

Paula Fernandes dos Santos

ESTUDOS SOBRE O PAPEL DE *INTERFERON STIMULATED GENE 15 (ISG15)* COMO UMA CITOCINA REGULADORA DA PRODUÇÃO DE INTERLEUCINA-10 EM MONÓCITOS HUMANOS

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. André Báfica

Florianópolis
2017

Santos, Paula Fernandes dos

Estudos sobre o papel de Interferon Stimulated Gene 15 (ISG15) como uma citocina reguladora da produção de interleucina 10 em monócitos humanos / Paula Fernandes dos Santos ; orientador, André Báfica, coorientador, Daniel Mansur, 2017.

167 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

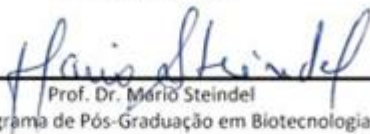
1. Biotecnologia e Biociências. 2. ISG15. 3. Interleucina-10. 4. Monócitos. 5. Tuberculose. I. Báfica, André. II. Mansur, Daniel. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Estudos sobre o papel de *Interferon Stimulated Gene 15 (ISG15)* como uma molécula reguladora da produção de interleucina-10 em monócitos humanos”

Por

Paula Fernandes dos Santos

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (17/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof. Dr. Mário Steindel

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



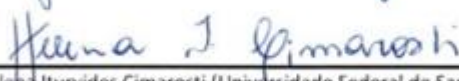
Dr. André Luis Barbosa Báfica (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



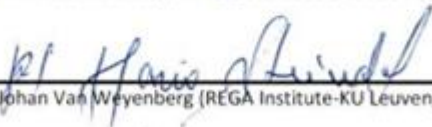
Dr. Aguinaldo Roberto Pinto (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Jamil Assreuy Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Helena Iturvides Cimarosti (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Johan Van Weyenberg (REGA Institute-KU Leuven)



Beatriz C. Bonorino (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do

Florianópolis, 30 de agosto de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca examinadora,

Ao Prof. André Báfica, pela orientação, pela disponibilidade, pelas críticas, pelas sugestões e pelo investimento nesse projeto,

Ao Prof. Daniel Mansur, pela orientação, pela disponibilidade, pelas críticas e sugestões, pelo incentivo diário, pelo investimento nesse projeto e pela participação que foi além da intelectual,

Ao Dr. Rodrigo Guabiraba, por ter realizado, no exterior, os experimentos iniciais que incentivaram esse projeto e por ter cedido reagentes para continuá-lo no Brasil,

A todos os colegas do Laboratório de Imunobiologia pela convivência e um agradecimento especial à Adara, Daniel Patrício, Murilo e Constanza pelas colaborações em experimentos,

Ao Prof. Aguinaldo Pinto do Laboratório de Imunologia Aplicada e ao Prof. Aristóbolo Silva da UFMG por terem participado da banca de qualificação desse projeto. Quero agradecer especialmente ao Prof. Aguinaldo por ter se disposto, em várias oportunidades, a ler meu trabalho ou assistir a seminários e contribuir com seus comentários e observações,

Ao Prof. Mário Steindel, ao Prof. Edmundo Grisard e à Prof^a Patrícia Stoco por cederem reagentes e o espaço do Laboratório de Protozoologia para alguns experimentos de biologia molecular,

Ao Prof. Zanetti do Laboratório de Imunologia Aplicada por ceder a linhagem de células Jurkat que foi utilizada nesse projeto,

À Professora Cláudia Simões do Laboratório de Virologia Aplicada por ceder linhagens de células que foram testadas nesse projeto,

Ao Dr. Brian Ferguson por ter colaborado nesse projeto e me recebido em seu laboratório para o doutorado sanduíche,

Ao Laboratório do Prof. Geoffrey Smith que trabalha em conjunto com o Laboratório do Dr. Ferguson e onde foram realizados alguns experimentos,

Ao Prof. Aristóbolo por ter cedido os anticorpos anti-p38 e anti-p-p38 que foram utilizados nesse trabalho,

Ao Dr. Johan Van Weienberg por ter cedido *beads* que foram utilizadas na separação de células no final desse projeto e pelas análises dos dados de transcriptoma que vieram a enriquecer esse estudo,

Ao Prof. Fernando Spiller por ter permitido o uso de equipamentos do seu laboratório que auxiliaram no andamento desse projeto,

À equipe do LAMEB pela disponibilidade e pontualidade,

Aos colegas de todos esses laboratórios pela convivência,

À minha família, em especial à minha mãe, que, agora no final, se desdobrou para cuidar das minhas outras responsabilidades enquanto eu escrevia essa tese.

RESUMO

A proteína ISG15 é o produto de um gene estimulado por interferons (IFN) do tipo I. Além de um papel de proteína semelhante à ubiquitina, ela é frequentemente descrita na literatura interagindo com o sistema imune, sendo capaz de regular proteínas que participam de vias de sinalização importantes como a JAK1, ERK1, STAT1 e RIG-I. ISG15 é também importante na resposta a infecções virais. Além dessas atividades intracelulares, ISG15 é secretada sendo capaz de induzir quimiotaxia em neutrófilos, estimular a proliferação de células NK, estimular a atividade citotóxica de monócitos e induzir a produção de IFN γ por linfócitos T e células NK. Os mecanismos responsáveis pela capacidade de ISG15 de ativar células e genes imunes são pouco conhecidos, diante disso, buscou-se investigar o papel de citocina dessa proteína e seus potenciais mecanismos de ação. Nessa tese, foi observado que ISG15 é capaz de induzir a produção de IL-10 em monócitos primários de forma dose-dependente. Além disso, utilizando dados de transcriptoma, foi observada uma correlação significativa entre células mielóides, ISG15 e IL-10 e entre células linfóides e IFN γ , essa última, corroborando estudos anteriores. Também com o auxílio dos bancos de dados, foi observado que a produção de IL-10 induzida por ISG15 está associada a MAPKs e PI3K em indivíduos saudáveis. Esse dado foi demonstrado com experimentos *in vitro*. Além disso, demonstrou-se que o eixo ISG15/IL-10 está amplificado em lesões causadas por *M. leprae*, mas ausente em indivíduos com tuberculose ativa embora ISG15 *per se* esteja fortemente correlacionada à inflamação e gravidade dessa patologia. Por último, com a finalidade de identificar um possível receptor de ISG15, ensaios de purificação por afinidade em tandem foram realizados utilizando ISG15 fusionada aos motivos STREP e FLAG e proteínas de membranas de leucócitos totais. A precipitação permitiu identificar alvos de ISG15 já descritos na literatura além de proteínas de membrana que podem atuar como possíveis receptores, porém outros estudos precisam ser realizados para avaliar um potencial mecanismo de sinalização desencadeado por essa ligação. Em conclusão, esse estudo determina a produção de IL-10 como uma nova atividade biológica para ISG15, propõe essa proteína como um marcador de gravidade da para infecções por micobactérias e sugere alvos de ISG15 presentes na superfície de leucócitos humanos que podem atuar como potenciais receptores dessa proteína.

Palavras-chave: ISG15. Interferon. IL-10. Tuberculose. *Mycobacterium*. Monócitos.

ABSTRACT

In humans, interferon stimulated gene (ISG) 15 deficiency may lead to inflammatory interferonopathies and mycobacterial disease, which has been previously linked to its extracellular cytokine-like activity. Here, a novel role for secreted ISG15 as IL-10 inducer, unique to human primary monocytes, is demonstrated. Moreover, a significant correlation of ISG15-induced monocyte/IL-10 and lymphoid/IFN γ expression, which was associated with p38 MAPK and PI3K signalling in healthy volunteers, was found employing targeted *in vitro* and *ex vivo* system analysis of novel and established human transcriptomic datasets. In human mycobacterial infections, the *ISG15/IL10* axis was amplified in leprosy, whereas ISG15 strongly correlated to inflammation and disease severity in active tuberculosis (TB). The specificity and MAPK/PI3K-dependence of ISG15-induced monocyte IL-10 production was confirmed *in vitro* using CRISPR/Cas9 knockout and pharmacological inhibitors. In this study, we have also attempted to identify a potential receptor using tandem affinity purification assays with ISG15 fused to STREP-FLAG motifs and membrane proteins from total leukocytes. This assay led to the identification of potential ISG15 receptors but other studies must be carried out to evaluate a signalling mechanism potentially triggered by this binding. In conclusion, this study determines the production of IL-10 as a new biological activity for ISG15, proposes this protein as a marker of severity of mycobacterial infections and suggests new ISG15 targets present on the surface of human leukocytes that can act as potential receptors.

Keywords: ISG15. Interferon. IL-10. Tuberculosis. Mycobacterium. Monocytes.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Vias de sinalização clássicas dos três tipos de IFN	26
Figura 2 - Produção de interferons do tipo I	29
Figura 3 - Comparação entre Ubiquitina e ISG15	34

REVISÃO

Figure 1 - An overview of free-ISG15 secretion and function in known target cells	50
---	----

MANUSCRITO

Figure 1 – ISG15 induces the production of IL-10 in human PBMCs.....	77
Figure 2 – CD14 ⁺ cells are the main source of IL-10 upon ISG15 stimulation.....	78
Figure 3 - ISG15 induces monocyte derived IL-10 via p38, MEK1/2 and PI3K signalling pathways, which are deregulated in human mycobacterial infections	79
Figure 4 - An anti-inflammatory <i>ISG15/IL10</i> myeloid axis is amplified in human leprosy and disrupted in human tuberculosis, revealing a novel clinical biomarker	80
Supplemental Figure 1	81
Supplemental Figure 2	82

ANEXO A - TENTATIVA DE IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE ISG15 E AVALIAÇÃO DO SEU PAPEL DE CITOCINA

Figura 1 - Identificação de alvos exclusivos dos fatores de transcrição STAT-1 a STAT-5 utilizando diagrama de Venn	112
Figura 2 - Análise da expressão de genes-alvo de fatores de transcrição de resposta a citocinas	114
Figura 3 - Citometria de fluxo de células CD14+ e CD14-separadas por coluna magnética	115
Figura 4 - Expressão de <i>CARD11</i> , <i>IFI16</i> , <i>IL-10</i> , <i>IκBα</i> e <i>IFNγ</i> em células CD14+ e CD14- tratadas com ISG15.....	117
Figura 5 - Expressão de <i>CARD11</i> , <i>IFI16</i> e <i>IκBα</i> em células CD14+ e CD14- tratadas com ISG15	118
Figura 6 - Quantificação de <i>IFNγ</i> em linhagens de células tratadas com ISG15.....	119
Figura 7 - Quantificação de <i>IL-10</i> em linhagens de células tratadas com ISG15	121
Figura 8 - <i>Western blot</i> utilizando anticorpo anti-FLAG para detecção da proteína <i>tag-ISG15</i>	122
Figura 9 - <i>Western blot</i> utilizando anticorpo anti-FLAG com proteínas precipitadas do meio de cultura de células HEK293T transfectadas com ISG15 para MoTAP	123
Figura 10 - Esquema da metodologia adaptada para o primeiro ensaio de purificação por afinidade em tandem	123
Figura 11 - <i>Western blot</i> e SDS-PAGE das frações obtidas no primeiro ensaio de purificação por afinidade em tandem.....	124
Figura 12 - <i>Western blot</i> e SDS-PAGE das frações obtidas no segundo ensaio de purificação por afinidade em tandem	125

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO:

Table 1 - PI3K gene expression enriched during latent tuberculosis	83
Table 2 - MAPK gene expression enriched during latent tuberculosis	86
Table 3 - Ingenuity Pathway Analysis for MAPK in monocytes during latent tuberculosis	88
Table 4 - p38 network in monocytes during active tuberculosis	89

ANEXO A:

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR	109
Tabela 2 - Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	<i>Activating Protein-1</i>
ATP	<i>Adenina trifosfato</i>
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
CARDIF	<i>CARD Adapter Inducing Interferon-β</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
cGAS	<i>Cyclic GAMP-AMP Synthase</i>
CRP	<i>C Reactive Protein</i>
DAI	<i>DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors</i>
dsRNA	<i>Double strand RNA</i>
EU	<i>Endotoxin Units</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic Initiation Factor 2α</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required For Transport</i>
ESR	<i>Erythrocyte Sedimentation Rate</i>
GAF	<i>Gamma Activation Factor</i>
GAS	<i>Gamma Activated-Sequences</i>
HBMEC	<i>Human Brain Microvascular Endothelial Cells</i>
HECT	<i>Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus</i>
HERC5	<i>HECT Domain and RCC1-Like Domain-Containing Protein 5</i>
IFIT	<i>Interferon-induced Tetratricopeptide protein</i>
IFITM	<i>Interferon-induced Transmembrane protein</i>
IFN	<i>Interferons</i>
IFNAR	<i>Interferon Alpha Receptor</i>
IFNGR	<i>Interferon Gamma Receptor</i>
IFNLR	<i>Interferon Lambda Receptor</i>
IL	<i>Interleucina</i>
IP-10	<i>IFN gamma-inducible protein 1</i>
IPS-1	<i>Interferon-β Promoter Stimulator Protein-1</i>
IRAK	<i>Interlekin-1 Receptor Associated Kinase</i>
IRF3	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i>
IRF7	<i>Interferon Regulatory Factor 7</i>
ISG	<i>Interferon Stimulated Gene</i>
ISGF3	<i>Interferon Stimulated Gene Factor 3</i>
ISRE	<i>Interferon Stimulated Response Element</i>
JAK1	<i>Janus Quinase I</i>
JNK	<i>Jun Quinase</i>
LDL	<i>Low-density Lipoprotein</i>

LPS	Lipopolissacarídeo
Mal	<i>MyD88 Adaptor-like</i>
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MAVS	<i>Mitochondrial Antiviral Signaling Protein</i>
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation–Associated Gene 5</i>
MDR	<i>Multidrug Resistance Glycoprotein</i>
MEKK1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
MIP-1	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1 α</i>
MKK4	<i>MAP kinase kinase mkk-4</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mx1	<i>Myxovirus resistance 1</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>
OAS	<i>2'-5'-Oligoadenilate Sintethase</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PIK3CA	<i>Subunidade catalítica de PI3K - isoforma alfa</i>
PIK3CB	<i>Subunidade catalítica de PI3K - isoforma beta</i>
PKR	<i>Protein Kinase R</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RIG-I	<i>Retinoic Acid–Inducible Gene 1</i>
RING	<i>Really interesting New Gene</i>
RLRs	<i>RIG-I – like Receptors</i>
RNAseL	<i>Ribonuclease L</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator Of Transcription</i>
STING	<i>Stimulator of Interferon</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
TB	<i>Tuberculose</i>
TBK1	<i>Tank-binding kinase 1</i>
TLR	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor Necrose Factor</i>
TRAF6	<i>TNF Receptor Associated Factor 6</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing-IFNβ</i>
tRNA	<i>RNA transportador</i>
mRNA	<i>RNA mensageiro</i>
Met	<i>Metionina</i>

GDP	<i>Guanosina Difosfato</i>
TYK2	<i>Tirosina Kinase 2</i>
UB	<i>Ubiquitina</i>
UbcH8	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme H8</i>
UbE1L	<i>Ubiquitin E1-like</i>
UBL	<i>Ubiquitin-like</i>
USP18	<i>Ubiquitin Specific Peptidase 18</i>
VISA	<i>Virus-induced Signaling Adaptor</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e a produção de interferon.....	25
1.2 Os IFNs sinalizam pela via JAK-STAT e induzem a expressão de ISGs	30
1.3 Genes Estimulados por Interferons (ISGs)	31
1.4 A proteína ISG15.....	32
1.5 ISG15 como UBL e o processo de ISGelação	33
1.6 Funções de ISG15 conjugada	35
1.7 Potenciais mecanismos de liberação da proteína ISG15	37
1.8 A proteína ISG15 como citocina	38
2. REVISÃO.....	40
REVISÃO PUBLICADA NO JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH, VOLUME 37, NÚMERO 6, 2017. DOI: 10.1089/JIR.2016.0103	40
3. OBJETIVOS	60
3.1 Objetivo Geral	60
3.2 Objetivos Específicos.....	60
4. MANUSCRITO	61
MANUSCRITO SUBMETIDO E SOB REVISÃO	61

5. DISCUSSÃO.....96

6. ANEXO A104

**TENTATIVA DE IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE ISG15 E
AVALIAÇÃO DO SEU PAPEL DE CITOCINA104**

OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS:144

7. REFERÊNCIAS DA DISCUSSÃO E DO ANEXO A.....152

Nota

Seguindo o artigo 64, seção V, capítulo VI do regimento deste curso de pós-graduação, o corpo principal desta tese inclui uma introdução redigida em língua portuguesa, artigos gerados redigidos em inglês e discussão e conclusão redigidas em língua portuguesa. Alguns dados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho não foram incluídos no artigo final e, a fim de manter a coesão do texto principal, foram restritos ao anexo, juntamente com outras publicações originadas de projetos paralelos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e a produção de interferon

A primeira linha de defesa contra patógenos em organismos vertebrados consiste em um conjunto de mecanismos inatos capazes de reconhecer e responder a infecções. Essa vertente do sistema imune é chamada “imunidade inata” e tem os interferons (IFNs) como alguns de seus mais importantes componentes.

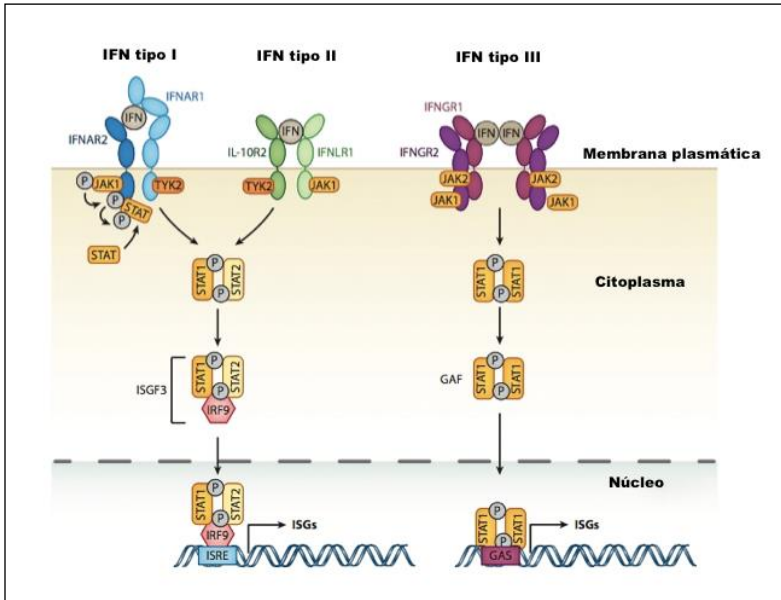
A primeira descrição dos interferons foi feita em 1957 por Isaacs e Lindenmann que demonstraram uma diminuição da capacidade de infecção de vírus influenza A em células de embriões de galinha quando estas eram previamente incubadas com vírus influenza inativados por calor. Sabe-se que os IFNs são, na verdade, uma família de proteínas constituída por diferentes tipos de interferons que participam de um complexo processo de comunicação intercelular com funções que vão além da defesa antiviral (revisado por Borden et al., 2007).

Atualmente, são conhecidas três classes de IFNs denominadas IFN tipo I, II ou III que participam de um complexo processo de comunicação intercelular com funções que vão além da defesa antiviral (revisado por McNab et al., 2015). Os IFNs do tipo I (IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN τ , IFN κ , IFN ω , IFN δ and IFN ζ) (Pestka et al., 2004) tem afinidade pelo receptor IFNAR (*Interferon Alpha Receptor*), um heterodímero formado pelas subunidades IFNAR1 e IFNAR2. Em humanos, existem 13 genes que codificam IFNs α e um gene que codifica cada um dos demais componentes do grupo (McNab et al., 2015).

Os IFNs do tipo III (IFN λ 1, λ 2 e λ 3, também conhecidos como as interleucinas IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente) possuem similaridade estrutural com os membros da família da interleucina IL-10 e tem afinidade pelo receptor IFNLR (*Interferon Lambda Receptor*), formado pelas subunidades IL10R2 e IFNLR1.

Ao contrário dos IFNs do tipo I e III que possuem mais de um representante, existe somente um IFN do tipo II, o IFN γ , que possui afinidade pelo receptor formado pelas subunidades IFNGR1 e IFNGR2 (revisado por Schneider, Chevillotte e Rice, 2014) (Figura 1).

Figura 1 - Vias de sinalização clássicas dos três tipos de IFN



(Adaptado de Schneider et al., 2014).

IFNs podem ser produzidos em pequenas quantidades por qualquer tipo celular, porém algumas células são capazes de produzi-los em maior quantidade. Os IFNs do tipo I, por exemplo, são produzidos principalmente por células dendríticas plasmacitóides (Siegal et al., 1999). Já o IFN do tipo II, é produzido majoritariamente por linfócitos Th1, células T CD8+ citotóxicas, células NK, NKT, linfócitos B e células apresentadoras de antígenos (revisado por Schroder et al., 2004). Os IFNs do tipo III são principalmente produzidos por monócitos, células dendríticas derivadas de monócitos e dendríticas plasmacitóides (revisado por Yin et al., 2012).

A produção de IFNs do tipo I e III é induzida quando Receptores de Reconhecimento de Padrão, os PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*), isto é, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lípidos ou proteínas de agentes causadores de infecções. Os PRRs de maior importância para a defesa antiviral e, portanto, para a produção de IFN, são os TLRs (*Toll-like Receptors*)² (Mansur et al., 2005), 3, 4, 7, 8 e 9 (revisado por Noppert et

al., 2007). O TLR4, que é ativado por LPS bacteriano e várias glicoproteínas em envelope viral, é o único TLR de superfície celular capaz de indução de IFN tipo I. Os TLRs intracelulares 3, 7, 8 e 9 estão localizados em membranas endossomais onde detectam ácidos nucleicos patogênicos e seus derivados. Atualmente, não há evidência para a indução de IFNs em resposta a TLRs 1, 2, 5 ou 6, que ativam as vias NFκB (do inglês *Nuclear Factor κB*) clássicas dependentes de MyD88 (do inglês *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*) para induzir citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e TNF (revisado por Noppert et al., 2007).

Brevemente, os TLR3 reconhecem RNAs dupla fita (dsRNA) presentes no ciclo de replicação de vírus de RNA e de DNA e ativam a proteína TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing-IFNβ*, onde TIR significa *Toll/Interleukin-1 Receptor*). TRIF, por sua vez, ativa as quinases IκB (IKKε) e TBK1 (*Tank-binding kinase 1*) que fosforilam IRF3 (do inglês *Interferon Regulatory Factor 3*) levando à sua dimerização e translocação para o núcleo. TRIF também induz a ativação de NFκB e AP-1 (*Activating Protein-1*). Essas três proteínas (IRF3, NFκB e AP-1) são os fatores de transcrição que regulam a expressão de IFNβ na célula (revisado por Kawasaki e Kawai, 2014).

A ativação do TLR4 ativará várias vias de sinalização intracelular. A via canônica requer as proteínas adaptadoras Mal (do inglês *MyD88 Adaptor-like*) e MyD88. IRAK1 e IRAK4 (do inglês *Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 1 e 4*) então associam-se ao complexo e IRAK1 é autofosforilado dissociando-se do complexo e ativando TRAF6 (do inglês *TNF Receptor Associated Factor 6*) que, subsequentemente, ativa TAK1 (do inglês *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*). TAK1, finalmente, ativa NFκB, p38 e JNK. Contudo, existe uma via alternativa que pode induzir IFN do tipo I. Essa via é independente de MyD88, mas dependente das proteínas adaptadoras TRIF e TRAM. Destas, TRIF se liga a TRAF6 e TBK1 que juntas ativam NFκB. TBK1 também é capaz de ativar IRF3, um importante fator de transcrição de IFN do tipo I (revisado por Noppert et al., 2007).

Os TLR7 (presente em humanos e murinos) e TLR8 (presente em humanos e inativo em murinos) reconhecem RNA de fita simples (e.g. vírus Influenza, Dengue e HIV) e RNA de origem bacteriana (Mancuso et al., 2009; Cervantes et al., 2011). A ativação de TLR7 leva ao recrutamento de MyD88 que então se complexa a IRAK1 (do inglês *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1*) e com a proteína, IRAK4

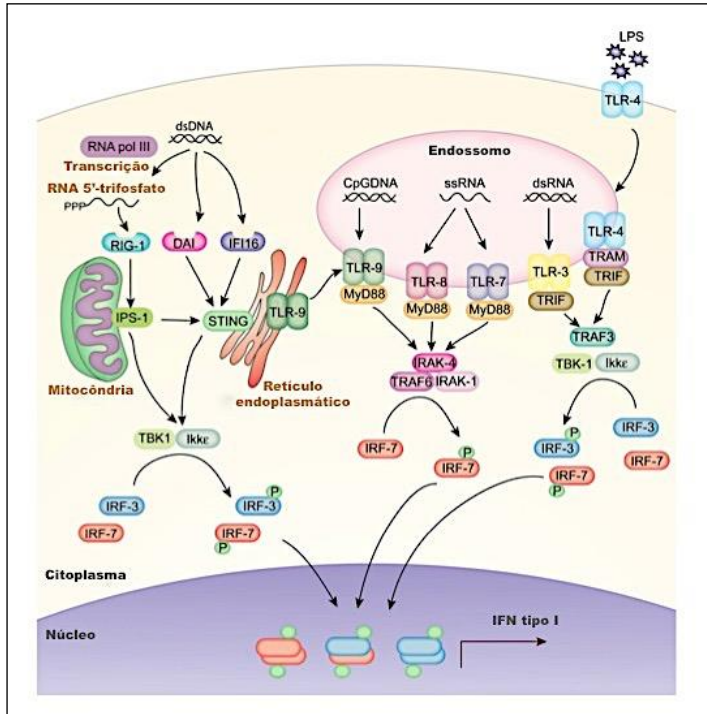
eTRAF6(do inglês *Tumor Necrosis Factor Receptor–Associated Factor 6*). Esse complexo,então, ativa TAK1 e, subsequentemente, NFκB. Outra via reportada, é a ativação de TRAF3 por TLR7 levando a um complexo formado por MyD88 e IRAK1 que fosforilam IRF7 (Fator Regulador de Interferon 7, do inglês *Interferon Regulatory Factor 7*). IRF7 fosforilado migra para o núcleo e induz a expressão de IFNs do tipo I. A fosforilação de IRF5 a partir da via de ativação de TLR7 também foi descrita (Schoenemeyer et al., 2005). Uma via específica para TLR8 não foi elucidada, e, como ambos TLR7 e TLR8 possuem os mesmos ligantes, assume-se, até o momento, que eles ativam as mesmas vias (revidado por Noppert et al., 2007).

Por último, osTLR9, que reconhecem DNA viral (e.g. Herpesvirus). Uma vez sensibilizados pelos respectivos PAMPs, TLR9 se complexa às proteínas MyD88,IRAK1, IRAK4 e TRAF6. Esse complexo ativa o fator de transcrição IRF7, que induz a produção de IFN α . IRF7 também ativaNFκB e AP-1 que, como descrito anteriormente, também auxiliam na regulação da expressão de IFN β (Bauer et al., 2008; Fuertes et al., 2013).

Um esquema da indução de IFN do tipo I via TLRs e outros PRRs, os quais serão abordados a seguir, está disponível na figura abaixo (**Figura 2**).

Os TLRs descritos acima são expressos por células componentes do sistema imune (células apresentadoras de antígenos, linfócitos B e T e células NK) e não explicam como outros tipos celulares também são capazes de reconhecer e responder a infecções virais. Essa pergunta foi esclarecida com a descoberta dos RLRs (*RIG-I – like Receptors*), sensores de ácidos nucleicos dispersos no citoplasma de praticamente todos os tipos celulares.

Figura 2 - Produção de interferons do tipo I



(Adaptado de Fuentes et al., 2013)

Os RLRs mais bem descritos até o momento são o RIG-I (*Retinoic Acid-Inducible Gene I*) (Yoneyama et al., 2004) e o MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated Gene 5*) (Andrejeva et al., 2004). Ambas são helicases de RNA que possuem dois domínios CARD (*Caspase Recruitment Domain*) na porção N-terminal e um domínio DExD/H (Asp-Glu-x-Asp/His) na porção C-terminal. Após se ligarem a um fragmento de RNA exógeno, RIG-I e MDA-5 são recrutadas pela proteína adaptadora IPS-1 (*Interferon-β Promoter Stimulator Protein-1*), também conhecida como VISA, CARDIF ou MAVS (*Virus-induced Signaling Adaptor; CARD Adapter Inducing Interferon-β; Mitochondrial Antiviral Signaling Protein*) (Kawai e Akira, 2009). IPS-1 está presente na membrana externa da mitocôndria e induz a ativação das quinases TAK1-IKKβ e TBK1/IKKε que ativam IRF3, IRF7 e NFκB, regulando a expressão de IFN (Figura 2) (Fuentes et al., 2013).

Após a descrição dos sensores de RNA, foram descritos também sensores de DNA que, assim como aqueles, são capazes de desencadear a produção de IFN do tipo I. O DAI (*DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors*) (Takaoka et al., 2007), a RNA polimerase III (Chiu, MacMillan e Chen, 2009), o DNA-PK (Ferguson et al., 2012), o IFI16 (Unterholzner et al., 2010) e o cGAS (*Cyclic GAMP-AMP Synthase*) (Ablasser et al., 2013) são exemplos de sensores que se ligam a moléculas de dsDNA que podem ser de origem endógena ou exógena, isto é, podem ser “próprio” ou “não próprio”. Uma vez ligados, aqueles receptores são recrutados pela proteína STING (*Stimulator of Interferon*) que está localizada na membrana do retículo endoplasmático (Ishikawa, Ma e Barber, 2009). STING ativa os fatores de transcrição IRF3 e IRF7 via TBK1, levando à expressão de IFNs do tipo I (revisado por Mansur, Smith e Ferguson, 2014).

1.2 Os IFNs sinalizam pela via JAK-STAT e induzem a expressão de ISGs

Uma vez expressos, esses IFNs são secretados e se ligam a seus receptores cognatos nas membranas de células vizinhas desencadeando nelas a ativação da via de sinalização JAK-STAT. Os IFNs do tipo I e III sinalizam pela mesma via. Nela, as proteínas Janus Quinase I (JAK1) e Tirosina Quinase 2 (TYK2) associadas aos receptores daqueles IFNs, fosforilam os fatores de transdução de sinal e de transcrição STAT1 e STAT2 que então migram para o núcleo e associam-se ao IRF9 formando um complexo chamado ISGF3 (*Interferon Stimulated Gene Factor 3*). Esse heterotrímero se liga a sequências consenso chamadas de ISRE (*Interferon Stimulated Response Element*) levando à transcrição de uma série de genes denominados ISGs (*Interferon Stimulated Genes*) (revisado por Schneider et al., 2014).

Diferentemente dos IFNs tipo I e III, que são majoritariamente induzidos por PAMPs, a produção do IFN do tipo II é induzida principalmente pela citocina IL-12 (Trinchieri et al., 1992). Durante uma infecção, macrófagos ativados produzem IL-12 e quimiocinas que atraem células NK e linfócitos. O estímulo de IL-12 sobre essas células levam-nas a produzir IFN γ (revisado por Schroder et al., 2004) A via de sinalização ativada por IFN γ também difere daquela dos IFNs do tipo I e III. Após a ligação do IFN γ a seu receptor cognato, as tirosinas quinases JAK1 e JAK2 a ele associadas recrutam e fosforilam um homodímero de

STAT1. Esse homodímero fosforilado é chamado GAF (*Gamma Activation Factor*) e é translocado para o núcleo onde se liga a elementos promotores chamados GAS (*Gamma Activated-Sequences*) e induz a transcrição de outros ISGs (revisado por Schneider et al., 2014). Alguns desses genes, dentre eles o ISG15, são de grande importância na defesa antiviral e serão discutidos em maior detalhe a seguir.

1.3 Genes Estimulados por Interferons (ISGs)

As respostas antivirais pelas quais os IFNs são um reflexo do painel dos genes induzidos por eles, os quais controlam a replicação e disseminação dos vírus entre as células (revisado por Schoggins, 2014). Os estudos para a determinação e classificação dos genes estimulados por interferon tiveram início há cerca de 40 anos (Knight e Korant, 1979; Friedman et al., 1984), mas somente na última década foram realizados estudos em larga escala que possibilitaram uma análise mais completa do painel de genes induzidos por interferons. Nesses estudos, mais de 300 ISGs já foram identificados (Der et al., 1998; de Veer et al., 2001; Schoggins et al., 2011) mostrando que o perfil de genes induzidos varia de acordo com o tipo de interferon (Der et al., 1998), com o patógeno (revisado por Ivashkiv e Donlin, 2014) e com a população de células analisada (Korant et al., 1984; Indraccolo et al., 2007; Waddell et al., 2010; Swiecki e Colonna, 2011). Neste item da introdução serão abordados apenas os ISGs induzidos por interferon do tipo I, pois é entre eles que se encontra o ISG15, alvo de interesse deste estudo.

Poucos ISGs tem sua função bem caracterizada atualmente. Dentre estes, os genes que codificam para as proteínas PKR (*Protein Kinase R*) (Zilberstein et al., 1978), Mx1 (*Myxovirus resistance 1*) (Haller e Kochs, 2011), OAS (*2'-5'-Oligoadenylate Synthase*) (Miyamoto, Jacob e Samuel, 1983) e RNaseL (*2'-5'-Oligoadenylate Synthase / Ribonuclease L*) (Squire et al., 1994), que são genes expressos exclusivamente na presença de IFN, tem seus mecanismos de ação muito bem descritos.

Resumidamente, a proteína PKR possui ação antiviral quando é expressa, porque compromete a síntese proteica da célula. Ela fosforila o fator eIF2 α inativando-o e impedindo o início da síntese proteica uma vez que o eIF2 α é um fator que se liga ao complexo tRNA-Met-GDP (RNA transportador - Metionina - Guanosina Trifosfato) e que é importante para a ligação desse complexo ao ribossomo no início

dasíntese proteica. Enquanto a PKR atua isoladamente, a proteína OAS atua em conjunto com a RNaseL. A OAS metaboliza e polimeriza moléculas de ATP (Adenina trifosfato) formando polímeros 2'-5' de adenilatos. Os oligoadenilatos ativam a RNaseL (*Ribonuclease L*) que então degrada o RNA viral (revisado por Munir e Berg, 2014).

Além desses, outros ISGs tem sido intensamente investigados mais recentemente, mas seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados. Dois interessantes exemplos são as famílias de proteínas IFIT (*Interferon-induced Tetratricopeptide protein*) e IFITM (*Interferon-induced Transmembrane protein*). Resumidamente, a família IFIT é composta por 4 genes regulados por interferons em humanos: IFIT1, 2, 3 e 5, também conhecidos por ISG56, ISG54, ISG60 e ISG58. Essas proteínas inibem a infecção viral suprimindo a tradução de proteínas, ligando-se a moléculas de RNA desprovidas de CAP e impedindo a mobilidade de proteínas ou RNAs virais no citoplasma da célula infectada (revisado por Diamond e Farzan, 2013). Já a família IFITM é composta por 3 membros em humanos (IFITM1, 2 e 3) e sabe-se que essas proteínas são importantes para a defesa contra influenza A e outros vírus envelopados (revisado por Diamond e Farzan, 2013). Elas impedem a infecção comprometendo etapas que ocorrem anteriormente à fusão do vírus na célula, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está esclarecido. Vale também ressaltar que pouco se sabe sobre o papel de genes IFIT e IFITM na defesa contra outros patógenos como bactérias e parasitos (revisado por Diamond e Farzan, 2013).

Outro ISG que tem sido abordado em muitos estudos recentes é o ISG15. Ele codifica para uma proteína de 15 kDa que é importante na defesa antiviral em camundongo e à qual foi atribuída também a capacidade de estimular células do sistema imune. A possibilidade da descrição de uma nova citocina despertou o interesse de muitos grupos que se empenharam na purificação e caracterização dessa proteína a fim de elucidar suas funções. Os resultados destes trabalhos serão descritos ao longo da introdução.

1.4A proteína ISG15

A proteína ISG15 foi inicialmente descrita em 1979 por Farrell e colaboradores que observaram um polipeptídeo de 15 kDa que se acumulava no citoplasma de células de tumor ascítico de Erlich tratadas com IFN (Farrell et al., 1979). Nas duas décadas seguintes, vários outros

estudos dedicaram-se a caracterizar essa nova proteína demonstrando que sua produção é estimulada por IFN α , IFN β e, em menor escala, por IFN γ (Haas et al., 1987; Korant et al., 1984). Além disso, foi demonstrado que ela é expressa por células imunes e não imunes de humanos e outros vertebrados (D’Cunha et al., 1996b; Loeb e Haas, 1992) e que ela é sintetizada em uma forma precursora de 17 kDa que é rapidamente clivada perdendo a metionina N-terminal (Blomstrom et al., 1986) e oito aminoácidos C-terminais dando origem à forma madura da proteína (Knight et al., 1988).

ISG15 possui dois principais papéis: o de proteína similar a ubiquitina (UBL, do inglês ubiquitin-like protein) (Haas et al., 1987; Loeb e Haas, 1992) que é capaz de se ligar a proteínas alvo regulando a sua função, um processo denominado *ISGelação* (Zhang e Zhang, 2011) e o de proteína com efeito de citocina, uma vez que ela é secretada e capaz de ativar células do sistema imune (D’Cunha et al., 1996a; Recht et al., 1991).

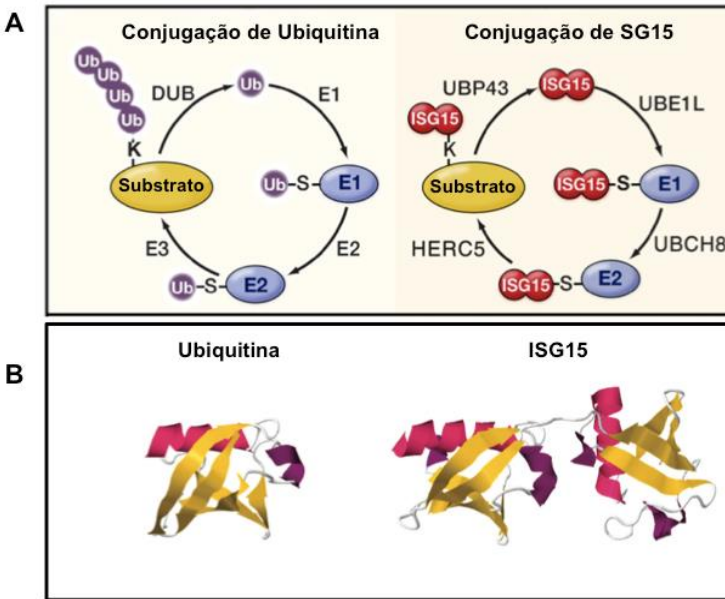
O papel de UBL de ISG15 tem sido amplamente estudado e parece estar correlacionado principalmente à atividade antiviral dessa proteína. Já o papel de citocina de ISG15, a forma livre da proteína que atua independente do processo de ISGelação, ainda é pouco explorado.

1.5 ISG15 como UBL e o processo de ISGelação

ISG15 foi a primeira UBL a ser descrita em 1987 (Haas et al., 1987). Ela possui 50% de similaridade com ubiquitina em sua sequência aminoacídica e, além disso, ambas terminam com o motivo LRLRGG (Leucina-Arginina-Leucina-Arginina-Glicina-Glicina) onde a glicina C-terminal é capaz de se ligar à proteínas-alvo (Haas et al., 1987) com o auxílio de três enzimas (Staub, 2004) genericamente conhecidas como E1 (enzima de ativação), E2 (enzima de conjugação) e E3 (ligase) (Liu et al., 2013). As enzimas E1 possuem um domínio catalítico que se liga à UBL em uma ligação dependente de ATP e um domínio que interage com a enzima E2 (Streich e Lima, 2014). As enzimas E2 possuem um domínio de conjugação com a UBL e um domínio de ligação capaz de interagir tanto com enzimas E1 quanto E3 (Reverter e Lima, 2005) que lhe permite transferir a UBL de E1 para E3. Já as enzimas E3 podem ser divididas em dois principais tipos: as que possuem um domínio HECT e as que possuem um domínio RING. As ligases HECT possuem um sítio para ligação da UBL e outro para a ligação da proteína-alvo. Após a

ligação dos substratos a esses dois sítios ativos, a UBL é transferida para o alvo. Já as RING, possuem somente sítio de ligação para a UBL e a transfere diretamente de E2 para a proteína-alvo. Em humanos existem 28 HECT E3 ligases e mais de 600 RING ligases E3 identificadas até o momento (Metzger et al., 2014).

Figura 3 - Comparação entre Ubiquitina e ISG15. (A) Processos de conjugação de ubiquitina e ISG15 (adaptado de Skaug e Chen, 2010). (B) Estrutura terciária dessas proteínas.



(Adaptado de Bogunovic et al., 2013).

A enzima E1 do ciclo de conjugação de ISG15 (ou ISGelação) é a UBE1L (do inglês Ubiquitin E1-like) (Yuan e Krug, 2001), a E2 é a UbcH8 (Zhao et al., 2004) e a E3 é a HERC5 (Dastur et al., 2006; Wong et al., 2006). Esse processo é reversível e a enzima USP18 é a peptidase capaz de remover os resíduos de ISG15 das proteínas-alvo (Malakohv et al., 2002). É interessante observar que, juntamente com ISG15, todas as enzimas que fazem parte do processo de ISGelação são também genes estimulados por IFN (Wong et al., 2006; Yuan e Krug et al., 2001; Zhao et al., 2004; Zou et al., 2006). Além disso, algumas enzimas dos ciclos

de conjugação de diferentes UBLs ou da própria ubiquitina podem ser redundantes. Por exemplo, UbcH8 e HERC5 participam tanto do ciclo de ubiquitinação quanto do ciclo de ISGelação (Zhao et al., 2004; Dastur et al., 2006).

1.6 Funções de ISG15 conjugada

Mais de 300 alvos de ISG15 foram identificados até o momento (Giannakopoulos et al., 2005; Wong et al., 2006; Zhao et al., 2005), mas poucos tiveram o papel biológico dessa interação foi elucidado. A maioria dos estudos que investigaram o efeito da ligação de ISG15 a alvos intracelulares mostraram que essa interação tem um papel importante na regulação de determinadas vias de sinalização e na proteção antiviral.

Lu e colaboradores (2006) mostraram que ISG15 se liga a IRF3 (do inglês *Interferon Regulatory Transcription Factor 3*) (Lu et al., 2006) impedindo a ligação de ubiquitina a esse fator de transcrição e, consequentemente, inibindo sua degradação e prolongando a produção de IFN do tipo I (Shi et al., 2010). Além disso, ISG15 também se liga à proteína PKR (Proteína Kinase R, do inglês *Protein Kinase R*). A PKR é um ISG e é ativada por RNA dupla-fita virais (Sadler e Williams, 2007), mas pode ser também ativada por ISG15 na ausência desse estímulo (Okumura et al., 2013). A PKR ativada fosforila eIF2 α (do inglês *Eukaryotic Initiation Factor 2 α*) inibindo a tradução de proteínas. Nesse contexto, Okumura e colaboradores (2013) observaram que a ligação de ISG15 à PKR reduz a tradução de proteínas em células HEK293T. Outro alvo de ISG15 é o sensor de RNA RIG-I. Quando ativado, RIG-I induz a ativação de IRF3 e NF κ B. Alienação de ISG15 a RIG-I reduz a resposta de ambos IFN do tipo I e NF κ B em células murinas (Kim et al., 2008). Ainda na via de NF κ B, foi observado que ISG15 se liga a Ubc13 (Takeuchi et al., 2005), uma proteína E2 do ciclo de ubiquitinação. Juntamente com a ligase TRAF6, Ubc13 faz a conjugação de ubiquitina à proteína TAK1 que então ativa o complexo IKK. Posteriormente a esse evento, I κ B é degradado pelo proteossoma liberando NF κ B para translocação para o núcleo. A presença de ISG15 reduz a ubiquitinação de TRAF6 e a ativação de NF κ B (Minakawa et al., 2008). Por último, ISG15 também se liga à proteína filamina B (Jeon et al., 2009), uma proteína que serve para o ancoramento de RAC1, MEKK1, MKK4 e JNK formando um complexo que facilita a sinalização de IFN do tipo I

(Jeon et al., 2009). A ligação de ISG15 a filamina B inibe a formação desse complexo e, conseqüentemente, reduz a resposta de IFN do tipo I (Jeon et al., 2009).

Além de se ligar a proteínas da célula regulando vias de sinalização, ISG15 se liga a proteínas virais ou proteínas do hospedeiro envolvidas no ciclo de replicação viral. Okumura et al. (2006) mostraram que ISG15 inibe a ubiquitinação das proteínas Gag do provírus HIV-1 e Tsg101 do ESCRT reduzindo a eficiência do brotamento viral para HIV-1. Posteriormente, foi demonstrado que ISG15 também inibe a ubiquitinação da proteína VP40 do vírus Ebola. Ela se liga à enzima Nedd4, uma ligase de ubiquitina tornando-a incapaz de ubiquitinar as proteínas virais. Sem a conjugação com a ubiquitina o vírus não consegue associar-se ao ESCRT e perde a eficiência do brotamento (Okumura et al., 2008; Malakhova e Zhang, 2008). Zhao e colaboradores (2010) mostraram que ISG15 se liga à lisina (K41) da proteína NS1 do vírus Influenza A impedindo que ela interaja com a proteína importina- α . Sem interagir com a importina, a NS1 não consegue conduzir o RNA viral para o núcleo da célula para ser replicado e a taxa de infecção é reduzida (Zhao et al., 2010). Em outro estudo, Tang et al. (2010) mostraram que mutações em aminoácidos de lisina da NS1 reduzem a ligação de ISG15 pela E3 HERC5. As ligações de ISG15 às lisinas 126 e 217 da NS1 mostraram-se muito importantes no controle da infecção, uma vez que vírus mutados nessas posições apresentavam maior replicação viral *in vitro* e maior virulência *in vivo*. Complementando esses dados, Durfee et al. (2010) demonstrou que HERC5 e polissomos estão co-localizados sugerindo que ela conjuga ISG15 às proteínas virais recém-sintetizadas.

Embora esses e outros estudos tenham sugerido que ISG15 está associada à proteção contra infecções virais em modelos celulares humanos (Morales e Lenschow, 2013), trabalhos recentes com indivíduos que possuem formas truncadas de ISG15 mostraram que os mesmos não apresentam maior susceptibilidade a uma série de vírus quando comparados a indivíduos normais (Bogunovic et al., 2012; Speer et al., 2016; Zhang et al., 2015). Esse papel se deve a uma forma de ISG15 livre, que pode ou não ser secretada, e será descrita a seguir.

1.7 Potenciais mecanismos de liberação da proteína ISG15

A proteína ISG15 não está confinada ao meio intracelular e vários trabalhos já demonstraram que ela pode ser liberada por diferentes tipos celulares como células primárias (neutrófilos, monócitos, linfócitos, plasmablastos) e células de linhagem de origem imune (THP-1, Raji e Jurkat) e não imune (OVCAR-3 e A549) (Bogunovic et al., 2012; Care et al., 2016; D’Cunha et al., 1996b; Knight e Cordova, 1991). ISG15 também já foi detectada no soro de indivíduos após a administração de IFN β (D’Cunha et al., 1996b) e em pacientes com vírus da Hepatite B (HBV do inglês Hepatitis B virus) (Hoan et al., 2016).

Apesar da presença de ISG15 no meio extracelular, poucos contemplaram possíveis métodos de transporte dessa proteína. D’Cunha e colaboradores (1996b) sugeriram que ISG15 não era secretada pela via clássica de transporte de proteínas (i.e. pelo complexo de Golgi) ou via glicoproteína de resistência a múltiplas drogas (MDR, do inglês *Multidrug Resistance Glycoprotein*), que é uma via não clássica ou alternativa de transporte. Isso levou os autores a compararem ISG15 com IL-1 β . Assim como IL-1 β (Auron et al., 1984; Rubartelli et al., 1990), ISG15 é sintetizada em uma forma precursora que é clivada originando a forma madura (Knight et al., 1988); não possui peptídeo sinal (Knight e Cordova, 1991) e não é secretada pela via clássica (D’Cunha et al., 1996b).

Foi demonstrado anteriormente que IL-1 β pode ser secretada via lisossomos (Rubartelli et al., 1990), liberação de microvesículas (MacKenzie et al., 2001; Pizzirani et al., 2007), pela exocitose de exossomos (Qu et al., 2007) e pela liberação de células em processo de apoptose (Hogquist et al., 1991). Quanto a ISG15, evidências observadas em alguns trabalhos sugeriram que ela pode ser secretada por neutrófilos através de seus grânulos ou ainda por microvesículas. Bogunovic et al. (2012) mostraram que ISG15 está co-localizada com grânulos de gelatinase em neutrófilos. Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem em um sítio de infecção de são capazes de produzir uma série de citocinas e quimiocinas que são importantes para o início da resposta inflamatória (Lacy e Stow, 2011). As citocinas IL-8, IL-6 e IL-1 β , por exemplo, estão presentes em grânulos de gelatinase (Naegelen et al., 2015). Além de grânulos de gelatinase, ISG15 foi encontrada em microvesículas liberadas por macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Interessantemente, adição de micropartículas contendo ISG15 a macrófagos não infectados, levou a um aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, de quimiocinas

como MIP-1 α (do inglês, *Macrophage Inflammatory Protein-1 α*) e IP-10 (*IFN gamma-inducible protein 10*) e induziu um aumento de expressão de ISG15 juntamente a outros ISGs tais como IFIT1, IFIT2 e IFIT3 (Hare et al., 2015). Indiretamente corroborando esses resultados, ISG15 também foi encontrada em exossomos liberados por células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC, do inglês *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*). Macrófagos primários são capazes de internalizar exossomos, um evento que leva ao aumento da expressão de ISGs (Sun et al., 2016). É importante observar que não somente neutrófilos, mas também monócitos, células T, cDC, pDC e células NK apresentam uma produção basal de ISG15 independente de IFN γ (Bogunovic et al., 2012) sugerindo que essas células produzem e podem ser capazes de secretar ISG15 em circunstâncias fisiológicas.

1.8 A proteína ISG15 como citocina

Por definição, uma citocina é uma proteína pequena e sintetizada por células que afeta o comportamento de outras células mediante ligação a receptores específicos presentes na superfície dessas células (Murphy e Weaver, 2016). ISG15 é secretada e capaz de induzir efeitos em determinadas células imunes, porém não se sabe ainda se há um receptor específico para essa proteína ou quais são os mecanismos pelos quais ela induz a ativação de determinadas células.

Os grupos que estudam ISG15 consideram que é possível que a proteína possua um receptor específico e ainda desconhecido a partir do qual sejam ativadas vias de sinalização que lhe permitam aumentar a citotoxicidade de monócitos primários estimulados com LPS (Recht et al., 1991), induzir a produção de IFN γ (Recht et al., 1991) e aumentar a proliferação de células NK (D’Cunha et al., 1996a). Outro cenário sugerido, é que ISG15 atue através do receptor de IL-12, uma vez que um efeito sinérgico entre IL-12 e ISG15 foi descrito para a produção de IFN γ (Bogunovic et al., 2012). Uma terceira hipótese, ainda, é que ISG15 se ligue a uma molécula de superfície que não seja um receptor, mas que lhe permita desencadear suas funções imunes. CD36, por exemplo, é uma molécula de superfície que atua facilitando a endocitose de ligantes solúveis como β -amiloide, LDL oxidado (do inglês *Low-density Lipoprotein*) e ilhas de polipeptídeos de amiloide (IAAP, do inglês *Islet Amyloid Polypeptides*), que induzem ativação do inflamassoma-NLRP3 uma vez que estão dentro da célula (Sheedy et al.,

2013). Outra possibilidade é que ISG15 não interaja diretamente com nenhuma proteína de superfície e, sim, que entre na célula por meio de microvesículas e/ou grânulos liberados de macrófagos e neutrófilos. Essas estruturas podem ser capturadas pelas células em que ISG15 exerce sua função (Hare et al., 2015), tais como células T, NKs e monócitos.

ISG15 é uma aquisição evolutiva recente dos vertebrados e ainda há um longo caminho a percorrer antes que se possa desvendar por completo o espectro de suas ações (Zhang e Zhang, 2011). Há várias evidências que mostram que essa proteína participa de uma gama de processos celulares e doenças, mas os mecanismos moleculares responsáveis pelos mesmos ainda não foram totalmente elucidados abrindo um novo panorama de questionamentos sobre ISG15. Além disso, ISG15 é capaz de induzir ativar células imunes sugerindo que ela possui um papel de citocina e que pode ter um receptor ainda a ser identificado.

Durante experimentos iniciais com o intuito de identificar o possível receptor de ISG15 em células primárias humanas, observamos que a adição de ISG15 solúvel a culturas de PBMC levou a produção principalmente de IL-10. Como tal resultado foi inesperado e surpreendente, o presente trabalho de tese concentrou na caracterização da relação entre ISG15 e IL-10. Portanto, a presente tese será apresentada sob forma demanuscrito contendoos achados sobre o foco principal deste documento.

2. REVISÃO

Revisão publicada no Journal of Interferon & Cytokine Research, volume 37, número 6, 2017. DOI: 10.1089/jir.2016.0103

Beyond ISGylation: functions of free intracellular and extracellular ISG15

Paula Fernandes dos Santos and Daniel Santos Mansur

Departament of Microbiology, Immunology and Parasitology, University of Santa Catarina, Campus Trindade, Centro de Ciências Biológicas, Bloco A, sala 213, Santa Catarina, Brazil. CEP 88040-900

Corresponding author: Daniel Santos Mansur

Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, University of Santa, Campus Trindade, Centro de Ciências Biológicas, Bloco A, sala 213, Santa Catarina, Brazil. CEP 88040-900. Contact number: +55 (48) 3721-5203

Abstract

ISG15 is a ubiquitin-like type I IFN-stimulated protein of 15 kDa and is one of the most prominent expressed proteins in viral infections. ISG15 is widely known to be involved in a process called ISGylation, where it binds to over 150 targets from a variety of classes of proteins including central immune signaling pathways such as those mediated by NF κ B, JNK and IRF-3. However, ISG15 also exists in a free form that can act intra or extracellularly. *In vitro* and *in vivo* evidences suggest that free ISG15 play different roles in several cellular processes, from cancer and defense against viral infections to activation of immune cells such as lymphocytes, monocytes and NK cells. This review discusses the roles of free intracellular and secreted ISG15 approaching questions yet to be answered about the mechanism of action of this protein.

Introduction

In the context of viral infection, type I interferons (IFN α and β) are secreted by infected cells and bind to their cognate receptors on the surface of neighboring cells where they initiate the JAK-STAT signaling pathway (Schreiber and Piehler 2015). This pathway leads to the

induction of over 300 genes called ISGs (Interferon-stimulated genes), which have different functions such as nucleic acid sensors, signal transducers and signal activators (de Veer and others 2001) and together confer an antiviral state to the host cells.

The interferon-stimulated gene of 15 KDa (ISG15) is amongst the 10 most expressed ISGs (Der and others 1998). The first description of ISG15 was made in 1979 by Farrell and colleagues who observed a polypeptide of approximately 15 KDa accumulating in the cytoplasm of IFN-treated Erlich ascite tumour cells (Farrell and others 1979). After that, a series of studies published in the 80s and 90s allowed further characterization of this protein demonstrating that it is induced by IFN α , IFN β and, to a lesser extent, IFN γ (Haas and others 1987; Korant and others 1984), that it is expressed by human and other vertebrates immune and non-immune cells (D'Cunha and others 1996b; Haas and others 1987; Loeb and Haas 1992; 1994) and, finally, that it is synthesized as a 17 KDa precursor that has its N-terminal methionine (Blomstrom and others 1986) and eight C-terminal amino acids cleaved to produce the mature form of the protein (Knight and others 1988).

ISG15 has two main functions: a ubiquitin-like function where the protein is able to bind and regulate target proteins (Haas and others 1987; Loeb and Haas 1992; 1994) and a free form function, which can be secreted or act inside the cell and has been mainly associated with cytokine production and activation of immune cells (D'Cunha and others 1996a; Recht and others 1991). ISGylation has been the most studied function leaving the mechanism of action of the free form of ISG15 with several questions yet to be answered and which we will address in this review.

Intracellular roles of ISGylation

ISG15 was the first ubiquitin-like protein to be described. It was so classified because it has two domains with around 50% similarity to the amino acid sequence of ubiquitin and a C-terminal sequence LRLRGG where the last glycine binds to lysine residues in target proteins (Haas and others 1987). For both ubiquitin and ISG15 this binding is mediated by three enzymes commonly referred to as E1 (activating enzyme), E2 (conjugating enzyme) and E3 (ligase) (Liu and others 2013). The binding of ISG15 is performed by the E1 Ube1L (Yuan and Krug 2001),

the E2 UbcH8 (Zhao and others 2004) and the E3 Herc5 (Dastur and others 2006; Wong and others 2006). This process is collectively known as ISGylation and these enzymes and USP18, an enzyme able to remove ISG15 from target proteins (Malakhov and others 2002) are, as ISG15, interferon-stimulated genes (Wong and others 2006; Yuan and Krug 2001; Zhao and others 2004; Zou and others 2007).

Over 150 intracellular ISG15 targets have been identified (Giannakopoulos and others 2005; Wong and others 2006; Zhao and others 2005) but only a restricted number have had the biological function of this interaction elucidated. Most of these studies have shown that the binding of ISG15 can affect important signaling pathways involved in immune regulation such as IFN, NF κ B and JNK pathways. Of note, IRF3 (Interferon Regulatory Transcription Factor 3), a key transcriptional regulator of type I IFN-dependent responses, is one of ISG15 targets (Lu and others 2006). The binding of ISG15 to IRF3 inhibits its degradation by the proteasome leading to a more prominent IFN response in human cells (Shi and others 2010). ISG15 also binds to PKR (Protein Kinase R). PKR is an IFN-inducible protein kinase that is activated by double-stranded RNA (Sadler and Williams 2007) and can be activated by ISG15 in the absence of viral RNA (Okumura and others 2013). Activated PKR is known to inhibit protein translation by phosphorylating eIF2 α (eukaryotic Initiation Factor 2 alpha) and the activation of PKR by ISG15 leads to a reduction in protein translation in HEK293T cells (Okumura and others 2013). Another ISG15 target is RIG-I (Retinoic Acid-Inducible Gene I), a RNA sensor which signal leads to the activation of IRF3 and NF κ B. The binding of ISG15 to RIG-I reduces type I interferon promoter activity and NF κ B response in mice cells (Kim and others 2008). Still on the NF κ B pathway, ISG15 binds to Ubc13 (Takeuchi and Yokosawa 2005), a ubiquitin conjugating enzyme that participates in the ubiquitination of TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1). The presence of ISG15 inhibits TAK1 ubiquitination leading to a negative regulation of the NF κ B pathway (Minakawa and others 2008). Last, ISG15 binds to filamin B (Jeon and others 2009). Filamin B serves as a scaffold for RAC1, MEKK1, MKK4 and JNK facilitating IFN signaling (Jeon and others 2008) and binding of ISG15 to filamin B prevents the formation of that scaffold and, in consequence, diminishes IFN response (Jeon and others 2009).

Besides regulating specific signaling pathways, ISG15 also binds to viral

proteins and it has been suggested that this protein has an important role in the response against viral infections in humans and mice. For instance, it has been demonstrated that ISG15 binds to HIV-1 Gag protein and to the Tsg101 protein from the ESCRT system (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) compromising viral budding in 293T cells (Okumura and others 2006). Also, ISG15 binds to Nedd4, a ubiquitin ligase, inhibiting the ubiquitination of Ebola VP40 protein. The lack of ubiquitination of VP40 avoids viral association with the ESCRT machinery reducing viral budding in 293T cells (Malakhova and Zhang 2008; Okumura and others 2008). In addition, binding of ISG15 to NS1 from Influenza A has also been reported and reduces viral propagation in human cell lines (Tang and others 2010). According to Zhao and colleagues, ISG15 is able to control Influenza infection because it inhibits the conjugation of NS1 to importin- α and abrogates the transport of viral RNA to the nucleus where it should be replicated (Zhao and others 2010).

Although these and other studies have suggested that ISGylation is associated to protection against viral infections in humans *in vitro* (Morales and Lenschow 2013), works with individuals carrying a truncated and inactive form of ISG15 showed that they do not have increased susceptibility to several viruses (Bogunovic and others 2012; Speer and others 2016; Zhang and others 2015) when compared to normal individuals. These studies, which will be discussed in depth later on, showed that the absence of ISG15 increases a type I IFN response that would otherwise be regulated in normal individuals in a way dependent of ISG15 but independent of ISGylation. These results have driven the spotlight from ISGylation to free ISG15, giving opportunity to discuss how the free intracellular and extracellular forms of this protein participate in biological events.

The roles of free intracellular and extracellular ISG15

ISG15 is produced and secreted by several different types of cells including human primary monocytes, lymphocytes, neutrophils, plasmablasts and immune (THP-1, Raji, Jurkart) and non-immune cells lines (OVCAR-3 and A549) after type I IFN treatment (Bogunovic and others 2012; Care and others 2016; D'Cunha and others 1996b; Knight and Cordova 1991). Interestingly, ISG15 has been detected in the serum of patients after administration of IFN β (D'Cunha and others 1996b) and

of patients with HBV (Hepatitis B virus) infection (Hoan and others 2016).

Only a few studies have contemplated potential ISG15 secretion pathways. Using inhibitors of cellular secretory processes, D'Cunha and collaborators suggested that ISG15 was not secreted by the Golgi complex, which is the classical protein transport pathway, or by the MDR (Multidrug Resistance) glycoprotein, one of the non-classical pathways. This data led the authors to associate ISG15 with the pro-inflammatory cytokine IL-1 β (Interleukin-1 β) (D'Cunha and others 1996b). As IL-1 β (Auron and others 1984; Rubartelli and others 1990), ISG15 is synthesized from a larger precursor (Knight and others 1988), lacks a secretory signal peptide (Knight and Cordova 1991) and is not secreted by the classical pathway (D'Cunha and others 1996b) (Figure 1).

It has been shown previously that IL-1 β can reach the extracellular environment through secretory lysosomes (Rubartelli and others 1990), shedding of plasma membrane microvesicles (small membranous particles of 100–1000 nm thought to provide a communication network between host cells) (MacKenzie and others 2001; Pizzirani and others 2007), exocytosis of exosomes (Qu and others 2007) and through apoptosis (Hogquist and others 1991). As for ISG15, neutrophil granules and microvesicles have been reported as potential secretion pathways. ISG15 co-localizes with gelatinase and secretory granules in neutrophils (Bogunovic and others 2012) suggesting the most likely ISG15 secretion pathway in granulocytes. Neutrophils are the first cells to arrive at the site of infections and are able to produce several cytokines and chemokines that are important for the initial inflammatory response (Lacy and Stow 2011). IL-8, IL-6 and IL-1 β are examples of cytokines that have also been detected inside neutrophil gelatinase granules (Naegelen and others 2015). Besides gelatinase granules, ISG15 was found in microvesicles released from *Mtb* infected macrophages. Interestingly, addition of ISG15-containing microparticles to uninfected macrophages increased the secretion of the pro-inflammatory cytokine and chemokines IL-8 (Interleukin-8), MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 α) and IP-10 (IFN gamma-inducible protein 10) and induced the expression of more ISG15 along with other ISGs such as IFIT1, IFIT2 and IFIT3 (Interferon Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 1, 2 and 3) (Hare and others 2015). ISG15 has

also been found in exosomes released by TLR3-activated HBMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cells). Primary macrophages are able to internalize these exosomes, an event that leads to an increase in the expression of ISG mRNAs and proteins, including ISG15 itself (Sun and others 2016). It is important to note that not only neutrophils but also monocytes, T cells, cDC, pDC and NK cells all had a constitutive production of ISG15 protein even in the absence of type I IFN (Bogunovic and others 2012) suggesting they produce and might be able to secrete ISG15 in physiological circumstances (Figure 1).

Once secreted, ISG15 is able to modulate the function of different immune cells. It has been demonstrated that this protein increased the cytotoxicity of LPS-stimulated primary monocytes (Recht and others 1991), induced the production of IFN γ (Recht and others 1991), augmented NK cell proliferation in a B lymphocyte-depleted primary culture without inducing the production of IL-2 or IL-12 (D'Cunha and others 1996a) and had chemo-attractant properties to murine neutrophils (Owhashi and others 2003) (Figure 1).

The production of IFN γ induced by free extracellular ISG15 is an important function of this protein. Individuals carrying mutations in ISG15 can develop MSMD (Mendelian Susceptibility to Mycobacterium Disease) (Bogunovic and others 2012), a rare condition that makes the subject predisposed to severe clinical symptoms when infected even with less pathogenic species of mycobacteria including the BCG (Bacille Calmette-Guérin), used for *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) vaccination. The lack of a functional ISG15 results in lower IFN γ production, a cytokine known to promote macrophage activation, which in turn, is crucial for protection against *Mtb* (Flynn and others 1993). Bogunovic and collaborators demonstrated that treatment with recombinant ISG15 rescued IFN γ production by total leukocytes from ISG15-deficient subjects *in vitro*. In this system, NK cells were the major producers of IFN γ among PBMCs treated with ISG15 and, in addition, this protein worked synergistically with IL-12 without increasing the expression of IL-12 receptor subunits in T or NK cells. It is important to note that the ability of ISG15 to induce IFN γ is due to free ISG15 only and not due to ISGylation once a mutated form lacking the C-terminal glycines (Δ GG ISG15) displayed equivalent capability to induce IFN γ production in NK cells (Bogunovic and others 2012) (Figure 1).

In addition to tuberculosis, other malignances have also been associated to free extracellular ISG15 such as lupus, cancer and viral infections, but the presence of ISG15 doesn't necessarily have a protective phenotype.

An increased production of type I IFNs and ISGs in active lupus have been reported in several studies (Baechler and others 2003; Bennett and others 2003; Feng and others 2006; Kirou and others 2005; Yao and others 2009). Feng and collaborators, for instance, have shown that ISG15 is amongst the genes overexpressed in patients with lupus nephritis, being suggested as a marker for the disease (Feng and others 2006). Care and collaborators identified a sustained production of ISG15 and components of the ISGylation pathway as well as ISG15 secretion in plasmablasts from patients with SLE (Systemic Lupus Erythematosus), a profile comparable with that of plasma cells from healthy donors treated with IFN α (Care and others 2016). Although overexpression and secretion of ISG15 have been associated with active lupus, it is still elusive whether this protein plays a protective or detrimental role in the disease.

ISG15 is also associated with cancer. Many works have associated an increase in expression of ISG15 and/or of ISGylation with tumorigenesis (Andersen and Hassel 2006; Bektas and others 2008; Desai and others 2006; Desai and others 2008; Kiessling and others 2009; Padovan and others 2002; Rajkumar and others 2011) but the literature is filled with conflicting results suggesting that ISG15 has both pro- and anti-tumor activity. Of note, it has been reported that ISG15 is more secreted by melanoma tumors that induced DC (dendritic cell) maturation than by tumors that didn't and also that melanoma cells overexpressing ISG15 induced expression of E-cadherin in DCs *in vitro* (Padovan and others 2002). E-cadherin is an adhesion molecule and its expression can impair DC motility and work as a mechanism of tumor escape (Zeng and others 2007) implicating in a pro-tumor role for free ISG15 in melanoma. Pro-tumor activity was also observed for free ISG15 in PDAC (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma). This protein is secreted by macrophages present in the tumor in response to IFN β produced by PDAC cells and acts upon cancer stem cells enhancing their tumorigenicity. In addition, ISG15 secretion was shown to be increased in M2, or alternatively activated macrophages (Sainz and others 2014), which are often associated with promoting tumor growth directly and via angiogenesis as well as tissue remodeling and suppression of adaptive immunity

(Mantovani and others 2002).

In human tissue, human cells lines and mouse models of breast cancer, although ISGylation is more prominent and related to an unfavorable prognosis (Bektas and others 2008; Desai and others 2012), free ISG15 seems to have an anti-tumor function (Burks and others 2015; Wood and others 2012). Injection in mice of a fusion of ISG15 gene downstream of a DNA sequence coding for tLLO (truncated Listeriolysin O), a hemolysin produced by the bacteria *Listeria monocytogenes*, resulted in secretion of the ISG15-tLLO protein, consequent induction of IFN γ and significant reductions in primary tumor burden, in metastatic spread and in tumor incidence for three separate models of mouse breast cancer (Wood and others 2012). Supporting these data, breast cancer cells with a silenced ISG15 gene resulted in faster growing tumors in nude mice when compared to cells overexpressing ISG15 (Burks and others 2015). The same group has also shown that free ISG15 promoted intra-tumor infiltration of NK cells inhibiting tumor growth when added extracellularly and that intracellular free ISG15 enhanced antigen presentation and expression of MHC class I complexes on breast cancer cells.

The works of Wood and collaborators and Burks and collaborators have suggested that free ISG15 has an anti-tumor activity resulting from an induction of IFN γ or an increase in cancer surveillance by NK cells, but the molecular mechanisms underlying these events are still elusive. Interestingly, a few anti-tumor mechanisms have been suggested for ISGylation (Burks and others 2015; Wood and others 2012). P53, a transcription factor that activates cell cycle arrest and apoptosis in order to prevent propagation of damaged cells (Biegling and others 2014) is a target for ISG15. The binding of ISG15 to misfolded p53 increases its degradation by the proteasome contributing to protein turnover (Huang and others 2014). In another study, Park and colleagues demonstrated that DNA damage induces ISG15 conjugation to p53 and this modification markedly enhances the binding of p53 to the promoters of its target genes leading to suppression of cell growth and of tumorigenesis. It is important to note that pro-tumor mechanisms have also been associated with ISGylation (Park and others 2016). Desai and colleagues have shown that different human tumor cell lines have an increased ISGylation and lower ubiquitination suggesting that ISG15 can interfere with the ubiquitin/26S proteasome pathway and,

consequently, with the regulation of proteins involved in cell growth and death (Desai and others 2006).

Last but not least, free intracellular ISG15 has also been associated with the regulation of immune response in viral infections. As mentioned previously in this review, individuals carrying a non-functional form of ISG15 have a normal response to viral infection and this response have a central participation of free intracellular ISG15. Individuals carrying a nonsense mutation in the *isg15* gene had an enhanced type I IFN activity with high expression of ISGs and persistent phosphorylation of STAT1 and STAT2. This activity would lower to normal levels in cells transduced with the wild type form of ISG15, what also applied to an ISG15 lacking the C-terminal glycines (Δ GG ISG15), a form incapable of ISGylating. The higher IFN α/β response in ISG15-deficient patients is due to an inability to sustain proper levels of USP18 (Zhang and others 2015). USP18 is responsible for down-regulating type I IFN response (Francois-Newton and others 2012; Malakhova and others 2006). In normal individuals, ISG15 regulates USP18 in an ISGylation-independent way, controlling the expression of ISGs while in ISG15 deficient patients, the absence of this protein leads to lower levels of USP18 and an increased expression of ISGs (Zhang and others 2015). In another study, fibroblasts from ISG15-deficient individuals were infected with HIV-1 (Human immunodeficiency virus type 1), HCMV (Human cytomegalovirus), IAV (Influenza A virus,) SeV (Sendai virus), RVFV (Rift Valley Fever Virus) and NiV (Nipah virus). With the exception of NiV, levels of viral replication were significantly lower when compared to the controls (Speer and others 2016). As demonstrated previously by Zhang et al (2015), ISG15-deficient patients displayed an increased IFN α/β response and increased expression of ISGs which enhanced their antiviral protection. Interestingly, when they transduced ISG15-deficient cells with wild type or Δ GG ISG15, viral susceptibility was rescued showing that not ISGylation but free intracellular ISG15 is able to regulate IFN response. It is worth to notice that none of what was observed in ISG15-deficient human cells applied to ISG15-silenced murine cells (Speer and others 2016). Previous studies have shown an important role for ISG15 in the antiviral response *in vivo* in mice (Giannakopoulos and others 2009; Guerra and others 2008; Lai and others 2009; Lenschow and others 2005; Lenschow and others 2007), however the works of Zhang et al (2015) and Speer et al (2016) suggest this might not be the most important role of ISG15 in

humans. One explanation for this difference between species could be that ISG15-silenced murine cells have normal levels of USP18 and decreased levels of ISGs (Speer and others 2016), a different phenotype than that observed for ISG15-deficient humans.

Potential mechanisms of ISG15 signaling

The mechanism through which secreted ISG15 induces immune cell activation and IFN γ production is still unknown. As the known cytokines, it is possible that ISG15 signals through a receptor, triggering signaling pathways responsible for its functions. In another scenario, it is possible that ISG15 acts through the IL-12R (IL-12 receptor) since it acts synergistically with IL-12 in the IFN γ production (Bogunovic and others 2012). A third hypothesis is that ISG15 binds to a surface molecule, which is not a receptor but a transporter. CD36, for example, works as a facilitator for the endocytosis of soluble ligands such as amyloid- β , oxidized LDL (Low-density Lipoprotein) and IAAP (Islet Amyloid Polypeptides), which induce NLRP3-inflammasome activation once inside the cell (Sheedy and others 2013). Another possibility to be considered is that ISG15 is delivered to the cell through microvesicles and granules that are released from macrophages and neutrophils, as mentioned previously. These structures could be captured by other cells where ISG15 would exert its function (Hare and others 2015). Similar to what is suggested by this hypothesis is the new mechanism of action recently described for OAS1 (2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1). OAS1 is an ISG and an UBL with antiviral properties (Eskildsen and others 2003) that, as ISG15, is secreted despite the absence of a signal peptide and accumulates in the serum of patients with HCV infection or undergoing IFN α treatment (Merritt and others 2010; Yang and others 1997). OAS1 is captured by cells from the medium, potentially through vesicles such as lysosomes or endosomes, executing inside the cell an alternative antiviral mechanism different from the RNA degradation together with RNase L (Kristiansen and others 2010; Thavachelvam and others 2015). Lastly, in case ISG15 is present in apoptotic cells, it could be released after cell lysis and phagocytized by other cells. This is seen for ASC, a protein central for the inflammasome activation (Srinivasula and others 2002). Franklin and collaborators showed that ASC specks released by pyroptotic cells are phagocytized by macrophages where they induce lysosomal damage being released into the cell cytoplasm leading to IL-1 β production (Franklin and others

2014). Nonetheless, it has been reported previously that ISG15 secretion is not due to cell death (D'Cunha and others 1996b).

Conclusion

ISG15 is a recent evolutionary acquisition present only in vertebrates and there is still a long way before we can conclude the full spectrum of its actions. There are several evidences that it participates in a wide range of cellular processes and malignancies but the molecular mechanisms underlying many of these events, especially those regarding free ISG15, are still elusive. Also, ISG15 is able to trigger $\text{IFN}\gamma$ production and other signaling pathways suggesting it is a potential cytokine that could interact with still unknown receptors. Therefore, more studies on the molecular mechanisms of action of free ISG15 and its abilities to modulate other cells could contribute to our understanding of immune responses.

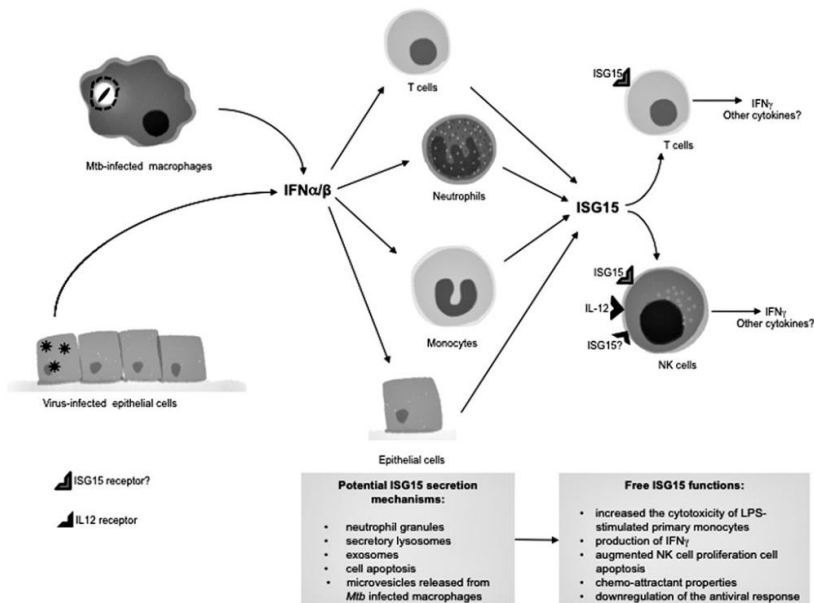


FIG. 1. An overview of free-ISG15 secretion and function in known target cells: ISG15 is an interferon-stimulated gene produced in response to both $\text{IFN}\alpha$ and β produced in viral or bacterial infections. Free ISG15 can be found in the extracellular milieu and carry out different functions. T cells, neutrophils, monocytes, and epithelial cells secrete this protein through nonclassical unknown mechanisms and it exerts cytokine-like responses in target cells. The main role of free extracellular ISG15 is the participation in $\text{IFN}\gamma$ production by T or NK cells. In the latter, ISG15 has been described to act in synergy with IL-12, a potent activator of $\text{IFN}\gamma$ production.

References

- Andersen JB, Hassel BA. 2006. The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev* 17(6):411-21.
- Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA. 1984. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(24):7907-11.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK, Behrens TW. 2003. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5):2610-5.
- Bektas N, Noetzel E, Veeck J, Press MF, Kristiansen G, Naami A, Hartmann A, Dimmler A, Beckmann MW, Knuchel R, Fasching PA, Dahl E. 2008. The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a potential prognostic marker in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 10(4):R58.
- Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197(6):711-23.
- Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. 2014. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 14(5):359-70.
- Blomstrom DC, Fahey D, Kutny R, Korant BD, Knight E, Jr. 1986. Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence. *J Biol Chem* 261(19):8811-6.
- Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, Abhyankar A, Sanal O, Mansouri D, Salem S, Radovanovic I, Grant AV, Adimi P, Mansouri N, Okada S, Bryant VL, Kong XF, Kreins A, Velez MM, Boisson B, Khalilzadeh S, Ozelik U, Darazam IA, Schoggins JW, Rice CM, Al-Muhsen S, Behr M, Vogt G, Puel A, Bustamante J, Gros P, Huibregtse JM, Abel L, Boisson-Dupuis S, Casanova JL. 2012. Mycobacterial disease and impaired IFN-gamma immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science* 337(6102):1684-8.
- Burks J, Reed RE, Desai SD. 2015. Free ISG15 triggers an antitumor immune response against breast cancer: a new perspective. *Oncotarget* 6(9):7221-31.

- Care MA, Stephenson SJ, Barnes NA, Fan I, Zougman A, El-Sherbiny YM, Vital EM, Westhead DR, Tooze RM, Doody GM. 2016. Network Analysis Identifies Proinflammatory Plasma Cell Polarization for Secretion of ISG15 in Human Autoimmunity. *J Immunol* 197(4):1447-59.
- D'Cunha J, Knight E, Jr., Haas AL, Truitt RL, Borden EC. 1996a. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1):211-5.
- D'Cunha J, Ramanujam S, Wagner RJ, Witt PL, Knight E, Jr., Borden EC. 1996b. In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. *J Immunol* 157(9):4100-8.
- Dastur A, Beaudenon S, Kelley M, Krug RM, Huibregtse JM. 2006. Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *J Biol Chem* 281(7):4334-8.
- de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR. 2001. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 69(6):912-20.
- Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26):15623-8.
- Desai SD, Haas AL, Wood LM, Tsai YC, Pestka S, Rubin EH, Saleem A, Nur EKA, Liu LF. 2006. Elevated expression of ISG15 in tumor cells interferes with the ubiquitin/26S proteasome pathway. *Cancer Res* 66(2):921-8.
- Desai SD, Reed RE, Burks J, Wood LM, Pullikuth AK, Haas AL, Liu LF, Breslin JW, Meiners S, Sankar S. 2012. ISG15 disrupts cytoskeletal architecture and promotes motility in human breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 237(1):38-49.
- Desai SD, Wood LM, Tsai YC, Hsieh TS, Marks JR, Scott GL, Giovanella BC, Liu LF. 2008. ISG15 as a novel tumor biomarker for drug sensitivity. *Mol Cancer Ther* 7(6):1430-9.
- Eskildsen S, Justesen J, Schierup MH, Hartmann R. 2003. Characterization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family. *Nucleic Acids Res* 31(12):3166-73.
- Farrell PJ, Broeze RJ, Lengyel P. 1979. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature* 279(5713):523-5.

- Feng X, Wu H, Grossman JM, Hanvivadhanakul P, FitzGerald JD, Park GS, Dong X, Chen W, Kim MH, Weng HH, Furst DE, Gorn A, McMahon M, Taylor M, Brahn E, Hahn BH, Tsao BP. 2006. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54(9):2951-62.
- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 178(6):2249-54.
- Francois-Newton V, Livingstone M, Payelle-Brogard B, Uze G, Pellegrini S. 2012. USP18 establishes the transcriptional and anti-proliferative interferon alpha/beta differential. *Biochem J* 446(3):509-16.
- Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, Mangan MS, Zimmer S, Monks BG, Fricke M, Schmidt RE, Espevik T, Jones B, Jarnicki AG, Hansbro PM, Busto P, Marshak-Rothstein A, Hornemann S, Aguzzi A, Kastentmuller W, Latz E. 2014. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 15(8):727-37.
- Giannakopoulos NV, Arutyunova E, Lai C, Lenschow DJ, Haas AL, Virgin HW. 2009. ISG15 Arg151 and the ISG15-conjugating enzyme Ube1L are important for innate immune control of Sindbis virus. *J Virol* 83(4):1602-10.
- Giannakopoulos NV, Luo JK, Papov V, Zou W, Lenschow DJ, Jacobs BS, Borden EC, Li J, Virgin HW, Zhang DE. 2005. Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336(2):496-506.
- Guerra S, Caceres A, Knobloch KP, Horak I, Esteban M. 2008. Vaccinia virus E3 protein prevents the antiviral action of ISG15. *PLoS Pathog* 4(7):e1000096.
- Haas AL, Ahrens P, Bright PM, Ankel H. 1987. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J Biol Chem* 262(23):11315-23.
- Hare NJ, Chan B, Chan E, Kaufman KL, Britton WJ, Saunders BM. 2015. Microparticles released from *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages contain increased levels of the type I interferon inducible proteins including ISG15. *Proteomics* 15(17):3020-9.

- Hoan NX, Van Tong H, Giang DP, Toan NL, Meyer CG, Bock CT, Kreamsner PG, Song LH, Velavan TP. 2016. Interferon-stimulated gene 15 in hepatitis B-related liver diseases. *Oncotarget*.
- Hogquist KA, Unanue ER, Chaplin DD. 1991. Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. *J Immunol* 147(7):2181-6.
- Huang YF, Wee S, Gunaratne J, Lane DP, Bulavin DV. 2014. Isg15 controls p53 stability and functions. *Cell Cycle* 13(14):2200-10.
- Jeon YJ, Choi JS, Lee JY, Yu KR, Ka SH, Cho Y, Choi EJ, Baek SH, Seol JH, Park D, Bang OS, Chung CH. 2008. Filamin B serves as a molecular scaffold for type I interferon-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathway. *Mol Biol Cell* 19(12):5116-30.
- Jeon YJ, Choi JS, Lee JY, Yu KR, Kim SM, Ka SH, Oh KH, Kim KI, Zhang DE, Bang OS, Chung CH. 2009. ISG15 modification of filamin B negatively regulates the type I interferon-induced JNK signalling pathway. *EMBO Rep* 10(4):374-80.
- Kiessling A, Hogrefe C, Erb S, Bobach C, Fuessel S, Wessjohann L, Seliger B. 2009. Expression, regulation and function of the ISGylation system in prostate cancer. *Oncogene* 28(28):2606-20.
- Kim MJ, Hwang SY, Imaizumi T, Yoo JY. 2008. Negative feedback regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation. *J Virol* 82(3):1474-83.
- Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MG, Crow MK. 2005. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum* 52(5):1491-503.
- Knight E, Jr., Cordova B. 1991. IFN-induced 15-kDa protein is released from human lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 146(7):2280-4.
- Knight E, Jr., Fahey D, Cordova B, Hillman M, Kutny R, Reich N, Blomstrom D. 1988. A 15-kDa interferon-induced protein is derived by COOH-terminal processing of a 17-kDa precursor. *J Biol Chem* 263(10):4520-2.
- Korant BD, Blomstrom DC, Jonak GJ, Knight E, Jr. 1984. Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon. *J Biol Chem* 259(23):14835-9.
- Kristiansen H, Scherer CA, McVean M, Iadonato SP, Vends S, Thavachelvam K, Steffensen TB, Horan KA, Kuri T, Weber F,

- Paludan SR, Hartmann R. 2010. Extracellular 2'-5' oligoadenylate synthetase stimulates RNase L-independent antiviral activity: a novel mechanism of virus-induced innate immunity. *J Virol* 84(22):11898-904.
- Lacy P, Stow JL. 2011. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* 118(1):9-18.
- Lai C, Struckhoff JJ, Schneider J, Martinez-Sobrido L, Wolff T, Garcia-Sastre A, Zhang DE, Lenschow DJ. 2009. Mice lacking the ISG15 E1 enzyme Ube1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection. *J Virol* 83(2):1147-51.
- Lenschow DJ, Giannakopoulos NV, Gunn LJ, Johnston C, O'Guin AK, Schmidt RE, Levine B, Virgin HWt. 2005. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. *J Virol* 79(22):13974-83.
- Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, Wolff T, Osiak A, Levine B, Schmidt RE, Garcia-Sastre A, Leib DA, Pekosz A, Knobeloch KP, Horak I, Virgin HWt. 2007. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(4):1371-6.
- Liu X, Wang Q, Chen W, Wang C. 2013. Dynamic regulation of innate immunity by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 24(6):559-70.
- Loeb KR, Haas AL. 1992. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem* 267(11):7806-13.
- Loeb KR, Haas AL. 1994. Conjugates of ubiquitin cross-reactive protein distribute in a cytoskeletal pattern. *Mol Cell Biol* 14(12):8408-19.
- Lu G, Reinert JT, Pitha-Rowe I, Okumura A, Kellum M, Knobeloch KP, Hassel B, Pitha PM. 2006. ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52(1):29-41.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. 2001. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15(5):825-35.
- Malakhov MP, Malakhova OA, Kim KI, Ritchie KJ, Zhang DE. 2002. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem* 277(12):9976-81.

- Malakhova OA, Kim KI, Luo JK, Zou W, Kumar KG, Fuchs SY, Shuai K, Zhang DE. 2006. UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *EMBO J* 25(11):2358-67.
- Malakhova OA, Zhang DE. 2008. ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. *J Biol Chem* 283(14):8783-7.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23(11):549-55.
- Merritt EA, Arakaki TL, Larson ET, Kelley A, Mueller N, Napuli AJ, Zhang L, Deditta G, Luft J, Verlinde CL, Fan E, Zucker F, Buckner FS, Van Voorhis WC, Hol WG. 2010. Crystal structure of the aspartyl-tRNA synthetase from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 169(2):95-100.
- Minakawa M, Sone T, Takeuchi T, Yokosawa H. 2008. Regulation of the nuclear factor (NF)-kappaB pathway by ISGylation. *Biol Pharm Bull* 31(12):2223-7.
- Morales DJ, Lenschow DJ. 2013. The antiviral activities of ISG15. *J Mol Biol* 425(24):4995-5008.
- Naegelen I, Beaume N, Plancon S, Schenten V, Tschirhart EJ, Brechard S. 2015. Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. *J Immunol Res* 2015:817038.
- Okumura A, Lu G, Pitha-Rowe I, Pitha PM. 2006. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5):1440-5.
- Okumura A, Pitha PM, Harty RN. 2008. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(10):3974-9.
- Okumura F, Okumura AJ, Uematsu K, Hatakeyama S, Zhang DE, Kamura T. 2013. Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by interferon-stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. *J Biol Chem* 288(4):2839-47.
- Owhashi M, Taoka Y, Ishii K, Nakazawa S, Uemura H, Kambara H. 2003. Identification of a ubiquitin family protein as a novel neutrophil chemotactic factor. *Biochem Biophys Res Commun* 309(3):533-9.

- Padovan E, Terracciano L, Certa U, Jacobs B, Reschner A, Bolli M, Spagnoli GC, Borden EC, Heberer M. 2002. Interferon stimulated gene 15 constitutively produced by melanoma cells induces e-cadherin expression on human dendritic cells. *Cancer Res* 62(12):3453-8.
- Park JH, Yang SW, Park JM, Ka SH, Kim JH, Kong YY, Jeon YJ, Seol JH, Chung CH. 2016. Positive feedback regulation of p53 transactivity by DNA damage-induced ISG15 modification. *Nat Commun* 7:12513.
- Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolfi E, Sandona D, Savaglio E, Di Virgilio F. 2007. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* 109(9):3856-64.
- Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR. 2007. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* 179(3):1913-25.
- Rajkumar T, Sabitha K, Vijayalakshmi N, Shirley S, Bose MV, Gopal G, Selvaluxmy G. 2011. Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis. *BMC Cancer* 11:80.
- Recht M, Borden EC, Knight E, Jr. 1991. A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma. *J Immunol* 147(8):2617-23.
- Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. 1990. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J* 9(5):1503-10.
- Sadler AJ, Williams BR. 2007. Structure and function of the protein kinase R. *Curr Top Microbiol Immunol* 316:253-92.
- Sainz B, Jr., Martin B, Tatari M, Heeschen C, Guerra S. 2014. ISG15 is a critical microenvironmental factor for pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 74(24):7309-20.
- Schreiber G, Piehler J. 2015. The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends Immunol* 36(3):139-49.
- Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhelawon B, Carpenter SB, Becker CE, Ediriweera HN, Mullick AE, Golenbock DT, Stuart LM, Latz E, Fitzgerald KA, Moore KJ. 2013. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* 14(8):812-20.

- Shi HX, Yang K, Liu X, Liu XY, Wei B, Shan YF, Zhu LH, Wang C. 2010. Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Mol Cell Biol* 30(10):2424-36.
- Speer SD, Li Z, Buta S, Payelle-Brogard B, Qian L, Vigant F, Rubino E, Gardner TJ, Wedeking T, Hermann M, Duehr J, Sanal O, Tezcan I, Mansouri N, Tabarsi P, Mansouri D, Francois-Newton V, Daussy CF, Rodriguez MR, Lenschow DJ, Freiberg AN, Tortorella D, Piehler J, Lee B, Garcia-Sastre A, Pellegrini S, Bogunovic D. 2016. ISG15 deficiency and increased viral resistance in humans but not mice. *Nat Commun* 7:11496.
- Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. 2002. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* 277(24):21119-22.
- Sun L, Wang X, Zhou Y, Zhou RH, Ho WZ, Li JL. 2016. Exosomes contribute to the transmission of anti-HIV activity from TLR3-activated brain microvascular endothelial cells to macrophages. *Antiviral Res* 134:167-171.
- Takeuchi T, Yokosawa H. 2005. ISG15 modification of Ubc13 suppresses its ubiquitin-conjugating activity. *Biochem Biophys Res Commun* 336(1):9-13.
- Tang Y, Zhong G, Zhu L, Liu X, Shan Y, Feng H, Bu Z, Chen H, Wang C. 2010. Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *J Immunol* 184(10):5777-90.
- Thavachelvam K, Gad HH, Ibsen MS, Despres P, Hokland M, Hartmann R, Kristiansen H. 2015. Rapid Uptake and Inhibition of Viral Propagation by Extracellular OAS1. *J Interferon Cytokine Res* 35(5):359-66.
- Wong JJ, Pung YF, Sze NS, Chin KC. 2006. HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(28):10735-40.
- Wood LM, Pan ZK, Seavey MM, Muthukumar G, Paterson Y. 2012. The ubiquitin-like protein, ISG15, is a novel tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 61(5):689-700.
- Yang PM, Wang JT, Chiang BL, Lai MY, Chen DS. 1997. Serum 2',5'-oligoadenylate synthetase concentrations in acute and chronic hepatitis C. *J Formos Med Assoc* 96(5):314-9.
- Yao Y, Richman L, Higgs BW, Morehouse CA, de los Reyes M, Brohawn P, Zhang J, White B, Coyle AJ, Kiener PA, Jallal B.

2009. Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 60(6):1785-96.
- Yuan W, Krug RM. 2001. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J* 20(3):362-71.
- Zeng Z, Xu X, Zhang Y, Xing J, Long J, Gu L, Wang X, Sun D, Ka W, Yao W, Wen Z, Chien S. 2007. Tumor-derived factors impaired motility and immune functions of dendritic cells through derangement of biophysical characteristics and reorganization of cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 64(3):186-98.
- Zhang X, Bogunovic D, Payelle-Brogard B, Francois-Newton V, Speer SD, Yuan C, Volpi S, Li Z, Sanal O, Mansouri D, Tezcan I, Rice GI, Chen C, Mansouri N, Mahdavian SA, Itan Y, Boisson B, Okada S, Zeng L, Wang X, Jiang H, Liu W, Han T, Liu D, Ma T, Wang B, Liu M, Liu JY, Wang QK, Yalmozoglu D, Radoshevich L, Uze G, Gros P, Rozenberg F, Zhang SY, Jouanguy E, Bustamante J, Garcia-Sastre A, Abel L, Lebon P, Notarangelo LD, Crow YJ, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Pellegrini S. 2015. Human intracellular ISG15 prevents interferon-alpha/beta over-amplification and auto-inflammation. *Nature* 517(7532):89-93.
- Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML, Waddell MB, Yuan W, Schulman BA, Huibregtse JM, Krug RM. 2004. The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(20):7578-82.
- Zhao C, Denison C, Huibregtse JM, Gygi S, Krug RM. 2005. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(29):10200-5.
- Zhao C, Hsiang TY, Kuo RL, Krug RM. 2010. ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(5):2253-8.
- Zou W, Kim JH, Handidu A, Li X, Kim KI, Yan M, Li J, Zhang DE. 2007. Microarray analysis reveals that Type I interferon strongly increases the expression of immune-response related genes in Ubp43 (Usp18) deficient macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 356(1):193-9.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel de citocina de ISG15 e explorar potenciais mecanismos de ação na indução de IL-10.

3.2 Objetivos Específicos

1. Investigar as populações celulares produtoras de IL-10;
2. Estudar as vias de sinalização induzidas por ISG15 que controlam a síntese de IL-10;
3. Aplicar biologia computacional para análise de possíveis correlações entre ISG15 e IL-10 durante estados de doença.

4. MANUSCRITO

Manuscrito submetido e sob revisão

ISG15 induces IL-10 production in human monocytes and is a biomarker of disease severity during active tuberculosis

Paula Fernandes dos Santos*, Johan Van Weyenbergh[¶], Murilo Delgobo*, Daniel de Oliveira Patricio*, Brian J. Ferguson[§], Rodrigo Guabiraba[#], Tim Dierckx[¶], Soraya Maria Menezes[¶], André Báfica^{**} and Daniel Santos Mansur^{**1}

*Laboratory of Immunobiology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Centro de Ciências Biológicas, Bloco A, sala 213, Santa Catarina, Brasil. CEP 88040-900

[§]Department of Pathology, University of Cambridge

[#]ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, 37380 Nouzilly, France

[¶]Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute for Medical Research, Laboratory for Clinical and Epidemiological Virology, KU Leuven - University of Leuven, Leuven, Belgium

¹□Lead Contact

★Correspondence:

daniel.mansur@ufsc.br (D.S.M)

andre.bafica@ufsc.br (A.B.)

Running title

ISG15 drives a monocyte/IL-10 axis disrupted in TB

Abstract

Interferon stimulated gene 15 (ISG15) deficiency in humans leads to severe interferonopathies and mycobacterial disease, the latter being previously attributed to its extracellular cytokine-like activity. Here, we demonstrate a novel role for secreted ISG15 as an IL-10 inducer, unique to primary human monocytes. Employing *ex vivo* systems analysis of human transcriptome datasets, we observed a significant correlation of ISG15-induced monocyte IL-10 and lymphocyte IFN γ expression. This effect was associated with p38 MAPK and PI3K signalling in healthy volunteers. The specificity and MAPK/PI3K-dependence of ISG15-induced monocyte IL-10 production was confirmed *in vitro* using CRISPR/Cas9 knockout and pharmacological inhibitors. Moreover, this *ISG15/IL10* axis was amplified in leprosy but disrupted in human active tuberculosis (TB) patients. Importantly, ISG15 strongly correlated with inflammation and disease severity during active TB. In conclusion, this study identifies a novel anti-inflammatory ISG15/IL-10 myeloid axis that is disrupted in active TB, revealing a potential biomarker for disease severity in this major human disease.

Introduction

Type one interferons (IFN-I) exert most of their functions by inducing the expression of interferon-stimulated genes (ISGs). To date, over 300 ISGs have been described (1, 2) and interferon stimulated gene of 15 KDa (ISG15) is prominently expressed in response to infection, in autoimmune diseases, cancer and physiological processes such as pregnancy (3-8). ISG15 is synthesized as a 17 KDa precursor that is cleaved in the C-terminal region producing a mature form of 15 KDa. Also called ubiquitin cross-reactive protein(UCRP), ISG15 was the first ubiquitin-like protein to be described and it can be covalently linked to other proteins in a process called ISGylation (3, 9-11). ISGylation is important for cell intrinsic immunity against several viruses including Influenza A, Vaccinia, Ebola, HIV and Hepatitis C virus (9, 12, 13).

In addition to its intracellular ISGylation-mediated processes, the mature form of ISG15 can be secreted and possesses cytokine-like activities that modulate leukocyte functions (3, 14). For instance, soluble ISG15 was found to enhance production of IFN γ by lymphocytes and NK cells (15, 16) and to stimulate NK cell proliferation (16) as well as neutrophil migration (17). Importantly, ISG15 deficiency in humans is associated with a severe Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (15) and cells from patients with a nonsense mutation or a frame-shift in *isg15* are deficient in IFN γ -mediated immunity. This activity is attributed to the effects of extracellular ISG15 in NK cells and possibly occurs through an unknown receptor (15). Furthermore, humans lacking ISG15 also develop exacerbated IFN-I-induced immunopathology (18). This evidence suggests that extracellular or free ISG15, especially in humans (19), may regulate multiple aspects of the host immune response to pathogens and implicates this protein as an important component induced during infection and inflammatory processes involving IFN-I signalling. However, despite its ability to induce pro-inflammatory mediators, IFN-I may also exert anti-inflammatory effects (20-22), and whether soluble extracellular ISG15 modulates anti-inflammatory responses has not been reported.

The present study demonstrates that ISG15 induces IL-10 synthesis in human primary monocytes through MAPK- and PI3K-dependent pathways. Additionally, analysis of human transcriptome data sets identified a myeloid *ISG15/IL10* axis present in homeostasis. In contrast, the *ISG15/IL10* axis is disrupted during active TB and *ISG15* mRNA

levels strongly correlate with inflammatory and disease severity markers. These data suggest ISG15 may play a role in the crosstalk between Type I/Type II IFNs and IL-10 and reveal *ISG15* mRNA levels as potentially useful biomarker in human active TB.

Material and methods

Reagents

ISG15 was purchased from Boston Biochem and tested for endotoxins by R&D Systems (endotoxin value for lot #DBHF0614021 is <0.00394 EU/ μ g). LAL assay (Lonza) was performed according to the manufacturer's instruction and the endotoxin level of recombinant ISG15 was below the detection threshold. Pro-ISG15 (UL-615) was also purchased from Boston Biochem. *E. coli* LPS (strain O111:B4) (Invivogen) was used as a positive control for IL-10 production in human PBMCs and monocytes. P38 kinase inhibitors SB203580 and SB220025 (Calbiochem) were used at 10 μ M, MEK1/2 inhibitor U0126 (Cell Signaling) at 50 μ M and PI3K inhibitor Ly294002 (Cell Signaling) was at 50 μ M. Solvent (DMSO, medium) was used as negative control and chloroquine (Sigma, 5 μ g/mL), a DNA-PKC/TLR endosomal signalling inhibitor, was used as an additional negative control.

Primary human cells

Human PBMCs were separated from healthy individuals using Ficoll-paque (GE) according to manufacturer's instructions. Briefly, blood was collected in heparin-containing tubes, and gently mixed 1:1 with saline solution and gently mixed before being added over one volume of Ficoll-paque reagent. The gradient was centrifuged for 35 minutes at 400 x g, 18°C. PBMCs were harvested and washed once with 45 mL of saline solution for 10 min at 400 x g, 18°C. Subsequently, cell pellet was suspended and washed twice with 5 mL of saline solution for 10 min at 200 x g, 18°C to remove platelets. The remaining cell pellet was suspended to the desired density in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 5% foetal calf serum (Hyclone), 2mM L-glutamine (Gibco), 1 mM sodium pyruvate (Gibco), 25 mM HEPES (Gibco), 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco). Cells were plated as described in each experiment. Human primary monocytes (CD14⁺ cells) were separated from PBMCs using CD14 microbeads (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's instructions with the exception of the MACS buffer, which was prepared using 3% foetal calf serum.

Monocyte enrichment varied between 73 to 92% between experiments. The use of PBMCs from healthy donors was previously approved by UFSC ethical committee (IRB#283/08).

Generation of isg15 knockout cell lines

A549 lung epithelial cells were co-transfected with three gRNA/Cas9/GFP plasmids (provided by Horizon) targeting the *ISG15* locus using JetPEI (PolyPlus Transfection). The guide RNAs used were 5' GGCTGTGGGCTGTGGGCTGT 3', 5' GGTAAGGCAGATGTCACAGG 3' and 5' TGGAGCTGCTCAGGGACACC 3'. 72 hours after transfection, cells sorted for GFP fluorescence and then separated by limiting dilution. Single-cell derived clones were selected for ISG15 expression (Supplemental Figure 1B).

A549 – CD14+ co-culture

A549 WT or ISG15 KO cells were seeded at 2×10^5 cells/ml in 24 well-plates. Cells rested in the incubator for 6 hours before ISG15 KO cells were transfected with ISG15-pCEP4 plasmid using FugeneHD reagent (Promega) according to manufacturer's instructions. Cells were then washed and LPS was added 18 hours after transfection and immediately prior to the addition of a 2×10^5 CD14⁺ cells overlay. Following 24 hours of co-culture, supernatants were harvested for IL-10 quantification.

Immunoblotting

1×10^5 CD14⁺ cells were added to a 96-well plate and left to rest overnight. Cells were stimulated with ISG15 (1 μ g/ml) and after 15 minutes cells were spun at 4°C, supernatant was removed and M-PER lysis buffer (Thermo Scientific) containing protease inhibitors (Complete, Mini Protease Inhibitor Tablets, Roche) and phosphatase inhibitors (#524625, Calbiochem) was added to the cells. Protein separation was performed according to M-PER manufacturer's instructions. Antibodies concentrations for detection of p38 (Cell Signaling #9212) and p-p38 (Cell Signaling #9211), ISG15 (Cat: A600, R&D Systems) and anti- α -Tubulin (clone DM1A, Millipore) were those suggested by the manufacturers. For Western blots, at least 20 μ g of total protein were separated and transferred to a PVDF 0.22 μ m blotting membrane. Membrane was blocked for at least 1 hour with 1X Tris Buffered Saline-0.1% Tween20 (TBST) with 5% w/v non-fat dry milk and subsequently washed 3 times with TBST for 5 minutes each wash.

Membrane was incubated with primary antibodies diluted in 5% w/v BSA, 1X TBS, 0.1% Tween20 at 4°C with gentle shaking overnight. Membrane was washed 3 times for 5 min each with TBST and then incubated with the appropriate secondary HRP-linked antibody for 1 hour at room temperature. Membrane was washed 3 times of 5 min each with TBST before detection with ECL chemiluminescent substrate (Pierce).

p38 MAPK and PI3K signalling pathway inhibition

1 x 10⁵ CD14⁺ cells were added to a 96-well plate and left to rest overnight. Inhibitors were added to cells for 1 hour prior to ISG15 treatment. 24 hours after treatment, cells were spun at 4°C; supernatant was harvested and IL-10 was quantified by ELISA.

Cytokine quantification

For exploratory experiments, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 and TNF were quantified in supernatants by human inflammatory cytokine cytometric beads array kit (CBA, BD Biosciences). IL-10 and IFN γ were quantified using Human IL-10 DuoSet ELISA kit (R&D Systems) or Human IFN γ mini kit (Thermo Scientific) according to manufacturer's instructions.

Flow Cytometry Assays

PBMCs were seeded at a density of 5 x 10⁵ cells per well in 150 μ L of medium. After 8 hours of resting at 37°C with 5% CO₂, cells were treated with ISG15 (2 μ g/mL) or LPS (1 μ g/mL), unless indicated otherwise. Golgi Plug protein transport inhibitor (BD Biosciences) was added 1-hour post treatment, according to manufacturer's instructions. Then, 12 hours post treatment; growth medium was removed and cold 1X HBSS (Gibco) with 2.5 mM EDTA was added to each well. The tissue culture dish was kept at 4°C for 30 minutes and cells were suspended and transferred to 1.5 mL tubes. Cells were washed in a final volume of 1mL cold 1X HBSS (Gibco) with 2.5 mM EDTA at 300 x g and 4°C for 5 minutes. Supernatant was removed and cells were suspended in FACS buffer (1% BSA, 1% sodium azide in 1X PBS). Anti-human antibody mix containing anti-CD4 APC-Cy7 (clone OKT1) (BioLegend), anti-CD8 PE-Cy7 (clone SK1) (BioLegend), anti-CD14 PerCP-Cy5.5 (clone M5E2) (BioLegend), anti-CD56 FITC (clone NCAM 16.2) (BD Biosciences) was added to the cell suspension for 40 min at 4°C in the presence of 10% AB blood-type human serum to block

Fc receptors. Afterwards, cells were washed once with 1 mL of 1X PBS at 300 x g, 4°C, for 5 minutes and 1 mL of fixation buffer (1% paraformaldehyde in 1X PBS) was added to the cells. Tubes were kept in the dark at room temperature for 15 min and then centrifuged at 300 x g, 4°C, for 10 min to remove supernatant. 1 mL of permeabilization buffer (0.5% saponin in FACS buffer) was added to the cells and tubes were centrifuged at 300 x g, 4 C for 10 min. Intracellular stain with anti-IL-10-PE (clone JES3-9D7) (BioLegend) was carried out for 30 min in the dark at room temperature. Cells were washed with permeabilization buffer at 300 x g, 4°C, 5 min, supernatant was removed and cells were suspended in FACS buffer prior to acquisition of 1 x 10⁵ events or more. For analysis, all acquired events displayed as forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) parameters were selected. After that, single cells events were selected using FSC area and height parameters (FSC-A x FSC-H) and auto-fluorescence was excluded using APC as an open channel. Intracellular IL-10 was then quantified in monocytes (CD14⁺IL-10⁺), NK cells (CD56⁺IL-10⁺), CD4 (CD4^{high}IL-10⁺) and CD8 T cells (CD8^{high}IL-10⁺). Gates were set according to unstained PBMC sample and controls. All samples were acquired on a Becton-Dickinson Verse flow cytometer using BD FACSuite™ software. In order to analyse cell death, 5x10⁵ PBMC/well were treated with ISG15 2 µg/mL or Staurosporine (Sigma) 1 µM for 24 hours. Cells were then harvest, washed with 1 mL of PBS at 300 x g, room temperature, 5 min, supernatant was removed and cells were washed once in 1 mL of 1x Annexin binding buffer (eBioscience). Cell were resuspended at 10⁶ cells/mL in 1x Annexin binding buffer and FITC conjugated Annexin V (eBioscience) was added to the cell suspension for 15 min, room temperature, according to manufacture's instruction. Following incubation period, cells were washed with 1 mL of 1x Annexin binding buffer, 300 x g, room temperature, 5 min and resuspended in 200 µL of 1x annexin binding buffer. Propidium iodide (BD Pharmingen) was added at 0.25 µg/mL to the cell suspension prior to sample acquisition. Samples were acquired on a Becton-Dickinson Canto II flow cytometer using BD FACSDiva™ software.

Real time quantitative PCR (qPCR)

For relative quantification of *IL10* gene expression, total RNA was extracted from PBMCs treated or not with ISG15. RNA was extracted after 6, 12, 24 or 48 hours of treatment using RNeasy RNA extraction kit (Qiagen). Using 400 ng of RNA, cDNA was produced with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and

2 μ L of the product was used for the qPCR reaction in a final volume of 10 μ L. qPCR reactions were performed using the primers forward 5'GAG ATC TCC GAG ATG CCT TCA G 3' and reverse 5'CAA GGA CTC CTT TAA CAA CAA GTT GT 3' (23). Fold-increase in *IL10* gene expression was determined by relative quantification using hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*) as endogenous control. Primers forward and reverse for *HPRT* were 5' CCTGCTGGATTACATCAAAGCACTG 3' and 5' TCCAACACTTCGTGGGGTCCT 3', respectively, and were used at 250 nM each.

Microarray analysis

Curated and annotated publicly available data-sets (24-29)(GXB, ImmuCo, ImmuSort, BioGPS, GEO) were obtained from large, established cohorts of healthy controls, latent and active tuberculosis patients, comprising *ex vivo* and *in vitro* whole blood, total PBMCs, purified leukocyte subsets, non-leukocyte human primary cells and skin biopsies (leprosy patients, healthy controls and cutaneous leishmaniasis as non-mycobacterial infectious control). Novel datasets were generated for both whole blood and PBMCs from healthy controls and individuals infected with other non-mycobacterial intracellular pathogens (*Leishmania*, HIV-1, HTLV-1). PBMCs were isolated as above and immediately frozen in Trizol to preserve RNA integrity. Following Trizol extraction, total RNA was further purified using an RNeasy kit according to the manufacturer's protocol (QIAGEN, Venlo, Netherlands). Affymetrix Whole Genome microarray analysis was performed by the VIB Nucleomics Facility (Leuven, Belgium) using a GeneChip[®] Human Gene 1.0 ST Array with the WT PLUS reagent kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. Data preprocessing (RMA) was performed using the Bioconductor xps package. All microarray raw data are available at Gene Expression Omnibus database (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under series accession numbers GSE80008, GSE82160, GSE85487.

Enrichment analysis

The Ingenuity Pathway Analysis (IPA) program was used to perform the initial pathway/function level analysis on genes determined to be differentially expressed in the microarray analysis (Ingenuity Systems, Red Wood City, CA). Uncorrected p-values and absolute fold-changes were used with cut-offs of $p < 0.05$. Based on a scientific literature

database, the genes were sorted into gene networks and canonical pathways, and significantly overrepresented pathways were identified. Further enrichment analysis was performed, including Gene Ontology (GO) term enrichment using the WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt), KEGG pathway enrichment using the pathway database from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes and transcription factor target enrichment using data from the Broad Institute Molecular Signatures Database (MSigDB). Genesets from the GO, KEGG pathways, WikiPathways and Pathway Commons databases, as well as transcription factors, were considered overrepresented if their corrected p-value was smaller than 0.05. Principal component analysis, correlation matrices (Spearman), unsupervised hierarchical (Euclidean distance) clustering were performed using XLSTAT and visualized using MORPHEUS (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

Data processing and statistical analyses

Data derived from *in vitro* experiments was processed using Graphpad Prism 6 and analysed using unpaired Student's T test unless stated otherwise. Statistical significance is expressed as follows: * P-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001 and **** p-value<0.0001. In all cases, data shown are representative from at least two independent experiments. Data from experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm SEM.

Results

ISG15 induces IL-10 production in human PBMC

Extracellular ISG15 stimulates IFN γ production by human NK cells (15), so to investigate whether ISG15 regulates synthesis of other inflammatory cytokines, PBMCs were exposed to soluble ISG15 and 24h cell culture supernatants assayed for several cytokines by cytometric bead array (CBA). Out of this panel, only IL-10 and IL-6 were induced by ISG15 (Supplemental figure 1A). IL-10 is a key immune-regulatory cytokine that exerts opposing effects to IFN γ , hence this result was further assessed by treating PBMCs with different concentrations of pro- or mature ISG15 indicating a concentration-dependent response (Figure 1A). Following intracellular processing of pro-ISG15, its C-terminal LRLRGG domain is exposed and the protein becomes mature, a necessary requirement for ISGylation (11, 30-32). Both pro- and mature

ISG15 induced IL-10 secretion in human PBMCs in a similar manner (Figure 1A), indicating that LRLRGG sequence does not need to be exposed for ISG15-mediated IL-10 production. Exogenous ISG15 stimulated IL-10 synthesis by PBMCs from most of the healthy donors tested (Figure 1B). Control experiments showed that heat denatured ISG15 did not promote IL-10 synthesis demonstrating this protein requires its correctly folded structure to induce cell signalling (Figure 1B). Kinetic analysis of ISG15-stimulation in human PBMCs showed a peak of IL-10 mRNA and protein synthesis after 6 and 12 hours respectively (Figure 1C and D). Interestingly, this response was found to be specific for primary cells as a library of human cell lines (NKL, NK92, THP-1, Karpas, U937 and Jurkat) treated with ISG15 did not produce IL-10 (data not shown). Additionally, ISG15 treatment did not induce cell death by means of annexin V expression and propidium iodide (PI) incorporation (Figure 1E-G) suggesting IL-10 was actively secreted, not released from nor induced by apoptotic or necrotic cells. Together, these data show that ISG15 induces IL-10 synthesis and secretion by primary human PBMCs, independent of cell death.

CD14⁺ cells are the main producers of ISG15-induced IL-10

ISG15 can act on different cell types (15-17, 33) hence intracellular cytokine staining was used to identify the source of ISG15-induced IL-10 in PBMCs subpopulations. These experiments indicated that CD14⁺ cells are the main source of IL-10 (Figure 2A) with an average 2.5 fold-increase of CD14⁺IL-10⁺ cells as compared to unstimulated cultures (Figure 2B). Next, PBMCs were separated into CD14⁺ and CD14⁻ populations and both groups were exposed to soluble ISG15. Quantification of IL-10 and IFN γ 24 hours post stimulation confirmed the CD14⁺ population to be the main producers of IL-10 (Figure 2C) whilst we corroborated previous work showing the CD14⁻ population to be the source of ISG15-induced IFN γ (Figure 2D) (15, 16). Additionally, these data indicate that recombinant ISG15-induced IL-10 synthesis by CD14⁺ populations does not require the presence of CD14⁻ cells.

To test whether endogenously produced ISG15 stimulates IL-10 synthesis, a co-culture experiment was set up using a lung epithelial cell line, A549, as a source of ISG15 (34). For these assays, an *ISG15*-knockout (KO) A549 cell line was generated using CRISPR/Cas9 technology (Supplementary figure 1B, clone 3). Wild type (WT) or *ISG15*-KO A549 cells were then co-cultured with purified human

primary CD14⁺ cells or stimulated with LPS as a positive control. In this setup, A549-monocyte co-cultures led to a consistent production of IL-10, an outcome completely abrogated when *ISG15*-KO A549 cells were used. This effect could be rescued by re-introduction of the *ISG15* gene into the knockout cells (Figure 2E) thus demonstrating the specificity of epithelial cell-derived ISG15 for the induction IL-10.

To study co-regulation of *ISG15/IL10/IFNG* pathways in different cell types *ex vivo*, we next examined transcriptome datasets of purified major human leukocyte subsets (ImmuCo, ImmuSort) (28, 29). Expression levels of *ISG15* and *IL10* are positively correlated in total PBMCs, purified monocytes and macrophages, but not neutrophils and T-cells (Figures 2F-J). Although neutrophils display the highest *ISG15/IL10* expression ratio, monocytes are the main *ex vivo* *IL10* expressing cell type (60.19% of cells with IL10 transcripts above detection limit, vs. 17.33% in PBMCs and 5.97% in neutrophils, Fig. 2K), thus corroborating with our *in vitro* results (Fig. 2A-D). Consistent with a previous study (35), low or undetectable *IL10* transcripts in human neutrophils (Fig. 2K) are explained by the inactive chromatin configuration of the *IL10* locus in these cells. Together, this set of results suggests a role for extracellular rather than intracellular ISG15 as inducer of monocyte-derived IL-10 (this study) and NK-derived IFN γ (15). Since the unique susceptibility of ISG15-deficient children to low virulence mycobacteria has underscored a role for extracellular ISG15 (15), we performed a systems analysis approach to gain insights on the possible influence of ISG15/IL-10 axis during mycobacterial exposure in humans.

IL-10 production in response to ISG15 requires MAPK-PI3K signalling pathways

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase(PI3K) signalling pathways have been shown to participate in *IL10* transcription in human monocytes and macrophages. For instance, p38, ERK1/2 and PI3K are crucial for IL-10 synthesis during microbial stimuli such as LPS and *Mycobacterium*(36, 37). Thus, we analysed a published transcriptome dataset of latent TB using WebGEstalt and Ingenuity Pathway Analysis (IPA). MAPK and PI3K signalling pathways were significantly enriched in latent TB transcriptomes, as compared to healthy, uninfected controls (data not shown). We next investigated whether members of MAPK and PI3K

signalling families displayed divergent expression patterns between latent and active TB. MAPK family members were up-regulated in both latent and active TB (Figure 3A). However, *PIK3CA* (PI3Kalpha) levels were up-regulated in active TB and down-regulated in latent TB. In this scenario *MAPK14* (p38) expression levels were significantly and positively correlated to *ISG15* levels *ex vivo* (Figure 3B). Additionally, *MAPK3* (MAP3K/ERK1) levels were positively correlated to *IL10* (Figure 3C) and negatively correlated to *IFNG* transcript levels (Figure 3D). Finally, *PIK3CA* and *PIK3CB* (PI3Kbeta) transcripts were negatively correlated to *IL10* expression levels (Figure 3E). These data suggested that *ISG15/IL-10* as well as MAPK/PI3K-associated transcripts are co-regulated during mycobacterial stimulation *in vivo* and raised the possibility that MAPK/PI3K pathway is involved in *ISG15*-induced IL-10 responses in monocytes. Indeed, following exposure of CD14⁺ cells to *ISG15*, increased phosphorylation of p38 MAPK was observed (Figure 3F). More importantly, the use of two distinct inhibitors for p38 (Figures 3G-H) as well as inhibitors for MEK1/2 (Figure 3I) and PI3K (Figure 3J) abrogated IL-10 production in *ISG15*-stimulated monocytes. In contrast, chloroquine, an inhibitor targeting DNA-PKs/TLR9/endosome signalling pathways, did not affect IL-10 synthesis induced by *ISG15* (Figure 3J). These results suggest a central role for p38 activation and MAPK as well as PI3K signalling in *ISG15*-induced IL-10 production by primary monocytes.

An ISG15/IL10/IFNG cluster in healthy controls is disrupted during active TB

Altogether, our data indicated that *ISG15* is associated with immunoregulatory responses and it could have an important role in mycobacterial-induced inflammation. To test this concept, publicly available transcriptome data sets from established cohorts of healthy controls and patients with leprosy as well as latent or active tuberculosis were examined. Positive and negative correlations (Spearman Rho) were calculated between normalized transcript levels of MAPK/PI3K/STAT signalling family members, established myeloid lineage markers (*CD14*, *CD16=FCGR3A/FCGR3B*, *ITGAM*, *ITGAX*) and lymphoid lineage markers (*CD4*, *CD8*, *CD56=NCAM1*, *ITGAL*) plus *ISG15*, *IL10* and *IFNG* transcripts. Unsupervised hierarchical clustering of these transcripts was then performed, based on the resulting correlation matrices. In healthy controls (Figure 4A), *ISG15* mRNA strongly clusters with *IL10*, and to a lesser extent with *IFNG*, indicating the

existence of a regulatory balance between pro-and anti-inflammatory effects under homeostatic conditions. Leprosy lesions have been shown to express both type I IFN and IL-10, a scenario that leads to suppression of IFN γ effector activities (27). An unsupervised hierarchical cluster analysis of the cohort published by Teles and colleagues shows the myeloid anti-inflammatory *ISG15/IL10* axis maintained in leprosy lesions (Figure 4B), demonstrated by a single expression cluster comprised of, *ISG15*, *IL10* and monocyte (*CD14*) and myeloid markers (*CD64=FCGR1*, *CD11c=ITGAX*, *PU.1=SPI1*, *CD16=FCGR3*). Consistent with previous data (27), this disease cluster was negatively correlated to a “protective” *CD8/IFNG/STAT4* cluster, which is associated with milder (borderline tuberculoid/paucibacillary) clinical form, whereas the *ISG15/IL10/CD14* cluster was associated with the severe (lepromatous/multibacillary) disease form. Surprisingly, the *ISG15/IL10* axis was disrupted in whole blood transcriptomes of active TB (Figure 4C). However, *ISG15* (but not *IL10* or *IFNG*) retained its association with disease status and monocyte/myeloid markers (*CD14*, *FCGR1*). Since TB disease signature in the whole blood is predominated by neutrophils (24) and monocytes only make up a minor fraction in these samples, we next investigated whether components of the *ISG15/IL10* signalling pathway might be overexpressed in purified monocytes from TB patients, as compared to control monocytes. Indeed, Ingenuity Pathway Analysis identified MAPK signalling as significantly enriched in monocytes from TB patients (data not shown), and p38 MAPK was significantly interconnected with several TB signature genes (*FCGR1*, *IL27*, *SIGLEC6*) in a disease network (Figure 4D). Together, these results show the *ISG15/IL10* axis is disrupted during active TB.

To further investigate the possible connection between *ISG15* and *M. tuberculosis*-mediated immunopathology, we examined the expression of this gene in an independent large cohort in which both detailed clinical parameters and corresponding transcriptome data are available (24). Expression levels of *ISG15* were significantly correlated with established inflammatory biomarkers such as erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), tissue damage (Modal X-ray grade) as well as systemic clinical parameters (neutrophil count, haemoglobin, and globulin serum concentration) (Figure 4 G-L). These results suggest *ISG15* may be a biomarker of disease severity in active TB patients.

Discussion

Unconjugated ISG15 was shown previously to induce a variety of responses in different cells and contexts (3). Humans lacking ISG15 present severe mycobacterial disease and interferonopathy (15, 18) and it is interesting to notice that both phenotypes are possibly linked to this form of the protein and not due to ISGylation (19). Studies performed in mice lacking ISG15 or UBE1L, E1 enzyme necessary for most ISGylation processes (38), show a mild phenotype after Mtb infection (39), pointing to a contrasting role of ISG15 in mice and humans. This is reinforced by the fact that the ISG15 deficiency in humans is not linked to a higher susceptibility to viral infections, as seen in mice (18, 40-43).

Exploring its extracellular role we show that ISG15 induces IL-10 production in monocytes via a MAPK and PI3K dependent pathway. Activation of both of these pathways has been shown previously to be involved in *IL10* transcription (44). Interestingly it has been shown that the production of IFN γ by NK cells, the producers of IFN γ after stimulation with ISG15, can also be mediated by MAPK and PI3K (45). This suggests that the ISG15 receptor, if common to both monocytes and NK cells, might use these common downstream signal transducers to exert its activities. This merits further investigation.

Currently, there are no reports on the expression of ISG15 during human mycobacterial diseases *in vivo*. In the bioinformatics approach performed here, some but not all cohorts showed differences in ISG15 mRNA expression between healthy volunteers (HV) and acute TB patients (data not shown). However, since HV displayed high levels of ISG15 expression, it would be important to obtain parametric data from pre vs post-infection patients' samples. While ISG15 is critical for IFN γ production by cells from vaccine strain *BCG*-infected patients (15), this protein has a synergistic effect when combined with IL-12 (15), an important inducer of IFN γ (46, 47). Furthermore, IL-10 inhibits production of IL-12 and, consequently, of IFN γ by PBMCs (48), pointing to a pleiotropic effect for ISG15. Cell type and context dependent effects of ISG15 could explain these diverse activities. This work and others (15) suggest that despite ubiquitous expression in different cell types, neutrophils are a major source of secreted ISG15. Additionally, Mtb-infected macrophages can release microparticles containing ISG15 *in vitro* (49). Although we have not tested this directly, we speculate that soluble phagocyte-derived ISG15 is important

to the orchestration of immune responses *in vivo*, driving the production of at least two major cytokines, IL-10 and IFN γ . Interestingly, the intra and extracellular location of ISG15 and its ability to induce a plethora of effects in distinct cells, resembles the function of an alarmin (50). As shown in figure 4, ISG15's function is context dependent, varying from a driver of an anti-inflammatory monocytic/IL-10 axis in homeostasis and the less severe *M. leprae* infection to a strong pro-inflammatory IFN γ -biased scenario during active TB. Additionally, since ISG15 and IL-10 lack correlation in active *M. tuberculosis* infection, it is possible that IL-10 is controlled by different signals other than ISG15 during disease. Whether virulent *M. tuberculosis* hijacks the ISG15/IL-10 axis contributing to induction of tissue pathology remains to be determined.

In conclusion, these findings confirm and extend previous work characterizing soluble extracellular ISG15 as a pleiotropic cytokine (or alarmin) that induces both pro- and anti-inflammatory effects in a variety of cell types. Moreover, the combined *ex vivo* and *in vitro* approach uncovers a novel myeloid *ISG15/IL10* p38-mediated anti-inflammatory signalling cascade, which is preserved in human leprosy but disrupted in active TB. Strikingly, our data indicate *ISG15* mRNA as a novel biomarker of disease severity during acute TB that merits further investigation

Acknowledgements

DSM received support from CAPES Computational Biology (23038.010048/2013-27), CNPq Universal (473897/2013-0) and the Academy of Medical Sciences/UK (NAF004/1005). PFS and MD received CAPES and CNPq student fellowships respectively. AB received financial support from NIH-GRIP (TW008276), HHMI-ECS (55007412). AB is CNPq-PQ scholar and CAPES/ESE. BJF received support from an Isaac Newton Trust/Wellcome Trust ISSF/University of Cambridge research grant and a Wellcome Trust Seed Award (201946/Z/16/Z). TD received grant support from VLAIO (IWT141614). JWV received grant support from CAPES (PVE) and FWO (G0D6817N).

We would like to thank Prof. Aristobolo Mendes Silva from UFMG for providing reagents, suggestions and Dr. Alan Sher for critical reading and evaluation of these results.

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

PFS, JVW and RG designed, performed experiments, analysed the data and wrote the manuscript; MD, DOP, TD and SMM performed experiments and analysed the data, BF, AB and DSM designed experiments analysed the data and wrote the manuscript.

FIGURE 1 - (A) Dose-dependent IL-10 production as measured by ELISA 24 hours post stimulation of PBMCs with both pro- and mature ISG15 ([ISG15]: 0.15; 0.45; 1.5, 4.5 and 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (B) Induction of IL-10 by recombinant, but not heat-treated, ISG15 using PBMCs from a total of 5 different donors in 8 independent experiments. (C) *IL10* mRNA expression in PBMCs treated with ISG15 at 6, 12, 24 and 48 hours post stimulation. (D) Quantification of IL-10 in the supernatant of human PBMCs at 6, 12, 24 and 48 hours after treatment with of ISG15 (E) Representative dot-plot evaluating cell-death in human PBMCs by annexin V and PI staining after treatment with ISG15 (2.0 $\mu\text{g}/\text{m}$) or Staurosporine (1 μM). (F, G) Quantification of cell death from the experiment described in (E). Unless stated otherwise, ISG15 concentration was 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Error bars indicate SEM for biological replicates in each experiment. In each experiment PBMCs from 3 or more different donors were used. * P-value<0.05, ** p-value<0.01 and **** p-value<0.0001. ISG15HT, ISG15 heat-treated; STA, Staurosporine; PI, Propidium Iodide; Uns, Unstimulated.



FIGURE2 – CD14⁺ cells are the main source of IL-10 upon ISG15 stimulation. **(A)** Representative dot plot of intracellular staining of IL-10 in CD14⁺, CD56⁺, CD4⁺ and CD8⁺ in ISG15-treated PBMCs. **(B)** PBMCs from 6 different individuals showing fold increase in IL-10 production from CD14⁺, CD56⁺, CD4⁺ and CD8⁺ populations after ISG15 stimulation. **(C-D)** ELISA quantification of IL-10 and IFN γ in the supernatants of CD14⁺ and CD14⁻ separated populations treated with ISG15 **(E)** A549 WT or ISG15 KO cells were co-cultured with primary CD14⁺ cells magnetically separated from PBMCs and IL-10 production was measured by ELISA 24 hours later. *ISG15* KO cells were also transfected with a plasmid expressing *ISG15* in order to rescue its function. LPS was used as a positive control for IL-10 stimulation. Error bars indicate SEM for biological replicates in each experiment. All experiments were repeated at least two times. In every experiment PBMCs from 3 or more donors were used. **(F-J)** Transcriptome datasets of healthy controls (ImmuCo, ImmuSort) confirm *ISG15* and *IL10* *ex vivo* expression levels are strongly and positively correlated in total PBMCs **(F)**, purified primary monocytes **(G)** and macrophages **(H)**, but not neutrophils **(I)** or T cells **(J)**. Red lines indicate the approximate threshold for *IL10* mRNA detection (determined for each individual microarray). **(K)** Neutrophils display the largest *ISG15/IL10* ratio *ex vivo*, whereas monocytes are the major *IL10* expressing leukocyte population (>PBMCs>neutrophils) under homeostatic conditions. ****p-value<0.0001.

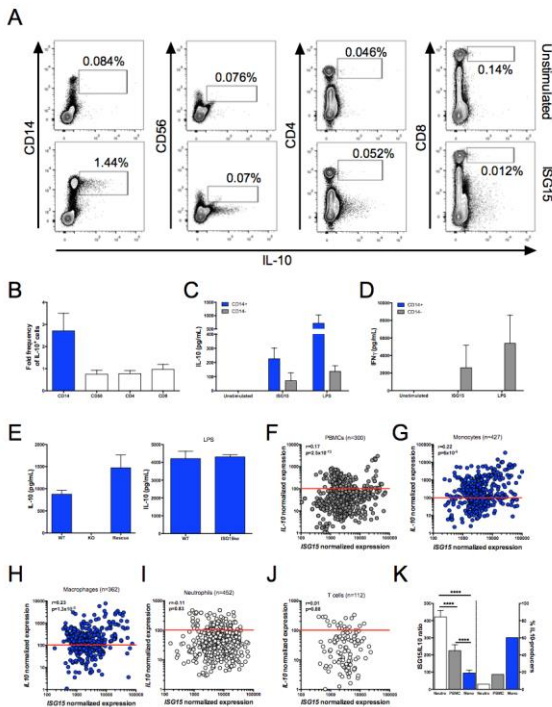


FIGURE 3: ISG15 induces monocyte derived IL-10 via p38, MEK1/2 and PI3K signalling pathways, which are deregulated in human mycobacterial infections. (A) MAPK family members expression in both latent and active TB. *Ex vivo* expression levels correlation of *MAPK14* and *ISG15* (B), *MAPK3* and *IL-10* (C), *MAPK3* and *IFNG* (D) and of *PIK3CA* or *PIK3CB* with *IL-10* (E) during latent TB infection (F) Representative immunoblot showing the phosphorylation of p38 MAPK 15 min after the stimulation of ISG15 in CD14⁺ cells. (G-J) CD14⁺ cells were treated for 1h with p38 (10 μ M), MEK1/2 (50 μ M) and PI3K inhibitors (50 μ M) (B-E respectively) prior to addition of ISG15 (1 μ g/mL) or LPS (100 ng/mL). (K) Chloroquine (5 μ g/mL) was used as an unrelated control drug. 24 hours after treatment, supernatant was harvested and used for IL-10 quantification by ELISA. Error bars indicate SEM for biological replicates in two independent experiments. * P-value<0.05, ** p-value<0.01 and *** p-value<0.001. Uns, Unstimulated.

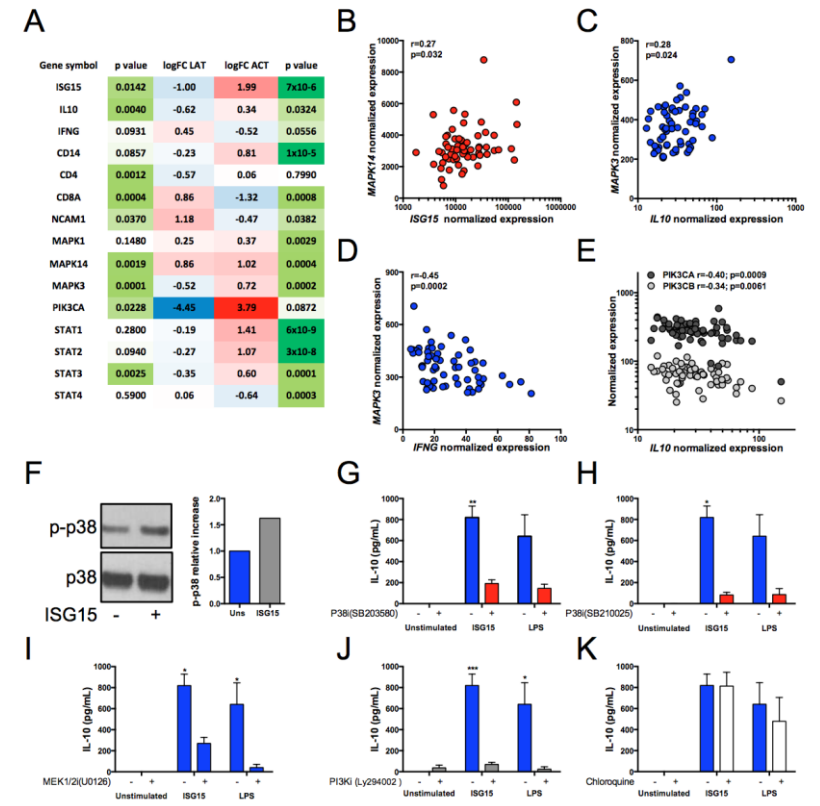
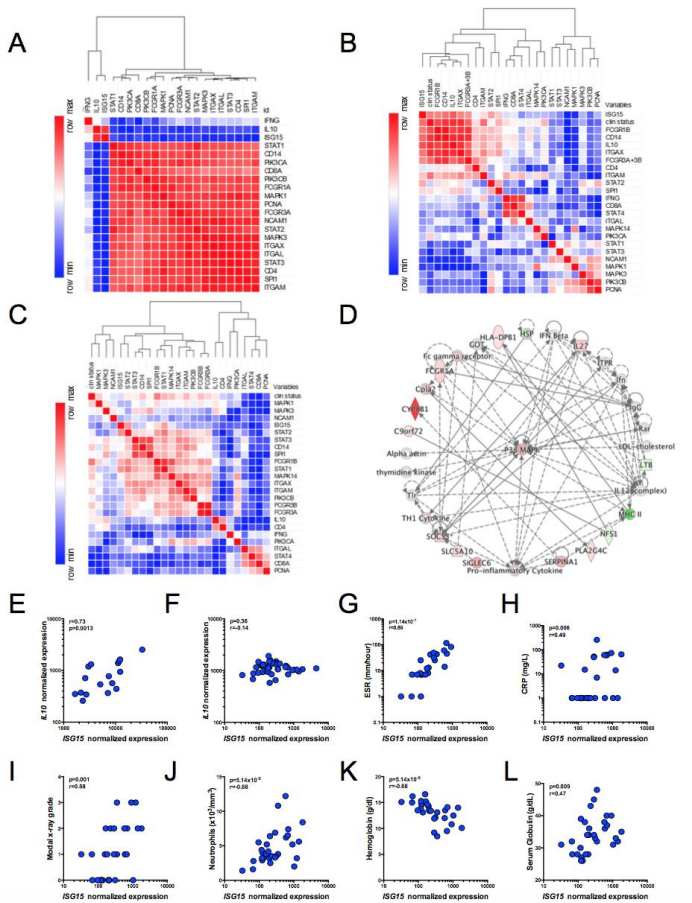


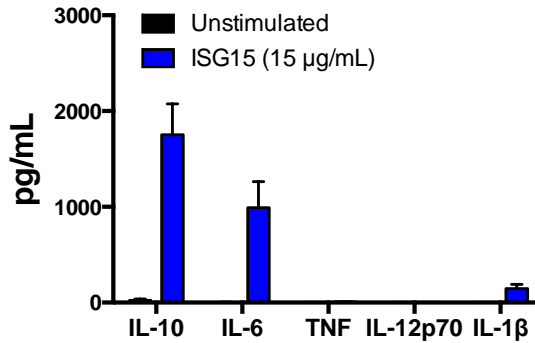
FIGURE 4: An anti-inflammatory *ISG15/IL10* myeloid axis is amplified in human leprosy and disrupted in human tuberculosis, revealing a novel clinical biomarker. (A-C) Heatmaps representing positive (red) and negative (blue) correlation matrix of selected genes (see text) classified by unsupervised hierarchical clustering (Euclidian distance). (A) Healthy controls (GSE80008) (B) Leprosy patients (GSE82160) (C) TB cohort (GSE85487) (D) Significantly enriched network (Ingenuity Pathway Analysis) showing p38 MAPK as highly interconnected in the monocyte transcriptome of TB patients. (E-F) *ISG15* transcript correlates with (G, H) established inflammatory metrics (erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP)), (I) tissue damage (Modal X-ray grade) as well as (J-L) systemic clinical parameters (neutrophil count, haemoglobin, and globulin serum concentration).



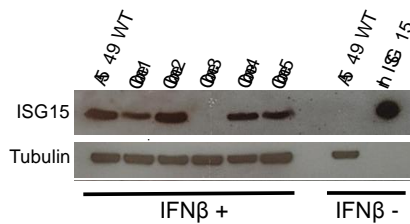
Supplemental figure 1

(A) ISG15 induces the production inflammatory cytokines. PBMCs from healthy donors were treated with ISG15 (15 $\mu\text{g/mL}$) and supernatant was harvested 24 hours for inflammatory cytokines quantification by cytometric Bead Array (CBA). ISG15 induced the production of IL-10, IL-6 and IL-1 β . (B) Generation of ISG15 deficient A549 cell line. ISG15 deficient A549 cell line was produced using CRISPR/Cas9. After clone selection, cells were stimulated with IFN β (1000 IU/mL), proteins extracted after 24 hours and immunoblotted with anti-ISG15 and anti-tubulin antibodies. Clone 3 (ISG15 KO) was used for further experiments.

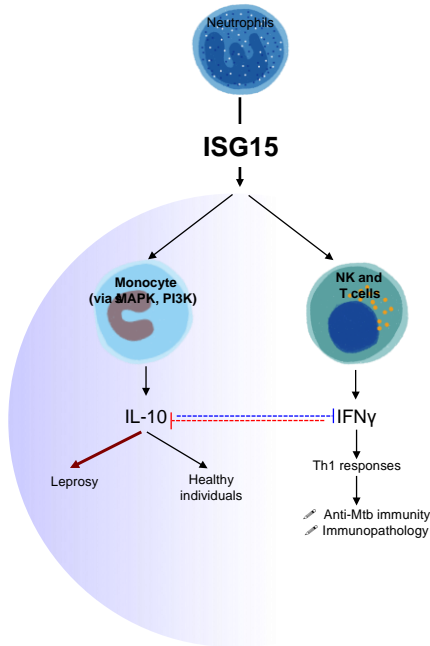
A



B



Supplemental figure 2: Proposed model. ISG15 induces both IL-10 (Blue) and IFN γ (Red) biased responses humans. The ISG15/IL-10 myeloid axis is present in healthy individuals and also in leprosy lesions while the ISG15/IFN γ lymphoid axis is characteristic of anti-Mtb immunity but is also related to immunopathology, a state in which ISG15 transcripts strongly correlate with disease severity parameters when the myeloid axis is disrupted. Dotted lines represent known literature (Chomarat et al., 1993; Redford et al., 2011).



Tab 1. PI3K gene expression enriched during latent tuberculosis.

Database:KEGG pathway Name:MAPK signaling pathway ID:04010						
C=251; O=37; E=18.78; R=1.97; rawP=5.54e-05; adjP=0.0008						
Index	UserID	Value	Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
1	MAPK8	NA	MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	5599	ENSG00000107643
2	TAOK2	NA	TAOK2	TAO kinase 2	9344	ENSG00000149930
3	MAP2K5	NA	MAP2K5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	5607	ENSG00000137764
4	MAX	NA	MAX	MYC associated factor X	4149	ENSG00000125952
5	DUSP6	NA	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	1848	ENSG00000139318
6	RAF1	NA	RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	5894	ENSG00000132155
7	RPS6KA1	NA	RPS6KA1	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1	6195	ENSG00000117676
8	MAPK8IP3	NA	MAPK8IP3	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	23162	ENSG00000138834
9	PRKCA	NA	PRKCA	protein kinase C, alpha	5578	ENSG00000154229
10	RPS6KA5	NA	RPS6KA5	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	9252	ENSG00000100784
11	TGFBR2	NA	TGFBR2	transforming growth factor,	7048	ENSG00000163513

				beta receptor II (70/80kDa)		
12	RAC2	NA	RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	5880	ENSG00000128340
13	CDC42	NA	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	998	ENSG00000070831
14	PAK2	NA	PAK2	p21 protein (Cdc42/Rac)- activated kinase 2	5062	ENSG00000180370
15	RPS6KA4	NA	RPS6KA4	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4	8986	ENSG00000162302
16	PPM1A	NA	PPM1A	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1A	5494	ENSG00000100614
17	NFKB2	NA	NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells 2 (p49/p100)	4791	ENSG00000077150
18	MAP3K14	NA	MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	9020	ENSG00000006062
19	MAP3K7	NA	MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	6885	ENSG00000135341
20	RRAS2	NA	RRAS2	related RAS viral (r-ras) oncogene	22800	ENSG00000133818

				homolog 2		
21	PRKACB	NA	PRKACB	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	5567	ENSG00000142875
22	AKT1	NA	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	207	ENSG00000142208
23	SOS1	NA	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	6654	ENSG00000115904
24	MAPK3	NA	MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3	5595	ENSG00000102882
25	RASGRP2	NA	RASGRP2	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	10235	ENSG00000068831
26	MAPKAPK2	NA	MAPKAPK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	9261	ENSG00000162889
27	MAP4K1	NA	MAP4K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	11184	ENSG00000104814
28	TAB2	NA	TAB2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2	23118	ENSG00000055208
29	DAXX	NA	DAXX	death-domain associated protein	1616	ENSG00000204209
30	PLA2G2D	NA	PLA2G2D	phospholipase A2, group IID	26279	ENSG00000117215

31	AKT3	NA	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	10000	ENSG00000117020
32	PPP3R1	NA	PPP3R1	protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha	5534	ENSG00000221823
33	MAP3K11	NA	MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase 11	4296	ENSG00000173327
34	TNFRSF1A	NA	TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	7132	ENSG00000067182
35	MAPK13	NA	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	5603	ENSG00000156711
36	TAB1	NA	TAB1	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1	10454	ENSG00000100324
37	RPS6KA3	NA	RPS6KA3	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3	6197	ENSG00000177189

Tab 2. MAPK gene expression enriched during latent tuberculosis.

Database:KEGG	pathway	Name:Phosphatidylinositol	signaling
system	ID:04070		
C=72; O=11; E=5.39; R=2.04; rawP=0.0175; adjP=0.0404			

Index	UserID	Value	Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
1	ITPK1	NA	ITPK1	inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	3705	ENSG00000100605
2	ITPKB	NA	ITPKB	inositol-trisphosphate 3-kinase B	3707	ENSG00000143772
3	INPP5D	NA	INPP5D	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa	3635	ENSG00000168918
4	PIK3R2	NA	PIK3R2	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)	5296	ENSG00000105647
5	DGKA	NA	DGKA	diacylglycerol kinase, alpha 80kDa	1606	ENSG00000065357
6	DGKD	NA	DGKD	diacylglycerol kinase, delta 130kDa	8527	ENSG00000077044
7	PIK3CD	NA	PIK3CD	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta	5293	ENSG00000171608
8	PRKCA	NA	PRKCA	protein kinase C, alpha	5578	ENSG00000154229
9	SYNJ1	NA	SYNJ1	synaptojanin 1	8867	ENSG00000159082
10	PLCB2	NA	PLCB2	phospholipase C, beta 2	5330	ENSG00000137841
11	PIK3CG	NA	PIK3CG	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma	5294	ENSG00000105851

Tab 3. Ingenuity Pathway Analysis for MAPK in monocytes during latent tuberculosis.

Symbol	Entrez Gene Name	Gene symbol -- human (Hugo / HGNC, Entrez Gene)	Exp. Log Ratio	Expected	Location	Type(s)	Biomarker Application(s)	Drug(s)	Entrez Gene ID for Human	Entrez Gene ID for Mouse	
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	FGFR2	-3.015 Up		Plasma	Membrane kinase		pazopanib, lenvatinib, nintedanib, regorafenib, dexamethasone/halodolide, bortezomib/dexamethasone/halodolide, rituximab/halodolide, bortezomib/halodolide, everolimus/halodolide, everolimus/halodolide, celecoxib, ARO 087, BAY 1197362, INCGB64828, PRN1371, docetaxel/nintedanib, everolimus/lenvatinib, thalidomide, palifermin	283	14183	2562
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	FGFR4	-2.571 Up		Plasma	Membrane kinase		lenvatinib, FGF401, BLU-554, PRN1371, U3-1784, everolimus/lenvatinib, HGB-6527	284	14186	2514
MAPK11	mitogen-activated protein kinase 11	MAPK11	3.559 Up		Cytoplasm	kinase		talimepimod, regorafenib, rafmetinib	560	19094	689314
NOTUM	NOTUM, semaphorin-purin catalase/esterase	NOTUM	-4.874 Up		at Splice	enzyme			147111	77583	303743
PARP3	family member 3 poly(ADP-ribose) polymerase	PARP3	1.184 Up		Nucleus	enzyme		rucaparib, olaparib	10039	235597	300985
PARP9	poly(ADP-ribose) polymerase 9	PARP9	1.086 Up		Nucleus	enzyme			68666	80285	303905
PK3R1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	PK3R1	2.796 Up		Cytoplasm	kinase	diagnosis, efficacy, prognosis, response to therapy		5295	18708	25513
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1	STAT1	1.89 Up		Nucleus	transcription regulator			6772	20846	25124

© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Tab 4. p38 network in monocytes during active tuberculosis.

© 2009-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Symbol	Synonym(s)	Entrez Gene Name	Chromosome	Map / Entrez Gene ID	Engr Log Entrez Gene ID	Location	Family	Drugs	Entrez Gene ID for Human ID for
Alpha actin 1	Acta1								
Gamma receptor 1	FCGR1	FC gamma 1 receptor							
FCGR1A	FCGR1A	FC gamma 1 receptor 1A			2.168572	Plasma membrane	transmembrane receptor		2289
FCGR1B	FCGR1B	FC gamma 1 receptor 1B				Plasma membrane	transmembrane receptor		
IGG						Space	group		
IL12 (complex)	IL12					Space	complex		
IL27	IL27					Extracellular space	complex		246778
LDL cholesterol	LDL					Extracellular space	complex		
MHC II						Plasma membrane	group		
PSB MARK						Plasma membrane	group		
Pro-inflammatory Cytokine						Plasma membrane	group		
SOCS3						Plasma membrane	group		
Tlr						Plasma membrane	group		

References

1. de Veer, M. J., M. Holko, M. Frevel, E. Walker, S. Der, J. M. Paranjape, R. H. Silverman, and B. R. Williams. 2001. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 69: 912-920.
2. Der, S. D., A. Zhou, B. R. Williams, and R. H. Silverman. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15623-15628.
3. Dos Santos, P. F., and D. S. Mansur. 2017. Beyond ISGylation: Functions of Free Intracellular and Extracellular ISG15. *J Interferon Cytokine Res*.
4. Hansen, T. R., and J. K. Pru. 2014. ISGylation: a conserved pathway in mammalian pregnancy. *Adv Exp Med Biol* 759: 13-31.
5. Henkes, L. E., J. K. Pru, R. L. Ashley, R. V. Anthony, D. N. Veeramachaneni, K. C. Gates, and T. R. Hansen. 2015. Embryo mortality in *Isg15*^{-/-} mice is exacerbated by environmental stress. *Biol Reprod* 92: 36.
6. Hermann, M., and D. Bogunovic. 2017. ISG15: In Sickness and in Health. *Trends Immunol* 38: 79-93.
7. Tecalco Cruz, A. C., and K. Mejia-Barreto. 2017. Cell type-dependent regulation of free ISG15 levels and ISGylation. *J Cell Commun Signal*.
8. Wang, B. X., S. A. Grover, P. Kannu, G. Yoon, R. M. Laxer, E. A. Yeh, and E. N. Fish. 2017. Interferon-Stimulated Gene Expression as a Preferred Biomarker for Disease Activity in Aicardi-Goutieres Syndrome. *J Interferon Cytokine Res* 37: 147-152.
9. Skaug, B., and Z. J. Chen. 2010. Emerging role of ISG15 in antiviral immunity. *Cell* 143: 187-190.

10. Haas, A. L., P. Ahrens, P. M. Bright, and H. Ankel. 1987. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J Biol Chem* 262: 11315-11323.
11. Loeb, K. R., and A. L. Haas. 1992. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem* 267: 7806-7813.
12. Morales, D. J., and D. J. Lenschow. 2013. The antiviral activities of ISG15. *J Mol Biol* 425: 4995-5008.
13. Schoggins, J. W., and C. M. Rice. 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 1: 519-525.
14. Bogunovic, D., S. Boisson-Dupuis, and J. L. Casanova. 2013. ISG15: leading a double life as a secreted molecule. *Exp Mol Med* 45: e18.
15. Bogunovic, D., M. Byun, L. A. Durfee, A. Abhyankar, O. Sanal, D. Mansouri, S. Salem, I. Radovanovic, A. V. Grant, P. Adimi, N. Mansouri, S. Okada, V. L. Bryant, X. F. Kong, A. Kreins, M. M. Velez, B. Boisson, S. Khalilzadeh, U. Ozcelik, I. A. Darazam, J. W. Schoggins, C. M. Rice, S. Al-Muhsen, M. Behr, G. Vogt, A. Puel, J. Bustamante, P. Gros, J. M. Huibregtse, L. Abel, S. Boisson-Dupuis, and J. L. Casanova. 2012. Mycobacterial disease and impaired IFN-gamma immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science* 337: 1684-1688.
16. D'Cunha, J., E. Knight, Jr., A. L. Haas, R. L. Truitt, and E. C. Borden. 1996. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 211-215.
17. Owhashi, M., Y. Taoka, K. Ishii, S. Nakazawa, H. Uemura, and H. Kambara. 2003. Identification of a ubiquitin family protein as a novel neutrophil chemotactic factor. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 533-539.
18. Zhang, X., D. Bogunovic, B. Payelle-Brogard, V. Francois-Newton, S. D. Speer, C. Yuan, S. Volpi, Z. Li, O. Sanal, D. Mansouri, I. Tezcan, G. I. Rice, C. Chen, N. Mansouri, S. A. Mahdavian, Y. Itan, B. Boisson, S. Okada, L. Zeng, X. Wang, H. Jiang, W. Liu, T. Han, D. Liu, T. Ma, B. Wang, M. Liu, J. Y. Liu, Q. K. Wang, D. Yalnizoglu, L. Radoshevich, G. Uze, P. Gros, F. Rozenberg, S. Y. Zhang, E. Jouanguy, J. Bustamante, A. Garcia-Sastre, L. Abel, P. Lebon, L. D. Notarangelo, Y. J. Crow, S. Boisson-Dupuis, J. L. Casanova, and S. Pellegrini.

2015. Human intracellular ISG15 prevents interferon-alpha/beta over-amplification and auto-inflammation. *Nature* 517: 89-93.
19. Speer, S. D., Z. Li, S. Buta, B. Payelle-Brogard, L. Qian, F. Vigant, E. Rubino, T. J. Gardner, T. Wedeking, M. Hermann, J. Duehr, O. Sanal, I. Tezcan, N. Mansouri, P. Tabarsi, D. Mansouri, V. Francois-Newton, C. F. Daussy, M. R. Rodriguez, D. J. Lenschow, A. N. Freiberg, D. Tortorella, J. Piehler, B. Lee, A. Garcia-Sastre, S. Pellegrini, and D. Bogunovic. 2016. ISG15 deficiency and increased viral resistance in humans but not mice. *Nat Commun* 7: 11496.
 20. Billiau, A. 2006. Anti-inflammatory properties of Type I interferons. *Antiviral Res* 71: 108-116.
 21. Borden, E. C., G. C. Sen, G. Uze, R. H. Silverman, R. M. Ransohoff, G. R. Foster, and G. R. Stark. 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6: 975-990.
 22. McNab, F., K. Mayer-Barber, A. Sher, A. Wack, and A. O'Garra. 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15: 87-103.
 23. Potter, J. L., J. Narasimhan, L. Mende-Mueller, and A. L. Haas. 1999. Precursor processing of pro-ISG15/UCRP, an interferon-beta-induced ubiquitin-like protein. *J Biol Chem* 274: 25061-25068.
 24. Narasimhan, J., J. L. Potter, and A. L. Haas. 1996. Conjugation of the 15-kDa interferon-induced ubiquitin homolog is distinct from that of ubiquitin. *J Biol Chem* 271: 324-330.
 25. Knight, E., Jr., D. Fahey, B. Cordova, M. Hillman, R. Kutny, N. Reich, and D. Blomstrom. 1988. A 15-kDa interferon-induced protein is derived by COOH-terminal processing of a 17-kDa precursor. *J Biol Chem* 263: 4520-4522.
 26. Recht, M., E. C. Borden, and E. Knight, Jr. 1991. A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma. *J Immunol* 147: 2617-2623.
 27. Wang, W., Y. Yin, L. Xu, J. Su, F. Huang, Y. Wang, P. P. C. Boor, K. Chen, W. Wang, W. Cao, X. Zhou, P. Liu, L. J. W. van der Laan, J. Kwekkeboom, M. P. Peppelenbosch, and Q. Pan. 2017. Unphosphorylated ISGF3 drives constitutive expression of interferon-stimulated genes to protect against viral infections. *Sci Signal* 10.

28. Wang, P., H. Qi, S. Song, S. Li, N. Huang, W. Han, and D. Ma. 2015. ImmuCo: a database of gene co-expression in immune cells. *Nucleic Acids Res* 43: D1133-1139.
29. Wang, P., Y. Yang, W. Han, and D. Ma. 2015. ImmuSort, a database on gene plasticity and electronic sorting for immune cells. *Sci Rep* 5: 10370.
30. Tamassia, N., M. Zimmermann, M. Castellucci, R. Ostuni, K. Bruderek, B. Schilling, S. Brandau, F. Bazzoni, G. Natoli, and M. A. Cassatella. 2013. Cutting edge: An inactive chromatin configuration at the IL-10 locus in human neutrophils. *J Immunol* 190: 1921-1925.
31. Ma, W., W. Lim, K. Gee, S. Aucoin, D. Nandan, M. Kozlowski, F. Diaz-Mitoma, and A. Kumar. 2001. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem* 276: 13664-13674.
32. Nair, S., P. A. Ramaswamy, S. Ghosh, D. C. Joshi, N. Pathak, I. Siddiqui, P. Sharma, S. E. Hasnain, S. C. Mande, and S. Mukhopadhyay. 2009. The PPE18 of Mycobacterium tuberculosis interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage. *J Immunol* 183: 6269-6281.
33. Teles, R. M., T. G. Graeber, S. R. Krutzik, D. Montoya, M. Schenk, D. J. Lee, E. Komisopoulou, K. Kelly-Scumpia, R. Chun, S. S. Iyer, E. N. Sarno, T. H. Rea, M. Hewison, J. S. Adams, S. J. Popper, D. A. Relman, S. Stenger, B. R. Bloom, G. Cheng, and R. L. Modlin. 2013. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science* 339: 1448-1453.
34. Berry, M. P., C. M. Graham, F. W. McNab, Z. Xu, S. A. Bloch, T. Oni, K. A. Wilkinson, R. Banchereau, J. Skinner, R. J. Wilkinson, C. Quinn, D. Blankenship, R. Dhawan, J. J. Cush, A. Mejias, O. Ramilo, O. M. Kon, V. Pascual, J. Banchereau, D. Chaussabel, and A. O'Garra. 2010. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* 466: 973-977.
35. Chan, S. H., M. Kobayashi, D. Santoli, B. Perussia, and G. Trinchieri. 1992. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol* 148: 92-98.

36. Chan, S. H., B. Perussia, J. W. Gupta, M. Kobayashi, M. Pospisil, H. A. Young, S. F. Wolf, D. Young, S. C. Clark, and G. Trinchieri. 1991. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 173: 869-879.
37. Hare, N. J., B. Chan, E. Chan, K. L. Kaufman, W. J. Britton, and B. M. Saunders. 2015. Microparticles released from Mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages contain increased levels of the type I interferon inducible proteins including ISG15. *Proteomics* 15: 3020-3029.
38. Rider, P., E. Voronov, C. A. Dinarello, R. N. Apte, and I. Cohen. 2017. Alarmins: Feel the Stress. *J Immunol* 198: 1395-1402.
39. Skrzeczynska-Moncznik, J., M. Bzowska, S. Loseke, E. Grage-Griebenow, M. Zembala, and J. Pryjma. 2008. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67: 152-159.
40. Novais, F. O., L. P. Carvalho, S. Passos, D. S. Roos, E. M. Carvalho, P. Scott, and D. P. Beiting. 2015. Genomic profiling of human Leishmania braziliensis lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J Invest Dermatol* 135: 94-101.
41. Speake, C., S. Presnell, K. Domico, B. Zeitner, A. Bjork, D. Anderson, M. J. Mason, E. Whalen, O. Vargas, D. Popov, D. Rinchai, N. Jourde-Chiche, L. Chiche, C. Quinn, and D. Chaussabel. 2015. An interactive web application for the dissemination of human systems immunology data. *J Transl Med* 13: 196.

5. DISCUSSÃO

A resposta celular a patógenos é mediada por vias de sinalização que permitem reconhecer e responder a patógenos além de alertar células vizinhas para a iminência de infecções. Essa resposta é iniciada pela detecção de PAMPs por receptores de reconhecimento de padrões, TLRs, RLRs e sensores de ácido nucleico, como DNA-PK, cGAS, DAI, IFI16, DHX9 e DHX36 (Ferguson et al., 2012; Kim et al., 2010; Unterholzner et al., 2010; Paludan e Bowie, 2013). A ativação de PRRs desencadeia cascatas de sinalização que levam à indução de vários genes, dentre eles os interferons do tipo I (IFN I), que restringem a replicação de patógenos e também modulam a resposta imune.

A atividade dos interferons é determinada por um painel de genes chamados “genes estimulados por interferons” (ISGs, do inglês *Interferon Stimulated Genes*) (revisado por Gonzalez-Navajas et al., 2012) cuja transcrição é dependente de STAT1 e STAT2. Esses genes possuem mecanismos para a restrição de vários estágios de replicação microbiana e também funções imunomoduladoras, sendo ISG15 um dos ISGs mais expressos (Der et al., 1998).

ISG15 apresenta similaridades de sequência e estruturais com a proteína ubiquitina (UB) (Haas et al., 1987, Loeb e Haas, 1992; Narasinhani et al., 1996). Como a UB, ISG15 pode se ligar a proteínas-alvo com o auxílio de uma cascata enzimática, sendo seu papel antiviral caracterizado pela ligação a proteínas virais nascentes, modificando-as (Durfee et al., 2010), entretanto, ISG15 possui outras funções além do seu papel antiviral (Knight et al., 1991; Recht, Borden e Knight, 1991; D’Cunha et al., 1996a; D’Cunha et al., 1996b; Bogunovic et al., 2012). Essa proteína não se restringe ao meio intracelular e pode ser secretada (Knight et al., 1991; D’Cunha et al., 1996b) e induzir a produção de IFN γ em linfócitos T (D’Cunha et al., 1996a; Bogunovic et al., 2012) e células NK (Bogunovic et al., 2012), induzir a replicação de células NK em PBMCs na ausência de IL-2 (D’Cunha et al., 1996a), aumentar a

atividade citolítica de células NK (D’Cunha et al., 1996a) e aumentar a atividade citotóxica de monócitos no PBMC (Recht et al., 1991). Pouco se sabe sobre os mecanismos de ação de ISG15 exógena e essa diversidade de funções sugere que ela pode ter outros papéis ainda inexplorados. Diante disso, o objetivo principal desse trabalho foi explorar o papel de citocina de ISG15 e investigar novos mecanismos de ação.

Inicialmente, acessamos o papel de citocina da proteína ISG15 utilizando um ensaio de CBA (*Cytometric Bead Array*) onde foi possível avaliar o impacto do tratamento com essa proteína na produção de diferentes citocinas inflamatórias. Nesse ensaio, PBMCs de doadores saudáveis foram separados e tratados com ISG15 recombinante para posterior quantificação de IL-12p70, IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF. Os resultados mostraram que ISG15 foi capaz de induzir uma discreta produção de IL-1 β e, em maior quantidade, das citocinas IL-6 e IL-10. IL-10 é uma citocina considerada antinflamatória (Couper et al., 2008; Saraiva e O’Garra, 2010) e possui um papel oposto ao do IFN γ (Schroder et al., 2004; Kopitar-Jerala, 2017), citocina também induzida por ISG15 (Bogunovic et al., 2012). Isso chamou a atenção para um potencial e novo papel imunoregulador dessa proteína.

A fim de comprovar a produção de IL-10 induzida por ISG15, PBMCs de um grupo de doadores saudáveis foram tratados com ISG15 e a quantidade de IL-10 foi dosada no sobrenadante por ELISA após 24h. Apesar da variação da resposta entre os indivíduos, foi observada produção de IL-10, assim como no CBA. A relação ISG15/IL-10 também foi investigada em um ensaio dose-resposta e em ensaios de cinética de expressão do gene e da proteína IL-10. No ensaio dose-resposta, observou-se uma correlação positiva entre a quantidade de ISG15 utilizada no tratamento e a quantidade de IL-10 produzida. Nos ensaios de cinética, foi observado um pico de expressão de *IL10* 6 horas após o tratamento, enquanto o pico de síntese da proteína foi após 12 horas. A indução de IL-10 pode ser mais uma função de citocina de ISG15 e adiciona mais um componente à lista de genes imunes estimulados por essa proteína. Além dos trabalhos de Bogunovic et al. (2012), Recht et al. (1991) e D’Cunha et al. (1996a), que demonstraram que ISG15 induz a produção de IFN γ , Padovan e colaboradores (2002) demonstraram que essa proteína é capaz de induzir a expressão de CD86 e CD15 em células dendríticas derivadas de monócitos humanos. Em adição, Wang e colaboradores (2012) mostraram que ISG15 é capaz de

induzir a expressão de TLR9, IL-8 e IL-1 β , dentre outros genes, em cultura de linfócitos de *Cynoglossus semilaevis* (Wang et al., 2012).

ISG15 é sintetizada com 17 KDa e tem sua metionina N-terminal clivada, bem como oito aminoácidos da sua porção C-terminal expondo o motivo LRLRGG e originando a forma madura de 15 KDa (Knight et al., 1988; Potter et al., 1999). A fim de avaliar se a indução de IL-10 também era realizada pela forma precursora de ISG15, pré-ISG15 foi utilizada para o tratamento de PBMCs em diferentes concentrações. Os resultados indicaram uma produção de IL-10 semelhante àquela induzida pela forma madura da proteína sugerindo que esse efeito é independente da exposição do domínio LRLRGG. D’Cunha et al. (1996a) também avaliaram o papel de citocina da forma precursora de ISG15 e mostraram que, diferentemente de ISG15 madura, pré-ISG15 não é capaz de induzir a proliferação de células NK em linfócitos de sangue periférico. O fato de a forma precursora e madura não apresentarem a mesma atividade sugere que, ao contrário do que foi observado em nossos resultados, a clivagem da metionina N-terminal e a exposição do motivo LRLRGG são importantes para essa atividade biológica de ISG15.

O motivo C-terminal LRLRGG confere caráter de ubiquitina a ISG15 (Loeb e Haas, 1992; Lenschow et al., 2005) e sua função foi avaliada em alguns estudos. Bogunovic et al. (2012) mostraram que as glicinas C-terminais não são necessárias para a produção de IFN γ . Naquele trabalho foi demonstrado que uma forma de ISG15 onde as glicinas C-terminais foram deletadas (ISG15 Δ GG) também foi capaz de induzir a produção de IFN do tipo II. Segundo os autores, esse dado sugere que a produção desse IFN mediada por ISG15 é independente do seu papel de ubiquitina, assim como sugerido para a produção de IL-10 mostrada nesse trabalho. Além disso, aqueles autores também mostram que a proteína ubiquitina *per se* não apresenta a capacidade de induzir a produção de IFN γ , sugerindo que a similaridade estrutural entre ubiquitina e ISG15 não é suficiente para o papel de citocina de ISG15. O impacto dos aminoácidos LRGG também foi avaliado no trabalho de Wang e colaboradores (2012) que utilizaram ISG15 nativa e um mutante em que a arginina e a glicina C-terminais foram substituídas por alaninas (LAAG) para o tratamento de macrófagos e linfócitos purificados de *C. semilaevis*. O grupo observou que o mutante LAAG era menos eficiente para a ativação de macrófagos e expressão de IL-8, TLR-9 e IL-1 β em linfócitos quando comparada à proteína nativa.

A produção de IL-10 em PBMCs tratados com ISG15 nos levou a questionar se esse efeito poderia ser um artefato derivado de uma possível contaminação por LPS (Barsig et al., 1995). Diante disso, avaliou-se o nível de endotoxinas na amostra por diferentes abordagens. Inicialmente, células HEK293T transfectadas com TLR4 murino foram estimuladas com a ISG15 recombinante e a amostra utilizada não ativou as células transfectadas. Posteriormente, a proteína foi submetida a um teste utilizando o kit *LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit* (Thermo Scientific Pierce) onde a quantificação de endotoxinas na amostra foi abaixo de 0,1 EU/mL (Endotoxin Units/mL). O lote de ISG15 utilizado foi, ainda, testado pela própria empresa fornecedora *R&D Systems*, que constatou um nível de endotoxinas abaixo de 0,005 EU/mL, um resultado semelhante ao relatório da empresa Lonza, cujo serviço de quantificação de endotoxinas para amostras isoladas foi contratado. Por último, a presença de LPS também foi descartada utilizando a amostra aquecida para o tratamento de PBMCs. Enquanto ISG15 recombinante teve sua atividade de indução de IL-10 completamente comprometida após o aquecimento, o controle LPS manteve sua atividade.

Seguros de que a produção de IL-10 não era induzida por endotoxinas, buscou-se investigar se a IL-10 detectada era induzida pela presença de células apoptóticas. Sabe-se que a presença de células apoptóticas pode induzir a produção de IL-10 em PBMCs (Bzowska et al., 2002; Byrne e Reen, 2002) ou, ainda, que as próprias células em apoptose podem produzir essa citocina (Rivas e Ulrich, 1992; Gao et al., 1998). Ao avaliar se o tratamento com ISG15 poderia induzir morte celular, observou-se que essa proteína não levou ao aumento da porcentagem de células apoptóticas quando comparado ao controle negativo. Em ambos os grupos foi observada significativamente menos morte celular que no grupo tratado com o controle positivo, staurosporina.

Em seguida, investigou-se quais as principais populações de células produtoras de IL-10 em PBMC tratado com ISG15. Estudos anteriores já haviam demonstrado que essa proteína é capaz de ativar linfócitos T (D’Cunha et al., 1996), células NK (Bogunovic et al., 2012; D’Cunha et al., 1996) e monócitos (Recht et al., 1991), portanto, foi avaliada a presença intracelular de IL-10 em células CD4, CD8, CD56 e CD14 após o tratamento com ISG15. O resultado desse ensaio indicou que, nesse cenário, os monócitos são os principais produtores de IL-10. Esse resultado foi corroborado por outro experimento onde as populações de células CD14+ e CD14- foram separadas por colunas

magnéticas e tratadas com ISG15. A quantificação de IFN γ e IL-10 nos sobrenadantes dessas frações mostrou que a população CD14 $^{+}$ é a principal produtora de IL-10 enquanto a fração CD14 $^{-}$ é a principal produtora de IFN γ . Esse resultado está de acordo com os dados de D’Cunha e colaboradores (1996) e de Bogunovic e colaboradores (2012) que mostraram que linfócitos T e células NK, ambos presentes na fração CD14 $^{-}$, são as principais produtoras de IFN γ no PBMC tratado com ISG15.

A produção de IFN γ mediada por ISG15 foi observada em populações de células isoladas por coluna magnética ou *sorting* (D’Cunha et al., 1996; Bogunovic et al., 2012), mas outras atividades, tais como a indução da replicação de células NK (D’Cunha et al., 1996a) e o aumento da citotoxicidade de monócitos (Recht et al., 1991) não foram observados em populações isoladas, sugerindo que essa função depende da comunicação intercelular (D’Cunha et al., 1996a). A produção de IL-10 induzida por ISG15 foi observada em PBMCs e células CD14 $^{+}$ com pureza relativamente alta, mas não puras. Dito isso e, considerando que a produção de IL-10 não foi observada em células de linhagem tais como NK92, NKL (características de células NK), Karpas, Jurkat (características de linfócitos T), THP-1 e U937 (características de monócitos), é possível que essa atividade de ISG15 também dependa de outras populações de células ou, ainda, pode ser um fenômeno específico de células primárias. Adicionalmente, a produção de IFN γ reportada por Bogunovic et al. (2012) é maior em PBMCs que em células NK isoladas, sugerindo uma regulação positiva que depende das demais células.

A fim de avaliar se a produção de IL-10 pode também ser atribuída a ISG15 endógena, foi realizado um experimento em que células CD14 $^{+}$ foram colocadas em co-cultura com células A549 selvagens e deficientes em ISG15. Nesse experimento foi observado que células A549 selvagens induzem a produção de IL-10 em células CD14 $^{+}$ enquanto o mesmo não é observado em células A549 ISG15 KO, um efeito restaurado quando essas células foram transfectadas com ISG15. Esses resultados sugerem que ISG15 derivada das células epiteliais é capaz de induzir a produção de IL-10 em monócitos, entretanto, a via pela qual essa ISG15 endógena é produzida não é clara. Pode-se especular que ela é derivada de forma independente de IFN do tipo I. De fato, Bogunovic et al. (2012) mostraram que diferentes tipos celulares possuem uma produção basal e constitutiva de ISG15, mas ensaios de *Western blot* realizados pelo nosso grupo com anticorpo anti-ISG15 não

indicou a presença dessa proteína no extrato de proteínas totais de A549sem tratamento prévio com IFN, (Figura suplementar). Algumas explicações podem ser sugeridas para esse resultado: é possível que os níveis de ISG15 estivessem abaixo do limite de detecção do anticorpo utilizado ou, ainda, que a co-cultura tenha levado essas células a expressar ISG15, o que ainda não foi testado. Krakauer e colaboradores (2002), por exemplo, mostraramque a co-cultura de A549 com PBMCs levou a uma modificação do perfil de expressão proteico com aumento da produção de IFN γ e outras citocinas na presença de determinados estímulos.

Posteriormente,a fim de correlacionar a expressão de ISG15 e IL-10 nas principais populações de leucócitos, bancos de dadosde transcriptoma de indivíduos saudáveis foram analisados (Wang et al., 2015a, Wang et al., 2015b). Essas análises foram uma colaboração estabelecida com o grupo do Prof. Johan Van Weyenberg e mostraram que os níveis de expressão de ISG15 estão positivamente correlacionados com os níveis de IL-10 em PBMCs totais, monócitos e macrófagos, mas não em neutrófilos e células T. Foi também observada maior expressão de *ISG15* em neutrófilos e maior expressão de *IL-10* em monócitos.Nossos resultados, que mostram monócitos como os principais produtores de IL-10 em resposta a ISG15 exógena, estão de acordo com esses dados. Em adição, os dados tambémconcordam com o trabalho de Bogunovic e colaboradores (2012) que demonstraram que granulócitos, mais especificamente uma população HLADR-/CD15+/CD16+,apresentam maior nível de expressão de *ISG15* quando comparados a outras subpopulações do PBMC tratadas com IFN.

Determinada a principal população de células produtora de IL-10 no PBMC tratado com ISG15, buscou-se investigar as vias envolvidas nessa resposta. Sabe-se que as MAPKs e PI3K possuem um papel importante na produção de IL-10 em monócitos (Foey et al., 1998; Saraiva e O'Garra, 2010; Antoniv e Ivashkiv, 2011) e macrófagos (Ma et al., 2001; Nair et al., 2009). Diante disso, foi analisado se essas vias estavam envolvidas na produção dessa citocina no sistema de monócitos humanos primários tratados com ISG15. Para tal, as células CD14+ foram tratadas com inibidores de p38, ERK1/2 e PI3K previamente ao tratamento com ISG15 e a quantidade de IL-10 foi dosada no sobrenadante. De acordo com os resultados, a produção de IL-10 induzida por ISG15 em monócitos ocorre via MAPKs e PI3K. Adicionalmente, ensaios de *Western blot* de proteínas totais de células CD14+ mostrou que p38 é ativada após o tratamento com ISG15.

Considerando-se que a produção de IL-10 mediada por ISG15 ocorre via MAPKs e PI3K e sabendo-se da importância de ISG15 na infecção por micobactérias (Bogunovic et al., 2012), investigou-se a correlação da expressão de *IL-10*, *ISG15*, *MAPKs* e *PI3K*, além das vias de sinalização das MAPKs e PI3K, em bancos de transcriptoma de indivíduos saudáveis e com tuberculose (TB) ativa ou latente. Essas análises mostraram que as vias das MAPKs e de PI3K estão enriquecidas em indivíduos com TB latente quando comparadas a indivíduos não infectados. Além disso, foi observado que membros da família das MAPKs estão mais expressos em indivíduos com TB latente e TB ativa, enquanto *PIK3CA* (PIK3Calfa), subunidade catalítica de PI3K, está mais expresso em TB ativa e menos expresso em TB latente. Também em indivíduos infectados, foi observada uma correlação positiva entre *ISG15* e *MAPK14* (p38) e entre *MAPK3* (MAP3K/ERK1) e *IL-10*, além de uma correlação negativa entre *MAPK3* e *IFN γ* . Em adição, foi observada uma correlação negativa entre *PIK3CA* e *PIK3CB* (PIK3Cbeta) e *IL-10*. Em conjunto, esses dados indicam que *ISG15* e *IL-10*, bem como MAPKs e PI3K estão co-regulados durante a infecção por *M. tuberculosis*.

A fim de aprofundar as evidências quanto ao papel da IL-10 induzida por ISG15 na infecção por micobactérias, bancos de dados de transcriptoma de indivíduos saudáveis, infectados por *M. lepreae* e com infecções por Mtb ativa e latente foram analisados interpolando os dados de níveis de expressão de ISG15, IL-10, IFN γ e de marcadores de células mielóides e linfóides. Primeiramente, essas análises mostraram um agrupamento dos genes *ISG15*, *IL-10* e IFN γ em indivíduos saudáveis, corroborando o equilíbrio entre vias pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que regem o estado de homeostase. Já nos dados de lesões causadas por *M. lepreae*, foi observada a presença do eixo *ISG15/IL-10* em monócitos e outras células mielóides sugerindo um efeito dessas proteínas nas lesões hansênicas. Curiosamente, somente *ISG15* e não o eixo *ISG15/IL-10* pôde ser correlacionado com células CD14 em indivíduos com TB ativa. Inclusive, ao se avaliar as vias correlacionadas a p38 utilizando os dados desses pacientes, não se encontrou o eixo *ISG15/IL-10*. É provável que esse resultado deva-se ao fato de a “assinatura” que caracteriza a doença é primordialmente determinada por neutrófilos (Berry et al., 2010), que não expressam IL-10 em grandes quantidades (Tamassia et al., 2013) e os produtos derivados de monócitos são uma pequena fração das células no PBMC. Apesar de não termos confirmado a presença do eixo *ISG15/IL-10* nos bancos de dados

utilizados, eles permitiram determinar que ISG15 está fortemente correlacionada com marcadores de inflamação bem estabelecidos na literatura como taxa de sedimentação de eritrócitos (ESR do inglês *Erythrocyte Sedimentation Rate*), proteína c-reativa (CRP do inglês *C Reactive Protein*), com danos teciduais, contagem de neutrófilos, hemoglobulina e concentração de globulina no soro permitindo sugerir *ISG15* como um marcador de gravidade da doença.

Em conclusão, os dados dessa tese ampliam o conhecimento do campo fortalecendo o papel de ISG15 extracelular como uma possível citocina pleiotrópica que induz efeitos pró e anti-inflamatório em uma variedade de tipos celulares. Resta, entretanto, determinar a presença de um receptor extracelular que permita definir ISG15, de uma vez por todas, como uma citocina. Além disso, a abordagem *ex vivo* e *in vitro* revelou que o mRNA de ISG15 pode ser um novo biomarcador da gravidade para TB aguda e merece mais investigação.

6. ANEXO A

TENTATIVA DE IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE ISG15 E AVALIAÇÃO DO SEU PAPEL DE CITOCINA

1. INTRODUÇÃO

A proteína ISG15 é um produto de IFN do tipo I (Haas et al., 1992; Korante et al., 1994) que pode ser secretada (D’Cunha et al., 1996a; Recht et al., 1991) e apresenta, dentre outras, funções imunoreguladoras como a capacidade de ativar células do sistema imune e induzir a produção de citocinas (Recht et al., 1991; D’Cunha et al., 1996a; D’Cunha et al., 1996b; Owhashi et al., 2003; Bogunovic et al., 2012). Essa função levou alguns grupos a sugerirem ISG15 como uma nova citocina, entretanto, por definição, citocinas são moléculas secretadas que ativam outras células a partir de receptores presentes na superfície das mesmas. Com isso em mente, foram realizadas algumas tentativas de identificação do receptor e do mecanismo de sinalização de ISG15 em células imunes após a reprodução de dados da literatura mostrando a capacidade dessa proteína de induzir a produção de IFN gama em células NK (realizados pelo colaborador do projeto Dr. Rodrigo Guabiraba, INRA, Université François Rabelais de Tours).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar os ligantes de ISG15 presentes na membrana de células do sistema imune e avaliar seu papel na atividade dessas células *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Análise do perfil transcricional de células estimuladas com ISG15.
- Identificação de uma célula de linhagem responsiva a ISG15.
- Obtenção de uma linhagem estável de células transfectadas com vetor contendo a sequência codificante para ISG15 associada a *tags* STREP e FLAG para purificação por afinidade em tandem.
- Separação dos ligantes de ISG15 dentre proteínas de membrana utilizando um protocolo modificado de purificação por afinidade em tandem (MoTAP, *Modified Tandem Affinity Purification*; Haas et al., 2009) e um protocolo de marcação de proteínas com meio de cultura de células contendo aminoácidos com isótopos estáveis (SILAC, do inglês *Stable Isotope Labeling in Cell Culture*; Ong et al., 2002).
- Identificação dos ligantes de ISG15 por espectrometria de massa.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção de PBMCs de sangue humano e separação de células por colunas magnéticas

Para a obtenção de PBMCs (*Peripheral Blood Monocyte Cells*) aproximadamente 60 mL de sangue foram coletados de voluntários saudáveis. Esse volume foi misturado a 60 mL de PBS 1X e cada 30 mL dessa mistura foram adicionados lentamente sobre 15 mL de Ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare). Após centrifugação a 400 x g, 22°C, por 30 minutos, a fase contendo os PBMCs foi coletada em um tubo estéril de 50 mL. O tubo foi preenchido com PBS 1X qsp 40 mL e centrifugado a 400 x g, 22°C, 5 min. Em seguida, as células foram lavadas mais duas vezes com o mesmo volume de PBS, mas a 200 x g, 22 °C, 5 min para remoção de plaquetas. Ao final das lavagens, as células foram contadas utilizando Azul de Trypan 0,4% (Gibco).

Para dividir a população de PBMCs, quando necessário, foram utilizadas *beads* magnéticas MACS MicroBeads CD14+ juntamente com colunas magnéticas MACS® (Miltenyi Biotec) de acordo com as informações do fabricante. O kit para separação de células CD14+ foi utilizado para a divisão dos PBMCs em duas frações: a fração de células CD14+, que contém em sua maioria monócitos, e a fração de células CD14-, que contém em sua maioria linfócitos. Após a separação, as células foram ressuspensas em meio de cultura e mantidas como descrito a seguir.

3.2. Cultura de células

PBMCs ou subpopulações de PBMCs separadas por coluna magnética foram cultivadas em RPMI 1640 1X (Life Technologies) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (GE HealthCare HyClone™), HEPES 25 mM (Life Technologies) e sem antibióticos. Uma vez ressuspensas no meio apropriado, as células foram mantidas a 37°C

em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO₂) até serem estimuladas com ISG15 e/ou outras citocinas.

Células HEK293T utilizadas para transfecção foram cultivadas em meio DMEM/F12 1X (Life Technologies) contendo 10% de SFB, penicilina 100 U/mL e streptomomicina 100 µg/mL e mantidas a 37°C e 5% de atmosfera de CO₂. Células THP-1, Jurkat, Karpas, HL-60, U937 e YT foram cultivadas em meio RPMI 1640 1X (Life Technologies) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (GE HealthCare HyClone™), HEPES 25 mM (Life Technologies) e penicilina 100 U/mL e streptomomicina 100 µg/mL. Células NKL e NK92 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma) contendo 12,5% SBF (Life Technologies), 2,5% de soro de cavalo (Sigma), 0,2% de β-mercaptoetanol (Sigma) e 10 ng/mL de IL-2 (PeproTech).

3.3. Avaliação da produção de IFN γ ou IL-10 em PMBCs e subpopulações ou células de linhagem estimuladas com ISG15

A fim de avaliar a atividade biológica da ISG15 recombinante (Boston Biochem, produto UL601) foram realizados ensaios de citometria e ELISA. Os ensaios foram realizados com PBMCs ou células CD14+ e CD14-. Um total de 2 x 10⁵ ou 1 x 10⁶ células foram distribuídas por poço em placa de 96 ou de 24 poços, respectivamente. Em seguida, elas foram estimuladas com diferentes quantidades de ISG15 na presença ou ausência de diferentes citocinas. 24 e 48 horas após o estímulo, o sobrenadante foi removido e utilizado para dosagem de IFN γ ou IL-10 por ELISA utilizando kits específicos (*Human Interferon gamma ELISA*, Thermo Scientific e *Anti-Human IL-10 DuoSet ELISA kit*, R&D Systems) de acordo com as recomendações do fabricante. Para análise por citometria de fluxo, os mesmos procedimentos foram realizados, mas posteriormente as células foram marcadas com anticorpos anti-CD14.

3.4. Marcação de células para citometria de fluxo

Para a detecção de marcadores de superfície, cerca de 1 x 10⁶ células foram lavadas duas vezes a 400 x g, 22°C, 5 min com PBS 1X. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS 1X contendo 1% de SBF (tampão de FACS) e transferidas para um tubo de

1,5 mL onde foram tratadas com soro humano anti-AB para bloqueio de FcR, na concentração 1:20 por 15 min à temperatura ambiente. Após esse intervalo, as células foram centrifugadas nas mesmas condições descritas acima. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi removido, 25 µL de tampão de FACS foram adicionados ao tubo, as células foram ressuspendidas com micropipeta e os anticorpos foram adicionados na diluição 1:50. Após manter o tubo no escuro por 30 min a temperatura ambiente, 1 mL de tampão de FACS foi adicionado e as células foram centrifugação como anteriormente para remover anticorpos não ligados. Descartado o sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 200 µl de tampão de FACS para leitura em citômetro de fluxo (BD FACSVerserTM).

3.5. Seleção de genes-alvo de fatores de transcrição ativados por citocinas

A fim de investigar se algum dos principais fatores de transcrição estimulados por citocinas está envolvido em uma possível via de sinalização ativada por ISG15, a variação da expressão de genes-alvo desses fatores foi analisada por PCR quantitativo em tempo real. Os fatores de transcrição selecionados foram STAT-1 a STAT-5. Inicialmente, os genes-alvo de cada fator de transcrição foram selecionados utilizando o banco de dados de domínio público GeneCards (Rebhan et al., 1997). Com essas informações, foi construído um diagrama de Venn utilizando uma ferramenta disponibilizada pelo Departamento de Bioinformática e Biologia de Sistemas da Universidade de Gent (*Universiteit Gent*, Bélgica) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), o que nos permitiu selecionar alvos exclusivos de cada um dos fatores de transcrição STAT1 a STAT5. Aqui vale ressaltar que os alvos de STAT5a e STAT5b foram incluídos em um só grupo. O gene que codifica para IκBα, proteína reguladora da atividade de NFκB, também foi analisado, uma vez que essa é uma via importante na resposta imune inata. A expressão de outros genes de resposta como *ISG54* e *ISG56* também foi investigada.

Identificados os genes-alvo exclusivos, selecionamos preferencialmente aqueles que codificam para citocinas e quimiocinas, foram selecionados para o PCR quantitativo e serão identificados nos resultados. Os iniciadores utilizados foram obtidos da literatura e conferidos utilizando a ferramenta BLASTN do NCBI

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com os parâmetros-padrão. As condições de uso desses iniciadores foram otimizadas em nosso laboratório e demonstraram bom rendimento e curva de dissociação de pico único indicando a amplificação de somente um fragmento. Os iniciadores utilizados estão referenciados no anexo deste projeto.

3.6. Análise da expressão de genes-alvo de fatores de transcrição ativados por citocinas em diferentes populações de células estimuladas com ISG15

Para analisar a expressão desses genes, um total de 1×10^6 células (PBMCs, CD14⁺ e CD14⁻ separadas como descrito acima) foram estimuladas com ISG15 isoladamente ou ISG15 combinada com outras citocinas por intervalos de 30 min, 6h e 20h ou de 30 min, 2h e 12h. Em seguida, o RNA das células foi extraído utilizando o reagente QIAzol (QIAGEN) de acordo com as orientações do fabricante sendo que, ao final, foi ressuspendido em 20 μ L de água livre de RNAses (Gibco - Life Technologies) e congelado a -80°C até o uso.

Para a síntese do cDNA, o RNA foi descongelado à temperatura ambiente e dosado utilizando o equipamento ND1000 (NanoDrop®) disponível no Departamento de Farmacologia da UFSC. A mesma quantidade de RNA foi utilizada para a síntese do cDNA de todas as amostras utilizando iniciadores randômicos e o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Life Technologies) ou a enzima M-MLV (Promega) como recomendado pelos fabricantes. A quantidade de RNA utilizada variou de acordo com o rendimento da extração realizada em cada experimento e variou de 500 ng a 1 μ g totais.

Cada reação de qPCR foi realizada com 1 μ L do cDNA, 25 pmoles de cada iniciador senso e antisenso (Tabela I), 5 μ L de mix para qPCR QuantiFast Sybr Green (QIAGEN) e água ultrapura qsp 10 μ L. O aparelho 7900HT *Sequence Detection System* (ABI Prism®) disponível no Laboratório de Multiusuários da UFSC (LAMEB 1) foi utilizado para obtenção dos resultados e a expressão foi analisada pelo método de quantificação relativa utilizando os genes HPRT ou 18S rDNA como controle endógeno.

Tabela 1: Iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR.

Fator de transcrição	Gene alvo		Iniciador	Referência
STAT-1	CXCL1	senso	5'-AACCGAAGTCATAGCCACAC-3'	Wang et al., (2006)
		anti-senso	5'-GTTGGATTGTCACTGTTCAAGC-3'	
STAT-1	IRF-3	senso	5'-ACCAGCCGTGGACCAAGAG-3'	Izaguirre et al., (2003)
		anti-senso	5'-TACCAAGGCCCTGAGGCAC-3'	
STAT-2	CARD11	senso	5'-GATGGAGGAGGAATGTAAGC-3'	Nakamura et al., (2005)
		anti-senso	5'-GGATGGTAGGGCAGGAAGTA-3'	
STAT-3	IL-8	senso	5'-AAGCTGGCCGTGGCTCTCTT-3'	Ma et al., (2009)
		anti-senso	5'-TGGTGGCGCAGTGTGGTCCA-3'	
STAT-3	IL-10	senso	5'-GCCTAACATGCTTCGAGATC-3'	Staples et al., (2010)
		anti-senso	5'-TGATGTCTGGGTCTGGTTC-3'	
STAT-4	MTERF2	senso	5'-ATGTTGTGGAAGCTGCTG-3'	Chen et al., (2005)
		anti-senso	5'-TCATTCTTCAACATTAATGG-3'	
STAT-5	IFI16	senso	5'-ACTGAGTACAACAAAGCCATTGA-3'	Caposio et al., (2007)
		anti-senso	5'-TTGTGACATTGTCTGTCCCCAC-3'	
STAT-5	IL-12p40	senso	5'-AGTAGTTATGGCTAAGGACATGA-3'	Xu et al., (2013)
		anti-senso	5'-AGGGATTCCAGATTTTCTTTGCA-3'	
NFκB	IκBa	senso	5'-TACACCTTGCCTGTGAGCAG-3'	Brophy et al., (2012)
		anti-senso	5'-TAGCCTTCAGGATGGAGTGG-3'	
IRF-3	ISG54	senso	5'-ACGGTATGCTTGGAACGATTG-3'	Orzalli et al., (2012)
		anti-senso	5'-AACCCAGAGTGTGGCTGATG-3'	
IRF-3	ISG56	senso	5'-AAGGCAGGCTGTCCGCTTA-3'	Orzalli et al., (2012)
		anti-senso	5'-TCCTGTCTTCATCCTGAAGCT-3'	
-	18S	senso	5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3'	Valentin-Vega et al., (2012)
		anti-senso	5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGT-3'	
-	IFNγ	senso	5'-CCAACGCAAAGCAATACATGA-3'	Body-Malapel et al., (2008)

	anti-senso	5'- CCITTTTCGCTTCCCTGTTTA- 3'	
HPRT	senso	5'-CCTGCTGGATTACATCAAAGCACTG- 3'	Bistrup et al. (1999)
	anti-senso	5'- TCCAACACTTCGTGGGGTCT- 3'	

3.7. Obtenção do vetor contendo o gene ISG15 para MoTAP

O vetor contendo o gene ISG15 para MoTAP (*Modified Tandem Affinity Protocol*) contendo os *tags* FLAG e STREP foi desenhado por nós e sintetizado pela empresa GenScript (GenScript USA Inc.). Ao longo do texto, esse gene será referido como *tag-ISG15*.

3.8. Obtenção de linhagens estáveis de células HEK293T transfectadas com *tag-ISG15*

O gene *tag-ISG15* clonado em plasmídeo pCEP04 foi transfectado em células HEK293T utilizando o reagente FuGENE® HD (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. As células transfectadas foram posteriormente mantidas com o antibiótico Higromicina B na concentração final de 200 µg/mL e, após a seleção, foram ressuspensas, diluídas em série nas concentrações 1:62,5, 1:125, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000 e replaqueadas em placa de 6 poços. Após um período de cultura em estufa a 37°C e 5% de atmosfera de CO₂, algumas ilhas de células foram coletadas com o objetivo de selecionar clones das células transformadas. As células foram expandidas em cultura na presença do antibiótico de seleção e quando atingiram 80% de confluência, uma amostra do sobrenadante dessa cultura foi coletada para ser testada para a presença da proteína *tag-ISG15*. O sobrenadante foi também amostrado em intervalos de 24h, 48h e 72h após a primeira coleta a fim de acompanhar a estabilidade de *tag-ISG15* nos tempos observados.

3.9. Precipitação de proteínas do sobrenadante, extração de proteínas e *Western blot*

As proteínas dos sobrenadantes de HEK293T transfectadas com *tag-ISG15* foram precipitadas como descrito por Fic et al. (2010) e ressuspensas em Tris-HCl 0,1M pH 8.0. As proteínas celulares foram obtidas após lise das células com tampão Tris 50 mM pH8, NaCl

150mM, EDTA 1mM, glycerol 10%, Triton X100 1%, NP40 0.05% e inibidores de proteases. Posteriormente, elas foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e utilizadas para ensaios de *Western blot* com o anticorpo monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich Co.) na diluição 1:1.000 para confirmação da presença de *tag-ISG15*.

3.10. MoTAP - *Modified Tandem Affinity Purification*- adaptado

O protocolo descrito a seguir é baseado naquele sugerido por Haas et al. (2009), porém com algumas modificações. Para realiza-lo, cerca de 1×10^9 PBMCs foram lisados com tampão composto por 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA e 0,2% Triton X-100. Em seguida, as proteínas foram separadas em duas etapas. Primeiro, a suspensão de células lisadas foi centrifugada a 600 x g, 4°C, por 3 minutos para remoção dos núcleos. O sobrenadante dessa separação foi coletado e submetido a nova centrifugação a 6.500 x g, 4°C, por 5 minutos para remoção de organelas membranosas. Esse segundo sobrenadante contendo as proteínas de membrana foi congelado a -80°C até o uso.

Para a primeira imunoprecipitação do MoTAP, a resina de estreptactina (*StrepTactinTM SepharoseTM High Performance*, GE Healthcare) foi incubada com a suspensão de proteínas *tag-ISG15* por 2 horas a 4°C. Depois, a resina foi centrifugada e o complexo resina-*tag-ISG15* foi incubado com as proteínas de membrana por 6 horas a 4°C. Em seguida, essa suspensão foi centrifugada e tratada com tampão de eluição contendo destiobiotina (*Strep-tag Elution Buffer 10X*, IBA) de acordo com as informações do fabricante. Para a segunda imunoprecipitação, o sobrenadante da resina de streptactina tratada com o tampão de eluição foi incubado com resina contendo anticorpo anti-FLAG (ANTI-FLAG® M2 *Affinity Gel*, Sigma-Aldrich) por 10 horas a 4°C. Para eluição, 25 µg/mL de peptídeo FLAG foram incubados com a resina anti-FLAG por 12 horas a 4°C. Após esse intervalo foi realizada uma última centrifugação de 3.000 rpm por 2 min. a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para análises por eletroforese, *Western blot* e espectrometria de massas.

3.11. Espectrometria de Massas (MS)

Após eletroforese das proteínas obtidas a partir do MoTAP, o gel de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata. A banda que co-

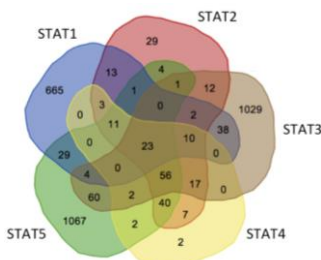
precipitou com rISG15, indicando a existência de um potencial ligante dessa proteína na superfície celular, foi extraída do gel e submetida a tratamento com tripsina específica para a digestão de amostras destinadas a espectrometria de massa (Thermo Scientific, número de catálogo 90055) como indicado pelo fabricante. Depois, foi realizada micro-cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa seguida de espectrometria de massa sequencial (microLC-MS/MS). O complexo proteico foi identificado utilizando algoritmos como MASCOT ou SEQUEST que comparam os peptídeos encontrados na espectrometria de massa com bancos de dados de domínio público. As análises foram realizadas em parceria com Dr. Brian Ferguson, da Universidade de Cambridge.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de genes-alvo exclusivos dos fatores de transcrição STAT1, STAT2, STAT3, STAT4 e STAT5

A fim de investigar se algum dos principais fatores de transcrição estimulados por citocinas está envolvido em uma possível via de sinalização ativada por ISG15, genes-alvo exclusivos de cada um dos STATs foram selecionados utilizando o banco de dados GeneCard e diagrama de Venn (Figura 1). A partir dessa lista, genes que codificam preferencialmente citocinas e quimiocinas foram selecionados para a análise por qPCR. Para STAT-1, foram selecionados os genes *CXCL1* e *IRF3*; para STAT-2, *CARD11*; para STAT-3, *IL-10*, *IL-8* e *IL-1 β* ; para STAT-4, *MTERFL* e para STAT-5, *IFIH6* e *IL-12*. Outros genes não necessariamente regulados por STATs, mas que também são genes importantes na resposta imune inata como *I κ B α* , *ISG54* e *ISG56*, também foram analisados.

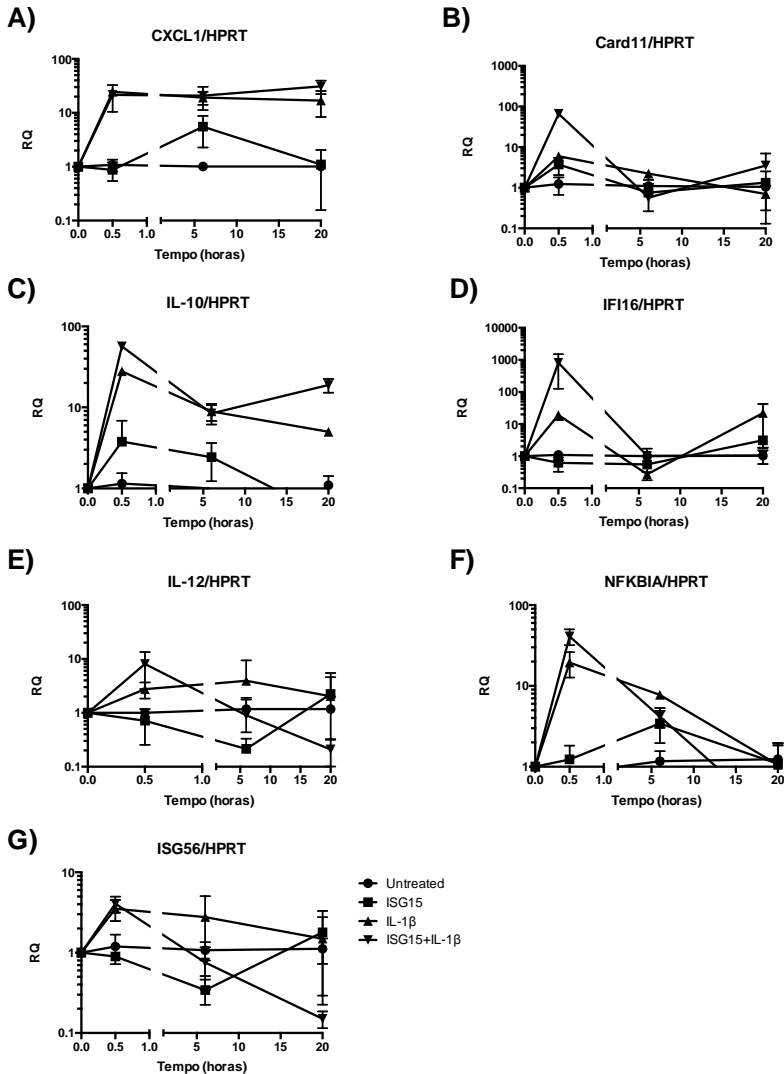
Figura 1: Identificação de alvos exclusivos dos fatores de transcrição STAT-1 a STAT-5 utilizando diagrama de Venn. Informações obtidas a partir do banco de dados GeneCard foram utilizadas para a construção de um diagrama que permitiu isolar alvos específicos de cada um dos fatores de transcrição de interesse.



4.2. Análise do perfil transcricional de genes-alvo de fatores de transcrição estimulados por citocinas em PBMCs estimulados com ISG15

Os genes regulados por STATs que foram selecionados foram *CXCL1* (alvo de STAT-1), *CARD11* (alvo de STAT-2), *IL-10* (alvo de STAT-3), *IFI16* e *IL-12p40* (alvos de STAT-5) e *ISG56*. A expressão desses genes foi analisada por qPCR utilizando o gene *HPRT* como normalizador (Figura 2). De acordo com esse experimento, ISG15 induz a expressão de *CARD11* e *IL-10* 30 min após o tratamento e também induz uma pequena expressão de *CXCL1* e *IκBα* 6 horas após a adição do estímulo. O perfil de *IκBα* também mostra um efeito aditivo de ISG15 ao efeito de IL-1 β 30 min após o tratamento com as duas proteínas. Além disso, foi observado um interessante efeito sinérgico entre IL-1 β e ISG15 na expressão de *CARD11* e *IFI16* nos 30 min após o tratamento, o que nos chamou a atenção. Para os demais genes analisados, não foi observada nenhuma diferença após estimulação com ISG15 ou a combinação das duas citocinas.

Figura 2: Análise da expressão de genes-alvo de fatores de transcrição de resposta a citocinas. O perfil transcricional dos genes-alvo de STAT-1 (*CXCL-1*), STAT-2 (*CARD11*), STAT-3 (*IL-10*) e STAT-5 (*IFI16* e *IL-12p40*) e dos genes *IκBα* e *ISG56* foram analisados por qPCR em PBMCs tratados com ISG15 (15 µg/mL), IL-1β (100 ng/mL) ou ambos nos intervalos de 30min, 6h e 20h após o tratamento.

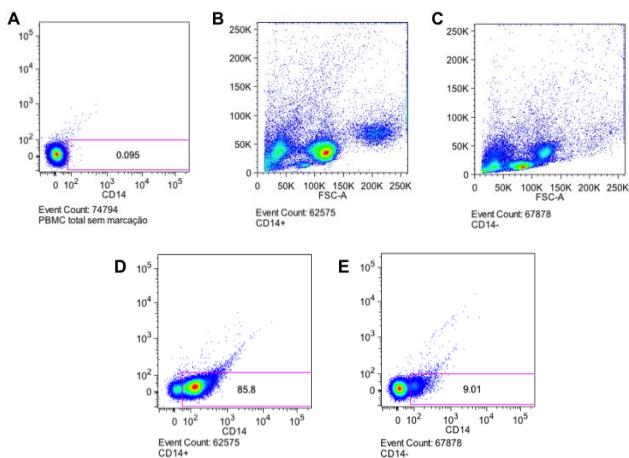


4.3. Análise da expressão dos genes *CARD11*, *IFI16*, *IL-10*, *I κ B α* e *IFN γ* em células CD14⁺ e CD14⁻ estimuladas com ISG15

A fim de avaliar se o aumento da expressão a partir de 30 minutos de tratamento com ISG15 era reprodutível e também para investigar se o

efeito poderia ser atribuído a determinadas populações de células, PBMCs foram separados em células CD14+ e CD14-. As células CD14+ separadas por coluna magnética bem como o filtrado dessa coluna, as CD14-, foram marcadas com anticorpo anti-CD14-FITC. O resultado de uma das separações de células CD14+ utilizando a coluna magnética pode ser observado nos *dot plots* da Figura 3. Inicialmente, no gráfico da Figura 3A, pode-se observar que, dentre os PBMCs utilizados para a separação magnética, não há células auto-fluorescentes. Nos gráficos 3B e 3C, pode-se observar o perfil de células das frações CD14+ e CD14-, respectivamente, separadas por tamanho e granulosidade e sem marcação com anticorpo. Nos demais gráficos podemos observar que a fração CD14+ foi obtida com aproximadamente 86% de pureza (Figura 3D) enquanto a fração de células CD14- foi obtida com 91% de pureza (Figura 3E).

Figura 3: Citometria de fluxo de células CD14+ e CD14- separadas por coluna magnética. As marcações, quando indicadas, foram realizadas com anticorpo anti-CD14-FITC. O número nos retângulos indica a porcentagem de células positivas para a marcação. (A) PBMCs antes da separação, não marcadas. (B) Células CD14+, não marcadas. (C) Células CD14-, não marcadas. (D) Células CD14+, marcadas. (E) Células CD14-, marcadas.



As células CD14+ e CD14- foram estimuladas com ISG15 (500 ng/mL), IL-1 β (10 ng/mL) e ISG15 + IL-1 β (nas concentrações mencionadas). LPS (100 ng/mL) foi utilizado como controle positivo de estímulo. Após 30 min, o RNA das células foi extraído e utilizado para realização de PCR quantitativo em tempo real. Nessa reação, a

quantificação relativa foi feita utilizando o gene *18S* rDNA como controle endógeno.

Um efeito sinérgico de ISG15 e IL-1 β na expressão do gene *CARD11* (Figura 4A) foi observado para as células CD14+, enquanto para *IFI16* (Figura 4B) foi observado nas células CD14+ e CD14-. Além disso, foi possível observar em ambas as frações um efeito aditivo do tratamento com ISG15 e IL-1 β na expressão de *I κ B α* (Figura 4C), como havia sido observado em PBMCs. Nenhuma alteração foi observada na expressão de *IL-10* (Figura 4D). Quanto a *IFN γ* , o tratamento com ISG15 não induziu sua expressão em nenhuma das frações de células analisadas nesse intervalo de tempo (Figura 4E).

Posteriormente, o mesmo experimento foi repetido com um diferente doador e mostrou os mesmos resultados (Figura 5). Dessa vez, TNF (100 ng/mL) foi utilizado como controle a fim de avaliar a eficiência da resposta celular a partir da expressão de *I κ B α* .

Em conclusão, com esses experimentos, não foi possível excluir uma via de sinalização via STATs que seja regulada por ISG15, entretanto, observou-se que as vias de sinalização que levam à transcrição de *CARD11*, *IFI16* e *I κ B α* (reguladas por STAT-2, STAT-5 e NF κ B, respectivamente) podem ser reguladas pela combinação ISG15 mais IL-1 β .

Figura 4: Expressão de *CARD11*, *IFI16*, *IL-10*, *I κ B α* e *IFN γ* em células CD14+ e CD14- tratadas com ISG15. PBMCs foram separados em duas frações (CD14+ e CD14-) e posteriormente tratados com ISG15 (500 ng/mL), IL-1 β (100 ng/mL), ambos ou LPS (100 ng/mL). A expressão dos genes *CARD11* (A), *IFI16* (B), *I κ B α* (C), *IFN γ* (D) e *IL-10* (E) foi analisada por qPCR.

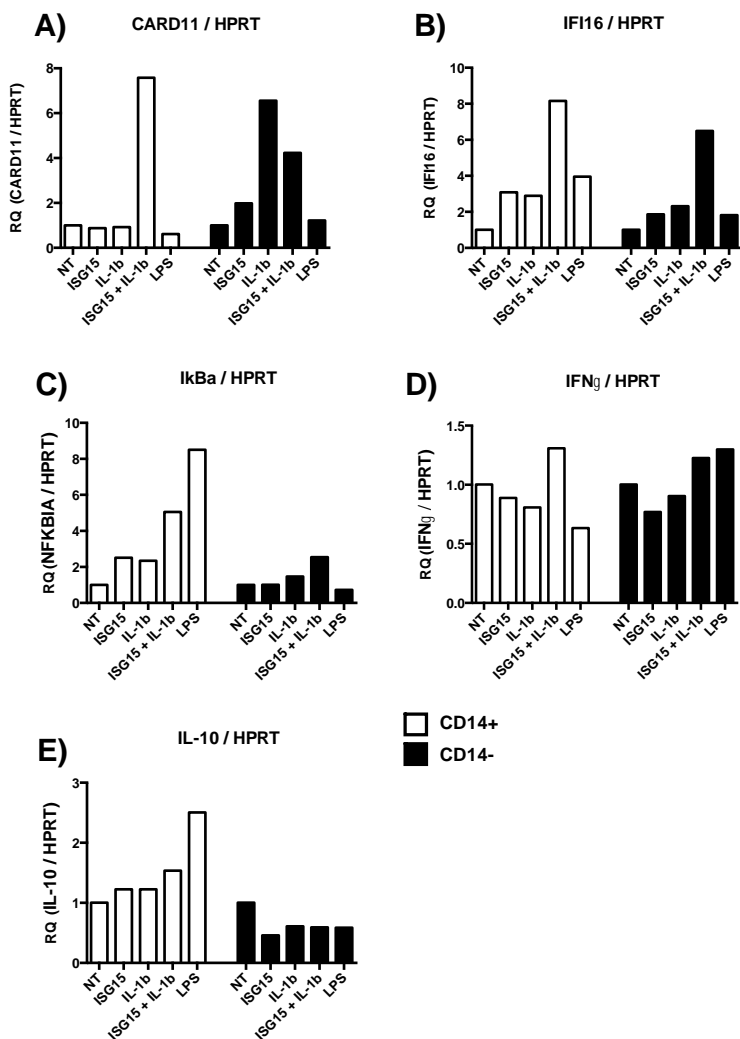
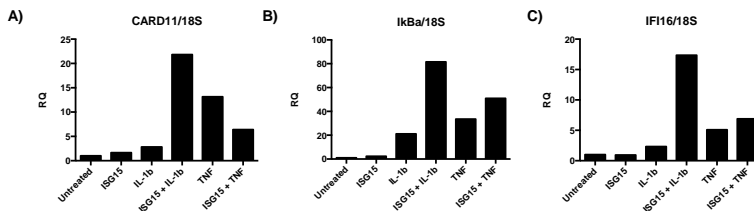


Figura 5: Expressão de *CARD11*, *IFI16* e *IkBa* em células CD14⁺ e CD14⁻ tratadas com ISG15. PBMCs foram separados em duas frações (CD14⁺ e CD14⁻). Após 18 horas na incubadora, as células foram tratadas com ISG15 (500 ng/mL), IL-1 β (100 ng/mL), ambos ou TNF (100 ng/mL). A expressão dos genes *CARD11* (A), *IkBa* (B) e *IFI16* (C) foi analisada por qPCR.



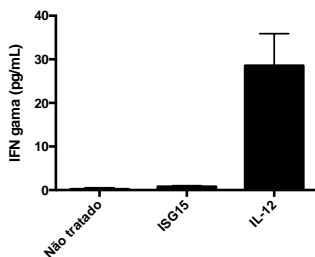
4.4. Teste da resposta de células de linhagem ao tratamento com ISG15

A separação de PBMCs é um método laborioso e oneroso. Além disso, seu uso implica em quantidade limitada de células, uma vez que há restrição do volume de sangue obtido por doador. Por outro lado, o trabalho com células de linhagem tende a ser mais prático e acessível, além de oferecer uma quantidade ilimitada de material para os estudos de proteômica.

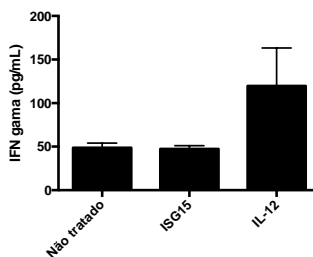
A fim de encontrar linhagens responsivas ao estímulo com ISG15 foram selecionadas células com características imunes como NK (linhagens NK1 e NK92), linfócitos T (Jurkat e Karpas) e monócitos (THP-1 e U937) (Figura 11). Inicialmente, a resposta ao tratamento com ISG15 foi avaliada pela presença no sobrenadante de $IFN\gamma$, considerada a resposta mais comum ao tratamento com ISG15, ou IL-10, como observado nos dados dessa tese. As quantificações foram realizadas utilizando ensaios de ELISA. Os experimentos demonstraram que a linhagem NK92 produziu $IFN\gamma$ após tratamento com o controle IL-12, porém não houve produção significativa em resposta ao tratamento com ISG15 (Figura 6A). Já a linhagem NK1, embora também tenha produzido $IFN\gamma$ em resposta ao controle positivo, não houve diferença significativa entre as células tratadas com ISG15 e o controle negativo (Figura 6B). Quanto às demais linhagens, foi observado que elas não responderam ao controle selecionado para a produção de $IFN\gamma$ e nem ao tratamento com ISG15 (Figura 6C-F).

Figura 6: Quantificação de $IFN\gamma$ em linhagens de células tratadas com ISG15. A – NK92 (características de células NK), B – NK1 (características de células NK), C – Jurkat (características de linfócitos T), D – Karpas (características de linfócitos T), E – U937 (características de monócitos), F – THP-1 (características de monócitos).

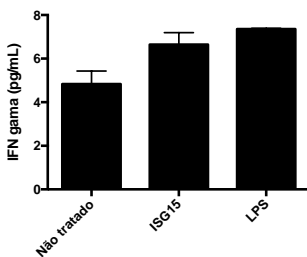
A) NK92



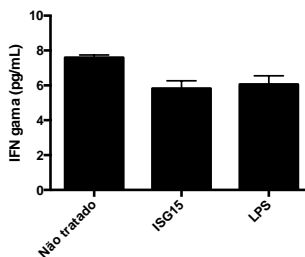
B) NKL



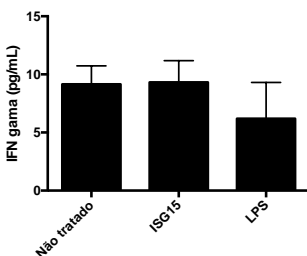
C) Jurkat



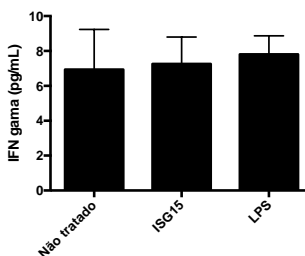
D) Karpas



E) U937



F) THP-1



Vale aqui ressaltar que a busca por uma linhagem de células responsiva a ISG15 não foi restrita a células com características imunes, mas também estendeu-se à linhagens de células epiteliais comumente utilizadas em laboratório tais como A549, HEK293T e Huh7.5. Visto

que uma grande produção e secreção de IFN γ e IL-10 não é esperada quando se trata daquelas linhagens, buscou-se avaliar a expressão dos genes que codificam para aquelas citocinas utilizando RT-qPCR. Os resultados obtidos foram muito variáveis e a impossibilidade de reproduzir um experimento levou-nos a dispensar esses dados que, por isso, não constam nesse anexo.

4.5. Obtenção de linhagem estável de células HEK293T transfectadas

Com objetivo de produzir uma linhagem de células que produzisse uma forma de ISG15 fusionada a tags que pudesse ser utilizada em ensaios de purificação por afinidade, o vetor pCEP4 contendo a sequência para a proteína recombinante ISG15 fusionada aos tags FLAG e STREP foi clonado, purificado e posteriormente transfectado em células da linhagem HEK293T. 48 horas após a transfecção as células começaram a ser tratadas com o antibiótico de seleção até obtermos uma cultura estável. Em seguida, uma alíquota das células e do sobrenadante dessa cultura foi retirada e as proteínas de ambas as frações foram submetidas a um *Western blot* utilizando o anticorpo anti-FLAG, um dos tags presentes na proteína recombinante. O resultado deste ensaio mostrou que a proteína tag-ISG15 está presente no sobrenadante da cultura, bem como nas células transfectadas (Figura 8).

Figura 7: Quantificação de IL-10 em linhagens de células tratadas com ISG15. A – NK92 (características de células NK), B – NKL (características de células NK), C – Jurkat (características de linfócitos T), D – Karpas (características de linfócitos T), E - U937 (características de monócitos), F – THP-1 (características de monócitos).

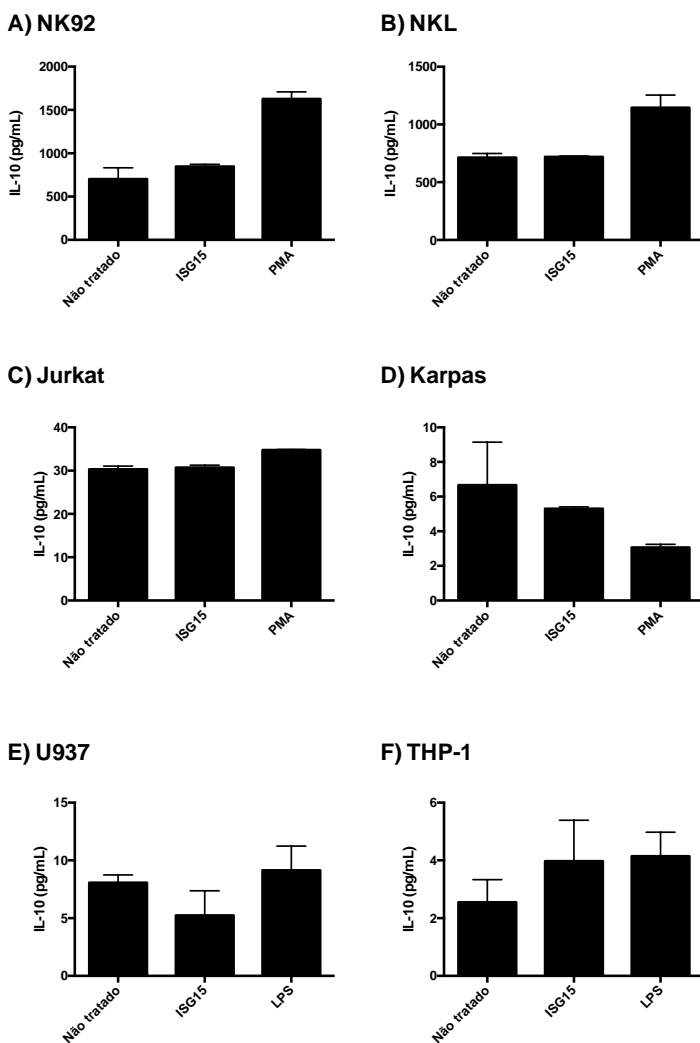
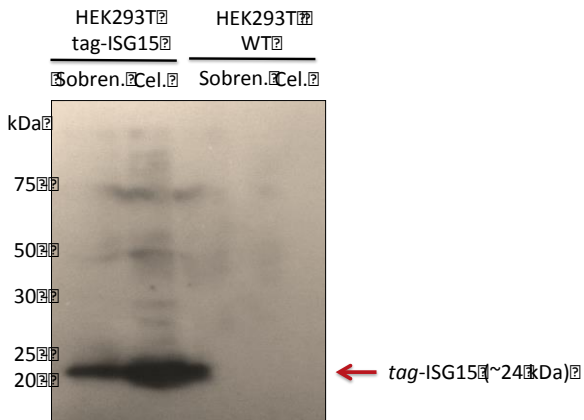


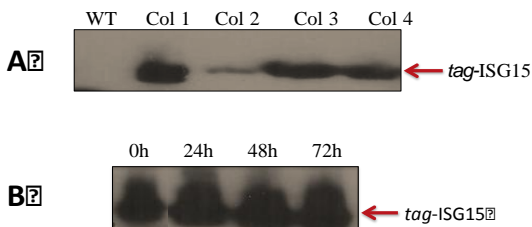
Figura 8: *Western blot* utilizando anticorpo anti-FLAG para detecção da proteína *tag-ISG15*. O anti-FLAG reconhece um dos “*tags*” fusionados ao ISG15. Sobren. corresponde às proteínas precipitadas do sobrenadante da cultura e Cel., às proteínas extraídas das células.



Certificada a eficiência da transfecção as células foram diluídas como descrito na metodologia e 4 clones foram isolados. A Figura 9A mostra que os 4 clones selecionados são positivos. Em seguida, um dos clones foi selecionado para testarmos a estabilidade da proteína no sobrenadante de cultura. Para isso, uma amostra de 1 mL do sobrenadante foi coletada quando a cultura atingiu 80% de confluência. Esse foi considerado o tempo 0h de coleta. Outras coletas foram feitas após 24h, 48h e 72h do tempo 0h. As proteínas dessas amostras foram precipitadas e submetidas a ensaio de *Western blot* com o anticorpo anti-FLAG. Como pode ser observado na Figura 9B, a proteína *tag-ISG15* encontra-se estável (ou com taxas equivalentes de produção e degradação) até pelo menos 72h em meio de cultura.

Figura

blot

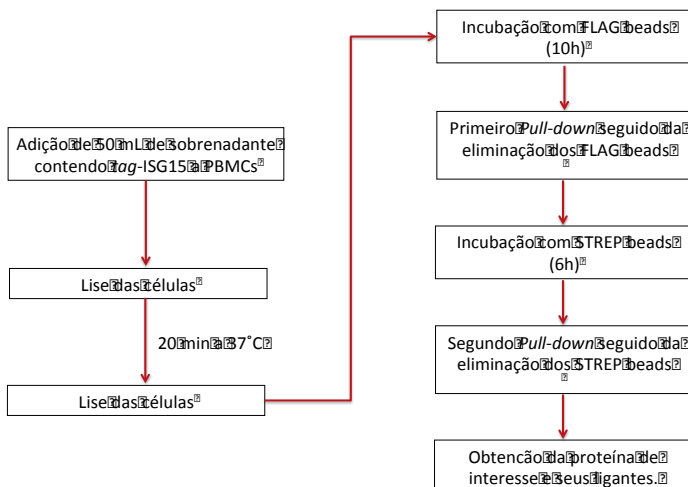
9:
Western

utilizando anticorpo anti-FLAG com proteínas precipitadas do meio de cultura de células HEK293T transfectadas com ISG15 para MoTAP. (A) WT: Células HEK293T não transfectadas, Col1-4: Diferentes clones expressando *tag*-ISG15. (B) Perfil de expressão de ISG15 para MoTAP durante 72h após obtenção de 80% de confluência em garrafa de cultura de 25 cm².

4.6. Ensaio de purificação por afinidade em tandem modificado (MoTAP)

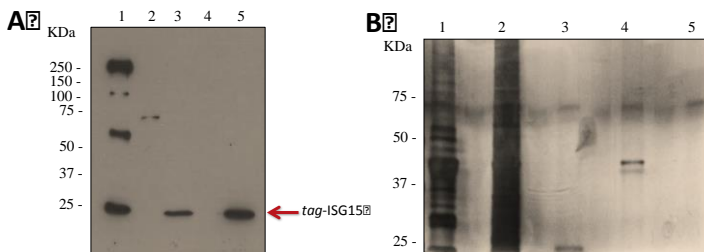
Os ensaios de purificação por afinidade em tandem foram adaptados de Haas e colaboradores (2009). Para facilitar a descrição dos resultados, a metodologia empregada está esquematizada (Figura 10).

Figura 10: Esquema da metodologia adaptada para o primeiro ensaio de purificação por afinidade em tandem.



Na primeira tentativa de realização do MoTAP, uma grande quantidade de PBMCs foi separada a partir de hemácias e leucócitos extraídos de filtros leucocitários. Esses PBMCs foram incubados com o sobrenadante contendo *tag*-ISG15 por 20 min a 37°C para permitir uma possível interação com proteínas de membrana. Posteriormente, essas células foram lisadas e o primeiro pull-down foi realizado com a resina contendo anticorpos anti-FLAG. Em seguida, as proteínas eluídas dessa resina foram utilizadas para um segundo *pull-down* utilizando a resina de streptactina. Em cada etapa, uma fração foi separada para realização de *Western blot* e uma eletroforese SDS-PAGE para colocação com nitrato de prata. O *Western blot* mostra a presença de *tag*-ISG15 aderida à resina anti-FLAG, no eluato dessa resina e no eluato da resina com streptactina, que foi a última etapa de filtração (Figura 11A, canaletas 1, 3 e 5, respectivamente), porém no gel de poliácridamida, onde era esperado encontrar as proteínas associadas a ISG15, não foi observado nenhum polipeptídeo (Figura 11B, canaleta 5).

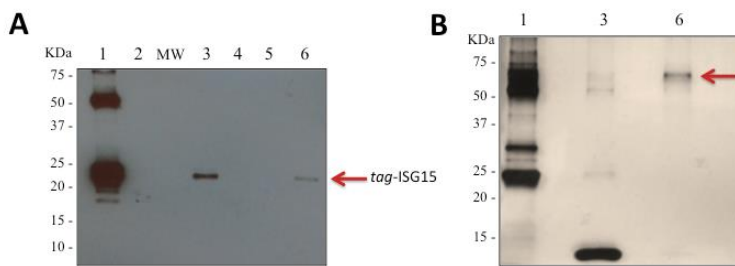
Figura 11: *Western blot* e SDS-PAGE das frações obtidas no primeiro ensaio de purificação por afinidade em tandem. (A) *Western blot* – Canaleta 1: Resina com anti-FLAG utilizada na primeira etapa filtração; (2) Sobrenadante do primeiro *pull-down* (filtrado da resina com anti-FLAG); (3) Resina de streptactina utilizada na segunda etapa de filtração; (4) Sobrenadante do segundo *pull-down* (filtrado da resina de streptactina); (5) Produto final eluído da resina de streptactina. (B) SDS-PAGE corado com nitrato de prata. Os números indicam as mesmas frações indicadas para o *Western blot*.



A segunda tentativa do MoTAP foi realizada com algumas modificações: o sobrenadante contendo *tag*-ISG15 foi incubado por 20 min a 4°C como uma forma de evitar internalização de proteínas de membrana. Outra modificação foi a incubação primeiro com resina de streptactina e depois com a resina com anti-FLAG. A Figura 10 mostra o resultado deste segundo experimento: o anticorpo anti-FLAG foi capaz de reconhecer o *tag*-ISG15 não só na resina com anti-FLAG, mas

também no eluato da última etapa de purificação (Figura 12A, canaleta 6). Nessa mesma fração, pode-se observar um polipeptídeo de aproximadamente 60 kDa no SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Figura 12B, canaleta 6).

Figura 12: Western blot e SDS-PAGE das frações obtidas no segundo ensaio de purificação por afinidade em tandem. (A) *Western blot* – (1) Resina de streptactina utilizada na primeira etapa filtração; (2) Sobrenadante do primeiro *pull-down* (filtrado da resina de streptactina); (3) Resina com anti-FLAG utilizadas na segunda etapa filtração; (4) Sobrenadante do segundo *pull-down* (filtrado da resina com anti-FLAG); (5) Produto final eluído da resina com anti-FLAG. (B) SDS-PAGE corado com nitrato de prata.



A banda equivalente ao polipeptídeo de 60 KDa foi isolada do gel, tratada com tripsina e enviada para análise por espectrometria de massas. Os resultados indicaram presença de proteínas presentes não só na membrana celular, mas também em outras regiões celulares como citoplasma, núcleo, membrana mitocondrial, matriz mitocondrial e retículo endoplasmático. Isso sugere que nossa abordagem para separação de membranas não foi eficiente e precisa ser revista. Por outro lado, a metodologia foi capaz de identificar alvos de ISG15 que também foram identificados por Zhao e colaboradores (2005) e Wong e colaboradores (2006) (especificados na Tabela 2 por um asterisco), indicando que foi realizada a imunoprecipitação de ligantes de ISG15. Dentre os potenciais alvos de ISG15, alguns possuem atividade no transporte de moléculas ou na transdução de sinal, permitindo especular seu envolvimento na sinalização mediada por essa proteína. Esses alvos seriam a proteína alfa enolase, a subunidade β -2 da proteína ligante de guanina, a proteína 2 de interação com TNFAIP3e a isoforma 2 da proteína Sigma 14-3-3, porém outros estudos seriam necessários para associar seu envolvimento às vias de sinalização das quais ISG15 participa.

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
sp P06733 EN OA_HUMAN	Alfa enolase humana*	Possui papel na glicólise e em vários outros processos celulares como controle de crescimento, tolerância a hipóxia e respostas alérgicas. Pode funcionar como receptor e ativador de plasminogênio na superfície celular de vários tipos celulares como leucócitos e neurônios. Estimula a produção de imunoglobulinas.	47	Citoplasma Membrana celular
tr E9PKE3 E9 PKE3_HUMAN	Proteína de choque térmico de 71 KDa	Ligante de ATP	68.8	-
sp P10809 CH60_HUMAN	Proteína de choque térmico de 60 KDa (mitocondrial)*	Chaperonina que participa da importação de proteínas mitocondriais. Junto com HSP10 facilita o dobramento correto de proteínas importadas. É um ligante de p53. Pode estar envolvida na regulação positiva de IFN alfa, IFN gama, IL-10 e IL-1, na ativação de células T e na resposta anti-viral.	61	Matriz mitocondrial
sp P14618 KPYM_HUMAN	Piruvato kinase M1/M2*	Enzima glicolítica. Participa do processo de morte de células tumorais independente de caspase. Importante para proliferação celular. Ligante de MHC de classe II	58	Citoplasma Núcleo
tr D3DTL2 D3DTL2_HUMAN	Enolase B*	Desenvolvimento e regeneração da musculatura estriada.	47	Citoplasma
sp P02545 LMNA_HUMAN	Prelamina-A/C	Precursoros de laminas A/C, componentes da lâmina nuclear. Prelaminas pode induzir danos no DNA das células musculares lisas vasculares levando à interrupção da mitose, instabilidade genômica e senescência prematura.	74,1	Núcleo Envelope nuclear Lâmina nuclear Nucleoplasma

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas**(continuação)**

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
tr A8K092 A8K092_HUMAN	Subunidade alfa de ATP sintase*	Porção da ATP-sintase da membrana mitocondrial. Evidências sugerem outras funções como ligação a angiotatina, MHC de classe I e a RNA. Participa do transporte transmembrana.	59,7	Membrana celular Membrana mitocondrial interna Meio extracelular
sp P13639 EF2_HUMAN	Fator de Elongação F2*	Catalisa a translocação GTP-dependente do ribossomo durante a tradução.	95,3	Citoplasma Núcleo
sp P07355-2 ANXA2_HUMAN	Isoforma 2 da anexina A2*	Proteína ligada a proteína de membrana. É regulada por cálcio. Pode estar envolvida na resposta a estresse. Pode fazer ligação de fosfolípidos de membrana com actina e citoesqueleto e participar na exocitose.	38,6	Meio extracelular Melanossomo
sp O43707 ACTN4_HUMAN	Alfa actinina 4*	-	104,9	Núcleo Citoplasma Junção celular
sp P40227 TCPZ_HUMAN	Subunidade zeta da proteína 1 – complexo T*	Chaperona que auxilia no dobramento de proteínas mediante hidrólise de ATP. Estudos in vitro mostraram papel no dobramento de actina e tubulina.	58	Citoplasma
sp Q15149-2 PLEC_HUMAN	Isoforma 2 de plectina*	Liga filamentos intermediários com microtubules e microfilamentos e ancora filamentos intermediários a demossomos e hemidesmossomos. Pode ligar proteínas a complexos de membrana da célula muscular.	531	Citoesqueleto Hemidesmossomo
tr G3V1A4 G3V1A4_HUMAN	Cofilina 1 (não muscular) isoforma CRA*	Ligante de actina.	16	Citoesqueleto

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas**(continuação)**

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
tr B7Z7A9 B7Z7 A9_HUMAN	Fosfoglicerato kinase 1*	Participa da via glicolítica	45	Membrana celular
sp P11021 GRP78 _HUMAN	Proteína regulada por glicose de 78 KDa	Provavelmente desempenha um papel na facilitação da montagem de complexos de proteínas multiméricas dentro do retículo endoplasmático.	72	Interior do retículo endoplasmáti co
tr E7EQG2 E7 EQG2_HUM AN	Fator de iniciação 4A	Atividade de helicase. Ligante de nucleotídeos e ATP	41,3	Núcleo
tr B7Z9L0 B7 Z9L0_HUMA N	Subunidade delta da proteína 1 do complexo T*	Chaperona que auxilia no dobramento de proteínas	52,3	Citoplasma
sp P78371- 2 TCPB_HUM AN	Isoforma 2 da proteína 1 do complexo T*	Chaperona que auxilia no dobramento de proteínas.	57,5	Citoplasma
sp P45880- 1 VDAC2_HU MAN	Isoforma 1 da proteína 2 do canal de ânions voltagem- dependente.	Forma um canal através da membrana externa mitocondrial que permite a difusão de pequenas moléculas hidrofílicas.	31,6	Membrana externa mitocondrial.
sp P21796 VD AC1_HUMA N	Proteína 1 do canal de ânions voltagem- dependente.	Forma um canal através da membrana externa mitocondrial e também da membrana plasmática. O canal na membrana mitocondrial externa permite a difusão de pequenas moléculas hidrofílicas enquanto na membrana plasmática está envolvida na regulação do volume celular e apoptose.	30,8	Membrana externa mitocondrial e membrana celular

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas

(continuação)

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
sp P52597 HNRPF_HUMAN	Ribonucleoproteína F nuclear heterogênea*	Componente dos complexos de ribonucleoproteína nuclear (hnRNP) que fornecem o substrato para os eventos de processamento de pré-mRNAs. Possui papel na regulação de <i>splicing</i> alternativo.	45,6	Núcleo
tr D6RAK8 D6RAK8_HUMAN	Proteína ligante de vitamina D	Envolvida em transporte e armazenamento de vitamina D, eliminação de G-actina extracelular, aumento da atividade quimiotática de C5 alfa para neutrófilos na inflamação e ativação de macrófagos	53	Meio extracelular
tr F8VPV9 F8VPV9_HUMAN	Subunidade β da ATP-sintase*	Liga-se e participa da quebra de ATP.	21	-
tr B7Z5D8 B7Z5D8_HUMAN	Triosefosfato isomerase	Participa de gliconeogênese.	30,8	Citoplasma Núcleo Meio extracelular
sp Q00839-2 HNRPU_HUMAN	Isoforma curta da ribonucleoproteína U nuclear heterogênea	Componente do complexo mediado por CRD (<i>Coding Region Determinant-Binding Protein</i>) que promove a estabilização do mRNA de c-myc.	90,5	Núcleo Citoplasma Membrana celular
tr J3KS05 J3KS05_HUMAN	Homólogo 1 da proteína Cromobox 1	Componente da heterocromatina. Reconhece e liga a H3 da histona metilada, levando à repressão epigenética. A interação com receptor de lamin B (LBR) pode contribuir para a associação da heterocromatina com a membrana nuclear interna.	20	Núcleo

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas**(continuação)**

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
		Necessário para a fragmentação das vesículas do Golgi durante a mitose e para a sua remontagem após a mitose. Participa de um complexo juntamente com UFD1 e NPLOC4 que liga proteínas ubiquitinadas e é necessário para a exportação de proteínas dobradas do ER para o citoplasma, onde são degradadas pelo proteassoma. Regula a atividade E3 de ubiquitina ligase de RNF19A.		
	sp P55072 TERA_HUMAN	ATPase transicional do retículo endoplasmático	89,3	Citoplasma Retículo endoplasmático Núcleo
		Envolvida na seleção de proteínas recém-sintetizadas para o retículo endoplasmático e as reencaminha para o citossol para degradação proteossômica. Também envolvido na resposta ao dano do DNA. Necessária para a translocação de proteínas da membrana externa mitocondrial para o citoplasma para degradação. Essencial para a maturação dos autofagosomas contendo ubiquitina. Atua como um regulador negativo da produção de interferon do tipo I		
	tr H0YHX9 H0YHX9_HUMAN	Subunidade alfa do complexo associado a proteína nascente*	22,9	Citoplasma
	tr B0AZP7 B0AZP7_HUMAN	Homologo de Proteína de membrana VAT-1 de vesícula sináptica	41,9	Membrana externa mitocondrial Citoplasma
		Participa da ativação do queratinócito regulado por cálcio nos mecanismos de reparo epidérmico. Regula negativamente a fusão mitocondrial.		

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas

(continuação)

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
	sp P38646 GRP75_HUMAN	Proteína mitocondrial de choque térmico de 70 KDa	20	Núcleo
	tr J3KPG2 J3KPG2_HUMAN	Proteína tumoral controlada por tradução	18,1	Citoplasma
	sp P07900-2 HS90A_HUMAN	Isoforma 2 da proteína de choque térmico de 90 KDa alfa*	84,6	Citoplasma Membrana celular
	tr G3V1U9 G3V1U9_HUMAN	Cadeia 1A da tubulina alfa*	50	Citoesqueleto

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas**(continuação)**

Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
sp P08238 HS90 B_HUMAN	Proteína de choque térmico de 90 KDa beta*	83,2	Núcleo Citoplasma Membrana celular Meio extracelular
tr A8K092 A8K 092_HUMAN	ATP-sintase subunidade alfa*	59,3	Membrana interna mitocondrial Membrana celular

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas

(continuação)

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
tr H0YAF8 H0YAF8_HUMAN	Similar à subunidade β -2 da proteína ligante de guanina	Receptor para kinase C activada 1 (RACK1). Também conhecida como subunidade de ligação de nucleótidos de guanina beta-2	22	Citoplasma Membrana celular
sp P15924 DESP_HUMAN	Desmoplaquina	Principal proteína de alto peso molecular de desmossomas. Envolvida na organização dos complexos de caderina-placoglobina desmossomal em domínios discretos de membrana plasmática e na ancoragem de filamentos intermediários aos desmossomos.	331,7	Citoesqueleto Membrana celular Junções celulares
sp P14923 PLAK_HUMAN	Junção Placoglobina	Componente citoplasmático comum das junções celulares. Componente da família das Cateninas.	81,7	Junções celulares Citoesqueleto Membrana celular
sp P02765 FETUA_HUMAN	Glicoproteína alfa-2-HS	Promove a endocitose. Possui afinidade por íons de cálcio e bário.	39,3	Meio extracelular
sp Q9UBG3 CRNN_HUMAN	Cornulina	Participa da clonogenicidade das linhas celulares do epitélio esofágico escamoso, atenua a morte celular apoptótica induzida pelo ácido desoxicólico (DCA) e a liberação de cálcio. Quando expressa nas linhas celulares de carcinoma escamoso oral, regula negativamente a proliferação celular congelando a fase G1.	53,5	Citoplasma
tr C9J0E4 C9J0E4_HUMAN	Cistatina A	Inibidor de cisteína-protease	7	Citoplasma

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas**(continuação)**

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
sp P31947-2 1433S_HUMAN	Isoforma 2 da proteína Sigma 14-3-3	Proteína adaptadora que participa da regulação de varias vias de sinalização. Liga-se a fosfoserinas ou fosfotreoninas modulando a atividade da outra proteína. Quando ligado ao KRT17, regula a síntese proteica e o crescimento de células epiteliais estimulando a via Akt / mTOR. Também pode regular a ubiquitinação e degradação de MDM2 e, assim, ativar p53 / TP53.	27,7	Citoplasma Núcleo Meio extracelular
sp P81605-2 DCD_HUMAN	Isoforma 2 de dermicidina	Exibe atividade antimicrobiana, limitando a infecção da pele por agentes patogênicos nas primeiras horas após a colonização bacteriana. Altamente eficaz contra <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> . Também exibe atividade proteolítica. Exibe atividade de fosfatase. Pode ligar IgG. Catalisa a formação de ligações cruzadas de iso-peptídeos entre resíduos de glutamina e lisina em várias proteínas, bem como a conjugação de poliaminas em proteínas. Envolvida na formação do envelope cornificado, um componente especializado formado abaixo da membrana celular de queratinócitos.	11,3	Meio extracelular
sp Q08188 TGM3_HUMAN	Proteína gama-glutamina transferase E	Facilita a diferenciação e a cornificação dos queratinócitos	76,6	Citoplasma
sp P31949 S10A_B_HUMAN	Proteína S100-A11	Inibidor de tiol proteinase intracelular. Inibidor reversível de catepsinas L, H e B.	11,7	Citoplasma Núcleo
sp P04080 CYT_B_HUMAN	Cistatina B		11,1	Citoplasma Núcleo

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas

(continuação)

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
tr B1AN48 B1A N48_HUMAN	Proteína rica em prolina 3	Componente de proteínas precursoras do envelope celular cornificado	17	-
sp P27482 CAL L3_HUMAN	Proteína 3 similar a calmodulina	Pode funcionar como uma cadeia leve específica de miosina não convencional- 10 (MYO10), também melhora a tradução de MYO10, possivelmente atuando como um acompanhante para a proteína de cadeia pesada MYO10 emergente. Pode competir com a calmodulina, ligando, com diferentes afinidades, aos substratos celulares.	16,9	Exossomos
tr P07476 INVO _HUMAN	Involucrina	Parte do envelope de células cornificadas insolúveis (CE) de epitélio escamoso estratificado.	68,5	Citoplasma
sp P01614 KV20 1_HUMAN	Região V- I da cadeia kappa de imunoglobulina	Região V do domínio variável das cadeias leves da imunoglobulina que participa do reconhecimento do antígeno	13,3	Meio extracelular Membrana celular
tr H7BZN7 H7B ZN7_HUMAN	Provável helicase de RNA dependente de ATP DDX56 *	-	20,8	Núcleo
tr D6RGJ2 D6R GJ2_HUMAN	Proteína 2 de interação com TNFAIP3	Atua como um inibidor da ativação do NFkB. Também está envolvida na via de sinalização MAP / ERK em tipos de células específicos. Pode estar envolvida na apoptose das células endoteliais.	39	Citoplasma Núcleo
tr B1AN99 B1A N99_HUMAN	Serina-protease 3	Atividade de tripsinogênio	19,2	-

Tabela 2: Potenciais ligantes de ISG15 identificados por espectrometria de massas**(continuação)**

	Polipeptídeo	Funções (de acordo com Gene Ontology)	Peso molecular (KDa)	Localização
sp P06732 KCRM_HUMAN	Creatina-kinase tipo M	Catalisa reversivelmente a transferência de fosfato entre ATP e vários fosfógenos (por exemplo, fosfato de creatina). As isoenzimas da creatina quinase desempenham um papel central na transdução de energia em tecidos com demandas de energia grandes e flutuantes, como músculo esquelético, coração, cérebro e espermatozóides.	43,1	Citoplasma
sp A11GU5 ARH37_HUMAN	Fator 37 de troca de nucleotídeo guanina Rho	Fator de troca de nucleotídeo guanina Rho	76,2	Citoplasma
sp Q5D862 FIL A2_HUMAN	Filagrina-2	Ligante de cálcio. Participa da proteção da pele e da degranulação de neutrófilos	248	Citoplasma Grânulos no citoplasma
tr H0Y3K2 H0Y3K2_HUMAN	UBR3 ligase de ubiquitina	Ligase de ubiquitina	107,6	Citoplasma
tr A8MX94 A8MX94_HUMAN	Glutathiona S-transferase P*	Atividade de glutathiona-transferase	19,4	Citoplasma

5. DISCUSSÃO

O ISG15 é um dos genes mais expressos em resposta a IFN do tipo I (Der et al., 1998) e foi a primeira proteína similar à ubiquitina (Ub) já descrita, o que lhe rendeu o nome UCRP (*Ubiquitin Cross-reactive Protein*), ou seja, proteína que apresenta reação cruzada com Ub (Haas et al., 1987; Loeb e Haas, 1992; Narasinhani et al., 1996). Essa similaridade é conferida por dois domínios que apresentam, cada um, cerca de 30% de similaridade com a sequência da Ub (Zhang e Zhang, 2011). Apesar dessa similaridade, essas duas proteínas apresentam diferenças interessantes. Enquanto a Ub está presente em todos os eucariotos e é praticamente 100% conservada entre as espécies, a ISG15 está presente exclusivamente em vertebrados e sua sequência pode variar de 98% de similaridade entre humanos e chimpanzés (Zhang e Zhang, 2011) a 32% de similaridade entre humanos e o organismo modelo peixe-zebra (Jeon et al., 2010).

A inexistência de ISG15 na maioria dos eucariotos e a viabilidade de animais *knockout* para ISG15, sugerem que esse gene não é essencial à vida (Osiak et al., 2005). Por outro lado, é um gene que está presente em vertebrados, podendo ser uma adaptação evolutiva (Zhang e Zhang, 2011). De fato, a proteína em questão contribui para vários processos biológicos que podem ter favorecido a adaptação desse grupo. Por exemplo, ISG15 é induzido por IFN do tipo I (Farrel et al., 1979; Korant et al., 1984; Knight e Cordova, 1991) e auxilia nas defesas antiviral (revisado por Lenschow et al., 2010; Skaug et al., 2010; Morales e Lenschow, 2013) e antibacteriana (Kim et al., 2003; Bogunovic et al., 2012) modificando as proteínas recém-sintetizadas (Dastur et al., 2006; Durfee et al., 2010). Ela também participa da regulação de proteínas celulares relacionadas à resposta a estresse (Malakhov et al., 2003; Giannakopoulos et al., 2005; Zhao et al., 2005; Takeuchi et al., 2006), contribui para a estabilidade do fator p53 protegendo o organismo de células cancerígenas (Huang et al., 2014; Huang e Bulavin, 2014), participa no desenvolvimento gestacional em mamíferos sendo importante para a fixação do óvulo e formação da placenta (Hansen e Pru, 2014; Schanz et al., 2014) e atua como citocina promovendo a ativação de células do sistema imune em infecções virais e bacterianas (D’Cunha et al., 1996a e 1996b; Bogunovic et al., 2012).

Apesar de vários trabalhos mostrarem a importância de ISG15 em todos esses processos, poucos foram capazes de explicar os mecanismos de ação dessa proteína. O papel de citocina de ISG15, por exemplo, é um dos ainda não foi esclarecido sendo o trabalho de Bogunovic et al. (2012) a evidência mais elegantemente apresentada dessa atividade

biológica de ISG15. Os autores mostraram que ela é induzida por IFN do tipo I em PBMCs, que ela induz a produção de IFN γ por linfócitos T e células NK, que ISG15 atua em sinergismo com o indutor clássico de produção de IFN γ , a citocina IL-12, e que a forma secretada de ISG15 é importante na defesa contra *M. tuberculosis*. Apesar da riqueza de dados, o mecanismo de ação de ISG15 continua indefinido. Não se sabe quais as vias de sinalização que ela ativa, como ela induz a produção de IFN ou se ela possui um receptor específico. Diante disso, buscou-se identificar vias de sinalização de ISG15, bem como ligantes dessa proteína presente na superfície de células imunes, tendo como hipótese que ela é uma citocina e possui um receptor de membrana.

A ideia inicial desse projeto era utilizar a metodologia de TAP em busca de um ligante de membrana daquela proteína. Após um planejamento inicial do projeto, a primeira abordagem foram ensaios de citometria e ELISA realizados pelo colaborador Dr. Rodrigo Guabiraba, que reproduziu os dados de Bogunovic e colaboradores (2012) utilizando a proteína disponível comercialmente. Nesses ensaios, foi possível confirmar a atividade biológica da proteína recombinante mostrando que células NK tratadas com ISG15 produzem mais IFN γ que as células não tratadas. Além disso, houve um discreto aumento na produção dessa citocina quando a dose de ISG15 foi aumentada. Nos ensaios de ELISA, foi observado um aumento da produção de IFN γ em PBMCs tratados simultaneamente com ISG15 e IL-12, corroborando os dados da literatura.

Posteriormente, com o objetivo de obter informações sobre uma possível via de sinalização ativada por ISG15 foram selecionados genes-alvo exclusivos de cada um de fatores de transcrição comumente utilizados na sinalização de citocinas (STAT 1-5) além de alvos de outros fatores de transcrição importantes como Nf κ B (a partir de IKBa), ISG54 e ISG56, cujos perfis de expressão foram analisados em diferentes intervalos de tempo após os tratamentos com ISG15, IL-1 β e ISG15+IL-1 β . Os intervalos foram selecionados tomando como referência o trabalho de Hao e Baltimore (2009) que mostraram que a cinética de expressão gênica no processo inflamatório é determinada por três parâmetros: genes que possuem mRNAs altamente instáveis e que, por isso, apresentam um pico de expressão poucos minutos após o estímulo; genes que são expressos pouco tempo após o tratamento e que possuem mRNAs mais estáveis - estes não apresentam um pico de expressão como os descritos anteriormente, mas mantêm um platô de expressão duradouro a partir de poucas horas após o tratamento; e por último, um grupo de genes que apresenta expressão tardia, esses

possuem mRNAs extremamente estáveis. Como são pouco degradados, eles se acumulam e apresentam um pico de expressão 12h ou mais após o tratamento. Considerando então que o perfil observado poderia ser dividido em três grupos (genes de expressão breve, expressão contínua e expressão tardia), a expressão dos alvos de STATs, I κ B α , ISG54 e ISG56 foram analisadas nos intervalos de 30 min, 6h e 20h após o tratamento. O resultado desse experimento mostrou que ISG15 sozinha foi capaz de induzir a expressão de genes *CXCL-1*, *CARD11* e *IL-10*, alvos conhecidamente regulados por STAT-1, STAT-2 e STAT-3 respectivamente. Além disso, novamente foi observado um efeito sinérgico entre ISG15 e IL-1 β , aumentando em mais de cinco vezes a expressão de *CARD11*, alvo de STAT-2; cerca de duas vezes a expressão de *IL-10*, alvo de STAT-3; cerca de vinte vezes a expressão de *IFI16*, alvo de STAT-5 e cerca de quatro vezes a expressão de *I κ B α* , quando comparados com os níveis de expressão induzidos por IL-1 β isoladamente. Apesar de não ter sido possível obter informações sobre uma via de sinalização específica de ISG15 exógena, a atividade combinada de ISG15 e IL-1 β nos chamou a atenção.

A fim de investigar se os efeitos de ISG15 observados anteriormente podiam ser atribuídos a alguma população de células específica, leucócitos de sangue periférico foram separados em monócitos e linfócitos que foram tratados com ISG15, IL-1 β , a combinação dessas citocinas e LPS. Como o efeito que havia nos chamado a atenção no experimento anterior ocorreu dentro de 30 minutos após o tratamento, optamos por restringir nossa análise a esse intervalo de tempo. Assim como no ensaio anterior, foi observado que ISG15 sozinha foi capaz de induzir alguma expressão dos genes *IL-10* e *I κ B α* . Além disso, a combinação de ISG15 e IL-1 β novamente induziu o aumento da expressão de alguns genes quando comparado com o tratamento somente com IL-1 β . Esse efeito pôde ser observado na expressão do gene *CARD11* em células CD14+ e na expressão do gene *IFI16* em células CD14+ e CD14-, mas, ao contrário do esperado, não foi observado aumento da expressão de IFN γ na população CD14- tratada com ISG15. De fato, os trabalhos que mostraram a produção desse IFN após o tratamento com ISG15 utilizaram ensaios de ELISA, *Western blot* ou citometria realizados 48h após o tratamento (D' Cunha et al., 1996a; Bogunovic et al, 2012). Adicionalmente, outro trabalho que utilizou RT-qPCR para avaliar a expressão de IFN γ detectou transcritos somente após um tempo mínimo de 4h após remoção de biópsia de fígado de camundongos WT (Hosoya et al., 2013), portanto, é provável que o período em que avaliamos a expressão de IFN γ após o

tratamento com ISG15 não tenha sido suficiente para observarmos qualquer variação.

Com essa informação em mãos, o experimento foi repetido utilizando monócitos separados de PBMCs com colunas magnéticas e submetidos a um intervalo de 16h antes dos tratamentos com ISG15, IL-1 β , ISG15 + IL-1 β , ISG15 + TNF ou TNF. Trinta minutos após o tratamento, o RNA total das células foi extraído. A análise por PCR em tempo real dos genes *CARD11*, *IFI16* e *I κ B α* mostrou que os controles funcionaram apropriadamente e mostrou mais uma vez a diferença de expressão observada previamente: os genes *CARD11*, *IFI16* e *I κ B α* estavam cerca de cinco vezes mais expressos nas células tratadas com ISG15 + IL-1 β quando comparadas às células tratadas somente com IL-1 β .

Como alternativa ao uso de células primárias, buscou-se encontrar uma linhagem de células que respondesse a ISG15 testando-se a capacidade dessa linhagem de produzir IFN gama ou IL-10. Com essa abordagem, buscávamos a oportunidade de trabalhar com uma população de células homogênea que pudesse ser utilizada em grandes quantidades e de forma menos laboriosa e onerosa que o trabalho com leucócitos primários. Aqui, foram testadas várias linhagens de células, principalmente com características imunes, mas nenhuma delas apresentou a mesma resposta que aquela observada em PBMCs e subpopulações, sugerindo que a resposta a ISG15 é exclusiva de células primárias ou necessita da comunicação entre diferentes populações. Desse ponto em diante os experimentos foram realizados somente com células de doadores saudáveis e originaram os resultados mostrados no corpo principal da tese.

Outra etapa dessa parte do trabalho foi a construção de reagentes e a padronização da técnica de MoTAP. A referência que utilizamos para o MoTAP sugere que sejam utilizadas cerca de 1×10^9 células no procedimento. Para conseguir essa quantidade de células foram utilizados filtros leucocitários descartados pelo setor de Hemoterapia do Hospital Universitário da UFSC (HU). Com essas células, conseguimos observar um polipeptídio de aproximadamente 60 kDa na fração de proteínas eluídas após a última etapa de purificação. Esse polipeptídio foi enviado para análise por espectrometria de massas na Universidade de Cambridge e os resultados indicaram a presença de algumas proteínas com função de transporte ou sinalização que serão investigados em outra oportunidade.

Em conclusão, experimentos realizados paralelamente àqueles que constam no corpo principal da tese mostraram que ISG15 pode atuar

juntamente com IL-1 β na regulação da transcrição de CARD11, IFI16 e NF κ B. Além disso, com a produção de uma linhagem de células expressando uma isoforma de ISG15 fusionada a tags, pode-se selecionar potenciais alvos que podem atuar como transportadores de ISG15 ou ainda, participar de uma potencial via de sinalização iniciada pela forma extracelular dessa proteína. Esses dados são preliminares e serão melhor investigados posteriormente pelo grupo.

6. ANEXO B

OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS:

As publicações listadas abaixo mostram contribuições realizadas em projetos de diferentes linhas de pesquisa e representam bem a experiência adquirida ao longo do doutorado. Os trabalhos como primeira autora foram frutos da pesquisa realizada durante o mestrado no Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ/MG e que foram publicadas após o curso. Já os demais trabalhos foram, em sua maioria, frutos de colaborações estabelecidas durante o doutorado com colegas da mesma pós-graduação ou com o grupo do Prof. Brian Ferguson da Universidade de Cambridge onde foi realizado o doutorado sanduiche.

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

Fleith RC, Lobo FP, Dos Santos PF, Rocha MM, Bordignon J, Strottmann DM, Patricio DO, Pavanelli WR, Lo Sarzi M, Santos CN, Ferguson BJ, Mansur DS.

Sci Rep. 2016 Nov 2;6:36339. doi: 10.1038/srep36339.

- 2. Molecular characterization of lipamide dehydrogenase gene in Trypanosoma cruzi populations susceptible and resistant to benznidazole.**

Dos Santos PF, Moreira DS, Baba EH, Volpe CM, Ruiz JC, Romanha AJ, Murta SM.

Exp Parasitol. 2016 Nov;170:1-9. doi:

10.1016/j.exppara.2016.08.006. Epub 2016 Aug 25.

- 3. The Schistosoma mansoni T2 ribonuclease omega-1 modulates inflammasome-dependent IL-1 β secretion in macrophages.**

Ferguson BJ, Newland SA, Gibbs SE, Tourlomousis P, Fernandes dos Santos P, Patel MN, Hall SW, Walczak H, Schramm G, Haas H, Dunne DW, Cooke A, Zaccone P.

Int J Parasitol. 2015 Nov;45(13):809-13. doi:

10.1016/j.ijpara.2015.08.005. Epub 2015 Sep 16.

4. **Markers for the population genetics studies of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae).**
Belisário CJ, Pessoa GC, dos Santos PF, Dias LS, Rosa AC, Diotaiuti L.
Parasit Vectors. 2015 May 13;8:269. doi: 10.1186/s13071-015-0879-1.

5. **Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination.**
Menin Á, Fleith R, Reck C, Marlow M, Fernandes P, Pilati C, Báfica A.
PLoS One. 2013;8(1):e53884. doi:
10.1371/journal.pone.0053884. Epub 2013 Jan 9.

6. **Molecular characterization of the hexose transporter gene in benznidazole resistant and susceptible populations of *Trypanosoma cruzi*.**
Dos Santos PF, Ruiz JC, Soares RP, Moreira DS, Rezende AM, Folador EL, Oliveira G, Romanha AJ, Murta SM.
Parasit Vectors. 2012 Aug 7;5:161. doi: 10.1186/1756-3305-5-161.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

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

Received: 13 July 2016
Accepted: 14 October 2016
Published: 02 November 2016

Renata C. Fleith¹, Francisco P. Lobo², Paula F. dos Santos¹, Mariana M. Rocha³, Juliano Bordignon⁴, Daisy M. Strottmann⁵, Daniel O. Patrício⁶, Wander R. Pavanelli⁴, Maria Lo Sarzi⁷, Claudia N. D. Santos⁸, Brian J. Ferguson⁹ & Daniel S. Mansur¹

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

Dengue is a mosquito-borne disease caused by a group of viruses collectively known as *Dengue virus*, belonging to the *Flaviviridae* family. It affects nearly 390 million people every year worldwide¹ with symptoms ranging from mild fever to severe shock syndrome. Although recently different vaccination strategies have achieved reasonable levels of protection, a vaccine that protects uniformly against the circulating serotypes is not available². This is partly due to the high variability among these viruses, which can lead to partially protective immune responses and antibody dependent enhancement (ADE) of infection when non-neutralising antibodies facilitate virus entry by Fc gamma receptors³⁻⁶.

Dengue viruses (DV) are enveloped, ssRNA viruses with a single open reading frame encoding three structural and seven non-structural proteins⁷. The genetic variance amongst DV results in diverse immune responses such that they are classified into four serogroups (DV1–4) based on antigenic diversity^{8,9}. Although mutations occur randomly in the genome, viral proteins show a combination of regions that are permissive to multiple mutations, which enable immune evasion through antigenic variation, and regions where amino acid residues critical for structure and viral fitness are conserved¹⁰. In general, regions exposed to the immune system are prone to variation, however, even the envelope (E) protein, the main antigenic determinant on the virion, retains highly conserved cryptic peptides^{10,11}. It has been demonstrated that those conserved regions in structural proteins have an important role in viral fitness and might be targets of broadly neutralising antibodies in viruses such as HIV

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

**Molecular characterization of lipoamide dehydrogenase gene in
Trypanosoma cruzi populations susceptible and resistant to
benznidazole**

Paula F. dos Santos, Douglas S. Moreira, Elio Baba, Caroline Volpe, Jerônimo C. Ruiz,
Alvaro J. Romanha, Silvane M. F. Murta*

*Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, Caixa Postal 1743,
CEP 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil.*

Abbreviations: BZ, benznidazole; LipDH, lipoamide dehydrogenase; Tc, Trypanosoma cruzi.

* Corresponding author: Tel.: +55 31 33497780; fax: +55 31 32953566.

E-mail address: silvane@cpqrr.fiocruz.br (S. M. F. Murta)



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara

Succinctus

The *Schistosoma mansoni* T2 ribonuclease omega-1 modulates inflammasome-dependent IL-1 β secretion in macrophages

Brian J. Ferguson^{a,1}, Stephen A. Newland^{b,1}, Sarah E. Gibbs^a, Panagiotis Tourioulis^c,
Paula Fernandes dos Santos^b, Meghana N. Patel^b, Samuel W. Hall^b, Henning Walczak^d,
Gabriele Schramm^e, Helmut Haas^f, David W. Dunne^a, Anne Cooke^a, Paola Zaccaro^{a,*}

^a Department of Pathology, University of Cambridge, Tennis Court Road, CB2 1QP Cambridge, UK

^b Department of Medicine, University of Cambridge, Cambridge, UK

^c Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Cambridge, UK

^d Centre for Cell Death, Cancer, and Inflammation (CCCI), UCL Cancer Institute, University College London, London, UK

^e Research Center Borstel, D-23845 Borstel, Germany

^f HelminGuard, D-23867 Suedfeld, Germany



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2014

Received in revised form 4 August 2015

Accepted 5 August 2015

Available online 16 September 2015

Keywords:

T2 ribonuclease

Omega-1

IRIS α -1*Schistosoma mansoni* antigens

Inflammasome

IL-1 β

ABSTRACT

The T2 ribonuclease omega-1 is a powerful Th2-inducing factor secreted by the eggs of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. Omega-1 can modulate pattern recognition receptor-induced inflammatory signatures and alter antigen presentation by dendritic cells. Recent findings have suggested that component(s) contained in or secreted by *S. mansoni* eggs (soluble egg antigen) can also enhance IL-1 β secretion by dendritic cells stimulated with pattern recognition receptor ligands. Here we show that omega-1 enhances IL-1 β secretion in macrophages stimulated with Toll-like receptor 2 ligand, and propose omega-1 as the factor in soluble egg antigen capable of regulating inflammasome activity. This effect is dependent on the C-type lectin receptor Dectin-1, caspase-8 and the ASC inflammasome adaptor protein, highlighting the ability of omega-1 to regulate multiple pattern recognition receptor signalling pathways. These mechanistic insights into manipulation of host immunity by a parasite product have implications for the design of anti-inflammatory therapeutic drugs.

© 2015 Published by Elsevier Ltd. on behalf of Australian Society for Parasitology Inc.

Schistosoma mansoni is a parasitic worm that causes chronic human morbidity worldwide (Colley et al., 2014). Individual female worms can live for years in their human host's mesenteric blood vessels producing hundreds of highly immunogenic eggs per day that pass into the gut lumen to continue the parasite's life-cycle. However, eggs are also continuously carried by the blood and trapped in host tissues, particularly the pre-sinusoidal hepatic capillary beds, where they provoke granuloma formation and chronic fibrotic morbidity (Colley et al., 2014). Myeloid cells, in particular macrophages (M Φ), are key components of the early response to *S. mansoni* egg products, producing inflammatory chemokines, cytokines and oxidative products, via activation of pattern recognition receptors (PRRs). Subsequently, however, M Φ s are driven to an alternatively activated phenotype (aaM Φ or M2) by molecules expressed/secreted by eggs. These M Φ s express specific transcriptional profiles including the arginase

and fizz genes and are essential for limiting tissue damage and maintaining the long-term balance between the chronically infected host and long-lived parasite, as excessive acute pro-inflammatory or fibrotic responses could be life-threatening to the host and thereby compromise the parasite (Hoffmann et al., 2000, 2002). Furthermore aaM Φ surrounding the eggs contribute to Th2 and regulatory responses, fibroblast proliferation, collagen deposition and act as antigen presenting cells (APCs) driving adaptive immunity (Barron and Wynn, 2011). Mechanistic studies of the effects of schistosome products on classical M Φ and aaM Φ functions are required to understand the interplay between these chronically infecting metazoan parasites and the mammalian host immune system.

Cytokines are secreted by myeloid cells and provide critical signals that drive adaptive immune responses. Stimulation of PRRs such as Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors (CLRs) and inflammasomes on myeloid cells by microbial products results in rapid and potent production of multiple cytokines including the IL-1 family, such as IL-1 α and IL-1 β . These proteins are essential mediators of innate immunity and inflammation orchestrating

* Corresponding author. Tel.: +44 1223 333716.

E-mail address: pz2006@cam.ac.uk (P. Zaccaro).

¹ These authors contributed equally to this work.

SHORT REPORT

Open Access

Markers for the population genetics studies of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae)

Carliota Josefovicz Belisário, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa, Paula Fernandes dos Santos, Leticia Sena Dias, Aline Cristine Luiz Rosa and Liléia Diotaiuti*

Abstract

Background: *Triatoma sordida*, a vector of *Trypanosoma cruzi*, is native of Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, and Uruguay, and occurs primarily in peridomestic. Currently, it is the species most frequently captured by the Chagas Disease Control Program in Brazil. For this reason, population genetic studies attract great interest, as they can provide further information about the dispersal and household invasion processes of this species. In the absence of suitable markers, the objective of this study was to test the cross amplification of microsatellite primers.

Findings: 23 primers were tested for microsatellite loci already described for other species of the genus *Triatoma* sp. Forty four specimens of *T. sordida* captured in the north of Minas Gerais were used to validate the use of standardized loci for population genetic analyses. It was possible to amplify 10 of the 23 loci tested for *T. sordida*.

Conclusions: This is the first study that provides 10 microsatellite markers for population analysis of this triatomine species. Cross-amplification of primers can be used among other phylogenetically related species whose loci are already available for study.

Keywords: Triatominae, *Triatoma sordida*, Microsatellites, Population genetic, Chagas disease

Findings

Background

Triatoma sordida (Stål, 1859) is the triatomine species most frequently captured by Brazil's Chagas Disease Control Program [1] and in neighboring countries [2]. It occurs in Bolivia, Paraguay, Argentina and Uruguay [2], and Brazilian Cerrado [1]. This vector has broad ecological valence, and so it can live in several ecotopes and use different food sources [3]. It shows high rates of active dispersal [4], and it can also be passively introduced into artificial environments, possibly in firewood piles transported from forests to households, or from one household to another [5], or attached to bird feathers [3]. In an artificial environment, *T. sordida* is often associated with peridomestic; in addition, it uses birds as its preferred hosts. Thus, this vector has secondary epidemiological importance [1].

Microsatellites are established as a valid technique to study diversity for more than a decade. Because they have

highly polymorphic loci, they are widely used to investigate the genetic structure of natural populations. These genetic markers possess high reproducibility, multiallelic nature, codominant inheritance, abundance and wide distribution throughout the genome [6].

The use of microsatellites has not been widely applied in triatomines yet, but they are very sensitive markers and yield promising results in the population analyses of this subfamily. Microsatellite markers have been identified and characterized for the following triatomines: *Rhodnius pallescens* [7], *Triatoma dimidiata* [8], *Triatoma infestans* [9, 10], *Rhodnius prolixus* [11, 12], *Triatoma pseudomaculata* [13] and *Triatoma brasiliensis* [14]. Microsatellites described for particular species may sometimes be used to characterize others, e.g., markers for *R. prolixus* that are used for other species of the genus. However, this requires specific research that is certainly associated with the degree of similarity among species [11].

The analysis of gene flow between populations of the wild environment, intradomestic and peridomestic can help understand the factors that favor the infestation/reinfestation of the household, and hence provide guidelines for Chagas disease control programs [15, 16]. Considering

* Correspondence: diotaiuti@ccqpr.fiocruz.br
Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, CEP 30.190-002 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil



Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination

Álvaro Menin^{1*}, Renata Fleith¹, Carolina Reck², Mariel Marlow³, Paula Fernandes¹, Célio Pilati², André Báfica^{1*}

1 Laboratory of Immunobiology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, **2** Laboratory of Histology and Immunohistochemistry, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brazil, **3** Laboratory of Protozoology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Abstract

Rational discovery of novel immunodiagnostic and vaccine candidate antigens to control bovine tuberculosis (bTB) requires knowledge of disease immunopathogenesis. However, there remains a paucity of information on the *Mycobacterium bovis*-host immune interactions during the natural infection. Analysis of 247 naturally PPD+ *M. bovis*-infected cattle revealed that 92% (n = 228) of these animals were found to display no clinical signs, but presented severe as well as disseminated bTB-lesions at *post-mortem* examination. Moreover, dissemination of bTB-lesions positively correlated with both pathology severity score (Spearman $r = 0.48$; $p < 0.0001$) and viable tissue bacterial loads (Spearman $r = 0.58$; $p = 0.0001$). Additionally, granuloma encapsulation negatively correlated with *M. bovis* growth as well as pathology severity, suggesting that encapsulation is an effective mechanism to control bacterial proliferation during natural infection. Moreover, multinucleated giant cell numbers were found to negatively correlate with bacterial counts (Spearman $r = 0.25$; $p = 0.03$) in lung granulomas. In contrast, neutrophil numbers in the granuloma were associated with increased *M. bovis* proliferation (Spearman $r = 0.27$; $p = 0.021$). Together, our findings suggest that encapsulation and multinucleated giant cells control *M. bovis* viability, whereas neutrophils may serve as a cellular biomarker of bacterial proliferation during natural infection. These data integrate host granuloma responses with mycobacterial dissemination and could provide useful immunopathological-based biomarkers of disease severity in natural infection with *M. bovis*, an important cattle pathogen.

Citation: Menin Á, Fleith R, Reck C, Marlow M, Fernandes P, et al. (2013) Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. PLOS ONE 8(1): e53884. doi:10.1371/journal.pone.0053884

Editor: Pere-Joan Cardona, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, CIBERes, Spain

Received: August 2, 2012; **Accepted:** December 4, 2012; **Published:** January 9, 2013

Copyright: © 2013 Menin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by CAPES (PROCAD), CNPq (INCT/INTEV), National Institutes of Health 394 (GRIP/Fogarty) and the Howard Hughes Medical Institute (ICS Program). AM is a CNPq 395 scientist scholar. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: andrea.bafica@ufsc.br (AB); amenin@ccb.ufsc.br (AM)

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB), caused by infection with the intracellular acid-fast bacilli *Mycobacterium bovis*, is an important neglected zoonosis, which significantly decreases livestock production and economically affects international trade [1–3]. Additionally, *M. bovis* infection is estimated to be responsible for ~10% of human tuberculosis (TB) in Africa [3] and ~2.5% of human cases in Latin America [4], thus underscoring the importance of disease control programs based on the understanding of infection dynamics [5–8].

Currently, no effective vaccine exists for bovine TB. The main procedures to control/eradicate this intractable disease are diagnosis and compulsory slaughter of positive animals [9]. In this context, the most utilized diagnostic tool for *M. bovis* infection in cattle is the single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICCT), which measures a delayed type hypersensitivity response to the tuberculin antigen-purified protein derivative (PPD) [10], but may fail to detect specific pathogen infection [11–13]. Indeed, Claridge et al. have recently reported that *Piscicola hepatica* co-infection in bTB diseased cattle significantly decreases

the numbers of PPD-positive animals [11], demonstrating PPD sensitivity could be affected by parasitic co-infections. Together, these data indicate an urgent need for an effective vaccine as well as better diagnostic tests to control bTB. However, there remains a paucity of information on bTB immunopathogenesis, especially during natural infection.

M. bovis primarily infects macrophages, where they can survive, replicate and disseminate into different anatomical sites [14,15]. The risk of transmission as well as the host's survival relies mainly on the ability of well-organized structures called granulomas to contain mycobacterial infection [14–17]. Tuberculous granuloma is a complex host-protective structure generated in response to persistent mycobacterial stimuli with focal accumulation of inflammatory cells, such as multinucleated giant cells and lymphocytes [16,18–21]. In addition, encapsulation, a process involving production of connective tissue around the granuloma, has been shown to be critical for controlling both mycobacterial growth and tissue dissemination [14,15,22].

The pathological outcome of experimental *M. bovis* infection has been associated with diversity and efficiency of host immune

RESEARCH

Open Access

Molecular characterization of the hexose transporter gene in benzimidazole resistant and susceptible populations of *Trypanosoma cruzi*

Paula F dos Santos¹, Jerônimo C Ruiz², Rodrigo P P Soares¹, Douglas S Moreira¹, Antônio M Rezende¹, Edson L Folador¹, Guilherme Oliveira^{1,2,3}, Alvaro J Romanha¹ and Silvane M F Murta^{1*}

Abstract

Background: Hexose transporters (HT) are membrane proteins involved in the uptake of energy-supplying glucose and other hexoses into the cell. Previous studies employing the Differential Display technique have shown that the transcription level of the HT gene from *T. cruzi* (*TcrHT*) is higher in an *in vitro*-induced benzimidazole (BZ)-resistant population of the parasite (17 LER) than in its susceptible counterpart (17 WTS).

Methods: In the present study, *TcrHT* has been characterized in populations and strains of *T. cruzi* that are resistant or susceptible to BZ. We investigated the copy number and chromosomal location of the gene, the levels of *TcrHT* mRNA and of TcrHT activity, and the phylogenetic relationship between TcrHT and HTs from other organisms.

Results: *In silico* analyses revealed that 15 sequences of the TcrHT gene are present in the *T. cruzi* genome, considering both CL Brener haplotypes. Southern blot analyses confirmed that the gene is present as a multicyclic tandem array and indicated a nucleotide sequence polymorphism associated to *T. cruzi* group I or II. Karyotype analyses revealed that *TcrHT* is located in two chromosomal bands varying in size from 1.85 to 2.6 Mb depending on the strain of *T. cruzi*. The sequence of amino acids in the HT from *T. cruzi* is closely related to the HT sequences of *Leishmania* species according to phylogenetic analysis. Northern blot and quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction analyses revealed that *TcrHT* transcripts are 2.6-fold higher in the resistant 17 LER population than in the susceptible 17 WTS. Interestingly, the hexose transporter activity was 40% lower in the 17 LER population than in all other *T. cruzi* samples analyzed. This phenotype was detected only in the *in vitro*-induced BZ resistant population, but not in the *in vivo*-selected or naturally BZ resistant *T. cruzi* samples. Sequencing analysis revealed that the amino acid sequences of the TcrHT from 17WTS and 17LER populations are identical. This result suggests that the difference in glucose transport between 17WTS and 17LER populations is not due to point mutations, but probably due to lower protein expression level.

Conclusion: The BZ resistant population 17 LER presents a decrease in glucose uptake in response to drug pressure.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Drug resistance, Hexose transporters

* Correspondence: silvane@cpqrr.fiocruz.br

¹Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2012 dos Santos et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

7. REFERÊNCIAS DA DISCUSSÃO E DO ANEXO A

ABLASSER, A. et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. **Nature**, v. 498, n. 7454, p. 380-4, Jun 20 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23722158> >.

ANDREJEVA, J. et al. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17264-9, Dec 7 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15563593> >.

BAUER, S. et al. Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 315-28, 2008. ISSN 0171-2985 (Print) 0171-2985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406377> >.

BLOMSTROM, D. C. et al. Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence. **J Biol Chem**, v. 261, n. 19, p. 8811-6, Jul 5 1986. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3087979> >.

BOERNER, S. et al. Assessment of MYCN amplification in neuroblastoma biopsies by differential polymerase chain reaction. **Pediatr Pathol**, v. 14, n. 5, p. 823-32, Sep-Oct 1994. ISSN 0277-0938 (Print) 0277-0938 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7808981> >.

BOGUNOVIC, D. et al. Mycobacterial disease and impaired IFN-gamma immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. **Science**, v. 337, n. 6102, p. 1684-8, Sep 28 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22859821> >.

BONNEAU, M. et al. The effects of immunization against luteinizing hormone-releasing hormone on performance, sexual development, and levels of boar taint-related compounds in intact male pigs. **J Anim Sci**, v. 72, n. 1, p. 14-20, Jan 1994. ISSN 0021-8812 (Print) 0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138482> >.

BORDEN, E. C. et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 12, p. 975-90, Dec 2007. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18049472> >.

CHIU, Y. H.; MACMILLAN, J. B.; CHEN, Z. J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. **Cell**, v. 138, n. 3, p. 576-91, Aug 7 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631370> >.

COX, G. N. et al. Recombinant human insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-1 inhibits somatic growth stimulated by IGF-I and growth hormone in hypophysectomized rats. **Endocrinology**, v. 135, n. 5, p. 1913-20, Nov 1994. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525258> >.

D'CUNHA, J. et al. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 1, p. 211-5, Jan 9 1996. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8552607> >.

D'CUNHA, J. et al. In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. **J Immunol**, v. 157, n. 9, p. 4100-8, Nov 1 1996. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892645> >.

DASTUR, A. et al. Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. **J Biol Chem**, v. 281, n. 7, p. 4334-8, Feb 17 2006. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407192> >.

DE VEER, M. J. et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 6, p. 912-20, Jun 2001. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404376> >.

DER, S. D. et al. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15623-8, Dec 22 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861020> >.

DIAMOND, M. S.; FARZAN, M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 1, p. 46-57, Jan 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237964> >.

DIMITROULAKOS, J. et al. NUB-7: a stable I-type human neuroblastoma cell line inducible along N- and S-type cell lineages. **Cell Growth Differ**, v. 5, n. 4, p. 373-84, Apr 1994. ISSN 1044-9523 (Print) 1044-9523 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8043511> >.

DIPPERT, K. D. et al. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, v. 41, n. 7, p. 1411-23, 1994. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727495> >.

DRIMAN, D. et al. MYCN gene amplification in rhabdomyosarcoma. **Cancer**, v. 73, n. 8, p. 2231-7, Apr 15 1994. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8156531> >.

DUNNE, M. J. et al. Ion channels and the molecular control of insulin secretion. **Biochem Soc Trans**, v. 22, n. 1, p. 6-12, Feb 1994. ISSN 0300-5127 (Print) 0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7515832> >.

DURFEE, L. A. et al. The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. **Mol Cell**, v. 38, n. 5, p. 722-32, Jun 11 2010. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542004> >.

EA, C. K. et al. EHMT1 protein binds to nuclear factor-kappaB p50 and represses gene expression. **J Biol Chem**, v. 287, n. 37, p. 31207-17, Sep 07 2012. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22801426> >.

ELLISON, J. et al. Detection of mutations and polymorphisms using fluorescence-based dideoxy fingerprinting (F-ddF). **Biotechniques**, v. 17, n. 4, p. 742-3, 746-7, 748-53, Oct 1994. ISSN 0736-6205 (Print) 0736-6205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7833039> >.

FARRELL, P. J.; BROEZE, R. J.; LENGYEL, P. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. **Nature**, v. 279, n. 5713, p. 523-5, Jun 7 1979. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/571963> >.

FERGUSON, B. J. et al. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. **Elife**, v. 1, p. e00047, 2012. ISSN 2050-084X (Electronic) 2050-084X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251783> >.

FRIEDMAN, R. L. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. **Cell**, v. 38, n. 3, p. 745-55, Oct 1984. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6548414> >.

FUERTES, M. B. et al. Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. **Trends Immunol**, v. 34, n. 2, p. 67-73, Feb 2013. ISSN 1471-4981 (Electronic)
1471-4906 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23122052> >.

GAZDZINSKI, P.; SQUIRES, E. J.; JULIAN, R. J. Hepatic lipidosis in turkeys. **Avian Dis**, v. 38, n. 2, p. 379-84, Apr-Jun 1994. ISSN 0005-2086 (Print)
0005-2086 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7980293> >.

GIANNAKOPOULOS, N. V. et al. Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 336, n. 2, p. 496-506, Oct 21 2005. ISSN 0006-291X (Print)
0006-291X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139798> >.

GONZALEZ-NAVAJAS, J. M. et al. Immunomodulatory functions of type I interferons. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 2, p. 125-35, Jan 06 2012. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22222875> >.

HAAS, A. L. et al. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. **J Biol Chem**, v. 262, n. 23, p. 11315-23, Aug 15 1987. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440890> >.

HAAS, T. L. et al. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. **Mol Cell**, v. 36, n. 5, p. 831-44, Dec 11 2009. ISSN 1097-4164 (Electronic)
1097-2765 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20005846> >.

HALLER, O.; KOCHS, G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. **J Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 1, p. 79-87, Jan 2011. ISSN 1557-7465 (Electronic)
1079-9907 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21166595> >.

HANSEN, A. et al. Abnormalities in peripheral B cell memory of patients with primary Sjogren's syndrome. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 6, p. 1897-908, Jun 2004. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15188366> >.

HANSEN, M. S. et al. Accelerated dynamic Fourier velocity encoding by exploiting velocity-spatio-temporal correlations. **MAGMA**, v. 17, n. 2, p. 86-94, Nov 2004. ISSN 0968-5243 (Print)
0968-5243 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15565503> >.

HANSEN, M. S. et al. On the influence of training data quality in k-t BLAST reconstruction. **Magn Reson Med**, v. 52, n. 5, p. 1175-83, Nov 2004. ISSN 0740-3194 (Print)
0740-3194 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15508162> >.

HANSEN, T. R.; PRU, J. K. ISGylation: a conserved pathway in mammalian pregnancy. **Adv Exp Med Biol**, v. 759, p. 13-31, 2014. ISSN 0065-2598 (Print)
0065-2598 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25030758> >.

HAO, S.; BALTIMORE, D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. **Nat Immunol**, v. 10, n. 3, p. 281-8, Mar 2009. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19198593> >.

HARDING, E. A. et al. Polymyxin B has multiple blocking actions on the ATP-sensitive potassium channel in insulin-secreting cells. **Pflugers Arch**, v. 426, n. 1-2, p. 31-9, Jan 1994. ISSN 0031-6768 (Print)

0031-6768 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8146022> >.

HARE, N. J. et al. Microparticles released from Mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages contain increased levels of the type I interferon inducible proteins including ISG15. **Proteomics**, v. 15, n. 17, p. 3020-9, Sep 2015. ISSN 1615-9861 (Electronic) 1615-9853 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26036210> >.

HARFORD, J.; LUTHER, P.; SQUIRE, J. Equatorial A-band and I-band X-ray diffraction from relaxed and active fish muscle. Further details of myosin crossbridge behaviour. **J Mol Biol**, v. 239, n. 4, p. 500-12, Jun 17 1994. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8006964> >.

HENKES, L. E. et al. Embryo mortality in Isg15^{-/-} mice is exacerbated by environmental stress. **Biol Reprod**, v. 92, n. 2, p. 36, Feb 2015. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25505199> >.

HOGQUIST, K. A.; UNANUE, E. R.; CHAPLIN, D. D. Release of IL-1 from mononuclear phagocytes. **J Immunol**, v. 147, n. 7, p. 2181-6, Oct 1 1991. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1918954> >.

HOLMES, J. M. et al. Randomized clinical trial of surfactant prophylaxis in retinopathy of prematurity. **J Pediatr Ophthalmol Strabismus**, v. 31, n. 3, p. 189-91, May-Jun 1994. ISSN 0191-3913 (Print) 0191-3913 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931953> >.

HOSOYA, S. et al. Innate immune responses involving natural killer and natural killer T cells promote liver regeneration after partial hepatectomy in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 304, n. 3, p. G293-9, Feb 01 2013. ISSN 1522-1547 (Electronic)

0193-1857 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086918> >.

HUANG, Y. F. et al. Isg15 controls p53 stability and functions. **Cell Cycle**, v. 13, n. 14, p. 2200-10, 2014. ISSN 1551-4005 (Electronic) 1551-4005 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24844324> >.

HUSS, R. W. et al. Mite allergen control with acaricide fails. **J Allergy Clin Immunol**, v. 94, n. 1, p. 27-32, Jul 1994. ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8027495> >.

INDRACCOLO, S. et al. Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells. **J Immunol**, v. 178, n. 2, p. 1122-35, Jan 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202376> >.

ISAACS, A.; LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 147, n. 927, p. 258-67, Sep 12 1957. ISSN 0080-4649 (Print) 0080-4649 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13465720> >.

ISAACS, A.; LINDENMANN, J.; VALENTINE, R. C. Virus interference. II. Some properties of interferon. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 147, n. 927, p. 268-73, Sep 12 1957. ISSN 0080-4649 (Print) 0080-4649 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13465721> >.

ISHIKAWA, H.; BARBER, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 674-8, Oct 2 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18724357> >.

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 1, p. 36-49, Jan 2014. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24362405> >.

JEON, Y. J. et al. ISG15 modification of filamin B negatively regulates the type I interferon-induced JNK signalling pathway. **EMBO Rep**, v. 10, n. 4, p. 374-80, Apr 2009. ISSN 1469-3178 (Electronic) 1469-221X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270716> >.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **Int Immunol**, v. 21, n. 4, p. 317-37, Apr 2009. ISSN 1460-2377 (Electronic) 0953-8178 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246554> >.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Front Immunol**, v. 5, p. 461, 2014. ISSN 1664-3224 (Print) 1664-3224 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309543> >.

KIEMER, A. K. et al. Attenuated activation of macrophage TLR9 by DNA from virulent mycobacteria. **J Innate Immun**, v. 1, n. 1, p. 29-45, 2009. ISSN 1662-8128 (Electronic) 1662-811X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375564> >.

KIM, K. I.; ZHANG, D. E. ISG15, not just another ubiquitin-like protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 307, n. 3, p. 431-4, Aug 1 2003. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12893238> >.

KNIGHT, E., JR.; CORDOVA, B. IFN-induced 15-kDa protein is released from human lymphocytes and monocytes. **J Immunol**, v. 146, n. 7, p. 2280-4, Apr 1 1991. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2005397> >.

KNIGHT, E., JR.; KORANT, B. D. Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 4, p. 1824-7, Apr 1979. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/287023> >.

KORANT, B. D. et al. Interferon-induced proteins. Purification and characterization of a 15,000-dalton protein from human and bovine cells induced by interferon. **J Biol Chem**, v. 259, n. 23, p. 14835-9, Dec 10 1984. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6501319> >.

LACY, P.; STOW, J. L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 9-18, Jul 7 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic)
0006-4971 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562044> >.

LAU, R. C. et al. Lymphoid blast crisis of B-lineage phenotype with monosomy 7 in a patient with juvenile chronic myelogenous leukemia (JCML). **Leukemia**, v. 8, n. 5, p. 903-8, May 1994. ISSN 0887-6924 (Print)
0887-6924 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182949> >.

LENSCHOW, D. J. et al. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. **J Virol**, v. 79, n. 22, p. 13974-83, Nov 2005. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254333> >.

LOEB, K. R.; HAAS, A. L. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. **J Biol Chem**, v. 267, n. 11, p. 7806-13, Apr 15 1992. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373138> >.

LU, G. et al. ISG15 enhances the innate antiviral response by inhibition of IRF-3 degradation. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 52, n. 1, p. 29-41, 2006. ISSN 1165-158X (Electronic)
0145-5680 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16914094> >.

MALAKHOV, M. P. et al. High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. **J Biol Chem**, v. 278, n. 19, p. 16608-13, May 9 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582176> >.

MALAKHOV, M. P. et al. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. **J Biol Chem**, v. 277, n. 12, p. 9976-81, Mar 22 2002. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788588> >.

MALAKHOVA, O. A.; ZHANG, D. E. ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. **J Biol Chem**, v. 283, n. 14, p. 8783-7, Apr 4 2008. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287095> >.

MANSUR, D. S.; SMITH, G. L.; FERGUSON, B. J. Intracellular sensing of viral DNA by the innate immune system. **Microbes Infect**, v. 16, n. 12, p. 1002-12, Dec 2014. ISSN 1769-714X (Electronic) 1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316508> >.

MCNAB, F. et al. Type I interferons in infectious disease. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 2, p. 87-103, Feb 2015. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25614319> >.

MINAKAWA, M. et al. Regulation of the nuclear factor (NF)-kappaB pathway by ISGylation. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 12, p. 2223-7, Dec 2008. ISSN 0918-6158 (Print) 0918-6158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043203> >.

MIYAMOTO, N. G.; JACOBS, B. L.; SAMUEL, C. E. Mechanism of interferon action. Effect of double-stranded RNA and the 5'-O-monophosphate form of 2',5'-oligoadenylate on the inhibition of reovirus

mRNA translation in vitro. **J Biol Chem**, v. 258, n. 24, p. 15232-7, Dec 25 1983. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6197414> >.

MORALES, D. J.; LENSCHOW, D. J. The antiviral activities of ISG15. **J Mol Biol**, v. 425, n. 24, p. 4995-5008, Dec 13 2013. ISSN 1089-8638 (Electronic)
0022-2836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24095857> >.

MUNIR, M.; BERG, M. The multiple faces of protein kinase R in antiviral defense. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 85-9, Jan 1 2013. ISSN 2150-5608 (Electronic)
2150-5594 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23314571> >.

NAEGELEN, I. et al. Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. **J Immunol Res**, v. 2015, p. 817038, 2015. ISSN 2314-7156 (Electronic)
2314-7156 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26579547> >.

NARASIMHAN, J.; POTTER, J. L.; HAAS, A. L. Conjugation of the 15-kDa interferon-induced ubiquitin homolog is distinct from that of ubiquitin. **J Biol Chem**, v. 271, n. 1, p. 324-30, Jan 5 1996. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550581> >.

NOPPERS, S. J.; FITZGERALD, K. A.; HERTZOG, P. J. The role of type I interferons in TLR responses. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 6, p. 446-57, Aug-Sep 2007. ISSN 0818-9641 (Print)
0818-9641 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667935> >.

OKUMURA, A. et al. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1440-5, Jan 31 2006. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434471> >.

OKUMURA, A.; PITHA, P. M.; HARTY, R. N. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 10, p. 3974-9, Mar 11 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305167> >.

OWHASHI, M. et al. Identification of a ubiquitin family protein as a novel neutrophil chemotactic factor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 309, n. 3, p. 533-9, Sep 26 2003. ISSN 0006-291X (Print)
0006-291X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963022> >.

PEARLE, P.; SQUIRES, E. Bound state excitation, nucleon decay experiments and models of wave function collapse. **Phys Rev Lett**, v. 73, n. 1, p. 1-5, Jul 04 1994. ISSN 1079-7114 (Electronic)
0031-9007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10056705> >.

RECHT, M.; BORDEN, E. C.; KNIGHT, E., JR. A human 15-kDa IFN- γ induced protein induces the secretion of IFN- γ . **J Immunol**, v. 147, n. 8, p. 2617-23, Oct 15 1991. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717569> >.

SCHANZ, A. et al. Interferon stimulated gene 15 expression at the human embryo-maternal interface. **Arch Gynecol Obstet**, v. 290, n. 4, p. 783-9, Oct 2014. ISSN 1432-0711 (Electronic)
0932-0067 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24996384> >.

SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 513-45, 2014. ISSN 1545-3278 (Electronic)
0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24555472> >.

SCHOGGINS, J. W. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. **Curr Opin Virol**, v. 6, p. 40-6, Jun 2014. ISSN 1879-6265 (Electronic). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713352> >.

SCHOGGINS, J. W.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. **Curr Opin Virol**, v. 1, n. 6, p. 519-25, Dec 2011. ISSN 1879-6265 (Electronic). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22328912> >.

SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 2, p. 163-89, Feb 2004. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525967> >.

SHEEDY, F. J. et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. **Nat Immunol**, v. 14, n. 8, p. 812-20, Aug 2013. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812099> >.

SHI, H. X. et al. Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. **Mol Cell Biol**, v. 30, n. 10, p. 2424-36, May 2010. ISSN 1098-5549 (Electronic)
0270-7306 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20308324> >.

SIEGAL, F. P. et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. **Science**, v. 284, n. 5421, p. 1835-7, Jun 11 1999. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364556> >.

SKAUG, B.; CHEN, Z. J. Emerging role of ISG15 in antiviral immunity. **Cell**, v. 143, n. 2, p. 187-90, Oct 15 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20946978> >.

SMITH, S. L. et al. Patterns of postnatal weight changes in infants with very low and extremely low birth weights. **Heart Lung**, v. 23, n. 6, p. 439-45, Nov-Dec 1994. ISSN 0147-9563 (Print) 0147-9563 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7852058> >.

SQUIRE, J. et al. Localization of the interferon-induced, 2-5A-dependent RNase gene (RNS4) to human chromosome 1q25. **Genomics**, v. 19, n. 1, p. 174-5, Jan 01 1994. ISSN 0888-7543 (Print) 0888-7543 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514564> >.

SUN, L. et al. Exosomes contribute to the transmission of anti-HIV activity from TLR3-activated brain microvascular endothelial cells to macrophages. **Antiviral Res**, v. 134, p. 167-171, Aug 3 2016. ISSN 1872-9096 (Electronic) 0166-3542 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27496004> >.

SWIECKI, M. et al. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. **J Exp Med**, v. 208, n. 12, p. 2367-74, Nov 21 2011. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084408> >.

TAKAOKA, A. et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 501-5, Jul 26 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618271> >.

TAKEUCHI, T. et al. Link between the ubiquitin conjugation system and the ISG15 conjugation system: ISG15 conjugation to the UbcH6 ubiquitin E2 enzyme. **J Biochem**, v. 138, n. 6, p. 711-9, Dec 2005. ISSN 1756-2651 (Electronic) 0021-924X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16428300> >.

TANG, Y. et al. Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. **J Immunol**, v. 184, n. 10, p. 5777-90, May 15 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385878> >.

TRINCHIERI, G. et al. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. **Prog Growth Factor Res**, v. 4, n. 4, p. 355-68, 1992. ISSN 0955-2235 (Print)
0955-2235 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1364096> >.

UNTERHOLZNER, L. et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nat Immunol**, v. 11, n. 11, p. 997-1004, Nov 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890285> >.

WADDELL, S. J. et al. Dissecting interferon-induced transcriptional programs in human peripheral blood cells. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9753, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20339534> >.

WONG, J. J. et al. HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 28, p. 10735-40, Jul 11 2006. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815975> >.

YIN, Z. et al. Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. **J Immunol**, v. 189, n. 6, p. 2735-45, Sep 15 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22891284> >.

YONEYAMA, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nat Immunol**, v. 5, n. 7, p. 730-7, Jul 2004. ISSN 1529-2908 (Print)
1529-2908 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208624> >.

YUAN, W.; KRUG, R. M. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. **EMBO J**, v. 20, n. 3, p. 362-71, Feb 1 2001. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157743> >.

ZHANG, D.; ZHANG, D. E. Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. **J Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 1, p. 119-30, Jan 2011. ISSN 1557-7465 (Electronic)

1079-9907 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21190487> >.

ZHAO, C. et al. The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 20, p. 7578-82, May 18 2004. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131269> >.

ZHAO, C. et al. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 29, p. 10200-5, Jul 19 2005. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009940> >.

ZHAO, C. et al. ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 5, p. 2253-8, Feb 2 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133869> >.

ZILBERSTEIN, A. et al. Isolation of two interferon-induced translational inhibitors: a protein kinase and an oligo-isoadenylate synthetase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 10, p. 4734-8, Oct 1978. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/283387> >.

ZOU, W.; ZHANG, D. E. The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. **J Biol Chem**, v. 281, n. 7, p. 3989-94, Feb 17 2006. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16352599> >.