



# **Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto** **Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Arieli Fernanda Gavioli Gomes

## **Interação entre a Proteína Celular hSlu7 e a Proteína NS5 do Vírus da Febre Amarela**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

São José do Rio Preto  
2011

Arieli Fernanda Gavioli Gomes

# **Interação entre a Proteína Celular hSlu7 e a Proteína NS5 do Vírus da Febre Amarela**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira

São José do Rio Preto  
2011

Gavioli, Arieli Fernanda

Interação entre a Proteína Celular hSlu7 e a Proteína NS5 do Vírus da Febre Amarela/ Arieli Fernanda Gavioli  
São José do Rio Preto, 2011  
94 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira

1. hSlu7; 2. Vírus da Febre Amarela; 3. Interação Proteína-proteína;  
4. NS5; 5. Sistema Duplo-Híbrido.

**ARIELI FERNANDA GAVIOLI GOMES**

**Interação entre a Proteína Celular hSlu7 e a  
Proteína NS5 do Vírus da Febre Amarela**

**BANCA EXAMINADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE**

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira

2º Examinador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

3º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Vidotto

Suplentes: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Rahal

Prof<sup>a</sup>. Dorotéia Rossi Silva Souza

São José do Rio Preto, 15/12/11.

## DEDICATÓRIA

---

**Ao meu amado Rodrigo Caltiano; Minha mãe Aparecida e Adair Gomes *in*  
*memoriam* e a todos os Familiares pelos esforços  
para que eu chegasse até aqui.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por tudo que me deu e proporcionou-me a viver todos os momentos maravilhosos que tenho. Por cada obstáculo e discernimento e por superá-lo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira pela confiança, apoio e incentivo durante o desenvolvimento do projeto de mestrado.

Ao meu grande amor Rodrigo, pela paciência, compreensão, doação e amor incondicional nestes dois anos, pois seu apoio foi fundamental para a conclusão deste projeto de vida.

A todos os familiares, que rezaram por mim para superar as dificuldades, o apoio psicológico, o ombro amigo, as palavras de conforto e de incentivo quando eu mais precisei.

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro e pelo investimento em meu intelecto, obrigada.

À Direção e Vice Direção da FAMERP, em especial ao programa de pós-graduação e seus coordenadores, pela oportunidade proporcionada e pelo apoio financeiro, auxílio CAPES, para o meu aprimoramento em congressos.

A todos os funcionários, sem nenhuma extinção, aos professores, chefes de departamentos, aos outros laboratórios por permitir o desenvolvimento do projeto.

Aos colegas do LPV (Laboratório de Pesquisa em Virologia) pela ajuda e contribuição ao desenvolvimento da pesquisa.

“Corram atrás dos sonhos, porque um dia o sonho estará correndo atrás de você”.

Maestro João Carlos Martins



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Genômica dos <i>Flavivirus</i> .....	03
Figura 2: Replicação Viral: Ciclo de Replicação Flaviviral .....	08
Figura 3: Seleção do AG correto para fixação do complexo de spliceossomo..	14
Figura 4: Princípio básico do sistema duplo-híbrido em levedura .....	17
Figura 5: Tecnologia do DNA recombinante .....	21
Figura 6: Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pGBKT7.	27
Figura 7: Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pACT2 ...	28
Figura 8: Genes repórteres da linhagem da AH109 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
Figura 9: Esquema das construções deletérias de RdRp de YFV .....	34
Figura 10: Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pET21a	40
Figura 11: Mapa de restrição e sítios de clonagem do vetor pEGFP-C3 .....	47
Figura 12: Placa de 24 <i>wells</i> contendo monocamada celular de Vero E6 para imunofluorescência indireta .....	49
Figura 13: Controles de transformação e de interação no sistema duplo-híbrido em leveduras .....	52
Figura 14: Fragmentos deletantes de RdRp e sua interação com hSlu7 .....	53
Figura 15: Mapeamento das regiões de interação da hSlu7 com os fragmentos .....	54
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% .....	55
Figura 17: Clonagem da hSlu7 em cepas variadas de <i>E. coli</i> BL21 .....	56
Figura 18: SDS-PAGE da expressão e solubilização de hSlu7 .....	57
Figura 19: Teste de tampões de lise .....	58
Figura 20: SDS-PAGE da solubilização e purificação de hSlu7 .....	59
Figura 21: Localização e Sublocalização celular de hSlu7 .....	60

Figura 22: Marcação Celular por Imunofluorescência .....	61
Figura 23: Porcentagem da sublocalização celular de hSlu7 pós infecção com YFV .....	63

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Transformações dos Plasmídeos Controle em Levedura .....	31
Quadro 2. Transformações sequenciais em <i>S. cerevisiae</i> AH109 entre pACT2-hSlu7 e pGBKT7-RdRp, incluindo os plasmídeos controles .....	33
Quadro 3 : Soluções para Extração de DNA plasmidial – <i>Maxipreparation</i> .....	36
Quadro 4: Condições Experimentais para a Expressão e Solubilização da hSlu7 .....	42
Quadro 5: Tampões de Lise e Solubilização na Expressão de hSlu7 .....	43

## LISTA DE ABREVIACOES

AD	Activating Domain
Ade	Adenina
BVD	Bovine Viral Diarrhoea
BT	Broth Terrific
C	Proteína do Capsídeo Viral
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
cDNA	DNA complementar
DENV	Dengue Virus
DNA-BD	DNA-binding domain
DNTp	Deoxirribonucleotídeo Trifosfato
DO <sub>600</sub>	Densidade Óptica 600nm
DV	Dengue Virus
E	Proteína do Envelope Viral
EDTA	Ácido Tetracético Diamino-etilênico
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)
eIF3L	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3
ER	Endoplasmic Reticulum
GFP	Green Fluorescent Protein
HA	Hemaglutinina
HCV	Hepatitis C Virus
HCl	Cloreto de Hidrogênio (Ácido Clorídrico)
His	Histidina

hnRNPL	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteína L
hSlu7	Pre-mRNA splicing factor Slu7; Slu7 Splicing factor homolog; Synergistic Lethal with U5 snRNA human
hVAP-A	Human Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein A
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
JEV	Japanese Encephalopathy Virus
kDa	Kilodalton
$K_2HPO_4$	Fosfato de Potássio Monobásico
Lam	Laminina
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucina
MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
$Na_2HPO_4$	Fosfato de Sódio Dibásico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCR	Noncoding Region
NLS	Nuclear Localization Signals
NRBP	Nuclear Receptor Binding Protein
ORF	Open Reading Frame
pb	Pares de Bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	<b>Polymerase</b> Chain Reaction

PEG	Polyethylene Glycol
PFU	Plaque-Forming Unit
Proteína NS	Proteína não estrutural
prM	Pré-proteína de Membrana Viral
PTB	Polypyrimidine tract-binding
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
RNA	Ribonucleic Acid
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
SLEV	Saint Louis Encephalitis <b>Virus</b>
snRNP	Small Nuclear Ribonucleoproteins
SD medium	Meio Sintético Definido
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TE buffer	Tampão Tris-EDTA
UV-C	Ultraviolet Ray - Type C
UAS	Upstream Activation Sequence
WNV	West Nile Virus
YTB	Yeast Terrific Broth
YFV	Yellow Fever Virus

## RESUMO

**Introdução:** A Febre Amarela é uma doença decorrente da infecção pelo Vírus da Febre Amarela (YFV) que é um protótipo do gênero *Flavivirus* que provoca uma severa hepatite, falência renal, hemorragia, e eventos que rapidamente levam ao choque e morte do indivíduo. Os mecanismos de replicação genômico do YFV não são bem conhecidos. A proteína não estrutural 5 (NS5) é a maior proteína e a mais conservada dos *Flavivirus*, ela codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A hSlu7 é uma proteína celular, predominantemente nuclear, e foi isolada interagindo com a U5 no segundo passo do splicing alternativo. A hSlu7 auxilia na correta seleção dos AGs alternativos do exon 3' para a realização da reação de splicing. **Objetivo:** Caracterizar a interação de hSlu7 com a proteína NS5 de YFV, quanto a sua localização celular durante a infecção. **Material e Método:** Pelo sistema duplo-híbrido em leveduras utilizando *plasmid-linkage* avaliamos a interação de hSlu7 com deleções mutantes da RdRp de YFV, e a localização celular de GFP-hSlu7 durante a replicação da cepa vacinal 17D de YFV em cultura de células Vero E6, marcadas com anticorpos NS4AB e NS5 para detecção da infecção. **Resultados:** A hSlu7 interage com as porções inicial e final da RdRp, e a sublocalização citoplasmática de hSlu7, ocorre nas células infectadas com YFV. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que a hSlu7 possui uma sublocalização celular durante a replicação do YFV, além de interagir com a RdRp viral. Ainda será necessária a confirmação da função celular de hSlu7 utilizando RNA de interferência para avaliar quais as alterações que a célula não infectada e infectada sofrerá diante dos níveis baixos de hSlu7.

**Palavras-chave:** 1. hSlu7; 2. Interação proteína-proteína; 3. Sublocalização citoplasmática; 4. NS5; 5. Sistema duplo-híbrido.



## **ABSTRACT**

**Introduction:** The Yellow Fever is characterized by severe hepatitis, renal failure, hemorrhage, and rapid terminal events that lead to shock and death. This disease is caused by the infection with the Yellow Fever Virus (YFV), considered the prototype of the *Flavivirus* genus. Its mechanism of replication is not well known but includes interactions of viral RNA with cellular and viral proteins. The nonstructural protein 5 (NS5) is the largest and most conserved protein of the *Flavivirus* genus; it encodes RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domains, besides possessing many important functions during viral replication, such as genic regulation of host cells. The protein hSlu7 is a homologous human protein, which was isolated interacting with the U5 that is involved in the second the step of alternative splicing. The hSlu7 is a predominantly nuclear protein and participates at the alternative splicing, influencing the correct choice of the alternative AGs of exon 3' so that the spliceosome is able to bind and start alternative splicing.

**Objective:** To characterize the interaction of the hSlu7 protein with the YFV-NS5 protein and its cellular localization during viral infection. **Material and Method:** We confirmed the interaction of various NS5 with human proteins by two-hybrid assays. Deletion mutants were constructed and co-transformed with hSlu7 in yeast to determine the minimal domain of NS5 required for interaction. The cellular localization of the hSlu7 fused with GFP during the response of vaccine strain 17D of YFV in cells Vero E6, marked with anti-NS4AB and anti-NS5 for detection of the infection was also tested. **Results:** hSlu7 interacts with initial and final portions of the RdRp and the cytoplasmic sublocalization of hSlu7 occurs in the cells infected with YFV. **Conclusions:** Our results suggest that hSlu7 interacts with the YFV by

two-hybrid system and the cellular sublocalization occurs due to the presence of viral infection. Further studies using RNA interference should be addressed to confirm the cellular function of hSlu7 , and to evaluate which alterations that infected and uninfected cells will suffer with low levels of hSlu7.

**Key-words:** 1. hSlu7; 2. Protein-protein interaction; 3. Cytoplasmic Sublocalization; 4. NS5; 5. Two-hybrid assays.

# SUMÁRIO

Dedicatória .....	i
Agradecimentos .....	ii
Epígrafe .....	iv
Lista de Figuras .....	v
Lista de Quadros .....	vii
Lista de Abreviações .....	viii
Resumo .....	xi
Abstract .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	02
1.1. Aspectos Gerais do Genoma e Replicação dos <i>Flavivirus</i> .....	02
1.2. Interação Proteína-Proteína .....	08
1.3. Proteína hSlu7 .....	13
1.4. Sistema Duplo-Híbrido em Leveduras .....	15
1.5. Expressão de Proteínas Recombinantes .....	19
1.6. Relevância e Justificativa .....	22
1.7. Objetivos .....	23
1.7.1. Objetivo Geral .....	23
1.7.2. Objetivos Específicos .....	23
2. MATERIAIS E MÉTODO .....	26
<b>2.1. Sistema Duplo-Híbrido</b> .....	<b>26</b>
.....	
2.1.1. Plasmídeos .....	26
2.1.1.1. Vetor pGBKT7 .....	26
2.1.1.2. Vetor pACT2 .....	27
2.1.1.3. Sequenciamento Nucleotídico .....	29

2.1.2. Levedura .....	29
2.1.2.1. Meios de Cultura para Crescimento e Manutenção de Leveduras	30
2.1.2.2. Transformação em Levedura .....	32
2.1.2.3. Transformação dos Plasmídeos Controle .....	32
2.1.2.4. <i>Plasmid-Linkage</i> .....	34
2.2. Expressão e Purificação da Proteína hSlu7 .....	36
2.2.1. Clonagem .....	36
2.2.1.1. Confirmação do cDNA de hSlu7 .....	36
2.2.1.2. Síntese da Molécula Recombinante .....	39
2.2.1.2.1. Digestão do Inseto hSlu7 e Vetor de Expressão em Procarioto	39
2.2.1.2.2. Ligação do Inseto no Vetor .....	40
2.2.1.2.3. Geração de Bactérias Eletrocompetentes .....	41
2.2.1.2.4. Confirmação dos Clones Positivos .....	42
2.2.2. Expressão da Proteína hSlu7 em Procarioto .....	43
2.2.3. Purificação da Proteína hSlu7 .....	45
2.3. Localização Celular de hSlu7 .....	46
2.3.1. Super-Expressão de hSlu7 .....	46
2.3.2. Células e Vírus .....	47
2.3.3. Imunofluorescência Indireta .....	48
3. RESULTADOS .....	52
3.1. <i>Plasmid-Linkage</i> .....	52
3.2. Expressão e Purificação da hSlu7 .....	54
3.3. Imunofluorescência Indireta .....	59
4. DISCUSSÃO .....	65
5. CONCLUSÃO .....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
7. ANEXO I .....	93

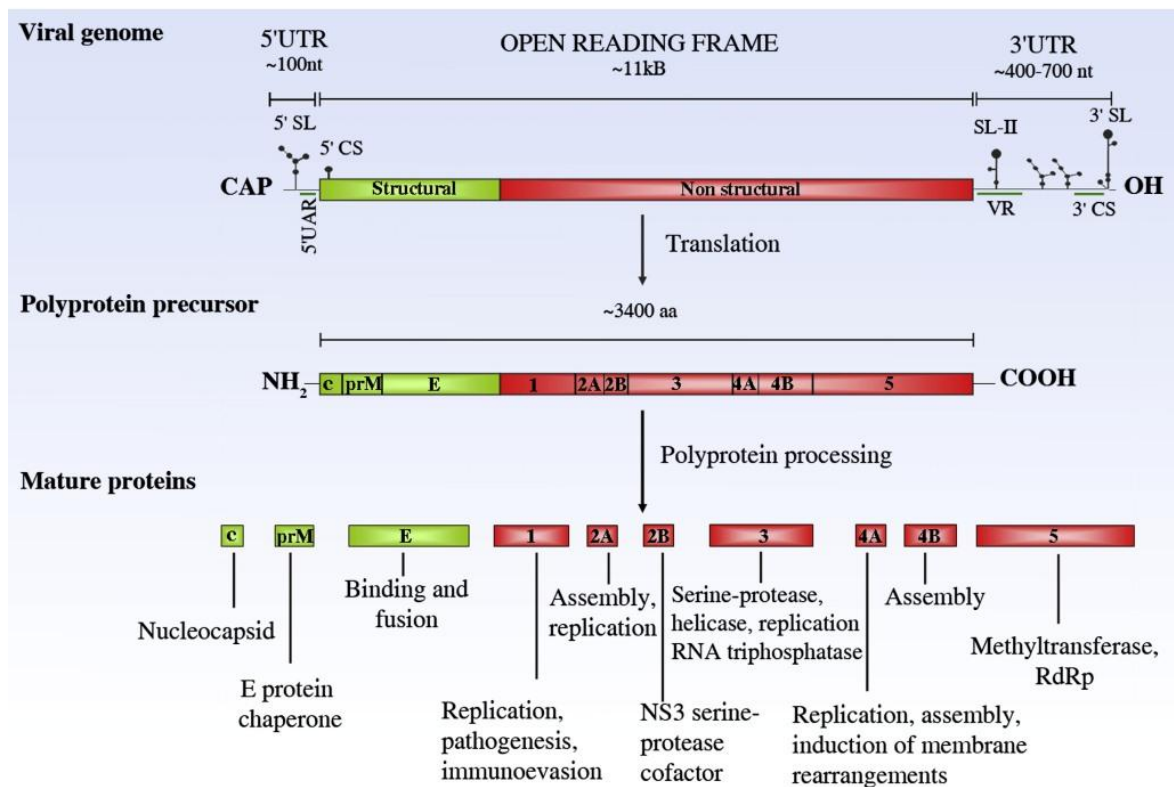
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos Gerais do Genoma e Replicação dos *Flavivirus*

Os *Flavivirus* compreende um grupo com mais de 70 vírus de RNA envelopado, que provocam sérias doenças em humanos e animais. Muitas destas arboviroses (termo derivado de *arthropod-borne vírus*) são transmitidas por, mosquitos ou carrapatos, para hospedeiros vertebrados <sup>(1)</sup>. O gênero *Flavivirus* possui vários membros, como o *Yellow Fever Virus* (YFV), *Dengue Virus* (DV), *West Nile Virus* (WNV), e o *Japanese Encephalitis Virus* (JEV), que são vírus altamente patogênicos para humanos e animais, que compõem grandes problemas de saúde pública internacional <sup>(2,3)</sup>. Estes vírus podem ser agrupados em viroses que possuem a capacidade de provocar extravasamento vascular e hemorragias, quando infecção por exemplo, de DV e YFV; e as que provocam encefalites (WNV e JEV) <sup>(4)</sup>.

Os *Flavivirus* possuem envelope lipídico, seu genoma é constituído por uma fita simples de RNA polaridade positiva (**Figura 1**). A endocitose dos *Flavivirus* é mediada por receptores celulares. Os *Flavivirus* transitam em direção aos endossomos, onde ocorre a mudança de pH do endossomo, tornando o ambiente ácido, o que proporciona a mudança conformacional das glicoproteínas do envelope (proteína E), que induz a fusão da membrana viral com a do hospedeiro (**Figura 2**) <sup>(5,6)</sup>. O RNA viral é liberado do endossomo e é codificado em uma poliproteína precursora que mede aproximadamente 3400 amino ácidos. Esta poliproteína é processada co- e pós-traduzida pela protease celular sinal-

específica do hospedeiro codificando as proteases virais NS2B/NS3 que dão origem a três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS) <sup>(4)</sup> **(Figura1)**.



**Figura 1:** Estrutura Genômica dos *Flavivirus*: RNA genômico evidenciando as proteínas estruturais e não estruturais presentes na ORF (Open Reading Frame). (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009).

A proteína estrutural central (C), pré-membrana (prM), e a E constituem a partícula viral. As proteínas não estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) estão envolvidas com a adsorção, replicação viral e na modulação das respostas celulares do hospedeiro <sup>(7)</sup>.

A proteína NS1 possui aproximadamente 46 kDa, existe sob três formas: associada à célula, na superfície da célula e no meio extracelular. Alguns estudos revelam que a NS1 de Dengue vírus é uma glicoproteína altamente conservada, produzida quando associada a membrana e a forma secretada está abundantemente presente no soro de pacientes na fase inicial da infecção <sup>(8-12)</sup>, colaborando assim para o diagnóstico na fase inicial da dengue <sup>(11,13-18)</sup>.

Inicialmente foi caracterizada como um antígeno solúvel presente no soro e em tecidos de animais infectados *in vitro*. Hoje a forma extracelular de NS1 está fortemente relacionada com a indução de uma resposta imune humoral <sup>(19-24)</sup> Por outro lado, são várias as evidências sobre a participação de NS1 na replicação do RNA viral, pois estudos demonstram a colocalização de NS1 e marcadores de replicação do RNA, associados às estruturas de membrana que são supostos sítios de replicação <sup>(25,26)</sup>. Além disso, a produção de um YFV contendo mutações em NS1 mostrou uma relevante queda no acúmulo de RNA <sup>(27)</sup>. Outras análises genéticas evidenciaram que a interação entre NS1 e NS4A é crítica no processo citoplasmático de replicação do RNA <sup>(28)</sup>.

NS2A é uma pequena proteína hidrofóbica de aproximadamente 22 kDa, provavelmente associada à membrana <sup>(29)</sup>, envolvida no processamento da proteína NS1. A demonstração da localização de NS2A do *Flavivirus Kunjin* em possíveis sítios de replicação de RNA, somada à realização de estudos de interação proteína-proteína, sugerem sua ligação às proteínas NS3, NS5 e à 3'NCR (*noncoding region*) <sup>(30)</sup>. É provável que a função da proteína NS2A esteja relacionada ao recrutamento de moldes de RNA para a região de replicase associada à membrana. No entanto a NS2B, é uma pequena proteína de 14 kDa associada à membrana, é caracterizada por formar um complexo com NS3, sendo um cofator indispensável para a função de serino-protease de NS3 <sup>(31-34)</sup>.

A proteína NS3 é altamente conservada entre os *Flavivirus*. Possui aproximadamente 70 kDa e está associada à membrana devido à interação com a NS2B. A NS3 contém várias atividades enzimáticas <sup>(35)</sup>, mutações em NS3 que



eliminam sua atividade de protease impedem a recuperação de vírus viáveis, concretizando o papel essencial desta enzima para o ciclo viral <sup>(36)</sup>.

Uma outra função de NS3 é a de RNA helicase <sup>(35)</sup>, apesar do correto papel de uma RNA helicase ainda não estar bem estabelecido para os *Flavivirus*. No entanto, ela pode estar envolvida na dissociação das fitas de RNA recém-formadas a partir da fita molde, durante a replicação do RNA, ou talvez desenrolar estruturas secundárias envolvidas na iniciação da síntese de RNA <sup>(37)</sup>. Além disso, NS3 foi mostrada ligada à região 3'NCR, em associação com a proteína NS5 <sup>(38,39)</sup>. Por fim, NS3 apresenta atividade de RNA trifosfatase <sup>(35)</sup>, que está envolvida provavelmente na modificação da extremidade 5' do genoma durante sua preparação para a adição do *cap* 5'.

Existem poucas informações a respeito de NS4A e NS4B, são proteínas pequenas hidrofóbicas associadas à membrana, com aproximadamente 16 kDa e 27 kDa, respectivamente <sup>(40)</sup> e pouco conservadas entre os *Flavivirus*. Com base na distribuição subcelular e interação com NS1, acredita-se que NS4A dos DV atue na replicação do RNA <sup>(40,41)</sup>. Sabe-se que NS4B do vírus *Kunjin* também se localiza no núcleo <sup>(26)</sup> e que NS4B de HCV é capaz de transformar células em cultura de tecido <sup>(42)</sup>. Em YFV, mutações na proteína NS4B estariam associadas a uma menor virulência da cepa Asibi <sup>(43)</sup>.

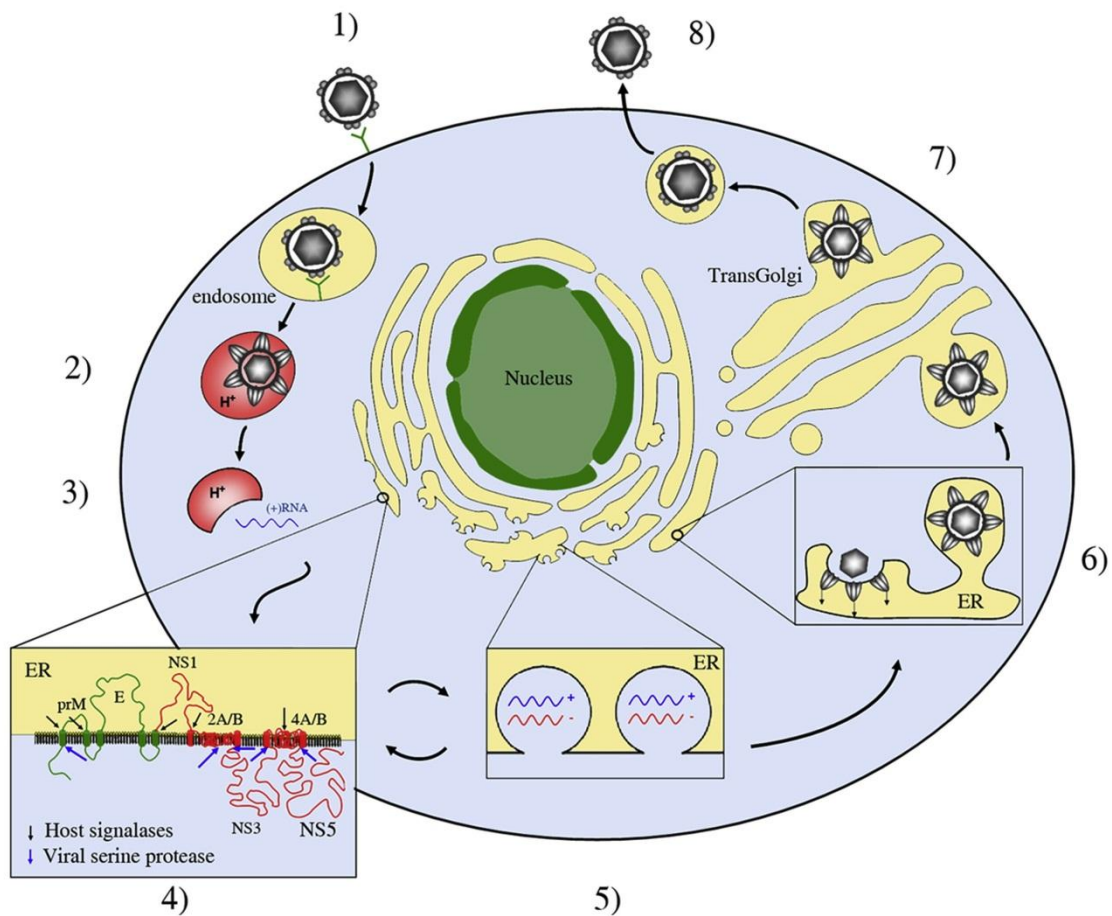
A proteína NS5 é a maior e a mais conservada entre os *Flavivirus* <sup>(44)</sup>, apresentando um peso molecular de 104 kDa <sup>(29)</sup>. Duas atividades essenciais para a replicação viral estão relacionadas a essa proteína: uma de RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* – RdRp), na região carboxi-terminal e outra de metiltransferase, em sua porção amino-terminal, que

está envolvida na formação do *cap* RNA, provavelmente na metilação da estrutura *cap* RNA 5' <sup>(29,45-48)</sup>.

A NS5 celular, além de possuir ação citoplasmática durante a replicação de RNA, também foi identificada no núcleo de células infectadas com YFV e DV <sup>(49,50)</sup>. Essa participação nuclear nas etapas de replicação viral foi confirmada pela detecção da interação entre a proteína NS5 do DV-2 com uma proteína celular envolvida no transporte nuclear, a *importin-β* <sup>(51)</sup>. Além disso, 20% da atividade total da RdRp nas células infectadas com WNV, JEV e DV é nuclear, assim como a maioria das replicases NS3 e NS5 de JEV <sup>(52)</sup>. A presença de ambas as replicases na matriz nuclear revelou uma localização bem definida para o complexo de replicação viral. Contudo, torna-se necessário considerar o papel que a proteína NS5 pode desempenhar no núcleo da célula, como a interação com proteínas do hospedeiro e também a modificação de funções celulares.

Após a tradução do RNA genômico, a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) da NS5 realiza cópias complementares de RNA utilizando como molde o RNA genômico para a síntese da nova fita do RNA viral <sup>(4,53)</sup> **(Figura 2)**, assim a membrana do retículo endoplasmático (ER) serve de suporte para o início do complexo da replicação viral <sup>(3,4,54)</sup>. Os vírions são formados por um complexo que consiste em RNA viral e proteína C, que são empacotados dentro do retículo endoplasmático. Além dessas estruturas já mencionadas, os vírions tem na sua constituição parte da bicamada lipídica do retículo endoplasmático e heterodímeros das proteínas prM e E <sup>(4,55,56)</sup>. A proteína prM serve como envoltório e previne a fusão prematura do vírus durante o seu transporte para o exterior da célula <sup>(57,58)</sup>. Depois do transporte celular que ocorre por meio de sinalizações do

hospedeiro, a maturação do vírion ocorre no trans-Golgi, local da clivagem de prM em M, mediada por furinas. <sup>(57-59)</sup>. E finalmente as partículas infecciosas maduras são liberadas por exocitose para o meio extracelular **(Figura 2)**.



**Figura 2:** Replicação Viral: Ciclo de Replicação Flaviviral: (1) Interiorização dos *Flavivirus* para o endossomo. (2 e 3) Diminuição do pH dentro do endossomo, proporciona a fusão do vírus com a membrana do hospedeiro para a liberação do RNA viral. (4 e 5) Poliproteína viral ancorada no retículo endoplasmático para síntese de proteínas virais pelo hospedeiro. (6) Empacotamento dos vírions na superfície do retículo endoplasmático. (7) Os vírions são encaminhados para o trans-Golgi, onde são envolvidos pela membrana M, tornando-se partículas infectantes e (8) são liberadas para o meio extracelular. (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009).

## 1.2. Interação Proteína-Proteína

Estudos recentes mostram que as proteínas NS5 de *Flavivirus* interage com muitas proteínas do hospedeiro para a replicação viral ser bem sucedida. Como por exemplo, a interação entre a NS5 e as proteínas ciclofilinas e a La, que promovem a transcrição e tradução da NS5 <sup>(60-62)</sup>.

Sendo assim, para a ocorrência do ciclo de infecção viral há necessidade da utilização da maquinaria das células hospedeiras, por isso, vários produtos gênicos e vias de sinalização do hospedeiro são requeridos para a replicação dos *Flavivirus*, mas a relevância biológica de muitas dessas interações ainda não são muito claras <sup>(4)</sup>, necessitando da investigação das interações proteicas entre as proteínas virais e as proteínas celulares.

Interações proteína-proteína são intrínsecas a diversos processos biológicos essenciais, apresentando fundamental importância para ativação, regulação e controle de várias funções enzimáticas a elas relacionadas <sup>(64,65)</sup>, sendo assim, necessárias para muitas funções virais. O conhecimento do significado dessas interações para a função celular, ou seja, sua identificação, a amplitude que tomam e a determinação de suas consequências, são questões essenciais para a resolução, dentre outras relevâncias, das bases das interações patógeno-hospedeiro e conseqüentemente para o desenho racional de drogas que possam atuar promovendo a ruptura dessas interações <sup>(65)</sup>.

Muitas doenças humanas podem estar ligadas à associação anormal entre proteínas, incluindo algumas formas de leucemia e doença neurodegenerativa <sup>(66)</sup>. Interações proteína-proteína proveem alvos terapêuticos no tratamento do câncer e de doenças infecciosas <sup>(67)</sup> e o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras dessas interações é um campo crescente de pesquisas.

A informação genética limitada dos vírus é dependente da maquinaria celular, para a síntese de muitas macromoléculas. Processos como a montagem do complexo de replicação do RNA viral e sua transcrição caracterizam-se pelo envolvimento não apenas dos fatores virais, mas também de proteínas celulares,

sendo a maioria delas componentes que atuam no processamento de RNA ou na tradução de células hospedeiras, e que passam a exercer papel integral ou regulatório na replicação e transcrição do vírus <sup>(4,68)</sup>. Uma importante evidência da participação de fatores celulares na síntese do RNA viral, foi primeiramente descrita nos trabalhos de Janda & Ahlquist (1993) <sup>(68)</sup>, por meio da utilização do sistema heterólogo que estudou a replicação do *Brome Mosaic Virus* (BMV) em leveduras.

Trabalhos anteriores demonstraram que a RdRp, purificada de células infectadas por diferentes vírus de RNA de polaridade positiva, estava associada a proteínas celulares. A remoção destes fatores celulares resultou na perda da atividade da RdRp viral ou de sua especificidade para o alvo, considerando como específica a replicação do RNA viral e não dos RNAs celulares. Isto sugere que fatores celulares são necessários para a síntese específica de RNA, sendo pré-requisitos fundamentais para o sucesso de uma replicação viral <sup>(69)</sup>.

A NS5 de outros membros da família Flaviviridae ter sido identificada como alvo de interações proteína-proteína com proteínas celulares. Através de *screening* em sistema duplo-híbrido em levedura, contra biblioteca de cDNA de células renais de bovino susceptíveis à infecção por BVD <sup>(70)</sup>.

Os experimentos de Houshmand & Bergqvist (2003) <sup>(71)</sup> indicam uma habilidade da proteína La de interagir com as extremidades 5' e 3' do RNA do vírus Dengue tipo 4, bem como com NS3 e NS5, sugerindo uma função desta proteína na replicação dos vírus Dengue, bem como na de outros membros da família Flaviviridae. Desta forma, é possível que o complexo de replicação dos *Flavivirus* requeira a interação com a proteína La para a ocorrência da replicação

<sup>(71)</sup>. A proteína La pode desempenhar diferentes funções, como modular ou favorecer a interação das duas extremidades do genoma viral, conferindo uma conformação específica do genoma viral para tradução ou replicação. Além disso, esta proteína, pode estar envolvida na mudança dos processos de tradução para os de replicação. É possível que a replicase viral possa interagir com o genoma viral somente após a interação do RNA com a proteína La e outras proteínas celulares, e que NS3 e NS5 possam usar esta interação para se ligar ao complexo de replicação viral no início de sua formação. Finalmente, a interação entre ambas as extremidades do genoma viral com a proteína La pode ser um pré-requisito para a ligação de outros fatores ainda não identificados, que podem participar da replicação dos vírus Dengue <sup>(60)</sup>.

Outras proteínas celulares têm sido envolvidas no complexo de replicação dos *Flavivirus*, dentre elas a proteína ligadora de trato de polipirimidina (PTB) e a ribonucleoproteína L (hnRNPL), estas proteínas ligam-se à região IRES do HCV e estão envolvidas na tradução viral <sup>(72,73)</sup>. A proteína calreticulina interage com a região 3' NCR do vírus Dengue tipo 4 <sup>(74)</sup>. A proteína NS3 do vírus Dengue interage com a proteína ligante de receptor nuclear (NRBP-*nuclear receptor binding protein*), uma proteína que atua no tráfego do retículo endoplasmático/complexo de Golgi. Esta interação pode afetar a distribuição intracelular da NRBP e pode ser importante na geração de estruturas membranosas induzidas pelo vírus e pela maturação viral <sup>(75)</sup>.

Em nosso laboratório duas interações entre NS5 e proteínas celulares já foram descritas: U1A e eIF3L. A proteína U1A é uma ribonucleoproteína predominantemente nuclear que está associada ao complexo de *splicing*, além de

possuir um NLS (*Nuclear Localization Signals*), um domínio central que favorece a U1A transitar para o citoplasma e voltar para o núcleo. Essa interação provavelmente ocorre devido a função moduladora de U1A no transporte da NS5 citoplasmática para o núcleo da célula hospedeira. A interação entre NS5 de YFV e a proteína celular U1A, foi identificada por Bronzoni e colaboradores (2010) <sup>(76)</sup> por meio de imunoprecipitação e confirmação por *western blot*, de células de mamíferos transfectadas com NS5 e U1A e células transfectadas com U1A e infectadas com YFV, sugerindo uma função fisiológica para a formação do complexo NS5-U1A.

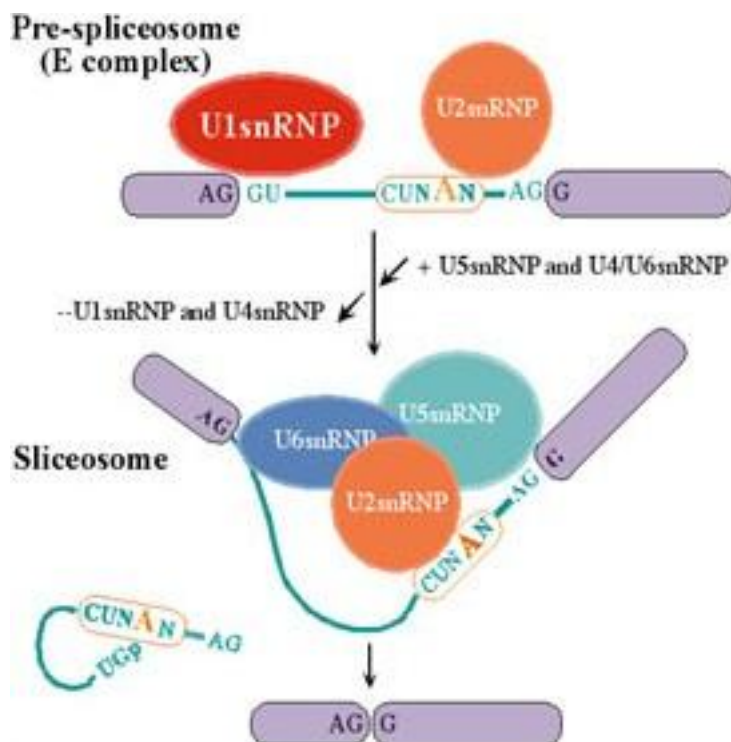
Morais e colaboradores (2011) <sup>(77)</sup> identificaram e caracterizaram a interação entre a proteína humana eIF3L (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L*) e NS5 de YFV. Essa interação ocorre em uma região conservada de 79 aminoácidos do domínio RdRp de NS5, denominada *Interaction Domain*. Usando o sistema de duplo híbrido em levedura, demonstraram que a interação não ocorre apenas em YFV, mas também em outros *Flavivirus* como YFV, DV2, DV3 e SLEV, sendo portanto relevante para o gênero. Para avaliar a importância dessa interação na replicação viral, foi realizada a superexpressão de eIF3L em células BHK *LucNeo* contendo um *replicon* YFV17D. Utilizando ensaios de atividade de luciferase, os autores mostraram que os níveis de *replicons* YFV nos sobrenadantes de células com eIF3L superexpressa foram significativamente reduzidos quando comparados aos controles (Teste *t-student*,  $p < 0,05$ ), sugerindo que eIF3L possui uma importante função na replicação de YFV.



### 1.3. Proteína hSlu7

A hSlu7 (*Synergistic Lethal with U5 snRNA human, pre-mRNA-splicing factor SLU7; step II splicing factor SLU7*) foi isolada interagindo com a U5 e é requerida no segundo passo do *splicing*. A Slu7 de leveduras liga-se antes do segundo passo catalítico do spliceossomo de snRNP de U5 <sup>(78)</sup>.

A proteína de *splicing* Slu7 <sup>(79)</sup> e a sua proteína homóloga humana hSlu7 <sup>(78)</sup>, apresentou uma importante função na seleção do 3'ss (*single strand*) no segundo passo do *splicing*. Extrato nuclear de células humanas deprimidas de hSlu7 tiveram redução da afinidade do exon 5' pelo spliceossomo, condição essa que implica na seleção de diferentes AGs do 3'ss. Este fato sugere que a função da hSlu7 é se fixar ao exon 5', quando este estiver no complexo spliceossomo para o acesso correto ao 3'ss possa ocorrer <sup>(80)</sup> (**Figura 3**). Tanto a Slu7 e a hSlu7 participam na seleção do 3'ss, quando a distância entre a sequência do 3'ss for maior que 7 ou 23 nucleotídeos, respectivamente <sup>(80, 81)</sup>.



**Figura 3:** Seleção do AG correto para a fixação do complexo de spliceossomo. (*genome.crg.es*)

Shomron e colaboradores (2004) <sup>(82)</sup>, identificaram por ferramentas de bioinformática e por análises mutacionais, três domínios funcionais da proteína hSlu7 com funções distintas quanto a localização subcelular, conhecida como, um Sinal de Localização Nuclear (NLS), uma região de afinidade ao zinco e outra rica em leucina. A região de afinidade ao zinco sofre uma sobreposição no NLS para formar uma estrutura que não requer a entrada da hSlu7 para o núcleo, no entanto, uma pequena quantidade de hSlu7 é mantida no núcleo para prevenir a sua translocação para o citoplasma via rota de Manutenção da Região Cromossomal 1 (*Chromosome Region Maintenance* - CRM1) <sup>(83)</sup>. A translocação sincronizada das proteínas entre o núcleo e o citoplasma de células eucarióticas é um poderoso mecanismo regulatório da expressão gênica, dos processos celulares <sup>(85)</sup>, e da regulação do *splicing* alternativo <sup>(85,86)</sup>.

A identificação dos sinais que promovem a transição nuclear-citoplasmática é importante para a compreensão das funções destas proteínas e a regulação de seus substratos <sup>(83)</sup>. A região de afinidade pelo zinco da hSlu7 determina a sua localização celular, por ser uma proteína sensível ao balanço núcleo-citoplasmático <sup>(82)</sup>. Há algumas condições fisiológicas que podem alterar as concentrações de hSlu7 nuclear endógena para acúmulos citoplasmáticos. No entanto, o efeito do estresse à célula, como raio-ultravioleta C (UV-C) e calor, podem mudar a localização celular e a concentração de hSlu7, que é extremamente importante para determinar a seleção correta do 3' ss no *splicing* alternativo na reação de *splicing* <sup>(83)</sup>.

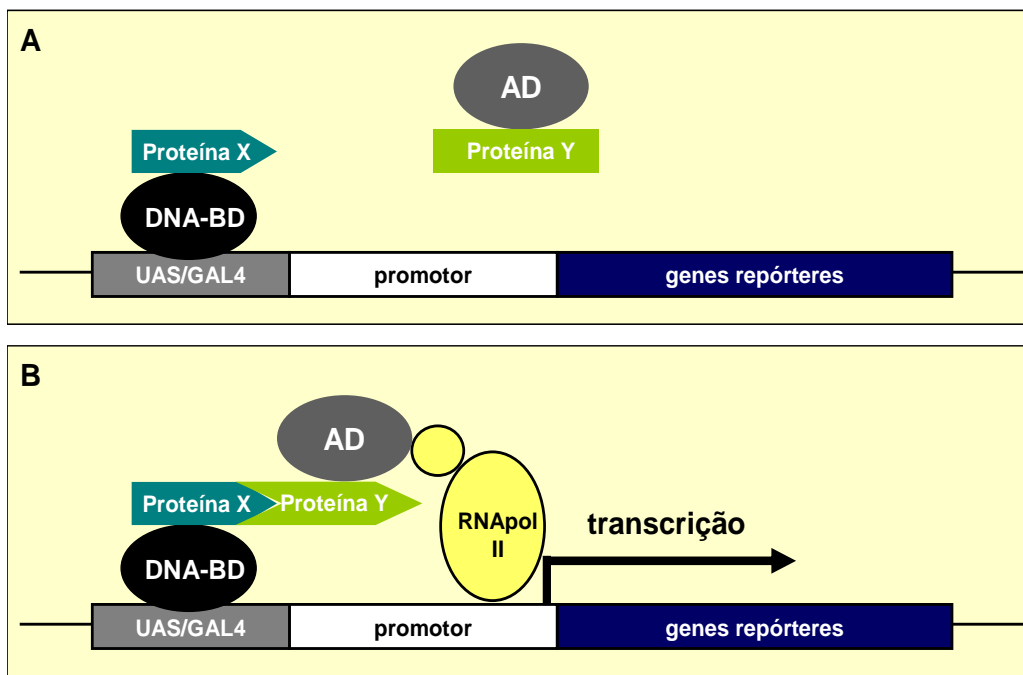
#### 1.4. Sistema Duplo-Híbrido em Leveduras

O ensaio de duplo-híbrido em levedura foi inicialmente introduzido por Fields e Song (1989) <sup>(87)</sup>, quando mostraram que plasmídeos expressando proteínas de fusão GAL4<sub>BD</sub>-SNF1 e GAL4<sub>AD</sub>-SNF5 ativavam o gene repórter *GAL1-lacZ*. Trata-se de um ensaio genético-molecular pelo qual uma interação proteína-proteína é detectada *in vivo* através da reconstituição da atividade de um ativador transcricional. Ativadores transcricionais podem ser separados em regiões discretas correspondentes a domínios de ligação ao DNA e domínios de ativação da transcrição <sup>(88-90)</sup>. O método é baseado em propriedades da proteína Gal4, um ativador transcricional da levedura *Saccharomyces cerevisiae* constituído por dois domínios funcionais distintos e separáveis – um domínio amino-terminal, localizado entre os aminoácidos 1 e 147, onde se ligam regiões específicas do DNA (UAS-GAL4), sendo denominado DNA-BD (*DNA-binding domain*); e um domínio carboxi-terminal, o qual está situado entre os aminoácidos 768 e 881 de Gal4, e se caracteriza por ativar o processo de transcrição da levedura, sendo chamado, portanto, de AD (*activating domain*). UAS (*Upstream Activation Sequence*) são regiões reguladoras da transcrição no genoma da levedura, reconhecidas por ativadores transcricionais específicos <sup>(91,92)</sup>.

O DNA-BD de Gal4 reconhece seqüências de ativação UAS, mas isoladamente, não é capaz de ativar a transcrição. O AD, por sua vez, apesar de poder interagir com o complexo da RNA polimerase II, não ativa o processo de transcrição por si só, devido à distância em que ele se encontra da região

promotora UAS-GAL4. Mas os dois domínios do ativador não precisam estar ligados covalentemente. Apenas a reconstituição da proximidade entre esses domínios DNA-BD e AD já é suficiente para que a atividade transcricional de Gal4 seja restabelecida <sup>(63,64,90)</sup>.

No sistema duplo-híbrido para se detectar as interações proteicas, é necessário construir e introduzir na levedura hospedeira plasmídeos codificando duas proteínas híbridas, um com o DNA-BD de GAL4 fundido a uma proteína X e o outro com o AD de GAL4 fundido a uma proteína Y. A interação entre as proteínas X e Y refaz a proximidade entre os dois domínios de GAL4, recrutando a maquinaria transcricional para a região do promotor. A transcrição é ativada e a interação proteína-proteína é detectada através de um sinal fenotípico que é gerado a partir da ativação transcricional dos genes repórteres da levedura, os quais contêm sítios de ligação para GAL4 <sup>(63,87,90)</sup>. A ilustração do princípio básico de um ensaio de duplo-híbrido em levedura está na **Figura 4**.



**Figura 4.** Princípio básico do sistema duplo-híbrido em levedura descrito por Fields e Song. A) O processo de transcrição não ocorre porque as proteínas híbridas X e Y não são parceiras interativas. B) A interação entre as proteínas X (fundida ao DNA-BD) e Y (fundida ao AD) reconstitui a proximidade entre os dois domínios da proteína Gal4, ativando a transcrição e promovendo a expressão de genes repórteres da levedura.

Apesar de ter sido desenvolvido inicialmente para detectar interações físicas entre duas proteínas conhecidas, em pouco tempo o sistema duplo-híbrido passou a ser amplamente utilizado em *screenings* para triagens de interações entre uma proteína conhecida e proteínas codificadas por bibliotecas de cDNAs de determinado órgão ou tecido. Normalmente, a proteína conhecida está fundida ao DNA-BD, sendo denominada “isca” e as proteínas da biblioteca apresentam-se ligadas ao AD, sendo chamadas de “presas” nesse sistema <sup>(93)</sup>. Essas triagens resultam na disponibilidade imediata do gene clonado para qualquer nova proteína identificada <sup>(64,90)</sup>.

A maioria dos vetores de duplo-híbrido emprega o promotor de levedura *ADH1* para dirigir a expressão das proteínas híbridas, o que permite um alto nível

de expressão das sequências sob seu controle <sup>(94)</sup>. A localização nuclear é direcionada através de sequências internas no domínio de ligação da proteína híbrida ou por uma sequência SV40, ligada à extremidade amino-terminal do domínio de ativação da referida proteína <sup>(95)</sup>.

No sistema duplo-híbrido os produtos da ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* da linhagem AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*, levam à expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de histidina e adenina, respectivamente. Desta forma, a seleção das interações entre isca e presa foi efetuada a partir da utilização de meios de cultura com ausência desses nutrientes, os chamados meios *drop-out* duplo (SD-Leu-Trp) triplos (SD-His-Leu-Trp) e quádruplos (SD-Ade-His-Leu-Trp). O gene *HIS3* é o repórter mais sensível, porém o menos seletivo possui grande potencial na geração de falso-positivos. O *ADE2* é especialmente usado porque, como é o único com promotor *GAL2*, que é um gene repórter mais seletivo, porém menos sensível, eliminando um grande número de falso-positivos, mas também gera falsos negativos <sup>(96)</sup>.

Também a partir do sistema duplo-híbrido, Chung e colaboradores (2000) <sup>(97)</sup> identificaram a proteína karioferina  $\beta 3$ , pertencente ao grupo de proteínas que fazem transporte de proteína e de RNA, como um parceiro interativo da proteína NS5A do HCV. O trabalho também mostrou, por meio da geração de proteínas mutantes, que a interação NS5A de HCV com karioferina  $\beta 3$  pode inibir sua atividade e alterar o metabolismo celular, bem como contribuir com a proliferação viral <sup>(97)</sup>.

Outra interação proteína-proteína com NS5A de HCV detectada através do sistema duplo-híbrido foi descrita por Evans e colaboradores (2004) <sup>(99)</sup>. Os

experimentos detectaram como par interativo de NS5A a proteína hVAP-A humana, que está envolvida no transporte intracelular de vesículas e, além de atuar como receptora para a ligação de proteínas, é alvo necessário para a replicação eficiente do RNA. Mutações em NS5A que bloqueiam a referida interação reduzem fortemente a replicação do HCV. Além disso, as análises demonstraram uma inversa correlação entre o estado fosforilativo de NS5A e a interação com hVAP-A (*Human Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein A*), ou seja, os modelos no estudo sugeriram que a hiperfosforilação de NS5A rompe a interação, regulando negativamente a replicação do RNA viral <sup>(98)</sup>.

### **1.5. Expressão de Proteínas Recombinantes**

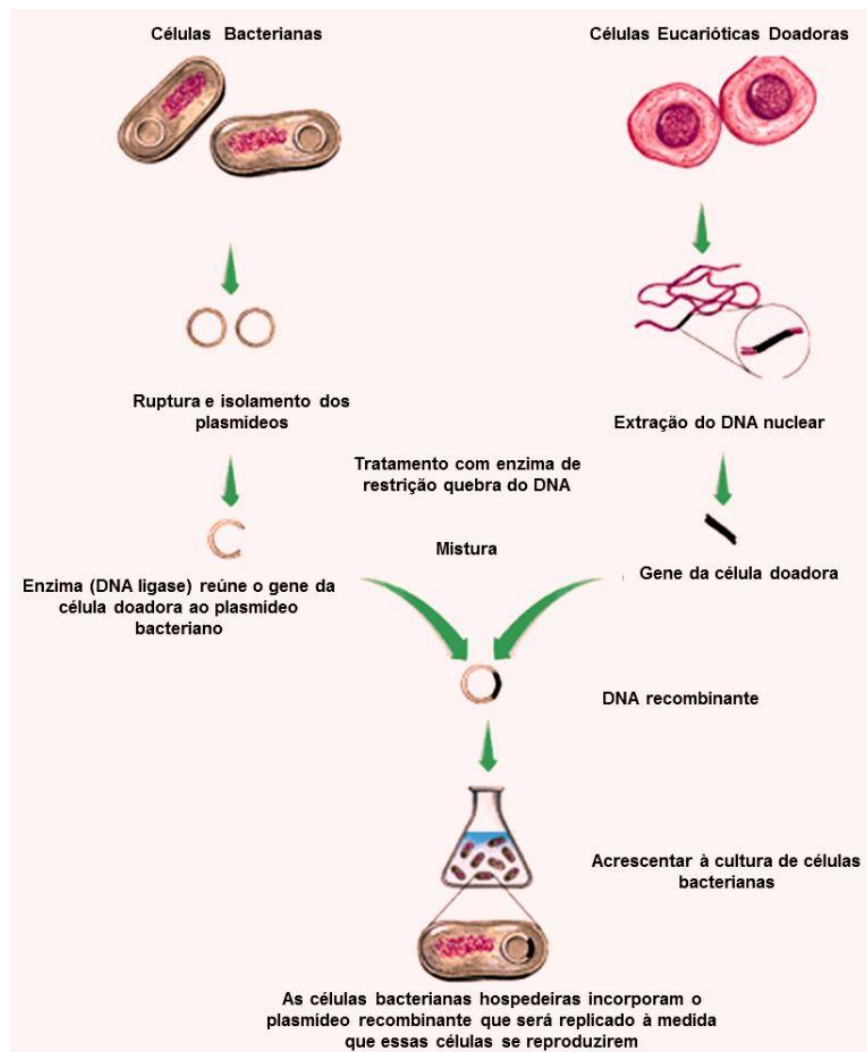
A expressão de proteínas recombinantes em procariotos apresenta a vantagem de ser rápida e possibilitar a obtenção de proteínas em larga escala. Porém, grande parte das proteínas expressas pode ficar contida na fração insolúvel da preparação e devem ser purificadas em condições desnaturantes, alterando assim sua estrutura e conseqüentemente função e/ou antigenicidade <sup>(99)</sup>. Além disso, o sistema não inclui modificações pós-traducionais, como por exemplo, a glicosilação de proteínas <sup>(99)</sup>. Para proteínas que apresentam um padrão de glicosilação, como NS1 e E dos *Flavivirus*, são necessários sistemas alternativos, como o uso de células eucarióticas: leveduras, células de mamíferos e de insetos para a expressão, pois permitem o processamento pós-traducional das proteínas recombinantes. Entretanto a expressão de proteínas em células de

mamíferos representa elevado custo de manutenção, além de ser muito demorada e trabalhosa<sup>(100)</sup>.

O sistema de expressão em procarionto é atualmente utilizado comercialmente na produção de diversas proteínas de interesse terapêutico, como por exemplo, insulina, hormônio do crescimento humano, vacina contra Hepatite B, entre outros<sup>(101)</sup>. Isto certamente se deve ao fato de serem de fácil manipulação, crescerem rapidamente e exigirem meios relativamente simples. Os processos de extração e purificação da proteína recombinante em procariontos são menos complexos de serem realizados e apesar de não permitir modificações pós-traducionais, as proteínas expressas em *Escherichia coli* tem apresentado grande êxito em testes sorológicos<sup>(102-105)</sup>.

Para a expressão de proteínas clonadas em bactérias, utiliza-se a tecnologia do DNA recombinante, que consiste em inserir o cDNA de interesse em um vetor de expressão em procarionto. O plasmídeo recombinante será inserido em uma célula procarionte para a propagação do plasmídeo pelas suas células filhas. A técnica está exemplificada simplificada na **Figura 5**.





**Figura 5:** Tecnologia do DNA recombinante que consiste na formação de moléculas recombinantes (<http://www.mundovestibular.com.br>).

Portanto, a síntese do RNA viral envolve processos bastante complexos, com a interação entre o RNA viral, proteínas virais e também fatores celulares, ficando clara a relevância das interações proteicas dentro desse contexto. Diferentemente de HCV e de outros membros da família Flaviviridae, pouco se sabe sobre as interações proteína-proteína relacionadas à NS5 de YFV e sua participação no processo de replicação viral. Dessa forma, a descoberta de proteínas celulares que atuem como parceiras interativas de NS5 de YFV podem

gerar ferramentas para a elucidação da importância funcional de NS5 em células infectadas, como também estabelecer uma base molecular para a atenuação viral dependente de NS5, além de possibilitar, num futuro, uma abordagem proteômica e química para o desenho de drogas contra a Febre Amarela.

### **1.7 Relevância e Justificativa**

A febre amarela é uma enfermidade que ocasiona relevante morbidade e mortalidade nas regiões tropicais da América do Sul. No Brasil, apesar da extensiva campanha de vacinação, aproximadamente 20% da população das áreas endêmica e de transição e quase 100% da população da área indene não estão vacinadas, contudo um dos fatores agravantes do diagnóstico dessa doença é a evolução rápida para formas mais graves e a similaridade de sua sintomatologia com outras doenças febris como malária, sarampo e leptospirose. Para diferenciar estas enfermidades há necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnóstico e formas de tratamento rápido, no entanto não há nenhuma droga antiviral específica para o tratamento da febre amarela, somente tratamento de suporte e vacinação.

Ainda há chances do mosquito *Aedes aegypti* que encontra-se intensamente difundido em praticamente todos os estados do país. Indivíduos com febre amarela silvestre representam fontes potenciais de infecção para estes vetores, que podem iniciar epidemias urbanas explosivas e acometer milhares de pessoas entre a população não vacinada trazendo consequências importantes para a saúde pública e para a economia do país.

Experimentos que utilizam modelo animal (primata não humano) que reflete as formas clínicas observadas em indivíduos infectados com o vírus da febre amarela constitui um excelente modelo de estudo, no entanto, são muito caros e inviáveis nos dias de hoje. Assim, o estudo *in vitro* para a identificação da funcionalidade da protease viral do YFV e seus potenciais inibidores, como por exemplo, a função da interação entre a proteína NS5 e a proteína celular hSlu7, poderia contribuir para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas que atuariam inibindo algumas das interações proteína-proteínas de fundamental importância para a ocorrência do ciclo de replicação viral e a progressão dos sintomas da febre amarela.

## **1.6. Objetivos.**

### **1.7.1. Objetivo Geral.**

Identificação da interação da proteína viral NS5 de YFV com a proteína celular hSlu7.

### **1.7.2. Objetivos Específicos.**

1) Identificação da interação entre a proteína celular hSlu7 com o domínio RNA polimerase de NS5 e suas deleções, através da realização do mapeamento em sistema duplo híbrido em levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2) Caracterização da sublocalização celular de hSlu7 diante infecção com a cepa vacinal 17D de YFV em células de mamíferos, por meio de superexpressão proteica ante infecção.

3) Clonar e Expressar a hSlu7 recombinante em sistema de expressão em procarioto, modelo *Escherichia coli*, e conseqüentemente, a purificação de hSlu7.

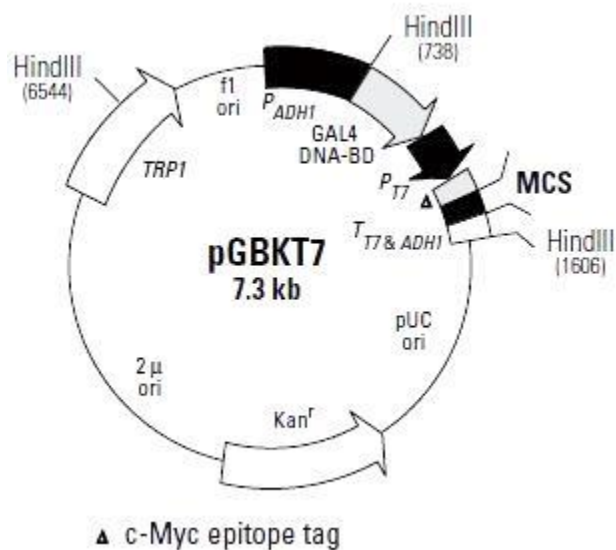
## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Sistema Duplo-Híbrido.

#### 2.1.1. Plasmídeos.

##### 2.1.1.1. Vetor pGBKT7.

A inserção de 15 cDNAs, 14 proveniente de fragmentos deletérios da RdRp de YFV e a RdRp inteira, previamente construídas e confirmadas pela Profa. Maria Carolina Ferrari Sarkis Madrid e colaboradores (2007) <sup>(106)</sup>, em seu projeto de mestrado, foram inseridas no vetor pGBKT7 (CLONTECH *Laboratories*, Inc.) que permite sua expressão em fusão com o domínio de ligação ao DNA (DNA-BD – DNA *binding domain*) da proteína Gal4, gerando, assim, uma proteína híbrida usada como isca para o sistema duplo-híbrido em leveduras. Outras características deste vetor incluem a presença do promotor *ADH1*, o qual promove a expressão de elevados níveis das proteínas híbridas em leveduras, e a presença dos sinais de término de transcrição T7 e *ADH1* (T<sub>T7</sub> & *ADH1*). A replicação autônoma do pGBKT7 em *E. coli* e em *Saccharomyces cerevisiae* é determinada pelas origens de replicação pUC e 2μ ori, respectivamente. O vetor (**Figura 6**) carrega o gene que confere resistência à kanamicina, para seleção em *E. coli*, e o marcador nutricional *TRP1*, para seleção em leveduras.

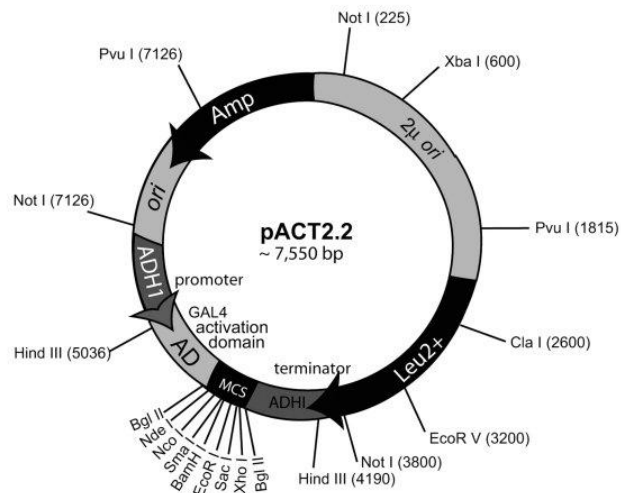


**Figura 6:** Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pGBKT7 (CLONTECH Laboratories, Inc.)

### 2.1.1.2. Vetor pACT2.

Gentilmente cedida pelo Dr. Jörg Kolbarg (Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, Campinas, SP), clonada no vetor pACT2 (CLONTECH Laboratories, Inc.), uma biblioteca de cDNA de células Hela para o *screening* em duplo-híbrido contra as deleções de RdRp construídas pela Profa. Maria Carolina Ferrari Sarkis Madrid e colaboradores (2007) <sup>(106)</sup>, em seu projeto de mestrado. Uma das proteínas que despertou nosso interesse para estudo, foi a hSlu7, para analisarmos o seu domínio de interação com a RdRp e suas deleções. A inserção do cDNA no sítio múltiplo de clonagem do vetor pACT2, com corretas orientação e fase de leitura aberta, permite a expressão das proteínas codificadas em fusão ao domínio de ativação da transcrição (AD – *activation domain*) da proteína Gal4, gerando, assim, proteínas híbridas denominadas presas no sistema duplo-híbrido. O vetor pACT2, cujo mapa está representado na **Figura 7**, apresenta promotor

*ADH1* que gera altos níveis de expressão das proteínas híbridas, as quais são direcionadas para o núcleo da levedura através da sequência de localização nuclear do antígeno SV40, clonado na região 5' da sequência GAL4 AD. O vetor pACT2 replica-se de forma autônoma em *E. coli* e em *S. cerevisiae* e carrega o gene *bla* que confere resistência à ampicilina em *E. coli*, bem como o marcador nutricional *LEU2*, para seleção em leveduras.



**MSC:**

CAT	ATG	GCC	ATG	GAG	GCC	CCG	GGG	ATC	CGA	ATT	CGA	GCT	CGA	GAG	ATC	T
<b>Nde I</b>		<b>Nco I</b>			<b>Sma I</b>			<b>BamH I</b>		<b>EcoR I</b>		<b>Sac I</b>		<b>Xho I</b>		<b>Bgl II*</b>

\*this site is not unique

**Figura 7:** Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pACT2. (CLONTECH Laboratories, Inc.).

### 2.1.1.3. Sequenciamento Nucleotídico

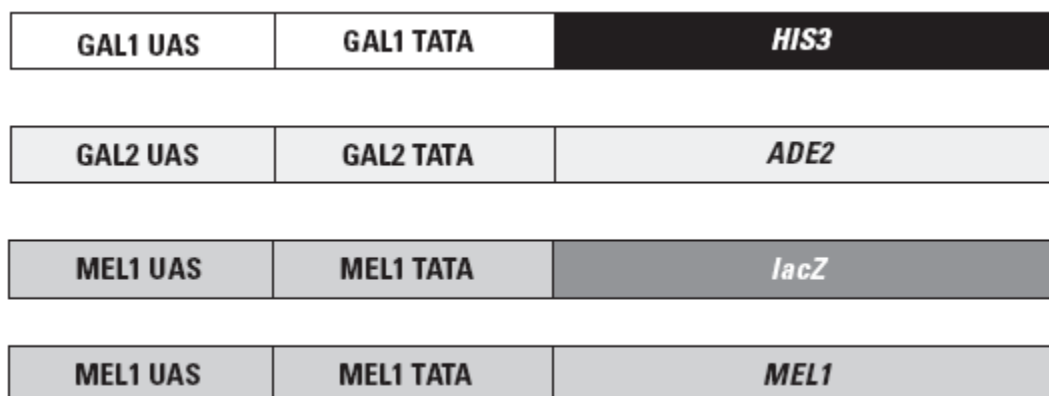
Os clones positivos foram analisados quanto a ausência de mutações que possam ter sido originadas nas PCRs, bem como quanto a correta coesão dos insertos no pGBKT7 e pACT2, pelo sequenciamento nucleotídico. As reações de sequenciamento foram realizadas com o ABI PRISM<sup>®</sup> *Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, nas seguintes condições, 200ng de DNA plasmideal, 4µL de tampão de sequenciamento (5x Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>), 4µL do *Ready Reaction Mix*, 1µL de *primer* e água Gibco<sup>®</sup> (água livre de DNase/RNase) para um volume final de 20µL. Os *primers* foram utilizados numa concentração de 3,2pmol/µL. Os primers para a as deleções de RdRp podem ser consultados em Madrid e colaboradores (2007), para a hSlu7 foi o utilizado o *primer* com sequencia *foward* (TTTGGATCCATGTCAGCCACAGTTGTAGATGCA), e *reverse* (TTTGCGGCCGC CCTACTGTCCAAGGAA). Os produtos obtidos foram submetidos ao ABI PRISM<sup>®</sup> 377 DNA Sequencer (*Applied Biosystems*) e as sequencias foram analisadas utilizando o programa DS Gene 2.0 (Accelrys). As sequências obtidas foram comparadas às sequências disponíveis no *GenBank* pelo programa *BLASTn* (NCBI). E os clones positivos foram armazenados em solução de Glicerol 50% a -80°C.

### 2.1.2. Levedura

A cepa de levedura utilizada no sistema duplo-híbrido foi a linhagem AH109 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Clontech), que foi geneticamente construída para eliminar clones falso-positivos através de três genes repórteres –



*HIS3*, *ADE2* e *lacZ* (ou *MEL1*), os quais estão sob controle de diferentes regiões promotoras (UAS) adjacentes à GAL4, conforme pode ser visualizado na **Figura 8**. Esses repórteres são expressos a partir da proximidade entre os domínios de ligação ao DNA (DNA-BD) e de ativação da transcrição (AD) de GAL4 da referida levedura, ativando sua maquinaria transcricional e gerando, assim, um sinal fenotípico.



**Figura 8.** Genes repórteres da linhagem AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 2.1.2.1. Meios de Cultura para Crescimento e Manutenção de Leveduras

Para a seleção de leveduras contendo os plasmídeos isca e presa, bem como seleção de interação proteína-proteína ativadora da transcrição de um determinado gene repórter foram usados meios SD (Sinapse) (meios sintéticos definidos, também chamados de *drop-out*). Dentre eles, foram utilizados os meios *drop-out* simples, duplos, triplos e quádruplos, respectivamente representados pelos meios: SD-Trp (com ausência do aminoácido triptofano, seleciona levedura

que contém a isca); SD-Leu-Trp (com ausência dos aminoácidos leucina e triptofano, seleciona levedura que contém isca e presa); SD-His-Leu-Trp (com ausência dos aminoácidos histidina, leucina e triptofano, que seleciona as interações capazes de ativar o gene repórter *HIS3*); o meio SD-Ade-His-Leu-Trp (com ausência dos aminoácidos adenina, histidina, leucina e triptofano, seleciona as interações que são capazes de ativar o gene repórter *ADE2*), a quantidade dos reagentes para os meios podem ser vistos a seguir.

	<b>Peso em gramas para 1L de água q.s.p.</b>
Meio SD Base*	26,7
SD-Trp**	0,74
SD-Trp-Leu**	0,64
SD-Trp-Leu-His**	0,62
SD-Trp-Leu-His-Ade**	0,60

\* Meio SD base (Clontech) e \*\* Meios SD drop-out (Sinapse)

Para o crescimento das leveduras contendo vetor pGBKT7 foi utilizado o meio SD -Trp (Sinapse). E para o crescimento das leveduras contendo o vetor pACT2 e vetores utilizados para controles o meio para crescimento das leveduras foi o SD; -Trp-Leu (Sinapse), portanto as leveduras transformantes foram cultivadas em meio duplo.

### 2.1.2.2. Transformação em Levedura

Para a transformação em leveduras das deleções de RdRp replicada em SD-Trp e o pACT2-hSlu7 em meio SD-Leu-Trp (Sinapse) para o teste do *Plasmid-Linkage*, portanto utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* AH109 (*BD MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3*, Clontech) e incubou-se a 30°C durante dois ou três dias. Em seguida, uma massa celular de leveduras foi inoculada em 10mL de meio SD, a 30°C, sob agitação de 250rpm, por 48 horas. Centrifugou-se a 3000g por 1 minuto a temperatura ambiente. Lavou-se o *pellet* com água MiliQ. Centrifugou-se a 3000g por 1 minuto, e adicionou-se 2mL de acetato de lítio a 100mM, e incubou-se por 15 minutos, a 30°C, sobre 250rpm. Após a incubação, centrifugou-se a 3000g por 1 minuto e adicionou-se 2µg de DNA plasmideal, 10µg do carreador (esperma de salmão – Promega), 250µl de PEG 50%, 36µl acetato de lítio a 1M e 45µL de água MiliQ. Homogeneizou-se por 1 minuto em velocidade máxima (*vortex*). Incubou-se por 20 minutos a 42°C. Após o período de incubação, centrifugou-se por 1 minuto em velocidade máxima (13000rpm) e a suspensão de células foi plaqueada em meio SD –Leu-Trp (Sinapse). E as placas foram incubadas a 30°C por 42 a 84 horas.

### 2.1.2.3. Transformação com os Plasmídeos Controle

Conforme metodologia descrita no item 2.1.2.2, foi transformado sequencialmente em levedura, pares de plasmídeos usados como controles positivo e negativo para o estudo das interações proteína-proteína nos ensaios de duplo-híbrido (**Quadro 1**).

**Quadro 1.** Transformações dos Plasmídeos Controle em Levedura.

<b>Transformações sequenciais em AH109</b>		<b>Resultado esperado da interação quanto à ativação de genes repórteres de AH109</b>
<b>Plasmídeos* com DNA-BD de GAL4</b>	<b>Plasmídeos* com AD de GAL4</b>	
pGBKT7-BD	pGADT7-AD pGADT7-T	Negativo Negativo
pGBKT7-Lam	pGADT7-AD pGADT7-T	Negativo Negativo
pGBKT7-53	pGADT7-T	Positivo
* <i>Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3 (Clontech)</i>		

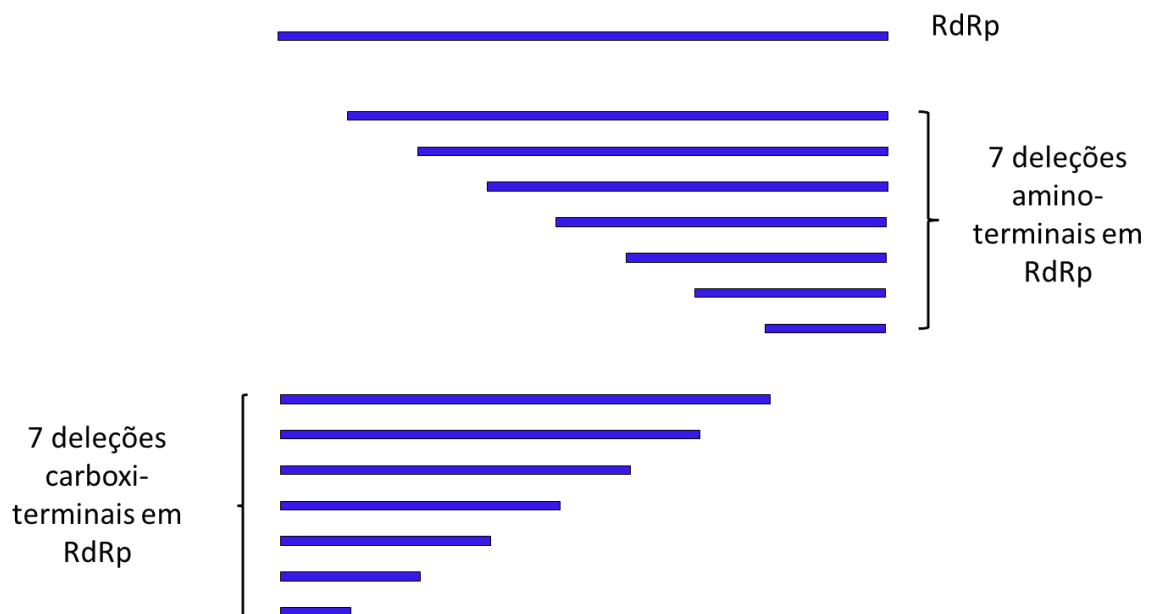
Do grupo de plasmídeos que possuem DNA-BD de GAL4, além do pGBKT7 vazio, foram transformados o pGBKT7-Lam e o pGBKT7-53. O vetor pGBKT7-Lam expressa o DNA-BD em fusão com a proteína laminina C humana, que não está relacionada com a formação de complexos, nem interage com a maioria das proteínas oferecendo, desta forma, um controle negativo para o estudo das interações proteicas. O vetor pGBKT7-53, por sua vez, expressa o DNA-BD de GAL4 em fusão com a proteína p53, que interage com o antígeno *large-T* de SV40 sendo, assim, usado como controle positivo.

Pertencentes ao grupo dos vetores com AD de GAL4 estão o pGADT7 vazio e o pGADT7-T. Este último é usado como controle positivo, uma vez que expressa o AD em fusão ao antígeno *large-T* de SV40, que interage com a proteína p53.

#### 2.1.2.4. *Plasmid-Linkage*.

Para confirmar as interações entre a proteína celular hSlu7 e a RdRp de YFV no sistema duplo-híbrido em levedura, realizou-se um procedimento denominado *plasmid-linkage*.

Para validar o experimento, utilizou-se os controles pGADT7 e pGADT7-T que foram transformados sequencialmente em leveduras contendo pGBKT7 vazio, pGBKT7-Lam, pGBKT7-p53, pGBKT7-RdRp de YFV e as iscas contendo as deleções de RdRp de YFV. Os fragmentos deletérios encontram-se esquematicamente na **Figura 9**. As transformações sequencias estão presentes no **Quadro 2** e a metodologia foi descrita no item 2.1.2.2.



**Figura 9:** Esquema das construções deletérias de RdRp de YFV. RdRp: região correspondente a isca de RdRp inteira, 7 deleções amino-terminais em RdRp de YFV e posteriormente 7 deleções carboxi-terminal em RdRp de YFV, totalizando 15 iscas, sendo 14 dessa representando os fragmentos deletérios.

**Quadro 2.** Transformações sequenciais em *S. cerevisiae* AH109 entre pACT2-hSlu7 e pGBKT7-RdRp, incluindo os plasmídeos controles.

Leveduras transformadas (BD)	DNA AD para Transformação
AH109 pGBKT7-BD vazio	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7-Lam	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7-p53	pAGDT7-T
AH109 pGBKT7-RdRp	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 2f	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 3f	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 4f	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 5f	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 6f	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 7f	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 8f	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 2r	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 3r	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 4r	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 5r	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 6r	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 7r	pACT2-hSlu7
AH109 pGBKT7- RdRp 8r	pACT2-hSlu7

Os transformantes obtidos foram analisados quanto à ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*. O domínio responsável pelo estabelecimento das interações entre RdRp NS5 de YFV e a hSlu7 foi definido segundo a ativação dos dois repórteres e denominados de fragmentos A e B em RdRp.

Para o mapeamento da interação entre pACT2-hSlu7 e as porções deletantes de RdRp, avaliou-se a capacidade da ativação dos genes repórteres

*HIS3* e *ADE2* de AH109, a partir da normalização do número de células por diluições seriadas das culturas e plaqueamento sob forma de *spots* nos meios apropriados. Para isto, foram preparadas culturas de cada levedura transformante em 2mL de meio SD-Leu-Trp (Sinapse) e incubadas a 30°C, sob agitação de 250rpm, até atingir a DO<sub>600</sub> maior que 1. Em seguida, foram transferidos 100µL de cada suspensão com DO<sub>600</sub> normalizada para um poço de microplaca e diluída seriadamente (1:10) quatro vezes, com meio SD-Leu-Trp (Sinapse), para uma análise mais adequada do crescimento e do grau de ativação de um gene repórter. Foram aplicados, então, sob a forma de *spots*, 4µL da suspensão original e de cada diluição em ágar SD-Leu-Trp (Sinapse), SD-His-Leu-Trp (Sinapse) e SD-Ade-His-Leu-Trp (Sinapse). A incubação das placas foi a 30°C até observação de crescimento, o que levou aproximadamente três dias.

## **2.2. Expressão e Purificação da Proteína hSlu7.**

### **2.2.1. Clonagem.**

#### **2.2.1.1. Confirmação do cDNA de hSlu7.**

Inicialmente amplificou-se o fragmento de interesse, que neste caso é o cDNA da hSlu7 (sequencia disponível no *Gene Bank*-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF101074.1>), inserido no pEGFP-C3-hSlu7, para confirmação do tamanho do fragmento 1762pb, este plasmídeo encontrava-se em *E. coli* DH5α.

A extração do DNA plasmidial foi realizado pelo método caseiro de *MaxiPreparation*, que consiste em incubar a construção plasmideal em 4mL de

meio LB (Luria-Bertani) com ampicilina (100µg/mL) por 8 horas a 37°C a 250rpm. Transferir o pré-inóculo para 200mL de LB com ampicilina (100µg/mL) e incubar por 16 horas a 37°C a 250rpm. Centrifugou-se a cultura por 15 minutos a 4°C (rotor SLA-1500 Sorval). Ressuspendeu-se o *pellet* com 6mL da Solução I (**Quadro 3**). Adicionou-se 12mL da Solução II (**Quadro 3**) e incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 6mL da Solução III (**Quadro 3**) e incubou-se no gelo por 20 minutos. Centrifugou-se por 20 minutos a 12000rpm. Filtrou-se o sobrenadante. Adicionou-se 12mL de isopropanol gelado. Homogeneizou-se levemente e incubou-se no gelo por 30 minutos. Centrifugou-se por 20 minutos a 12000rpm (rotor 55-34 Sorval) e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* com 700µL de água MiliQ. Adicionou-se 700µL de 5M Cloreto de Lítio e incubou-se no gelo por 30 minutos. Centrifugou-se a 14000rpm por 20 minutos. Precipitou-se o sobrenadante com 3mL de Etanol Absoluto e incubou-se por 30 minutos a -80°C. Após incubação, centrifugou-se a 14000rpm por 20 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* com 400µL de água MiliQ e aqueceu-se a 37°C até dissolver por completo. Adicionou-se 2,5µL de RNase (20mg/mL) e incubou-se por 20 minutos a 37°C. Adicionou-se 450µL de solução a 20% de PEG (Polietileno Glicol) e 2,5M de NaCl e incubou-se por 16 horas a 4°C. Transcorrida a incubação, centrifugou-se a 12000rpm por 30 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* com 400µL de tampão TE (10mM Tris pH8.0 e 1mM EDTA) a 37°C sob agitação de 950rpm. Adicionou-se 400µL de Fenol/Clorofórmio e homogeneizou-se severamente (*Vortex*). Centrifugou-se a 13200rpm por 2 minutos em temperatura ambiente. Colheu-se a fase líquida e adicionou-se 40µL de 3M de Acetato de Sódio e ainda completou o volume para 1,5mL com etanol absoluto a -



20°C e incubou-se por 30 minutos a -80°C. Centrifugou-se a 13000rpm por 20 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e preencheu-se o tubo com etanol 70% a -20°C. Centrifugou-se a 13200rpm por 20 minutos. Descartou-se o sobrenadante e deixou o *pellet* secar completamente e somente após ter ressuspenso com 200µL de água livre de DNase e RNase é que ficou pronto para a quantificação.

**Quadro 3** : Soluções para Extração de DNA plasmidial – *Maxipreparation*.

<b>Solução I</b>	<b>Solução II</b>	<b>Solução III</b>
1M Glicose 0,5M EDTA 1M Tris pH 8,0 H <sub>2</sub> O q.s.p.	10N NaOH SDS 20% H <sub>2</sub> O q.s.p.	Acetato de potássio: 98,19g Ácido Acético Glacial: 23mL H <sub>2</sub> O q.s.p.:200mL

Após a obtenção do DNA purificado do pEGFP-C3-hSlu7, sua quantificação foi por método de absorvância em espectrofotômetro, obtendo-se o valor de 10550ng/µL, realizou-se a sua amplificação por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizou-se o protocolo *High Fidelity*<sup>®</sup> (Invitrogen), onde o fabricante recomenda 45µL do *Mix High Fidelity*<sup>®</sup>, 1µL do *primer forward* (diluição 15pmol/µL) (TTTGGATCCATGTCAGCCACAGTTGTAGATGCA), 1µL do *primer reverse* (diluição 15pmol/µL) (TTTGCGGCCGCCCTACTGTCCAAGGAA) e 3µL do cDNA extraído de hSlu7 (10550ng/µL). Submeteu-se esta reação a ciclagens de 94°C por 1 min., 53°C por 1 min., 72°C por 2min. e novamente 72°C

por 2 minutos repetidamente por 30 ciclos. A confirmação da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

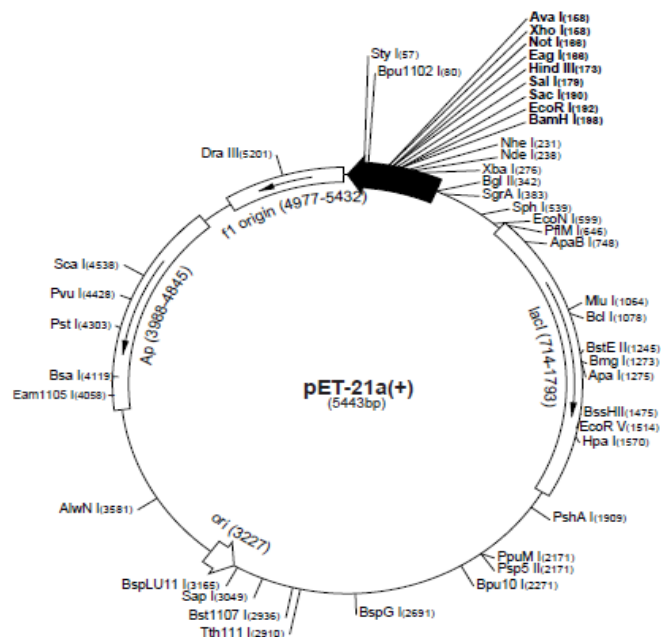
#### **2.2.1.2. Síntese da Molécula Recombinante com cDNA de hSlu7**

Depois da confirmação do tamanho do fragmento, realizou-se a precipitação do produto de PCR com glicogênio e etanol, adicionando-se 5µL de 3M de acetato de sódio; 1µL de Glicogênio (Invitrogen); 150µL de etanol absoluto gelado a -20°C; incubou por 16 horas a -20°C; centrifugou-se por 20 minutos, a 13.200rpm, a 4°C; descartou-se o sobrenadante; adicionou-se 150µL de etanol 70% (-20°C); centrifugou-se por 20 minutos a 13.200rpm e a 4°C; descartou-se o sobrenadante; secou e ressuspendeu-se o *pellet* em 20µL de água livre de RNase e DNase e quantificou-se o purificado (hSlu7 1060 ng/µL).

##### **2.2.1.2.1. Digestão do Inseto hSlu7 e Vetor de Expressão em Procaríoto**

Para a formação da molécula recombinante há a necessidade de se fazer a digestão para a liberação do cDNA de hSlu7 do vetor pEGFP-C3 e a linearização do vetor pET21a para que esses possam por coesão se associarem. Portanto digeriu-se o purificado hSlu7 e o vetor pET 21a (**Figura10**). Para a digestão do inserto utilizou-se do seguinte protocolo: 3,18µL do cDNA purificado de hSlu7 (1060ng/µL); 3µL da enzima de digestão BamHI (Promega); 3µL da enzima de digestão NotI (Promega); 6µL do tampão de reação da enzima (Promega) e 48,82 de água livre de DNase e RNase (Gibco). Para o vetor foi: 17,64µL da extração do pET21a (170ng/µL); 3U da enzima de digestão BamHI

(Promega); 3U da enzima de digestão NotI (Promega); 6µL do tampão de reação – *React*<sup>®</sup> 3 (Promega) e 34,36µL de água livre de DNase e RNase (Gibco). Incubou-se por 1 hora a 37°C. Verificação da eficiência da digestão por eletroforese em gel de agarose a 1%.



**Figura 10:** Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pET21a. (Novagen).

### 2.2.1.2.2. Ligação do Inseto no Vetor

Para a ligação dos fragmentos digeridos realizou-se a sua extração diretamente do gel de agarose, recortando as bandas com os tamanhos correspondentes a hSlu7 (1761pb) e ao pET21 (5443pb) agora linearizado. A extração por micro centrifugação ocorreu com a utilização de um kit (*Pure Link*<sup>®</sup>: *Quick Gel Extration Kit*-Invitrogen), incubou-se a banda recortada do gel a 50°C por 10 minutos, a 300rpm com a solução L3 até o gel dissolver por completo. Centrifugou-se a 11400rpm por 1 minuto e descartou-se a fase líquida. Adicionou-

se 700µL da solução de lavagem W<sub>1</sub>, centrifugou-se primeiro a 11400rpm por 1 minuto, descartou-se a fase líquida e centrifugou-se novamente a 13200rpm por 3 minutos. Adicionou-se 50µL de água livre de DNase e RNase (Gibco), incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugou-se a 11400rpm por 1 minuto para a eluição do DNA para posterior quantificação.

A ligação do inserto hSlu7 no vetor de expressão pET21a foi realizada utilizando a proporção de 1:2 do inserto, como segue no protocolo: 2µL do vetor pET21a (40ng/µL); 2,7µL do inserto hSlu7 (60ng/µL); 1µL de T<sub>4</sub> DNA ligase (1U/µL) e 3µL do tampão de ligação 10x (Roche); e 21,3µL de água livre de DNase e RNase (Gibco) ajustando para um volume final de 30µL. Incubou-se por 16 horas a 4°C. Transcorridas às 16 horas as amostras foram precipitadas com 500µL N-Butanol para melhor pureza das amostras.

#### **2.2.1.2.3. Geração de Bactérias Eletrocompetentes**

Transformação do ligante recombinante em *E. coli* DH5α. Para isto, tornou-se a DH5α eletrocompetente por meio da saturação de sacarose. Reativou-se a bactéria em meio ágar LB (triptona 10g; extrato de levedura: 5g; NaCl: 10g para 1L de água q.s.p.), sem antibiótico, pescou-se uma colônia bacteriana, adicionou-a em 30mL de meio LB e incubou-se 37°C, por 16 horas, a 250rpm. Distribuiu-se em 1,5mL da cultura em suspensão e centrifugou-se a 13000rpm por 2 minutos. Lavou-se duas vezes com 1mL de sacarose a 300mM em temperatura ambiente (centrifugação 13000rpm por 2 minutos). Ressuspendeu-se o *pellet* com 30µL de 300mM de sacarose. Adicionou-se 5µL da ligação nos 30µL de bactérias competentes e submeteu-as a eletroporação (2500V; 200Ω; 25µF) em 3 pulsos de

dois segundos cada. Deixou-se estabilizar a eletroporação em meio LB por 1 hora e 40 minutos sob agitação de 250rpm a 37°C. Após incubação, centrifugou-se a 13000rpm por 2 minutos e plaqueou-se o *pellet* em meio seletivo para o plasmídeo recombinante que é meio LB com ampicilina (100µg/mL) (Sigma Aldrich), incubou-se a placa com a bactéria transformada por 16 horas a 37°C.

#### **2.2.1.2.4. Confirmação dos Clones Positivos**

Para a confirmação dos clones positivos, primeiro selecionou-se as colônias e as colocou para crescer em 4mL de meio LB com 100µg/mL de ampicilina a 250rpm por 16 horas. O PCR *screening* foi realizado com o *kit* para reação de PCR da LGC Biotecnologia<sup>®</sup>, e o protocolo utilizado foi: 5µL do tampão; 2µL de 50mM de Cloreto de Magnésio; 2µL de DNTps (2,5mM); 1µL do *primer forward* (15pmol/µL) e 1µL do *primer reverse* (15pmol/µL); 0,2µL de *Taq* polimerase (5U/mL); 2µL da amostra e 36,8µL de água livre de DNase e RNase (Gibco) para a obtenção de um volume final de 50µL por reação. A ciclagem escolhida foi: 94°C nos primeiros 10 minutos e repetidamente para os 35 ciclos foi 94°C por 1 minuto; 53°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos; e por fim 72°C por 10 minutos.

As amostras positivas detectadas pelo *screening*, passaram pela extração plasmidial pelo *Kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen), para posterior análise quanto à ausência de mutações que possam ter sido originadas nas PCRs, bem como quanto à correta inserção do inserto no vetor pET21a, pelo sequenciamento nucleotídico. As reações de sequenciamento foram realizadas com o ABI PRISM<sup>®</sup> *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, empregando-se aproximadamente 200ng de DNA plasmidial, 4µL de tampão de

sequenciamento (5x Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>), 4µL do *Ready Reaction Mix*, 1µL de *primer* e água (Gibco) para um volume final de 20µL. Os *primers* foram utilizados na concentração de 3,2pmol/µL e estão listados no item 2.2.1.1. Os produtos obtidos foram submetidos ao ABI PRISM<sup>®</sup> 377 DNA *Sequencer* (Applied Biosystems) e as sequências foram analisadas utilizando o programa DS *Gene 2.0* (Accelrys). Os clones positivos foram armazenados em solução de glicerol 50% a - 80°C.

### **2.2.2. Expressão da Proteína hSlu7 em Procarioto**

As cepas bacterianas utilizadas para a transformação do cDNA de hSlu7 inserida no vetor pET21a foram, *E. coli* BL21(DE3) *Codon Plus*-(Stratagene) (marcador de resistência para Cloranfenicol) e algumas cepas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Mário Tyago Murakami (LNBio) como a BL21(DE3)pRARE 2 (marcador de resistência para cloranfenicol), BL21(DE3) C41 e C43 (sem marcador de resistência para antibióticos) e *Arctic Express* (marcador de resistência para gentamicina).

Para a expressão da hSlu7 recombinante foi realizado vários testes (**Quadro 4**), variando a temperatura para ver qual contribuía para a maior síntese proteica. Inicialmente foi inoculado 2mL de meio de cultura previamente incubado por 16 horas, em 100mL de meio LB com antibiótico específico para cada uma das cepas de *E. coli* utilizadas e para o plasmídeo recombinante. A agitação em cada um dos experimentos variou de 130 a 250rpm durante as incubações das culturas bacterianas, até atingirem a Densidade Óptica (DO<sub>600</sub> – *Eppendorf-Biophotometer*) desejada que variou de 0,4 a 0,6. Após atingir o valor esperado para a DO<sub>600</sub>, a expressão foi otimizada com a indução do *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

(IPTG) com concentrações que variaram de 0,2-1mM. Para a confirmação da eficiência da expressão de hSlu7, correu-se as amostras obtidas segundo os testes e desnaturadas a 99°C por 5 minutos em 10% SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis*). Ainda para a lise da amostra e solubilização da hSlu7 foi utilizado Lisozima (Sigma Aldrich) e coquetel de inibidor de protease (*Complete, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets-Roche*).

**Quadro 4:** Condições Experimentais para a Expressão e Solubilização da hSlu7

Bactéria	Marcador de Resistencia	Meio de Cultura	Temperaturas	DO <sub>600</sub>	Concentração de IPTG	Tampão de Lise <sup>1</sup>
		LB e LB com 1-10% de glicerol	20°C, 25°C, 30°C e 37°C pós-indução.	0,6	1mM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15 e 16
		LB, YT <sup>2</sup> , TB <sup>3</sup>	37°C	0,6	1mM	9, 10 e 11
BL21 (DE3) <i>Codon Plus</i>	Cloranfenicol (100µg/mL) e Ampicilina (100µg/mL)	YT <sup>2</sup> , TB <sup>3</sup> e LB	20°C	TB=0,1 YT=0,2 LB=0,3	1mM LB (0,2 e 0,5mM)	12, 13 e 17
		LB	30°C	0,75	1mM	14
		LB	18°C	-	Sem IPTG	18
BL21 (DE3) C41	Ampicilina (100µg/mL)	LB	30°C e 37°C	0,8	0,5mM	17
BL21 (DE3) C43	Ampicilina (100µg/mL)	LB	20°C, 30°C e 37°C	0,8	0,5mM	17
BL21 (DE3) pRARE	Cloranfenicol (100µg/mL) e Ampicilina (100µg/mL)	LB	20°C, 30°C e 37°C	30°C=0,5 37°C e 20°C=0,8	0,5mM	17
<i>Arctic Express</i>	Gentamicina (20µg/mL) e Ampicilina (50µg/mL)	LB	13°C	0,25	0,5mM	17

<sup>1</sup>: Os reagentes e suas concentrações encontram-se no **Quadro 5**.

<sup>2</sup>: Meio de cultivo *Yeast Terrific* (Tryptona: 16g; Extrato de Levedura: 10g; NaCl: 5g para 1L de água q.s.p.).

<sup>3</sup>: Meio de cultura *Broth Terrific* (Tryptona: 12g; Extrato de Levedura: 24g; Glicose: 7,5g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2,2g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 9,4g para 1L de água q.s.p.).

**Quadro 5:** Tampões de Lise e Solubilização na Expressão de hSlu7.

Tampão de Lise	Reagentes (pH 7.4)	Tampão de Lise	Reagentes (pH 7.4)	Tampão de Lise	Reagentes (pH 7.4)
1	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 0,02M Imidazol	2	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 0,02M Imidazol 8M Uréia	3	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 0,02M Imidazol 2% Triton X-100
4	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 0,02M Imidazol 8M Uréia 1% Chaps	5	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 0,02M Imidazol 8M Uréia 2% Triton X-100	6	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 0,02M Imidazol 5% Glicerol 2% Sarkozyl
7	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 0,02M Imidazol 5% Glicerol 2% Sarkozyl 2M Uréia	8	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 5% Glicerol 2% Sarkozyl 2M Uréia	9	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 5% Glicerol 2% Sarkozyl 6M Uréia
10	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 5% Glicerol 2% NP-40 2M Uréia	11	0,1M NaCl 0,05M Tris-HCl 0,001M EGTA 8M Uréia	12	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 20% Glicerol 1% Sarkozyl 1% HEPES 6M Uréia
13	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 5% Glicerol 2% Tween 80: 2M Uréia	14	0,1M NaCl 0,05M Tris-HCl 0,001M EGTA 0,02M Imidazol 8M Uréia	15	0,1M NaCl 0,05M Tris-HCl 0,001M EDTA 0,04M Imidazol 8M Uréia
16	0,1M NaCl 0,05M Tris-HCl 0,01M Imidazol 8M Uréia	17	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl	18	0,02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5M NaCl 0,01M Imidazol

### 2.2.3. Purificação da Proteína hSlu7

Na purificação da proteína, utilizou-se de uma *sepharose* empacotada em coluna para pronto uso (Histrap<sup>®</sup> HP 1mL- *GE Healthcare Life Sciences*), que possui íons de níquel. A hSlu7 foi inserida no vetor (pET21a), que possui uma construção de cadeia de poli histidina (HA) marcada como etiqueta (HIS-tag), essa construção possui afinidade pelo íon níquel presente na coluna. O extrato celular que foi obtido por meio de expressão, posteriormente, foi lisado com



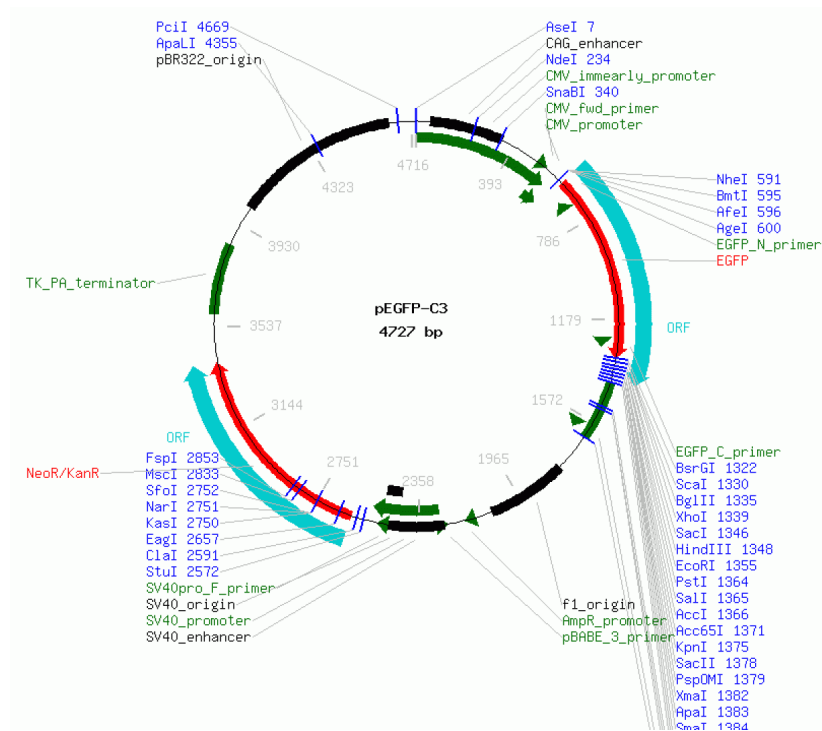
tampão de lise, contendo lisozima (10mg/mL) e coquetel de inibidores de proteases (50mg/mL) (*Complete, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets* - Roche). A lise total ocorreu por sonicação (4x por 1 minuto na potência 0,2). Centrifugou-se a 16000g por 20 minutos a 4°C o extrato celular para a separação da fração solubilizada da insolúvel.

Para a purificação da proteína inoculou-se na coluna Histrap<sup>®</sup>, o extrato proteico lisado, anteriormente estabilizada com o tampão de lise. Para a obtenção da fração purificada da proteína, lavou-se a coluna de purificação com tampão de eluição, contendo os mesmos reagentes do tampão de lise, mudando somente a concentração do Imidazol para: 0,05M; 0,1M; 0,2M; 0,3M e 0,5M respectivamente. Os eluados foram analisados segundo o grau de pureza por 10% de SDS-PAGE e corados ora por *Coomassie Blue*, ora por Impregnação por Nitrato de Prata.

## **2.3. Localização Celular de hSlu7**

### **2.3.1. Super-Expressão de hSlu7**

O vetor para expressão em células de mamíferos com hSlu7 possui uma região capaz de expressar a proteína fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*), no qual o DNA da proteína de interesse foi inserido (pEGFP-C3-hSlu7 clone 3) e o pEGFP-C3 foi utilizado como controle da transfecção **Figura 11**.



**Figura 11:** Mapa de restrição e sítios de clonagem do vetor pEGFP-C3 (CLONTECH Laboratories, Inc).

### 2.3.2. Células e Vírus

As células Vero E6 foram cultivadas em meio *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM) - (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) a 37°C.

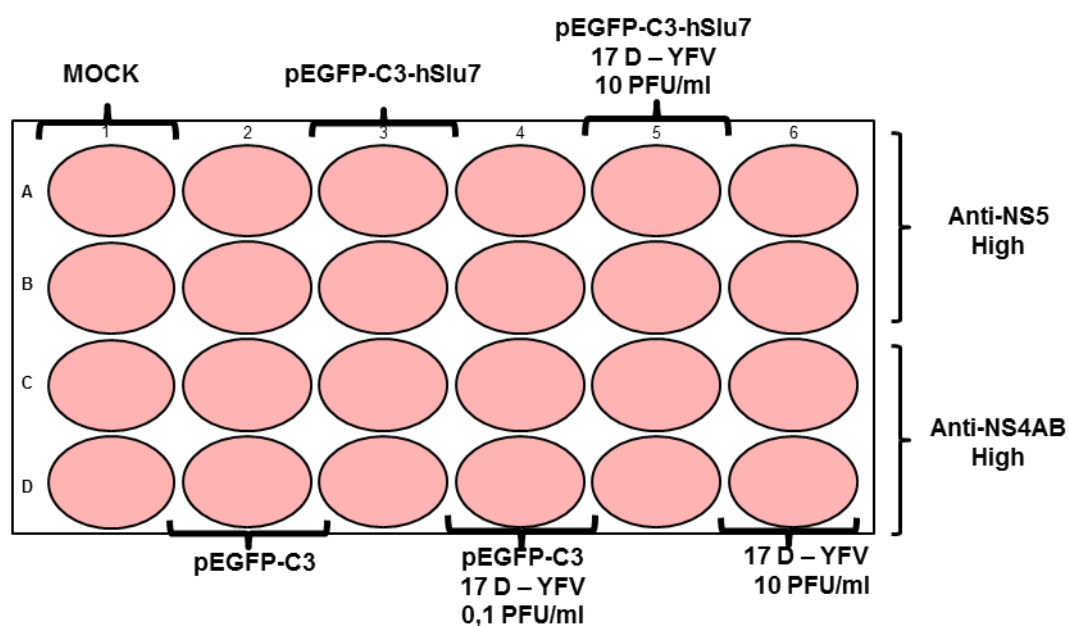
A cepa vacinal 17D de YF (Fiocruz, Brasil), utilizada nos experimentos, foi propagada e titulada a 10<sup>6</sup> PFU/mL, em cultura de células de mosquito *Aedes albopictus* denominada C6/36.

### 2.3.3. Imunofluorescência Indireta.

As células Vero E6 (20.000/well) foram cultivadas sobre lamínula esférica em 24 cavidades (well) e transfectadas com 2,5µg de pEGFP-C3-hSlu7 e 2,5µg do vetor vazio pEGFP-C3 como controle da transfecção. O agente de transfecção utilizado foi 1µL do *Turbofect*<sup>®</sup> (Fermentas), por 4 horas, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> em meio MEM sem antibiótico e sem soro fetal bovino. Transcorridas às 4 horas de transfecção, o meio de manutenção foi trocado para MEM com antibiótico e 1% de soro fetal bovino. Após as 24 horas da transfecção e a monocamada celular possuindo aproximadamente 50% de confluência, foram infectadas com 0,1PFU/mL e 10PFU/mL da cepa vacinal 17D de YFV, as células foram mantidas por 1 hora e meia em meio MEM com antibiótico e sem soro fetal bovino, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de infecção o inoculo contendo a cepa vacinal foi retirado e a monocamada celular foi mantida por 24 horas em meio MEM com antibiótico e a 1% de soro fetal bovino, o desenho experimental pode ser visualizado na **Figura 12**.

Para o estudo de imunofluorescência, houve necessidade da fixação da monocamada celular em 4% de paraformaldeído por 15 minutos, após lavou-se duas vezes com *Phosphate Buffered Saline* 1x (PBS pH7.4) e ainda permeabilizou-se a monocamada celular com metanol gelado (-20°C) durante 5 minutos. Lavou-se três vezes por 5 minutos com PBS 1x. O bloqueio foi realizado com uma solução contendo 5% de soro de bode (Invitrogen), 0,3% de Triton X-100, PBS 1x q.s.p. e incubou-se por 1 hora. Transcorrido o tempo do bloqueio, incubou-se *overnight* a 4°C com os anticorpos primários cedidos gentilmente pelo Dr. Charles Rice (Rockefeller University) o anticorpo de coelho anti-NS5 *High*

(1:2000) e anti-NS4AB *High* (1:1000), diluídos em solução bloqueio em câmara úmida. Depois de 16 horas, lavou-se três vezes por 5 minutos com PBS 1x sob agitação lenta. A incubação com o anticorpo secundário foi com o *Alexa Fluor*<sup>®</sup> 555 *rabbit* (Invitrogen) na diluição (1:2000) em solução bloqueio por 2 horas ao abrigo da luz em câmara úmida. A coloração fluorescente do núcleo foi realizada com o *6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI-Sigma-Aldrich), diluído em PBS pH 7.4 por 5 minutos. Após a lavagem, as lamínulas foram montadas sobre lâminas para microscopia com solução de *mowiol 4.88* impermeabilizando a monocamada celular entre a lâmina e a lamínula.



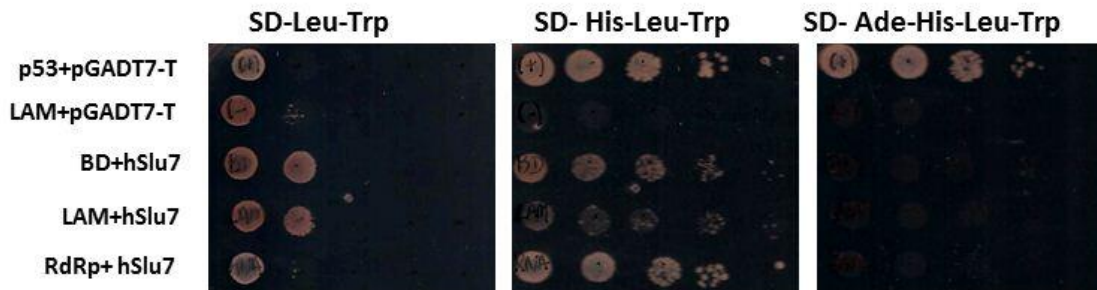
**Figura 12:** Placa de 24 *wells* contendo monocamada celular de Vero E6 para imunofluorescência indireta.

Para a análise da marcação de imunofluorescência, realizou-se então, a contagem de 10 campos por lamínula e quantificou-se quantas células obtiveram a marcação nuclear e nuclear/citoplasmática para a hSlu7 (pEGFP-C3-hSlu7), diante da infecção ou não por YFV. A localização celular de hSlu7 foi quantificada por porcentagem e posteriormente validada quanto ao valor do p segundo o método estatístico t de *Student*.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. *Plasmid-Linkage*

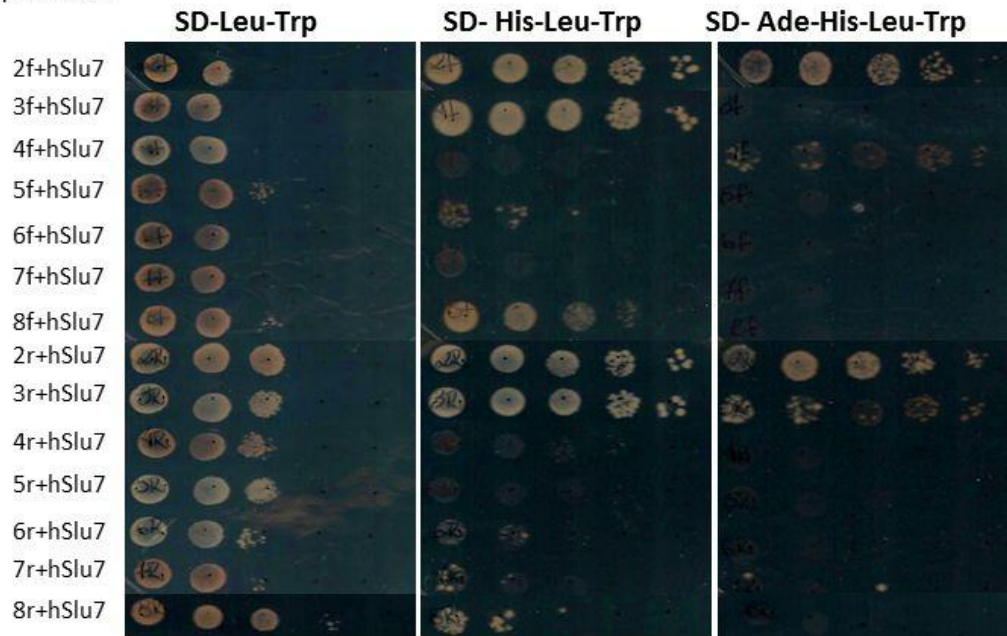
A confirmação da interação entre hSlu7 e as deleções de RdRp de YFV, foi realizado por meio do sistema de *plasmid-linkage*. O pACT2-hSlu7 foi transformado em *S. cerevisiae* AH109, que já continham os fragmentos deletantes e a RdRp inteira de YFV. Os controles para transformação foram, os positivos p53+pGDT7-T; LAM (Laminina)+hSlu7; BD (vazio)+hSlu7, e o negativo LAM+pGADT7-T. Os controles estão ilustrados na **Figura 13**.



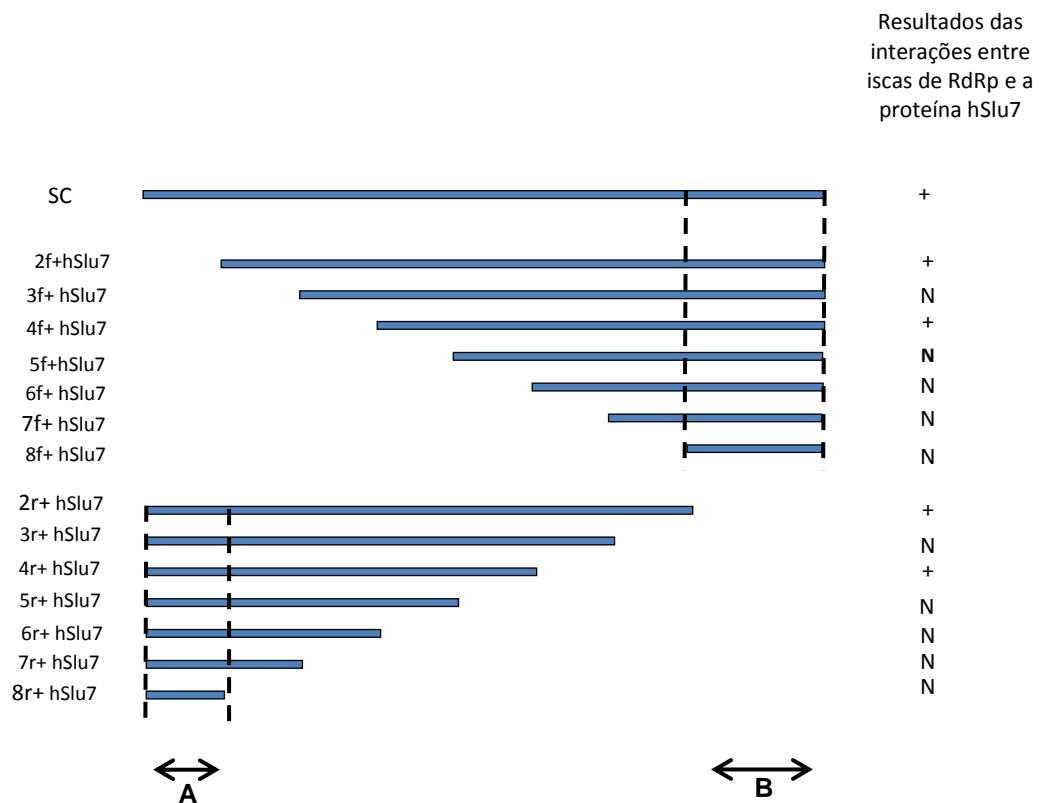
**Figura 13:** Controles de transformação e de interação no sistema duplo-híbrido em leveduras para ativação dos genes reportes segundo o meio de seleção para o crescimento.

Como podemos ver na **Figura 14**, houve interação da hSlu7 com os fragmentos deletérios de RdRp de YFV, nas suas porções amino-terminal e carboxi-terminal, tanto nos meios seletivos *drop-out* Triplo: SD-His-Leu-Trp, quanto no *drop-out* quadruplo (SD-Ade-His-Leu-Trp). O esquema das interações de hSlu7 com a RdRp de YFV inteira e com as suas deleções estão representados na **Figura 15**, incluindo as regiões de interação.

Interações entre iscas de RdRp e hSlu-7



**Figura 14:** Fragmentos deletantes de RdRp e sua interação com hSlu7 no sistema duplo-híbrido em leveduras para ativação dos genes *reporters* segundo o meio de seleção para o crescimento.

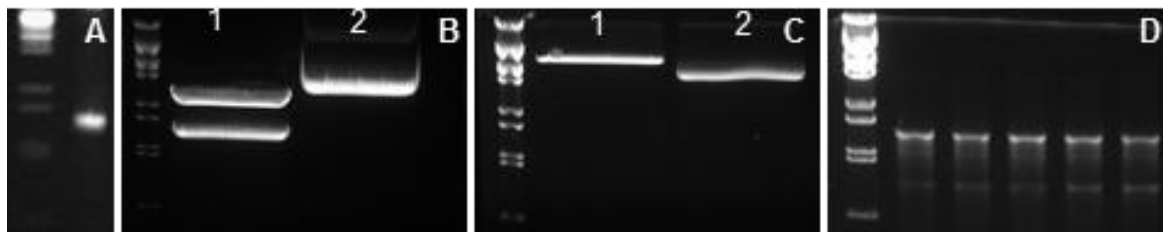


**Figura 15:** Mapeamento das regiões de interação da hSlu7 com os fragmentos deletantes de RdRp no sistema duplo-híbrido em leveduras no meio *drop-out* triplo.

### 3.2. Expressão e Purificação da hSlu7

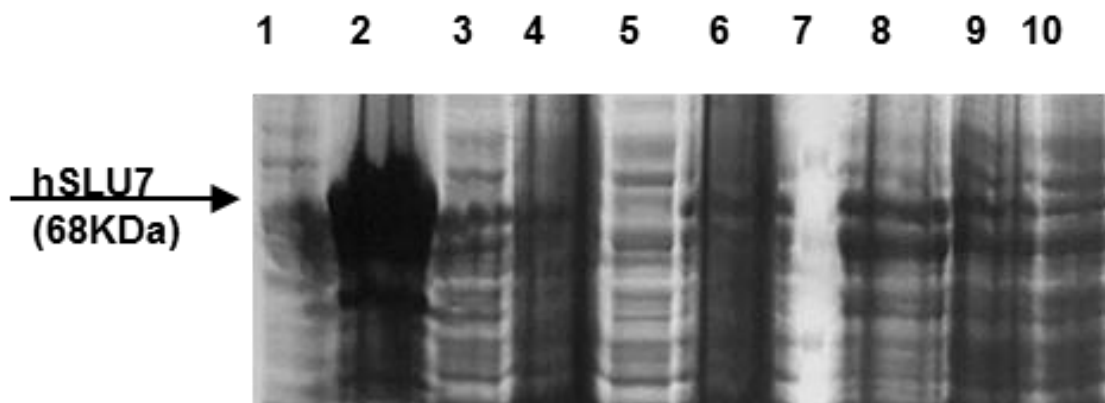
Para expressar e purificar a proteína hSlu7, primeiramente houve a necessidade de confirmar a clonagem da hSlu7 nas diferentes cepas de *E. coli*. A confirmação dos números de pares de bases do cDNA da proteína hSlu7 (**Figura 16A**), e posteriormente a confirmação da eficiência da digestão tanto do plasmídeo contendo hSlu7 (**Figura 16B**) quanto para o vetor pET21a, no qual a proteína foi inserida (**Figura 16C**). A confirmação da transformação em BL21 foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (**Figura 16D**).



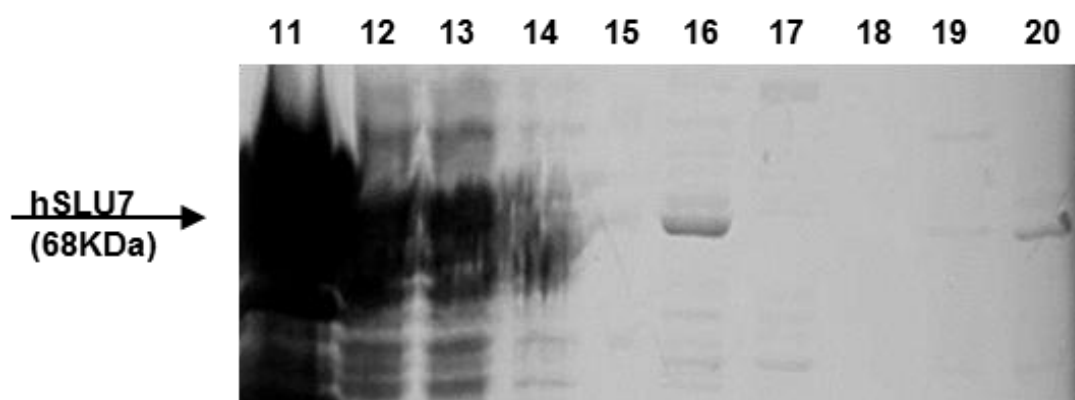


**Figura 16:** Eletroforese em gel de agarose 1%. A - Confirmação do fragmento de 1761pb de hSlu7. B – (1) Digestão do pEGFP-C3-hSlu7 e (2) pEGFP-C3-hSlu7 sem digerir. C – (1) Digestão do vetor pET21a e (2) pET21a sem digerir. D – PCR *Screening* da transformação de pET21ahSlu7 em *E. coli* BL21. Marcador 1Kb de pb.

Foram realizados vários testes para se obter a melhor expressão e solubilização para hSlu7, como encontram-se descritos no quadro 4. Utilizou-se diferentes cepas de *E. coli* na perspectiva de aumentar a expressão e solubilização da hSlu7, como a BL21 (DE) *Codon Plus*, BL21 (DE) C41, BL21 (DE) C43, BL21 (DE) pRARE e outra cepa bacteriana a *Artic Express*. As cepas C41 e C43 apresentaram boa expressão de hSlu7 na temperatura de 30°C, mas não influenciou quanto a solubilização da proteína de interesse. A cepa pRARE exibiu pouca expressão para a hSlu7 e não influenciou quanto a solubilização de hSlu7 como ilustrado na **Figura 17**.



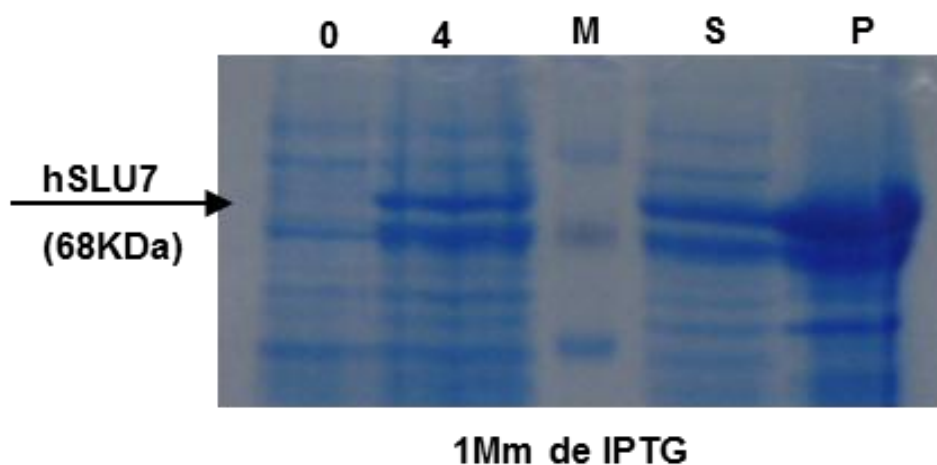
	Cepas Bacterianas segundo teste de Expressão		Cepas Bacterianas segundo teste de Expressão
1	C41/37°C/4 hs	6	pRARE/30°C/3 hs
2	C41/30°C/4 hs	7	Marcador
3	C43/37°C/4 hs	8	C41/37°C/insolúvel
4	C43/30°C/4 hs	9	C41/37°C/solúvel
5	pRARE/37°C/3 hs	10	pRARE/30°C/insolúvel



	Cepas Bacterianas segundo teste de Expressão		Cepas Bacterianas segundo teste de Expressão
11	C41/30°C/insolúvel	16	C43/30°C/insolúvel
12	C41/30°C/solúvel	17	C43/30°C/solúvel
13	C41/37°C/insolúvel	18	pRARE/37°C/insolúvel
14	C41/37°C/solúvel	19	pRARE/37°C/solúvel
15	Marcador	20	pRARE/30°C/solúvel

**Figura 17:** Clonagem da hSlu7 em cepas variadas de *E. coli* BL21 para testar a solubilização da proteína. Concentração de IPTG 0,5mM e tampão de lise de 0,5M de NaCl e 0,02M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

A melhor temperatura para a expressão e posterior solubilização de hSlu7 foi 30°C por 4 horas após a indução com 1mM de IPTG (**Figura 18**). À 37°C ocorreu boa expressão, mas baixa solubilização, dessa forma diminuiu-se a temperatura para 20°C e 25°C, estas temperaturas resultaram em baixa expressão e mesma solubilização quando comparamos com a temperatura de 30°C.

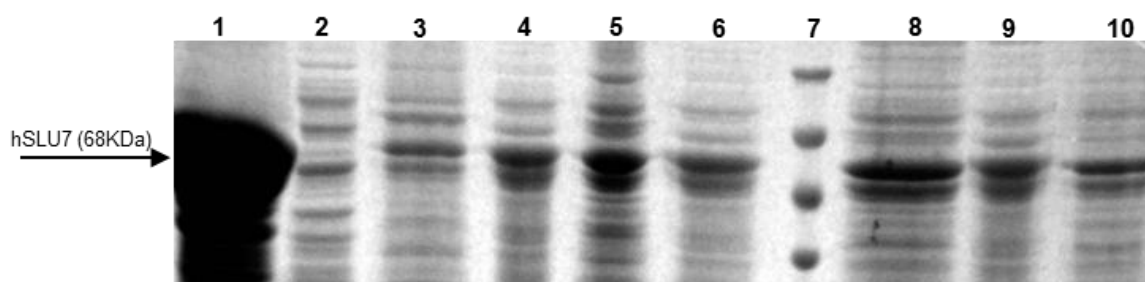


**Figura 18:** SDS-PAGE da expressão e solubilização de hSlu7. Expressão a 30°C por 4hs, pós indução com 1mM de IPTG. Tampão de solubilização 7 que está descrito no quadro 5. (0) 0h antes da indução com IPTG; (4) 4hs após indução com IPTG; (M) marcador (*PageRuler*<sup>TM</sup>-Fermentas); (S) Porção Solúvel da hSlu7 e (P) Porção Insolúvel da hSlu7. Coloração *Coomassie Blue*.

Para a purificação, vários tampões de lise foram testados na tentativa de solubilizar a hSlu7 do extrato celular, como pode ser observado no quadro 5. O detergente que possuiu maior poder surfactante para a hSlu7 foi o chaps, mas solubilizou somente parte da fração proteica.

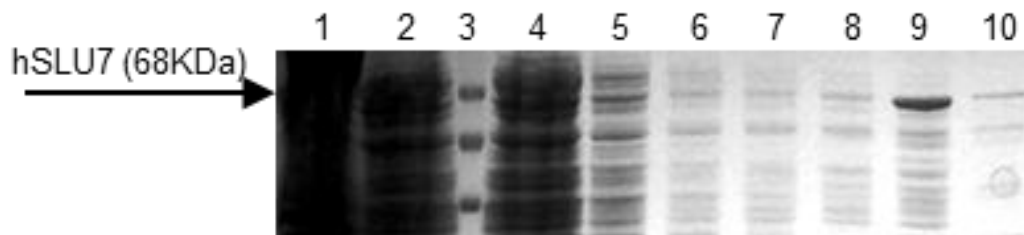
Como descrito no **quadro 5**, muitos tampões de lise continham concentrações crescentes de uréia e mesmo o tampão 11, contendo 8M de uréia, não surtiu efeito significativo a respeito da solubilização de hSlu7.

De qualquer modo, na tentativa de purificar a pequena fração de hSlu7 que solubilizava, tentou-se retirar o excesso de uréia por diálise, mas o extrato proteico precipitou durante a mudança de concentração de 3M para 1M de uréia do tampão de diálise. Teste de solubilização para a hSlu7 podem ser visto na **Figura 19**.



**Figura 19:** Teste de tampões de lise. (1) Fração insolúvel e (2) Fração solúvel – Tampão de lise 3; Frações (3) Insolúvel e (4) Solúvel – Tampão de lise 4; Frações (5) Insolúvel e (6) Solúvel - Tampão de Lise 5; (7) Marcador (*PageRuler*<sup>TM</sup>-Fermentas); e Frações (8) Insolúvel, (9) e (10) Solúvel –Tampão de Lise 2.

No entanto, mesmo que a solubilização não ocorreu totalmente, a purificação foi realizada com a pequena quantidade de proteína solubilizada. A pequena quantidade solúvel de hSlu7 que se ligou na coluna de purificação foi sendo eluída conjuntamente com as proteínas contaminantes, assim não possuindo fração pura de hSlu7 em quantidades necessárias para a realização do dicroísmo ou cristalografia (**Figura 20**).

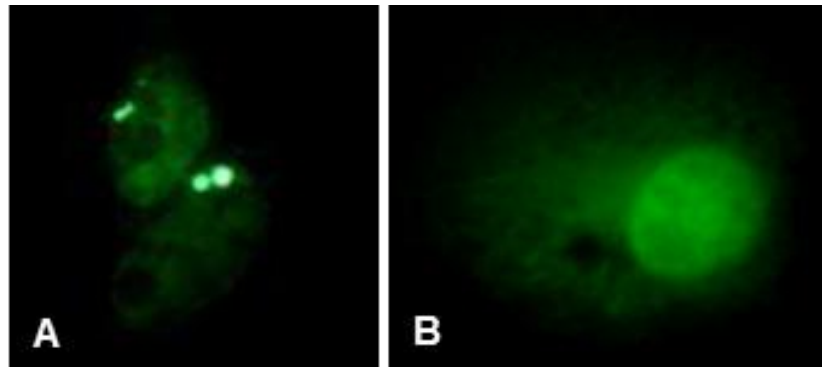


**Figura 20:** SDS-PAGE da solubilização e purificação de hSlu7. (1) Fração Insolúvel. (2) Fração Solúvel. (3) Marcador (*PageRuler*<sup>TM</sup>-Fermentas); (4) Extrato proteico. (5) 1<sup>a</sup> Eluição (tampão de lise). (6) 2<sup>a</sup> Eluição (tampão 17 com 0,05M de Imidazol). (7) 3<sup>a</sup> Eluição (tampão 17 com 0,1M de Imidazol). (8) 4<sup>a</sup> Eluição (tampão 17 com 0,2M de Imidazol). (9) 5<sup>a</sup> Eluição (tampão 17 com 0,3M de Imidazol). (10) 6<sup>a</sup> Eluição (tampão 17 com 0,5M de Imidazol). Expressão a 18°C, sem IPTG por 16 horas. Coloração *Coomassie Blue*. Resina *Sephadex G50*

As imagens correspondentes aos outros testes de solubilização para a hSlu7 encontram-se no **Anexo I**, em conjunto com as respectivas condições de expressão e tampões de solubilização.

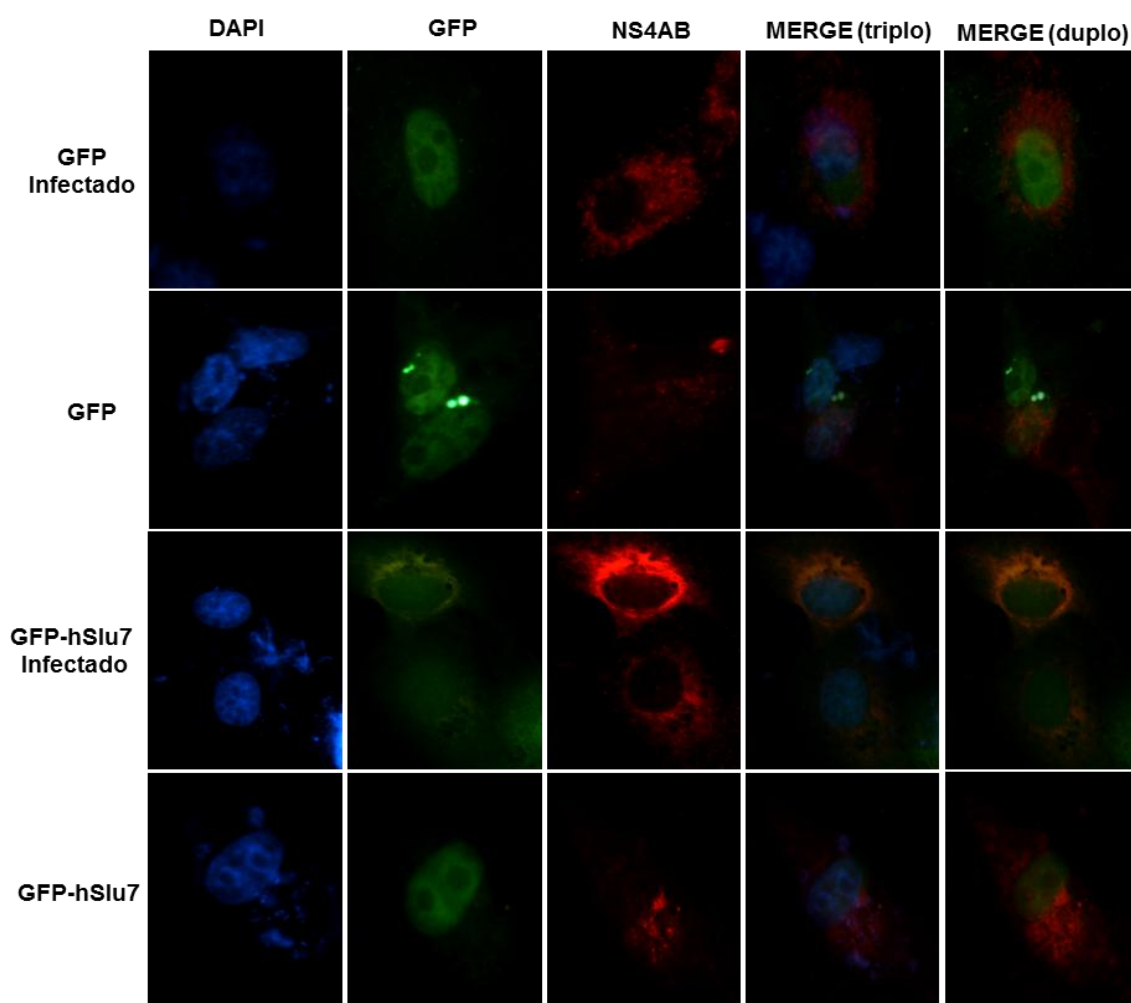
### 3.3. Imunofluorescência Indireta

Quando superexpressamos a hSlu7, ela possuiu localização nuclear (**Figura 21A**), mas quando infectamos com o YFV, a célula Vero E6, ocorreu uma translocação celular e a hSlu7 deixou de se localizar somente no núcleo, para se localizar também no citoplasma (**Figura 21B**).



**Figura 21:** Localização e Sublocalização celular de hSlu7. (A) Superexpressão de hSlu7 e não infecção. (B) Superexpressão de hSlu7 infecção com YFV a 10 PFU/ml. Imunofluorescência Indireta em células Vero E6. Vetor pEGFP-C3-hSlu7.

Quando analisamos o sinal de fluorescência das células, o que podemos ver é a hSlu7 em verde, pois há a emissão da fluorescência pela proteína GFP (*Grow Fluorescent Protein*) e em vermelho a emissão da fluorescência pela marcação do *Alexa Fluor 555* (Invitrogen) para a marcação com os anticorpos anti-NS4AB e anti-NS5. A **Figura 22** revela a localização somente nuclear de hSlu7, quando não há infecção celular. Mas quando infecta-se a monocamada celular com YFV, a localização de hSlu7 nuclear passa a ser citoplasmática também. Essas evidências, comprovam a sublocalização celular de hSlu7 24 horas pós-infecção com YFV.



**Figura 22:** Marcação Celular por Imunofluorescência. Primeira coluna: Marcação nuclear pelo DAPI. Segunda coluna: Fluorescência pela transfecção de pEGFP-C3 vazio e pEGFP-C3-hSlu7. Terceira coluna: Fluorescência pelo *Alexa Fluor 555* (Invitrogen) para o anti-NS4AB. Quarta coluna: Sobreposição tripla das marcações fluorescentes – DAPI, GFP e NS4AB. Quinta coluna: Sobreposição dupla das marcações fluorescentes - GFP e NS4AB.

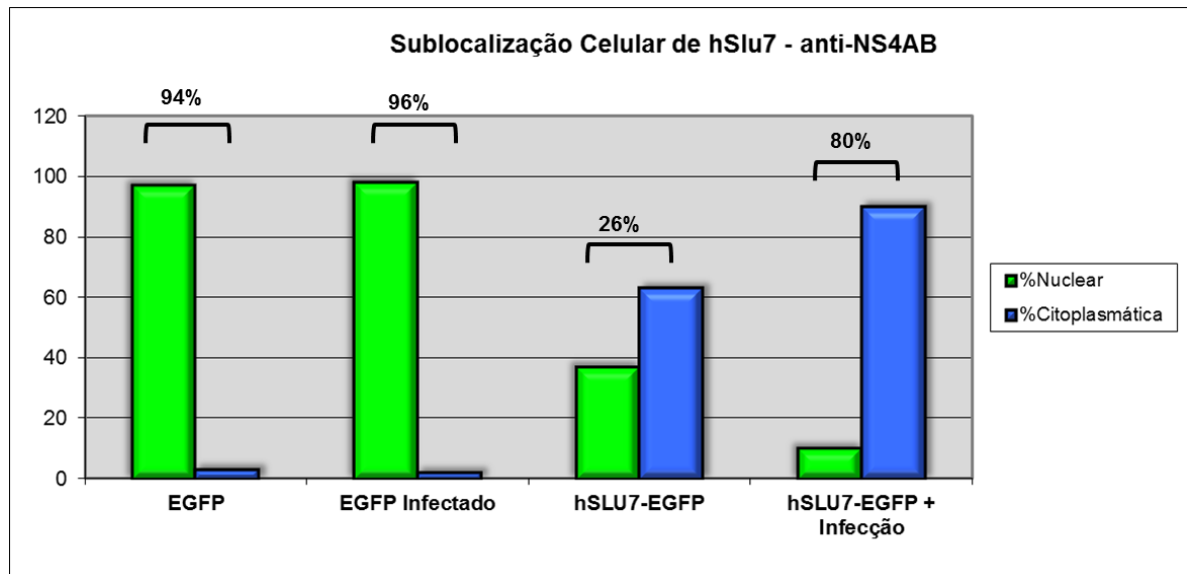
Quando se realizou a quantificação para determinar a intensidade da translocação nuclear da hSlu7 para o citoplasma diante da infecção pelo YFV, obtivemos os dados que estão representados na **Figura 23**, que exemplifica a porcentagem da marcação nuclear de hSlu7 quando as células não foram infectadas e a da sua sublocalização celular pós-infecção com YFV nas concentrações de 10PFU/mL. Portanto, a quantificação nuclear foi comparada

segundo o vetor de controle de transfecção pEGFP-C3 vazio e o pEGFP-C3-hSlu7. Para a validação da sublocalização celular de hSlu7, foi então estabelecida uma porcentagem sobre a soma das células de 10 campos microscópicos e quantas células foram marcadas pela fluorescência no núcleo, e núcleo/citoplasma. Esses cálculos foram realizados tanto para marcação anti-NS4AB *High* e anti-NS5 *High*.

Para se determinar a relação da marcação nuclear/citoplasmática do pEGFP-C3 vazio, não houve diferença significativa na marcação nuclear/citoplasmática diante da infecção pelo YFV. Essa diferença foi de aproximadamente de 3%, sugerindo assim a não interação da proteína GFP com YFV, nem a sua transição celular. Por outro lado, podemos perceber que a marcação citoplasmática de pEGFP-C3-hSlu7 ultrapassa a marcação nuclear após a infecção viral, ou seja 90% das células infectadas e marcadas com GFP-hSlu7 possuiu marcação citoplasmática além da marcação nuclear.

Quando avaliamos a diferença da marcação citoplasmática de células somente transfectadas com pEGFP-C3-hSlu7 e as transfectadas e infectadas, foi observado que 27% de células a mais possuíram a marcação para a hSlu7 no citoplasma, sugerindo o envolvimento da hSlu7 durante a replicação viral.





**Figura 23:** Porcentagem da sublocalização celular de hSlu7 pós infecção com YFV (10PFU/ml). Anti-NS4AB High.

Quando se relaciona os valores obtidos utilizando a porcentagem quanto a sublocalização celular de hSlu7 e a da proteína GFP que não se altera durante a infecção por YFV, a validação do resultado foi pelo método estatístico do *t* de Student, que ao compararmos as condições obtidas quanto a localização celular de hSlu7 e GFP pós-infecção, o valor de *p* foi igual a 0,05. Essa análise estatística nos permite afirmar com 95% de confiança que após 24 horas de infecção com YFV houve a translocação significativa da hSlu7 nuclear para o citoplasma celular.

#### 4. Discussão

A replicação viral é um evento que ocorre tanto no citoplasma quanto no núcleo da célula hospedeira, portanto utilizando toda a sua maquinaria para a produção do genoma viral. Um evento que ocorre de extrema importância na replicação de alguns vírus de RNA, é a reação de *splicing* <sup>(107)</sup>, essa reação otimiza a síntese proteica do vírus. A reação de *splicing* genericamente pode ser resumida como a retirada de íntrons e a ligação dos exons, que estão presentes na molécula precursora de RNAm no núcleo das células eucarióticas. Nesta reação há o envolvimento de muitas moléculas e proteínas necessárias para a ocorrência do *splicing* e muitas participam formando o complexo spliceossomo. Uma das ubiquitinas envolvidas no segundo passo catalítico do *splicing* é a ribonucleoproteína (RNP) U5 e sabe-se que a hSlu7 é uma proteína nuclear que interage com a U5 <sup>(78)</sup>. Esta proteína atua como um cofator durante a transesterificação do segundo passo catalítico do *splicing* alternativo, selecionando os nucleotídeos AG corretos para a fixação do spliceossomo, dando início ao processo *splicing* alternativo <sup>(79,108)</sup>.

Quando realizamos o sistema duplo-híbrido em leveduras, utilizando uma biblioteca de cDNA de proteínas celulares de células Hela, contra regiões deletantes de RdRp de YFV, algumas interações proteína-proteína foram detectadas e uma das proteínas de interação foi a hSlu7. Utilizando a hSlu7 como isca para as presas deletantes de RdRp, obtivemos a ativação dos genes repórteres, validando então a interação entre a proteína celular hSlu7 e a RdRp de YFV. O mapeamento da interação proteína-proteína mostrou que a hSlu7 interage com regiões diferentes da RdRp, isso nos sugere, que além da hSlu7 interagir com

a RdRp, e ainda, por ser um fator importante para a correta seleção do AG iniciando o *splicing* alternativo, a hSlu7 provavelmente está envolvida com o metabolismo do RNA viral durante a replicação do YFV.

Outro resultado que sustenta a interação de hSlu7 com o YFV, é a imunofluorescência indireta, onde houve um acúmulo de GFP-hSlu7 no citoplasma das células Vero E6 infectadas com YFV, quando comparado com a sua concentração nuclear. Shomron e colaboradores (2004) <sup>(82)</sup> corroboram que a hSlu7 possui três domínios funcionais diferentes na localização subcelular, um Sinal de Localização Nuclear (NLS), que possui uma região de ligação ao zinco e outra rica em leucina. A região de ligação ao zinco sobrepõe ao NLS que bloqueia entrada da hSlu7 para o núcleo, mas uma pequena quantidade de hSlu7 nuclear é mantida prevenindo a sua translocação para o citoplasma via rota de Manutenção da Região Cromossomal 1 (CRM1) <sup>(83)</sup>. A translocação sincronizada das proteínas entre o núcleo e o citoplasma de células eucarióticas é um poderoso mecanismo regulatório da expressão gênica, dos processos celulares <sup>(85,109)</sup>, da regulação do *splicing* alternativo <sup>(85,110)</sup> e na replicação viral <sup>(107)</sup>.

A identificação dos sinais que promovem a transição nuclear-citoplasmática é importante para a compreensão das funções destas proteínas e a regulação de seus substratos <sup>(83)</sup>. A região ligante ao zinco da hSlu7 determina a sua localização celular, por ser uma proteína sensível ao balanço núcleo-citoplasmático <sup>(82)</sup>. Há algumas condições fisiológicas que podem alterar as concentrações de hSlu7 nuclear endógena para acúmulos citoplasmáticos. Isso ocorre geralmente em condições de estresse celular, e alternância para o *splicing* alternativo <sup>(83)</sup>.

A sublocalização celular de hSlu7 no citoplasma, sugere alta síntese proteica nas células pós-infecção viral. Alguns vírus podem inibir diretamente ou indiretamente a síntese proteica celular, como estimular a síntese de proteínas necessárias para a replicação viral <sup>(107)</sup>. Diante destas afirmações, podemos relacionar os achados quanto a sublocalização celular de hSlu7 decorrente da replicação viral de YFV.

Poucos estudos conseguem determinar a função celular de hSlu7, quanto ao seu envolvimento nas sinalização do metabolismo celular. A caracterização inicial para o envolvimento dessa proteína homóloga humana foi realizada por meio da Slu7 em leveduras. Inicialmente foi determinada a sua função celular. Estudos mutacionais revelam que a Slu7 em leveduras não é vital para a célula, mas interfere na taxa da realização do *splicing*. E a mutação no nucleotídeo 221 mostrou ser letal *in vivo*. Esta mutação também foi responsável pela não formação do RNAm de Prp18 que também é um fator que participa do segundo passo catalítico do *splicing* <sup>(111)</sup>. Contudo pequenas mutações geraram um fenótipo para as leveduras que passaram a ser sensíveis a altas temperaturas <sup>(79,112)</sup>. A descoberta da função dessa proteína em leveduras, nos despertou a curiosidade de estudá-la, caracterizando então essa proteína em humanos, para posteriormente determinar sua participação no metabolismo celular.

A análise da sequência da hSlu7 foi realizada por ferramentas de bioinformática, (LNBio com o Dr. Mário Tyago Murakami). Esta proteína apresentou 30 códons raros, que quando expressos por *E. coli* tendem a não ser sintetizados corretamente pela bactéria. Além disso, a hSlu7 possui 85% da sua sequência com regiões desordenadas, o que impede a sua análise tridimensional

por cristalografia, mas não a sua avaliação por dicroísmo. Mesmo assim, como obtivemos ensaios biológicos significativos para esta proteína tentamos purificá-la.

Nossos resultados mostraram que a proteína heteróloga hSlu7, quando expressa em *E. coli* é uma proteína insolúvel. Isso geralmente ocorre quando expressa-se proteínas de membrana de eucarioto em *E. coli*, ocorrendo a formação de corpúsculos de inclusão<sup>(113-117)</sup>. Os corpúsculos de inclusão possuem certa resistência à degradação proteolítica devido a estrutura secundária das proteínas recombinantes<sup>(118,119)</sup>. A formação dos corpúsculos de inclusão está relacionada diretamente com algumas propriedades intrínsecas de cada proteína, como tamanho, hidrofobicidade e estrutura da cadeia peptídica<sup>(120)</sup>. Outro fato que impede a solubilização da proteína, é a presença de pequenos *loops* com cargas positivas, este fator impossibilita a liberação da proteína pela célula bacteriana<sup>(121)</sup>.

Vale a pena ressaltar que a expressão proteica tem que ser otimizada para contribuir com a produção de grande massa celular. No entanto, as proteínas endógenas podem ser tóxicas, proporcionando a lise celular das células hospedeiras por diferentes mecanismos<sup>(114)</sup>, diminuindo, portanto a massa celular que contém a proteína recombinante.

Muitos teste de expressão e solubilização foram realizados para a hSlu7. Para a expressão, a melhor temperatura que conseguimos produzir alto volume de massa proteica foi a de 30°C e esta temperatura também contribuiu para melhor solubilização da proteína, pois temperaturas mais baixas na faixa de 16 a 30°C tendem a diminuir a formação de corpúsculo de inclusão na expressão de proteínas heterólogas<sup>(122,123)</sup>. Mesmo assim, a solubilização de hSlu7 não foi

significativa em baixas temperaturas, fato que corroborou com Simionatto e colaboradores (2010) <sup>(124)</sup>. Outros fatores também podem influenciar na produção da massa proteica, como por exemplo a concentração de IPTG, que é um indutor para o crescimento bacteriano atuando no *Operon Lac*, mas uma das suas desvantagens é que ele é tóxico à maioria das células, de tal forma que, após 4-5 horas de indução, observa-se uma drástica diminuição do crescimento celular no meio de cultura <sup>(125)</sup>. Portanto tentamos variar as concentrações de IPTG durante a expressão de hSlu7 para avaliar a produção da massa celular, como foi realizado por Song e colaboradores (2009) <sup>(117,123,126)</sup>. Nossas amostras que foram expressas com diferentes concentrações de IPTG não tiveram diferença segundo a quantificação por SDS-PAGE. Portanto, percebemos que a utilização de 0,5mM de IPTG possui o mesmo efeito na expressão, quando comparado com 1mM. Outro fator que durante a expressão altera a quantidade da produção da massa proteica e da formação de corpúsculo de inclusão é a rotação realizada para a aeração no meio de cultivo.

Após várias tentativas de solubilização para a hSlu7 durante a expressão, utilizamos vários tipos de detergentes e desnaturantes na tentativa de solubilizar a hSlu7 durante a lise celular. Foram diferentes concentrações (2-8M) de uréia na tentativa de solubilizar o corpúsculo de inclusão <sup>(124)</sup>. Por mais que a maioria das proteínas insolúveis solubilizam em tampões de lise que possua 8M de uréia, essa concentração pode contribuir para a precipitação das proteínas durante a diálise <sup>(124)</sup>. Após a lise celular de hSlu7 com tampão contendo 8M de uréia, o extrato proteico precipitou quando mudou-se a concentração do tampão para 1M de uréia durante a diálise.

Mesmo assim, quando realizamos a confirmação por SDS-PAGE da lise utilizando-se o tampão 11 a solubilização de hSlu7 foi incompleta. Ainda que, concentrações elevadas de desnaturantes como a uréia, por exemplo, podem implicar na perda da estrutura original da proteína, portanto não podendo esta ser renaturada, e tornando-a imprópria para a análise estrutural por difração e/ou cristalografia.

Outros agentes utilizados na tentativa de solubilizar a hSlu7 foram os detergentes, estes são largamente utilizados para a solubilização de proteínas, este processo gera micelas que constituem-se de proteínas, lipídeos e detergentes. Este processo pode ser resumido em rompimento das membranas e consequente liberação das nucleoproteínas. O Chaps geralmente é efetivo para a solubilização de proteínas de membrana que tendem a formar corpúsculo de inclusão <sup>(127)</sup>. Quando foi utilizado para a solubilização da hSlu7, em um tampão de lise contendo 1% de Chaps e 8M de uréia, a solubilização não foi significativa, mesmo submetendo a amostra a duas sonicações. Song e colaboradores (2009) <sup>(117)</sup> também utilizou vários detergentes na tentativa de solubilizar a proteína hOR2AG1 e o detergente que foi eficaz para a solubilização da sua proteína foi o *sarkozyl*. Este detergente, é um surfactante iônico, redutor de hidrofobicidade, capaz de interagir com resíduos hidrofóbicos presentes na cadeia peptídica da proteína <sup>(128)</sup>. Também testamos o *sarkozyl* numa concentração de até 2% no tampão de lise, mas a hSlu7 não solubilizou significativamente, Simionatto e colaboradores (2010) <sup>(124)</sup>, corrobora com a ineficiência de *sarkozyl* na solubilização de corpúsculos de inclusão. Além desses, utilizamos SDS, Tween 80, Triton X-100 e NP40, estes tiveram uma ação menor ainda sobre a eficiência

na solubilização da proteína. O melhor resultado que conseguimos para a solubilização de hSlu7 foi quando utilizamos o tampão 11 para a lise celular, mas mesmo assim foi insuficiente a fração solúvel obtida .

Contudo, depois de se conseguir pouca solubilização de hSlu7 tentou-se mesmo assim a purificação por cromatografia de afinidade e a quantidade de proteína que se ligou na coluna cromatográfica foi insuficiente para qualquer análise estrutural, como o dicroísmo e para a cristalografia.

Os resultados obtidos ainda são preliminares e respondem somente a inicial pergunta da interação de hSlu7 com o vírus da YFV. Assim, muitos testes biológicos são necessários a se realizar, para tentar caracterizar a atividade biológica da hSlu7 dentro da célula no momento da replicação viral.

O próximo passo, é realizar experimentos utilizando RNA de interferência em cultura de células BHK-21 contendo um replicon de YFV para avaliar a inexpressão de hSlu7, e assim sugerir seu possível papel biológico dentro da célula durante a replicação de YFV.



## 5. CONCLUSÃO

- ❖ Os resultados obtidos no sistema duplo-híbrido em leveduras sugeriu a interação de hSlu7 com as porções deletantes da RdRp de YFV. O mapeamento da interação de hSlu7 com a RdRp mostrou que a interação proteína-proteína ocorre com as porções inicial e final da RdRp de YFV.
- ❖ Outro experimento que nos remete a possível interação com a hSlu7 foi a imunofluorescência indireta, que após a infecção com YFV, a hSlu7 deixa de se localizar somente no núcleo para obter uma sublocalização citoplasmática, as modificações da localização celular de hSlu7 diante de um quadro infeccioso, sugere a sua interação com o vírus, e se nos basearmos que esta proteína está envolvida no *splicing* alternativo, podemos sugerir que a hSlu7 está envolvida portanto com o metabolismo do RNA viral durante a replicação de YFV.
- ❖ A solubilização de hSlu7 não foi significativa diante dos inúmeros testes realizados. Portanto a caracterização estrutural e análise da atividade proteica, como também produção da proteína em larga escala para novos testes químicos de interação e produção de antígenos não tornou possível de ser estabelecida.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gubler, D.J., Kuno, G., Markoff, L. Flaviviruses. In *Fields Virology*, Fifth Edition, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, and Wilkins), p.1153–1252. 2007.
2. Gould, E.A., Solomon, T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 2008; 371: 500–509.
3. Mackenzie, J.S., Gubler, D.J., Petersen, L.R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* 2004; 10: 98–109.
4. Fernandez-Garcia, M.D., Mazzon, M., Jacobs, M., Amara, A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe* 2009; 101: 318- 328.
5. Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J. et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 2004; 23: 728–738.
6. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 2004; 427: 313–319.
7. Lindenbach, B.D., Thiel, H.J., and Rice, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, Fifth Edition, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, and Wilkins), p.1101–1152. 2007.
8. Young, P.R., Hilditch, P.A., Bletchly, C., Halloran, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 38: 1053–7.

9. Libraty, D.H., Young, P.R., Pickering, D., Endy, T.P., Kalayanarooj, S., Green, S., et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 2002; 186: 1165–8.
10. Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., Flamand, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 376–81.
11. Dussart, P., Labeau, B., Lagathu, G., Louis, P., Nunes, M.R., Rodrigues, S.G., et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 13: 1185–1189.
12. Xu, H., Di, B., Pan, Y.X., Qiu, L.W., Wang, Y.D., Hao, W., et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 2872–2878.
13. Kumarasamy, V., Wahab, A.H., Chua, S.K., Hassan, Z., Chem, Y.K., Mohamad, M., et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J. Virol. Methods* 2007; 140: 75–79.
14. Blacksell, S.D., Mammen, M.P.Jr., Thongpaseuth, S., Gibbons, R.V., Jarman, R.G., Jenjaroen, K., et al. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural

- 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 60: 43–9.
15. McBride, W.J. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 64: 39–44.
16. Zainah, S., Wahab, A.H., Mariam, M., Fauziah, M.K., Khairul, A.H., Roslina, I., et al. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. *J. Virol. Methods* 2009; 155: 157–160.
17. Lima, M.R.Q., Nogueira, R.M., Schatzmayr, H.G., dos Santos, F.B. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4: e738.
18. Lima, M.R.Q., Nogueira, R. M.R., Schatzmayr, H.G., Filippis, A.M.B., Limonta, D., Santos, F.B. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5: e1147.
19. Crill, W.D., Roehrig, J.T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J. Virol.* 2001; 75: 7769-7773.
20. Oliphant, T., Engle, M., Nybakken, G.E., Doane, C., Johnson, S., Huang, L., et al. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat. Med.* 2005; 11: 522-530.

21. Chung, K.M., Nybakken, G.E., Thompson, B.S., Engle, M.J., Marri, A., Fremont, D.H., Diamond, M.S. Antibodies against West Nile Virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc gamma receptor-dependent and - independent mechanisms. *J. Virol.* 2006; 80: 1340-1351.
22. Chung, K.M., Thompson, B.S., Fremont, D.H., Diamond, M.S. Antibody recognition of cell surface-associated NS1 triggers Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis and clearance of West Nile Virus-infected cells. *J. Virol.* 2007; 81: 9551-9555.
23. Sukupolvi-Petty, S., Austin, S.K., Purtha, W.E., Oliphant, T., Nybakken, G.E., Schlesinger, J.J., et al. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J. Virol.* 2007; 81: 12816-12826.
24. Lee, T. H., Song, B. H., Yun, S.I., Woo, H.R., Lee, Y.M., Michael S. Diamond, M.S., Chung, K.M. A cross-protective monoclonal antibody recognizes a novel epitope within the Flavivirus NS1 protein. *JGV Papers in Press* 2011; 10:e1099.
25. Mackenzie, J.M., Jones, M.K., Young, P.R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 1996; 220:232-240.
26. Westaway, E.G., Mackenzie, J.M., Kenney, M.T., Jones, M.K., Khromykh, A.A. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J. Virol.* 1997; 71: 6650-6661.

27. Muylaert, I.R., Galler, R.G., Rice, C.M. Genetic analysis of yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J. Virol.* 1997; 71: 291-298.
28. Lindenbach, B.D., Rice, C.M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.* 1999; 73: 4611-4621.
29. Yoshii, K., Igarashi, M., Ito, K., Kariwa, H., Holbrook, M.R., Takashima, I. Construction of an infectious cDNA clone for Omsk hemorrhagic fever virus, and characterization of mutations in NS2A and NS5. *Virus Research* 2010; 155: 61–68.
30. Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Jones, M.K., Westaway, E.G. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 1998; 245: 203-215.
31. Niyomrattanakit, P., Winoyanuwattikun, P., Chanprapaph, S., Angsuthanasombat, C., Panyim, S., Katzenmeier, G. Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. *J. Virol.* 2004; 78:13708–13716.
32. Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Renatus, M., Kroemer, M., Lim, S.P., et al., Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006; 13:372–373.
33. Melino, S., Fucito, S., Campagna, A., Wrubl, F., Gamarnik, A., Cicero, D.O., et al. The active essential CFNS3d protein complex. *Febs J.* 2006; 273: 3650–3662.

34. Yang, C.C., Hsieh, Y.C., Lee, S.J., Wu, S.H., Liao, C.L., Tsao, C.H., et al. Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55: 229–238.
35. Moreland, N.J., Tay, M.Y.F., 1., Lim, E., Paradkar, P.N., Doan, D.N.P., Yau, Y.H., 2, Shochat, S.G., Vasudevan, S.G. High affinity human antibody fragments to dengue virus non-structural protein 3. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 11: e881.
36. Chambers, T.J., Nestorowicz, A., Amberg, S.M., Rice, C.M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J. Virol.* 1993; 67:6797-6807.
37. Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17:4713-4729.
38. Chen, C.J., Kuo, M.D., Chien, L.J., Hsu, S.L., Wang, Y.M., Lin, J.H. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese Encephalitis virus genomic RNA. *J. Virol.* 1997; 71:3466-3473.
39. Cui, T., Sugrue, R.J., Xu, Q., Lee, A.K., Chan, Y.C., Fu, J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology* 1998; 246: 409-417.

40. McLean, J.E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., Zakeri, Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. No prelo 2011.
41. Miller, S., KAstner, S., Krijnse-Locker, J., Buhler, S., Bartenshlager, R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 8873-8882.
42. Park, J.S., Yang, J.M., Min, M.K. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 267: 581-587.
43. Dunster, L.M., Wang, H., Ryman, K.D., Miller, B.R., Watowich, S.J., Minor, P.D. et al. Molecular and biological changes associated with HeLa cell attenuation of wild-type yellow fever virus. *Virology* 1999; 261: 309-18.
44. Issur, M., Geiss, B.J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA* 2009; 15: 2340–2350.
45. Egloff, M.P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J.L., Canard, B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *Embo. J.* 2002; 21: 2757-68.
46. Ray, D., Shah, A., Tilgner, M., Guo, Y., Zhao, Y., Dong, H., et al. West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. *J. Virol.* 2006; 80: 8362–8370.



47. Yap, T.L., Xu, T., Chen, Y.L., Malet, H., Egloff, M.P., Canard, B., et al. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85 Å resolution. *J. Virol.* 2007; 81: 4753–4765.
48. Geiss, B.J., Thompson, A.A., Andrews, A.J., Sons, R.L., Gari, H.H., Keenan, S.M., et al. Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding. *J. Mol. Biol.* 2009; 385: 1643–1654.
49. Buckley, A., Gaidamovich, S., Turchinskaya, A., Gould, E.A. Monoclonal antibodies identify the NS5 yellow fever virus non-structural protein in the nuclei of infected cells. *J. Gen. Virol* 1992; 73: 1125–1130.
50. Kapoor, M., Zhang, L., Ramachandra, M., Kusukawa, J., Ebner, K.E., Padmanabhan, R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 19100-6.
51. Johansson, M., Brooks, A.J., Jans, D.A., Vasudevan, S.G. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J. Gen. Virol.* 2001; 82: (Pt 4) 735-45.
52. Uchil, P.D., Kumar, A.V.A., Satchidanandam, V. Nuclear localization of Flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* 2006; 80: 5451-64.
53. Brinton, M.A. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002; 56: 371–402.
54. Mackenzie, J.M., Jones, M.K., Westaway, E.G. Markers for trans- Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes

with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J. Virol.* 1999; 73: 9555–9567.

55. Mackenzie, J.M., Westaway, E.G. Assembly and maturation of the Flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J. Virol.* 2001; 75: 10787–10799.
56. Lorenz, I.C., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Allison, S.L., Heinz, F.X., Helenius, A. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* 2003; 77: 4370–4382.
57. Li, L., Lok, S.M., Yu, I.M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J., Rossmann, M.G. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science* 2008; 319: 1830–1834.
58. Yu, I.M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P. R., et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 2008; 319: 1834–1837.
59. Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J., and Heinz, F.X. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 1997; 71: 8475–8481.
60. Garcia-Montalvo, B.M., Medina, F., del Angel, R.M. La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Res.* 2004; 102: 141-50.
61. Yocupicio-Monroy, M., Padmanabhan, R., Medina, F., del Angel, R.M. Mosquito La protein binds to the 3' untranslated region of the positive and negative polarity dengue virus RNAs and relocates to the cytoplasm of infected cells. *Virology* 2007; 357: 29–40.

62. Qing, M., Yang, F., Zhang, B., Zou, G., Robida, J. M., Yuan, Z., et al. Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3226–3235.
63. Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., Fields, S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 9578-82.
64. Phizicky, E.M., Fields, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 1995; 59: 94-123.
65. Badtke, M.P., Cao, F., Travis, J. Combining genetic and biochemical approaches to identify functional molecular contact points. *Biol Proced Online* 2006; 8: 77-86.
66. Ryan, D.P., Matthews, J.M. Protein-protein interactions in human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005; 15: 441-6.
67. Arkin, M. Protein-protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. *Curr Opin Chem Biol.* 2005; 9: 317-24.
68. Janda, M., Ahlquist, P. RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* 1993; 72: 961-70.
69. Lai, M.M. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology* 1988; 244: 1-12.

70. Johnson, C.M., Perez, D.R., French, R., Merrick, W.C., Donis, R.O. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1. *J. Gen. Virol.* 2001; 82: (Pt 12) 2935-43.
71. Houshmand, H., Bergqvist, A. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 309: 695-701.
72. Ali, N., Siddiqui, A. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* 1995; 69: 6367-75.
73. Hahm, B., Kim, Y.K., Kim, J.H., Kim, T.Y., Jang, S.K. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Virol.* 1998; 72: 8782-8.
74. Yocupicio-Monroy, R.M., Medina, F., del Valle, J.R., del Angel, R.M. Cellular proteins from human monocytes bind to dengue 4 virus minus-strand 3' untranslated region RNA. *J. Virol.* 2003; 77: 3067-76.
75. Chua, J.J., Ng, M.M., Chow, V.T. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus Res.* 2004; 102: 151-63.
76. Bronzoni, R.V.M., Madrid, M.C.F.S., Duarte, D.V.B., Pellegrini, V.O.A., Pacca, C.C., Carmo, A.C.V., et al., The small nuclear ribonucleoprotein U1A interacts with NS5 from yellow fever virus. *Arch. Virol.* 2011; 156:931–938.

77. Morais, A.T.S., Duarte, D.V.B., Bronzoni, R.V.M., Madrid, M.C.F.S., Gavioli, A.F., Zanelli, C.F., Valentini, S.R., Rahal, P., Nogueira, M.L. The eIF3L protein interacts with Flavivirus NS5 and is required for Yellow Fever replication. *Biological Chemistry*. No prelo 2011.
78. Chua, K., Reed, R. Human step II splicing factor hSlu7 functions in restructuring the spliceosome between the catalytic steps of splicing. *Genes Dev.* 1999a; 13: 841-850.
79. Frank, D., Guthrie, C. An essential splicing factor, SLU7, mediates 3' splice site choice in yeast. *Genes Dev.* 1992; 6: 2112-2124.
80. Chua, K., Reed, R. The RNA splicing factor hSlu7 is required for correct 3' splice-site choice. *Nature* 1999b; 402: 207-210.
81. Zhang, X., Schwer, B. Functional and physical interaction between the yeast splicing factors Slu7 and Prp18. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 2146-2152.
82. Shomron, N., Reznik, M., Ast, G. Splicing factor hSlu7 contains a unique functional domain required to retain the protein within the nucleus. *Mol. Biol. Cell* 2004; 15: 3782-3795.
83. Shomron, N., Alberstein, M., Reznik, M., Ast, G. Stress alters the subcellular distribution of hSlu7 and thus modulates alternative splicing, *J. Cell Sci.* 2005; 118: 1151–1159.
84. Gorlich, D., Kutay, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1999; 15: 607-660.
85. Van der Houven van Oordt, W., Diaz-Meco, M.T., Lozano, J., Krainer, A.R., Moscat, J., Cáceres, J.F. The Mkk<sub>3/6</sub>-p38–Signaling Cascade Alters the

Subcellular Distribution of Hnrnp A1 and Modulates Alternative Splicing Regulation. *J. Cell Biol.* 2000; 149: 307–316.

86. Xie, J., Lee, J.A., Kress, T.L., Mowry, K.L. Black, D.L. Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 8776-8781.
87. Fields, S., Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340: 245-247.
88. Brent, R., Ptashne, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 1985; 43:729-736.
89. Hope, I.A., Struhl, K. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 1986; 46: 885-894.
90. Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V., Stagljar, I. Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nature Protocols* 2010; 5: 1281-1293.
91. Keegan, L., Gill, G., Ptashne, M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 1986; 231: 699-704.
92. Karimova, G., Ladant, D., Ullmann, A. Two-hybrid systems and their usage in infection biology. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002; 292: 17-25.
93. Domingues, S.F. Caracterização das interações proteicas envolvidas no tráfego celular do transportador de colina de alta afinidade – CTH1 [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.

94. James, P. Yeast two-hybrid vectors and strains. In: MacDonald PN, editor. Two-hybrid systems – Methods and protocols. New Jersey: Humana Press Inc; 2001. p. 41-84.
95. McAlister-Henn, L., Gibson, N., Panisko, E. Applications of the two-hybrid system. *Methods* 1999; 19: 330-337.
96. James, P., Haliaday, J., Craig, E.A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996; 144: 1425-1436.
97. Chung, K.M., Lee, J., Kim, J.E., Song, O.K., Cho, S., Lim, J. et al. Nonstructural protein 5A of hepatitis C virus inhibits the function of karyopherin beta3. *J. Virol.* 2000; 74: 5233-41.
98. Evans, M.J., Rice, C.M., Golf, S.P. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 13038-43.
99. Araújo, M. R. T. Expressão de proteínas recombinantes de vírus do gênero Flavivirus: Aplicação no desenvolvimento de kits de diagnóstico e em estratégias antivirais – [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná - Instituto Carlos Chagas. 2009.
100. Kidd, I.M., Emery, V.C. The use of baculoviruses as expression vectors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1993; 42: 137-159.
101. Walsh, G. *Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology*. London: Wiley, p. 94. 1998.

102. Ndifuna, A.; Waters, A.K.; Zhou, M.; Collisson, E.W. Recombinant nucleocapsid protein is potentially a inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. *J. Virol. Methods* 1998; 70: 37-44.
103. Chen, H., Coote, B., Hiscox, J.A. Evaluation of a nucleoprotein-based enzymelinked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 2003; 32: 519-526.
104. Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Wong, B.H.L., Tsoi, H., Fung, A.M.Y., Kao, R.Y.T. et al. Differential sensitivities of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike polypeptide enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 3054-3058.
105. Lugovskaya, N.N., Scherbakov, A.V., Yakovleva, A.S., Tsyvanyuk, M.A., Mudrak, N.S., Drygin, V.V., et al. Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* 2006; 135: 292-296.
106. Madrid, M.C.F.S. Identificação de interações proteína-proteína entre NS5 de febre amarela e proteínas celulares [dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2007.
107. Ball, L.A. Replication strategies of RNA viruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., editores. *Fields Virology* 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.98-106.



108. Chua, K., Reed, R. An upstream AG determines whether a downstream AG is selected during catalytic step II of splicing. *Molecular and Cellular Biology* 2001; 21: 1509–1514.
109. Mattaj, I.W., Englmeier, L. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67:265–306.
110. Xie, J., Lee, J.A., Kress, T.L., Mowry, K.L. Black, D.L. Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 8776-8781.
111. James, S.A., Turner, W., Schwer, B. How Slu7 and Prp18 cooperate in the second step of yeast pre-mRNA splicing. *RNA* 2002; 8: 1068–1077.
112. Frank, D., Patterson, B., Guthrie, C.. Synthetic lethal mutations suggest interactions between U5 small nuclear RNA and four proteins required for the second step of splicing. *Mol. Cell. Biol.* 1992; 12: 5197–5205.
113. Mitraki, A., King, J. Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Bio Technology* 1989; 7: 690–697.
114. Grisshammer, R., Tate, C. Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q. Rev. Biophys.* 1995; 28: 315– 422.
115. Betts, S., King, J. There's a right way and a wrong way: in vivo and in vitro folding, misfolding and subunit assembly of the P22 tailspike. *Struct. Fold. Des* 1999; 7: 131–139.
116. Kreisberg, J.F., Betts, S.D., Haase-Pettingell, C., King, J. The interdigitated beta-helix domain of the P22 tailspike protein acts as a molecular clamp in trimer stabilization. *Protein Sci.* 2002; 11: 820–830.

117. Song, H.S., Lee, S.H., Oh, E.H., Park, T.H. Expression, solubilization and purification of a human olfactory receptor from *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 2009; 59: 309–314.
118. Przybycien, T.M., Dunn, J.P., Valax, P., Georgiou, G. Secondary structure characterization of  $\beta$ -lactamase inclusion bodies. *Protein Eng.* 1994; 7: 131–136.
119. Umetsu, M., Tsumoto, K., Ashish, K., Nitta, S., Tanaka, Y., Adschiri, T., et al. Structural characteristics and refolding of in vivo aggregated hyperthermophilic archaeon proteins. *FEBS Lett.* 2004; 557: 49–56.
120. Mitraki, A., Hass-Petingell, C., King, J. Mechanism of inclusion body formation in “Protein Refolding” (Georgiou, G., and De Bernardez-Clark, E., Eds.), ACS Symposium Series No. 470, Am. Chem. Soc., Washington, DC. p. 35-49. 1991.
121. Nilsson, I., Heijne, G.V. Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein: role of positively and negatively charged amino acids. *Cell* 1990; 62: 1135–1141.
122. Schein, C.H., Noteborn, M.H.M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* 1988; 229: 533-539.
123. Ren, H., Yu, D., Ge, B., Cook, B., Xu, Z., Zhang, S. High-level production, solubilization and purification of synthetic human GPCR chemokine receptors CCR5, CCR3, CXCR4 and CX3CR1. *Plos one* 2009; 4: 1-15.

124. Simionatto, S., Marchioro, S.C.B., Galli, V., Hartwig, D.D., Carlessi, R.M., Munari, F.M., et al. Cloning and purification of recombinant proteins of mycoplasma hyopneumoniae expressed in Escherichia coli. Protein Expression and Purification 2010; 69: 132-136.
125. Hur, W., Chung, Y.K. On-Line Monitoring of IPTG Induction for Recombinant Protein Production Using an Automatic pH Control Signal. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2005; 10: 304-308.
126. Veessler, D., Blangy, S., Siponen, M., Vincentelli, R., Cambillau, C., Sciara, G. Production and biophysical characterization of the CorA transporter from Methanosarcina mazei. Anal. Biochem. 2009; 388: 115-21.
127. Kim, H., Kim, S.Y., Han, N.S., Tao, B.Y. Solubilization conditions for hydrophobic membrane protein, oleosin, in soybeans. Biotechnol. Bioprocess Eng. 2007; 12: 542–547.
128. Yang, X.A., Dong, X.Y., Li, Y., Wang, Y.D., Chen, W.F. Purification and refolding of a novel cancer/testis antigen BJ-HCC-2 expressed in the inclusion bodies of Escherichia coli. Protein Expr. Purif. 2004; 33: 332-8.