

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNA JULIA PIETROBON

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MUTANTES DA PROTEÍNA NS3_{hel} DO
VÍRUS DA DENGUE E EXPRESSÃO DO DOMÍNIO RdRp DA PROTEÍNA NS5
PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO**

CURITIBA

2014

ANNA JULIA PIETROBON

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE MUTANTES DA PROTEÍNA NS3^{hel} DO
VÍRUS DA DENGUE E EXPRESSÃO DO DOMÍNIO RdRp DA PROTEÍNA NS5
PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO**

Monografia apresentada para obtenção de
título de Bacharel em Biologia pelo curso de
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Daisy Maria Strottmann

Co-orientadores: Dra. Cláudia N. D. dos Santos

Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, de modo especial a meus pais Antonio Pietrobon e Mary Terezinha Cantarelli Pietrobon, por serem exemplos de pessoas íntegras e batalhadoras. À minha irmã Marina Pietrobon, minha melhor amiga e companheira. Obrigada pelo amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado, Emilio Eduardo Tressoldi Moreira, pela paciência, ajuda e apoio.

À minha orientadora Daisy Maria Strottmann pela importante contribuição em minha formação científica, todo ensinamento ao longo do meu estágio e pela sua amizade.

À minha co-orientadora Claudia Nunes Duarte dos Santos por me receber em seu grupo de pesquisa e pela colaboração durante o desenvolvimento do projeto.

Ao meu co-orientador Silvio Marques Zanata pela ajuda e disponibilidade que permitiram que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos colegas do Lab Viromol, Ana Luiza, Andrea, Andreia, Camila, Carol, Diogo, Giovanni, Guilherme, Juliano, Leonardo, Ligia, Lorena, Mateus, Paula, Pryscilla, Sandra, Sharon, Sibelle, Taissa e Thaisa, pela amizade e pelos momentos de descontração que tornavam o ambiente de trabalho mais divertido e pela motivação nos momentos de frustração.

Aos meus colegas do curso de Biologia, de maneira muito especial às minhas queridas amigas Anna Cecília, Carol Ahrens, Carol Dagostim e Tayana. A faculdade não seria a mesma se vocês não estivessem ao meu lado pra darmos risada de quase tudo, principalmente da Carol A.

Aos professores do curso de Biologia da UFPR que contribuíram para minha formação como bióloga.

À Rosane, secretária do curso de Biologia da UFPR, por toda dedicação ao curso e aos alunos e pela ajuda em incontáveis momentos ao longo de toda a minha graduação.

Aos membros da banca Dra. Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza, Dr. Silvio Marques Zanata e Dr. Emanuel Maltempi de Souza por terem aceito nosso convite e terem se disponibilizado para corrigir o trabalho escrito.

Ao Cnpq pelo apoio financeiro para a realização desse projeto e pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação enquanto biologia e aqueles que contribuíram para a realização desse projeto.

Anna Julia Pietrobon

*“Quando tudo nos parece dar errado
Acontecem coisas boas
Que não teriam acontecido
Se tudo tivesse dado certo”*

Renato Russo

RESUMO

A dengue atualmente constitui um dos principais problemas de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais. Apesar dos grandes avanços dos últimos anos para o entendimento da biologia do vírus da dengue (DENV), a patogenia da doença continua sendo um grande desafio. Estudos de infecção em modelo murino identificaram variantes de alta virulência em dengue vírus tipo 1 (DENV-1) que apresentam mutações nas proteínas E e NS3. As mutações na proteína NS3 encontram-se nos resíduos Val₂₀₉Ile, Leu₄₃₅Ser e Leu₄₈₀Ser do domínio helicase. Recentemente, estudos do nosso grupo demonstraram que as mutações Leu₄₃₅Ser e Leu₄₈₀Ser aumentam a capacidade replicativa do DENV-1 *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, enquanto a mutação Val₂₀₉Ile parece não alterar a atividade biológica do vírus. Os mecanismos pelos quais as mutações modulam a virulência do vírus ainda não foram completamente compreendidos. A proteína NS3 é uma proteína multifuncional que, juntamente com a proteína NS5, desempenha papel crítico durante a replicação do genoma viral. Buscando um melhor entendimento dos mecanismos funcionais relacionados às mutações, o presente estudo visou expressar e purificar as proteínas NS3hel parental do DENV-1 e suas variantes a fim de avaliar o efeito das mutações pontuais na atividade de ATPase da proteína. Além disso, procuramos expressar o domínio NS5RdRp da proteína NS5 para estudos futuros de interação com a proteína NS3hel. Nossos dados revelam que as mutações em estudo conferem maior afinidade da proteína pelo substrato e maior eficiência catalítica quando comparadas com a proteína parental. Os resultados sugerem ainda que a atividade helicase da proteína NS3hel é estimulada pela molécula de dupla fita de RNA. Pelos métodos empregados neste estudo, não foi possível expressar de forma funcional a proteína recombinante NS5RdRp. No entanto, sob condições desnaturantes a proteína foi purificada e poderá ser utilizada para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, que contribuirão para estudos futuros. Os dados obtidos sobre a atividade ATPase da proteína NS3hel são indicativos de que mutações pontuais podem modular a eficiência catalítica da enzima e modificar a aptidão viral para suportar a infecção do DENV-1 em diferentes modelos de estudo. Tais informações são importantes para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da dengue, os quais são fundamentais no contexto de produção de vacinas efetivas e delineamento de estratégias antivirais.

Palavras-chave: Vírus da dengue (DENV). Proteína não estrutural 3 (NS3). Atividade ATPase. Proteína não estrutural 5 (NS5).

ABSTRACT

Dengue consists in one of the main public health problems in tropical and subtropical regions. Despite the great advances in the last years of the understanding of the dengue virus (DENV) biology, the pathogenesis of the disease continues being a big challenge. Studies of infection in mice identified variants of high virulence in dengue virus 1 (DENV-1) that present mutations in the proteins E and NS3. The mutations in the NS3 proteins are localized on residues Val₂₀₉Ile, Leu₄₃₅Ser and Leu₄₈₀Ser in the helicase domain. Recently, studies from our group have shown that mutations Leu₄₃₅Ser and Leu₄₈₀Ser increase the replication ability of DENV-1 *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo*, while mutation Val₂₀₉Ile does not change the biological activity of the virus. The mechanisms whereby those mutations modulate the virulence of the virus are not yet comprehended. Protein NS3 is a multifunctional protein that, with protein NS5, plays a critical role during the replication of viral genome. Seeking a better understanding of the functional mechanisms related with those mutations, this study goal was to express and purify the NS3^{hel} parental protein and its variants, to evaluate the effect of those punctual mutations in the ATPase activity of the protein. We also tried to express the RdRp domains of the NS5 protein for future studies of interaction with the NS3^{hel} protein. Our data showed that the mutations studied enhance the affinity of the protein to the substrate and catalytic efficiency when compared to the parental protein. The results also suggest that helicase activity of the NS3^{hel} protein is stimulated by double stranded RNA. By the methodology used in this study, it was not possible to express the functional NS5RdRp recombinant protein. However, under denaturing conditions the protein was purified and may be used for developing monoclonal antibodies that will contribute for future studies. Data obtained on the ATPase activity of NS3^{hel} protein indicates that punctual mutations can modulate the catalytic efficiency of the enzyme and modify the viral fitness to support the infection of DENV-1 in different models of study. Such information is important to the understanding of the molecular mechanisms involved in dengue pathogenesis, which are fundamental to obtain effective vaccines and design antiviral strategies.

Keywords: Dengue virus (DENV). Non-structural protein 3 (NS3). ATPase activity. Non-structural protein 5 (NS5).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Países com risco de transmissão de dengue no ano de 2011	11
Figura 2 - Número de casos de dengue reportados anualmente à WHO.....	12
Figura 3 - Organização estrutural e composição do DENV	14
Figura 4 - Ciclo de replicação do DENV	16
Figura 5 - Estrutura cristalográfica das proteínas NS3hel e NS5RdRp de DENV	18
Figura 6 - Modelo de replicação do RNA de flavivírus pela formação do complexo replicativo.	19
Figura 7- Localização das mutações nos resíduos 209, 435 e 480 no domínio helicase da proteína NS3	20
Figura 8 - Esquema de vetor de expressão contendo o inserto de interesse.....	27
Figura 9 - Perfil da purificação das proteínas recombinantes NS3hel do DENV-1 e suas variantes mutantes.....	33
Figura 10 - Quantificação da hidrólise de ATP pelas proteínas NS3hel	35
Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do vetor de clonagem, produto de amplificação por PCR e clone	36
Figura 12 - Análise da expressão da proteína NS5RdRp em sistema procarioto em gel SDS-PAGE 13%.....	37
Figura 13 - Testes de purificação por afinidade da proteína NS5RdRp ao níquel, feitos em bancada.	39
Figura 14 - Purificação proteína NS5RdRp por afinidade à coluna de níquel em cromatógrafo tipo ÄKTA.	40
Figura 15 - Teste de ligação proteína NS5RdRp em resina.....	41
Figura 16 - Purificação da proteína NS5RdRp por troca iônica em resina de heparina	42
Figura 17 - Purificação da proteína NS5RdRp por afinidade ao níquel a partir de corpúsculos de inclusão	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP - adenosina trifosfato
AUG - códon de início de codificação de proteína
C - proteína de capsídeo
C6/36 - linhagem celular de glândula salivar de mosquito *Aedes albopictus*
CD19 - Cluster of Differentiation 19
cDNA - DNA complementar
CS - sequência conservada
DC-SING - molécula não integrina captadora da molécula de adesão intercelular 3 específica de célula dentrítica
DENV - vírus da dengue
DENV-1-5 - vírus da dengue sorotipos 1, 2, 3, 4 e 5
DNA - ácido desoxirribonucleico
DO - densidade ótica
dsRNA - RNA fita dupla
E - proteína de envelope do vírus da dengue
FGA/89 - cepa de DENV- isolada na Guiana Francesa
FGA/NA a5c/d1d/P6 - isolados neuroadaptado da cepa FGA/89
FPLC - cromatografia líquida e rápida de proteínas (do inglês *Fast Protein Liquid Chromatography*)
GenBank - base de dados de sequências de livre acesso produzida pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)
IPTG - isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside
Kb - quilobase
Kcat - constante catalítica
kDa - quilodaltons
Km - constante de Michaelis-Menten
M - proteína de membrana
NS - proteína não estrutural
NTPase - nucleosídeo trifosfatase
ORF - quadro de leitura aberto (do inglês, *open read frame*)
PCR - reação em cadeia da polimerase
pH - potencial de hidrogênio
Pi - fosfato inorgânico
prM - proteína pré-membrana
psi - unidade de pressão (pound force per square inch)
RdRp - RNA polimerase dependente de RNA
RE - retículo endoplasmático
RNA - ácido ribonucleico
RT/PCR - transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
UAR - região à montante ao AUG (do inglês, *Upstream of AUG Region*)
UTR - região não traduzida do genoma (do inglês, *untranslated region*)
WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DENGUE	11
1.2 VÍRUS	13
1.2.1 Ciclo replicativo	14
1.2.2 Complexo replicativo e as proteínas NS3 e NS5	17
1.2.3 Marcadores de virulência	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA NS3hel E SUAS VARIANTES MUTADAS	23
3.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ATPase	24
3.3 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA NS5RdRp	25
3.3.1 Amplificação e clonagem da sequência de interesse	25
3.3.2 Testes de expressão da proteína NS5RdRp em sistema procaríoto	28
3.3.3 Purificação da proteína NS5RdRp por cromatografia	30
3.3.4 Espectrometria de massas	31
3.3.5 Purificação da proteína NS5RdRp a partir de corpúsculos de inclusão	31
4 RESULTADOS	33
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NS3hel	33
4.2 ATIVIDADE ATPase	33
4.3 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA NS5RdRp	35
4.3.1 Clonagem e testes de expressão da proteína NS5RdRp	35
4.3.2 Purificação da proteína NS5RdRp	38
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	49
7 PERSPECTIVAS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DENGUE

A dengue é a doença viral com transmissão vetorial com maior potencial epidêmico no mundo. Segundo o Relatório de Doenças Negligenciadas da *World Health Organization* - WHO (2013), a distribuição geográfica da dengue alcançou mais de 125 países no ano de 2012 e cerca de 3,6 bilhões de pessoas encontram-se sob risco da doença (WILDER-SMITH *et al.*, 2012). O perfil de ocorrência desta arbovirose se concentra nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 1), principalmente devido às condições climáticas propícias para a reprodução do vetor da doença, os mosquitos do gênero *Aedes*.

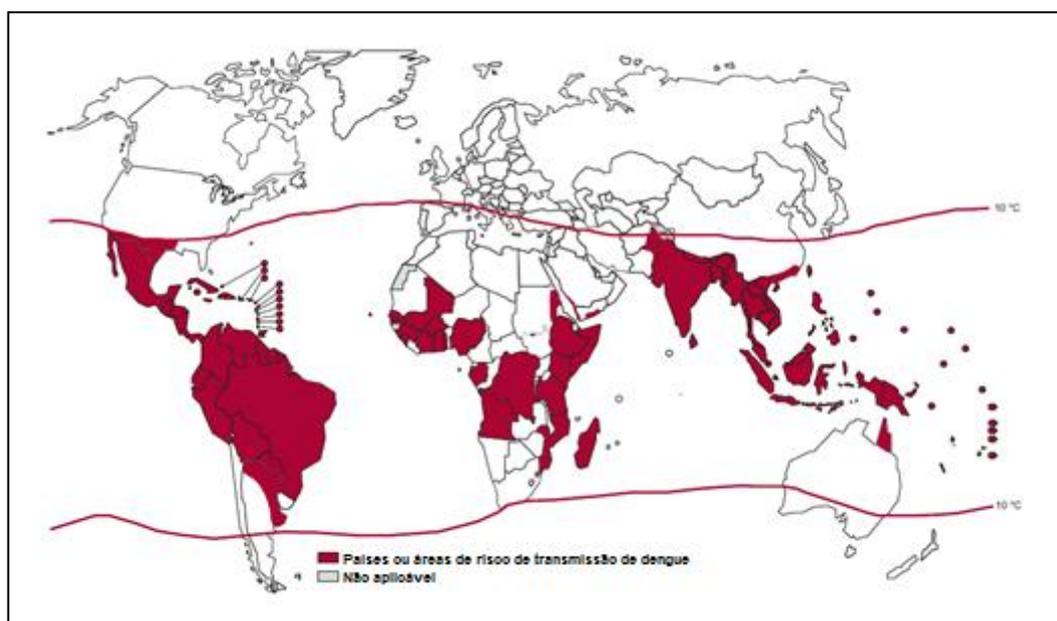


Figura 1 - Países com risco de transmissão de dengue no ano de 2011. Adaptado de WHO 2013.

O primeiro relato de epidemia de dengue ocorreu na África do Sul em 1926 com mais de 40.000 pessoas acometidas (KOKERNOT *et al.*, 1956), de onde se espalhou para outros países e continentes. Nos últimos anos a incidência de casos da doença no mundo aumentou cerca de 30 vezes, alcançando novas barreiras geográficas (WHO, 2014). No Brasil, os primeiros relatos desta arbovirose datam de

1846 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). No entanto, foi a partir de 1986 que a dengue adquiriu importância epidemiológica, disseminando-se rapidamente do estado do Rio de Janeiro para outras regiões do país. Nos últimos anos, a doença, que está presente em praticamente todo território nacional, tem sido objeto de inúmeras campanhas de informação e mobilização social na tentativa de impedir o estabelecimento de novas epidemias.

O vírus da dengue (DENV) é transmitido ao homem pela picada de fêmeas infectadas do mosquito vetor. *Aedes aegypti* é considerado o principal agente transmissor do vírus devido ao seu hábito urbano, mas a espécie *Aedes albopictus* também apresenta essa capacidade de transmissão, sendo considerado o principal vetor de transmissão do vírus na África (EFFLER *et al.*, 2005; KAMGANG *et al.*, 2011). Entre os possíveis motivos apontados como responsáveis pelo aumento do número de casos da doença nos últimos anos (Figura 2) está o crescimento descontrolado da população mundial e a consequente dispersão geográfica do mosquito vetor, o que aumenta a incidência de indivíduos vivendo em áreas de risco de infecção pelo DENV (WILDER-SMITH; GUBLER, 2008).

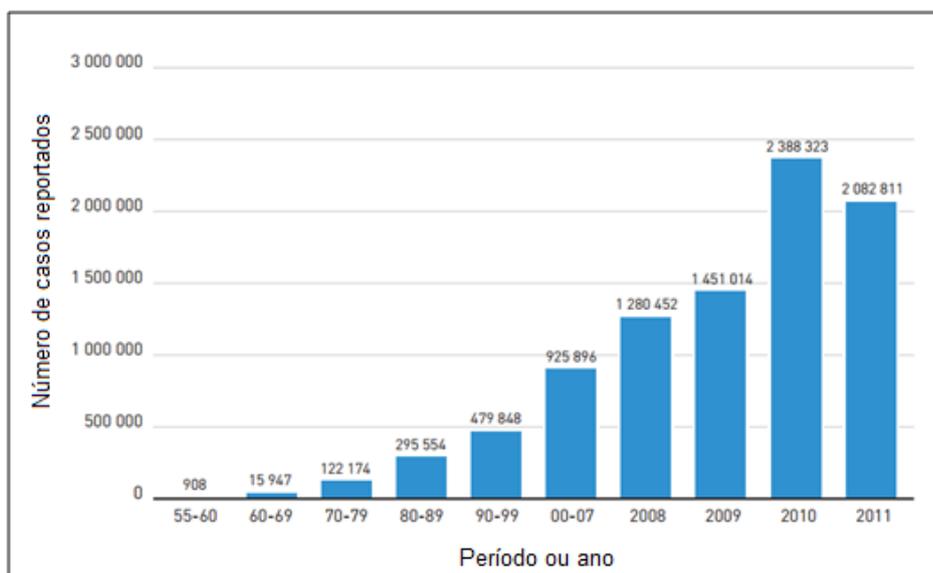


Figura 2 - Número de casos de dengue reportados anualmente à WHO.
Fonte: WHO 2014.

Uma vez que um indivíduo foi picado por um mosquito fêmea infectado com o vírus, inicia-se um período de incubação que pode durar de 3 a 14 dias, após o qual a pessoa pode ou não apresentar febre aguda acompanhada de diversos

sintomas e sinais não específicos. Durante este período, que pode durar de 2 a 10 dias, o DENV pode circular no sangue periférico. Caso outro mosquito se alimente do sangue de uma pessoa doente neste período, este poderá tornar-se infectado e após 8 a 12 dias estará apto a transmitir o vírus para outras pessoas, completando o ciclo de transmissão (GUBLER, 1998).

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV pode causar no hospedeiro humano uma doença que varia desde manifestações clínicas amenas (dengue sem sinais de alarme), dengue com sinais de alarme até dengue grave, que pode evoluir para o óbito (WHO, 2009). A complexidade da patogenia da dengue ainda é pouco compreendida, no entanto, estudos demonstram que a gravidade da doença está atrelada a uma série de fatores que envolvem principalmente o perfil genético, co-morbidades pré-existentes, resposta imunológica do hospedeiro à infecção, hiperendemicidade e fatores virais (WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

1.2 VÍRUS

O DENV é um membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, e pode ser encontrado na forma de quatro sorotipos bastante conhecidos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) (WHO, 2013). O genoma viral é composto por uma única molécula de RNA fita simples de polaridade positiva de aproximadamente 11 quilobases (Kb). Em sua extremidade 5' o RNA apresenta uma estrutura em *cap*, que confere maior estabilidade à molécula e promove seu reconhecimento pelos ribossomos da célula hospedeira (CHIU; KINNEY; DREHER, 2005). Tanto na região 5' do RNA viral, quanto na região 3', estão localizadas sequências nucleotídicas não traduzidas (UTRs) com tamanho aproximado de 100 nucleotídeos na extremidade 5' e 450 nucleotídeos na extremidade 3'. Essas UTRs possuem elementos importantes para a tradução, replicação e formação da estrutura secundária do RNA e flanqueiam a porção codificadora do genoma como mostrado na Figura 3B.

O RNA viral apresenta uma fase de leitura aberta (*open reading frame* - ORF) que codifica para uma poliproteína que é clivada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira, gerando três proteínas estruturais (capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E)) que são responsáveis pela

formação da partícula viral (Figura 3A) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) que em geral estão relacionadas com a replicação, montagem da partícula viral, rearranjo das membranas internas e a evasão da resposta imunológica do hospedeiro (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH *et al.*, 2007). A partícula viral infecciosa é constituída por uma única molécula de RNA associada a proteínas de capsídeo, de membrana (M) e por um envelope glicoproteico, composto pelas proteínas E e lipídeos derivados da célula hospedeira.

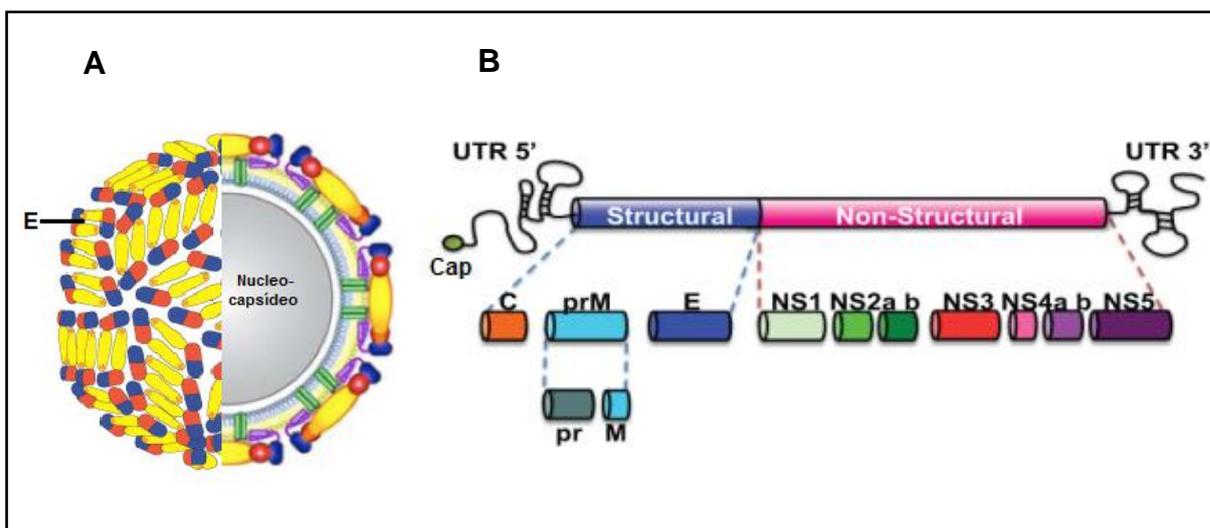


Figura 3 - Organização estrutural e composição do DENV. A. Representação da partícula viral indicando sua organização estrutural externa e interna. B. Genoma no DENV com destaque para a estrutura em *cap*, as UTRs e a região codificadora da poliproteína. Adaptado de Modis *et al.*, 2004; Stiasny *et al.*, 2011; Angel; Valle, 2013.

1.2.1 Ciclo replicativo

A internalização do vírus na célula hospedeira ocorre através da ligação de baixa afinidade entre a proteína E e receptores e co-receptores de superfície celular, dos quais podemos citar o heparan sulfato, DC-SING, CD19 e HSP70/90, seguida de endocitose mediada por clatrina (ALEN; SCHOLS, 2012). O baixo pH do endossomo tardio (pH aproximadamente 6,0) promove alterações conformacionais na proteína E que desencadeiam a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando, assim, o nucleocapsídeo no citoplasma (Figura 4). O RNA, quando dissociado das proteínas de capsídeo, é traduzido pela maquinaria celular

em uma poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos, que é clivada pela ação de proteínas celulares e do complexo NS2B/NS3.

A replicação do material genético ocorre associada à membrana do retículo endoplasmático, onde há a interação entre as proteínas não estruturais e formação do complexo replicativo. Esse processo tem início na região 3' UTR do RNA com a ligação do domínio RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) da proteína NS5, o qual produz uma fita complementar de polaridade negativa que servirá como molde para a geração de novas cópias de RNA genômico.

O RNA recém sintetizado se associa com proteínas do capsídeo, formando o nucleocapsídeo, que é envelopado pelas glicoproteínas prM e E para montagem das partículas imaturas que brotam do retículo endoplasmático. Estas são então transportadas através da rota secretória do complexo de Golgi, onde a partícula viral sofre a ação de furinas celulares que clivam a proteína prM em proteína M (que permanece ligada ao vírus) e peptídeo "pr" (que se desvincula), dando origem à partícula madura e infecciosa. A partícula madura é então liberada por meio de exocitose.

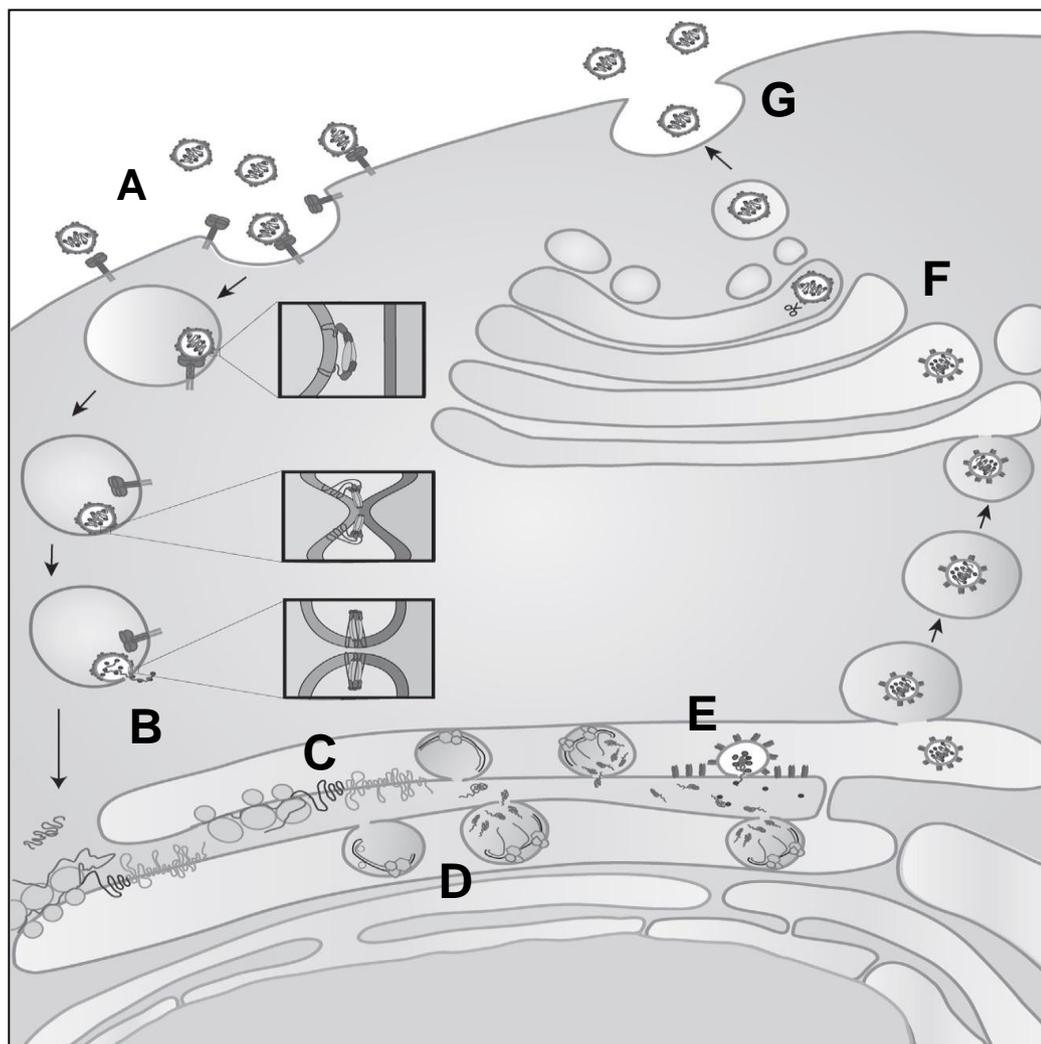


Figura 4 - Ciclo de replicação do DENV. O vírus entra na célula por endocitose mediada por receptores (A), resultando na liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (B). O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteínas virais e da célula hospedeira (C), e, em seguida, replicado via uma fita de RNA negativo intermediária que serve como molde para a produção de RNA genômico (D). As partículas virais são montadas nas membranas do retículo endoplasmático (E), sofrem maturação (F) e são transportadas através da via secretória da célula hospedeira e liberadas por exocitose (G). Adaptado de Acosta; Kumar; Bartenschlager, 2014.

Intensas pressões de seleção associadas à elevada taxa de erro da polimerase viral durante a replicação (10^{-3} a 10^{-5} /nucleotídeo/ciclo), contribuem para a geração de mutações que se fixam na população de vírus e geram variabilidade genética. Esse fenômeno pode promover alterações na capacidade infectiva e replicativa dos vírus, resultando em fenótipos com virulência distinta.

1.2.2 Complexo replicativo e as proteínas NS3 e NS5

Durante a replicação do RNA viral, as proteínas NS3 e NS5 desempenham funções de destaque e fundamentais para a geração da progênie. Essas proteínas interagem entre si e com outras proteínas virais para formar o complexo replicativo (CHAMBERS; MONATH, 2003).

A proteína NS5 é a maior das dez proteínas dos flavivírus e apresenta múltiplos domínios, dos quais pelo menos dois estão envolvidos no ciclo replicativo. A região amino-terminal da proteína constitui uma metiltransferase e está envolvida na reação de adição da estrutura em *cap* (5' m⁷GpppG) ao RNA viral, enquanto, a região carboxi-terminal apresenta atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Ambos os domínios, metiltransferase e RNA polimerase, já tiveram suas estruturas cristalográficas determinadas para DENV (EGLOFF *et al.*, 2002; YAP *et al.*, 2007). A região entre os resíduos de aminoácidos 320 a 368 apresenta considerável grau de conservação entre os flavivírus e está envolvida na interação com a proteína NS3 (KAPOOR *et al.*, 1995; JOHANSSON *et al.*, 2001). Além disso, Pryor *et al.* (2007) e Perera; Kuhn (2008) mostraram que a proteína NS5 pode ser encontrada dentro do núcleo da célula hospedeira, mas o papel dessa proteína no núcleo ainda é incerto.

A proteína NS3, por sua vez, apresenta em sua região amino-terminal um domínio serino-protease que requer a associação da proteína NS2B para catalisar clivagens de várias proteínas virais (Figura 5A) (ARIAS; PREUGSCHAT; STRAUSS, 1993). A região carboxi-terminal da proteína apresenta atividades de nucleosídeo 5'-trifosfatase (NTPase), RNA trifosfatase (RTPase) e helicase (BENARROCH *et al.*, 2004). O domínio helicase é constituído pelos subdomínios I, II e III. Sugere-se que o terceiro subdomínio do domínio helicase seja a região responsável pela interação com a proteína NS5 (JOHANSSON *et al.*, 2001), enquanto os subdomínios I e II apresentam motivos conservados que estão envolvidos na ligação da proteína ao RNA e na hidrólise da molécula de ATP (FAIRMAN-WILLIAMS; GUENTHER; JANKOWSKY, 2010; PYLE, 2008). Durante a replicação do RNA, a NS3 utiliza a energia gerada pela clivagem do ATP para desempenhar a sua função de helicase e

separar a dupla fita de RNA (YON *et al.*, 2005) para que a polimerase possa desempenhar a sua função.

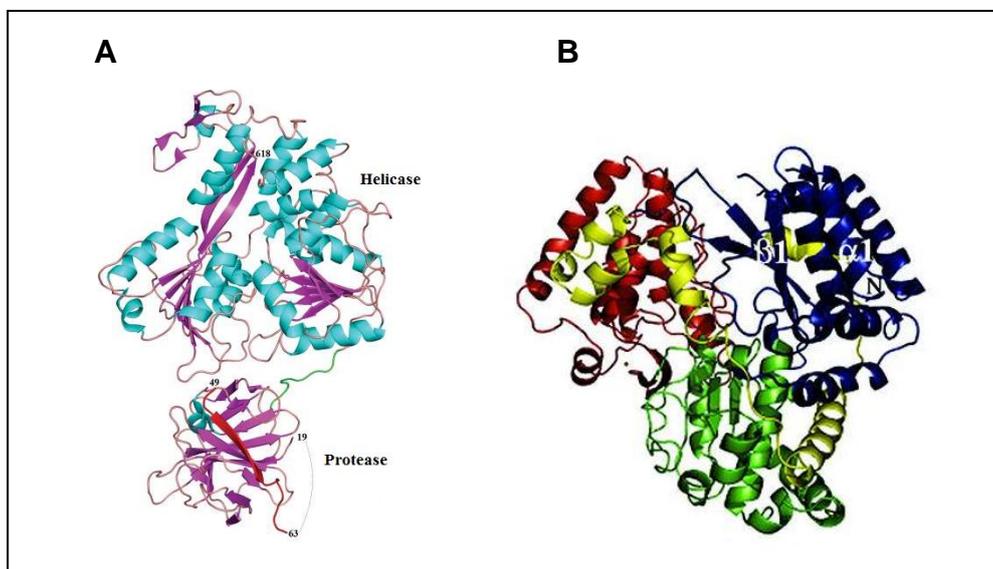


Figura 5 - Estrutura cristalográfica das proteínas NS3hel e NS5RdRp de DENV. A. Estrutura da proteína NS3 de DENV-4 com os domínios helicase e protease (LUO *et al.*, 2010). B. Estrutura do domínio RNA polimerase dependente de RNA da proteína NS5 de DENV-3. Os subdomínios estão representados da seguinte forma: “dedos” em azul, sequências de localização nuclear em amarelo, “palma” em verde e “polegar” em vermelho (YAP *et al.*, 2007).

Após a tradução e processamento da poliproteína do vírus, a proteína NS3 interage com a região N-terminal da proteína NS5, e ambas movem-se em direção a membrana do retículo endoplasmático (RE). A proteína NS5 interage com regiões específicas das UTRs 3' e 5' do genoma viral circular, como mostra a Figura 6-2 (YOU *et al.*, 2001). A conformação circular do RNA viral ocorre pela associação de sequências complementares presentes nas regiões 3' UTR e 5' UTR, denominadas de sequências de ciclização. A interação com as demais proteínas não estruturais presentes na membrana do RE (NS1, NS2A, NS4A) promove a formação do complexo replicativo e início da síntese de uma fita complementar de RNA de polaridade negativa no sentido 5' – 3' (CHAMBERS; MONATH, 2003). A dupla fita de RNA formada servirá como molde para a geração de uma fita de polaridade positiva que irá compor o genoma da progênie. Essa molécula é capeada pela ação das proteínas NS3 e NS5 e será envolta pelo nucleocapsídeo e envelope viral.

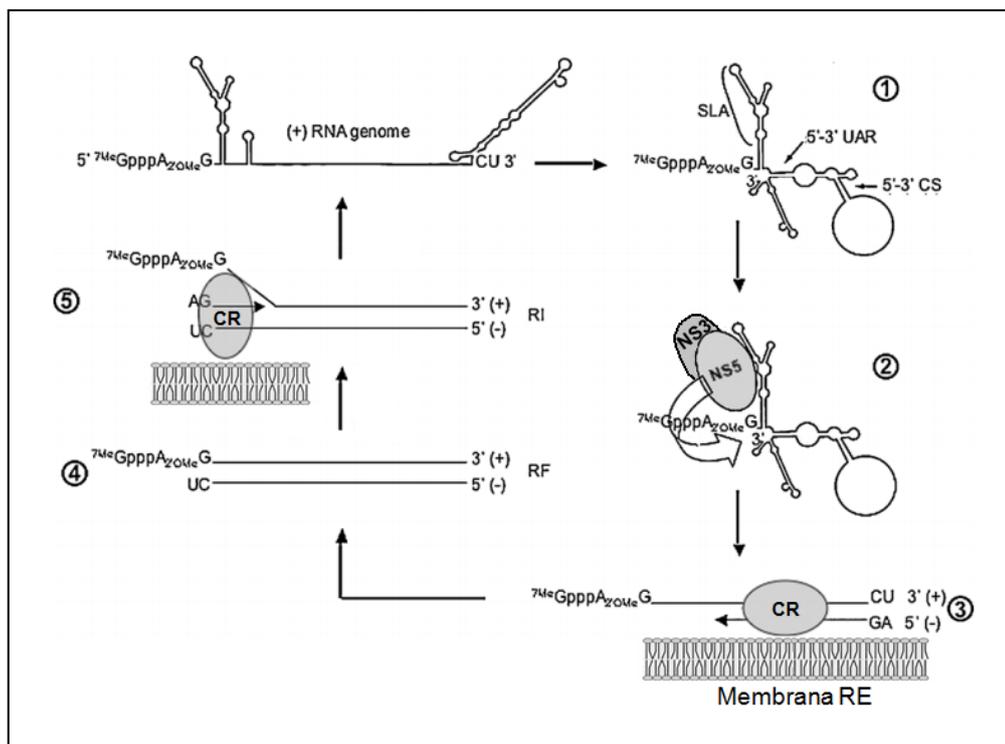


Figura 6 - Modelo de replicação do RNA de flavivírus pela formação do complexo replicativo. RNA genômico (+) com a estrutura em *cap* é circularizado (1) pelas interações entre sequências complementares localizadas nas extremidades 5' e 3' denominadas UAR (Upstream of AUG Region) e CS (complementary sequences). Domínio RdRp da NS5 liga-se especificamente ao promotor *stem loop* A (SLA) na extremidade 5' do genoma e inicia a síntese de RNA *de novo* usando a região 3' como modelo (2). Com a formação do complexo replicativo (CR), a proteína NS5RdRp sintetiza a fita complementar de polaridade negativa. O RNA dupla fita (forma replicativa - RF), consistindo na fita de RNA genômico anelada à fita negativa sintetizada (4) serve como modelo para a síntese de um novo RNA genômico (+), na forma replicativa intermediária (5). Adaptado de Malet *et al.*, (2008).

1.2.3 Marcadores de virulência

Buscando compreender melhor a patogenia da dengue, Desprès *et al.* (1998) desenvolveram um trabalho de neuroadaptação do DENV-1, cepa FGA/89, em modelo murino. Neste estudo o vírus foi inoculado no sistema nervoso central de camundongos neonatos com infecções alternadas em linhagem celular de mosquito AP61, por seis passagens, gerando duas variantes altamente neurovirulentas (FGA/NA d1d e FGA/NA a5c). O sequenciamento da cepa FGA/NA d1d apontou, concomitantemente, mutações na proteína E nos resíduos MetE₁₉₆Val, ValE₃₆₅Ile e ThrE₄₀₅Ile além de uma mutação no domínio helicase da NS3 LeuNS3₄₃₅Ser

(SANTOS *et al.*, 2000). Posteriormente, Bordignon *et al.* (2007), também realizando uma neuroadaptação da cepa FGA/89 apenas em modelo murino encontraram mutações nas proteínas E (resíduo Phe_{E402}Leu) e NS3 (resíduos Val_{NS3209}Ile e Leu_{NS3480}Ser) na cepa gerada, FGA/NA P6 (Figura 7). Essa nova variante viral também apresentou maior neurovirulência e maior replicação viral *in vivo* e *in vitro* quando comparada com a cepa parental.

Recentemente, estudos do nosso grupo demonstraram que mutações pontuais no domínio helicase da NS3 (Leu_{NS3435}Ser e Leu_{NS3480}Ser) foram capazes de aumentar a habilidade replicativa e virulência do DENV-1 em modelo murino (Borba *et al.*, 2012) e em modelo de infecção de células dendríticas derivadas de monócitos humanos (mdDCs) (STROTTMANN, 2013 - artigo em preparação). Porém, o mecanismo pelo qual essas mutações modulam a replicação do DENV-1 e favorecem a patogênese viral não foram completamente esclarecidos.

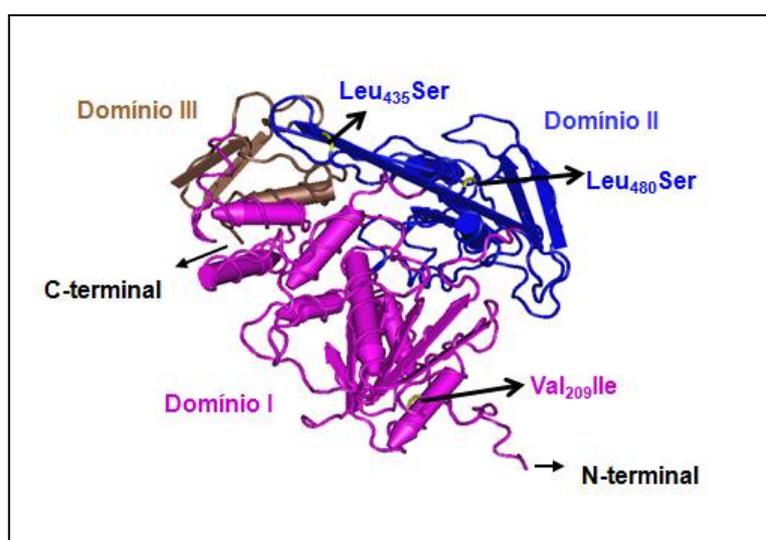


Figura 7- Localização das mutações nos resíduos 209, 435 e 480 no domínio helicase da proteína NS3. Fonte: Strottmann, 2008.

Estudos recentes sugerem que as proteínas NS3 e NS5 podem cooperar na formação do complexo replicativo e assegurar a amplificação eficiente do genoma viral (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012). Além disso, há evidências que a interação entre essas proteínas possa estimular a atividade NTPase e RTPase da NS3 (CUI *et al.*, 1998; YON *et al.*, 2005).

Diante deste cenário, o presente estudo visa elucidar o papel das mutações identificadas no domínio helicase da proteína NS3 (NS3hel) do DENV-1 nas

atividades enzimáticas da proteína. Sabendo também da íntima interação entre os domínios helicase e RdRp das proteínas NS3 e NS5, visamos investigar possíveis modulações das atividades enzimáticas da proteína NS3hel na presença do domínio RdRp. Devido ao crítico papel na replicação viral e processamento da poliproteína, as proteínas NS3 e NS5 constituem um alvo promissor para terapias antivirais. Dessa forma, um melhor entendimento sobre o funcionamento dessas importantes proteínas poderá contribuir para o delineamento de estratégias para o controle da infecção viral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Expressar e purificar o domínio helicase da proteína NS3 de DENV-1 e suas variantes para estudos comparativos de atividade enzimática e de interação com o domínio RNA polimerase dependente de RNA da proteína NS5

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar o domínio helicase das variantes da proteína NS3 (NS3hel) do DENV-1 (NS3 FGA/89, NS3200Mut, NS3209Mut, NS3435Mut e NS3480Mut);
- Clonar a sequência que codifica para o domínio RdRp da proteína NS5 (NS5RdRp) do DENV-1;
- Expressar e purificar o domínio RdRp da proteína NS5;
- Avaliar comparativamente a atividade funcional de ATPase das variantes da proteína NS3 na presença ou ausência da proteína NS5RdRp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA NS3hel E SUAS VARIANTES MUTADAS

A produção de clones recombinantes no vetor pET28a contendo a sequência da proteína NS3hel da cepa parental FGA/89 foi realizada por Strottmann (2013) e suas variantes mutadas (NS3hel200mut, NS3hel209mut, NS3hel435mut, NS3hel480mut) foram obtidas por mutagênese sítio dirigida, utilizando o kit Quick Change Site Directed (Stratagene). A expressão das proteínas seguiu o protocolo padronizado anteriormente (STROTTMANN, 2013), em que bactérias Rosetta-gami 2 (DE3) (Novagen) contendo os clones de interesse foram crescidas em 20 mL de meio LB com os antibióticos de seleção (25 µg/mL canamicina, 34 µg/mL cloranfenicol, 12,5 µg/mL tetraciclina e 34 µg/mL estreptomicina) a 30°C sob agitação constante (200 rpm) por 16 horas. Posteriormente fez-se uma diluição 1:10 da cultura em 180 mL de meio contendo antibióticos que também permaneceu sob agitação a 30°C por 16 horas. Fez-se então uma nova diluição em um volume final de 2 L de cultura que foi mantido a 30°C até atingir densidade óptica (DO) de 0,6 em 600 nm. Neste momento, a expressão das proteínas foi induzida com 0,4 mM de isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside (IPTG) (Roche). As bactérias permaneceram sob agitação a 30°C por 5 horas e, em seguida, foram centrifugadas a 12.000 rpm 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi armazenado a -20°C.

Para a purificação das proteínas na forma solúvel, o precipitado de bactérias foi ressuspenso em 30 mL de tampão de lise (50 mM fosfato pH 7,4, 300 mM NaCl e 10 mM imidazol) e lisado em microfluidificador modelo M-110L (Microfluidics) a uma pressão de 18.000 psi por 10 ciclos. Em seguida, esse extrato foi centrifugado a 30.000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para tubos de centrífuga contendo sulfato de estreptomicina 1% (concentração final) e centrifugado novamente a 50.000 g por 20 minutos a 4°C. Esse procedimento possibilita a precipitação de ácidos nucleicos e moléculas complexadas. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm e utilizado para purificação em *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC).

A purificação das proteínas foi realizada por afinidade da cauda de hexa-histidina (6xHis), co-expressa na porção N-terminal da proteína, à coluna de níquel (Ni^{2+}) (GE) utilizando o sistema de cromatografia FPLC ÄKTA prime (GE). A coluna foi equilibrada com cinco volumes de tampão de lise antes da injeção da amostra. As proteínas foram eluídas em tampão de eluição (50 mM fosfato pH 7,4, 300 mM NaCl e 500 mM imidazol), coletadas e armazenadas a -20°C em 28% de glicerol. A qualidade da purificação foi avaliada em gel dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliácridamida (PAGE) 13%. Uma segunda purificação, também em cromatógrafo ÄKTA, foi realizada por troca iônica em coluna de heparina (GE). Para tanto, as frações contendo a proteína NS3hel, provenientes da purificação por afinidade, foram diluídas em tampão A (20 mM HEPES pH 7,5) na proporção de 1:7, injetadas na coluna e eluídas com tampão B (20 mM HEPES pH 7,5 e 1 M NaCl). As frações de interesse foram armazenadas a -20°C com 28% de glicerol.

A identidade das proteínas foi confirmada por *western blotting*, em que as proteínas presentes no gel SDS-PAGE 13% foram transferidas para membrana de nitrocelulose, posteriormente bloqueada com TBS 1X com 5% de leite em pó desnatado (Nestlé) e incubada com anticorpos monoclonais anti-NS3hel 1722-1B, seguida pela incubação como anticorpo secundário anti-mouse conjugado à fosfatase alcalina.

3.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ATPase

A atividade ATPase das proteínas NS3hel parental e mutadas foi avaliada pelo método colorimétrico de detecção de fosfato inorgânico (Pi) *in vitro* com o kit colorimétrico de Atividade ATPase (Innova Biosciences), conforme as instruções sugeridas pelo fabricante. As proteínas purificadas foram incubadas em placas de 96 poços a 28°C por 10 minutos em 100 μL de tampão Tris pH 7,5, contendo 2,5 mM de MgCl_2 , 5% de glicerol e diferentes concentrações de RNA dupla fita (dsRNA). A reação foi iniciada pela adição de diferentes concentrações de ATP e incubação a 28°C por 10 minutos. A detecção de Pi foi determinada pela reação com o corante verde malaquita e leitura ótica da absorbância de 630 nm em leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek). A curva padrão de concentração de Pi foi utilizada para

quantificar indiretamente a capacidade hidrolítica das proteínas recombinantes. As constantes enzimáticas (K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m) foram determinadas a partir das velocidades iniciais de hidrólise de ATP, utilizando a equação descrita por Michaelis-Menten por regressão não linear e o programa GraphPad Prism.

Os ensaios de atividade ATPase foram realizados na presença de RNA dupla fita (dsRNA) para mimetizar as condições encontradas pela proteína durante o ciclo replicativo. Para tanto, a dsRNA foi obtida utilizando 2 mM Hepes pH 7,0, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,01% SDS e 90 pmol/ μ L dos oligonucleotídeos complementares RF (5'AGCACCGUAAAGACGC) e R3'R (5'GCGUCUUUACGGUGCUUAAAACAAAACAAAACAAAACAAA). Essa solução foi deixada a 95°C por 10 minutos, seguida de decaimento gradativo da temperatura até 20°C e mantidos a 4°C por 15 minutos. Os oligonucleotídeos dupla fita gerados foram purificados em coluna ilustra MicroSpin G-25 (GE Healthcare), seguindo sugestões de uso indicadas pelo fabricante e armazenados a -20°C.

3.3 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA NS5RdRp

3.3.1 Amplificação e clonagem da sequência de interesse

Células C6/36 (*Aedes albopictus*) foram infectadas com o DENV-1 cepa FGA/89 para obtenção do RNA viral. A extração do material genético foi feita por meio de kit de extração de RNA (QIAamp Viral RNA mini kit - Qiagen), conforme instruções do fabricante. Em seguida, realizou-se uma transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para conversão do RNA em DNA complementar (cDNA), utilizando o kit *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega), conforme protocolo sugerido pelo fabricante, acrescido de 12,5 μ M de oligonucleotídeos iniciadores randômicos (Invitrogen), 0,5 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (DNTP) (GE Healthcare) e 20 U de RNase Out (Invitrogen). Essa solução foi mantida a 42°C por 1 hora e armazenada a 4°C. O cDNA serviu como molde para a amplificação da sequência nucleotídica do domínio RdRp (1.884 nucleotídeos) da proteína NS5 por reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR

foi realizada a partir da utilização de oligonucleotídeos iniciadores contendo os sítios de clivagem das enzimas de restrição BamHI e HindIII: CNS5Bam-5'CGGGATCCAACCTAGATATCATTGGCCAGAGG e CNS5Hind-5'GGGGAAGCTTTTACTACCAGAGTGCCCCTTCGGG (as regiões sublinhadas indicam os sítios de clivagem das enzimas BamHI e HindIII, respectivamente). A amplificação foi feita com o kit LongRange PCR (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. Foram realizados testes a fim de determinar o ciclo de temperatura ideal para amplificação, sendo padronizado como 93°C por 3 minutos o tempo de desnaturação da dupla fita de DNA, seguido de 35 ciclos de 93°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 68°C por 2 minutos e 30 segundos.

Os amplicons foram purificados com o kit High Pure PCR Product (Roche), conforme indicações do fabricante, e clivados com as enzimas de restrição BamHI (New England Biolabs) e HindIII (New England Biolabs), segundo instruções do fabricante. A sequência de nucleotídeos clivada foi purificada com o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) e ligada ao plasmídeo pET28a (Novagen) também clivado com as mesmas enzimas e purificado como mencionado. A ligação foi feita com a proporção de 1 plasmídeo por 3 moléculas de amplicon, utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs). De acordo com a construção realizada, a sequência da proteína de interesse ficou sob regulação do promotor da T7 RNA polimerase e apresenta a sequência de seis histidina na região N' terminal (Figura 8).

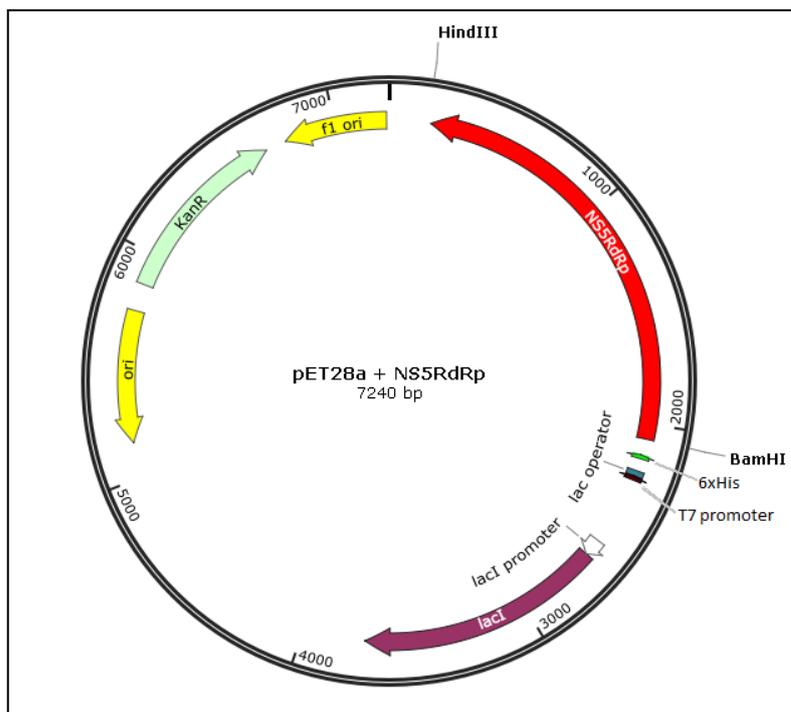


Figura 8 - Esquema de vetor de expressão contendo o inserto de interesse. Vetor pET28a com a sequência da proteína NS5RdRp acoplada a uma cauda de hexahistidina, cuja expressão está sob regulação do promotor da enzima T7 polimerase.

Um volume de 15 μ L do vetor contendo o fragmento de interesse foi misturado com células de *Escherichia coli* cepa cálcio competente TOP 10 (Invitrogen) para transformação bacteriana, sendo incubado em gelo por 30 minutos, seguido de choque térmico a 42°C por 1 minuto e 30 segundos. As células transformadas foram incubadas com 800 μ L de meio SOC a 37°C sob agitação de 200 rpm por 1 hora. Posteriormente, 100 μ L de cultura bacteriana foram plaqueadas em placas contendo meio LB sólido suplementado com 25 μ g/mL de canamicina. Os 700 μ L de cultura restantes foram centrifugados a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi parcialmente descartado, restando apenas 100 μ L de meio que foi utilizado para ressuspender o precipitado celular e plaquear as bactérias, conforme descrito a cima. Ambas as placas foram incubadas a 30°C por 16 horas para seleção das bactérias que continham o plasmídeo com o inserto funcional. As colônias contendo possíveis clones recombinantes foram transferidas para uma nova placa com palitos de dente estéreis (*Toothpick*), e foi incubada a 30°C por 16 horas.

Após esse período os clones foram triados por PCR de colônia, em que amostras de cada colônia eram transferidas da placa para microtubos numerados com o auxílio de palitos de dente estéreis. A esses tubos foram adicionados 10 μ L

de água ultrapura e incubados a 95°C por 10 minutos, centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto. 1 µL do sobrenadante foi utilizado para PCR com a enzima Taq DNA polimerase (IBMP). Foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos iniciadores citados anteriormente em um ciclo de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos. As amostras amplificadas foram aplicadas (10 µL) em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

Os clones que continham a sequência amplificada foram incubados em 10 mL de meio LB com 25 µg/mL de canamicina a 30°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, 500 µL de cultura foram transferidos para microtubos contendo 500 µL de glicerol 50% e armazenados a -80°C como estoque. O restante da cultura foi usado para purificação do DNA plasmidial, como descrito anteriormente, e a concentração de ácidos nucleicos foi obtida em espectrofotômetro (NanoDrop - Thermo). A sequência nucleotídica foi confirmada por sequenciamento pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul), utilizando os oligonucleotídeos T7promoter-5'TAATACGACTCACTATAGGG, T7terminator-5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG e CN19-5'GGCTGTTGCGAACCTGTC.

3.3.2 Testes de expressão da proteína NS5RdRp em sistema procarioto

O vetor contendo o inserto foi utilizado para transformação em células de *E. coli* das cepas BL21 (DE3) pLysS, Rosetta 2 (DE3) e Rosetta-gami 2 (DE3), como descrito no item 3.3.1, para realização de cinéticas de expressão e determinação das melhores condições de expressão da proteína heteróloga na forma solúvel. Os clones positivos foram armazenados em 25% de glicerol a -80°C.

A partir dos estoques em glicerol, as bactérias BL21 (DE3) pLysS, Rosetta 2 (DE3) (resistentes à cloranfenicol) e Rosetta-gami 2 (DE3) (resistente à cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina) foram cultivadas em 10 mL de meio LB na presença dos respectivos antibióticos acrescido do antibiótico de resistência do vetor (canamicina), sob agitação constante de 200 rpm a 30°C por 16 horas. No dia seguinte, 2 mL de cada cultura foram transferidos para erlenmeyers contendo 18 mL de meio com antibióticos que permaneceu em agitação e temperatura de 30°C até

atingir uma densidade óptica (DO) de 0,6 em 600 nm. Em seguida, a indução da proteína foi realizada com 0,4 mM de (IPTG) e uma cinética de expressão foi realizada sob diferentes condições de temperatura e tempo de indução. Também foram realizados testes de solubilidade com choque térmico, em que a cultura foi mantida em gelo por 15 minutos antes da indução seguido de choque químico com 3% de etanol absoluto (Merck). Outros testes de expressão buscaram avaliar a solubilidade da proteína em meio *Terrific Broth* (TB). O controle negativo (não induzido) foi mantido sob as mesmas condições, no entanto, sem a presença de IPTG. Após o período estipulado de indução em cada teste, 1 mL de cultura de bactéria foi coletado para visualização da expressão da proteína de interesse em gel SDS-PAGE. O restante da cultura foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi estocado a -20°C.

O precipitado bacteriano foi resuspenso em 500 µL de diferentes tampões de lise com a finalidade de testar a solubilidade da proteína. Os tampões utilizados apresentavam diferentes composições: Tampão fosfato (50 mM fosfato pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM de beta-mercaptoetanol e 10% glicerol) e tampão tris (20 mM ou 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 10 mM beta-mercaptoetanol e 10% glicerol). Em seguida a suspensão de bactérias foi submetida a dois ciclos de congelamento e descongelamento em banho de gelo seco e etanol e 5 ciclos de 15 segundos de ultrassom (Ultrasonic Homogeneizer 4710 Series - Cole Parmer) para completa lise celular. O material foi então centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C e 30 µL do sobrenadante (fração solúvel) e 75 µL do sedimento (fração insolúvel) foram ressuspensos em tampão PBS 1X. Foram misturados 10 µL de tampão de amostra 4X para SDS-PAGE e desnaturados a 95°C por 5 minutos. As alíquotas dos controles não-induzido e induzido foram centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados foram ressuspensos em 75 µL de PBS 1X e 25 µL de tampão 4X e desnaturados como já mencionado. 15 µL de cada amostra, com exceção do induzido (7,5 µL) foram aplicados em gel SDS/PAGE 13% para visualização em coloração direta com *coomassie blue* R-250 (Sigma).

A identidade das proteínas recombinantes foi analisada pela técnica de *western blotting*, como descrito no item 3.1 utilizando anticorpos primários policlonais anti-hexahistidina (Sigma) ou anticorpos policlonais anti-DENV1 (Hawai, 1998), seguida pela incubação como anticorpo secundário anti-mouse conjugado à fosfatase alcalina.

A lise de bactérias em volumes de cultura bacteriana de 1 L e 2 L seguiu o protocolo no qual o sedimento celular pós-indução era resuspendido em 20 e 30 mL de tampão de lise (50 mM fosfato pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM de beta-mercaptoetanol e 10% glicerol), respectivamente, suplementado com inibidor de protease (Roche) na proporção de uma pastilha para cada 10 mL de tampão. A lise bacteriana foi realizada em microfluidificador, e preparo do extrato para purificação por FPLC procedeu conforme descrito no item 3.1.

3.3.3 Purificação da proteína NS5RdRp por cromatografia

A preparação das amostras para purificação da porção solúvel do lisado celular por afinidade ao níquel em cromatógrafo ÄKTA foi possível pela presença da cauda de hexa-Histidina (6xHis) expressa fusionada ao N-terminal da proteína. A coluna HisTrap HP 1 mL (GE) foi equilibrada com cinco volumes de tampão de lise, seguida de lavagem de 2% de tampão B (50 mM fosfato pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM de beta-mercaptoetanol, 10% glicerol e 500 mM imidazol) e injeção do volume total de amostra a um fluxo de 1 mL/minuto. As proteínas foram eluídas na presença de um gradiente linear de tampão B de 0-100%, e foram coletadas em frações de 1 mL. As frações que poderiam conter a proteína de interesse foram armazenadas a -20°C. Alíquotas de 15 µL dessas frações foram misturadas com 5 µL de tampão de eletroforese de proteínas e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. 15 µL dessa mistura foram aplicados em gel SDS-PAGE 13%, posteriormente corado com *coomassie blue* R-250. A cromatografia foi acompanhada pela absorvância de UV a 280 nm. As frações correspondentes ao pico do cromatograma desta purificação foram quantificadas em fluorímetro Qubit (Invitrogen), utilizando o kit Qubit Protein Assay (Invitrogen).

Com a finalidade de melhorar a pureza da amostra por meio de uma purificação de troca iônica, foram realizados testes de ligação da proteína às resinas SP, heparina e DEAE (GE Healthcare). Para a resina SP o tampão de ligação era composto de 20 mM de fosfato, 20 mM NaCl e 1 mM de beta-mercaptoetanol pH 6,0; o tampão de ligação para a resina de heparina continha 50 mM de MES, 1 mM beta-mercaptoetanol e 1 mM EDTA pH 6,2; e para a resina DEAE utilizou-se um

tampão com 20 mM HEPES, 20 mM NaCl e 1 mM beta-mercaptoetanol pH 8,2. As proteínas foram eluídas em tampões de mesma composição que os tampões de ligação, mas com 1 M de NaCl. Para os testes de ligação, 10 µg da proteína diluídos em 100 µL de tampão de ligação foram incubados com 100 µL de cada resina sob agitação por 15 minutos a 4°C.

Uma purificação de troca iônica foi realizada em cromatógrafo ÄKTA com coluna de heparina (GE) e tampão MES, na qual as frações eluídas anteriormente na purificação de afinidade foram diluídas em tampão MES (50 mM de MES, 1 mM beta-mercaptoetanol e 1 mM EDTA pH 6,2) na proporção 1:10 e aplicadas na coluna. Foi realizado um gradiente linear 0-100% de tampão de eluição (50 mM de MES, 1 mM beta-mercaptoetanol, 1 mM EDTA e 1 M NaCl pH 6,2) e as frações de interesse foram armazenadas a -20°C na presença de glicerol 10%. O resultado da purificação foi analisado em gel SDS-PAGE 13%.

3.3.4 Espectrometria de massas

Para confirmar a sequência de aminoácidos do domínio RdRp da proteína NS5 expresso em sistema procarioto, após a purificação em coluna de troca iônica, a banda com tamanho correspondente a proteína de interesse foi extraída de gel SDS-PAGE 13%, digerida com tripsina e avaliada por espectrometria de massas em espectrômetro LTQ Orbitrap XL-ETD (Thermo Scientific).

3.3.5 Purificação da proteína NS5RdRp a partir de corpúsculos de inclusão

Embora a proteína purificada a partir de corpúsculos de inclusão bacterianos não seja indicada para realização de ensaios enzimáticos, uma vez que o processo de reenovelamento pode levar à formação de uma estrutura diferente da estrutura da proteína nativa, essa proteína poderá ser utilizada para a produção de anticorpos monoclonais, os quais poderão ser empregados em diferentes abordagens para o estudo do complexo replicativo do DENV. Com esse objetivo, 2 L de cultura foram

centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspensão em 20 mL de tampão A composto por 50 mM de fosfato pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM beta-mercaptoetanol e 10% de glicerol. O extrato celular foi lisado por 10 ciclos de pressão de 18.000 psi em microfluidificador M-110L (Microfluidics) e centrifugado a 30.000 g por 20 minutos. O *pellet* proveniente dessa segunda centrifugação foi ressuspensão em 20 mL de tampão B (100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M ureia pH 8,0) e mantido em gelo por 1 hora, com agitações vigorosas a cada 15 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 30.000 g por 20 minutos e o sobrenadante foi incubado com resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) por 20 minutos a 4°C. Após esse período centrifugou-se a amostra a 4°C 500 g por 4 minutos. O sobrenadante compõe a fração não-ligada à resina e foi armazenado a 4°C. À resina adicionou-se 10 mL de tampão C (100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M ureia pH 7,0) seguida de centrifugação à 4°C 500 g por 4 minutos. O sobrenadante (lavado) foi coletado e armazenado à 4°C. A proteína foi eluída com 100 µL de tampão D (100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, 500 mM de imidazol e 4 M ureia pH 6,5) e centrifugado como anteriormente. O sobrenadante (eluído 1) foi coletado. O procedimento foi repetido mais uma vez e o sobrenadante (eluído 2) foi armazenado. A resina foi ressuspensão em 75 µL de PBS 1X, adicionando-se a esta 25 µL de tampão de eletroforese 4X. Alíquotas de 75 µL das frações não-ligado, lavado, eluídos 1 e 2 foram coletadas e acrescidas de 25 µL de tampão 4X. Essas alíquotas foram mantidas a 95°C por 5 minutos e 15 µL foram aplicados em gel SDS-PAGE 13%. A identidade da proteína foi avaliada pela técnica de *western blotting*, utilizando anticorpos primários policlonais anti-histidina (Sigma) e detectados por anticorpos anti-mouse conjugado à fosfatase alcalina.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NS3hel

A proteína NS3hel parental (NS3helFGA/89), bem como suas variantes NS3hel209Mut, NS3hel435Mut, NS3hel480Mut, e NS3hel200Mut (proteína contendo mutação no motivo catalítico Walker A do domínio helicase), foram expressas em sistema procaríoto e purificadas por cromatografia de afinidade e troca iônica, utilizando o cromatógrafo ÄKTA (GE). O resultado das purificações está mostrado na Figura 9.

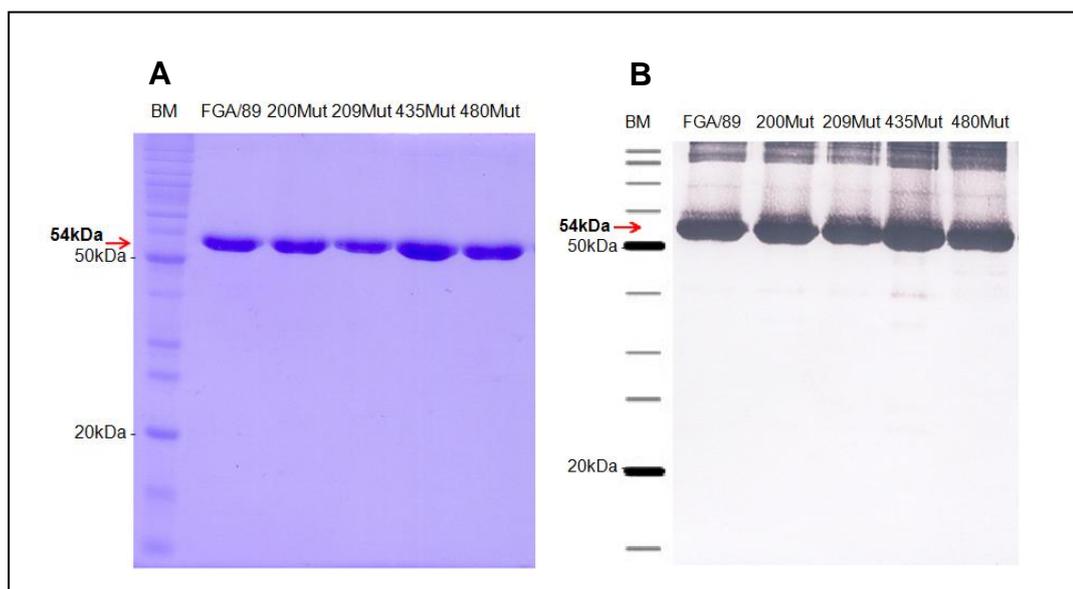


Figura 9 - Perfil da purificação das proteínas recombinantes NS3hel do DENV-1 e suas variantes mutantes. A. Gel representativo SDS-PAGE 13% corado com *coomassie blue* demonstrando o grau de pureza das proteínas recombinantes após purificação por cromatografia de afinidade e troca iônica. **B.** *Western blotting* das proteínas NS3hel marcadas com anticorpo monoclonal 1722-1B anti-NS3hel DENV1.

4.2 ATIVIDADE ATPase

A atividade ATPase das proteínas NS3hel foi avaliada pelo método colorimétrico de detecção de Pi, liberado a partir da hidrólise de ATP, pela reação

com o corante verde malaquita. Primeiramente, testes foram realizados para determinar a concentração ótima de enzima a ser utilizada nos ensaios comparativos. Para tanto, diferentes concentrações da proteína parental NS3hel FGA/89 (20 nM, 40 nM, 60 nM, 80 nM e 100 nM) foram incubadas com 500 nM de dsRNA, 0,5 mM de ATP, 2,5 mM de MgCl₂ em tampão Tris 50 mM pH 7,5 para quantificação da hidrólise de ATP em cada condição. Concentrações crescentes de Pi foram detectadas a medida que concentrações mais altas da proteína foram administradas (dados não mostrados). Visto que a atividade ATPase foi identificada desde as concentrações mais baixas de proteína, decidimos utilizar a concentração de 40 nM para os próximos ensaios.

Alguns trabalhos mostram que a interação com o RNA estimula a atividade catalítica de ATPase da proteína NS3 dos flavivírus *in vitro* (GEBHARD *et al.*, 2012; LI *et al.*, 1999). Desse modo, nossos dados apresentam-se em consonância com a literatura, demonstrando que a hidrólise de ATP pela proteína NS3hel do DENV-1 é estimulada pelo aumento da concentração de RNA até aproximadamente 500 nM de dsRNA (Figura 10A). O gráfico representa os valores da média de dois experimentos independentes.

Uma vez estabelecidas as concentrações de RNA e proteína, foram realizados ensaios comparativos de atividade enzimática entre as proteínas recombinantes NS3hel com diferentes concentrações de ATP (Figura 10B). Os valores de absorvância para cada proteína foram normalizados pelos dados da NS3hel200Mut, que não apresenta atividade catalítica de ATPase. Os resultados mostrados representam a média de três experimentos independentes ajustados a equação de Michaelis-Menten. Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m foram obtidos pelo programa GraphPad Prisma e os valores de k_{cat} e k_{cat}/K_m determinados pelas fórmulas $k_{\text{cat}} = V_{\text{MÁX}}/[Et]$, onde $[Et]$ é a concentração da enzima vezes uma unidade de tempo e k_{cat}/K_m seria dado pela divisão desses valores multiplicados por 1000. Os dados são mostrados na Tabela 1.

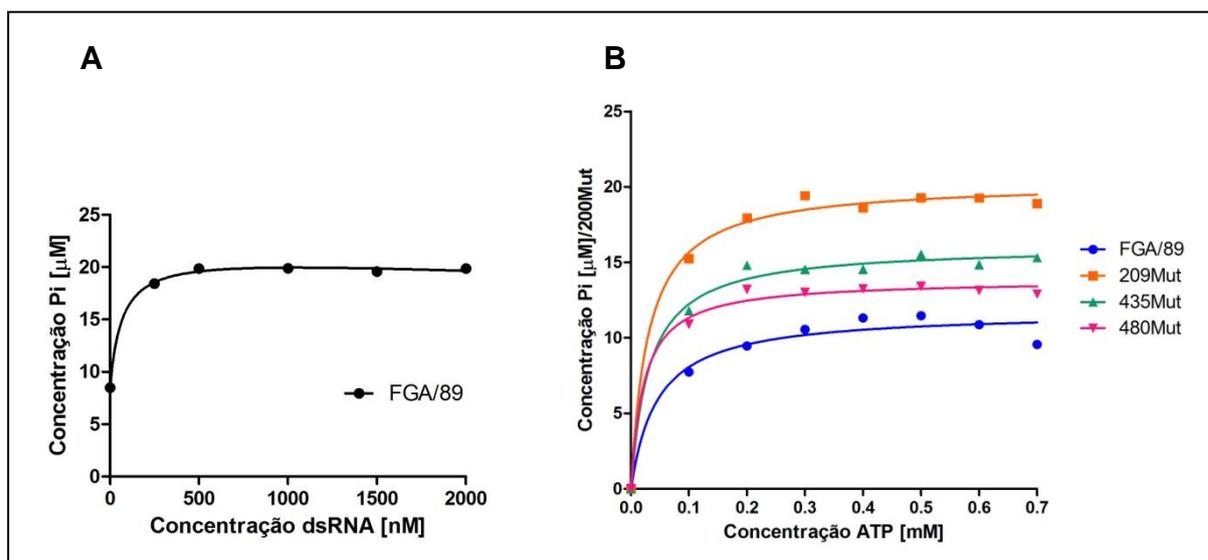


Figura 10 - Quantificação da hidrólise de ATP pelas proteínas NS3hel. A. Atividade ATPase da proteína NS3hel FGA/89 estimulada pelo aumento da concentração de dsRNA com um tempo de incubação de 10 minutos a 28°C. **B.** Curva de cinética enzimática de Michaelis-Menten para as proteínas recombinantes NS3hel realizada com 10 minutos de incubação a 28°C.

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos de hidrólise de ATP das proteínas recombinantes NS3hel.

NS3hel	$V_{M\acute{A}X}$ (nmoles/(mg min))	K_m (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM s^{-1}$)
FGA/89	11,73 \pm 1,045	0,04542 \pm 0,028	4,8875 \pm 0,435	107606,8
209Mut	20,31 \pm 1,789	0,02971 \pm 0,025	8,4625 \pm 0,7454	284836,8
435Mut	16,08 \pm 1,507	0,03145 \pm 0,027	6,7 \pm 0,627	213036,6
480Mut	13,83 \pm 1,159	0,02199 \pm 0,022	5,7625 \pm 0,482	262050,9

4.3 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA NS5RdRp

4.3.1 Clonagem e testes de expressão da proteína NS5RdRp

O fragmento de DNA correspondente à sequência do domínio RdRp da NS5 foi amplificado por reação de PCR, purificado, digerido com as enzimas de restrição BamHI e HindIII (Figura 11A) e ligado ao vetor pET28a, também digerido com as mesmas enzimas de restrição. Os clones recombinantes positivos (Figura 11B) foram sequenciados pela empresa coreana Macrogen, para confirmação da correta

inserção do fragmento de interesse no vetor e verificação da ausência de mutações indesejadas.

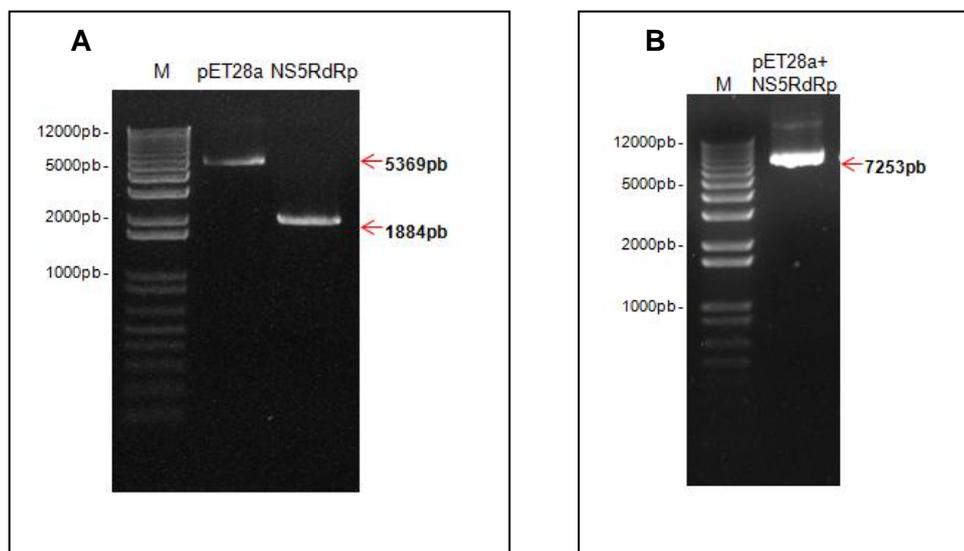


Figura 11 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do vetor de clonagem, produto de amplificação por PCR e clone. **A.** Vetor pET28a (5369pb) e sequência da proteína NS5RdRp amplificada por PCR (1884pb). **B.** clone do vetor de clonagem contendo a sequência de interesse (7253pb).

Após a confirmação por sequenciamento, o clone recombinante foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* das cepas BL21pLysS (DE3), Rosetta 2 (DE3) e Rosetta-gami 2 (DE3). Diferentes condições de temperatura e tempo de expressão foram testadas para a obtenção da proteína NS5RdRp. Os resultados iniciais de expressão da proteína à 16°C por 16 horas mostraram que a proteína estava sendo melhor expressa em Rosetta 2 (Figura 12A). A lise das bactérias para análise em gel das frações solúvel e insolúvel (proteína presente em corpúsculos de inclusão) (Figura 12B) indica a presença de uma banda do tamanho da proteína de interesse. No entanto, apenas a fração insolúvel da proteína, proveniente da agregação em corpúsculos de inclusão, apresentou marcação quando reagida com anticorpos anti-hexahistidina pela técnica de *western blotting* (Figura 12C). Dessa forma, mais testes foram realizados, alterando as condições de indução e tampões de lise a fim de melhorar a expressão proteica na forma solúvel.

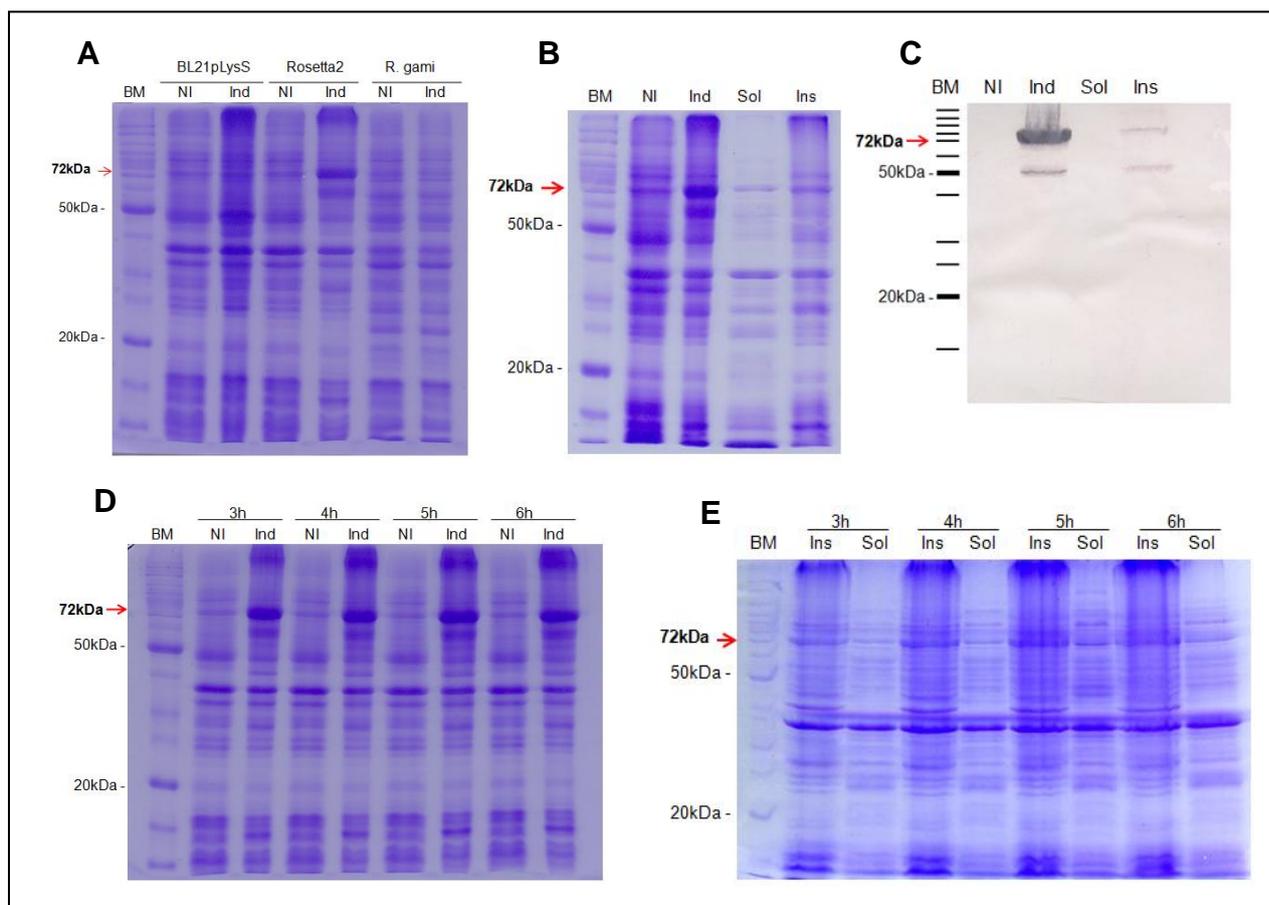


Figura 12 - Análise da expressão da proteína NS5RdRp em sistema procarioto em gel SDS-PAGE 13%. A. Teste de expressão em BL21pLysS, Rosetta 2 e Rosetta gami a 16°C por 16 horas, mostrando alíquotas não-induzidas com IPTG (NI) e induzidas (Ind). **B.** Frações solúvel (Sol) e insolúvel (Ins) da expressão em Rosetta 2 a 16°C por 16 horas. **C.** *Western blotting* do gel mostrado em B marcado com anticorpo anti-histidina. **D.** Cinética de expressão da proteína NS5RdRp em Rosetta 2 feita a 30°C mostrando amostras antes e após a indução com IPTG em 3, 4, 5 e 6 horas. **E.** Frações solúveis (Sol) e insolúveis (Ins) da cinética de expressão em Rosetta 2 a 30°C.

Embora em pequenas concentrações, a proteína pareceu estar sendo expressa em sua forma solúvel a 30°C. A cinética de tempo de indução da proteína não mostrou diferenças na expressão e na concentração da fração solúvel e insolúvel ao longo tempo (Figuras 12D e 12E). Optou-se por manter a expressão a 30°C com tempo de indução de 4 horas para dar início aos testes de purificação da proteína NS5RdRp.

4.3.2 Purificação da proteína NS5RdRp

Foram realizadas purificações por afinidade ao níquel em pequena escala e confirmação da expressão da proteína por *western blotting*. Testes preliminares com os tampões de lavagem (50 mM fosfato pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM beta-mercaptoetanol, 10% glicerol e 50 mM de imidazol) usado em L1 e L2 (lavados) e tampão de eluição (mesma composição do tampão B, porém com 500 mM de imidazol) que eluiu as frações E1 e E2 (eluídos) (Figura 13A), mostraram que a proteína estava se desligando da resina com baixas concentrações de imidazol. Para melhorar a purificação, novos testes foram realizados com tampão de eluição com 50 mM de imidazol (Figura 13C).

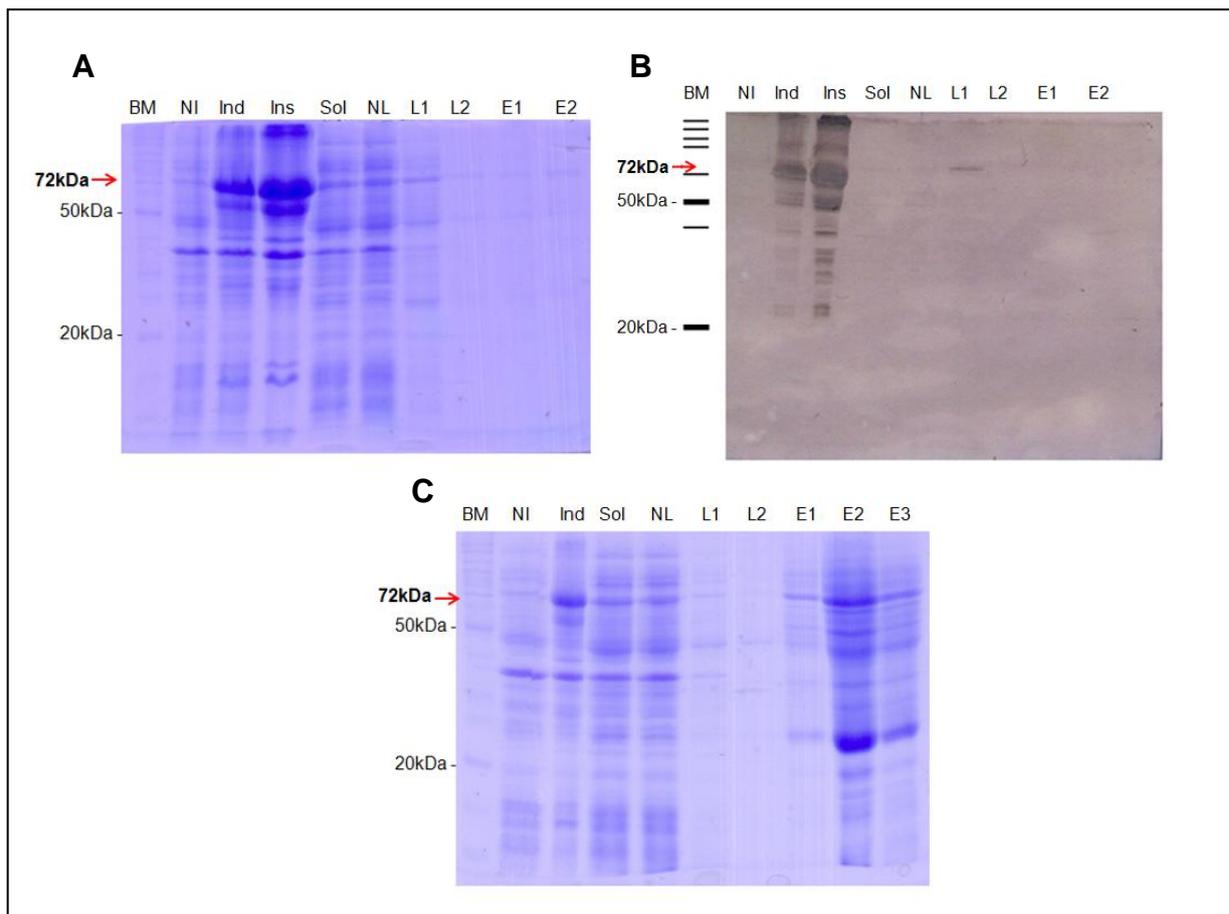


Figura 13 - Testes de purificação por afinidade da proteína NS5RdRp ao níquel feitos em bancada. A. Teste de purificação utilizando tampão de lavagem e eluição com 50 mM e 500 mM de imidazol, respectivamente, mostrando as frações antes da indução (NI), após a indução (Ind), insolúvel (Ins), solúvel (Sol), não-ligado à coluna (NL), lavado 1 (L1), lavado 2 (L2), eluído 1 (E1) e eluído 2 (E2). **B.** *Western blotting* do gel mostrado em A. Marcação da proteína utilizando anticorpo policlonal anti-DENV-1 e revelada com anticorpo secundário acoplado à fosfatase alcalina. **C.** Teste de purificação da proteína NS5RdRp com tampão de eluição com 50 mM de imidazol mostrando as frações antes da indução (NI), após a indução (Ind), solúvel (Sol), não-ligado à coluna (NL), lavado 1 (L1), lavado 2 (L2), eluído 1 (E1), eluído 2 (E2) e eluído 3 (E3).

Após determinar os tampões mais apropriados para a purificação da proteína, volumes maiores de cultura foram purificados por cromatografia de afinidade em cromatógrafo ÄKTA com tampão de lise sendo composto por 50 mM fosfato pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM de beta-mercaptoetanol e 10% glicerol e tampão de eluição 50 mM fosfato pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM de beta-mercaptoetanol, 10% glicerol e 500 mM de imidazol. A Figura 14 mostra o resultado de uma purificação para dois litros de cultura bacteriana.

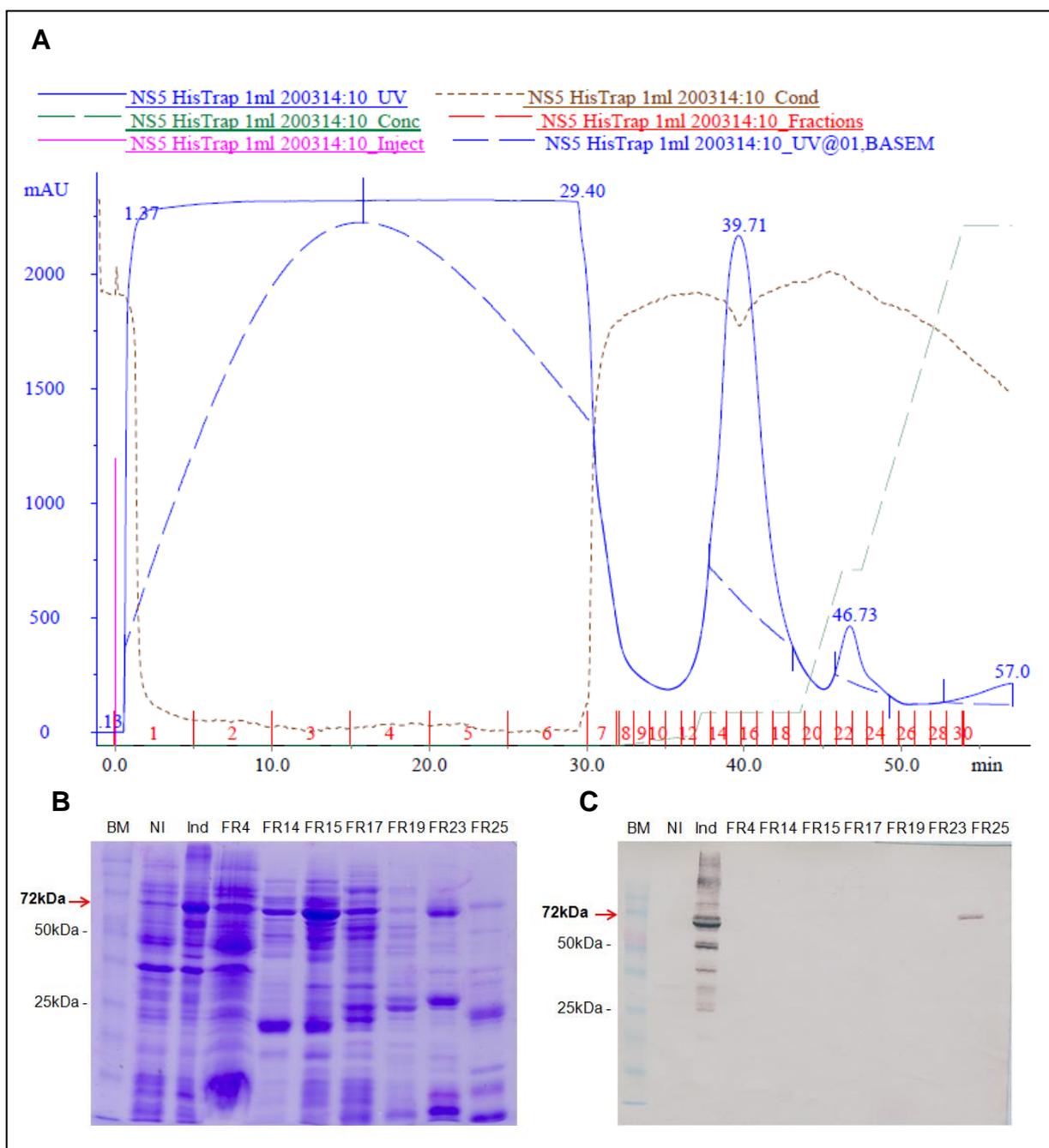


Figura 14 - Purificação proteína NS5RdRp por afinidade à coluna de níquel em cromatógrafo tipo ÄKTA. A. Cromatograma da purificação indicando a eluição de uma grande quantidade de proteínas entre as frações 12 e 19 e de um segundo pico de eluição entre as frações 22 e 24. **B.** Gel de acrilamida indicando a eluição de uma proteína do tamanho da proteína de interesse em ambos os picos do cromatograma. **C.** *Western blotting* do gel mostrado em B marcado com anti-hexahistidina no qual apenas a fração 25 foi marcada.

Os resultados observados nessa primeira purificação indicavam que a proteína poderia estar sendo eluída com 40 nM de imidazol, o que representa um valor baixo comparado ao que se costuma observar em uma purificação de afinidade. Complementariamente a esse resultado, apenas a fração que eluiu mais tardiamente da coluna apresentou marcação em *western blotting* com anticorpo anti-

hexahistidina, o que poderia ser um indicativo de que a proteína estaria perdendo sua cauda de histidina e somente as proteínas que apresentassem essa sequência um pouco mais conservada iriam ter maior interação com o níquel e apresentar marcação pelo anticorpo.

Assim, a fim de melhorar o grau de pureza da amostra foram realizados testes de ligação em diferentes resinas de troca iônica (heparina, DEAE e SP). Os resultados indicam que a resina de heparina seria mais eficiente para uma segunda purificação por troca catiônica.

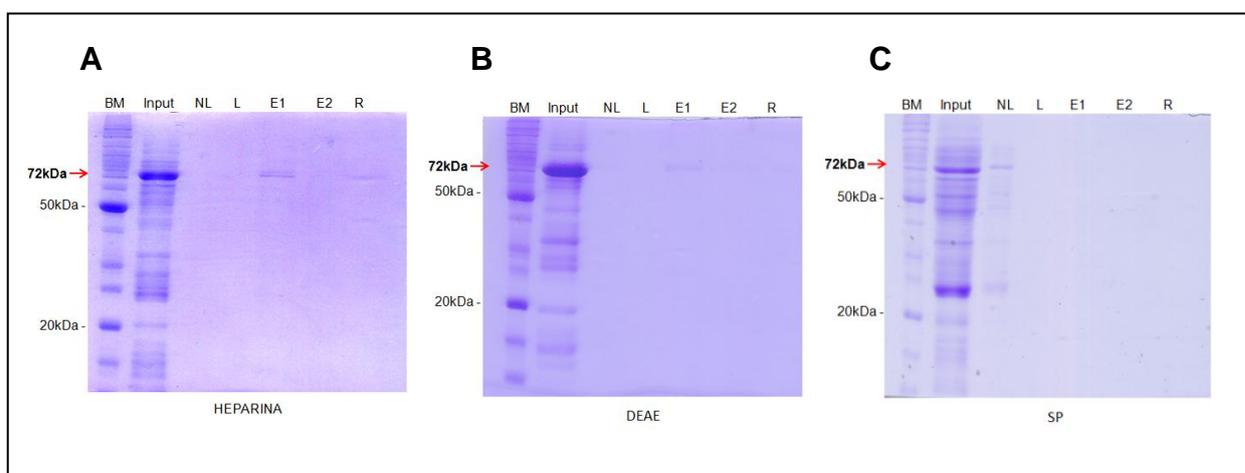


Figura 15 - Teste de ligação proteína NS5RdRp em resina. A. Teste com resina de heparina mostrando uma alíquota da proteína que não foi colocada na resina (*input*), não-ligado à resina (NL), lavado (L), eluído 1 (E1), eluído 2 (E2) e a resina (R). **B.** Teste com resina DEAE. **C.** Teste com resina SP.

Após os testes de ligação, as frações coletadas da purificação por afinidade que continham a proteína de interesse foram purificadas por troca catiônica em cromatógrafo com resina de heparina (GE Healthcare) em tampão MES.

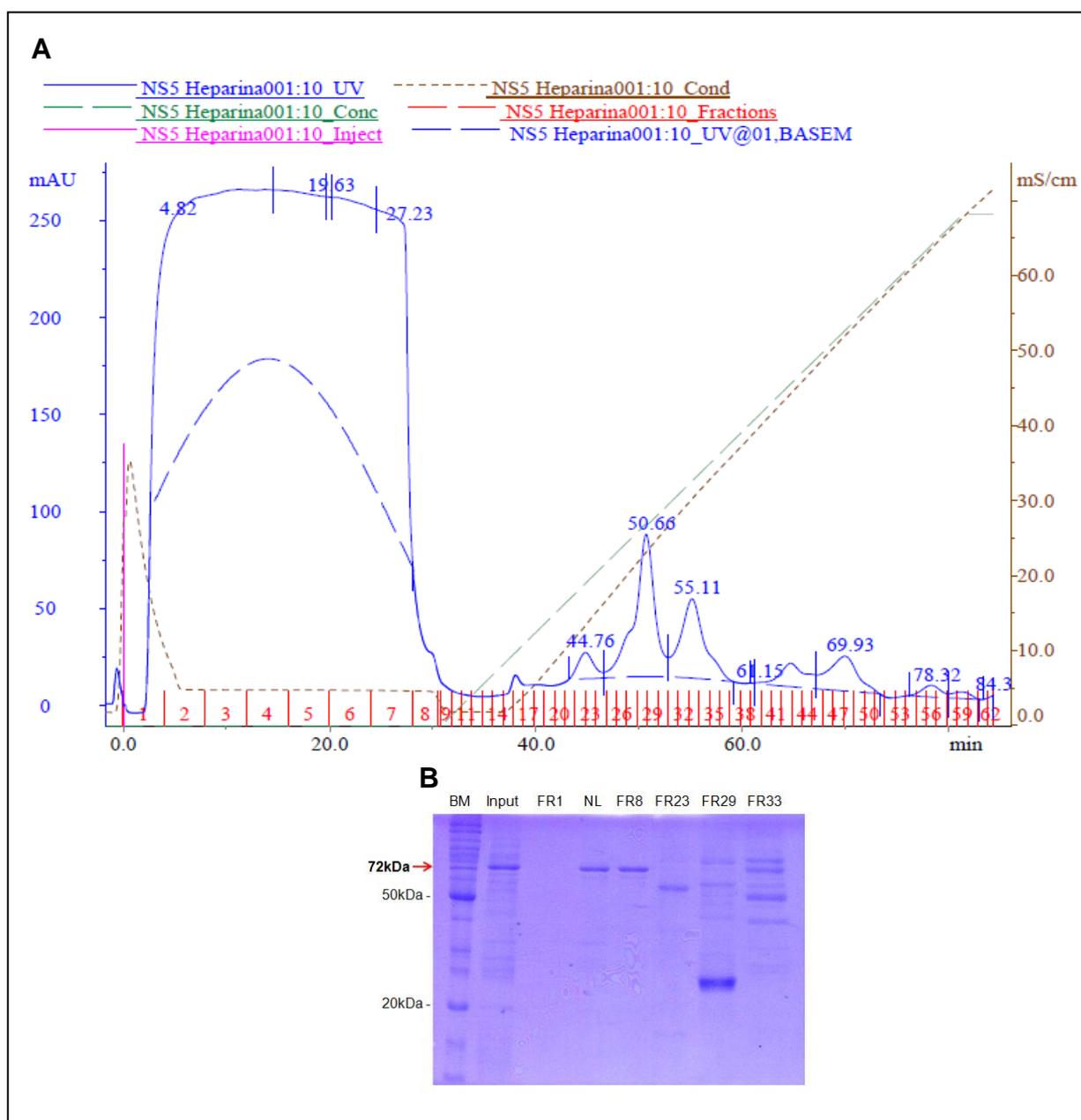


Figura 16 - Purificação da proteína NS5RdRp por troca iônica em resina de heparina. A. Cromatograma da purificação indicando que uma grande quantidade de proteína não ligou na coluna. **B.** Gel da purificação indicando as frações FR1, não-ligado à coluna (NL), FR8, FR23, FR29 e FR33.

As frações dessa purificação que não ligaram à coluna foram concentradas em Centricon de 50 kDa (Millipore) (Figura 16B). Um volume de 10 μ L de proteína foi aplicado em gel SDS-PAGE 13%. A banda do gel com o tamanho correspondente ao da proteína de interesse foi recortada e utilizada para análise de sequência por espectrometria de massas. O resultado da análise da sequência de aminoácidos da proteína de aproximadamente 72 kDa que estava sendo expressa em Rosetta 2 (DE3) indica que a proteína em questão trata-se, na verdade, de uma proteína *heat shock* de *E. coli* com 71 kDa.

Além das tentativas de expressão e purificação da proteína na forma solúvel realizou-se a purificação da fração insolúvel da proteína. O resultado visualizado no *western blotting* com anticorpo anti-hexahistidina mostra a marcação de bandas no tamanho esperado, indicando que a proteína de interesse está sendo expressa, mas encontra-se retida em corpos de inclusão. A banda visualizada na fração E2 (Figura 16A) será analisada por espectrometria de massas para confirmação da sequência de aminoácidos. Embora a proteína insolúvel não seja indicada para realização de ensaios de interação e de atividade devido à conformação estrutural inadequada do polipetídeo, a proteína purificada poderá ser utilizada para a produção de anticorpos monoclonais que poderão contribuir para estudos futuros da proteína na forma solúvel, além de poder ser utilizado em outros trabalhos desenvolvidos no laboratório.

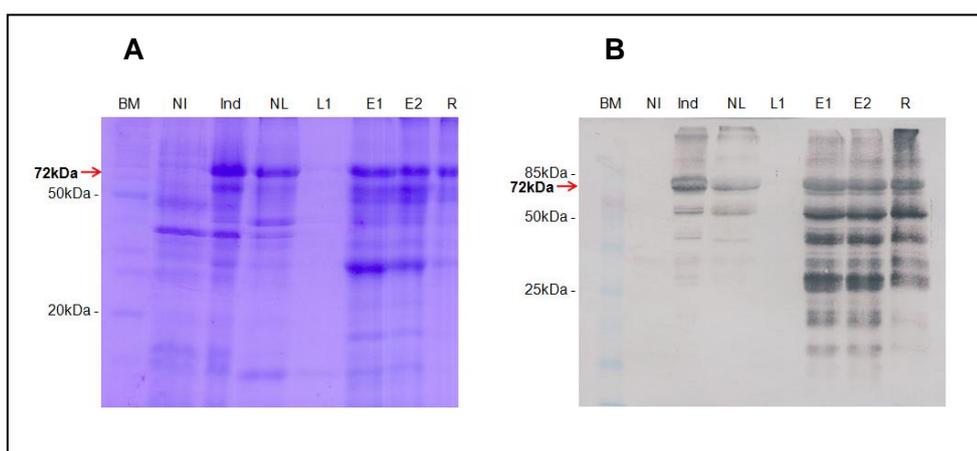


Figura 17 - Purificação da proteína NS5RdRp por afinidade ao níquel a partir de corpúsculos de inclusão. A. Perfil da purificação observado em gel de acrilamida 13% corado com *coomassie blue* indicando as frações antes da indução (NI), após indução (Ind), não-ligada à coluna (NL), lavado 1 (L1), eluído 1 (E1), eluído 2 (E2) e resina (R). **B.** *Western blotting* da purificação feita por afinidade ao níquel e marcado com anti-hexahistidina.

5 DISCUSSÃO

Apesar dos grandes avanços dos últimos anos para o entendimento da biologia do DENV, a patogenia da doença continua sendo um grande desafio principalmente no que diz respeito à ocorrência das formas mais graves. Uma das maiores dificuldades encontradas para o estudo da patologia e biologia molecular do vírus é o fato de que até o momento não existe um modelo ideal de infecção capaz de refletir as diferentes formas clínicas da doença, o que dificulta ainda mais o estudo.

Existem evidências na literatura que o vírus pode atravessar a barreira hematoencefálica e infectar células do sistema nervoso central, ocasionando encefalite (FERREIRA *et al.*, 2005). Em função disso, o modelo de infecção em sistema nervoso de camundongos tem se apresentado como um bom sistema para o estudo da patogênese do DENV. Sabin; Schlesinger, (1945) demonstraram que passagens sucessivas de isolados clínicos de DENV em cérebro de camundongos produziram variantes com maior virulência em modelo murino. Esses resultados são reflexo da alta taxa de erro da polimerase inerente aos vírus de RNA, que pode contribuir para o surgimento de mutações que auxiliem o vírus a superar uma pressão seletiva e permitir, por exemplo, a infecção em um novo nicho.

Trabalhos independentes (DESPRÈS *et al.*, 1998; BORDIGNON, *et al.*, 2007) que buscavam compreender melhor a patogênese da dengue através da neuroadaptação em camundongos neonatos, mostraram que mutações nas proteínas E e NS3 do DENV-1 cepa FGA/89 são capazes de aumentar a virulência do vírus. O sequenciamento das cepas neuroadaptadas geradas indicou que as mutações presentes na proteína NS3 localizam-se no domínio helicase dessa proteína (SANTOS *et al.*, 2000; BORDIGNON, *et al.*, 2007). Borba (2010) desenvolveu estudos com clones infecciosos de DENV-1 para tentar compreender o papel dessas mutações na virulência do vírus e, mais recentemente, Strottmann (2013) avaliou o perfil de infecção de duas variantes recombinantes do DENV-1, contendo as mutações pontuais LeuNS3₄₃₅Ser ou LeuNS3₄₈₀Ser em mdDCs, o alvo primário da infecção pelo DENV em humanos. Os estudos demonstram que os DENV-1 contendo mutações na proteína NS3hel aumentam substancialmente a aptidão viral *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*.

A proteína NS3 é uma proteína multifuncional que interage com outras proteínas virais, da célula hospedeira e com o RNA viral. Acredita-se que seu domínio helicase seja responsável por desfazer as estruturas secundárias do RNA genômico, dissociar proteínas do RNA e separar a dsRNA formada durante a replicação do material genético viral (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009; RANEY *et al.*, 2010). É sabido que existe uma relação funcional entre os domínios ATPase e helicase da proteína NS3 dos flavivírus, no entanto, o papel dessas atividades na modulação da replicação viral não está completamente elucidado (FAIRMAN-WILLIAMS; GUENTHER; JANKOWSKY, 2010).

Sampath *et al.*, (2006) trabalhando com mutações pontuais no domínio helicase do DENV-2 mostraram que a mutação Lys₃₉₆Ala é capaz de anular a atividade ATPase dessa enzima e reduzir em até 80% a sua atividade helicase quando comparada com a proteína parental. Curiosamente, mutações nos resíduos Ile₃₆₅Ala e Arg₃₇₆Ala apresentaram redução da atividade helicase sem alterar a hidrólise de ATP, mostrando que as mutações modulam a atividade enzimática da proteína através de diferentes mecanismos. Outros trabalhos na literatura envolvendo mutações na NS3 também mostram diferentes relações entre as atividades ATPase e helicase *in vitro* (HEILEK; PETERSON, 1997; KIM *et al.*, 1997; WARDELL *et al.*, 1999; MATUSAN *et al.*, 2001; YON *et al.*, 2005).

Alterações no perfil enzimático da proteína NS3hel poderiam constituir um dos mecanismos pelos quais as mutações nos resíduos LeuNS3₄₃₅Ser e LeuNS3₄₈₀Ser estariam modulando a infectividade e replicação viral, conforme os fenótipos observados por Desprès *et al.* (1998), Bordignon, *et al.* (2007), Borba (2010) e Strottmann (2013). Neste trabalho nós demonstramos que a atividade ATPase da proteína NS3hel FGA/89 é estimulada pelo aumento da concentração de RNA. Outros trabalhos na literatura corroboram esse dado (GEBHARD *et al.*, 2012; LI *et al.*, 1999; YON *et al.*, 2005). Acredita-se que a ligação da proteína ao RNA promove uma alteração conformacional que favorece a hidrólise do ATP (LI *et al.*, 1999). Yon *et al.* (2005) demonstraram que mutações no motivo RKRK da NS3hel, motivo conservado entre os flavivírus e responsável pela interação com o RNA, levam a diminuição das atividades ATPase e helicase em DENV-2.

Nossos dados demonstram que as proteínas mutantes NS3209Mut, NS3435Mut e NS3480Mut apresentam maior eficiência catalítica (determinada pelos valores de k_{cat}/K_M) quando comparadas com a proteína parental (NS3hel FGA/89).

Além disso, as mutações também parecem conferir maior afinidade da enzima pelo substrato (valores de K_M) enquanto o número de renovação (*turnover*) da enzima, dado pelos valores de k_{cat} , apresenta pouca variação entre as proteínas mutadas e a parental. Embora as mutações estudadas nesse trabalho não estejam localizadas no sítio ativo de ligação do ATP, alterações da atividade enzimática são observadas, provavelmente, por promoverem alterações conformacionais na proteína que modificam a ligação com o substrato e capacidade de hidrolisar ATP. Nós especulamos que as mutações no domínio II da proteína NS3hel poderiam modificar a interação da proteína com a molécula de RNA e promover alterações no processo replicativo do vírus, de acordo com o modelo proposto por Sampath e colaboradores (2006). Porém a alteração da capacidade hidrolítica de ATP por si só talvez não seja o único mecanismo pelo qual as mutações modulem a virulência do vírus. Como citado anteriormente, modificações na atividade ATPase podem refletir na atividade helicase, promovendo aumento ou diminuição dessa função. Além disso, as atividades RTPase, NTPase e helicase da NS3 são mutuamente reguladas pela ligação do Mg^{2+} . Assim sendo, mutações que alterem a ligação do cátion podem anular as três atividades da proteína, como mostrado por Benarroch *et al.* (2004).

Em seu trabalho, Borba (2010) mostrou alterações na virulência em camundongos quando infectados com vírus recombinantes contendo as mutações NS3209Mut, NS3435Mut e NS3480Mut. A infecção com os mutantes NS3435Mut e NS3480Mut ocasiona o desenvolvimento de sinais de neurovirulência em camundongos neonatos, similares aos ocasionados pelas variantes neurovirulentas do DENV-1. Enquanto que os animais infectados com o vírus recombinante contendo a mutação NS3209Mut não apresentaram nenhum sinal da doença. Os resultados dos ensaios *in vitro* de atividade ATPase obtidos no presente estudo, sugerem que as mutações nos resíduos LeuNS3₄₃₅Ser e LeuNS3₄₈₀Ser promovem alterações na atividade ATPase da proteína, contribuindo para os fenótipos observados por Borba (2010). No entanto, a mutação no resíduo ValNS3₂₀₉Ile mesmo apresentando um aumento na eficiência catalítica da enzima e maior afinidade pelo substrato, não é suficiente para modular a atividade replicativa do vírus *in vitro* e *in vivo*. Matusan *et al.* (2001), mostrou que um aumento da hidrólise de ATP pode estar relacionado com um aumento ou diminuição da atividade helicase, dependendo do resíduo onde a mutação ocorre. As alterações da atividade de ATPase, observadas nesse estudo, poderiam, portanto, estar modulando a atividade helicase da proteína NS3. Diante

desse cenário, os dados sobre a atividade ATPase aqui mostrados devem ser comparados com ensaios de atividade helicase destas proteínas para melhor compreender os mecanismos pelos quais essas mutações modulam a replicação viral.

Outra hipótese de como essas mutações estariam regulando o fenótipo viral, seria por promover uma alteração da interação da NS3 com outras proteínas virais ou da célula hospedeira. Uma das proteínas que se associa intimamente com a NS3 é a proteína NS5. A interação entre elas ocorre através dos domínios helicase da NS3 (aminoácidos 303-618) e RNA polimerase da NS5 (aminoácidos 320-368) e ambas interagem com o RNA viral e com outras proteínas virais para formar o complexo replicativo (JOHANSSON *et al.*, 2001). Cui *et al.* (1998) Yon *et al.* (2005) mostraram que a interação da proteína NS3 com a proteína NS5 estimula a atividade NTPase e RTPase da NS3. O mecanismo envolvido nesse estímulo de atividade ainda não foi caracterizado. Nós especulamos que as mutações NS3435Mut e NS3480Mut, localizadas no topo do subdomínio II da proteína NS3, poderiam modular a interação desta molécula com a proteína NS5 e modificar as suas atividades enzimáticas e, assim, resultar no aumento da aptidão viral observada nos modelos de estudo.

Com o intuito de estudar a interação entre a proteína NS5RdRp com as proteínas NS3hel mutantes, nos propusemos a expressar e purificar esse domínio. Para tanto, nos baseamos no protocolo descrito por Yap *et al.* (2007). Entretanto, como mostrado anteriormente nesse trabalho, a expressão da proteína não foi bem sucedida nessas condições. Uma análise da composição de aminoácidos entre a proteína NS5RdRp de DENV-1 cepa FGA/89 (GenBank AF226687.2) e de DENV-3 (GenBank AY662691.1), utilizada por Yap *et al.* (2007), apontou 118 aminoácidos de diferença entre as sequências. No entanto, testes de expressão em cepas de *E. coli* indicaram que a proteína de DENV-1 estava sendo expressa em Rosetta 2 na forma insolúvel e, em menor proporção, na forma solúvel.

A análise eletroforética do teste de purificação da proteína solúvel por afinidade mostra que uma proteína com o mesmo peso molecular da proteína de interesse estava sendo eluída da coluna. No entanto, não foi observada marcação da proteína em *western blotting* com o anticorpo anti-hexahistidina. Além disso, o cromatograma da purificação mostra que a proteína foi eluída em uma concentração muito baixa de imidazol. Esses resultados nos fizeram levantarmos a hipótese de que

a cauda de histidina da proteína pudesse estar sendo degradada por proteases bacteriana. Por se tratar de um íon bivalente, o níquel necessita apenas de duas moléculas de histidina para estabilizar sua carga. Sendo assim, a proteína com parte da etiqueta poderia se ligar à coluna durante a purificação, mas devido ao menor número de moléculas para interação ela se desligaria da coluna com maior facilidade. Essa hipótese também poderia explicar a ausência de marcação da proteína por *western blotting* quando reagida com anticorpos anti-hexahistidina. Para esclarecer os resultados observados nesses experimentos, a sequência de aminoácidos da proteína que estava sendo expressa e purificada foi analisada por espectrometria de massas, evidenciando que a proteína que estava sendo expressa e purificada tratava-se de uma proteína de *E. coli*. No entanto, como a última fração coletada a partir da purificação por afinidade ao níquel (fração 25) apresenta marcação com anticorpo anti-hexahistidina, sua sequência de aminoácidos será analisada por espectrometria de massas e, caso confirme-se que se trata da proteína NS5RdRp, novos testes serão realizados para melhorar o rendimento de expressão.

Paralelamente à purificação da proteína na forma solúvel, foram realizadas purificações da fração insolúvel da proteína NS5RdRp, a partir de corpúsculos de inclusão gerados pela agregação da proteína recombinante (SCHUMANN; FERREIRA, 2004). Mesmo após um tratamento para reenovelamento das proteínas na forma insolúvel, sua utilização para ensaios enzimáticos não é recomendada por poder apresentar uma estrutura diferente da proteína nativa. No entanto, esse polipeptídeo reenovelado pode ser utilizado para outros fins, como a produção de anticorpos monoclonais.

6 CONCLUSÃO

- A proteína NS3hel FGA/89 tem sua atividade ATPase estimulada pelo aumento da concentração de RNA dupla fita;
- As proteínas NS3hel com as mutações ValNS3₂₀₉Ile, LeuNS3₄₃₅Ser e LeuNS3₄₈₀Ser apresentam maior eficiência catalítica e maior afinidade pela molécula de ATP quando comparadas com a proteína parental do vírus DENV-1 FGA/89;
- A expressão da proteína NS5RdRp na forma solúvel não foi eficiente no sistema utilizado e outras estratégias de clonagem e expressão deverão ser utilizadas para dar continuidade aos trabalhos realizados.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar os ensaios de atividade ATPase com a proteína NS3hel209/480Mut, que apresenta as duas mutações observadas na variante neuroadaptada FAG/NA P6, e determinar seus valores de k_{cat} , K_M e k_{cat}/K_M .
- Realizar ensaios de atividade helicase com as proteínas NS3helFAG/89, NS3hel200Mut, NS3hel209Mut, NS3hel435Mut, NS3hel480Mut e NS3hel209/480Mut.
- Analisar a sequência de aminoácidos da fração 25 da purificação por afinidade ao níquel da proteína NS5RdRp por espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, E. G.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R. Revisiting Dengue Virus–Host Cell Interaction: New Insights into Molecular and Cellular Virology. In: Maramorosch, K.; Murphy, F. A. **Advances in Virus Research**. 2014.
- ALEN, M. M.; SCHOLS, D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. **Journal of Tropical Medicine**. p. 628475-88, 2012.
- ANGEL, R. M.; VALLE, J. R. Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. **Plos pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.
- ARIAS, C.F; PREUGSCHAT, F; STRAUSS, JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. **Virology**, v. 193, n.2, p. 888-99, 1993.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Cadernos de Estudos Avançados**, v. 22, p. 53-72, 2008.
- BENARROCH, D.; SELISKO, B.; LOCATELLI, G. A.; MAGA, G.; ROMETTE, J. L.; CANARD, B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of dengue virus protein NS3 are Mg²⁺ - dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. **Virology**. v. 328, p. 208-18, 2004.
- BORBA, L. de. **Dengue: Caracterização de marcadores moleculares de virulência utilizando a tecnologia de genomas infecciosos**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BORBA, L., DE; STROTTMANN, D. M.; NORONHA, L. DE, MASON, P. W., DUARTE DOS SANTOS, C.N. Synergistic Interactions between the NS3hel and E Proteins Contribute to the Virulence of Dengue Virus Type 1. **Plos Neglected Tropical Disease**. v. 6, n.4, p.e1624, 2012.
- BORDIGNON, J.; STROTTMAN, D.M.; MOSIMANN, A.L.P.; PROBST, C.M.; STELLA, V.; NORONHA, L.; ZANATA, S.M.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Dengue Neurovirulence in Mice: Identification of Molecular Signatures in E and NS3 Helicase Domains. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 10, p. 1506-1517, 2007.
- CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990
- CHAMBERS, T.J.; MONATH, T.P. The flaviviruses: structure, replication and evolution. In: **Advances in virus research**. v. 59, 2003
- CHIU, W.; KINNEY, R.M.; DREHER, T.W. Control of translation by the 5'- and 3'-

terminal regions of the dengue virus genome. **Journal of Virology**, v. 79, n.13, p. 8303-8315, 2005.

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**, v.246, n.2, p.409-17, 1998.

DESPRÈS P.; FRENKIEL M.P.; CECCALDI P.E.; DUARTE DOS SANTOS C.N.; DEUBEL V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. **Journal of Virology**. v.72, p.823–829, 1998.

EFFLER, P.V.; PANG, L.; KITSUTANI, P.; VORNDAM, V.; NAKATA, M.; AYERS, T.; ELM, J.; TOM, T.; REITER, P.; RIGAU-PEREZ, J. G.; HAYES, J. M.; MILLS, K.; NAPIER, M.; CLARK, G. G.; GUBLER D. J. Dengue Fever, Hawaii, 2001–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, maio de 2005.

EGLOFF, M. P., D. BENARROCH, B. SELISKO, J. L. ROMETTE, AND B. CANARD. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 2757–2768, 2002.

FAIRMAN-WILLIAMS, M. E.; GUENTHER, U.; JANKOWSKY, V. SF1 and SF2 helicases: family matters. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 20, n. 3, p. 313–324, junho de 2010.

FERREIRA, M.L.B.; CAVALCANTI, C.G.; COELHO, C.A.; MESQUITA, S.D. Manifestações neurológicas de dengue: estudo de 41 casos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, n. 2-B, p. 488-493, 2005.

GEBHARD, L. G.; KAUFMAN, S. B.; GAMARNIK, A. V. Novel ATP-Independent RNA Annealing Activity of the Dengue Virus NS3 Helicase. **Plos one**, v. 7, n. 4, 2012.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-96, 1998.

HEILEK, G. M.; PETERSON, M. G. A Point Mutation Abolishes the Helicase but Not the Nucleoside Triphosphatase Activity of Hepatitis C Virus NS3 Protein. **Journal of Virology**, v. 71, n. 8, p. 6264–6266, agosto de 1997.

JOHANSSON, M.; BROOKES, 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- β and the viral helicase, NS3. **Journal of General Virology**, v.82, p.735-745, 2001.

KAMGANG, B.; BRENGUES, C.; FONTENILLE, D.; NJIOKOU, F.; SIMARD, F.; PAUPY, C. Genetic Structure of the Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). **Plos one**, maio de 2011.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.19100-19106, 1995.

KIM, D. W.; KIM, J.; GWACK, Y.; HAN, J. H.; CHOE, J. Mutational Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Helicase. **Journal of Virology**, v. 71, n. 12, p. 9400–9409, 1997.

KOKERNOT, R.H.; SMITHBURN, K.C.; WEINBREN, M.P. Neutralizing antibodies to arthropod-borne viruses in human beings and animals in the Union of South Africa. **The Journal of Immunology**, v.77, n.5, p.313-23, 1956.

LI, H.; CLUM, S.; YOU, S.; EBNER, K.E.; PADMANABHAN, R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. **Journal of Virology**. v. 73, n. 4, p. 3108-16, 1999.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.; RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5° Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007. p. 1101-152, 2007.

LUO, D.; WEI, N.; DOAN, D. N.; PARADKAR, P. N.; CHONG, Y.; DAVIDSON, A. D.; KOTAKA, M.; LESCAR, J.; VASUDEVAN, S. G. Flexibility between the protease and helicase domains of the dengue virus NS3 protein conferred by the linker region and its functional implications. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 24, p.18817-27, 2010.

MALET, H.; MASSÉ, N.; SELISKO, B.; ROMETTE, J.; ALVAREZ, K.; GUILLEMOT, J. C.; TOLOU, H.; YAP, T. L.; VASUDEVAN, S.; LESCAR, J.; CANARD, B. The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. **Antiviral Research**, v. 80, p. 23–35, 2008.

MATUSAN, A.E.; PRYOR, M.J.; DAVIDSON, A.D.; WRIGHT, P.J. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. *J Virol*, v.75, n.20, p.9633-43, 2001.

SABIN, A.B. Research on dengue during World War II. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.1, p.30-50, 1952.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, p. 313-19, 2004.

MORRISON, J.; AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Innate immunity evasion by dengue virus. **Viruses**, v.4, p.397-413, 2012.

PERERA, R; KUHN, R.J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, n.4, p.1-9, 2008.

PRYOR, M.J.; RAWLINSON, S.M.; BUTCHER, R.E.; BARTON, C.L.;

WATERHOUSE, T.A.; VASUDEVAN, S.G.; BARDIN, P.G.; WRIGHT, P.J.; JANS, D.A.; DAVIDSON, A.D. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. **Traffic**, v.8, p.795-807, 2007

PYLE, A. M. Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA Helicases. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, p. 317–336, 2008.

RANEY, K. D.; SHARMA, S. D.; MOUSTAFA, I. M.; CAMERON, C. E. Hepatitis C Virus Non-structural Protein 3 (HCV NS3): A Multifunctional Antiviral Target. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 30, p. 22725–22731, julho de 2010.

SABIN, A.B.; SCHLESINGER, R.W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v.101, p.640-642, 1945.

SAMPATH, A.; XU, T.; CHAO, A.; LUO, D.; LESCAR, J.; VASUDEVAN, S.G. Structure- Based Mutational Analysis of the NS3 Helicase from Dengue Virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 13, p. 6686–90, 2006.

SANTOS, C. N. D.; FRENKIEL, M. P.; COURAGEOT, M. P.; ROCHA, C. F.; VAZEILLE-FALCOZ, M. C.; WIEN, M. W.; REY, F. A.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**. v. 274, n. 2, p. 292-308, 2000.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in Escherichia coli. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 442-453, 2004.

STIASNY, K.; FRITZ, R.; PANGERL, K.; HEINZ, F. X. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. **Amino Acids**, v. 41, p. 1159–1163, 2011.

STROTTMANN, D. M. **Neuroadaptação de vírus dengue em modelo murino: identificação de marcadores moleculares**. p. 117. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

STROTTMANN, D. M. **Vírus da dengue: novas abordagens para o estudo da Neuropatogênese**. p.179. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

WARDELL, A. D.; ERRINGTON, W.; CIARAMELLA, G.; MERSON, J.; MCGARVEY, M. J. Characterization and mutational analysis of the helicase and NTPase activities of hepatitis C virus full-length NS3 protein. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 701–709, 1999.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7221–7228, 2011.

WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D. J. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. **Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 6, p. 1377-1390, 2008.

WILDER-SMITH, A.; RENHORN, K.; TISSERA, H.; BAKAR, S. A.; ALPHEY, L.; KITTAYAPONG, P.; LINDSAY, S.; LOGAN, J.; HATZ, C.; REITER, P.; ROCKLOFF, V. J.; BYASS, P.; LOUIS, V. R.; TOZAN, Y.; MASSAD, E.; TENORIO, A.; LAGNEAU, C.; L'AMBERT, G.; BROOKS, D.; WEGERDT, J.; GUBLER, D. DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. **Glob Health Action**, v. 5, n. 17273, 2012

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Suíça, 2009

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Suíça, 2013. Second WHO report on neglected diseases.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **A global brief on vector-borne diseases**. Suíça, 2014.

YAP, T. L.; XU, T.; CHEN, Y.; MALET, H.; EGLOFF, M.; CANARD, B.; VASUDEVAN, S. G.; LESCAR, J. Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution. **Journal of Virology**, p. 4753–4765, maio 2007.

YON, C.; TERAMOTO, T.; MUELLER, N.; PHELAN, J.; GANESH, V. K.; MURTHY, K. H. M.; PADMANABHAN, R. Modulation of the Nucleoside Triphosphatase/RNA Helicase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Dengue Virus Type 2 Nonstructural Protein 3 (NS3) by Interaction with NS5, the RNA-dependent RNA Polymerase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 29, p. 27412–27419, julho de 2005.

YOU, S.; FALGOUT, B.; MARKOFF, L.; PADMANABHAN, R. *In Vitro* RNA Synthesis from Exogenous Dengue Viral RNA Templates Requires Long Range Interactions between 5'- and 3'-Terminal Regions That Influence RNA Structure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15581–15591, maio de 2001.