

Emmerson Corrêa Brasil da Costa

“Caracterização termodinâmica e funcional da
proteína não estrutural 3 (NS3) do vírus da dengue
do tipo 2”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Março de 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ)
Centro de Ciências da Saúde (CCS)
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF)
Programa de Biologia Molecular e Estrutural (PBME)
Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica)

"Caracterização termodinâmica e funcional da proteína não estrutural 3 (NS3) do vírus da dengue do tipo 2"

Emmerson Corrêa Brasil da Costa

Tese de doutorado submetida à Pós-Graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF-UFRJ / Programa de Biologia Molecular e Estrutural - PBME) visando à obtenção do grau de doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Rio de Janeiro

Março/2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ)
Centro de Ciências da Saúde (CCS)
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF)
Programa de Biologia Molecular e Estrutural (PBME)
Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica)

**“Caracterização termodinâmica e funcional da proteína não
estrutural 3 (NS3) do vírus da dengue do tipo 2”**

Emmerson Corrêa Brasil da Costa

Tese de doutorado submetida à Pós-Graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (**IBCCF-UFRJ** / Programa de Biologia Molecular e Estrutural - **PBME**) visando à obtenção do grau de doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Rio de Janeiro

Março/2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ)
Centro de Ciências da Saúde-Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica)
(Programa de Biologia Molecular e Estrutural)

"Caracterização termodinâmica e funcional da proteína não estrutural 3 (NS3)
do vírus da dengue do tipo 2."

Emmerson Corrêa Brasil da Costa

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges

Aprovado em __ / __ /2009 ASS: _____

Aprovado em ____ de _____ de 2009 pela banca examinadora:

Integrante da Banca: Prof. Dr. Mauro Eduardo Weyne Ferreira da Costa
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ.

Integrante da Banca: Prof. Dr. Luis Maurício Trambaioli Rocha e Lima
Faculdade de Farmácia – UFRJ.

Integrante da Banca: Prof. Dr. Julio Alberto Mignaco
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ.

Revisora: Prof. Dra. Wanda Maria Almeida von Krüger
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ.

Suplente Interno: Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ.

Suplente Externo: Prof. Dr. Cláudio Akio Masuda
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ.

Rio de Janeiro - 2009

Costa, Emmerson Corrêa Brasil da

“Caracterização termodinâmica e funcional da proteína não estrutural 3 (NS3) do vírus da dengue do tipo 2” / Emmerson Corrêa Brasil da Costa – 2008.

p. xxiii; 153

Orientador: Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges.

Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Pós-graduação em Biofísica, Programa de Biologia Molecular e Estrutural.

1. Dengue 2
2. Proteína Não Estrutural
3. NS3
4. Helicase
5. Protease

I – Mohana-Borges, Ronaldo.

II – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Pós-graduação em Biofísica, Programa de Biologia Molecular e Estrutural.

Dedico este trabalho aos meus familiares, cuja compreensão foi imprescindível para a concretização deste projeto, e a todos os laboratórios que disponibilizaram seus equipamentos para a realização dos experimentos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter me iluminado em mais esta jornada.

A Soraya, minha esposa e amiga, pelo carinho, amor, incentivo e principalmente paciência.

Ao meu filho Matheus, pelo carinho e amor.

Aos meus pais Adalberto e Abigail, por todo apoio, incentivo, confiança e por terem me ensinado a enfrentar os desafios com dignidade e honra.

As minhas irmãs Priscylla e Claudinha, e sobrinha Eloá, pelo carinho e ajuda nos momentos mais difíceis.

Ao orientador Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges, agradeço a oportunidade, paciência, confiança, estímulo, e por disponibilizar os recursos necessários para o desenvolvimento desta tese.

Ao meus estagiários de Iniciação Científica Gustavo Tavares Ventura e Ana Carla Olípio que me auxiliaram na bancada. Sem a ajuda deles, muitos resultados não estariam nesta tese.

Ao Francisco Souza, pelas dicas de trabalho e os momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

Aos colegas Diego Alonso, Eduardo Rabello, Fabrício Belgrano, Marcela, Estefani, Emiliana, Renata, Tamara do Laboratório de Genômica Estrutural pelo convívio diário.

A todos os professores do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos laboratórios do CCS que disponibilizaram os equipamentos e reagentes necessários para o desenvolvimento das pesquisas.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro que foi indispensável.

“Foi uma caminhada cheia de obstáculos, mas valeu a pena. Sentirei saudades”.

Lista de Figuras

	Página
Figura 1: Imagem do mosquito hematófago <i>Aedes aegypti</i> fêmea, picando a pele humana.	02
Figura 2: Distribuição global das áreas de transmissão do vírus da dengue e áreas infectadas com <i>A. aegypti</i> em 2005.	03
Figura 3: Introdução, expansão e dispersão do DENV dos tipos 1 e 2 no Brasil.	05
Figura 4: Número de casos de DHF/DSS e o resultado dos óbitos por infecção pelo vírus da dengue relatados no Brasil entre 1990 e 2006.	07
Figura 5: Classificação dos flavivírus.	09
Figura 6: Distribuição global dos flavivírus neurotrópicos.	10
Figura 7: Organização do genoma viral do vírus da dengue e representação esquemática do processamento proteolítico da poliproteína .	11
Figura 8: Diagrama esquemático da composição do flavivírus imaturo e maturo.	12
Figura 9: Representação esquemática do ciclo de replicação do DENV.	15
Figura 10: Modelo proposto para a formação do complexo de replicação e iniciação do síntese do RNA fita simples polaridade negativa nos flavivírus.	16
Figura 11: Representação esquemática da suposta interação entre a NS2B com a membrana celular e a NS3 protease.	18
Figura 12: Representação esquemática da estrutura da NS2BCF40glyNS3Pro do DENV-2.	20
Figura 13: Representação esquemática na NS3 íntegra.	21
Figura 14: Alinhamento das sequências de aminoácidos do domínio helicase	

dos vírus DENV, WNV, JEV, TBEV e HCV.	23
Figura 15: Representação esquemática da estrutura da NS3helicase do DENV-2.	24
Figura 16: Representação esquemática da estrutura da NS3 protease-helicase do DENV-4.	26
Figura 17: Estratégia utilizada para obtenção dos moldes para amplificação das CF40-NS3Pro168aa, CF40-NS3Pro185aa e CF40-NS3íntegra.	39
Figura 18: Esquema dos vetores pET21dEZ e pET21dHisTev utilizados para expressão.	40
Figura 19: Esquema das moléculas das proteínas recombinantes e diagrama de <i>Ribbon</i> .	41
Figura 20: Gel de SDS-PAGE a 12% demonstrando a expressão da proteína 6xHis-TEV-NS2BCF40glyNS3Pro185aa em diferentes cepas de <i>E. coli</i> .	68
Figura 21: Gel de SDS-PAGE a 12% mostrando as proteínas purificadas após a excisão da cauda de histidina.	71
Figura 22: Diagrama de <i>Ribbon</i> dos domínios protease (1-168aa) e domínio helicase (169-618aa).	72
Figura 23: Curvas de desnaturação das proteínas recombinantes por ureia (valores de CM espectral).	74
Figura 24: Curva de desnaturação das proteínas recombinantes por ureia (valores demonstram grau de desnaturação).	76
Figura 25: Gráfico de ΔG em função da concentração de ureia da NS3 íntegra, NS3Pro168aa e NS3 helicase.	76
Figura 26: : Desnaturação do domínio NS3 helicase por ureia monitorada pela área espectral de emissão de fluorescência do bis-ANS	78

- Figura 27:** Estrutura do domínio NS3 helicase do HCV e curva de desnaturação desta enzima por ureia. 80
- Figura 28** Espectro de emissão de fluorescência do NS3Pro168aa após o renovelamento e descongelamento. 81
- Figura 29:** Supressão de fluorescência da proteína NS3 íntegra e dos domínios NS3 helicase e NS3pro168aa por acrilamida. 83
- Figura 30:** Mapa de superfície dos domínios NS3Pro168aa e NS3Pro185aa. 84
- Figura 31:** Curvas de desnaturação da NS3pro168aa e NS3pro185aa por ureia. 86
- Figura 32:** Supressão de fluorescência das NS3pro168 e NS3pro185 por acrilamida. 87
- Figura 33:** Curvas de desnaturação e de supressão de fluorescência por acrilamida das proteínas NS3Pro185aa e CF40-NS3Pro185 por uréia. 88
- Figura 34:** Perfil de agregação das proteínas recombinantes em pH ácido e básico. 90
- Figura 35:** Mudanças conformacionais das proteínas recombinantes em pH ácido e básico. 92
- Figura 36:** Ensaio de interação proteína-proteína (*pull-down*). 94
- Figura 37:** Ensaio de *Western-blot* utilizando anticorpo anti- NS3Pro do DENV-2. 95
- Figura 38:** Teste de atividade proteolítica das proteínas NS3Pro168aa, NS3Pro185aa e NS3 íntegra com o cofator His-Ubiq-NS2BCF40 96
- Figura 39:** Estrutura do domínio da NS3 protease e alinhamento do segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵. 97

Figura 40: Atividade proteolítica da CF40-NS3Pro185aa em pH 8,5.	100
Figura 41: Análise da atividade enzimática da construção NS2B-NS3Pro185 em diferentes condições de pH.	100
Figura 42: Caracterização termodinâmica da CF40-NS3Pro185aa em diferentes condições de pH.	102
Figura 43: Análise da interação do bis-ANS com as proteínas NS3Pro185aa e CF40-NS3Pro185aa na ausência do substrato Ac-RTSKKR-pNA.	104
Figura 44: Análise da atividade ATPásica das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase em função do pH.	106
Figura 45: Análise da atividade ATPásica das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase em função da concentração do substrato e diferentes pHs.	107
Figura 46: Mapa de superfície da NS3 helicase do DENV-2 e da NS3 íntegra com cofator NS2B.	109
Figura 47: Valores de centro de massa espectral e LS em diferentes pHs das proteínas NS3 íntegra e domínio helicase, na presença de MgCl ₂ .	111
Figura 48: Supressão de fluorescência por acrilamida e titulação por bis-ANS das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase, na presença de MgCl ₂ .	112
Figura 49: Ligação do ATP à NS3 íntegra e à NS3 helicase na ausência de MgCl ₂ .	114
Figura 50: Ligação do ATP à proteína NS3 helicase em pH5,5.	117
Figura 51: Visualização do potencial de superfície eletrostática da NS3 íntegra do DENV4.	119

Figura 52: Caracterização das propriedades enzimáticas das proteínas NS3 helicase e NS3 íntegra na presença de bis-ANS.	120
Figura 53: Curva de desnaturação da NS3 helicase por ureia em pH 6,4 e 7,2	125
Figura 54: Espectros de emissão de fluorescência extrínseca do bis-ANS quando ligado à NS3 helicase em pH 6,4 e 7,2.	126
Figura 55: Ensaio de atividade helicásica do domínio NS3 helicase sobre a fita dupla de DNA.	127
Figura 56: Alinhamento de sequências de aminoácidos da NS3 íntegra dos quatro sorotipos do DENV.	131
Figura 57: Alinhamento de sequências de aminoácidos da NS3 íntegra dos quatro sorotipos do DENV e dos diversos flavivírus.	132
Figura 58: Árvore filogenética da NS3 íntegra de 16 espécies de flavivírus e dos quatro sorotipos do DENV.	133
Figura 59: Análise comparativa do comportamento dinâmico da NS3 íntegra do DENV-4 com a NS3 helicase do DENV-2.	136
Figura 60: Potencial de superfície eletrostática do sítio de interação ao ATP da NS3 helicase do DENV-4.	137

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1: Cepas de <i>Escherichia coli</i> com seus respectivos genótipos.	32
Tabela 2: Iniciadores utilizados para amplificação dos genes NS3 e NS2B por PCR.	36
Tabela 3: Combinação de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse por PCR.	38
Tabela 4: Tampões utilizados para a lise celular e purificação das proteínas recombinantes.	47
Tabela 5: Características físico-químicos das proteínas recombinantes e o total de resíduos de Trp, Tyr e Phe por proteína.	50
Tabela 6: Parâmetros termodinâmicos de desnaturação das proteínas recombinantes.	77
Tabela 7: Valores de K_{sv} , CM e ΔCM das proteínas recombinantes.	83
Tabela 8: Valores da K_{sv} e K_b referentes aos dados das Figuras 42 A e B.	103
Tabela 9: Propriedades cinéticas da NS3 íntegra e NS3 helicase em diferentes pHs.	108
Tabela 10: Valores das constantes de supressão de fluorescência por acrilamida, ΔCM e LS das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase em diferentes pHs.	113
Tabela 11: Valores das constantes de supressão de fluorescência do Trp por ATP e de ligação de bis-ANS nas proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase em diferentes pHs.	114

Tabela 12: Valores de coeficiente angular das regressões lineares dos dados da Figura 52.	120
Tabela 13: Parâmetros termodinâmicos de desnaturação das proteínas recombinantes NS3 helicase e NS3 íntegra em pH 6,4 e 7,2.	126

Lista de Siglas e Abreviaturas

AA – aminoácido

Ala – alanina

Arg – arginina

ASA – área de acessibilidade ao solvente

Asp – asparagina

Asp⁷⁵ – asparagina na posição 75

ADP – *adenosine diphosphate* (adenosina difosfato)

ATP – *adenosine triphosphate* (adenosina trifosfato)

bis-ANS – *4,4'-bis-1-anilino-naphthalene-8-sulfonate*

β-ME – β-mercaptoetanol

BVDV – *bovine viral diarrhoea virus* (vírus da diarreia viral bovina)

C – proteína capsídica

CAP – *capping* (capeamento)

CAPS – *N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*

CD – *circular dichroism* (dicroísmo circular)

CHAPS – *3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate*

cDNA – *complementary deoxyribonucleic acid* (ácido desoxinucleico complementar)

CF – cofator

CM – centro de massa espectral

cm – centímetros

CTP – *cytosine triphosphate* (citosina trifostato)

Da – Daltons

DC-SIGN – *dendritic-cell-specific-ICAM-grabbing non-integrin*

ddNTP – *dideoxynucleotide phosphatase* (dideoxiribonucleotídeo trifosfato)

DENV – *dengue virus* (vírus da dengue)

DENV-1 – *dengue virus serotype 1* (vírus da dengue sorotipo 1)

DENV-2 – *dengue virus serotype 2* (vírus da dengue sorotipo 2)

DENV-3 – *dengue virus serotype 3* (vírus da dengue sorotipo 3)

DENV-4 – *dengue virus serotype 4* (vírus da dengue sorotipo 4)

DF – *fever dengue* (febre por dengue)

DHF – *dengue hemorrhagic fever* (febre por dengue hemorrágica)

DMSO – *dimethyl sulfoxide*

DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxinucleico)

DSS – *dengue shock syndrome* (síndrome do choque por dengue)

DTT – *dithiothreitol*

E – glicoproteína de envelope

EDTA – ácido etileno-diamino tetracético

EDTA – ácido etileno-diamino tetracético

E⁶⁶ – ácido glutâmico na posição 66

F – *forward*

G⁸⁰ – glicina na posição 80

Gln – glutamina

Gly – glycine (glicina)

GTP – *guanosine triphosphate* (guanosina trifostato)

HCV – *hepatitis C virus* (vírus da hepatite C)

His – histidina

His⁵¹ – histidina na posição 51

IPTG – *isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*

JEV – *japasese encephalitis virus* (vírus da encefalite japonesa)

K²⁰¹ – lisina na posição 201

K_a – constante de associação

kb – quilo bases

k_{cal} – quilocaloria

k_{cat} – constante catalítica

k_{cat}/K_M – eficiência catalítica

K_{eq} – constante de equilíbrio

K_M – constante de Michaelis-Menten

K_{sv} – constante de Stern-Volmer

kDa – kilo Daltons

LS – *ligh scattering* (espalhamento de luz)

Lys – lisina

K²⁰¹ – lisina na posição 201

M – proteína de membrana ou molar

MCS – *multiple cloning site* (sítio múltiplo de clonagem)

m – área de acessibilidade ao solvente

MVL - membranas vesiculares lisas

N⁴⁶⁴ – asparagina a posição 464

NRBP – *nuclear receptor binding protein* (proteína de ligação a receptores nucleares)

NS – *non structural protein* (proteína não-estrutural)

NTA – *nitrilo triacetic acid* (ácido nitrilotriacético)

P⁴⁶⁵ – prolina na posição 465

pb – pares de base

PCR – *polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PDB – *Protein Data Bank*

P-loop – *loop* de ligação com o fosfato

pNA – para-nitroanilida

PNPP – *p-nitro-phenil-phosphate* (p-nitro fenil fostato)

Pfx – DNA polimerase derivada de *Pyrococcus* sp.

prM – proteína pré-M (membrana)

ORF – *open reading frame* (janela aberta de leitura)

RdRp – RNA dependente de RNA polimerase

R – *reverse* ou constante dos gases

R⁶⁴ – arginina na posição 64

RC – *replication complex* (complexo de replicação)

RE – retículo endoplasmático

RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

SAXS – *small angle X-ray scattering* (espalhamento de luz em baixo ângulo)

SDS – *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

Ser – serina

Ser¹³⁵ – serina na posição 135

SF – superfamília

SOE-PCR – *Splicing overlapping extension – polymerase chain reaction*

TAE – tampão tris ácido acético EDTA-Na₂

TBE – tampão tris borato EDTA-Na₂

TBST – Tris-Buffered Saline Tween-20

TBEV – *tick-borne encephalitis virus*

TCA – ácido tricloroacético

TGN – trans-Golgi

T_m – *temperature melting* (temperatura de dissociação)

Tris – trihidroximetil aminometano

Trp – triptofano

WNV – *West Nile virus* (vírus do oeste do Nilo)

U – unidade (s)

UTR – *untranslated region* (região não traduzida)

YFV – *yellow fever virus* (vírus da febre amarela)

[γ ³²P]dATP – 2' desoxiadenosina 5' trifosfato marcado com fósforo 32

μ Ci – microcurie

Δ G – Energia livre

Δ CM – variação do centro de massa espectral

Sumário

	Página
Agradecimentos	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xiv
Sumário	xix
Resumo	xii
Abstract	xxiii
I) INTRODUÇÃO	01
I.1) Dengue e epidemiologia da doença	02
I.2) Estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra o DENV2	06
I.3) Os flavivírus	08
I.4) Estrutura viral e ciclo de replicação do DENV	10
I.5) Proteína não estrutural 3 (NS3)	17
I.5.1) Domínio NS3 protease	17
I.5.2) Domínio NS3 helicase	20
I.5.3) NS3 íntegra	25
II) OBJETIVOS	28
III) MATERIAL E MÉTODOS	30
III.1) Desenho experimental	31
III.2) Cepas bacterianas, preparação de células competentes e transformação	31
III.2.1) Bactérias utilizadas nos procedimentos de clonagem e expressão	31
III.2.2) Preparação de células competentes para eletroporação	32
	xix

III.2.3) Preparação de células competentes para choque térmico	33
III.2.4) Transformação por eletroporação e choque térmico	34
III.3) Construção dos plasmídeos recombinantes	35
III.4) Expressão e purificação das proteínas de interesses	44
III.4.1) Teste de expressão das proteínas de interesses	44
III.4.2) Teste de solubilidade da proteína	45
III.4.3) Expressão das proteínas	46
III.4.4) Lise celular (proteínas solúveis e em corpo de inclusão)	46
III.4.5) Purificação das proteínas solúveis	47
III.4.6) Purificação das proteínas derivadas de corpo de inclusão	50
III.5) Preparação de anticorpos policlonais para os domínios protease e helicase	52
III.5.1) Ensaio de ELISA	53
III.5.2) Ensaio de <i>Western-blot</i>	54
III.6) Ensaio termodinâmicos	55
III.6.1) Ensaio de espectrofotometria de fluorescência	55
III.6.2) Ensaio de supressão de fluorescência por acrilamida	57
III.6.3) Ensaio de supressão de fluorescência por ATP	59
III.6.4) Ensaio de fluorescência do bis-ANS	60
III.7) Ensaio de atividade	61
III.7.1) Ensaio de hidrólise do ATP (ATPase)	61
III.7.2) Ensaio de atividade helicásica	63
III.7.3) Ensaio de atividade da NS3 protease	64
III.8) Ensaio de interação proteína-proteína - <i>pull-down</i>	64
IV) RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
IV.1) Clonagem, expressão e purificação dos recombinantes da proteína NS3	67

IV.2) Caracterização termodinâmica da proteína NS3 íntegra e de seus domínios protease e helicase	71
IV.3) Caracterização termodinâmica da protease e o efeito do segmento E ¹⁶⁹ -K ¹⁸⁵ e do cofator NS2B na sua estabilidade	84
IV.4) Efeito do pH na estabilidade da proteína NS3	88
IV.5) Interação do cofator NS2B com o domínio NS3 protease	93
IV.6) Avaliação da atividade proteásica e modificações conformacionais	97
IV.7) Avaliação da atividade ATPásica da NS3 do DENV-2	105
IV.8) Correlação da atividade ATPásica com mudanças conformacionais da NS3	110
IV.9) Relevância biológica da estabilidade da NS3 helicase	121
IV.10) Sítio ATPase como potencial alvo para desenho de inibidores do DENV	127
V) CONCLUSÕES	139
VI) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

Resumo

O propósito deste trabalho foi a clonagem, expressão e purificação da proteína NS3 íntegra do DENV-2, seus domínios e complexos isoladamente, com objetivo de avaliar i) a estabilidade da NS3 íntegra e dos domínios protease e helicase; ii) o efeito do domínio protease sobre a atividade NTPásica; e iii) o papel do cofator NS2B na atividade e estrutura da NS3 protease. Utilizamos técnicas espectroscópicas para o monitoramento da fluorescência intrínseca do Trp e ensaios de atividade helicásica, ATPásica e proteásica. Nossos dados termodinâmicos demonstram a importância do domínio protease na estabilidade da NS3 íntegra, e que o interdomínio E¹⁶⁹-K¹⁸⁵ (que conecta os domínios protease e helicase) é importante na modulação da atividade proteolítica, interação da protease com o cofator NS2B, e estabilidade do domínio protease. Observamos que o cofator NS2B fornece maior estabilidade e cooperatividade ao domínio protease em pH básico, além de promover modificações conformacionais que reduzem a exposição de resíduos hidrofóbicos que parecem prejudicar na interação de resíduos dibásicos com a tríade catalítica. Ao avaliar se a baixa atividade ATPásica da NS3 íntegra em comparação com a NS3 helicase estaria associada com a oclusão do motivo Walker A pelo domínio protease, demonstramos que a NS3 helicase apresenta maior atividade ATPase, em pH 6,0, devido à exposição de resíduos hidrofóbicos que favorecem a ligação do ATP. Contudo, em pH fisiológico, a interação do ATP com o motivo Walker A foi maior na NS3 íntegra, demonstrando que a localização do domínio protease sobre o motivo de formação do complexo ATP-Mg²⁺ não interfere na interação. E finalmente, analisando a fenda de interação do ATP na NS3 íntegra dos 4 sorotipos do DENV, identificamos oito resíduos altamente conservados (R⁶⁴, E⁶⁶, G⁸⁰, K²⁰¹, R²⁰², R²⁰⁹, K²¹³ e R²³⁶) circundando esta região de ligação, que podem ser importantes no desenvolvimento de inibidores específicos desta enzima.

Abstract

The aim of this work was the cloning, expression, and purification of the full-length NS3 protein of the DENV-2 as well as its domains and protein complexes, aiming to study i) the thermodynamic stability of the full-length NS3, and of its protease and helicase domains; ii) the effect of the protease domain on ATPase activity; and iii) the effect of the NS2B cofactor on the structure and activity of the protease domain. We used fluorescence spectroscopy to monitor the Trp intrinsic fluorescence, and ATPase, helicase and protease activity assays. Our results thermodynamics showed the importance of the protease domain for the stabilization of the full-length NS3 protein of interdomain peptide (E¹⁶⁹-K¹⁸⁵) for activity, the interaction of the protease domain with cofactor NS2B, and the stability of the protease domain. We observed that the cofactor NS2B promoted not only a higher stability and cooperativity to the protease domain at basic pH, but also conformational changes that decreased the exposure of hydrophobic residues, disfavoring the interaction of dibasic residues with the catalytic triad. When we evaluated whether the decrease ATPase activity of the full-length NS3, in comparison with NS3 helicase, would be associated or not with the occlusion of the Walker A motif by protease domain, our results showed that the NS3 helicase increased ATPase activity at pH 6.0 because of the hydrophobic residue exposure favoring the ATP binding. On the other hand, the interaction of the ATP with Walker A motif was higher in the full-length NS3 than in the NS3helicase, suggesting that the localization of the protease domain on the helicase domain does not interfere with the interaction of the latter with the ATP-Mg⁺². Finally, by analyzing the ATP binding site cleft in the full-length NS3 protein from the four DENV serotypes (DENV-1 to 4), we identified eight highly conserved residues (R⁶⁴, E⁶⁶, G⁸⁰, K²⁰¹, R²⁰², R²⁰⁹, K²¹³ and R²³⁶) surrounding this cleft that can be important in the development of specific inhibitors of that enzyme.

I) INTRODUÇÃO

I.1) Epidemiologia da doença de dengue

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que anualmente ocorram entre 50 a 100 milhões de novos casos de febre por dengue (*Dengue Fever* - DF), e entre 250.000 a 500.000 de casos de dengue hemorrágica (*Dengue Hemorrhagic Fever* - DHF) (Melino e Paci, 2007) principalmente nas regiões tropicais ao redor do mundo (Figueiredo *et al.*, 2008).

O principal vetor de transmissão do vírus da dengue (DENV) é o mosquito *Aedes aegypti* (**Figura 1**) que se encontra em áreas tropicais e subtropicais (**Figura 2**). Este mosquito foi importado da África para a América durante a colonização e a escravidão e disseminou-se para toda a faixa tropical em virtude do seu peculiar modo de reprodução, sendo hoje considerado cosmopolita. O *A. aegypti* tem como criadouros preferenciais os mais variados recipientes de água domiciliares e peridomiciliares (Neves *et al.*, 2000).



Figura 1: Imagem do mosquito hematófago *A. aegypti* fêmea, picando a pele humana (Fonte: *US Centers for Disease Control and Prevention*).

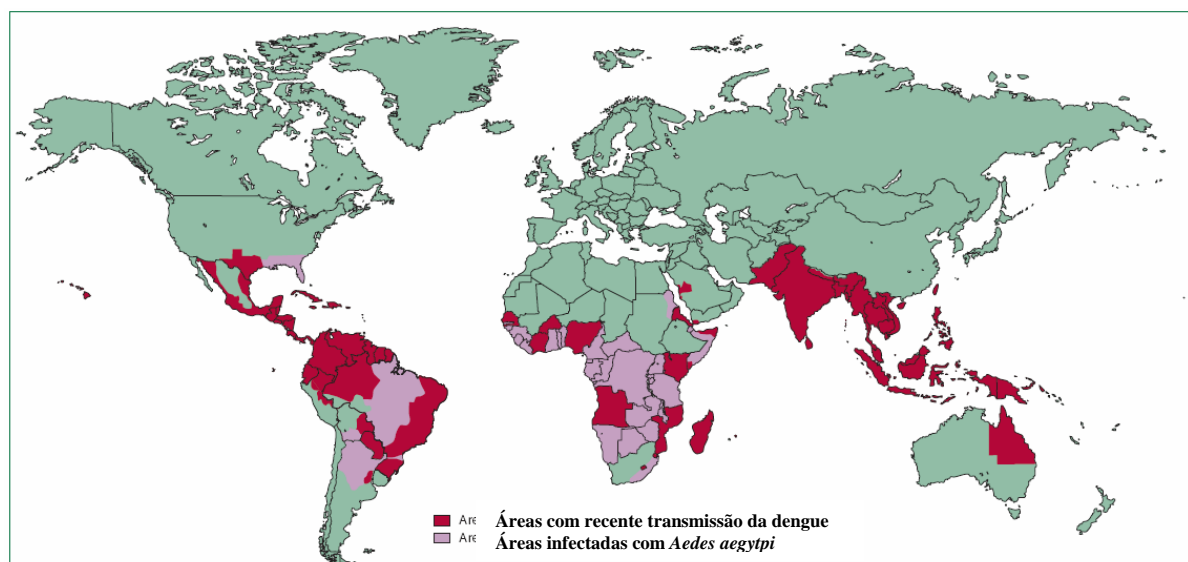


Figura 2: Distribuição global das áreas de transmissão do DENV e áreas infectadas com *A. aegypti* em 2005. (Fonte: *US Centers for Disease Control and Prevention*).

O DENV pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* e contém um genoma de RNA fita simples, polaridade positiva e compreende 4 sorotipos distintos (DENV-1 a DENV-4), sendo o sorotipo 2 (DENV-2) o mais prevalente no Brasil. A doença expressa-se clinicamente com gravidade variada e o período de incubação da dengue é de cinco a oito dias e a virose é transmitida pela picada do mosquito *A. Aegypti*, *A. albopictus* ou *A. scutellaris*.

O quadro de “dengue clássico”, de caráter benigno, é caracterizado por febre abrupta e intermitente, cefaléia, artralgia, mialgia, dor retroorbital, náusea e vômitos, podendo aparecer exantema maculopapular nas extremidades e no tronco (Ramos, 1989). Nos casos mais severos, ocorre um extensivo extravazamento plasmático em várias cavidades do corpo, como a pleura, pericárdio e peritônio, podendo resultar em profundo choque denominado de síndrome do choque por dengue (*Dengue Shock Syndrome – DSS*) (Melino e Paci, 2007). Ou seja, a DHF/DSS é caracterizada pelo rápido extravazamento capilar acompanhado de trombocitopenia, alteração homeostática e danos ao fígado (Halstead, 2007), podendo levar o paciente ao óbito.

Estas formas mais severas (DHF/DSS) apresentam quadros febris agudos, que se iniciam como o dengue clássico e que posteriormente evoluem com queda do estado geral do indivíduo, seguido de taquicardia, hipotensão, diminuição da perfusão dos tecidos periféricos, e manifestações hemorrágicas que estão associadas à alta letalidade, especialmente em crianças de todas as idades (Ramos, 1989).

Nas décadas de 40 e 50 ocorreu um intenso combate ao mosquito transmissor da dengue, tendo sido considerado sob controle por volta de 1955 em todos os países das Américas, com exceção do sul dos Estados Unidos, algumas ilhas do caribe e o norte da América do Sul. Esse descuido provocou a reintrodução do vírus no Brasil em 1967 nas cidades de Belém e São Luis e dissiminou-se pelo país. Durante anos, as medidas de controle deste vetor eram esporádicas e isoladas, conseqüentemente este descaso fez com que em 1985/1986 e 1997/1998 o *A. aegypti* fosse encontrado praticamente em todos os estados brasileiros (Neves *et al.*, 2000).

As infecções pelo DENV têm aumentado no Brasil com a disseminação do mosquito *A. aegypti*. Essa dispersão do vetor foi seguida pela introdução dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 na maioria das cidades brasileiras, com isso, houve uma cocirculação dos diferentes sorotipos levando à ocorrência das formas mais severas da doença (DHF e DSS). Com relação ao sorotipo DENV-4, seu primeiro relato ocorreu na cidade de Boa Vista no estado de Roraima em 1982 (Osanai *et al.*, 1998). Este sorotipo só foi detectado novamente no ano de 2005, em 3 indivíduos na cidade de Manaus (região Amazônica do Brasil). O ressurgimento do DENV-4 no Brasil, provavelmente pode estar relacionado com a proximidade da cidade de Manaus com a Venezuela e Colômbia, que tiveram epidemias de dengue com o sorotipo DENV-4 (Figueiredo *et al.*, 2008).

Somente depois de 1986, com a introdução do DENV-1 no estado do Rio de Janeiro, que a infecção por dengue se tornou um problema de saúde pública nacional. A sua rápida disseminação em diversos estados do Brasil foi ocasionada pelas dificuldades de implementação de programas de controle ao vetor nos grandes centros urbanos. Esta situação foi agravada com a introdução do DENV-2 em 1990, também no estado do Rio de Janeiro (Nogueira *et al.*, 1993), e sua subsequente disseminação pelo país. Nesta época ocorreram os casos clínicos mais graves da doença, que levou à primeira morte devido à infecção secundária (Nogueira *et al.*, 2007) (**Figura 3**).

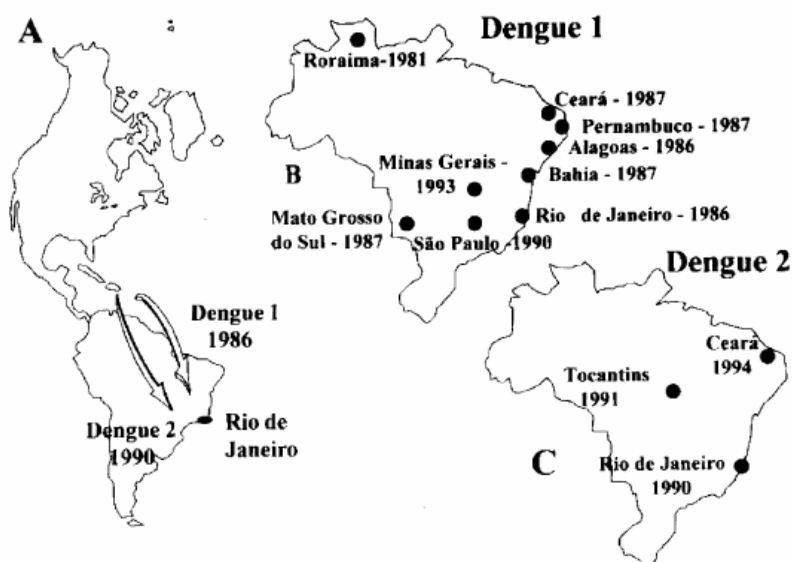


Figura 3: Introdução, expansão e dispersão do DENV no Brasil. (A) Introdução do DENV-1 e 2, (B) expansão e dispersão do DENV-1 no território até o ano de 1993, e (C) expansão e dispersão do DENV-2 no território até o ano de 1994 (Figueiredo, 2000).

O DENV-3 que, estava ausente das Américas desde 1979, foi reintroduzido em 1994, alcançando a região brasileira em 2000, o que levou a uma grande epidemia por dengue no verão de 2001-2002. O estado do Rio de Janeiro foi o sítio de introdução e a disseminação do DENV-3 no Brasil, bem como DENV-1 e DENV-2, deixando óbvio que esta área é importante na epidemiologia da dengue no Brasil (Nogueira *et al.*, 2007).

Por ser um importante centro turístico e com alto nível populacional de *A. aegypti*, o estado do Rio de Janeiro passou a ter especial atenção na entrada do DENV no Brasil.

De uma maneira em geral, as regiões brasileiras que apresentaram epidemia por dengue, no período de 1986 a 2006, tiveram características similares ao que ocorreu no estado do Rio de Janeiro. Em 1986, quando ocorreu a introdução do sorotipo DENV-1 no Brasil, nenhum caso de DHF e DSS foi relatado. Com a introdução do sorotipo DENV-2 em 1990, ocorreu um aumento significativo no número de casos de pacientes com diagnóstico de trombocitopenia quando este sorotipo era predominante, demonstrando que ele tem uma apresentação clínica mais severa em comparação ao DENV-1. Em 2001, houve a introdução no Brasil do DENV-3 (cepa proveniente do continente Indiano) (Miagostovich *et al.*, 2006) que foi associado com o aumento no número de casos de DHF e DSS em 2002 (**Figura 4**). Mesmo com as experiências de anos anteriores (1986, 1990 e 2002), tivemos no ano de 2008, em todo Brasil, uma nova epidemia por dengue entre os meses de Janeiro e Abril. Aproximadamente 231.000 brasileiros tiveram febre por dengue, sendo que aproximadamente 100 indivíduos morreram por DHF/DSS, em sua maioria crianças (Weissmann, 2008).

I.2) Estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra o DENV

Grandes esforços estão sendo empregados ao redor do mundo para o desenvolvimento de vacinas e fármacos contra o DENV. Desde a década da 70, a OMS tem patrocinado diversos estudos que ampliam os conhecimentos sobre a imunidade dos sorotipos e a fisiopatologia da DHF/DSS, que são essenciais para o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas contra a dengue. Enquanto vacinas profiláticas contra os vírus da febre amarela (Theiler e Smith, 1937) e da encefalite

japonesa (Oya e Kurane, 2007) já se encontram comercializadas, nenhuma vacina contra o DENV foi desenvolvida, apesar de várias décadas de intensivas pesquisas.

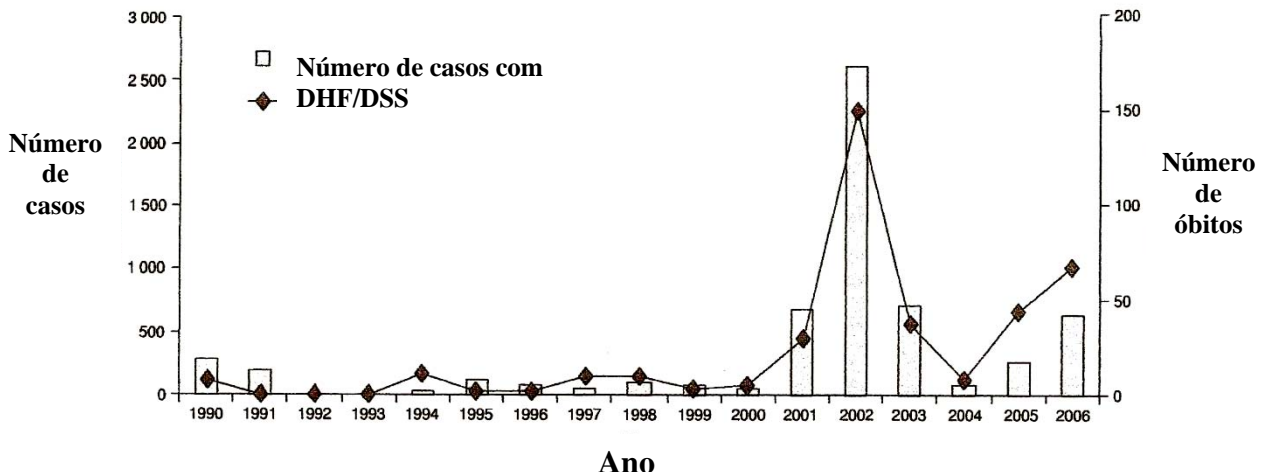


Figura 4: Número de casos de DHF/DSS e o resultado dos óbitos por infecção pelo DENV relatados no Brasil entre 1990 e 2006 (Fonte: *Ministério da Saúde*).

Existem várias dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o DENV e o principal problema é que um indivíduo quando infectado por um sorotipo do DENV, o seu sistema imune não irá conferir proteção contra os demais sorotipos. Ou seja, há necessidade de uma vacina tetravalente e isso dificulta o seu desenvolvimento (Innis e Eckels, 2003). Um outro problema é a falta de um modelo animal para a testagem das vacinas. Embora os modelos mais utilizados, ratos e macacos, sejam infectados pelo DENV, esses animais não apresentam uma patologia semelhante à dos humanos, elevando assim os custos das pesquisas devido à dificuldade para se avaliar a proteção vacinal (Gibbons e Vaughn, 2002).

No que se refere ao DENV, existe uma grande lacuna no conhecimento sobre as proteínas não estruturais do vírus, epítomos responsáveis pela ligação e penetração nas células do hospedeiro, assim como sobre a resposta imune, dificultando desta forma o desenvolvimento de vacinas (Deen, 2004). Devido à ausência de uma vacina

ou droga eficaz contra o DENV, o tratamento utilizado até o momento é o uso de analgésicos para conter a febre, e a reposição de fluido plasmático devido ao extravasamento dos capilares nos pacientes com DHF e DSS (Halstead, 2007).

I.3) Os flavivírus

Flaviviridae é uma grande família de patógenos virais responsáveis por diversas doenças e por grande mortalidade de animais, especialmente o homem. Esta família consiste em três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero flavivírus contém mais de 70 vírus, dentre eles encontram-se o DENV, o *japanese encephalitis virus* (JEV), o *tick-borne encephalitis virus* (TBEV), o *West Nilo virus* (WNV), e o *yellow fever virus* (YFV). Os vírus de cada gênero podem ser classificados com base em critérios sorológicos baseados em complexos antigênicos, em clades, *clusters*, e baseado na filogenética molecular da espécie (Mukhopadhyay *et al.*, 2005) (**Figura 5**).

Inicialmente, os arbovírus do grupo B (como eram conhecidos inicialmente as flavivírus) eram agrupados com os arbovírus do grupo A (alfavírus) na família *Togaviridae*, e os dois grupos eram distinguidos por ensaio inibitório de hemoaglutinação. Entretanto, estudos bioquímicos e moleculares demonstraram que os alfavírus eram diferentes dos flavivírus que foram separados em outra família denominada *Flaviviridae*. O gênero *Pestivirus* (ex: vírus da diarreia viral bovina – BVDV) e o *Hepacivirus* (HCV) foram também transferidos para esta família (Solomon e Mallewa, 2001).

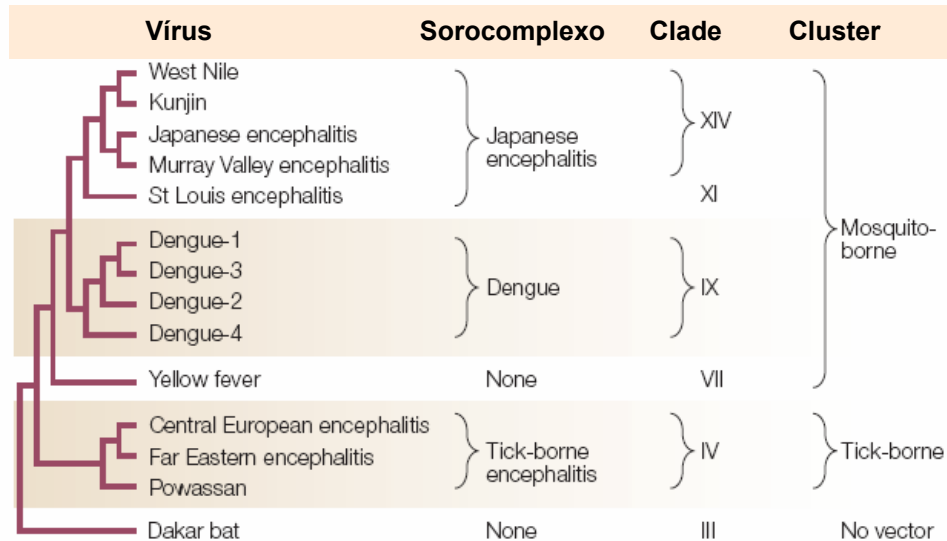


Figura 5: Classificação dos flavivírus. As relações filogenéticas entre as flaviviroses selecionadas são demonstradas no dendograma à esquerda, cuja distância evolutiva não está representada. A classificação sorológica (sorocomplexo) e filogenética (clade e cluster) das flaviviroses estão demonstradas à direita (Adaptado de Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Durante o século 20, a área geográfica afetada pela dengue cresceu em virtude da ampla distribuição do mosquito transmissor entre os trópicos de Capricórnio e Câncer (**Figura 2**). Contudo, a área geográfica afetada pelos vírus do sorocomplexo da JEV (**Figura 5**) tem se expandido nos últimos 50 anos. Atualmente, o sudeste da Ásia, o subcontinente Asiático e mais recentemente o nordeste da Austrália são afetados pelo JEV (**Figura 6**). As causas desta expansão são desconhecidas, mas acredita-se que estejam relacionadas com a migração dos pássaros para estas regiões e o aquecimento global, que aumenta a atividade do mosquito, aumentando também seu poder de transmissão (Solomon e Mallewa, 2001).

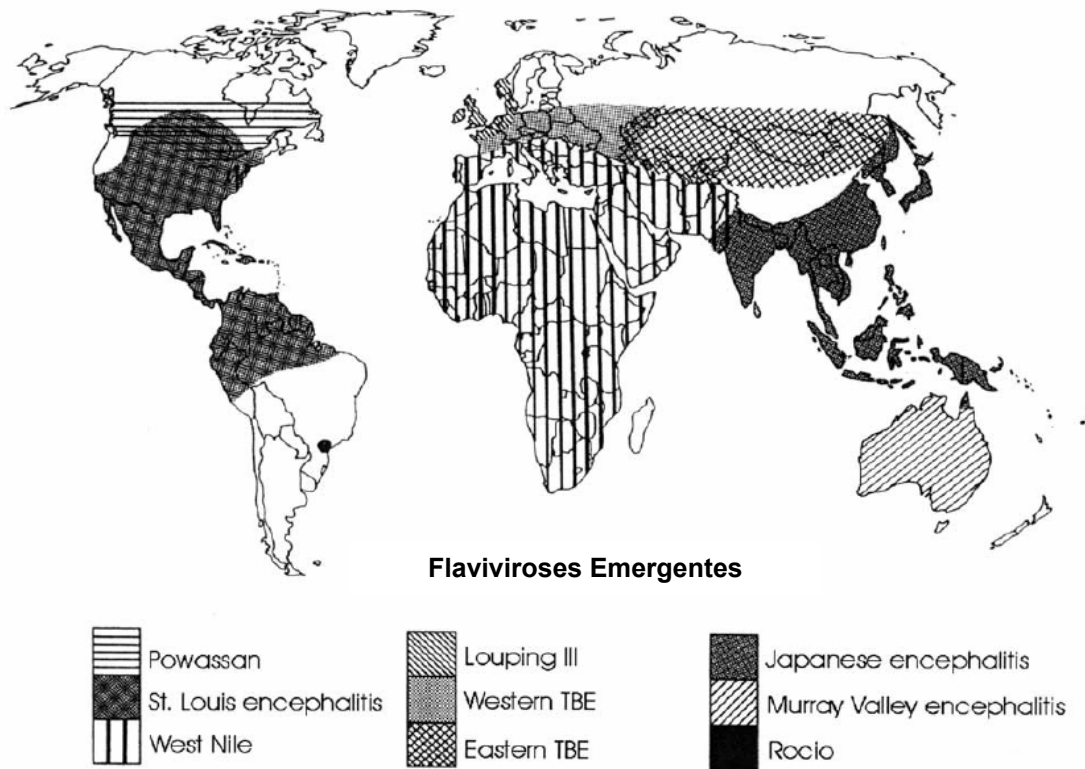


Figura 6: Distribuição global dos flavivírus neurotrópicos (Adaptado de Solomon e Mallewa, 2001).

I.4) Estrutura viral e ciclo de replicação do DENV

A família *Flaviviridae* possui um genôma de RNA de fita simples polaridade positiva (+ssRNA) de aproximadamente 11kb, e, ao contrário dos pestivírus e hepacivírus, a extremidade 5'-terminal do genôma do flavivírus é composto com a estrutura de capeamento do tipo 1 [$m^7G^5'ppp^5'A_{2'0m}$] (Benarroch *et al.*, 2004). O RNA genômico do DENV apresenta uma longa janela aberta de leitura (ORF - *open reading frame*), codificando três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Sua tradução gera uma poliproteína, a qual é clivada por proteases do vírus e da célula hospedeira. Nas regiões à montante e à jusante da ORF, existem duas regiões não traduzidas denominadas 5'-UTR e 3'-UTR (*untranslated regions*), que apresentam estruturas

secundárias que são cruciais ao processo de tradução, à montagem do vírion (Zeng *et al.*, 1998; Chiu *et al.*, 2005) e à interação do RNA no complexo de replicação (**Figura 7**).

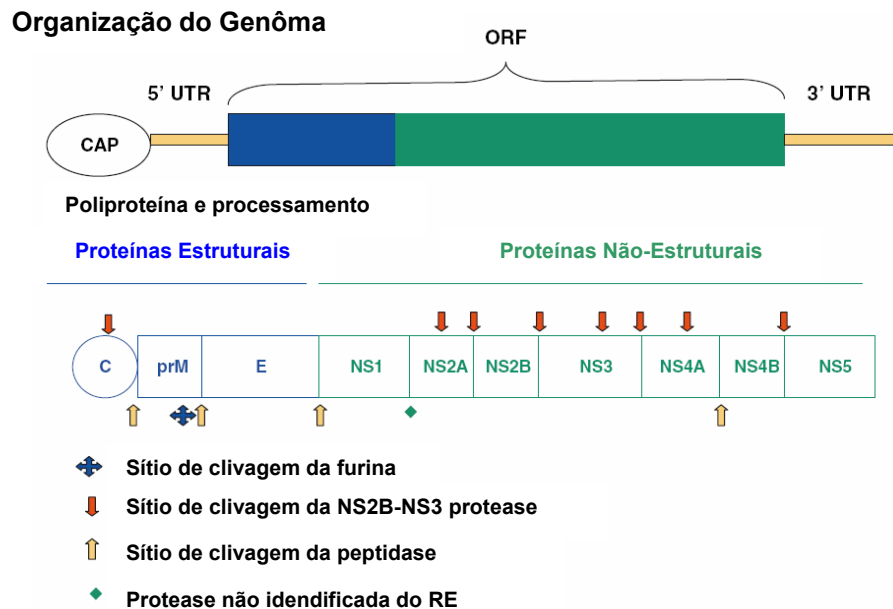


Figura 7: Organização do genoma viral do DENV e representação esquemática do processamento proteolítico da poliproteína. (Adaptado de Melino e Paci, 2007). RE = retículo endoplasmático

A estrutura do DENV é relativamente simples. Os vírions são partículas esféricas de 40-50nm de diâmetro formadas por 3 proteínas estruturais: a proteína C nucleocapsídica (C; 12-14kDa); proteína M (prM, 8kDa) que é uma proteína de membrana; e a glicoproteína E (E; 51-49kDa) que é uma proteína homodimérica presente no envelope viral. O genoma do DENV é encapsulado pela proteína C em uma estrutura icosaédrica (**Figura 8**).

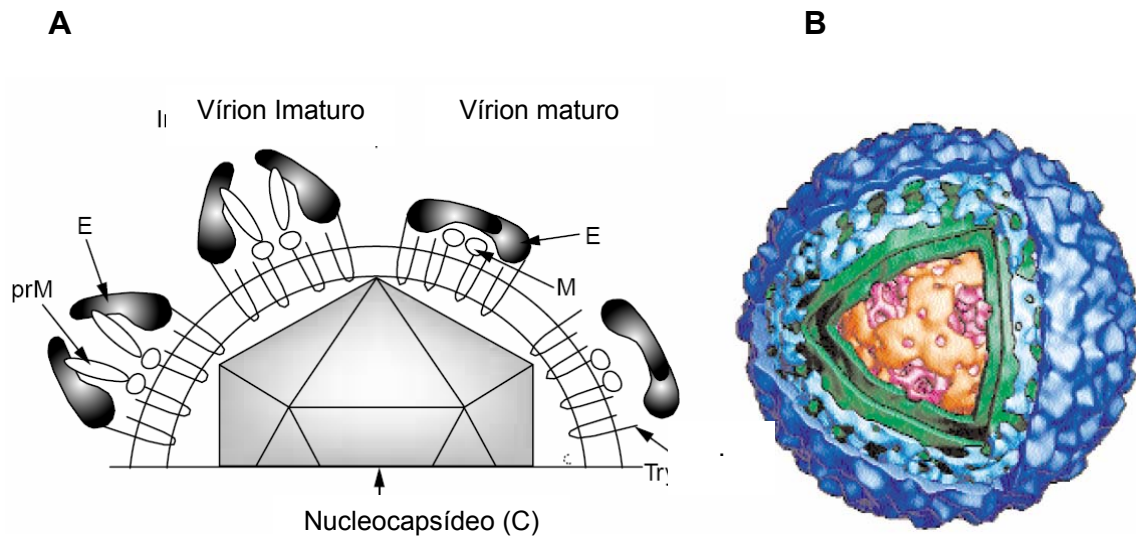


Figura 8: (A) Diagrama esquemático da composição do flavivírus imaturo e maturo. prM, proteína de membrana pré-M; M, proteína de membrana; e E, glicoproteína E (Fonte: Heinz e Allison, 2001); e (B) estrutura da partícula viral obtida por criomicroscopia. Em **azul**, podemos observar duas camadas de protéicas mais externas compostas pelas proteínas E e M, em **verde**, uma bicamada lipídica, em **laranja**, o nucleocapsídeo composto pela proteína C, e em **rosa**, o RNA genômico viral empacotado no centro de vírus (Fonte: Kuhn *et al.*, 2002).

O primeiro passo para o processo de infecção viral é a ligação do vírus a receptores de superfície (ainda não identificados) da célula hospedeira. Existem estudos que sugerem o envolvimento do heparan sulfato (um glicosaminoglicano) que é carregado negativamente (Chen *et al.*, 1997), e mais recentemente do receptor DC-SIGN (*dendritic-cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*), na ligação do vírus à membrana (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Pokidysheva *et al.*, 2006). A prM também parece ter um papel essencial no controle da atividade de fusão do vírus com a célula hospedeira por agir como uma proteína chaperona levando a correta topologia da glicoproteína E (Lorenz *et al.*, 2002).

Após a ligação do vírus ao receptor específico, ocorre a endocitose da partícula viral (Mukhopakhyay *et al.*, 2005). A acidificação do compartimento endossomal ocasiona a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando o

núcleocapsídeo e o RNA genômico para o citoplasma (**Figura 9**). Inicia-se assim o primeiro evento de infecção do DENV na célula hospedeira com a tradução do RNA genômico em uma poliproteína. A tradução ocorre devido ao reconhecimento da região *cap* localizada na 5'UTR do RNA viral pelo ribossomo. Com o processamento da poliproteína viral, proteases da célula hospedeira e viral são recrutadas. Para a clivagem da poliproteína nas junções C-prM, prM-E, E-NS1 e NS4A-NS4B, é utilizada a peptidase signalase encontrada no RE das células hospedeiras, e para a clivagem nas junções NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A e NS4B-NS5, é utilizada a serino-protease viral NS3. Já a clivagem da junção NS1-NS2A ocorre pela ação de uma protease ainda desconhecida localizada no RE (Falgout e Markoff, 1995).

As proteínas não estruturais estão envolvidas em diferentes funções do ciclo de replicação viral. A NS1, que é uma proteína glicosilada no RE, encontra-se na superfície celular. Sua colocalização com RNA viral em fita dupla, junto com outras evidências, sugere que esta proteína intracelular tem um papel importante na replicação do RNA viral. As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas que estão associadas à membrana. Em particular, a NS2B está associada à NS3 formando um complexo ativo serino-protease. A proteína NS3 é uma proteína multifuncional que, além de promover o processamento da poliproteína, tem a atividade helicásica (dissociação da fita dupla de RNA), NTPásica (hidrólise do ATP como fonte de energia) e RTPásica (capeamento do RNA viral) (Wengler, 1993; Cui *et al.*, 1998), sendo considerada uma proteína essencial para o processo de replicação viral. Além disto NS3 protease também é responsável pela clivagem interna das proteínas C, NS2A, NS3 e NS4A, sendo o significado dessas clivagens ainda desconhecidos (Arias *et al.*, 1993; Lobigs, 1993). Já a NS5 é a mais conservada dentre todas as proteínas não estruturais dos flavivírus. Ela é caracterizada pelo motivo

metiltransferase no domínio N-terminal e pela atividade RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) localizada no domínio C-terminal (Egloff *et al.*, 2002).

Após o processamento da poliproteína viral, as proteínas não estruturais associam-se a 3'UTR do RNA viral para a formação do complexo de replicação com a membrana do RE e posterior síntese do RNA viral (**Figura 10**) (Khromykh *et al.*, 1999). A associação do RNA genômico com a proteína C na face citossólica da membrana do RE é o passo inicial para a montagem do vírion. Essa montagem ocorre inicialmente no lúmen do RE, onde primeiro são gerados vírus imaturos, compostos de nucleocapsídeo, envelope e proteínas E e pr-M, formando um estável complexo de heterodímeros, que não é capaz de induzir fusão de membranas (Guirakhoo *et al.*, 1991). Acredita-se que a proteína pr-M proteja a proteína E de adquirir precocemente uma conformação fusogênica durante o processo de secreção, e que, após a sua clivagem pela enzima furina no complexo de Golgi (Stadler *et al.*, 1997; Elshuber *et al.*, 2003), as partículas virais se tornam maduras e infecciosas, sendo secretadas por exocitose (Fink *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2008) (**Figura 9**)

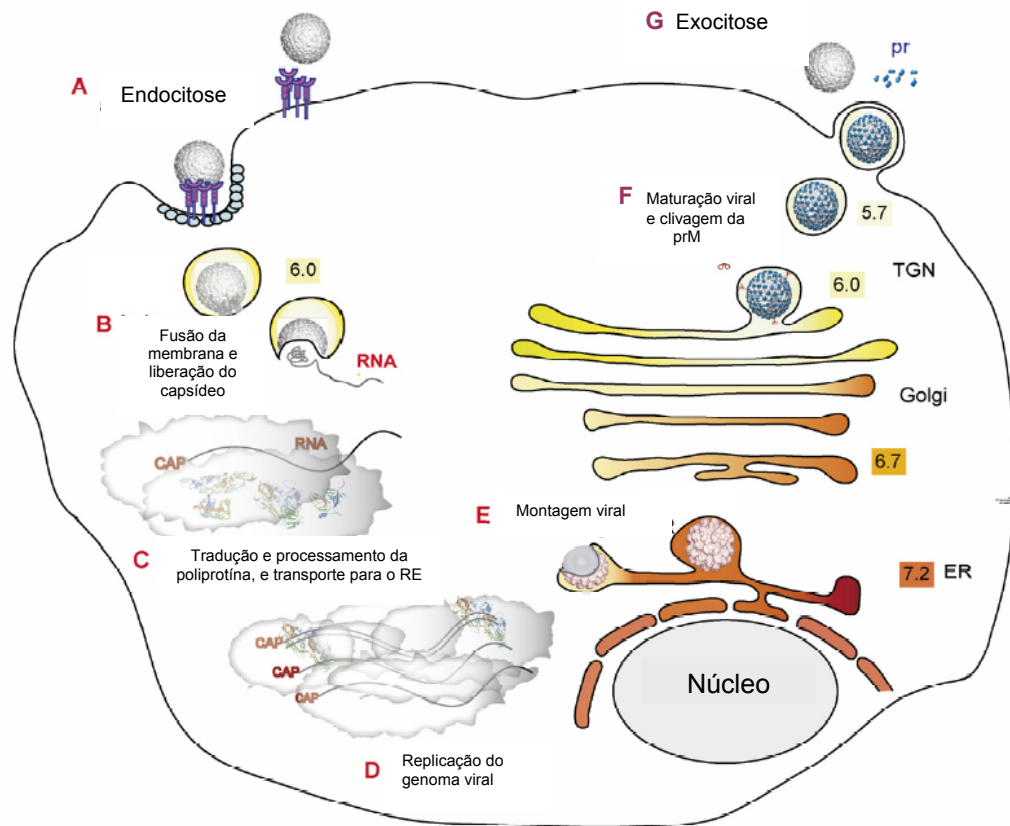


Figura 9: Representação esquemática do ciclo de replicação do DENV. As letras indicam a sequência do ciclo de vida dos flavivírus nas células; os números demonstrados nas caixas referem-se ao valor de pH encontrado nos respectivos compartimentos; ER, retículo endoplasmático; e TGN; trans-Golgi (Adaptado de Perera *et al.*, 2008).

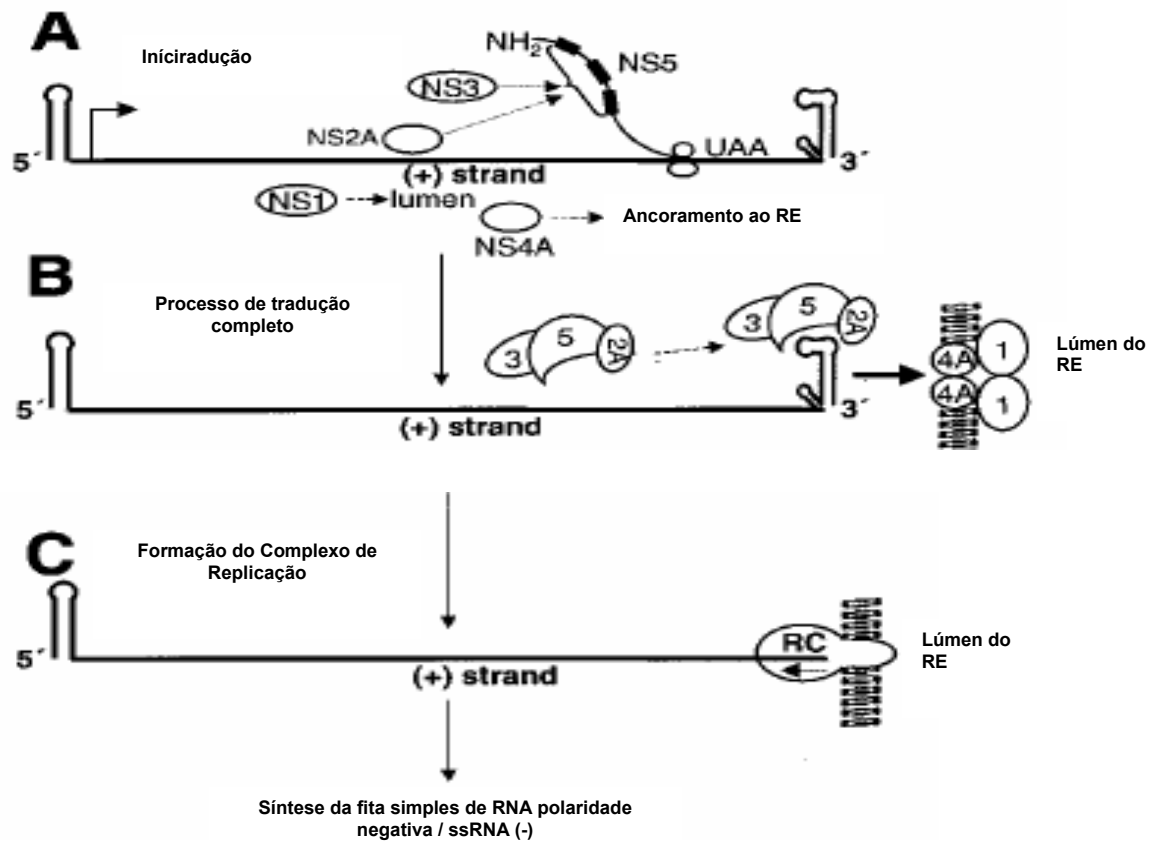


Figura 10: Modelo proposto para a formação do complexo de replicação e iniciação de síntese do (-)ssRNA nos flavivírus. (A) A NS3 se liga a NS5 em regiões conservadas (caixas pretas indicadas pelas setas) na porção N-terminal, possibilitando a associação da NS2A, (B) o complexo NS2A-NS3-NS5 se anexa a 3'UTR via ligação com a NS2A provavelmente no *stem-loop* 3'terminal, no qual NS3 e NS5 também se ligam. Este complexo é anexado ao (+)ssRNA e transportado para a membrana do RE pela afinidade da região hidrofóbica da NS2A com a proteína transmembranar NS4A (demonstrado como dímero) que se encontra ligada a NS1 (lúmen do RE). O *stem-loop* 3'terminal está representado numa conformação arbitrária; e (C) com o complexo de replicação completo, o domínio RdRp da NS5 pode sofrer um rearranjo conformacional que permite a replicação do (+)RNA em (-)RNA. O complexo de replicação (RC) está representado em um grande círculo e a seta indica a direção da síntese (5' \rightarrow 3') (Adaptado de Khromykh *et al.*, 1999).

I.5) Proteína não estrutural 3 (NS3)

Após a infecção do DENV na célula hospedeira e tradução do RNA genômico a poliproteína formada é clivada pela NS3, que utiliza o segmento hidrofóbico de 40 resíduos da proteína transmembranar NS2B como cofator essencial para a atividade. A NS3 é uma proteína de aproximadamente 70 kDa que apresenta os domínios serino-protease (~18kDa) na região N-terminal e helicase (~52 kDa) na região C-terminal.

I.5.1) Domínio NS3 protease

A atividade serino-protease na porção N-terminal da proteína NS3 dos flavivírus foi primeiramente proposto por Bazan e Fletterick (1989, 1990) e Gorbalenya *et al.* (1989). Após alinhamento das sequências das helicases putativas destes vírus, eles observaram domínios bem conservados e característicos da serino-protease de mamíferos (His⁵¹-Asp⁷⁵-Ser¹³⁵) (Bazan e Fletterick, 1989; Bazan e Fletterick, 1990). Posteriormente, estudos bioquímicos e mutagênese sítio dirigida na tríade catalítica confirmaram a localização da atividade proteásica nos primeiros 180 resíduos da porção N-terminal da NS3 (Chambers *et al.*, 1990b; Preugschat *et al.*, 1990), e perda da atividade enzimática (Chambers *et al.*, 1990b; Wengler e Wengler, 1991), respectivamente. Em 1991, Falgout e colaboradores demonstraram que a atividade proteolítica da NS3 era dependente da proteína NS2B que apresenta uma região hidrofílica (subdomínio IV) (**Figura 11**) composta de 40 resíduos que funciona como cofator essencial para atividade catalítica (Falgout *et al.*, 1993). Embora a região hidrofóbica da NS2B seja dispensável para a atividade proteásica, ela é importante

para a inserção da NS2B na membrana do RE e a eficiente ativação da NS3 protease *in vivo* (Clum, 1997) (**Figura 11**).

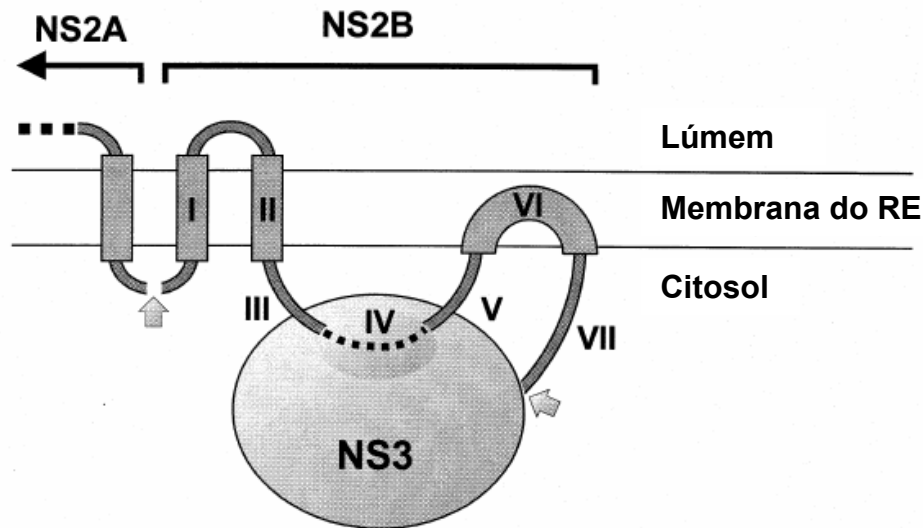


Figura 11: Representação esquemática da suposta interação entre NS2B com a membrana celular e a NS3 protease. Os subdomínios I, II e VI; e III, IV, V e VII representam subdomínios hidrofóbicos e hidrofílicos da NS2B, respectivamente. Setas, demonstrando as regiões de clivagem da NS3 serino-protease (Brinkworth *et al.*, 1999).

A NS3 protease do DENV é responsável por clivagens em *cis* e *trans* na poliproteína, e por isso, é considerada essencial ao processo de replicação e maturação do vírions da dengue. De acordo com a literatura, a NS3 protease é estruturalmente semelhante à tripsina. Diferentemente das tripsinas, a NS3 protease tem uma grande afinidade por resíduos dibásicos e tem como sítio de clivagem a ligação peptídica dos resíduos de Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Lys nas posições P1 e P2, seguido pelos aminoácidos Gly, Ala ou Ser na posição P1´.

A preferência da NS3 protease para ligações de peptídeos envolvendo resíduos básicos pode ser a base para o desenvolvimento de inibidores seletivos para esta enzima. Também foi demonstrado que, ao contrário do que ocorre no HCV, reações contendo a NS3 protease (sem o cofator) são incapazes de promover atividade

proteolítica, e que a adição de um peptídeo de 13 aminoácidos correspondentes ao suposto cofator não leva à proteólise. Ou seja, não há atividade proteolítica na ausência do cofator de 40 resíduos da NS2B (Brinkworth *et al.*, 1999).

A estrutura tridimensional do domínio NS3 protease do DENV-2 foi elucidada por cristalografia de raios-X e observou-se que ela apresenta 6 folhas β em barril típicas de uma quimotripsina serino-protease (Murthy *et al.*, 1999). Estudos relatam que este domínio tem uma forte tendência a formar agregados e, com isso, inativar a atividade proteásica. Embora a estrutura cristalográfica da NS3 protease tenha sido obtida após renovelamento (Murthy *et al.*, 1999), eles não mencionaram a necessidade do cofator NS2B na atividade proteolítica.

Em 2001, uma nova construção da forma recombinante NS3 protease foi fusionada com 40 resíduos hidrofílicos da região central do cofator NS2B através de um interdomínio flexível estável (não clivável pela NS3 protease) de nove peptídeos contendo Gly₄SerGly₄. Essa construção foi denominada de NS2BCF40glyNS3Protease, cuja expressão resultou numa alta produção de proteína recombinante solúvel e ativa (Leung *et al.*, 2001). A atividade proteolítica desta construção foi significativamente maior do que os recombinantes NS3 protease e NS2BCF40NS3 protease (sem o interdomínio de glicina) que precisaram passar pelo processo de renovelamento. Mais recentemente, a estrutura cristalográfica da NS2BCF40glyNS3Protease foi obtida (Erbel *et al.*, 2006) (**Figura 12**). Embora algumas regiões não estejam bem definidas no cristal, devido à sua alta flexibilidade, diferenças estruturais têm sido encontradas na protease com e sem o cofator (Erbel *et al.*, 2006; Murthy *et al.*, 1999).

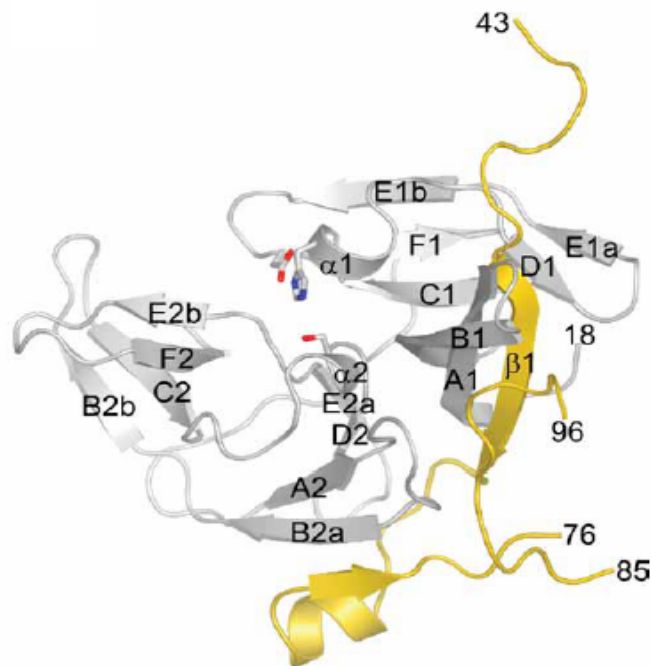


Figura 12: Representação esquemática da estrutura da NS2BCF40glyNS3Protease do DENV-2. Em cinza, temos a NS3Protease e em amarelo o cofator NS2BCF40 (Fonte: Erbel *et al.*, 2006).

I.5.2) Domínio NS3 helicase

As helicases são enzimas capazes de dissociar a fita dupla de DNA ou RNA pelo rompimento das ligações de hidrogênio que as unem (Gorbalenya e Koonin, 1993). A energia necessária para promover essa dissociação é fornecida pela hidrólise do γ -fosfato do nucleosídeo trifosfatase (NTP). Cui *et al.* (1998) demonstraram que a eficiência de hidrólise de nucleotídeos trifosfatados pela DENV-1 helicase é: ATP (62,8%) seguido do GTP (58,9%), UTP (34,6%) e CTP (13,6%), determinando assim a natureza preferencial dos nucleotídeos purina como substrato. Contudo, estudos de

Benarroch *et al.* (2004), mostraram que o domínio helicase do DENV-2 (cepa Jamaica) possui uma eficiência de hidrólise similar para os nucleotídeos ATP e CTP.

As RNA e DNA helicases foram classificadas em cinco superfamílias (SF1 a SF5) de acordo com os motivos conservados (Gorbalenya e Koonin, 1993). Todas as helicases apresentam um motivo Walker A (*P-loop* = alça de ligação com o fosfato), que se liga ao grupo fosfato terminal do NTP, e um motivo Walker B, que é responsável pela coordenação do íon Mg^{2+} para a formação do complexo ATP- Mg^{2+} . Ambos os motivos são encontrados nas proteínas que interagem com o ATP (**Figuras 13 e 15**) (Walker *et al.*, 1982). A helicase dos vírus da família *Flaviviridae* pertence à superfamília 2 (SF2), juntamente com as das *Potyviridae*, *Reoviridae*, *Hepesviridae* e *Poxviridae*, porque apresentam ao todo sete motivos conservados e a capacidade de dissociar a fita dupla de DNA ou RNA no sentido 3'→5' bem como no sentido oposto (Caruthers e McKay 2002). Esses motivos formam o núcleo catalítico estruturalmente conservado que age como “motor molecular” para a hidrólise do NTP como fonte de energia para a dissociação da fita dupla (Singleton e Wigley, 2002). Foi observado ainda que as atividades RNA helicase e NTPase são dependentes de Mg^{2+} e têm sido descritas para vários membros dos *Flaviviridae* como: WNV, JEV, BVDV e HCV.

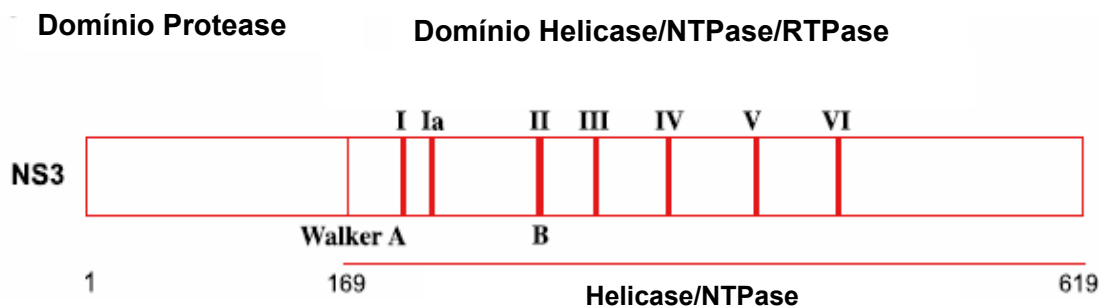


Figura 13: Representação esquemática na NS3 íntegra compreendendo o domínio N-terminal da protease e o domínio C-terminal da helicase/NTPase/RTPase. Os sete motivos conservados do domínio helicase/NTPase estão indicados pelas barras verticais em vermelho. O domínio protease do resíduo 1 ao 168aa e o domínio helicase do resíduo 169 a 619aa (Adaptado de Benarroch *et al.*, 2004).

Benarroch *et al.* (2004) alinharam sequências de aminoácidos dos domínios helicase dos vírus DENV, WNV, JEV, TBEV, e hepatite C (HCV). Neste alinhamento foram incluídos os elementos de estrutura secundária da estrutura em 3D do domínio helicase do HCV (Yao *et al.*, 1997) (**Figura 14**). Eles observaram a conservação dos sete motivos da helicase, demonstrando dessa forma que as helicases dos flavivírus pertencem à família DEXH/D-box da SF2 conforme observado por Gorbalenya e Koonin (1993). Observações interessantes de Benarroch *et al.* (2004) quando compararam as helicases de HCV e DENV, foram as baixas identidades de 16% entre as sequências de aminoácidos da região N-terminal dos domínios helicase (resíduos 170 a 475), e de 2% da região C-terminal (resíduos 476 a 619), embora as proteínas apresentem a mesma topologia na região catalítica.

A proteína NS3 helicase é formada por 3 subdomínios em forma da letra Y. O subdomínio 1 compreende os resíduos 181 a 326, o subdomínio 2 dos resíduos 327 a 481, e o subdomínio 3 dos resíduos 482 a 618. As estruturas dos subdomínios 1 e 3 são rígidas, enquanto a do subdomínio 2 é flexível. Os subdomínios 1 e 2 têm pouca similaridade de sequência, mas em compensação suas estruturas são bem similares, sendo compostas em sua região central de 6 folhas β em paralelo flanqueadas por 4 α -hélices. O subdomínio 3 é predominantemente α -hélice com 4 α -hélices em paralelo, circundada por 3 α -hélices curtas, e sustentada por 2 fitas β antiparalelo do subdomínio 2, que estão expostas ao solvente (Xu *et al.*, 2005) (**Figura 15**).

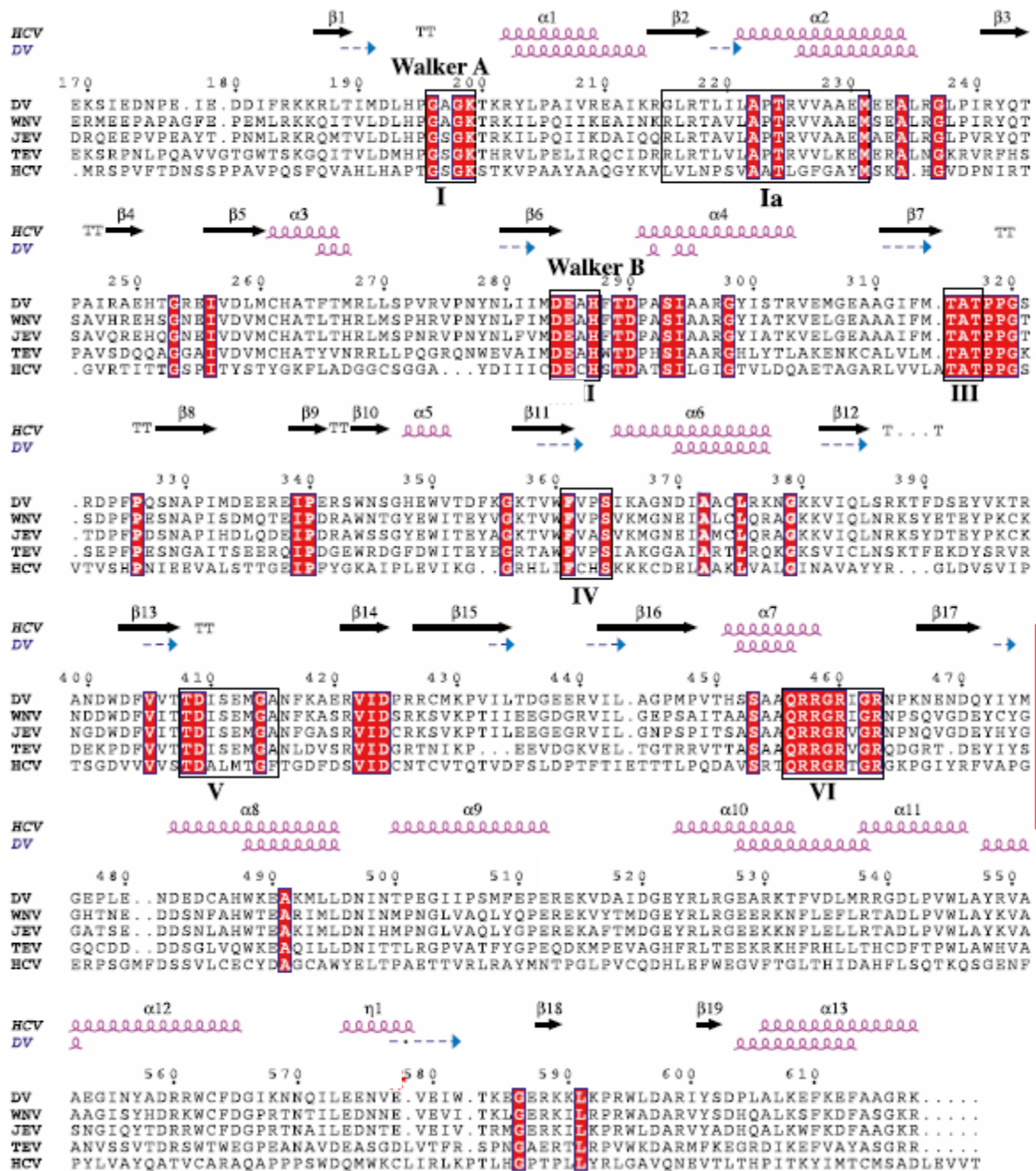


Figura 14: Alinhamento das seqüências do domínio helicase dos vírus DENV, WNV, JEV, TBEV e HCV. Acima do alinhamento estão representados os elementos de estrutura secundária do HCV (Yao *et al.*, 1997), setas em preto (estrutura em folhas β) e espiral em lilás (estrutura em α -helicice), e a predição da estrutura da helicase do DENV utilizando o programa *Predict Protein* (Rost, 1996), setas em azul pontilhadas (estrutura em folhas β) e espiral em lilás (estrutura em α -helicice). Os Resíduos conservados em todas as seqüências são marcados em fundo vermelho, e os retângulos em preto indicam os motivos conservados I, Ia, II, III, IV, V, e VI. (Adaptado de Benarroch *et al.*, 2004). DV, vírus da dengue

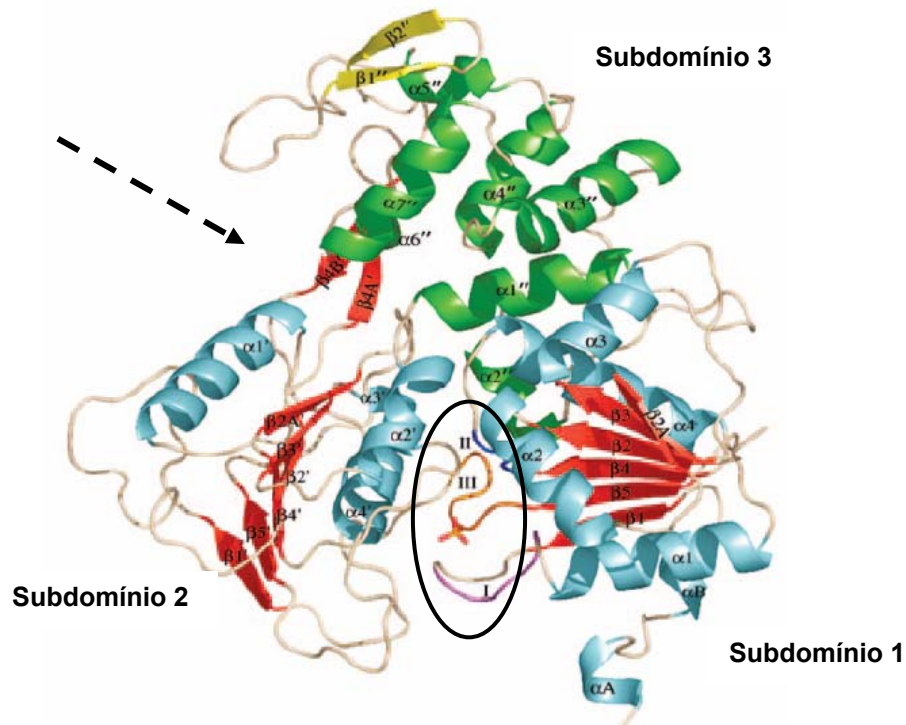


Figura 15: Representação esquemática da estrutura da NS3 helicase do DENV-2. Em azul estão as α -hélices e em vermelho as fitas β dos subdomínios 1 e 2. Em verde temos as α -hélices e em amarelo as fitas β do subdomínio 3. A superfície de interação com o ATP está representada pelo círculo oval preto, sendo mostrado os motivos Walker A e Walker B nas alça I (lilás) e II (azul) respectivamente. A superfície de ligação com o RNA está indicada pela seta pontilhada em preto. (Adaptado de Xu *et al.*, 2005)

A NS3 do DENV-2, além da atividade proteásica no N-terminal e das atividades helicásica e NTPásica no C-terminal, também apresenta uma atividade RTPásica (RTPase – RNA 5´trifosfatase) independente de Mg^{2+} que supostamente encontra-se envolvida no capeamento do RNA viral (Bartelma e Padmanabhan, 2002). Essa atividade independente de Mg^{2+} foi refutada por Benarroch e seus colaboradores (2004) após observar que mutações sítio dirigidas nos motivos Walker A e Walker B aboliam a atividade RTPase da NS3 helicase do DENV-2. O genoma dos vírus de RNA, na extremidade 5´-terminal, é capeado e usualmente associado com outras

atividades enzimáticas, tais como a RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) e RNA helicase. O RNA viral é inicialmente capeado, pela ação da RNA 5'-trifosfatase (RTPase) da proteína NS3, que remove o γ -fosfato da 5'-trifosfatase terminal do RNA viral (Benarroch *et al.*, 2004), e o capeamento finalizado pela ação da proteína NS5 (Egloff *et al.*, 2002).

I.5.3) NS3 íntegra

Recentemente, Luo e seus colaboradores (2008) revelaram por cristalografia de raios-X a correta orientação entre os domínios protease e helicase do DENV-4 (**Figuras 16 A, B, C**). Eles observaram que o domínio protease promove uma oclusão parcial do acesso ao sítio de ligação do ATP, localizado entre os subdomínios 1 e 2 da helicase, dando assim a proteína NS3 uma forma alongada que foi confirmada por espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS – *small angle X-ray scattering*) (Luo *et al.*, 2008). Essa estrutura foi diferente da observada por Yao *et al.* (1999), que relataram a interação o domínio protease nos subdomínios 2 e 3 na helicase do HCV (**Figura 16D**).

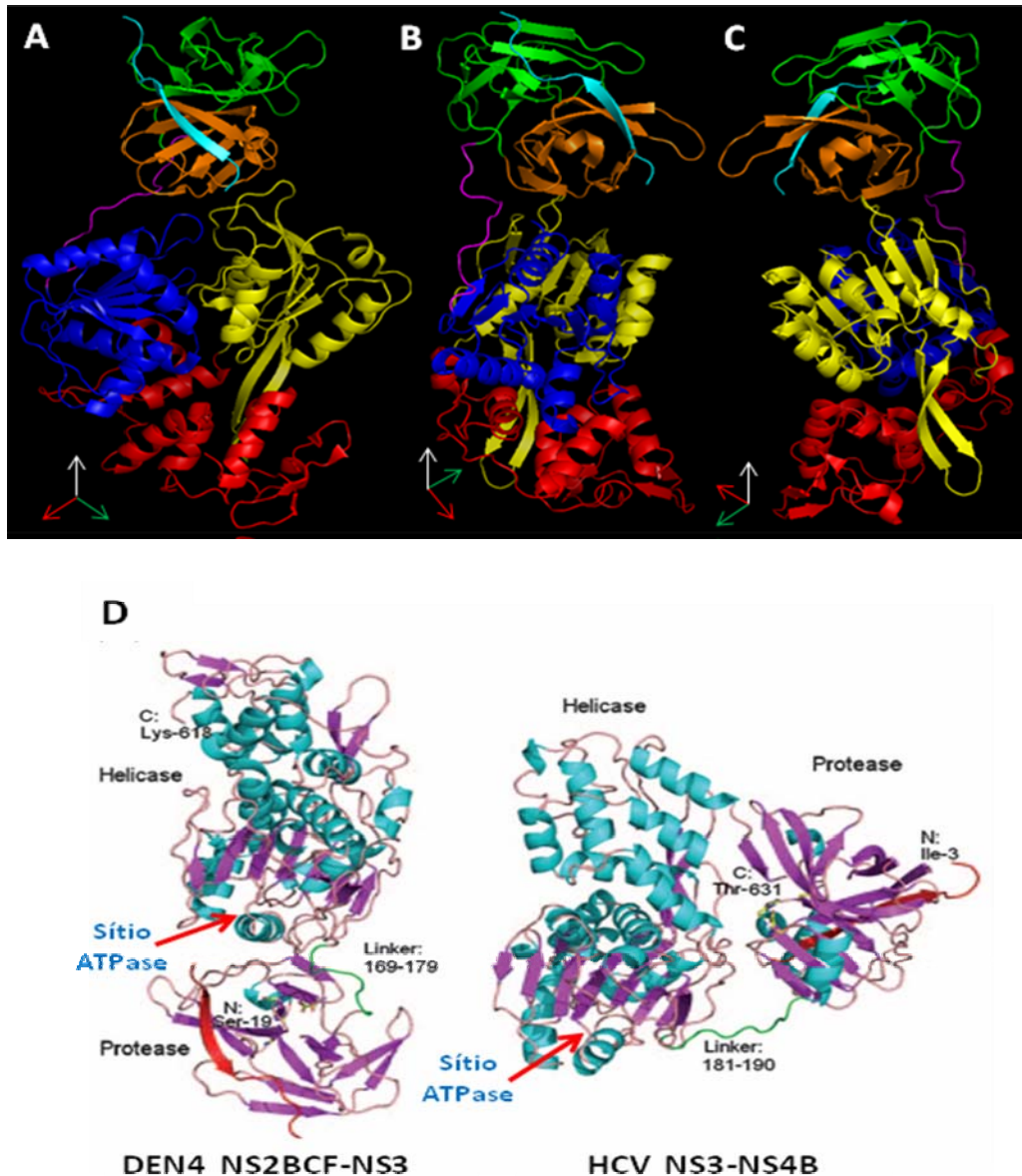


Figura 16: Representação esquemática em *Ribbon* da estrutura da NS3 protease-helicase do DENV-4. No painel (A) está demonstrada a estrutura da NS3 íntegra tendo em destaque os seus subdomínios; (B) mostra a molécula em rotação de 90° para a direita e em (C) a molécula em rotação de 90° para a esquerda em relação ao painel A. Em azul claro, temos o cofator da NS2B; em marrom o subdomínio 1 e em verde o subdomínio 2 do domínio proteásico, em lilás a região de interdomínio (resíduos de 169-185aa) entre o domínio helicase e protease; em azul escuro, amarelo e vermelho os subdomínios 1, 2 e 3, respectivamente (PDB 2vbc) (Programa PyMol). Em (D) temos a comparação lateral das proteínas NS3 íntegra com o cofator NS2B da DENV-4 (Luo *et al.*, 2008) e a NS3 íntegra com o cofator NS4B do HCV (Yao *et al.*, 1999), com seus domínios helicase na mesma orientação. O posicionamento dos domínios protease em relação ao domínio helicase nas duas figuras é claramente diferente. Os cofatores (NS2B e NS4B) encontram-se em vermelho e o interdomínio de ligação dos domínios protease e helicase estão em verde. Os resíduos N e C-terminal das duas proteínas estão identificados pelas letras N e C, respectivamente, e as setas em vermelho demonstram a localização do sítio ATPase (Adaptado de Luo *et al.*, 2008).

Medidas de afinidade para o ATP e ADP obtidas na presença de Mg^{2+} mostraram para NS3protease/helicase uma afinidade aproximadamente 10 vezes maior do que a do domínio helicase isolado (compreendendo os resíduos 178-618aa). Esta maior afinidade foi atribuída a efeitos eletrostáticos conduzidos pela fenda localizada na superfície do domínio protease (Luo *et al.*, 2008). Pouco se sabe sobre as características termodinâmicas das proteínas não estruturais dos flavivírus. Em relação às proteínas do DENV-2, até o momento, não foram encontrados relatos na literatura. Neste trabalho, utilizamos a espectroscopia de fluorescência para monitorar mudanças conformacionais na presença de diferentes concentrações de agentes desnaturantes e diferentes pHs.

As mudanças conformacionais na estrutura terciária da proteína NS3 íntegra e seus domínios puderam ser monitoradas medindo-se a fluorescência intrínseca dos resíduos de Trp localizados em diferentes regiões da proteína NS3. Medidas de espalhamento de luz também foram obtidas com o propósito de monitorar agregação em condições extremas de pH.

Diversos trabalhos de caracterização funcional da proteína NS3 de flavivírus (JEV, HCV e WNV) demonstram que a melhor atividade de hidrólise do ATP ocorre em pH 6,0; e que a melhor atividade proteolítica do HCV e DENV em pH 8,0 e 9,0; respectivamente. Contudo, não há na literatura sobre modificações conformacionais que podem ocorrer na proteína quando se varia o pH. Por esse motivo, decidimos fazer uma caracterização termodinâmica das proteínas NS3 íntegra, NS3 helicase e NS3 protease em função do pH. Pelo fato da NS3 não está associada a partículas virais livres e portanto, não induzir a formação de anticorpos anti-DENV facilitadores de infecção, essa proteína pode ser um alvo promissor para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue (Pang, 2003).

II) OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar funcional e termodinamicamente a proteína NS3 íntegra do DENV, seus domínios e complexos, e dessa forma obtermos informações relevantes que possam auxiliar na produção de inibidores específicos.

Este estudo teve como objetivos específicos:

- i) Clonar, expressar e purificar a proteína NS3 íntegra do DENV2, seus domínios e complexos isoladamente;
- ii) Avaliar as atividades ATPase, helicase e protease da proteína NS3;
- iii) Fazer caracterizações termodinâmicas da NS3 íntegra, dos domínios e complexos utilizando técnicas espectroscópicas para avaliar a emissão de fluorescência, espalhamento de luz, supressão de fluorescência por acrilamida e ATP, e interação com bis-ANS; e
- iv) Fazer uma correlação das atividades ATPase/helicase e protease com a termodinâmica da proteína.

III) MATERIAL E MÉTODOS

III.1) Desenho experimental

Nossos estudos baseiam-se na clonagem, expressão e purificação da proteína NS3 íntegra e seus domínios e complexos, para posterior caracterização estrutural, funcional e termodinâmica. Para a construção dos recombinantes, foram utilizadas as técnicas de PCR, clonagens em vetor expressão que foram conferidos por sequenciamento automático de DNA. Os plasmídeos (recombinantes sem mutação) foram utilizados para expressão em grande escala das proteínas de interesse em *E. coli*. As proteínas foram purificadas por métodos cromatográficos e ensaios enzimáticos foram realizados para verificar suas atividades funcionais, para posterior caracterização termodinâmica.

III.2) Cepas bacterianas, preparação de células competentes e transformação

III.2.1) Bactérias utilizadas nos procedimentos de clonagem e expressão

Para os procedimentos de clonagens, foram utilizados a *Escherichia coli* da cepa DH5 α (Promega) contendo mutações nos genes *recA1* e *endA1*, que previnem eventos de recombinação proporcionando maior estabilidade do inserto e melhora na qualidade dos plasmídeos isolados, respectivamente (**Tabela 1**).

Já, as cepas BL21 (λ DE3), Rosetta (λ DE3) e Codon Plus (RIL), (todas da Novagen), foram utilizadas para expressão das proteínas recombinantes. As duas primeiras carregam em seus genômas o gene da T7 RNA polimerase (proveniente do bacteriófago λ) que é controlado pelo promotor *lacUV5*. Contudo, as cepas Rosetta (λ DE3) e Codon Plus (RIL) acentuam a expressão de diversas proteínas, pois carregam

plasmídeos que expressam RNAs transportadores para os aminoácidos Arg, Leu e Ile; e Arg, Leu, Ile, Pro e Gly, respectivamente (**Tabela 1**).

As quatro cepas foram crescidas rotineiramente em meio LB (Sambrook and Russell, 2001), sendo a DH5 α a única cepa não susceptível à expressão de proteínas clonadas em vetor pET (Novagen).

Tabela 1: Cepas de *E. coli* com seus respectivos genótipos.

Cepa	Genótipo
DH5 α	<i>F</i> - 80 <i>dlacZ</i> , M15 (<i>lacZYA-argF</i>), U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> -, <i>mk</i> +), <i>phoAsupE44</i> - <i>thi</i> -1, <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
Codon Plus - RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> , <i>endA</i> , Hte [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^R]
Rosetta (λ DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> _B (rB ⁻ mB ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3) pRARE2 (Cam ^R)
BL21 (λ DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻), <i>gal</i> λ (DE3)

III.2.2) Preparação de células competentes para eletroporação

Bactérias *E. coli* da cepa DH5 α estocadas a -160°C foram descongeladas e estriadas em placa de Petri contendo meio LB Agar (sem antibiótico) e incubada a 37°C por 16 horas. Uma colônia foi transferida para 2mL de meio LB Líquido (sem antibiótico) e incubada com agitação de 200rpm a 37°C durante a noite. Um mililitro da cultura foi transferido para 100mL de meio LB Líquido e reincubada a 37°C a 200rpm até atingir a densidade óptica (A_{600}) entre 0,4–0,5. A cultura foi então incubada por 30min no gelo e centrifugada a 5000g (Sorval SS34) por 15min a 4°C (em todas as etapas de centrifugação). Após descartar o sobrenadante, o sedimento de bactérias foi ressuspenso em 100mL de água Milli-Q gelada (estéril), centrifugado e ressuspenso novamente em 50mL de glicerol a 10%. Em seguida, o sedimento celular centrifugado

e ressuspensão novamente em 5mL de glicerol a 10%. Finalmente, foi realizada uma nova centrifugação e ressuspensão do sedimento em 200 μ L de meio GYT estéril (Sambrook and Russell, 2001). Alíquotas de 40 μ L das células foram preparadas e congeladas a -70°C .

III.2.3) Preparação de células competentes para choque térmico

Bactérias *E. coli* das cepas Rosetta (λ DE3), Codon plus (RIL) e BL21 (λ DE3) estocadas a -160°C foram descongeladas e estriadas em placa de Petri contendo meio LB-agar (sem antibiótico) e incubada a 37°C por 16 horas. Uma colônia foi transferida para 1mL de meio LB líquido (sem antibiótico) e incubada com agitação de 200rpm a 37°C durante a noite. Quinhentos microlitros da cultura foi transferido para 50mL de meio LB líquido e reincubada a 37°C a 200rpm até atingir a densidade óptica (A_{600}) entre 0,4–0,5. A cultura foi então incubada por 30min no gelo e centrifugada a 5000g (Sorval SS34) por 15min a 4°C (em todas as etapas de centrifugação). Após descartar o sobrenadante, o sedimento de bactérias foi ressuspensão em 50mL de CaCl_2 a 100mM, incubado por 1h no gelo, centrifugado e ressuspensão novamente em 25mL de CaCl_2 a 100mM. A suspensão foi reincubada por mais 1h no gelo, centrifugada e o sedimento foi resuspensão em 2mL de CaCl_2 e adicionados 200 μ L de glicerol a 100% (estéril) para posterior incubação a 4°C durante a noite (Sambrook and Russell, 2001). Alíquotas de 100 μ L das células foram preparadas e congeladas a -70°C .

III.2.4) Transformação por eletroporação e choque térmico

Bactérias eletrocompetentes preparadas no item III.2.2 foram descongeladas em gelo, misturadas com 5 μ L da reação de ligação e transferidas para uma cubeta de eletroporação de 2mm (BioRad). A eletroporação ocorreu no eletroporador (BioRad) ajustado para 200 Ω de resistência, 25 μ F de capacitância e 2.5 volts (Sambrook e Russell, 2001). As bactérias eletroporadas foram transferidas para tubo de ensaio contendo 1mL de LB líquido sem antibiótico e incubadas por 45min a 37°C. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 13000rpm por 15 seg, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em 100 μ L de meio LB líquido e plaqueado em placa de Petri contendo LB agar e 100 μ g/mL de ampicilina. A incubação foi realizada a 37°C durante a noite.

Para a transformação por choque térmico (conforme item III.2.3) das cepas Rosetta (λ DE3), Codon plus (RIL) e BL21 (λ DE3), bactérias competentes em CaCl₂, foram descongeladas em gelo e em seguida adicionados ~25ng do DNA plasmídeo (que contém o gene de resistência para ampicilina), para posterior incubação por 30 minutos no gelo. As células foram submetidas ao choque térmico com incubação a 42°C por 45seg. sendo incubadas por 2min no gelo e posteriormente adicionamos 900 μ L de meio LB líquido sem antibiótico e incubados por 1h a 37°C. Em seguida 150 μ L foram plaqueados em placas de petri contendo meio LB-agar contendo antibiótico (34 μ g/mL de cloranfenicol e 100 μ g/mL de ampicilina para Rosetta [λ DE3], Codon plus [RIL], e 100 μ g/mL de ampicilina para a BL21 [λ DE3]) e incubados por 16h a 37°C.

III.3) Construção dos plasmídeos recombinantes

Para iniciarmos a construção dos recombinantes NS3 íntegra e de seus domínios protease e helicase, assim como o cofator NS2BCF40, pares de iniciadores foram desenhados no Laboratório de Genômica Estrutural, baseado-se na sequência do cDNA completo do DENV-2 cepa Nova Guiné derivado do plasmídeo pRS424-FLDEN2-NG-CDNA gentilmente cedido pelo Dr Barry Falgout à Dra. Mônica Monteiro Lomeli do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ.

As estratégias para os desenhos dos iniciadores foram baseadas nas publicações de Benarroch *et al.* (2004) para NS3 íntegra, NS3 helicase (169 - 618aa) e NS3 protease (1 - 168aa); Murthy *et al.* (1998) para NS3 protease (1 - 185aa); e Leung *et al.* (2001) para NS2BCF40glyNS3Pro e NS2BCF40 (**Tabela 2**). Os iniciadores foram desenhados com o propósito de termos uma temperatura de dissociação (T_m = *temperature melting*) o mais próximo de 60 °C, considerando apenas os nucleotídeos que fazem pareamento com a sequência do genoma viral (sem considerar os códon de terminação, e os sítios de reconhecimento para endonucleases de restrição). Para calcularmos a T_m dos iniciadores utilizamos a seguinte fórmula:

$$T_m = (\text{total de A+T}) \times 2 + (\text{total de C+G}) \times 4 \quad (\text{eq. 1})$$

Tabela 2: Iniciadores utilizados para amplificação dos genes NS3 e NS2B por PCR.

<i>Iniciadores</i>	<i>Sequência (5' a 3')</i>	<i>Tamanho do oligo</i>
NS3Pro/ <i>Bam</i> HI-F	AATAggATCCgCTggAgTATTgTgggATgT	30mer
NS3Hel/ <i>Bam</i> HI-F	GATATCggATCCgAAAAAgtATTg	25mer
NS3Pro168/ <i>Kpn</i> I-R	AATAggTACCCTAAgTCTgggCTATAgCACTCA	33mer
NS3Pro185/ <i>Kpn</i> I-R	AATAggTACCCTACTTTTCgAAAAATgTCATCTTCg	35mer
NS3Hel/ <i>Kpn</i> I-R	AATAggTACCCTACTTTCTTCCAgCTgCAAACCTC	34mer
NS2BCF40/ <i>Bam</i> HI-F	AATAggATCCgCCgATTTggAACTggAgA	29mer
NS2BCF40/ <i>Kpn</i> I-R	AATAggTACCCTACAgtTgTTTgTTCTTCCTCTT	33mer
NS3ProGly-F	gggggCggAggTAgTggTggAggCggggCTggAgTAT TgTgggATg	46mer
NS2BCF40Gly-R	CCCgCCTCCACCACTACCTCCgCCCCCAgtTgTT TgTTCTTCCTC	45mer

Os iniciadores NS3ProGly-F e NS2BCF40Gly-R contêm extensões de bases que não promovem pareamento com a sequência do DENV-2 mas que codificam os aminoácidos Gly₄SerGly₄, enquanto os demais iniciadores contêm na região 5' extensões de bases que codificam o sítio de reconhecimento para endonucleases de restrição e a sequência AATA ou GATATC que estabiliza a ligação da enzima de restrição. Nos iniciadores reversos foi introduzido o códon de terminação (CTA) a montante ao sítio de restrição.

Os produtos de PCR foram gerados seguindo combinação dos iniciadores descritos na **Tabela 3** em reações no volume final de 50µL, contendo entre 200 a 500ng de DNA plasmidial (pRS424-FLDEN2-NG-CDNA), tampão de reação 1X (*Invitrogen*), 1,5mM de MgSO₄ (*Invitrogen*), *Enhancer* 1X (*Invitrogen*), 250µM de cada dNTP, 50µM de cada iniciador (IDT – Integrated DNA Technologies) e 1,25U de *Pfx* DNA polimerase (*Invitrogen*). A amplificação foi realizada utilizando o termociclador da MJR seguidos de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1min (desnaturação), 60°C por

1min (anelamento) e 68°C por 1min por 1kb de fragmento a ser amplificado (extensão). Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de agarose 1,0% (BioRad, EUA) utilizando tampão TAE 1X (Sambrook e Russell, 2001), coradas com 0,5µg/mL de brometo de etídeo, visualizadas sobre luz ultravioleta e fotodocumentados. Utilizamos a *Pfx DNA polimerase* (Invitrogen) nas reações de PCR, devido a sua atividade *proofreading*, que aumenta a fidelidade na amplificação, e por conter em seu *kit* o tampão *Enhancer 10x*, que minimiza a formação de estruturas secundárias na molécula de DNA provocadas por sequências ricas em CpG.

Para a construção das proteínas quiméricas CF40-NS3Pro168aa, CF40-NS3Pro185aa e CF40-NS3íntegra, foram utilizados os iniciadores descritos na **Tabela 2** e suas respectivas combinações na **Tabela 3**. Os produtos de PCR referentes a sequência codificada da NS2BCF40gly (cofator hidrofílico de 40 resíduos de aminoácidos que contém o interdomínio Gly₄SerGly₄ na região 3' e que foi utilizado como molde comum para a construção das três proteínas quiméricas) e glyNS3 (NS3 protease ou íntegra, contendo o interdomínio de Gly₄SerGly₄ na região 5') foram gerados em duas reações de PCR independentes (**Figura 17 A**). Dois microlitros dos produtos amplificados das duas PCR foram posteriormente utilizados como molde em uma terceira reação de SOE-PCR (*Splicing Overlapping Extension – Polymerase Chain Reaction*) (**Figura 17 B**). Nessa terceira reação ocorreu a sobreposição dos interdomínios de glicina (região em negrito nos iniciadores NS3ProGly-F e NS2BCF40Gly-R) (**Tabela 1**) que serviram de iniciadores para reconhecimento da DNA polimerase e sua respectiva extensão (**Figura 17 B**). Para a construção dos três genes quiméricos, além dos moldes, foram utilizados na reação de SOE-PCR pares de iniciadores para as respectivas construções (**Tabela 3**), sendo o iniciador NS2BCF40/BamHI-F comum para as três construções.

Tabela 3: Combinações de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse por PCR.

<i>Gene Amplificado</i>	<i>Combinação dos Iniciadores</i>	<i>Tamanho (pb)</i>
NS3 Íntegra	NS3Pro/ <i>Bam</i> HI-F e NS3Hel/ <i>Kpn</i> I-R	1877*
NS3Pro168aa	NS3Pro/ <i>Bam</i> HI-F e NS3Pro169aa/ <i>Kpn</i> I-R	527*
NS3Pro185aa	NS3Pro/ <i>Bam</i> HI-F e NS3Pro185aa/ <i>Kpn</i> I-R	578*
NS3 helicase	NS3Hel/ <i>Bam</i> HI-F e NS3Hel/ <i>Kpn</i> I-R	1373*
NS2BCF40	NS2BCF40/ <i>Bam</i> HI-F e NS2BCF40/ <i>Kpn</i> I-R	164*
NS2BCF40glyNS3Pro168aa	NS2BCF40/ <i>Bam</i> HI-F e NS2BCF40gly-R (1ª reação)	178
(CF40-NS3Pro168aa)	NS3ProGly-F e NS3Pro168/ <i>Kpn</i> I-R (2ª reação)	544
	NS2BCF40/ <i>Bam</i> HI-F e NS3Pro168/ <i>Kpn</i> I-R (SOE-PCR)	695*
NS2BCF40glyNS3Pro185	NS2BCF40/ <i>Bam</i> HI-F e NS2BCF40gly-R (1ª reação)	178
(CF40-NS3Pro185aa)	NS3ProGly-F e NS3Pro185/ <i>Kpn</i> I-R (2ª reação)	595
	NS2BCF40/ <i>Bam</i> HI-F e NS3Pro185/ <i>Kpn</i> I-R (SOE-PCR)	746*
NS2BCF40glyNS3 íntegra	NS2BCF40/ <i>Bam</i> HI-F e NS2BCF40gly-R (1ª reação)	178
(CF40-NS3íntegra)	NS3ProGly-F e NS3Hel/ <i>Kpn</i> I-R (2ª reação)	1892
	NS2BCF40/ <i>Bam</i> HI-F e NS3Hel/ <i>Kpn</i> I-R (SOE-PCR)	2043*

*Subtraindo 23 pares de bases (contendo a sequência de bases que gera o sítio de restrição, sequência que estabiliza a interação da enzima de restrição e o códon de terminação) teremos o tamanho do *amplicon* sem as extensões de bases nos iniciadores.

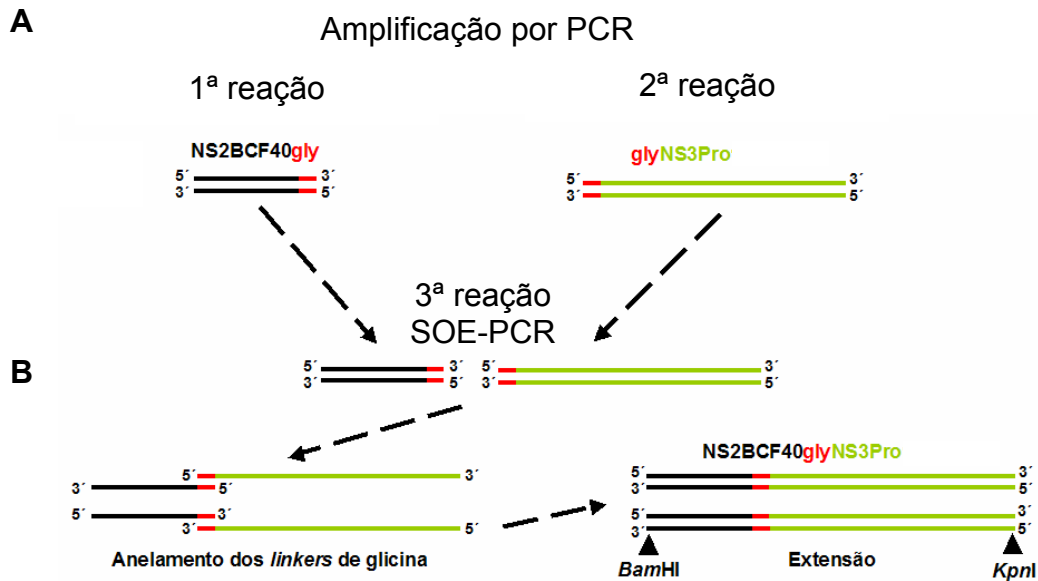


Figura 17: Estratégia utilizada para obtenção dos moldes para a amplificação das CF40-NS3Pro168aa, CF40-NS3Pro185aa e CF40-NS3íntegra. (A) Primeiramente foram realizadas duas reações independentes de PCR para obtenção dos moldes NS2BCF40gly e glyNS3 (protease ou íntegra). (B) Posteriormente estes moldes foram usados em uma terceira etapa de PCR (SOE-PCR, *Splicing Overlapping Extension – Polymerase Chain Reaction*), onde ocorreu a sobreposição dos interdomínios das glicinas que serviram de iniciador para ação da DNA polimerase e posterior anelamento dos iniciadores NS2BCF40/*Bam*HI-F e NS3Pro168/*Kpn*I-R (ou NS3Pro185/*Kpn*I-R ou NS3Hel/*Kpn*I-R que formaram sítios de restrição para o procedimento de clonagem).

Os produtos amplificados de todas as reações (inclusive a SOE-PCR) foram purificados com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e posteriormente clivados com as endonucleases de restrição *Kpn*I (NEB) e *Bam*HI (NEB) seguindo o protocolo do fabricante. Os insertos duplamente digeridos NS3 íntegra, NS3Pro168aa, NS3Pro185aa, NS3 helicase e NS2BCF40 foram inseridos no vetor de expressão pET21dEZ (10xHis-Ubiquitina na posição N-terminal), e os insertos das construções quiméricas CF40-NS3Pro168aa, CF40-NS3Pro185aa e CF40-NS3íntegra foram inseridos no vetor de expressão pET21dHisTev (6xHis-Tev na posição N-terminal) previamente digeridos com as mesmas enzimas (**Figuras 18 e 19**). Em todas as ligações de inserto com o vetor calculamos a razão molar de 1:3 (vetor:inserto).

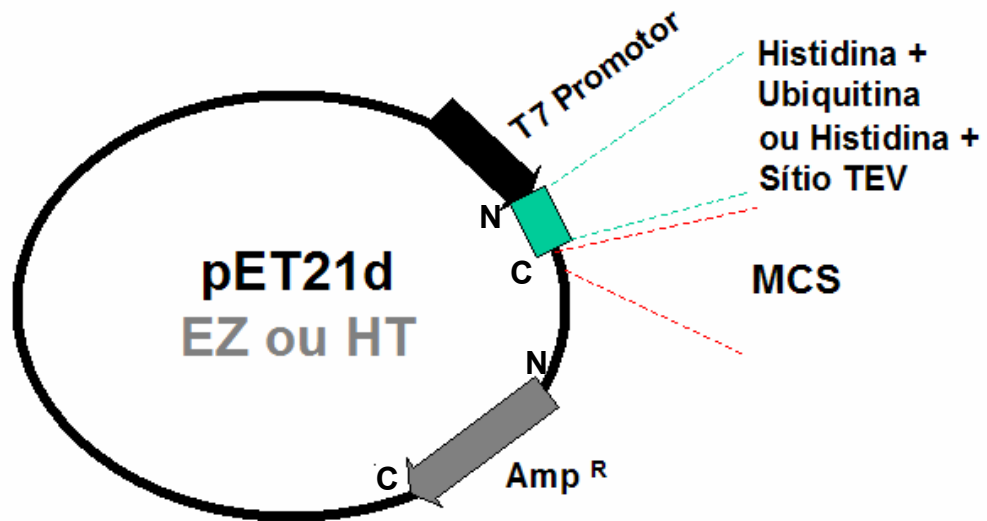
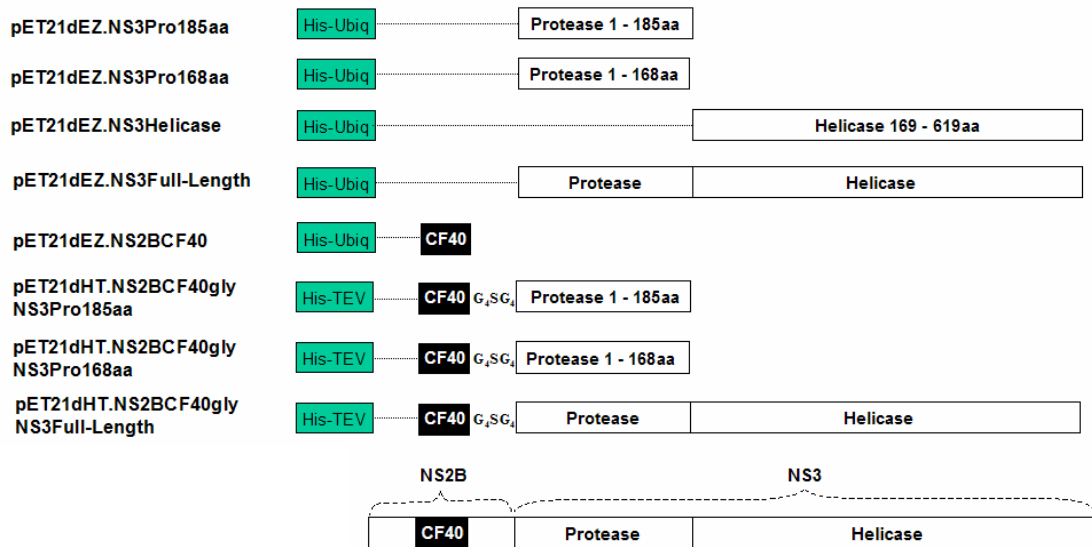


Figura 18: Esquema dos vetores pET21dEZ e pET21dHisTev utilizados para expressão de 10xHis-Ubiquitina ou 6xHis-TEV, respectivamente. MCS, sítio múltiplo de clonagem; Amp^R, gene de resistência ao antibiótico ampicilina; N, amino-terminal; C, carboxi-terminal.

As reações de ligação foram realizadas em volume final de 20µL contendo 400U de T4 DNA ligase (*New England Biolabs* – NEB), e incubação a 22°C (ou temperatura ambiente) durante a noite. A T4 DNA ligase foi inativada a 65°C por 10min, para posterior precipitação do DNA com adição de 30µL de água Milli-Q e 500µL de n-butanol (Tédia). Nessa etapa, há a formação de duas fases que serão misturadas com breve agitação no vortex (5 segundos), seguido de centrifugação a 13000rpm por 20minutos a 4°C (*Eppendorf – Centrifuge 5804R*). O sobrenadante é descartado e o sedimento seco a 37°C por 20 a 40min. Após sua completa secagem, o sedimento foi ressuspenso em 10µL de água Milli-Q e 5µL dos plasmídeos recombinantes foram utilizadas para transformar por eletroporação (Sambrook e Russell, 2001) em células eletrocompetentes de *E. coli* cepa DH5α (item III.2.3).

A



B

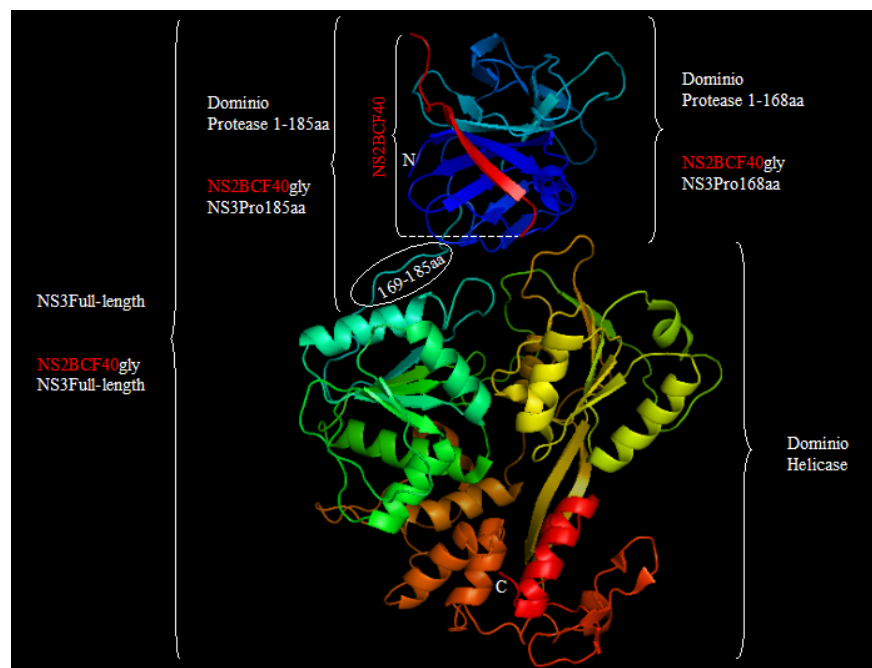


Figura 19: (A) Esquema das moléculas das proteínas recombinantes expressas em *E. coli*. No topo, a região da NS2B e NS3 da poliproteína viral do DENV. Barras em preto indicam os 40 resíduos da hidrofílicos da NS2B, barras em verde a posição N-terminal da cauda de histidina e sítio de clivagem para proteases (His-Ubiq e His-TEV), G₄SG₄ indicam o interdomínio de glicina Gly₄SerGly₄, do lado esquerdo a nomenclatura dos plasmídeos recombinantes construídos; e (B) o diagrama de *Ribbon* (programa PyMol) das 8 proteínas recombinantes. Estrutura da NS3 íntegra do DENV-4 complexada com o cofator da NS2B (PDB: 2vbc).

Para seleção dos clones positivos de *E. coli* resistentes a ampicilina que carreavam os plasmídeos recombinantes, foram feitas PCR de colônias, como se segue: i) colônias de bactérias que cresceram durante a noite, nas placas de LB contendo ampicilina (item III.2.4), foram repicadas em outra placa de Petri contendo o mesmo meio e incubadas a 37°C durante a noite; ii) no dia seguinte, as colônias foram identificadas (numeradas); e iii) com um palito de dente ou *tip* estéril, uma pequena quantidade de bactérias de cada colônia foi ressuspensa em 20µL de H₂O Milli-Q, aquecidas a 100°C por 2min para lisar as células. Após centrifugação por 30seg a 13000rpm o sobrenadante, contendo o plasmídeo foi utilizado na PCR.

O PCR foi realizado em reações de 25µL contendo tampão *Green Taq* 1X (*Promega*), 125µM de cada dNTP, 10µM do par de iniciadores T7Promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')/T7Terminator (5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3') que flanqueam o sítio múltiplo de clonagem (MCS) dos plasmídeos, 1U de *Taq* DNA polimerase (*Promega*) e 2µL do sobrenadante da suspensão de colônia. A reação foi realizada em termociclador da MJR, utilizando o seguinte protocolo de amplificação: 94°C por 2min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1min, 45°C por 1min e 72°C por min por 1kb. As reações de PCR de colônia foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X e as colônias carreando plasmídeos contendo os insertos foram identificadas. Cinco colônias foram inoculadas em 10mL de meio LB líquido contendo 100µg/mL de ampicilina e cultivadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte, as culturas foram centrifugadas na temperatura ambiente a 3200rpm por 15 minutos e dos sedimentos celulares foi extraído os DNAs plasmidiais com o o *kit* de miniprep *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (*Promega*), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente as preparações plasmideais (**Figura 19**) foram quantificados utilizando espectrometria de absorvância a 260 e 280nm (Sambrook e Russell, 2001) e

submetidos à reação de sequenciamento com dideóxi-nucleotídeos (ddNTP) marcados com fluorocromos (**item III.3.1**).

Após quantificação das preparações plasmídeais dos clones de interesse, foram realizadas reações em volume final de 15,0 μ L, contendo 250ng do plasmídeo recombinante e 3,2 μ M dos iniciadores *T7Promoter* e *T7Terminator* (em tubos separados) e 7,5 μ L do *kit* de sequenciamento *DYEnamycTM ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kit[®]* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante, o sequenciamento realizado no sequenciador automático ABI3730 da *Applied Biosystems*.

Os resultados das reações de sequenciamento foram obtidas por análise dos eletroferogramas no programa *BIOEDIT* versão 7.0.5.3 (disponível na internet). As sequências de bases foram comparadas com as do cDNA do DENV2 – cepa Nova Guiné (sequência disponibilizada pela Dra Mônica Monteiro Lomeli).

No eletroferograma, as regiões com ambiguidade foram representadas por “N”, o que indica a presença de alelos distintos. Para caracterizar a ambiguidade observada no sequenciamento direto do DNA plasmidial como uma variação, a mesma deveria ser lida no eletroferograma da fita complementar, caso não fosse verificada a ambiguidade em ambas as fitas, a hipótese de mutação era descartada, e o plasmídeo estocado a -20°C.

III.4) Expressão e purificação das proteínas

Após a obtenção dos plasmídeos recombinantes e confirmação por sequenciamento automático, estes foram inseridos em três cepas de *E. coli* (BL21[λ DE3]; Codon Plus [RIL] e Rosetta [λ DE3]), com o objetivo de identificar qual célula promoveria o melhor nível de expressão das proteínas de interesse. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com IPTG, e posteriormente foram realizados testes de solubilidade, para verificar se as proteínas recombinantes encontravam-se solúveis ou em corpo de inclusão para assim definirmos os protocolos de purificação.

III.4.1) Teste de expressão das proteínas

Os testes de expressão das proteínas recombinantes foram realizados de acordo com o seguinte protocolo: após transformação as cepas bacterianas por choque térmico (item III.2.3) (Sambrook e Russell, 2001), com cada plasmídeo recombinante três colônias de cada cepa foram transferidas para 2mL de meio LB líquido contendo 100 μ g/mL de ampicilina para a cepa BL21 (λ DE3), e 100 μ g/mL de ampicilina e 34 μ g/mL de cloranfenicol para as cepas Codon Plus (RIL) e Rosetta (λ DE3), que foram incubadas com agitação de 200rpm a 37°C durante a noite. No dia seguinte, 100 μ L de cada cultura foram transferidos para 5mL de meio LB líquido (razão 1:50) contendo os antibióticos adequados e incubados a 37°C até atingir a densidade óptica (A_{600}) entre 0,7 e 0,8. A indução ocorreu com a adição de IPTG na concentração final de 0,5mM, seguido de incubação a 25°C por 4 horas. Após este período, 1mL de cada cultura, induzida e não induzida (controle) foi transferido para *ependorfs* de 1,5mL e centrifugados a 13000rpm por 15seg. O sobrenadante foi descartado, e 50 μ L de água

destilada e 50µL de tampão de amostra para SDS-PAGE 2X (2mL de Tris-HCl 0,5M (pH 6,8), 4mL de SDS 10%, 0,02g de azul de bromofenol, 0,308g de DTT e 4mL de glicerol 50%, num volume final de 10mL) foram então adicionados ao sedimento. A suspensão foi vortexada até a completa liberação do sedimento, posteriormente fervida a 100°C por 10min e centrifugada a 13000rpm por 30seg. Dez microlitros de cada amostra e 5µL de marcador de peso molecular de proteína (*Page Ruler*TM - *Prestained Protein Ladder-BioRad*) foram analisados em gel de SDS-PAGE a 12% ou 15% sobre as condições de 250V e 30mA por 1h. As bandas foram visualizadas após coloração do gel de SDS-PAGE com solução de *Comassie-blue*.

III.4.2) Teste de solubilidade da proteína

Para verificar se as proteínas de interesse expressas nas cepas de *E. coli* encontravam-se na fração solúvel ou em corpo de inclusão, o sedimento (correspondente a 1 mL de cultura de bactéria) foi ressuspensão em 100µL de tampão contendo Tris-HCl 50mM, pH 7,2, 100 mM NaCl e 1 mM de β-mercaptoetanol. Foram adicionados 20µg/mL de lisozima, PMSF na concentração final de 2mM, e a ressuspensão foi incubada no gelo por 30min com agitação ocasional. Posteriormente, foram adicionados 100µg/mL de deoxicolato de sódio seguido de incubação a 37°C por 15 min. A degradação do DNA foi realizada adicionando-se 20µg/mL de DNase e MgCl₂ (ou MgSO₄) na concentração de 4mM, seguido de incubação a 37°C por 30min. O lisado foi centrifugado a 7000rpm por 15min na temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para outro *ependorf* de 1,5mL. Ao sobrenadante, foram adicionados 100µL de tampão de amostra para SDS-PAGE 2X e o sedimento foi ressuspensão em 100µL de tampão de amostra para SDS-PAGE 2X

mais 100 μ L de água destilada. Após fevura por 10min, 10 μ L das amostras foram aplicadas no gel de SDS-PAGE (**conforme ítem III.4.1**).

III.4.3) Expressão das proteínas

Após identificação da cepa bacteriana transformada que melhor expressou a proteína, esta foi cultivada em 50mL de meio LB líquido contendo os antibióticos adequados (**ítem III.4.1**) a 37°C durante a noite com agitação a 200rpm. No dia seguinte, 40mL da cultura foram transferidos para 2 litros de meio LB líquido com antibióticos e incubados a 37°C até atingir densidade óptica (A_{600}) entre 0,7 e 0,8. A indução ocorreu com a adição de 0,5mM de IPTG e incubação a 25°C por 4h. Após este período, a cultura celular foi centrifugada a 5000rpm por 20min a 4°C (Sorvall rotor SS34), o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi estacado a -20°C.

III.4.4) Lise celular (proteínas solúveis e em corpo de inclusão)

Os procedimentos de lise celular foram realizados no gelo ou a 4°C (câmara fria). Os sedimentos de células estocadas a -20°C foram ressuspensos e lisados em 50mL de tampão A ou B (**Tabela 4**) contendo PMSF a 1mM (mantendo sempre a suspensão no gelo para minimizar eventos de degradação da proteína). A suspensão foi transferida para um bequer de alumínio e a ela adicionamos 5mg/mL de lisozima, seguido de agitação por 1h a 4°C. Após este período de suspensão foi transferindapara tubos Falcon de 50mle submetida a 20 ciclos de choque térmico com nitrogênio líquido por 30seg e 42°C por 1min. O lisado foi transferido de volta para o bequer de alumínio, e a ela adicionamos 20 μ g/mL de DNase e MgCl₂ a 4mM e seguido de constante

agitação por 1h a 4°C. Após perder a viscosidade, a suspensão foi centrifugada a 15000rpm por 20min a 4°C (Sorvall rotor SS34) e o sobrenadante e o sedimento celular contendo as proteínas solúveis e em corpo de inclusão, respectivamente, foram estocadas a -20°C.

Tabela 4: Tampões utilizados para a lise celular e purificação das proteínas recombinantes.

<i>Proteínas recombinantes purificadas</i>	<i>Tampão A* contendo</i>
NS3 helicase	NaCl 500mM
His-Ubiq-NS2BCF40	NaCl 500mM
CF40-NS3Pro168aa	NaCl 200mM
CF40-NS3Pro185aa	NaCl 200mM
CF40-NS3íntegra	NaCl 500mM
	<i>Tampão B# contendo</i>
NS3Pro168aa	NaCl 500mM
NS3Pro185aa	NaCl 500mM
NS3 íntegra	NaCl 500mM

*Tampão A = Tris-HCl 50mM pH8,0; β-mercaptoetanol (β-ME) 5mM e glicerol 5%.

#Tampão B = Tampão A sem glicerol.

As proteínas em corpo de inclusão foram ressuspensas em tampão B (**Tabela 4**) contendo 8M de ureia (USB) sob constante agitação a 4°C durante a noite, centrifugadas a 15000rpm por 20min a 4°C (Sorvall rotor SS34) e o sobrenadante foi estocado a 4°C.

III.4.5) Purificação das proteínas solúveis (NS3 helicase, His-Ubiq-NS2BCF40, CF40-NS3Pro168aa, CF40-NS3Pro185aa e CF40-NS3íntegra).

Para a purificação das proteínas solúveis 2 colunas de níquel HisTrap de 5mL (*GE-Healthcare*) foram conectadas no coletor de frações (*Pharmacia – LKB FRAC 100*)

e equilibrada com 50mL de tampão A. Em seguida, a proteína solúvel foi imobilizada na coluna HisTrap pela passagem do sobrenadante pela coluna num fluxo de 2mL/min. Essa foi lavada com 50 mL de tampão A e a proteína de interesse foi eluída com gradiente de 0 a 250mM de imidazol e coletadas em fração de 4mL. Para identificar em qual fração a proteína se encontrava, 25 μ L de cada fração foram misturadas com 25 μ L de tampão de amostra para SDS-PAGE 2X, aquecidos por 10min a 100°C e analisados em gel de SDS-PAGE a 12% ou 15% e corados com Coomassie-*blue*.

As frações, contendo as proteínas foram reunidas e testadas com enzimas específicas com objetivo de remover a cauda de histidina. Para as proteínas que foram expressas com cauda de 10x-histidina + sítio da ubiquitina hidrolase, utilizou-se a hidrolase de levedura ubiquitina (YUH – *yeast ubiquitin hydrolyse*); e para as proteínas com cauda de 6x-histidina + sítio da TEV protease (TEV – *Tobacco Etch Virus*), a TEV protease foi utilizada. Os testes de clivagem foram realizados com 100 μ L das frações reunidas, misturados com diferentes volumes de enzimas (1:1; 1:0,5; 1:0,25; 1:0,1; e 1:0,05 volumes amostra:enzima) e incubados a temperatura ambiente durante a noite. A clivagem foi confirmada por SDS-PAGE, com intuito de avaliar a menor razão amostra:enzima necessária à clivagem completa da proteína de interesse. A razão volume da proteína:volume da enzima mais adequada foi utilizada nas frações reunidas.

Para separarmos a cauda de histidinas hidrolisada e as enzimas YUH ou TEV (ambas contendo cauda de histidinas) da proteína de interesse, a solução foi primeiramente dialisada contra o tampão A para a retirada do imidazol proveniente do gradiente. Após a diálise, a proteína de interesse já sem cauda foi passada em três colunas de níquel His-Trap, previamente equilibradas com tampão A. Nesta etapa, a

proteína digerida com YUH ou TEV protease não foi retida na coluna de níquel, mas sim a cauda de histidina hidrolisada e as enzimas YUH e TEV.

Após a purificação das proteínas de interesse, as mesmas foram concentradas sob pressão utilizando o *Stirred Ultrafiltration Cell (Millipore - Amicon)* contendo membrana de celulose de 10.000MWCO (*Millipore*). Para NS3 helicase, foi necessário adicionar 0,1% de CHAPS à solução para minimizar o efeito de agregação. Os ultrafiltrados foram utilizados como branco para a quantificação das proteínas concentradas pela determinação do coeficiente de extinção molar a 280nm (**Tabela 5**). As proteínas foram armazenadas a -80°C . Todo o procedimento descrito acima foi referente à purificação das proteínas NS3 helicase, CF40-NS3Pro168aa e CF40-NS3Pro185aa.

Para a purificação da His-Ubiq-NS2BCF40 esta foi imobilizada em coluna de troca iônica Hi-Trap Sepharose Q *Fast Flow* (Q-FF) de 5mL (*GE-Healthcare*). A coluna foi equilibrada em 50mL de tampão A (contendo 40mM de NaCl) e a amostra, inicialmente em tampão A com NaCl a 500mM, foi diluída em tampão A (sem NaCl) para concentração de NaCl final de 40mM. A amostra diluída foi passada na coluna Hi-Trap Q-FF e a proteína foi eluída com gradiente de 40 a 500mM de NaCl e coletada em frações de 4mL. Para identificar em qual fração a proteína se encontrava, uma alíquota de cada fração coletada foi analisada em gel de SDS-PAGE. As frações contendo as proteínas foram reunidas e estocadas a -20°C . Neste caso, não houve a necessidade de remover a cauda de histidina com a hidrolase (YUH).

A proteína CF40-NS3íntegra também foi passada numa coluna Hi-Trap Q-FF seguindo o mesmo procedimento de purificação da His-Ubiq-NS2BCF40. Após esta etapa a cauda de histidina foi removida da TEV protease, como descrito acima. A

amostra foi concentrada utilizando *Centriprep* YM-30 de 30.000MWCO (*Millipore-Amicon*), para posterior purificação por gel-filtração.

Tabela 5: Características físico-químicos das proteínas recombinantes e o total de resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina por proteína.

<i>Proteínas Recombinantes</i>	<i>Total de AA</i>	<i>P.M. (Da)</i>	<i>pI</i>	ϵ_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$)	<i>Trp</i>	<i>Tyr</i>	<i>Phe</i>
NS3Pro168aa	168	17848,4	9,35	36440	5	6	3
NS3Pro185aa	185	19907,6	8,07	36440	5	6	4
NS3 helicase *	450	51504,9	6,80	66140	9	11	15
NS3 íntegra *	618	69339,3	8,50	102330	14	17	18
His-Ubiq-NS2BCF40 [#]	144	16282,9	5,33	6990	1	1	2
CF40-NS3Pro168aa	224	23539,4	5,36	41940	6	6	3
CF40-NS3Pro185aa	242	25685,7	5,01	41940	6	6	4
CF40-NS3íntegra*	674	75026,4	6,10	107830	15	17	18

ϵ_{280} = Coeficiente de Extinção Molar a 280nm (não foram consideradas as cisteínas); P.M. = peso molecular; M, molar; AA, aminoácidos; pI, ponto isoelétrico; *, presença de 5 resíduos de cisteína; #, His-Ubiq contendo 1 Tyr e 2 Phe, e NS2BCF40 contendo 1 Trp .

III.4.6) Purificação das proteínas derivadas de corpo de inclusão (NS3Pro168aa, NS3Pro185aa e NS3 íntegra).

Proteínas em corpo de inclusão foram solubilizadas e estocadas a $-20^{\circ}C$ como descrito no item III.4.4. Para purificá-las quarenta mililitros da resina de Ni^{2+} -NTA (Qiagen) foram empacotados em coluna de cromatografia que foi conectada ao coletor de frações (*Pharmacia – LKB FRAC 100*). Posteriormente, a resina foi equilibrada com 200mL do tampão B contendo 8M de ureia e, em seguida, a proteína foi imobilizada na resina de Ni^{2+} -NTA por passagem da solução protéica a um fluxo de 5mL/min. A proteína foi eluída da coluna usando-se um gradiente 0 a 250mM de imidazol, e frações coletadas foram analisadas por em gel de SDS-PAGE. As frações contendo a proteína

foram reunidas e submetidas à diálise (para o renovelamento protéico) conforme descrito abaixo .

Para minimizar o processo de agregação das proteínas na etapa de diálise, fez-se uma análise semiquantitativa da proteína nas frações reunidas, por determinação da absorvância (A_{280}). A solução foi então diluída para A_{280} entre 0,8 e 1,0, com tampão B contendo 8M de ureia.

As proteínas NS3Pro168aa e NS3Pro185aa foram dialisadas em saco com porosidade de 3.000-6.000 MWCO (*Spectrum Laboratories*) contra o tampão C (contendo Tris-HCl 50mM pH 8,0, NaCl 500mM, β -ME 5mM, e glicerol 10%); e a proteína NS3 íntegra foi dialisada em saco de diálise com porosidade de 12.000-14.000 MWCO (*Spectrum Laboratories*) contra o tampão D (contendo Tris-HCl 50mM pH 8,0, NaCl 500mM, β -ME 5mM, glicerol 10%, e CHAPS 0,05%). Todas as diálises foram realizadas a 4°C sob constante agitação durante a noite.

Após a diálise das proteínas supracitadas, foram realizados testes de hidrólise com YUH (**conforme item III.4.5**), para remoção da cauda de histidina-ubiquitina. Após determinar a razão de amostra:enzima, as proteínas NS3 íntegra e NS3Pro185aa foram incubadas com a YUH a temperatura ambiente durante a noite. Para a NS3Pro168aa a incubação foi interrompida após 5 horas devido à agregação protéica.

Para a remoção da cauda de histidina-ubiquitina hidrolisada e da enzima YUH foram utilizadas três colunas de níquel His-Trap de 5mL, previamente equilibradas com 50mL dos tampões C ou D (dependendo da proteína). As proteínas de interesse sem cauda de histidina não interagiram com a coluna de níquel His-Trap. Posteriormente, as proteínas purificadas foram concentradas sob pressão utilizando-se o *Stirred Ultrafiltration Cell (Millipore-Amicon)*, com a membrana de celulose de 30.000MWCO (*Millipore-Amicon*) para concentração da NS3 íntegra, e a de

10.000MWCO (*Millipore-Amicon*) para concentração das proteínas NS3Pro168aa e NS3Pro185aa, sendo adicionado 0,1% de CHAPS no tampão de ambas proteínas. O ultrafiltrado das proteínas concentradas foi utilizado como branco para quantificação das proteínas (**item III.3.5**) e posteriormente a amostra foi armazenada a -20°C .

III.5) Preparação de anticorpos policlonais para os domínios protease e helicase

As proteínas NS3Pro168aa e NS3 helicase purificadas foram inoculadas em 6 camundongos machos (*naive*) Balb/c de 5 semanas de vida. Antes da imunização, foi realizada a coleta de aproximadamente 500 μL de sangue do plexo orbicular de cada camundongo. As frações coletadas de cada camundongo foram reunidas e incubadas a 37°C por 20min, seguido de centrifugação a 3000rpm por 30minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante (soro) foi transferido para outro tubo e armazenado a -20°C .

Para as inoculações, foram utilizados 50 μg de proteína solúvel (proteínas inoculadas separadamente) diluídos em volume final de 500 μL de salina tamponada (PBS) e misturados a 500 μL de adjuvante completo ou incompleto de Freund (Sigma), homogeneizado por 15 ciclos de sonicação no gelo. Cem microlitros da mistura foram inoculados na região intraperitoneal de cada camundongo. A primeira inoculação foi realizada com adjuvante completo, seguido de 4 etapas de inoculação com adjuvante incompleto. Cada inoculação foi realizada com intervalo de 2 semanas entre elas.

Após o período de imunização, os camundongos foram sedados com éter e a coleta do sangue foi realizada por pulsão intracoronária. Aproximadamente 1mL de sangue foi extraído de cada camundongo, sendo as frações reunidas e processadas (como descrito acima) para a obtenção do soro. Para confirmar a presença de

anticorpos que reconhecem os domínios protease e helicase, foram realizados ensaios de ELISA (*Enzyme Linked Imunoassay*) e *Western-blot*.

III.4.1) Ensaio de ELISA

Ensaios de ELISA foram realizados para confirmar a produção de anticorpos contra os domínios protease e helicase. Cada proteína foi diluída em solução de PBS a uma concentração de 5µg/mL e 50µL de amostra foram distribuídos em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi incubada a 4°C durante a noite, sendo o sobrenadante descartado no dia seguinte. Em cada poço, foram adicionados 200µL de solução de PBS contendo 1% de gelatina, e a placa foi incubada a 37°C por 2h. O sobrenadante foi descartado a placa lavada com PBS contendo 0,1% de Tween 20.

Para testar a atividade do soro e do soro pré-imune, esses foram diluídos em seriadas (1:3) a partir da diluição inicial (primeiro poço contendo o soro imune ou soro pré-imune diluído 1:50 em solução de PBS contendo 1% de gelatina e 0,1% de Tween 20) diretamente na placa. No dia seguinte três lavagens foram realizadas com solução de PBS contendo 0,1% de Tween 20 e 50µL de PBS, 1% de gelatina e 0,1% de Tween 20 contendo anticorpo anti-IgG de camundongo (conjugado da fosfatase alcalina), na diluição 1:4000 foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 1 ½ hora. O sobrenadante foi descartado e placa lavada 3 vezes para revelação. Para revelação dissolveu-se uma pastilha de PNPP (p-nitro-fenil-fosfato) em 5mL de Tris-base a 0,1M e MgCl₂ a 0,003M, e 50µL dessa solução foram adicionados por poço da placa, e incubado a temperatura ambiente por 20min. A análise de absorbância foi realizada em 450nm no leitor de placas *EspectraMax M5 (Molecular Devices)*.

III.4.2) Ensaio de *Western-blot*

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE a 12% e posteriormente o gel e a membrana de nitrocelulose (previamente cortada no tamanho do gel) foram equilibradas por 5 minutos em tampão de eletrotransferência (5,82g de Tris-base, 2,93g de glicina e 200mL de metanol em volume final de 1000mL). O “sanduíche” de transferência foi preparado e as proteínas transferidas para a membrana com o tampão de eletrotransferência a 4°C durante a noite a 30V e 90mA.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de TBST 1X (1,2g de Tris base, 8,77g de NaCl, 0,5mL de Tween-20, pH 7,6 com HCl em volume final de 1L) contendo 5% de leite em pó (marca Molico) durante 2h. Posteriormente o soro contendo os anticorpos primários diluídos em TBST 1X (contra o domínio helicase diluído 1:50.000; contra o domínio protease 1:20.000 e contra a cauda de histidina 1:1.000) foi adicionado seguido de incubação com constante agitação durante a noite a 4°C. Descartado o anticorpo primário a membrana foi lavada 3 vezes com TBST 1X por 10min cada, e TBST 1X contendo 5% de leite em pó e anticorpo secundário HRP anti-*mouse* (diluído 1:4.000) foram adicionados e a membrana foi incubada sob constante agitação por 1 hora. Descartado o anticorpo secundário, 3 lavagens com TBST 1X para posterior revelação da membrana com *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific), seguindo protocolo do fabricante.

III.6) Ensaios termodinâmicos

III.6.1) Ensaio de espectrometria de fluorescência

As proteínas purificadas foram solubilizadas em diferentes concentrações de ureia (0-8M) e valores de pH (2,0-11,5), e a mudança no espectro de emissão de fluorescência foi monitorada por medidas de espectrofotometria de fluorescência e espalhamento de luz.

Os experimentos foram realizados no espectrofluorímetro Hitachi F-4500 em cubetas de quartzo de fluorescência a 25°C. Para avaliar o grau de desnaturação das proteínas, o comprimento de onda de excitação foi fixado em 278nm e emissão avaliada num intervalo de 300 a 420nm; as fendas de excitação e emissão variaram para cada proteína. Para avaliarmos o deslocamento do espectro de emissão de fluorescência devido à exposição dos resíduos de Trp, Tyr ou Phe ao meio aquoso, foram obtidos valores de centro de massa espectral (que traduz o centro de energia do espectro de emissão de fluorescência) conforme a expressão:

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum \nu_i F_i}{\sum F_i} \quad (\text{eq. 2})$$

onde, $\langle \nu \rangle$ é o centro de massa espectral em número de ondas, F_i é a fluorescência emitida no número de ondas ν_i . O processo de desnaturação causado pelo agente desnaturante ou pela variação do pH foi monitorado convertendo-se o espectro de centro de massa em grau de desnaturação (α) para cada concentração de ureia. O parâmetro α foi relacionado ao centro de massa $\langle \nu \rangle$ pela expressão:

$$\alpha = [(\langle v \rangle_{\text{obs}} - \langle v \rangle_{\text{N}}) / (\langle v \rangle_{\text{D}} - \langle v \rangle_{\text{N}})] \quad (\text{eq. 3})$$

onde $\langle v \rangle_{\text{obs}}$ é o valor de centro de massa observado em determinada concentração de ureia; $\langle v \rangle_{\text{N}}$ e $\langle v \rangle_{\text{D}}$ correspondem ao centro de massa da proteína nos estados nativo e desnaturado, respectivamente.

A energia livre de desnaturação foi calculada utilizando-se a equação de Gibbs:

$$\Delta G = -R.T.\ln K_{\text{eq}} \quad (\text{eq. 4})$$

onde R, é a constante dos gases; T, a temperatura em Kelvin; e K_{eq} é a constante de equilíbrio ($K_{\text{eq}} = [D]/[N]$; onde D é a concentração da forma desnaturada da proteína e N é a concentração da forma nativa da proteína). Já as mudanças de energia livre foram correlacionadas empiricamente utilizando-se a equação:

$$\Delta G_u = \Delta G_{(\text{H}_2\text{O})}^{\circ} - m [\text{ureia}] \quad (\text{eq. 5})$$

onde ΔG_u é a energia livre de desnaturação em cada concentração de ureia, $\Delta G_{(\text{H}_2\text{O})}^{\circ}$ é a energia de desnaturação na ausência de agente desnaturante, e m é a constante de proporcionalidade que informa a área da proteína acessível ao solvente (ASA).

Para a análise do grau (percentual) de desnaturação em ureia, 1 μM de proteína foi adicionado em tampão contendo: 50mM de Tris-HCl pH 8,0, 200mM de NaCl, 5mM de β -mercaptoetanol, 5% de glicerol e diferentes concentrações de ureia (variação de 0,2M de ureia).

Para a obtenção de pH específicos no intervalo entre 2,3 e 11,5, foram misturados diferentes proporções de ácido cítrico e citrato de sódio (pH 2,2 a 7,5), Tris

e HCl (pH 7,2 a 9,2), carbonato de sódio e bicarbonato de sódio (pH 9,2 a 10,2), e CAPS e NaOH (pH 9,0 a 11,5), todas as soluções com 0,1M de concentração final. Para verificar o efeito do pH, utilizou-se a proteína a 1 μ M e a razão da área espectral de fluorescência, A/A_0 , foi utilizada para avaliar o processo de agregação; onde A e A_0 são as áreas espectrais obtidas em determinada condição de pH e pH 7,4, respectivamente.

Para avaliar se as proteínas encontravam-se em processo de agregação em diferentes pH, foram realizadas medidas de espalhamento de luz estático (*Light Scattering* – LS), no espectrofluorímetro Hitachi F-4500 em cubetas de quartzo de fluorescência a 25°C, utilizando 330nm como comprimento de onda de excitação, e a emissão observada entre 300 e 360nm. A mudança do CM em função da variação do pH também foi avaliada de acordo com a equação 3. Todos os experimentos foram incubados a 25°C por 1h.

III.6.2) Ensaio de supressão de fluorescência por acrilamida

A acessibilidade do triptofano ao solvente foi avaliada por experimentos de supressão de fluorescência por acrilamida. Esta técnica possibilita identificar variações no ambiente hidrofóbico da proteína causadas pelo solvente e que afetam o grau de exposição dos resíduos de Trp ao meio. A adição de acrilamida, causa uma redução da fluorescência dos resíduos de Trp. Quanto maior for a supressão de fluorescência, maior era a exposição dos resíduos de Trp ao meio aquoso e vice-versa. Os experimentos de supressão com acrilamida foram realizados no espectrofotômetro Hitachi F-4500 em cubetas de quartzo de fluorescência a 25°C.

Os ensaios foram realizados titulando o estoque de 3M de acrilamida para concentrações finais variando de 0 a 164mM em 500 μ L de reação contendo 1 μ M da proteína (tampão: 50mM de Tris-HCl (pH 8,0); 200mM de NaCl; 5mM de β -mercaptoetanol e 5% de glicerol). O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 295nm, com monitoramento da emissão de fluorescência do triptofano entre 325-355nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5,0 e 10,0, respectivamente. Para os ensaios de supressão de fluorescência com o propósito de avaliar modificações conformacionais das proteínas em diferentes pHs, o tampão utilizado foi o mesmo empregado para os ensaios de ATPase na ausência de ATP (ver **item III.7.1**). Os dados de supressão de fluorescência foram analisados utilizando-se a equação de Stern-Volmer (Lakowicz, 1999):

$$(F_0/F) = K_{sv} \cdot [Q] + 1 \quad (\text{eq. 6})$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente; $[Q]$ é a concentração do supressor; K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, que é a medida direta da eficiência de supressão. Se o gráfico de $(F_0/F) \times [Q]$ tiver uma linearidade entre os pontos, a K_{sv} pode ser obtida pelo coeficiente angular da reta.

Em proteínas com vários resíduos de triptofano, existem diferenças significativas na acessibilidade de cada um ao solvente, reflexo de diferentes conformações locais na estrutura da proteína, levando ao desvio da linearidade no gráfico de Stern-Volmer. A fração de acessibilidade do triptofano ao supressor pode ser calculada utilizando a equação de Lehrer:

$$F_o/\Delta F = \{(1/f_a \cdot K_{sv}) \cdot 1/[Q]\} + 1/f_a \quad (\text{eq. 7})$$

onde ΔF é $F_o - F$, e f_a representa a fração dos resíduos de triptofano que são acessíveis ao solvente, cuja supressão de fluorescência pode ser calculada pelo *plot* de Lehrer ($F_o/\Delta F \times 1/[Q]$).

III.6.3) Ensaio de supressão de fluorescência por ATP

O ensaio de supressão de fluorescência por ATP tem como principal objetivo medir a sua constante de ligação às proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase. Essa medida pode ser realizada devido à redução na intensidade de fluorescência do Trp mais próximo ao sítio de ligação do ATP. Os experimentos de supressão de fluorescência com ATP foram realizados no espectrofotômetro Hitachi F-4500 em cubetas de quartzo de fluorescência a 25°C. A excitação foi feita em 295nm e a emissão de fluorescência do Trp monitorada entre 325-355nm. As fendas de excitação e emissão foram de 5,0 e 10,0, respectivamente. o estoque de 3M de acrilamida para concentrações finais variando de 0 a 164mM Os ensaios foram realizados titulando-se o estoque de ATP a 10mM para concentrações finais variando de 0 a 100µM em 500µL de reação contendo 0,5µM da proteína em 40mM de MES (pH 5,5, 6,0 e 6,5) ou HEPES (pH 6,5, 7,0 e 7,5) ou Tri-HCl (pH 7,5, 8,0 e 8,5), 5mM de DTT, e 100mM de KCl. Os dados de supressão de fluorescência foram analisados utilizando-se a equação:

$$(F_o/F) = K_a \cdot [ATP] + 1 \quad (\text{eq. 8})$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na presença e na ausência do supressor, respectivamente, $[ATP]$ é a concentração do ATP, e K_a é a constante de ligação.

III.6.4) Ensaio de fluorescência do bis-ANS

Além da fluorescência intrínseca da proteína devido à presença dos resíduos de Trp, Tyr e Phe, também foi utilizada a sonda extrínseca fluorescente *4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid* (bis-ANS), que é capaz de se ligar não covalentemente a sítios hidrofóbicos localizados na superfície externa e/ou interna de proteínas. Quando livre em solução, o bis-ANS apresenta uma emissão de fluorescência quase desprezível. Porém, quando se encontra ligada a tais regiões ocorre uma redução da transferência de elétrons para o solvente, levando a um grande aumento no rendimento quântico observado no seu espectro de emissão. Este fenômeno permite acompanhar as alterações estruturais ocorridas durante a desnaturação de uma proteína. Os espectros de bis-ANS foram obtidos excitando-se as amostras a 360nm e monitorando-se a emissão entre 400 e 600nm. As fendas de excitação e emissão foram ajustadas de acordo com as necessidades do experimento. Os ensaios foram realizados titulando-se o estoque de bis-ANS a 400 μ M para concentrações finais de 0 a 5 μ M em 500 μ L de reação contendo 0,5 μ M da proteína em 40mM de MES (pH 5,5, 6,0 e 6,5) ou HEPES (pH 6,5, 7,0 e 7,5) ou Tri-HCl (pH 7,5, 8,0 e 8,5), 5mM de DTT, e 100mM de KCl.

A razão entre as áreas do espectro de fluorescência, A/A_0 , foi utilizada como medida de ligação, onde A e A_0 representam, respectivamente, as áreas dos espectros

do bis-ANS em uma dada condição e em tampão (livre em solução). Os valores das áreas foram calculados usando o software do espectrofotômetro Hitachi F-4500.

A interação do bis-ANS com as proteínas, nos diferentes pHs, foram calculadas obtendo a regressão linear do *plot* da A/A_0 x [bis-ANS]. A equação linear $Y=A+BX$ foi avaliada, onde Y é o espectro de emissão de fluorescência de A/A_0 , A é a medida da área do espectro de emissão na ausência de bis-ANS (A_0/A_0), X é a concentração final do bis-ANS ([bis-ANS]) em cada titulação, e B é o coeficiente angular da regressão linear (K_b).

III.7) Ensaios de atividade

III.7.1) Ensaio de hidrólise do ATP (ATPase)

A atividade ATPase foi determinada utilizando-se ensaio colorimétrico que mede a extensão de hidrólise do NTP para NDP e Pi (fosfato inorgânico). A quantidade de Pi liberada na reação foi calculada a partir do ensaio de Fiske e Subba-Row, usando a hidrólise do ATP para a obtenção da curva padrão de Pi liberado (Fiske e Subba-Row, 1925). As constantes de Michaelis-Menten (K_M) foram determinadas utilizando-se 0,1 μ M da proteína recombinante NS3 helicase e 0,2 μ M da NS3 íntegra, em reações com volume final de 480 μ L contendo: 40mM de MES (pH 5,5, 6,0 e 6,5) ou HEPES (pH 6,5, 7,0 e 7,5) ou Tris-HCl (pH 7,5, 8,0 e 8,5); 5mM de DTT; 5mM de MgCl₂ e 100mM de KCl. O ensaio foi conduzido utilizando-se 5 diferentes concentrações de ATP (0,25, 0,5, 1, 2 e 3mM)

As reações foram incubadas a 30°C por 12min e 80 μ L da reação foram coletados a cada 3min, e a atividade ATPásica interrompida com a adição de 20 μ L de

TCA a 50%. Após coleta de todas as aliquotas, foram adicionados a cada uma 80µL de solução de molibdato de amônio (33g de molibdato de amônio dissolvidos em 300mL de água mais 110mL de ácido sulfúrico concentrado para 1000mL de solução) e 40µL de agente redutor (0,25g de 1 amino-2-naftal-4-sulfônico e 0,5g de sulfito de sódio [Na₂SO₃] foram dissolvidos em 50mL de água e 15g de bissulfito de sódio [NaHSO₃] dissolvidos em 50mL de água; as soluções foram reunidas em vidro ambar, conservadas na geladeira por 24 horas; filtrada em papel de filtro e armazenada sob refrigeração). As densidades das amostras foram lidas a 660nm no *EspectraMax M5* (Molecular Devices). A velocidade inicial e os parâmetros cinéticos da reação foram calculados por regressões linear e polinomial de 3^a ordem utilizando o programa *SigmaPlot* versão 10.0 e Excel 2007, respectivamente, e os valores de K_{cat}/K_M foram calculados utilizando a equação de Lineweaver-Burk (1934):

$$1/v = \{(K_M/V_{m\acute{a}x}).1/[S]\} + 1/V_{m\acute{a}x} \quad (\text{eq. 9})$$

Para avaliarmos se a exposição dos resíduos das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase, está associado com a atividade de hidrólise do ATP, realizamos ensaios de ATPase utilizando 0,25mM de ATP e diluições seriadas de bis-ANS (500 a 0,97µM). As condições de reação são as mesmas descritas acima, sendo utilizados 80µL de reação para cada diluição seriada do bis-ANS em tampão pH 6,0 (MES) ou 7,5 (HEPES) para ambas proteínas. A incubação foi realizada a 30°C por 30 minutos e interrompida com 20µL de TCA a 50% conforme o protocolo acima.

III.7.2) Ensaio de atividade helicásica

Para verificarmos se a NS3 purificada apresentava atividade helicase foi utilizado um ensaio específico (DNA *Helicase Assay*), e como substrato oligonucleotídeos em fita dupla. Para este ensaio utilizamos os oligonucleotídeos complementares de d66-mer (5'-AGGATGTATGTTTAGTAGGTACATAACTATCTATTG ATACAGACCTAAAACAAAAATTTTCCGAG-3') e d18-mer (5'-GTTATGTACCTACTAAC-3') (Locatelli *et al.*, 2002), na qual o oligonucleotídeo de d18mer foi marcado radioativamente, na 5'-terminal, utilizando a enzima T4 polinucleotídeo cinase (NEB) e [γ - 32 P]ATP (GE Healthcare) conforme o protocolo do fabricante. Para a remoção do [γ - 32 P]ATP não incorporado foi utilizada a coluna Sephadex G25 (GE - Healthcare). O oligonucleotídeo d18mer marcado foi anelado com o d66mer em uma razão molar de 1:1,5 em 100 μ L de Tris-HCl 20mM (pH8,0), KCl 20mM e EDTA 1mM, seguido de aquecimento da reação a 100°C por 10min e lento resfriamento até a temperatura ambiente. Os ensaios de atividade da helicase foram realizados em diferentes condições de pH contendo 5 μ M da proteína, 5mM de ATP e 25nM do oligo dupla fita (d18mer/d66mer). As reações foram incubadas a 30°C, interrompidas com 5 μ L de *termination buffer* (glicerol 10%; azul de bromofenol 0,0015%, xileno cianol 0,0015%; EDTA 10mM e SDS 0,1%) e os produtos analisados em géis nativos de poliácridamida a 15% em tampão TBE1X (Sambrook e Russell, 2001). A intensidade da dissociação do oligo ds18:66mer para ss18mer foram avaliadas pelo escaneamento densitométrico no *PhosphorImager* (GE - Healthcare).

III.7.3) Ensaio de atividade da NS3 protease

A atividade proteásica das proteínas recombinantes foi monitorada espectrofotometricamente utilizando-se um substrato peptídico Ac-RTSKKR-pNA (AnaSpec) que contém o sítio de clivagem NS2A/NS2B (segmento amino-terminal P6-P1) e o cromóforo para-nitroanilida (pNA) na posição P1' (Leung *et al.*, 2001). A clivagem deste cromóforo pela protease promove uma mudança na coloração da reação que pode ser detectada em 405nm no leitor de placas *SpectraMax M5 reader* (Molecular Devices).

A constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade inicial (v_o) em diferentes condições de pH (6,0, 7,0, 8,0, 9,0, e 10,0) foram determinadas para a proteína quimérica CF40-NS3Pro185aa a 37°C, utilizando-se 1,0 μ M da proteína recombinante em reações de 200 μ L contendo: 50mM de Tris-HCl pH 8,5, 10mM de NaCl, 20% de glicerol e 1mM de CHAPS (Leung *et al.*, 2001). Ensaio para medir K_M foram conduzidos utilizando-se 4 diferentes concentrações do substrato entre 62,5 e 500 μ M, e para medir v_o em diferentes condições de pH utilizou-se o substrato a 250 μ M. Os parâmetros cinéticos da reação foram calculados por regressões linear e polinomial de 3ª ordem utilizando-se o programa *SigmaPlot* versão 10.0 e Excel 2007, respectivamente. Os valores de k_{cat}/K_M foram calculados a partir da equação de Lineweaver-Burk (conforme descrito na equação 9).

III.8) Ensaio de interação proteína-proteína - *pull-down*

Para verificar se as proteínas purificadas NS3 íntegra, NS3Pro168aa e NS3Pro185aa interagiriam com o cofator de 40 resíduos hidrofílicos da NS2B,

formando o complexo NS2B/NS3Pro, foram realizados ensaios de interação proteína-proteína utilizando-se resina de Ni²⁺-NTA. Aproximadamente 100µg das proteínas NS3 íntegra, NS3Pro168aa e NS3Pro185aa foram misturados separadamente com 100µg de NS2BCF40 (contendo cauda de 10xHis+Ubiquitina na porção N-terminal) e incubadas a 4°C por 2h. Posteriormente as proteínas foram incubadas em 200µL de resina de Ni²⁺-NTA da Qiagen (que foi previamente equilibrada em tampão A contendo 50mM de Tris-HCl pH 8,0; 200mM de NaCl e 5mM de β-mercaptoetanol), por 30 minutos a 4°C, seguidos de 4 lavagens com 1000µL de tampão A, para posterior eluição do complexo da resina com 200µL do tampão de eluição (tampão A contendo 500mM de imidazol). Após eluição, 7,5µL de reação foram analisados em gel de SDS-PAGE a 15% e coradas com Coomassie-*blue*.

IV) RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1) Clonagem, expressão e purificação dos recombinantes da proteína NS3

Para avaliarmos as propriedades termodinâmicas e enzimáticas da proteína NS3 do DENV-2, realizamos a clonagem, expressão e a purificação de 8 proteínas recombinantes (**Figura 19B**) contendo resíduos de histidina (6xHis ou 10xHis) na sua região N-terminal. Os genes foram clonados nos vetores de expressão pET21dHisTev ou pET21dEZ; e as proteínas expressas em *E. coli* foram purificadas em colunas de cromatografia por afinidade ao níquel. Para promovermos a excisão da cauda de histidina, utilizamos a TEV protease ou ubiquitina hidrolase de levedura (YUH), que reconhecem os sítios específicos que estão localizados entre a cauda de histidina e a proteína recombinante.

Para os estudos termodinâmico e funcional da serino-protease, foram utilizadas as proteínas NS3 íntegra, NS3Pro185aa, NS3Pro168aa e CF40-NS3Pro185aa; e para os estudo das atividades NTPásica e RNA helicásica, as proteínas NS3 helicase e NS3 íntegra. A construção His-Ubiq-NS2BCF40 foi purificada para avaliar o seu efeito sobre a atividade proteásica ao interagir com as proteínas NS3Pro185aa, NS3Pro168aa e NS3 íntegra.

A expressão de cada proteína recombinante foi testada em 3 cepas de *E. coli* (Rosetta [λ DE3], Codon Plus [RIL] e BL21[λ DE3]), e o nível de expressão, solubilidade e indução específica foram avaliados. Nossos testes demonstraram que os recombinantes NS3 helicase, CF40-NS3Pro185aa e His-Ubiq-NS2BCF40 tiveram melhor expressão na cepa BL21(λ DE3) (**Figura 20**), mantendo-se solúveis durante a sua expressão. Enquanto os recombinantes NS3Pro168aa, NS3Pro185aa e NS3 íntegra tiveram melhor expressão na cepa Rosetta (λ DE3), contudo formaram corpos

de inclusão e por esse motivo essas proteínas foram purificadas sobre condições desnaturantes conforme descrito na seção Material e Métodos.

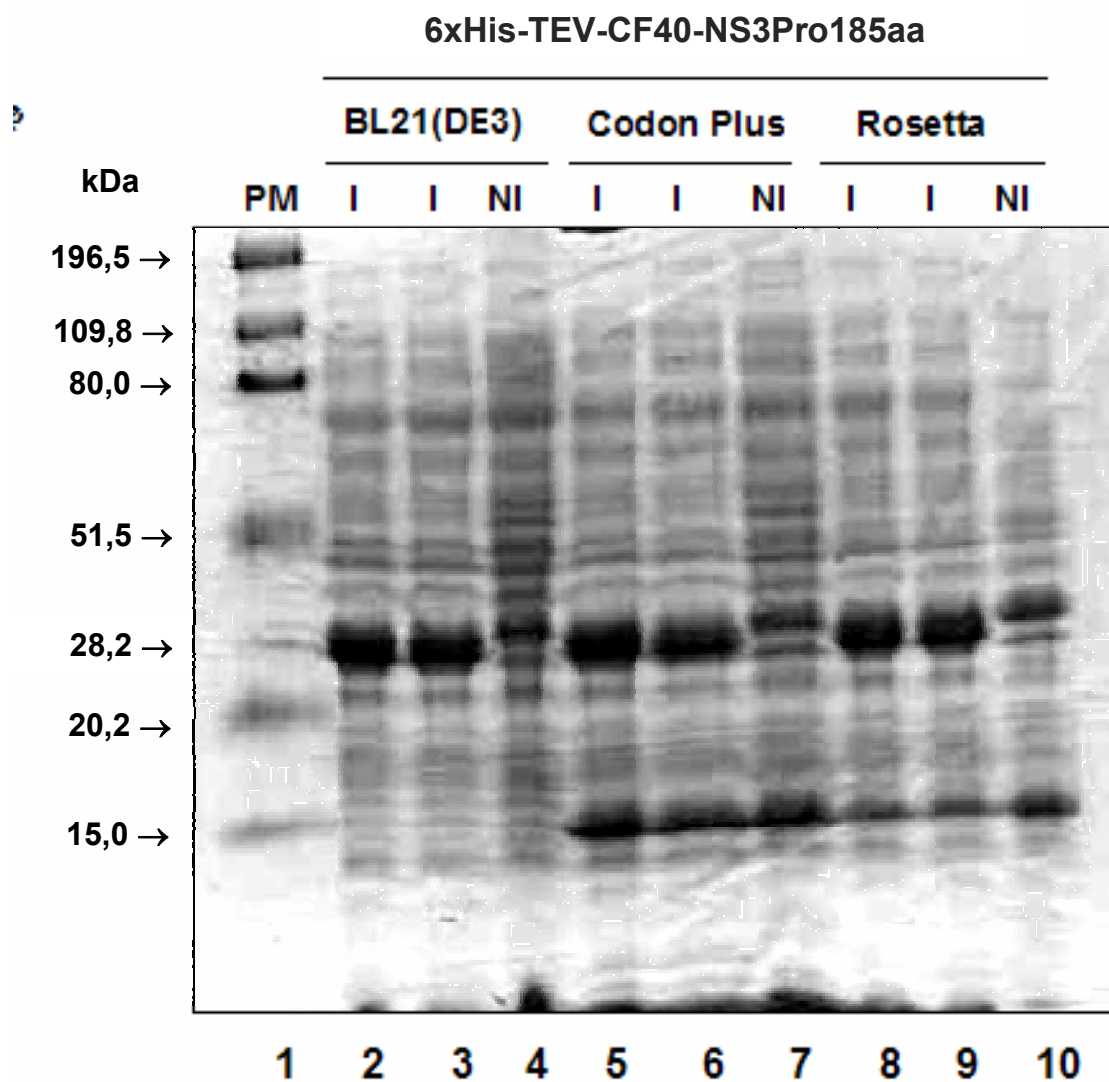


Figura 20: Gel de SDS-PAGE a 12% demonstrando a expressão da proteína 6xHis-TEV-CF40-NS3Pro185aa em diferentes cepas de *E. coli*. A cepa BL21(λ DE3) que apresentou melhor rendimento e indução específica. O gel de SDS-PAGE foi corado em Coomassie-*blue*. PM, padrão de peso molecular; kDa, kilo Daltons; I, induzido; NI, não induzido.

A estratégia inicial era clonar os genes das proteínas de interesse no vetor pET21dEZ, no qual contém 10 histidinas e o sítio de reconhecimento da enzima YUH à montante do sítio múltiplo de clonagem. Dessa forma, poderíamos remover a cauda de

histidina das proteínas, evitando assim que a mesma interferisse nos ensaios termodinâmicos e enzimáticos. A utilização do sistema pET21dEZ foi satisfatória para os recombinantes NS3 helicase, NS3 íntegra, NS3Pro185aa e NS3Pro168aa, contudo YUH não reagiu com os recombinantes CF40-NS3Pro185aa, CF40-NS3Pro168aa e CF40-NS3íntegra. A ausência de reação com a YUH, pode estar relacionada a um erro conformacional mediado pelo cofator da NS2B e o interdomínio de glicina (NS2BCF40-Gly₄SerGly₄), com o sítio de reconhecimento da ubiquitina (contendo aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos), prejudicando desta forma a exposição do sítio de clivagem. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que os recombinantes NS3 íntegra, NS3Pro85aa e NS3Pro168aa tiveram as caudas de histidina excisadas com o mesmo lote da enzima YUH purificada.

Para solucionarmos esse problema, as sequências de base referentes as proteínas CF40-NS3Pro185aa, CF40-NS3Pro168aa e CF40-NS3íntegra foram reclonadas em vetor pET21dHisTev (construído no laboratório de Genômica Estrutural). Este vetor possibilita a expressão das proteínas recombinantes contendo na região N-terminal uma cauda de 6 histidinas e sítio de clivagem para a proteína TEV protease que reconhece a sequência de aminoácidos ENLYFQS.

Estudos de Leung *et al.* (2001) demonstraram que a proteína recombinante CF40-NS3Pro (sem o segmento de glicina), quando expressa em *E. coli* (cepa SG13009), apresentou-se na forma de corpo de inclusão. Entretanto, quando a proteína na forma insolúvel foi solubilizado com 8M de ureia para posterior renovelamento, aqueles autores observaram um alto nível de proteína precipitada, além de uma baixa recuperação de proteína solúvel (renovelada). Após eluição dessa proteína da coluna de afinidade, foi observado que a mesma apresentou autoclivagem,

gerando produtos NS2BCF40 e NS3Pro185aa não se apresentaram em concentrações equimolares, levando dessa forma a uma baixa atividade proteolítica do purificado.

Estudos de modelagem estrutural mostraram que a região C-terminal do cofator da NS2B estava próxima à região N-terminal da NS3Protease (Brinkworth *et al.*, 1999), permitindo a incorporação de um *loop* flexível entre os dois domínios o que evitaria a autoclivagem da protease. Baseado nisso, Leung *et al.* (2001) construíram de uma proteína quimérica tendo o cofator da NS2B (NS2BCF40) fusionado com a NS3Pro185aa via um segmento peptídico não clivável e flexível de nove aminoácidos (Gly₄SerGly₄), propiciando dessa forma a expressão de uma proteína solúvel com alta atividade proteolítica e bom rendimento em sua purificação.

Com base nestas informações, realizamos a clonagem, expressão e purificação das proteínas CF40-NS3Pro185aa, CF40-NS3Pro168aa e CF40-NS3íntegra contendo o segmento (Gly₄SerGly₄). Contudo, após a excisão da cauda de histidina, as proteínas recombinantes CF40-NS3Pro168aa e CF40-NS3 íntegra apresentaram-se sensíveis à degradação (**Figura 21**). Para remover os produtos de degradação as proteínas foram passadas em colunas de gel filtração TSK3000 e Superdex 75 no cromatógrafo AKTA *purifier* (GE - Healthcare), mas não foi possível remover esses contaminates, inviabilizando o uso dessas construções.

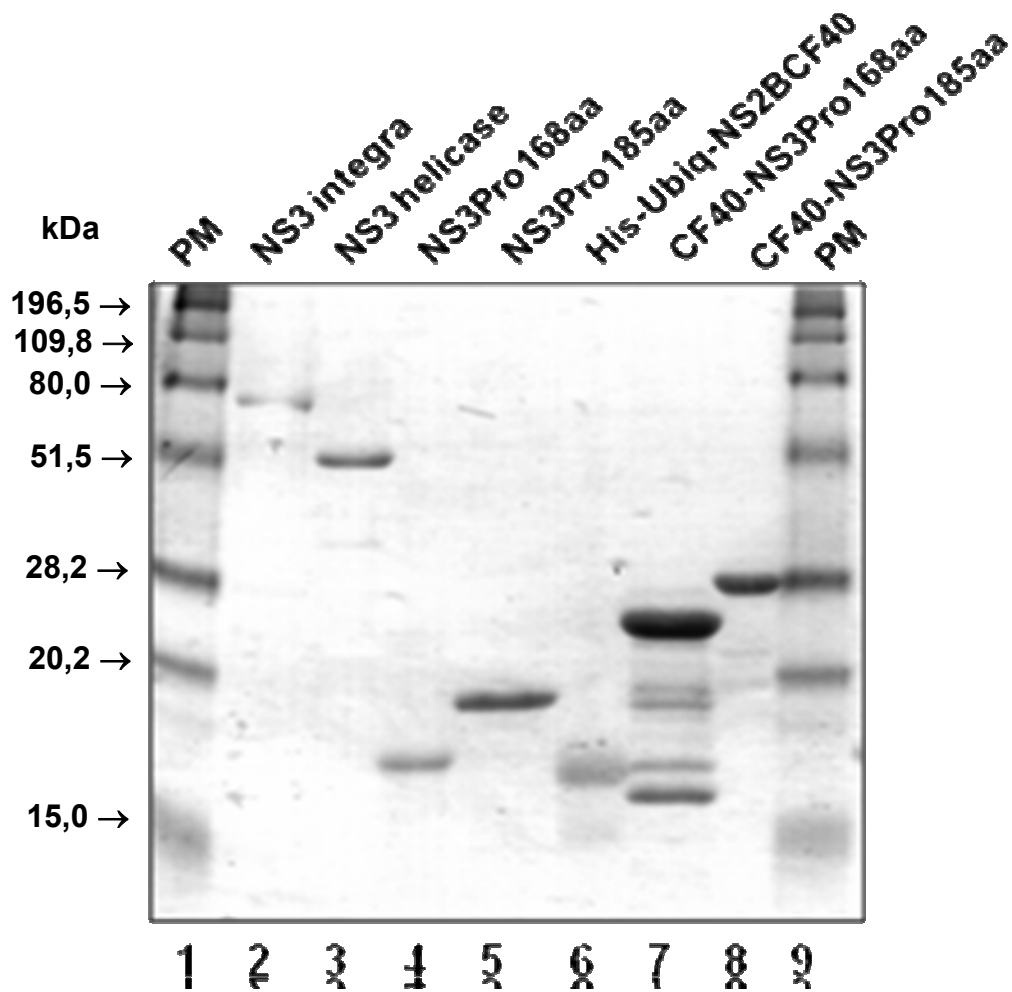


Figura 21: Gel de SDS-PAGE a 12% mostrando as proteínas purificadas após a excisão das caudas de histidina. Nas linhas 1 e 9, temos o padrão de peso molecular em kDa; linha 7, a construção CF40-NS3Pro168aa sensível à degradação. A proteína recombinante CF40-NS3 íntegra não é mostrada neste gel.

IV.2) Caracterização termodinâmica da proteína NS3 íntegra e de seus domínios protease e helicase

Embora a fluorescência do Trp seja útil no estudo conformacional das proteínas, a característica espectral é frequentemente difícil de ser analisada. Estas dificuldades variam, principalmente com a localização dos resíduos de Trp no ambiente

heterogêneo da proteína, levando à alterações na intensidade de fluorescência. Por esse motivo avaliamos a distribuição desses resíduos nos domínios protease e helicase da NS3. De acordo com as estruturas tridimensionais destas proteínas depositadas no *protein data bank* (PDB), observamos que os resíduos de Trp na protease encontram-se presentes em ambos os subdomínios (**Figura 22 A**), enquanto na helicase nos subdomínios 2 e 3 (**Figura 22 B**).

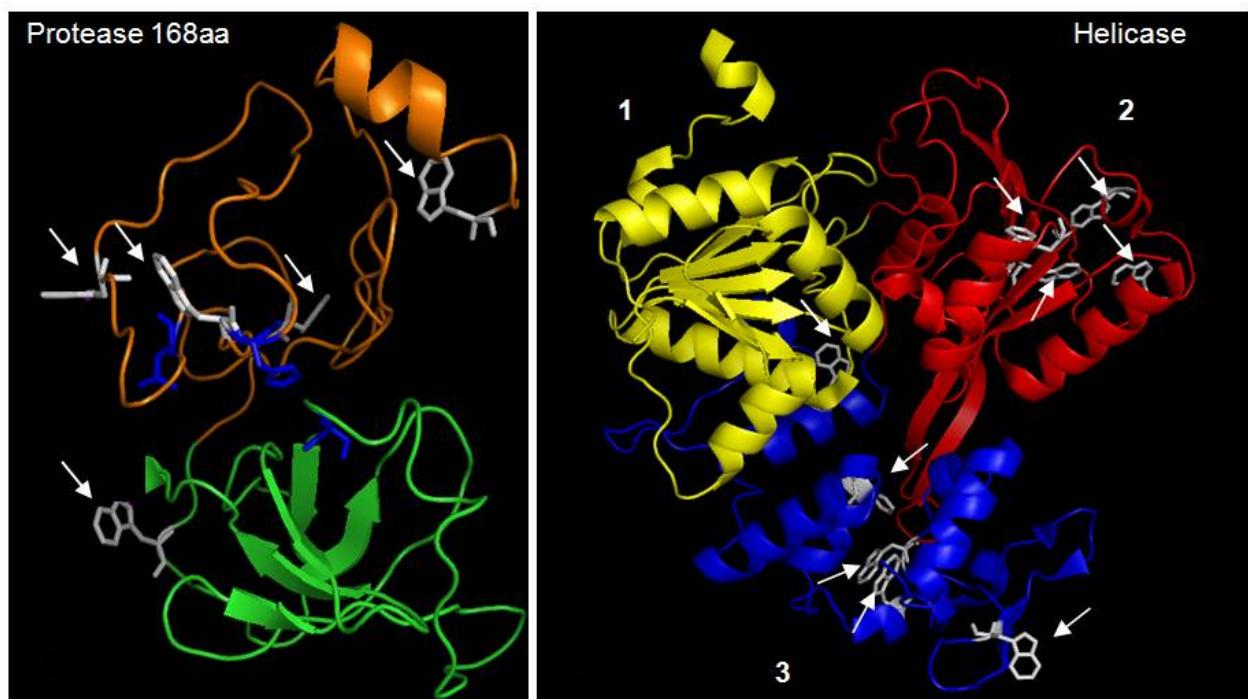


Figura 22: Diagrama de *Ribbon* (programa PyMol) dos domínios protease (1-168aa) e domínio helicase (169-618aa). (A) Estrutura da construção NS3Prot168aa, em laranja e verde demonstram os subdomínios 1 e 2 da protease, respectivamente; os bastões em azul indicam a localização da tríade catalítica, e (B) a estrutura da NS3 helicase (169-618aa), em amarelo, vermelho e azul os subdomínios 1, 2 e 3, respectivamente. Em ambas as figuras as setas em branco indicam a localização do resíduos de Trp. Na figura (A) a estrutura da DEN2NS3Pro (PDB 1bef) está mostrada e na figura (B) estrutura da DEN2NS3 helicase (PDB 2bmf).

O efeito dos domínios protease (dos resíduos 1 ao 168, denominado NS3Pro168aa) e helicase (dos resíduos 169 ao 618) sobre a estabilidade da NS3 íntegra foi avaliado a partir da comparação de suas propriedades termodinâmicas. Para

as três proteínas, foram realizados experimentos independentes de titulação com agente desnaturante (ureia) a 25°C, para posterior avaliação da desnaturação pela variação do CM do espectro de emissão dos resíduos de Trp. Nossos dados demonstram que o estado nativo do domínio NS3 helicase (ausência de ureia) apresenta um CM de 29100cm⁻¹ que é maior do que os das proteínas NS3 íntegra (28550cm⁻¹) e NS3Pro168aa (28380cm⁻¹) (**Figura 23**). Esses resultados sugerem que o domínio NS3 helicase apresenta uma menor exposição dos seus resíduos Trp ao solvente, provavelmente devido ao posicionamento destes resíduos na estrutura da proteína e/ou à menor flexibilidade do seu subdomínio 2 (destacado em vermelho na **Figura 22B**).

A cooperatividade depende da sequência de aminoácidos e das condições externas que levam a uma rica variedade de modificações conformacionais. Este processo pode ser dividido em: i) processo cooperativo em dois estados de transição, no qual existem dois mínimos de energia livre (nativo e desnaturado), e que são separados por uma barreira de energia livre; ii) processo cooperativo em um estado de transição, onde existe somente um estado populacional estável (desnaturado) que tem propriedade entre a estrutura nativa, e altas expansões conformacionais; iii) processo cooperativo em três estados de transição, no qual estão envolvidos os estados nativo, desnaturado e intermediário, e iv) mudanças contínuas que não envolvem a cooperatividade ou comportamento sigmoidal no perfil de desnaturação (Eisenberg e Richards, 1995). No caso da proteína NS3, podemos observar que o perfil de desnaturação da NS3 helicase apresentou no início do processo de desnaturação (0-1M de uréia) uma moderada cooperatividade, o mesmo não ocorrendo para a NS3 íntegra e o domínio NS3Pro168aa (**Figura 23**).

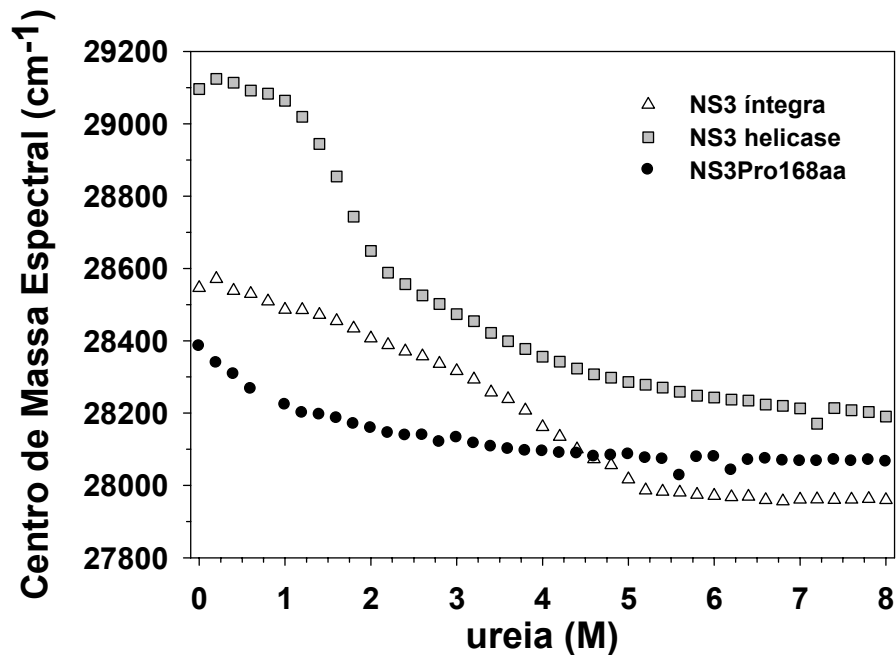


Figura 23: Curvas de desnaturação das proteínas recombinantes por ureia. As variações conformacionais da proteína NS3 íntegra e dos domínios NS3Pro168aa e NS3 helicase (169-618aa) foram observadas nas mesmas condições de tampão (50mM de Tris-HCl pH 8,0, 200mM de NaCl, 5mM de β -mercaptoetanol, 5% de glicerol), temperatura (25°C), tempo de incubação (1 hora) e concentração da proteína (1 μ M).

Em seguida, os valores de CM do espectro de emissão do Trp foram convertidos para grau (fração) de desnaturação (α), cujas curvas podem fornecer informações termodinâmicas bastante importantes tais como: o perfil de desnaturação, a energia livre conformacional da proteína em função de agentes desnaturantes (temperatura, pH, e sais) assim como a presença de estados intermediários de enovelamento (por exemplo, do tipo *molten globule*). Assim, comparando-se os perfis de desnaturação e avaliando-se a concentração de ureia necessária para se obter 50% das proteínas desnaturadas (**Figura 24 e Tabela 6**), podemos observar que a NS3 íntegra ($[ureia]_{50\%} = 3,48M$) é mais resistente à desnaturação por ureia do que os domínios NS3Pro168aa ($[ureia]_{50\%} = 0,84M$) e helicase ($[ureia]_{50\%} = 1,96M$).

A variação de energia livre ($\Delta G^{\circ}_{H_2O}$) da NS3 íntegra e dos domínios NS3Pro168aa e NS3 helicase foi calculada a partir dos valores de ΔG obtidos pelo método de extrapolação linear que consiste em converter os dados de constante de equilíbrio (K_{eq}) em ΔG_{obs} usando a equação 5 (item III.6.1). Então, as curvas de ΔG obtidas a partir dos dados de fluorescência intrínseca do Trp em função da concentração de ureia sugerem que tanto a NS3 íntegra quanto o domínio NS3 helicase apresentam intermediários de enovelamento visto que há uma clara mudança na inclinação das suas curvas de desnaturação (**Figuras 24 e 25**). O perfil da curva do domínio NS3 helicase mostra a existência de um intermediário de enovelamento devido à uma inflexão em 2M de ureia o que corresponde a 50% da proteína desnaturada (**Figura 25**). Os valores de $\Delta G^{\circ}_{(H_2O)}$ calculados para a desnaturação deste domínio são $3,06 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ($m = -1,56 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{M}^{-1}$) entre 0 e 2,0 M de ureia e $0,70 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ($m = -0,4 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{M}^{-1}$) entre 2,0 e 8,0 M de ureia (**Tabela 6**), demonstrando que o primeiro estado de enovelamento é ~ 4 vezes mais estável do que o segundo e que a área de superfície acessível ao solvente (ASA) é menor no primeiro estado refletido no valor de m .

Conforme relatamos anteriormente, a proteína NS3 íntegra mostrou-se 50% desnaturada na presença de 3,48M de ureia, sugerindo que ela seja termodinamicamente mais estável do que o domínio NS3 helicase. Analogamente a este domínio, a NS3 íntegra também apresentou intermediário de enovelamento, porém em menor nível. Os valores de $\Delta G^{\circ}_{(H_2O)}$ no primeiro e segundo estados de enovelamento desta proteína foram $2,16 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ($m = -0,73 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{M}^{-1}$) e $1,67 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ($m = -0,48 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{M}^{-1}$), respectivamente (**Tabela 6**), demonstrando que o primeiro estado de enovelamento da NS3 íntegra também é mais estável do que o segundo estado.

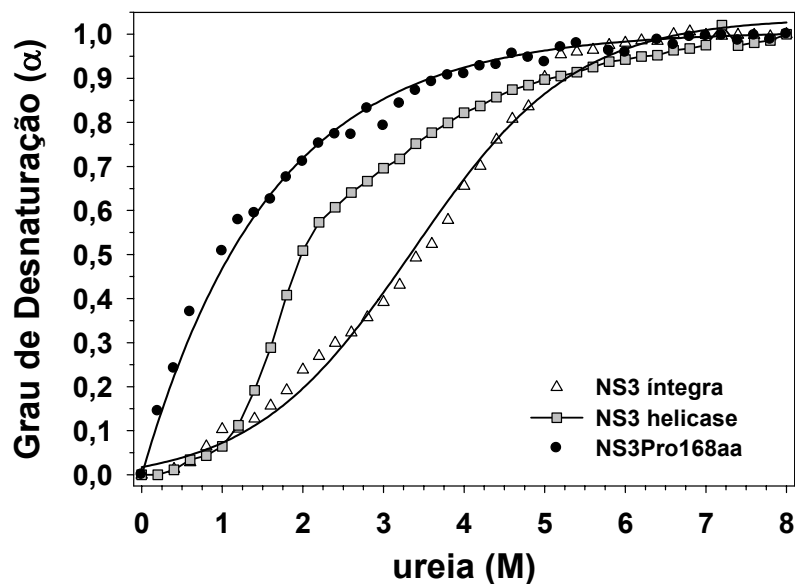


Figura 24: Curva de desnaturação das proteínas NS3 íntegra e dos domínios helicase e NS3pro168aa por ureia. O grau de desnaturação das proteínas, calculados pelos valores de CM, são apresentados em função de concentrações crescentes de ureia.

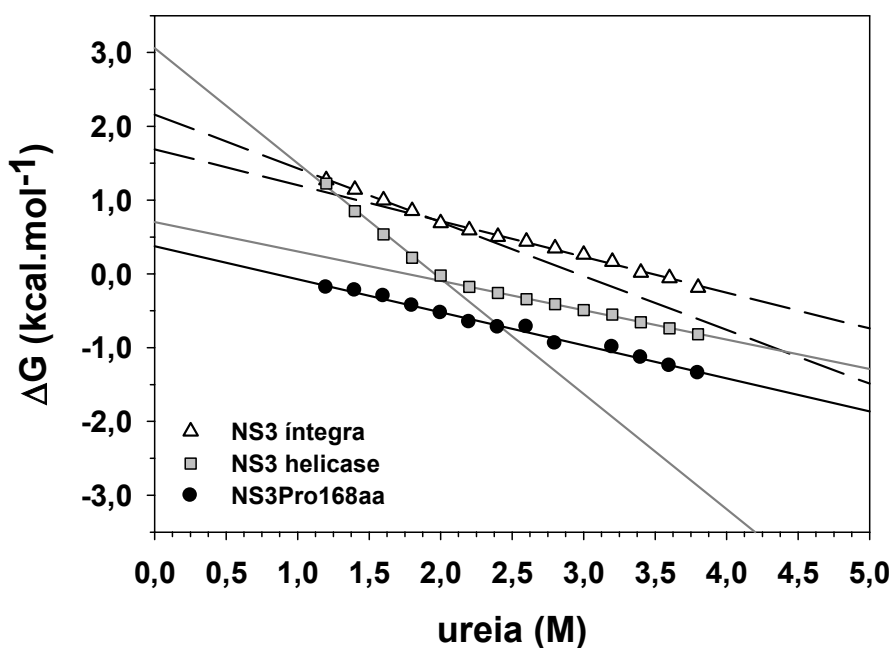


Figura 25: Gráfico de ΔG em função da concentração de ureia da NS3 íntegra e dos domínios protease NS3Pro168aa e NS3 helicase. Os valores de grau de desnaturação foram convertidos em ΔG usando a equação 5.

Tabela 6: Parâmetros termodinâmicos de desnaturação das proteínas recombinantes.

<i>Proteínas Recombinantes</i>	$\Delta G^{\circ}_{(H_2O)}$ (kcal.mol ⁻¹)	<i>m</i> (kcal.mol ⁻¹ M ⁻¹)	<i>[Ureia]_{50%}</i> (M)	<i>r</i> ²
NS3 íntegra (1 ^o estado de enovelamento)	2,16	-0,73	_____	1,00
(2 ^o estado de enovelamento)	1,67	-0,48	3,48	0,99
NS3 helicase (1 ^o estado de enovelamento)	3,06	-1,56	1,96	0,99
(2 ^o estado de enovelamento)	0,70	-0,40	_____	1,00
NS3Pro185aa	1,40	-0,61	2,30	1,00
NS3Pro168aa	0,38	-0,45	0,84	0,99
CF40-NS3Pro185aa	3,79	-1,99	1,91	0,99

$\Delta G_{obs} = \Delta G^{\circ}_{(H_2O)} - m.[ureia]$; $\Delta G = -RT \ln K_{eq} = -RT \ln [D]/[N]$; $[Ureia]_{50\%}$ = Concentração de ureia na qual 50% da proteína encontra-se desnaturada, T = 298K; R = 0,0019872 kcal.mol⁻¹K⁻¹; M, molar; D, proteína no estado desnaturado; N, proteína no estado nativo; m, variação de área acessível ao solvente (ASA).

A partir destes dados verificamos que o primeiro estágio de enovelamento do domínio NS3 helicase é mais estável do que o da NS3 íntegra ($\Delta G^{\circ}_{(H_2O)} = 3,06$ e $2,16$ kcal.mol⁻¹, respectivamente), enquanto que o segundo estágio de enovelamento da NS3 íntegra é mais estável ($\Delta G^{\circ}_{(H_2O)} = 1,67$ kcal.mol⁻¹) do que o do domínio NS3 helicase ($\Delta G^{\circ}_{(H_2O)} = 1,67$ e $0,70$ kcal.mol⁻¹) (**Tabela 6**). Além disso, comparando a ASA da NS3 íntegra com a do domínio NS3 helicase, observamos que para este domínio o primeiro estágio de enovelamento é 2 vezes menor ($m = -1,56$ kcal.mol⁻¹M⁻¹) do que o da NS3 íntegra ($m = -0,73$ kcal.mol⁻¹M⁻¹), sugerindo que ele tenha uma forma mais compacta devido à flexibilidade do seu subdomínio 2. Já no segundo estado de enovelamento podemos observar que a ASA são similares a ambas proteínas (**Tabela 6**). Sendo assim, nossos dados sugerem que o domínio NS3 protease estabiliza a NS3 íntegra do DENV-2, mas a desnaturação dos domínios proteásico e helicásico ocorrem em etapas diferentes, com o desenovelamento do primeiro precedendo ao segundo domínio que apresentou cooperatividade.

Para confirmar a presença de intermediários de enovelamento durante a desnaturação do domínio helicase NS3 por ureia, acompanhamos a sua desnaturação pela emissão de fluorescência do bis-ANS, que ao se ligar a regiões hidrofóbicas de uma proteína tem a sua emissão aumentada. Após cálculo da área do espectro de bis-ANS em função da concentração de ureia (**Figura 26**), verificamos que entre 0 e 1M de ureia, há um aumento na área do espectro do bis-ANS, indicando uma forte afinidade desta sonda com regiões hidrofóbicas da NS3 helicase, enquanto acima de 1M de ureia há uma diminuição gradativa da de sua área espectral. Estes resultados são mais um indício de que há a formação de um intermediário de enovelamento no processo de desnaturação da NS3 helicase em baixas concentrações de ureia (< 2M de ureia).

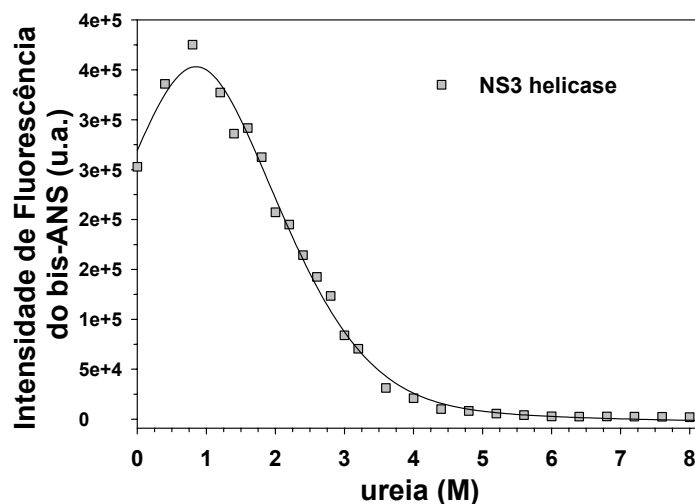


Figura 26: Desnaturação do domínio NS3 helicase por ureia monitorada pela área espectral de emissão de fluorescência do bis-ANS. As análises foram realizadas em tampão contendo 50mM de MOPS pH7,2, 200mM de NaCl, 5mM de β -mercaptoetanol e 5% de glicerol, na presença de 0,25 μ M do domínio NS3 helicase, 5 μ M de bis-ANS, e 1 hora de incubação a 25°C.

A formação de um estado intermediário durante o enovelamento da proteína também já foi descrita para a NS3 do HCV, cujo o perfil de desnaturação do domínio helicásico (subdomínios 1, 2 e 3) e dos subdomínios 1+2, e dos subdomínios 1 e 2 isolados mostrou a presença do intermediários de enovelamento nos subdomínios 1+2

detectado por CD. Observou-se também que a desnaturação dos subdomínios ocorreram em etapas diferentes, sendo que o desenovelamento do subdomínio 1 precedeu ao do subdomínio 2 e que a construção com os subdomínios 1+2 apresentou uma cooperatividade no início do processo de desnaturação (Gozdek *et al.*, 2008).

Diante destas evidências, comparamos o perfil de desnaturação por ureia do domínio helicase do HCV com o da DENV-2 de forma a inferir sobre a localização do intermediário de enovelamento do domínio helicásico deste vírus. Para isto, o domínio NS3 helicase do HCV foi clonado, expresso e purificado, e sua desnaturação por ureia monitorada por espectroscopia de fluorescência. Como todos os 4 resíduos de Trp do domínio NS3 helicase do HCV localizam-se no subdomínio 3 (**Figura 27 A**), os Δ CM obtidos refletem primordialmente a desnaturação deste subdomínio e não da NS3 helicase como um todo. A fim de avaliarmos as mudanças conformacionais ocorridas nos subdomínios 1 e 2, monitoramos também a desnaturação da NS3 helicase do HCV a partir da fluorescência extrínseca do bis-ANS (**Figura 27 B**). É importante ressaltar que a NS3 helicase do HCV apresenta 16% de similaridade na sequência de aminoácidos nos subdomínios 1 e 2, e de 2% para o subdomínio 3, quando comparada com a NS3 helicase do DENV-2. Entretanto, os subdomínios 1 e 2 apresentam similaridade estrutural em ambas às helicases.

Observamos que o subdomínio 3 iniciou seu processo de desnaturação em 4M de ureia (valores de CM figura 27B) e a ligação do bis-ANS à proteína diminuiu entre 0 e 1M de ureia, aumentando em seguida entre 1 e 4M de ureia e diminuindo novamente a partir de 4M de ureia (**Figura 27 B**). Comparando estes resultados, com os relatados por Gozdek *et al.* (2008), concluímos que o subdomínio 1 da helicase do HCV apresentou uma menor exposição dos resíduos hidrofóbicos entre 0 e 1M de ureia,

posteriormente o subdomínio 2 entra em processo de desnaturação (1 a 4M de ureia) levando ao aumento da exposição dos resíduos hidrofóbicos e finalizando com a desnaturação do subdomínio 3 (4 a 8M ureia) (**Figura 27 B**).

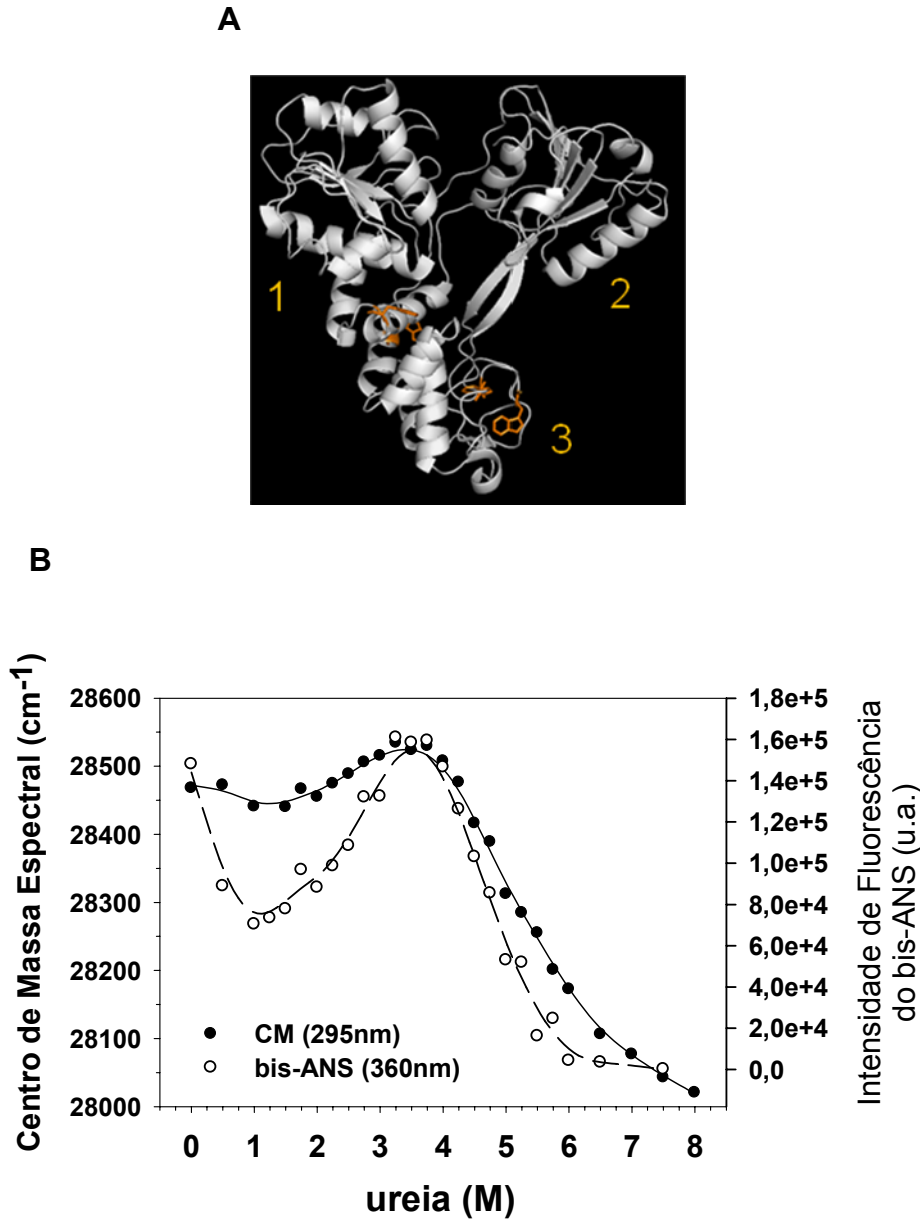


Figura 27: Estrutura do domínio NS3 helicase do HCV e curva de desnaturação desta enzima por ureia. (A) Representação em *ribbon* (programa PyMol) do domínio NS3 helicase do HCV (PDF: 1dxw); os subdomínios estão numerados em laranja e as estruturas em bastão indicam a localização dos resíduos de Trp no subdomínio 3. (B) Curva de desnaturação do domínio NS3 helicase por ureia monitorada pelo CM da fluorescência intrínseca do Trp e pelo espectro de emissão da fluorescência extrínseca do bis-ANS. As análises foram realizadas utilizando tampão contendo 50mM de MOPS pH7,2, 200mM de NaCl, 5mM de β -mercaptoetanol e 5% de glicerol, 1,0 μ M do domínio helicase, 5 μ M de bis-ANS, a 25°C e 1 hora de incubação.

Comparando a curva de ligação do bis-ANS ao domínio NS3 helicase do DENV-2 com o do HCV (**Figuras 26 e 27B**), concluímos que o primeiro estado de enovelamento do domínio helicase do DENV-2 observado entre 0 e 2M de ureia (**Figuras 25 e 26**) compreende a desnaturação dos subdomínios 1 e 2 e que acima de 2M de ureia, ou seja, o segundo estado de enovelamento se deve a desnaturação do subdomínio 3.

Em relação à caracterização termodinâmica do domínio NS3pro168aa do DENV-2, observamos que o seu perfil de desnaturação apresentou baixo valor de CM ($\sim 28380\text{cm}^{-1}$) estando 50% desnaturada em 0,84M de ureia como já descrito anteriormente (**Figura 23 e Tabela 6**), além disso, observamos um deslocamento da intensidade de fluorescência para maiores comprimento de onda e menor CM, quando descogelamos. (**Figura 28**). Devido a estes baixos valores de CM e $[\text{ureia}]_{50\%}$, parece que esta construção é parcialmente desenovelada na ausência de agente desnaturante.

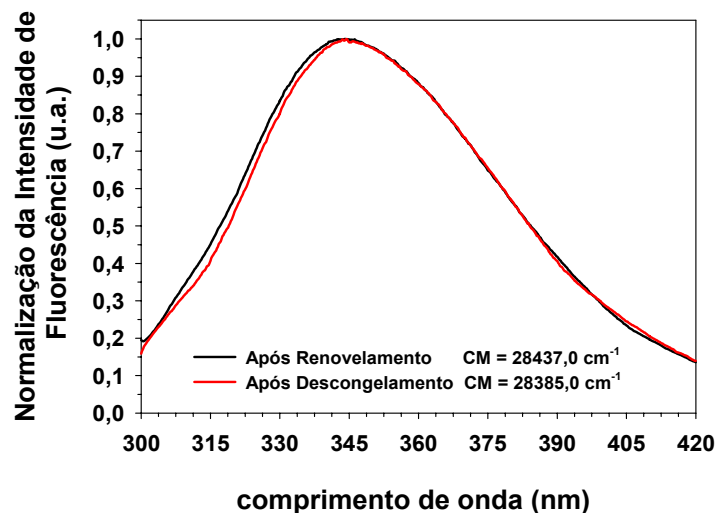


Figura 28: Espectro de emissão de fluorescência da NS3Pro168aa após o renovelamento e descongelamento. Na figura podemos observar um leve deslocamento da intensidade de fluorescência entre 300 a 420nm. Em preto observamos o intensidade de fluorescência da NS3Pro168aa após seu renovelamento e em vermelho observamos a intensidade de fluorescência da NS3Pro168aa após seu descongelamento e incubação por 1 hora a temperatura ambiente. CM = valores de centro de massa espectral.

Para confirmarmos esta hipótese, realizamos experimentos de supressão de fluorescência que ocorre quando o fluoróforo entra em contato com a molécula supressora de fluorescência deste. Essas medidas de supressão podem revelar o grau de exposição do fluoróforo (no caso, os resíduos de Trp) ao solvente, porque a taxa de supressão varia conforme a localização do fluoróforo no interior da molécula. Nos nossos estudos, utilizamos acrilamida como molécula supressora de fluorescência dos resíduos de Trp da proteína NS3 íntegra e dos seus domínios. Nossos dados demonstram que o domínio NS3 helicase tem uma menor supressão de fluorescência ($K_{sv} = 2,75 \pm 0,05 \text{ M}^{-1}$) quando comparado à NS3 íntegra e ao domínio NS3pro168aa ($K_{sv} = 3,05 \pm 0,05 \text{ M}^{-1}$ e $7,99 \pm 0,15 \text{ M}^{-1}$, respectivamente) (**Figura 29 e Tabela 7**), sugerindo que os resíduos de Trp do domínio helicase estejam localizados mais internamente na proteína o que explica o seu maior valor de CM . Observamos também que a acessibilidade dos resíduos de Trp do domínio NS3pro168aa ao solvente foi ~2,5 vezes maior do que a da NS3 íntegra e a do domínio NS3 helicase, reforçando a hipótese de que a protease purificada encontra-se parcialmente desenovelada.

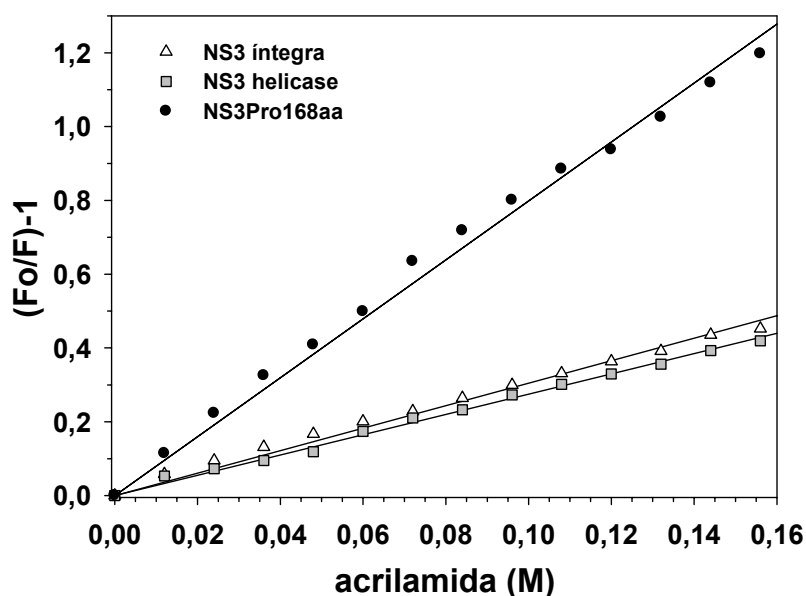


Figura 29: Supressão de fluorescência da proteína NS3 íntegra e dos domínios NS3 helicase e NS3pro168aa por acrilamida. A figura mostra o gráfico de Stern-Volmer que é o resultado da redução da intensidade de fluorescência com a titulação por acrilamida.

Tabela 7: Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) para a acessibilidade dos resíduos de Trp ao solvente (na presença de diferentes concentrações de acrilamida), valores de CM das proteínas recombinantes (na ausência de ureia); e ΔCM das proteínas recombinantes na passagem do estado nativo para o estado desnaturado.

Proteínas Recombinantes	$K_{sv} (M^{-1})$	CM (cm^{-1})		$\Delta CM (cm^{-1})$ $N \Rightarrow D$
		0M de ureia	8M de ureia	
NS3Íntegra	$3,05 \pm 0,05$	28546,48	27960,02	586,46
NS3 helicase	$2,75 \pm 0,05$	29096,28	28190,16	906,12
NS3Pro185aa	$3,99 \pm 0,10$	28671,97	28073,64	598,33
NS3Pro168aa	$7,99 \pm 0,15$	28384,66	28065,63	319,03
CF40-NS3Pro185aa	$5,35 \pm 0,08$	28571,63	28052,48	519,14

Os valores de K_{sv} e CM foram obtidos sobre as mesmas condições de tampão, temperatura e tempo de incubação, sendo que a concentração de proteína para o ensaio de supressão de fluorescência por acrilamida foi de $0,5\mu M$ e para a obtenção dos valores de CM a concentração foi de $1,0\mu M$.

IV.3) Caracterização termodinâmica da protease e o efeito do segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵ e do cofator NS2B na sua estabilidade

De acordo com os dados termodinâmicos, a NS3Pro168aa encontra-se parcialmente desenovelada. Com o objetivo de trabalharmos com uma proteína mais estável em solução, clonamos novamente o gene do domínio NS3Pro terminando no resíduo K¹⁸⁵ (chamado de NS3Pro185aa), a mesma construção utilizada por Murthy e colaboradores em 1999 para resolver a estrutura 3D deste domínio por cristalografia de raios-X. Ao comparar o mapa de superfície da NS3Pro168aa e NS3Pro185aa (**Figura 30**), observamos que o segmento entre os resíduos E¹⁶⁹ e K¹⁸⁵, que é responsável por interligar os domínios proteásico e helicásico da NS3 (**Figura 19B**), parece aumentar a estabilidade do primeiro domínio ao interagir com os seus subdomínios 1 e 2. Assim, para avaliarmos a validade desta hipótese, expressamos, purificamos e realizamos experimentos termodinâmicos com NS3Pro185aa similarmente ao que foi feito com a NS3Pro168aa.

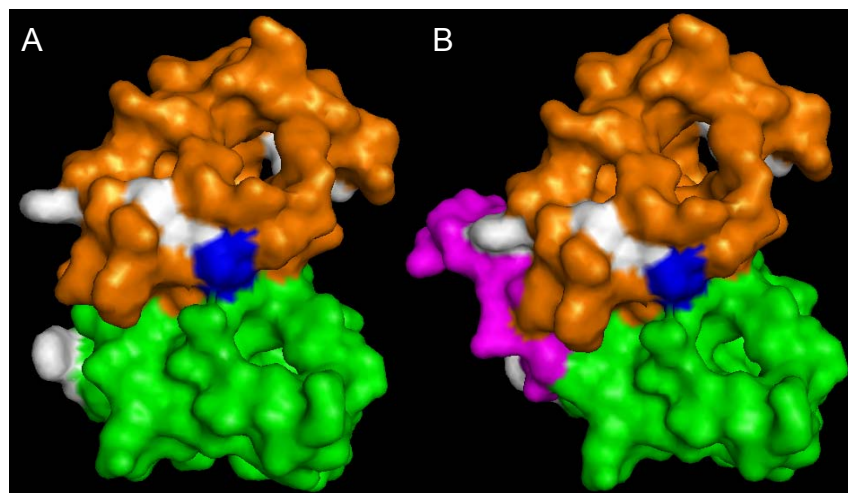


Figura 30: Mapa de superfície dos domínios NS3Pro168aa (A) e NS3Pro185aa (B). Em ambas estruturas, o branco, representa os resíduos de Trp na proteína; azul, a tríade catalítica; marrom claro, o subdomínio 1; em verde o subdomínio 2; e em rosa o segmento entre E¹⁶⁹ a K¹⁸⁵ da NS3Pro185aa. Estrutura da NS3 protease do DENV-2 (PDB: 1bef).

Nossos dados demonstram que NS3Pro168aa e NS3Pro185aa nativas apresentam valores de CM iguais a 28380cm^{-1} e 28671cm^{-1} , respectivamente (**Figura 31A, Tabela 7**). Ainda, a variação do centro de massa (ΔCM) do estado nativo para o estado desnaturado (8M de ureia) da NS3Pro168aa ($\Delta\text{CM} = 319,03\text{cm}^{-1}$) é aproximadamente a metade da variação obtida para a NS3Pro185aa ($\Delta\text{CM} = 598,33\text{cm}^{-1}$) (**Figura 31A, Tabela 7**). Observamos também que a presença do segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵ na NS3Pro185aa ($\Delta G^{\circ}_{(\text{H}_2\text{O})} = 1,40\text{kcal.mol}^{-1}$) promove um grande aumento de estabilidade deste domínio, sendo necessário 2,30M de ureia para desnaturar 50% da protease, enquanto para NS3Pro168aa apenas 0,84M de ureia ($\Delta G^{\circ}_{(\text{H}_2\text{O})} = 0,38\text{kcal.mol}^{-1}$) (**Figuras 31B e C; Tabela 6**). Já nos ensaios de supressão de fluorescência por acrilamida, observamos que a acessibilidade dos resíduos de Trp da NS3Pro168aa ao solvente ($K_{\text{sv}} = 7,99 \pm 0,15\text{M}^{-1}$) é duas vezes maior do que a NS3Pro185aa ($K_{\text{sv}} = 3,99 \pm 0,10\text{M}^{-1}$) (**Figura 32, Tabela 7**). Esses dados confirmam a hipótese de que o domínio NS3pro168aa encontra-se parcialmente desenovelado (~48%), e reforçam a importância do segmento E¹⁶⁹ a K¹⁸⁵ na estabilidade do domínio da NS3.

Ensaio termodinâmicos também foram realizados com a proteína quimérica CF40-NS3Pro185aa, onde CF40 significa a região hidrofílica da proteína NS2B contendo o segmento Gly₄SerGly₄, que é um cofator importante para aumentar a atividade enzimática da NS3 protease dos flavivírus. Como podemos observar na **Tabela 6**, o valor de CM desta construção no estado nativo foi de 28580cm^{-1} , que é 100cm^{-1} menor que o valor de CM calculado para a NS3Pro185aa, indicando que a proteína quimérica CF40-NS3Pro185aa apresenta maior exposição dos resíduos de Trp ao meio aquoso (**Figura 33 A**). Essa maior acessibilidade ao solvente foi confirmada pelo ensaio de supressão de fluorescência por acrilamida no qual

observamos que a CF40-NS3Pro185aa apresentou maior supressão dos resíduos de Trp do que a NS3Pro185aa ($K_{sv} = 5,35 \pm 0,08 \text{ M}^{-1}$ e $3,99 \pm 0,10 \text{ M}^{-1}$; respectivamente) (Figura 33D, Tabela 6). Provavelmente, esta maior supressão de fluorescência observada no CF40-NS3Pro185aa pode ser devido à presença do cofator CF40 que promoveria uma maior exposição do resíduo Trp⁵⁰ adjacente à His⁵¹ da tríade catalítica, ou ainda à presença do resíduo Trp⁶¹ do cofator NS2BCF40, que modificaria o espectro de emissão de fluorescência.

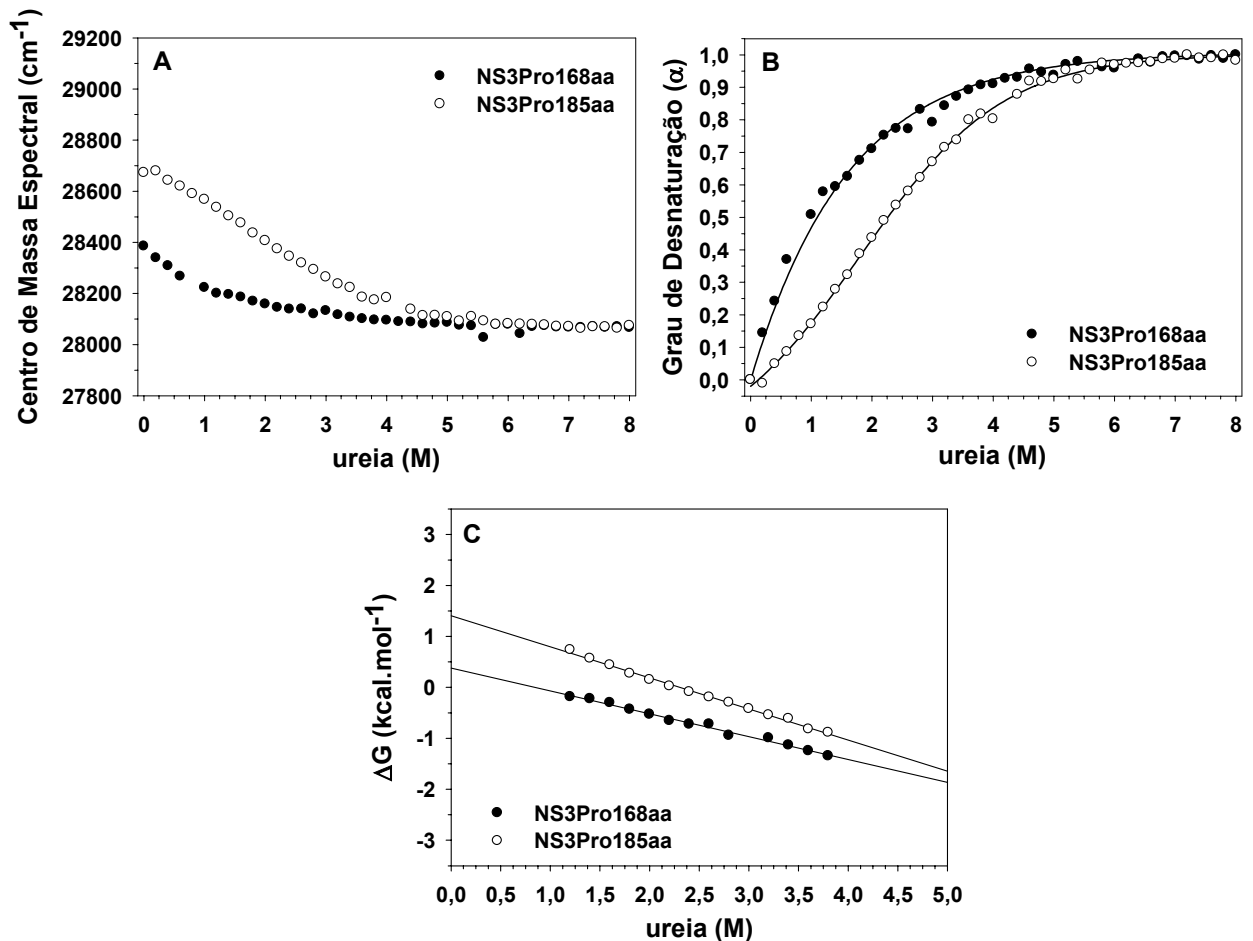


Figura 31: Curvas de desnaturação da NS3pro168aa e NS3pro185aa por ureia. (A) Comparação da ΔCM em função da concentração de ureia, (B) grau de desnaturação das proteínas obtido a partir dos valores de CM, e (C) valores de (ΔG) após extrapolação linear dos dados de intensidade de fluorescência intrínseca do Trp em função da concentração de ureia.

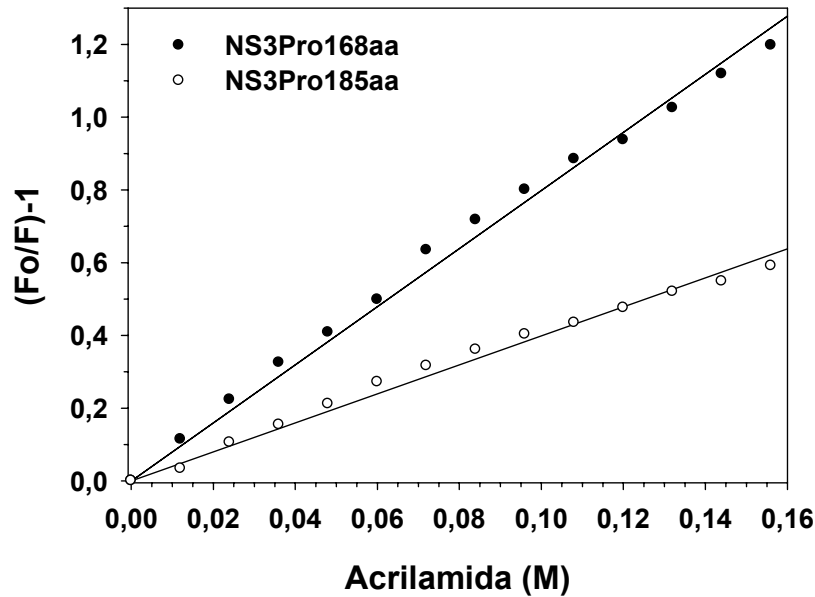


Figura 32: Supressão de fluorescência das NS3Pro168aa e NS3Pro185aa por acrilamida. O gráfico de Stern-Volmer é o resultado da redução da intensidade de fluorescência após titulação com acrilamida. As médias dos valores de supressão foram plotados em relação à concentração de acrilamida.

A variação de ΔG também foi avaliada para a proteína quimérica CF40-NS3Pro185aa, que se mostrou mais estável e cooperativa ($\Delta G^0_{(H_2O)} = 3,79 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $m = -1,99 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{M}^{-1}$), quando foi comparada com a NS3Pro185aa ($\Delta G^0_{(H_2O)} = 1,40 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $m = -0,61 \text{ kcal.mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) (**Figura 33 C; Tabela 7**), muito provavelmente devido à presença do cofator CF40. Isso indica a importância do resíduo hidrofóbico NS2B na estabilidade da NS3Pro185aa, contudo, a CF40-NS3Pro185aa apresentou-se 100% desnaturada em 3M de ureia, enquanto que a NS3Pro185aa apresentou-se aproximadamente 60% desnaturada sob as mesmas condições (**Figura 33B**), sugerindo que o processo cooperativo da CF40-NS3Pro185aa apresenta um perfil de desnaturação em dois estados de transição, do nativo para o desnaturado.

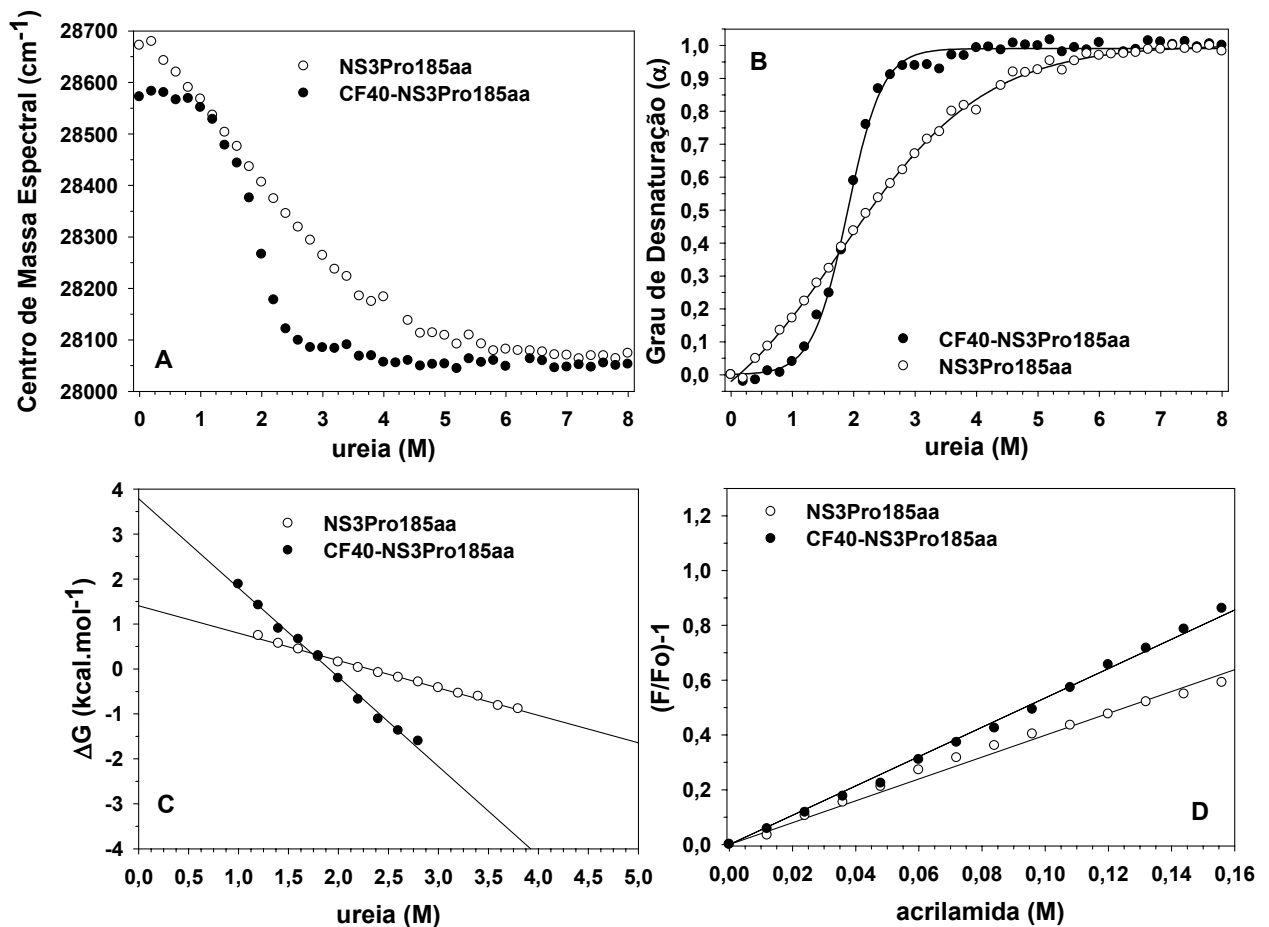


Figura 33: Curvas de desnaturação e de supressão de fluorescência por acrilamida das proteínas NS3Pro185aa e CF40-NS3Pro185aa por ureia. (A) Comparação da ΔCM da proteína quimérica CF40-NS3Pro185aa com a da NS3Pro185aa em função da ureia, (B) grau de desnaturação das proteínas recombinantes calculado pelos valores de centro de massa, (C) valores de energia livre (ΔG) após extraploção linear dos dados de intensidade de fluorescência intrínseca do Trp em função da concentração de ureia, e (D) gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência do Trp por acrilamida. As médias dos valores de supressão foram plotados em função da concentração de acrilamida.

IV.4) Efeito do pH na estabilidade da proteína NS3

Estudos têm demonstrado que o pH influencia a atividade enzimática de diversas proteínas por promover mudanças conformacionais, que podem reduzir ou abolir a ligação do substrato ao sítio de ligação, ou alterar o estado de ionização da proteína de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI). Ness trabalho, utilizamos a

espectrofotometria de fluorescência para caracterizar o perfil termodinâmico das proteínas em diferentes condições de pH, assim como identificar possíveis processos de agregação e/ou desnaturação.

Observamos que as proteínas NS3 íntegra, NS3Pro185aa e NS3Pro168aa apresentaram agregação moderada em pH 5,0, com pico máximo de LS (A/Ao) próximo de 2,5 vezes (**Figuras 34 A, C e D**). Contudo, as proteínas NS3 helicase e CF40-NS3Pro185aa apresentaram intenso processo de agregação em pH 4,5 (A/Ao = 17,5 vezes) e pH 4,0 (A/Ao = 16,5 vezes), respectivamente (**Figuras 34 B e E**). Uma explicação para este resultado pode ser o pI das proteínas helicase e CF40-NS3Pro185aa, que são 6,80 e 5,01, respectivamente. Já para as proteínas NS3 íntegra, NS3Pro185aa e NS3Pro168aa, com pI de 8,50, 8,07 e 9,38, respectivamente, não apresentaram intenso processo de agregação, sugerindo que as proteínas com pI básico apresentam maior solubilidade do que as proteínas que apresentam pI ácido. Com relação ao segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵, observamos que a NS3Pro185aa e NS3Pro168aa apresentaram perfis de LS similares independentemente do pH, indicando que a presença deste segmento não influencia no processo de agregação. (**Figuras 34 C e D**).

Concomitantemente com os ensaios de LS, os perfis de desnaturação das proteínas foram avaliados em função do pH. Para isto, monitoramos o deslocamento dos espectros de emissão de fluorescência dos resíduos de Trp, que foram convertidos em valores de CM, que, por sua vez, foram convertidos para grau de desnaturação.

Observamos que todas as proteínas (com exceção da NS3 helicase) apresentaram aumento do CM espectral com a acidificação do meio (**Figura 35**), indicando uma menor exposição dos resíduos de Trp ao solvente. E, levando-se em consideração o aumento do LS com a diminuição do pH, podemos sugerir que o

processo de agregação leva a uma menor exposição dos resíduos de Trp e, conseqüentemente, ao aumento do CM em pH ácido.

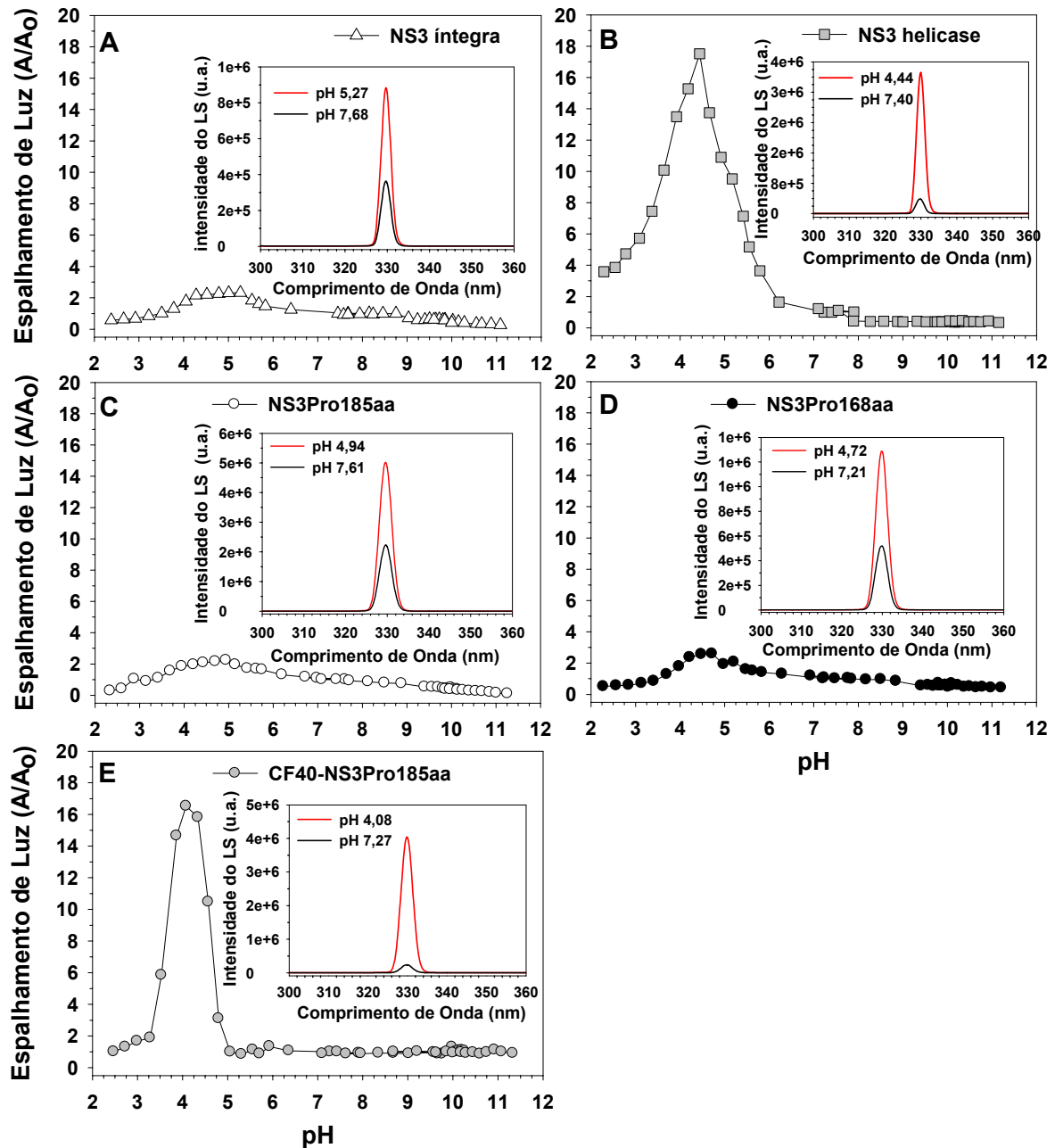


Figura 34: Perfil de agregação das proteínas NS3 íntegra, NS3 helicase, NS3Pro168aa, NS3Pro185aa, e CF40-NS3Pro185aa em função do pH. Os gráficos internos mostram em vermelho o LS máximo e em preto, o LS no pH mais próximo do fisiológico (pH 7,4). De A a E, mostramos os LS da (A) NS3 íntegra; (B) NS3 helicase; (C) NS3Pro185aa; (D) NS3Pro168aa; e (E) CF40-NS3Pro185aa. Todas as análises foram realizadas sob as mesmas condições de tampão, temperatura, tempo de incubação e concentração de proteína.

Considerando-se que em pH 7,4 (pH fisiológico) a NS3 helicase encontra-se na forma nativa, nossos dados demonstram que, com a acidificação do meio até o pH ~5,0, há uma redução do CM da NS3 helicase devido a menor exposição dos resíduos de Trp ($\Delta\text{CM} \approx -130 \text{ cm}^{-1}$). Concomitantemente, observamos o aumento de 10 vezes do LS. Em pH abaixo de 5,0, o CM passa a aumentar até o pH 3,5 ($\Delta\text{CM} \approx -80\text{cm}^{-1}$) e depois torna a reduzir até o pH 2,0; enquanto o LS tem o pico máximo em pH 4,5 (A/Ao $\approx 16,5$ vezes). Esses dados sugerem que a NS3 helicase inicia o processo de agregação após mudança conformacional que leva a maior exposição dos resíduos de Trp e, conseqüentemente, a exposição de resíduos hidrofóbicos (**Figura 35 B**). Esse comportamento termodinâmico diferenciado da NS3 helicase em relação do pH reforça ideia de que a proteína possa ter intermediário de enovelamento, conforme observado nos ensaios de desnaturação por ureia (**Figuras 25 e 26**).

Analisando as proteínas em pH básico, podemos observar que elas começam a se desnaturar sem agregação proteica. Observamos que as proteínas CF40-NS3Pro185aa e NS3Pro168aa apresentaram desnaturação completa em pH 11,3, enquanto que as outras proteínas foram parcialmente desnaturadas (**Figuras 35 D e E**). É importante lembrar que NS3pro168aa está parcialmente desenovelada em pH 7,5. Já a NS3Pro185aa apresentou-se 75% desenovelada (**Figura 35 C**), reforçando a importância do segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵ na estabilidade da NS3 protease.

Comparado-se os perfis de desnaturação das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase em pH básico, observamos que as proteínas encontram-se parcialmente desnaturadas (45% e 55%, respectivamente) em pH ~11,3 considerando o seu valor de CM em 8M de ureia como sendo 100% de desnaturação. Curiosamente, a NS3 helicase e CF40-NS3Pro185aa apresentaram uma estabilidade e cooperatividade em

pH básico, já que o seu processo de desnaturação iniciou-se pHs 8,0 e 9,8, respectivamente (**Figuras 35 B e E**).

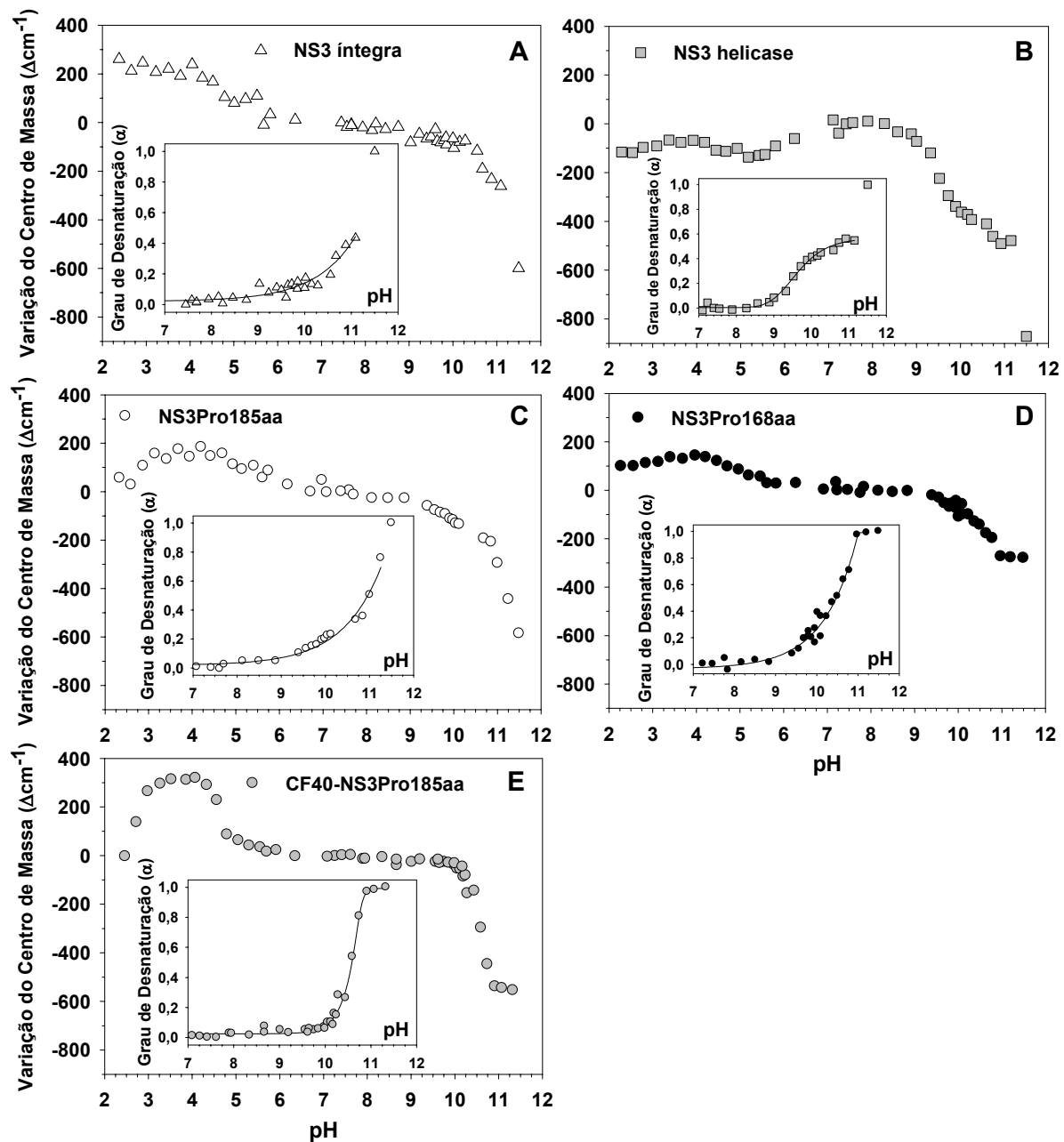


Figura 35: Mudanças conformacionais das proteínas NS3 íntegra, NS3 helicase, NS3Pro185aa, NS3Pro168aa, e , CF40-NS3Pro185aa em função do pH. Os gráficos internos mostram o perfil de desnaturação das proteínas recombinantes em pH básico. (A) NS3 íntegra; (B) NS3 helicase; (C) NS3Pro185aa; (D) NS3Pro168aa; e (E) proteína quimérica CF40-NS3Pro185aa. Todas as análises foram realizadas sobre as mesmas condições de tampão, temperatura, tempo de incubação e concentração de proteína. Os valores em pH 11,5 demonstram o CM e grau de desnaturação das proteínas considerando o seu CM obtido em 8M de ureia (100% desnaturada).

IV.5) Interação do cofator NS2B com o domínio NS3 protease

Como já relatado, o domínio NS3protease apresenta máxima atividade quando interage com os 40 resíduos hidrofílicos da NS2B, e para termos a certeza que nossas proteínas recombinantes não perderam a capacidade de interagir com este cofator, ensaios de *pull-down* com as proteínas recombinantes NS3Pro185aa, NS3Pro168aa, NS3 íntegra, e NS3 helicase (que serviu de controle negativo do ensaio) foram realizados (**Figura 36**). Imobilizamos a proteína recombinante NS2BCF40 contendo cauda 10xHis-ubiquitina na região N-terminal (His-Ubiq-NS2BCF40) em resina de níquel (Ni-NTA), e adicionamos em seguida a proteína de interesse (sem cauda de histidina). Nossos resultados demonstraram que a NS3Pro185aa e NS3 íntegra apresentaram interação com o cofator, sendo que a maior interação ocorreu com a proteína NS3Pro185aa. Entretanto, a interação da NS3Pro168aa não foi possível ser avaliada por ela apresentar peso molecular semelhante ao da His-Ubiq-NS2BCF40.

Para esclarecer esta dúvida, ou seja, para verificar se a NS3Pro168aa também interage com o cofator NS2B, as mesmas amostras do experimento de *pull-down* foram analisadas por *Western-blot* utilizando anticorpo anti-NS3Pro do DENV-2. Nossos resultados demonstram que, mesmo em estado parcialmente desenovelado conforme mostrado nos ensaios de termodinâmica, a NS3Pro168aa manteve a capacidade de interagir com o cofator (**Figura 37**). No entanto, de acordo com a intensidade das bandas no gel de *Western-blot*, as construções NS3Pro168aa e NS3Pro185aa interagiram com resina de Ni⁺² (linhas 9 e 6, respectivamente), sendo que a segunda apresentou maior intensidade de banda. Este resultado sugere que o segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵ tenha afinidade com a resina de níquel. Nossos dados também mostram que a NS3Pro168aa (linha 8) apresenta maior intensidade de banda do que a NS3Pro185aa (linha 5), sugerindo que sua interação com o cofator seja maior. Esses dados sugerem

que o segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵ pode interferir na interação do cofator com o domínio protease.

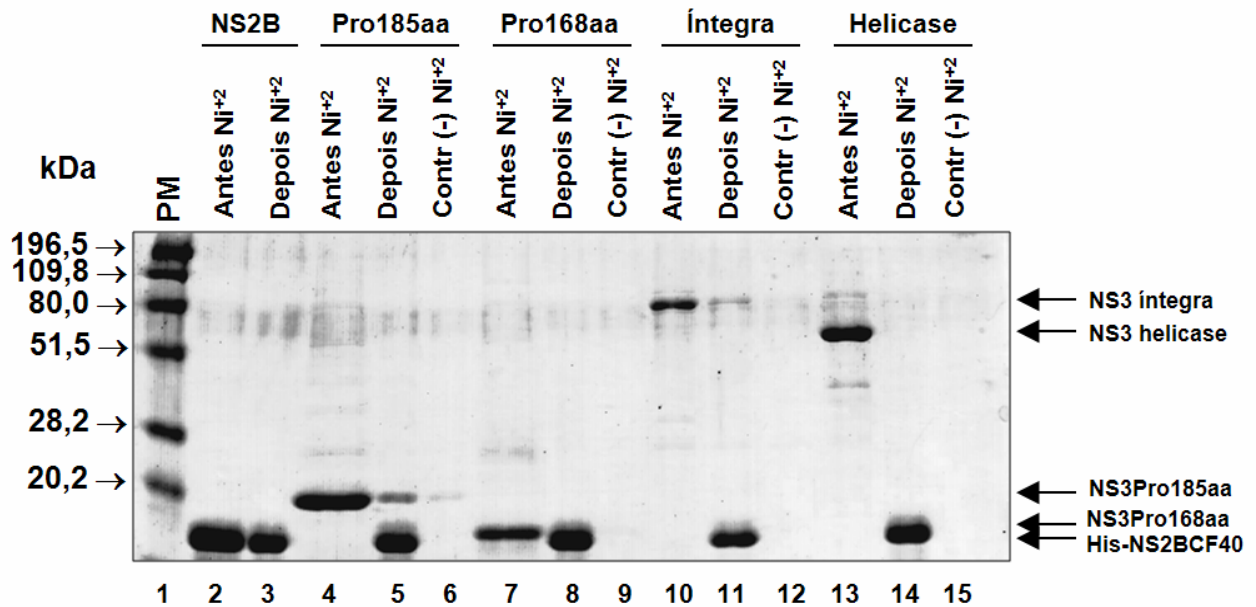


Figura 36: Ensaio de interação (*pull-down*) da proteína His-NS2BCF40 com as proteínas NS3 íntegra, NS3 helicase, NS3Pro185aa, e NS3Pro168aa. A linha 1 mostra o marcador de peso molecular; linhas 2, 4, 7, 10, e 13 são as proteínas recombinantes antes da passagem na coluna de níquel; linha 3, controle positivo da interação da His-NS2BCF40 com a resina de níquel; linhas 5 e 11, interação da His-NS2BCF40 com as proteínas NS3Pro185aa e NS3 íntegra; linhas 8 e 14, proteínas NS3 helicase e NS3Pro168aa não apresentaram interação com His-NS2BCF40; e linhas 9, 12 e 15 são os controles negativos do ensaio, demonstrando que as proteínas quando incubadas na coluna de níquel, sem a presença da His-NS2BCF40, não interagem com a resina, com exceção da linha 6. Gel corado com Comassie coloidal.

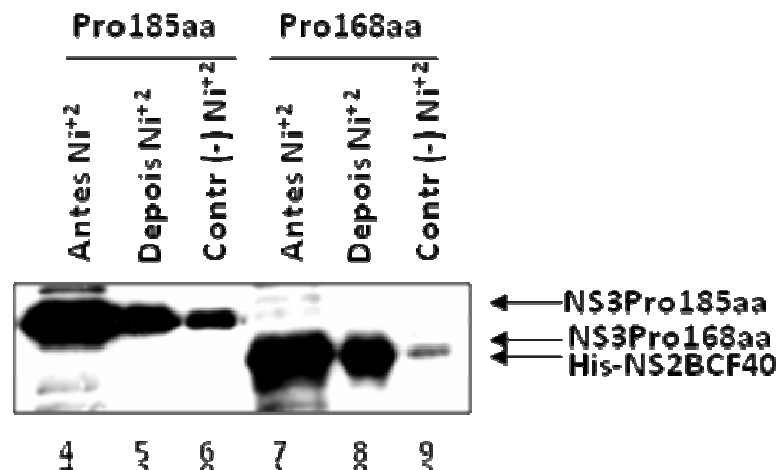


Figura 37: Ensaio de *Western-blot* das proteínas NS3Pro185aa e NS3Pro168aa utilizando anticorpo anti- NS3Pro do DENV-2. A figura acima mostra a interação do anticorpo com as mesmas proteínas do ensaio de *pull-down*. A ordem das amostras foram as mesmas da **Figura 36**. Linhas 4 e 7 são os controles positivos das proteínas NS3Pro185aa e NS3Pro168aa, respectivamente; linha 5, controle positivo para a NS3Pro185aa e negativo para His-Ubiq-NS2BCF40, demonstrando que o anticorpo anti-NS3Pro não interage com a proteína His-Ubiq-NS2BCF40; linhas 6 e 9, controle negativo demonstrando que as duas construções sem a cauda de histidina interagem com a resina de Ni^{+2} ; e linha 8, NS3Pro168aa interagindo com o cofator NS2BCF40. Antes Ni^{+2} = antes do ensaio de *pull-down* com resina de níquel.

Para avaliarmos se as proteínas NS3Pro168aa, NS3Pro185aa e NS3 íntegra purificadas a partir de corpo de inclusão foram reoveladas corretamente, realizamos ensaios de atividade proteolítica. Um micromolar das proteínas foram incubados separadamente com $10\mu\text{M}$ da His-Ubiq-NS2BCF40 durante 10 minutos e a reação iniciada com a adição de $250\mu\text{M}$ do substrato paranitroanilida. Podemos observar que a proteína NS3Pro168aa apresentou atividade proteolítica 30% e 70% maior do que a NS3Pro185aa e NS3 íntegra, respectivamente, sugerindo que o segmento $\text{E}^{169}\text{-K}^{185}$ interfere na ligação do cofator com a NS3 protease, e, conseqüentemente, com sua atividade proteolítica (**Figura 38**).

A análise do potencial de superfície eletrostática e da sequência de aminoácidos da NS3Pro185aa mostra que o segmento $\text{E}^{169}\text{-K}^{185}$ é carregado negativamente em pH fisiológico (**Figuras 39 A e B**). Além disso, este segmento não é conservado entre os 4 sorotipos do DENV de acordo com alinhamento de sequência de aminoácidos, embora

tenham grande conteúdo de resíduos de ácidos Asp e Glu (**Figura 39 C**), o que pode ter favorecido a interação da NS3Pro185aa com a resina de níquel.

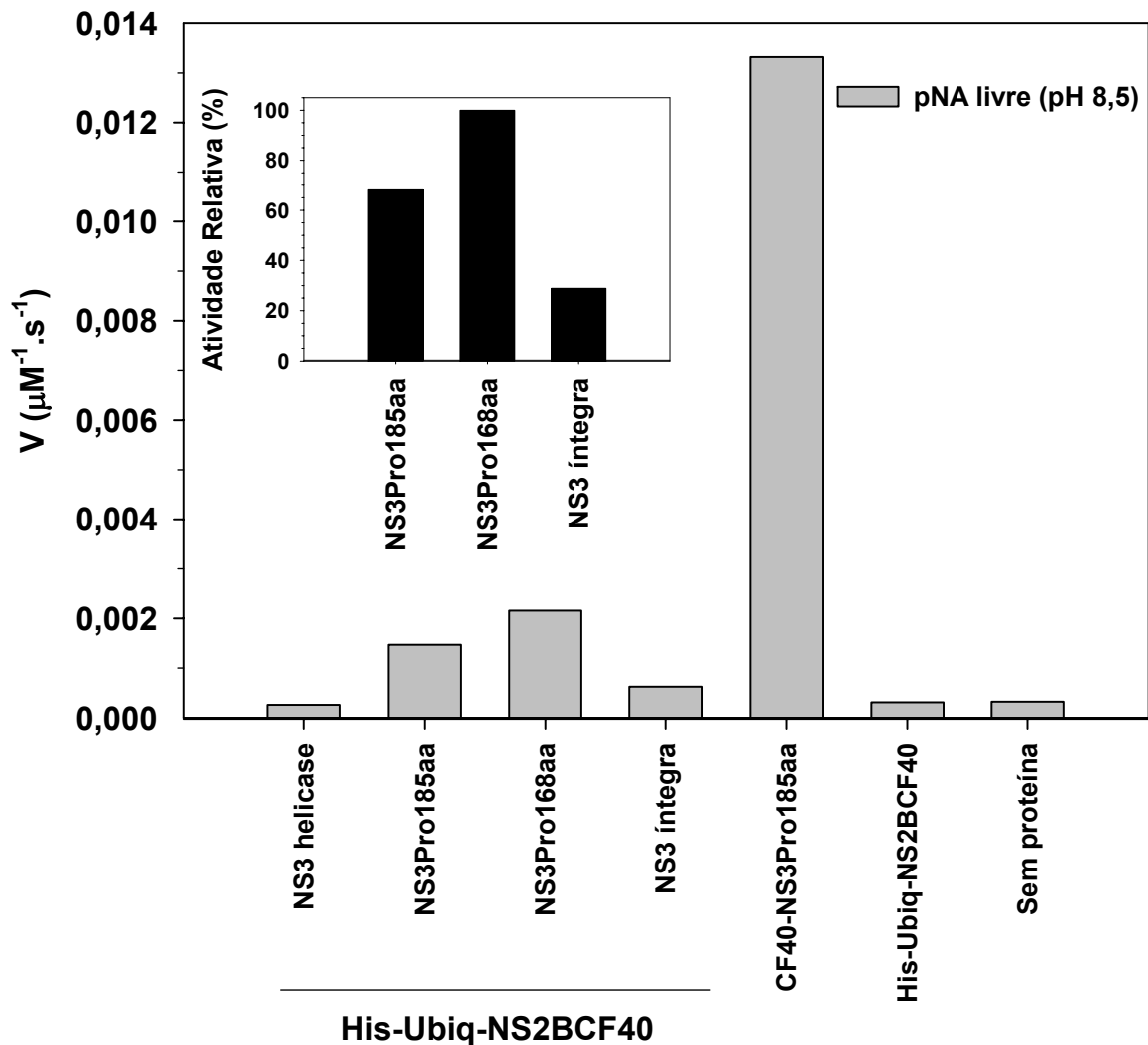


Figura 38: Teste de atividade proteolítica das proteínas NS3Pro168aa, NS3Pro185aa e NS3 íntegra com o cofator His-Ubiq-NS2BCF40. O gráfico mostra as velocidades de hidrólise do substrato Ac-RTSKKR-pNA. A reação contendo $1\mu\text{M}$ da proteína de interesse e $10\mu\text{M}$ do cofator NS2BCF40 (tampão: 50mM de Tris-HCl pH8,5, 10mM de NaCl, 20% de glicerol e 1mM de CHAPS) foi incubada com $250\mu\text{M}$ do substrato peptídico por 10 min a 37°C . O controle positivo da reação foi a CF40-NS3Pro185aa, e os controles negativos foram o domínio NS3 helicase + His-Ubiq-NS2BCF40; His-Ubiq-NS2BC40 isolada; e sem proteína. O painel interno demonstra a atividade relativa das proteínas NS3Pro185aa, NS3Pro168aa e NS3 íntegra.

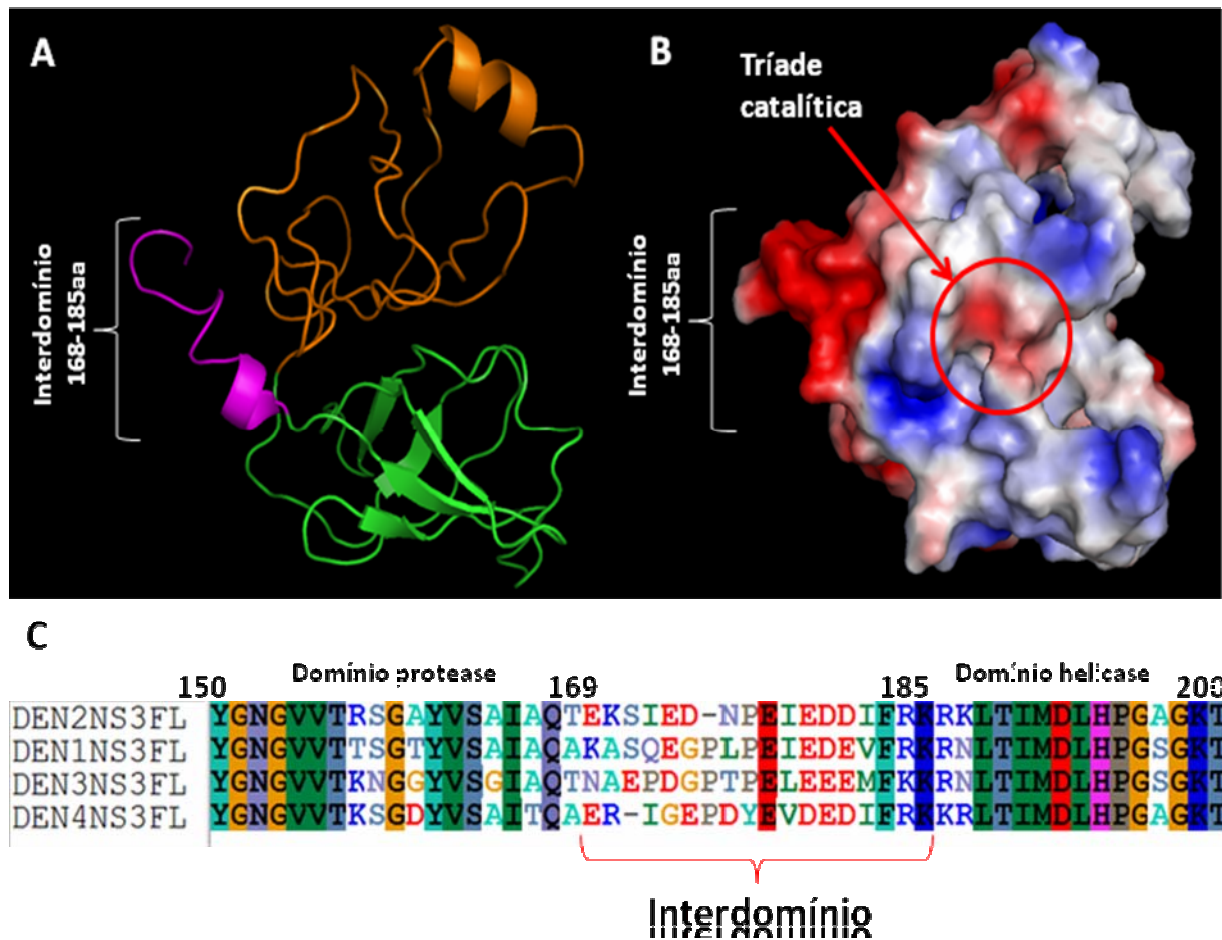


Figura39: Estrutura do domínio da NS3 protease e alinhamento do segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵. (A) Representação em *Ribbon* (programa PyMol) da NS3pro185aa (Murthy *et al.*, 1999 PDB: 1bef) com o subdomínio N-terminal em laranja, o subdomínio C-terminal em verde, e o segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵ em lilás. (B) visualização do potencial de superfície eletrostática da NS3Pro185aa, com a mesma orientação do painel A: seta em vermelho com círculo identificando a região da tríade catalítica (H⁵¹, D⁷⁵, S¹³⁵), em azul os potenciais positivos, em vermelho os negativos, e em branco os neutros; e (C) alinhamento de seqüências de aminoácidos do segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵ dos 4 sorotipos do DENV. Os números acima das seqüências indicam os resíduos de aminoácido referente à NS3 íntegra do DENV-2.

IV.6) Avaliação da atividade proteásica e modificações conformacionais

Em 2006, Erbel e colaboradores resolveram por cristalografia de raios-X duas novas estruturas contendo tanto o domínio da NS3 protease quanto o cofator NS2B, que é responsável pelo aumento na atividade catalítica da enzima. Uma das estruturas é referente a uma protease (NS2B/NS3pro) do vírus Oeste do Nilo (WNV) (PDB: 2fp7)

complexada com um inibidor tetrapeptídico (Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H) e a outra, a protease (NS2B/NS3pro) do DENV-2 (PDB: 2fom) sem qualquer tipo de ligante (inibidor ou substrato). Estas estruturas têm ajudado na identificação de resíduos importantes para o reconhecimento de substratos da NS3 protease, além de contribuir para o esclarecimento de seu mecanismo de catálise enzimática.

Vários inibidores peptidomiméticos da NS3 protease têm sido descritos na literatura . A aprotinina, um inibidor padrão de serina protease, apresentou uma grande afinidade com $K_i = 79, 25, 88$ e $6,4$ pM para as proteases dos DENV-1 a DENV-4, respectivamente (Leung *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005). Similar à protease de HCV, a protease do DENV apresenta um sítio de ligação para atividade proteolítica de alta afinidade o que oferece a possibilidade de desenvolvimento de novos inibidores através da otimização combinatorial dos sítios de clivagem. Por essa razão, tem-se dado ênfase ao desenvolvimento de pequenas moléculas baseadas em substratos peptídicos como inibidores da protease. Embora vários destes inibidores estejam sendo testados contra o DENV-2, a seletiva inibição da atividade proteolítica deste vírus ainda não foi obtida.

Neste contexto, clonamos, expressamos e purificamos a proteína quimérica CF40-NS3Pro185aa com o objetivo de estudarmos termodinamicamente essa construção e, futuramente, testarmos novos inibidores da NS3 protease do DENV-2. A atividade proteolítica foi medida usando-se o substrato peptídico Ac-RTSKKR-pNA que corresponde ao segmento N-terminal P6-P1 do sítio de clivagem NS2A/NS2B. As condições de reação utilizadas foram semelhantes às descritas por Leung *et al.* (2001), sendo o aumento de absorbância monitorado a 405 nm em diferentes concentrações de substrato. De acordo com os resultados destes autores, a CF40-NS3Pro185aa do DENV-2 apresenta atividade máxima em pH 9,0 com valores de K_M (medida de

afinidade da enzima ao substrato), k_{cat} (medida do número de vezes que cada sítio ativo da enzima catalisa uma reação por unidade de tempo) e k_{cat}/K_M (medida da eficiência catalítica das enzimas) iguais a $98 \pm 8 \mu\text{M}$, $0,0190 \pm 0,0001 \text{ s}^{-1}$ e $191 \pm 13 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. No entanto, nossos ensaios enzimáticos foram realizados em pH 8,5 para evitar a hidrólise do substrato Ac-RTSKKR-pNA na ausência de proteína em pH 9,0. Comparando nossos dados cinéticos com os de Leung *et al.* (2001), observamos uma divergência nos valores de K_M e k_{cat} que foram $682,88 \mu\text{M}$ e $0,0819 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Essas diferenças podem ser decorrentes da diferença do valor pH utilizado em nossos estudos ou da nossa construção não apresentar a cauda de histidina, que fora excisada com a nTEV protease. Contudo, a eficiência catalítica ($k_{cat}/K_M = 120 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) de nossa construção foi similar a de Leung *et al.* (2001) (**Figura 40**).

Conforme relatado anteriormente, dados da literatura demonstram que o domínio protease apresenta melhor atividade catalítica em pH alcalino. Desta forma, avaliamos o efeito do pH (6,0 – 10,0) sobre a atividade da CF40-NS3Pro185aa com a utilização de diversos tampões tais como MES (pH 6,0), HEPES (pH 7,0), Tris.HCl (pH 8,0 e 9,0) e CAPS (pH 10,0). Nossos resultados demonstram que a melhor atividade proteolítica foi em pH 9,0, com redução da atividade em pH 10,0 e atividade não-detectável em pH 6,0, corroborando dados da literatura (**Figura 41**).

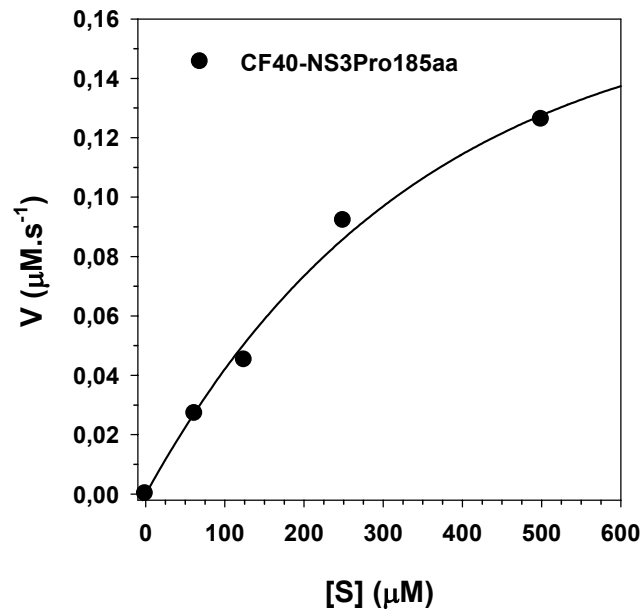


Figura 40: Atividade proteolítica da CF40-NS3Pro185aa em pH 8,5 sobre o substrato peptídico Ac-RTSKKR-pNA correspondente ao segmento N-terminal P6-P1 do sítio de clivagem NS2A/NS2B. Ensaio foi realizado utilizando 1,0μM da proteína recombinante em reações com volume final de 200μL contendo: 50mM de Tris-HCl pH8,5, 10mM de NaCl, 20% de glicerol e 1mM de CHAPS, com diferentes concentrações do substrato paranitroanilida (62,5; 125,0; 250,0; e 500,0 μM) seguido de incubação a temperatura de 37°C por 1 h.

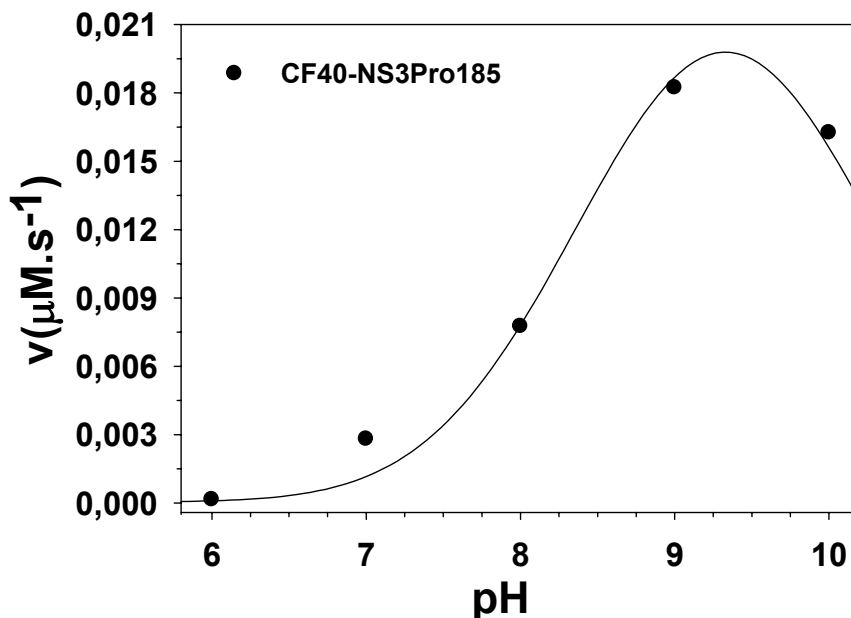


Figura 41: Análise da atividade enzimática da CF40-NS3Pro185aa em diferentes condições de pH (6,0-10,0). Ensaio foi realizado com 250μM do substrato Ac-RTSKKR-pNA, 1,0μM de CF40-NS3Pro185aa, e diferentes condições de tampão (50mM de [MES, HEPES, Tris.HCl ou CAPS], 10mM de NaCl, 20% de glicerol e 1mM de CHAPS).

Ao comparar a estrutura tridimensional da NS3Pro185aa com a CF40-NS3Pro185aa, Chanprapaph *et al.* (2005) demonstraram o não alinhamento da tríade catalítica (His⁵¹, Asp⁷⁵ e Ser¹³⁵). Isto porque, de acordo com a estrutura predita do complexo, o cofator NS2B presente na CF40-NS3Pro185aa parece induzir inúmeras modificações estruturais no domínio NS3 protease que afetam a conformação da tríade catalítica, levando ao aumento das distâncias entre os resíduos desta tríade (Chanprapaph *et al.*, 2005). Contudo, até o momento, não há descrito na literatura estudos que correlacionem as mudanças conformacionais do complexo CF40-NS3Pro185aa com a sua atividade catalítica em pH alcalino.

Assim, analisando os ensaios de termodinâmica da CF40-NS3Pro185aa, observamos que esta construção apresenta cooperatividade nos ensaios de desnaturação por ureia (**Figuras 34 C e E**) e não entra em processo de agregação, desnaturação ou compactação entre o pH 6,0 e 9,5 (**Figuras 35 C e E**), demonstrando ser se mais estável do que a NS3Pro185aa. Para avaliarmos de que forma modificações conformacionais (que não tenham sido detectados quando avaliamos o CM em diferentes condições de pH) possam afetar a estrutura do complexo CF40-NS3Pro185aa, foram realizados ensaios de supressão de fluorescência por acrilamida e interação com bis-ANS para monitorar a exposição dos resíduos de Trp e de regiões hidrofóbicas, respectivamente, com o ambiente aquoso.

Nossos dados demonstram que não há aumento da exposição dos resíduos de Trp ao solvente entre os valores de pH 6,0 e 9,0, mas somente em pH 10,0, onde ocorre o início do processo de desnaturação (**Figura 42 A**). Analogamente, quando analisamos a fluorescência extrínseca do bis-ANS (**Figura 42 B**), observamos que entre os valores de pH 7,0 a 9,0 não há variação da exposição dos resíduos hidrofóbicos, somente em pH 10,0, onde observamos menor exposição dos resíduos

hidrofóbicos ($K_b = 1,36\mu\text{M}^{-1}$) devido ao processo de desnaturação. Já em pH 6,0, observamos uma maior exposição dos resíduos hidrofóbicos ($K_b = 2,04\mu\text{M}^{-1}$) (Tabela 8) que pode explicar a atividade proteolítica muito baixa da CF40-NS3Pro185aa neste pH (Figura 41).

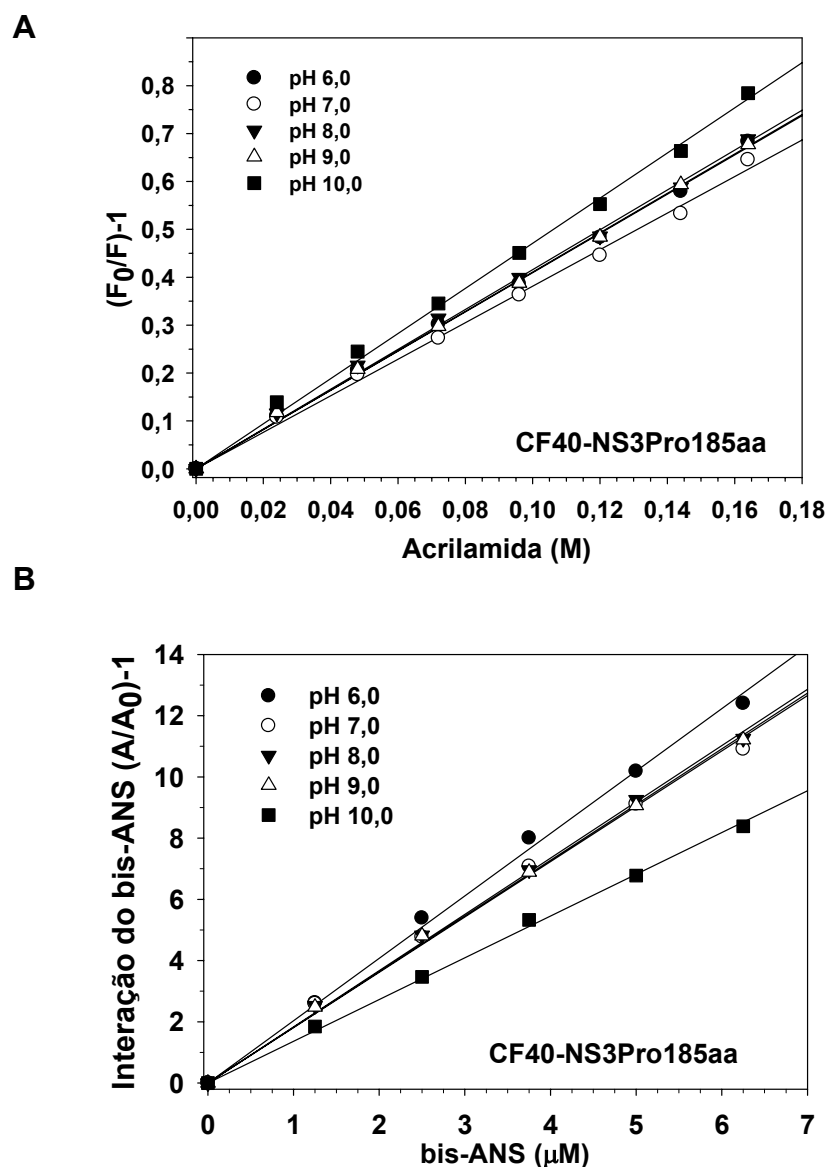


Figura 42: Caracterização termodinâmica da CF40-NS3Pro185aa em diferentes condições de pH. (A) supressão de fluorescência por acrilamida; (B) interação do bis-ANS; e tabela (C) com os valores da K_{SV} e K_b dos gráficos A e B. Ensaios de titulação por acrilamida e bis-ANS foram realizados com $0,5\mu\text{M}$ de CF40-NS3Pro185aa e diferentes condições de tampão (50mM de [MES, HEPES, Tris.HCl ou CAPS], 10mM de NaCl, 20% de glicerol e 1mM de CHAPS).

Tabela 8: Valores da K_{sv} e K_b referentes aos dados das Figuras 42 A e B.
CF40-NS3Pro185aa

	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_b (\mu M^{-1})$
pH 6,0	4,10	2,04
pH 7,0	3,82	1,81
pH 8,0	4,16	1,84
pH 9,0	4,11	1,82
pH 10,0	4,71	1,36

K_b = coeficiente angular da titulação por bis-ANS

Levando em consideração que o domínio protease na ausência do cofator NS2B não apresenta atividade proteolítica, comparamos a exposição dos resíduos hidrofóbicos da NS3Pro185aa com a CF40-NS3Pro185aa em diversas condições de pH. Nossos dados demonstram que a interação do bis-ANS com a NS3Pro185aa foi 2 vezes maior do que com a CF40-NS3Pro185aa entre o pH 6,0 e 10,0 (**Figura 43**), sugerindo que a ausência da atividade proteolítica do domínio protease sem o cofator pode não está apenas relacionada à mudança conformacional da tríade catalítica, mas também à maior exposição dos resíduos hidrofóbicos, prejudicando assim a interação do domínio protease com os resíduos dibásicos do peptídeo.

Pelos ensaios de supressão de fluorescência por acrilamida e de interação com o bis-ANS, não foi possível identificar modificações conformacionais que explicassem a alta atividade proteolítica da CF40-NS3Pro185aa em pH 9,0. Contudo, observamos que a interação do cofator NS2B com a NS3Pro185aa, além de ser importante para a correta conformação da tríade catalítica e conseqüente para a atividade proteásica, diminui a exposição dos resíduos hidrofóbicos da protease, que, de outra forma, diminuiria a interação da NS3 protease com o substrato.

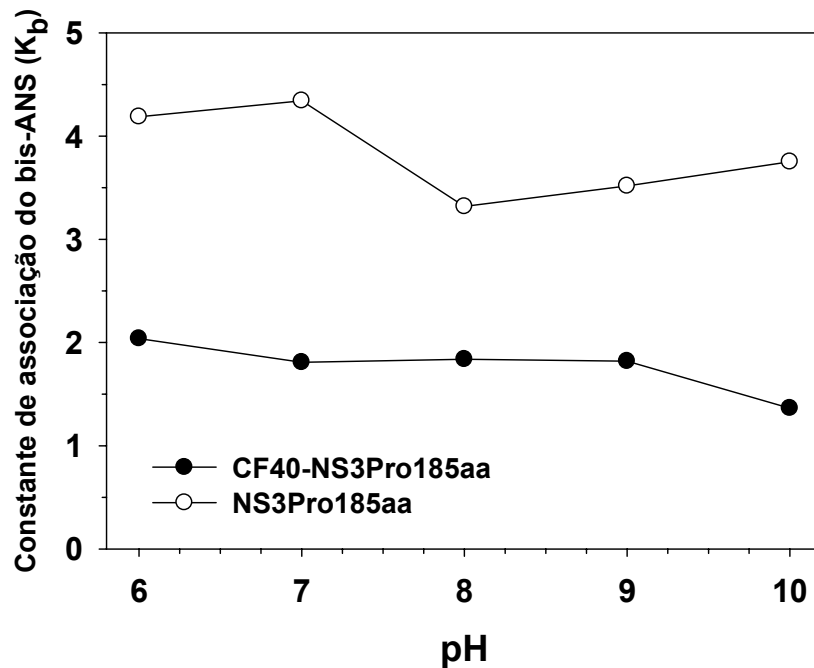


Figura 43: Análise da interação do bis-ANS com as proteínas NS3Pro185aa e CF40-NS3Pro185aa na ausência do substrato Ac-RTSKKR-pNA. O gráfico correlaciona os valores de K_b após titulação por bis-ANS com as diferentes condições de pH.

Até o momento, não foi encontrado um inibidor da protease (CF40-NS3Pro185aa) para os 4 sorotipos de DENV. Porém, o fato da CF40-NS3Pro185aa apresentar atividade proteolítica *in vitro* em pH alcalino sugere que este domínio interaja com ativadores ainda desconhecidos na célula hospedeira ou que ocorram modificações pós-transcricionais que levem a uma ótima atividade proteolítica em pH fisiológico. Recentemente, Angelo *et al.* (2006) relataram que glicosaminoglicanos e sais cosmotrópicos (agentes que estabilizam as macromoléculas) induzem a um aumento da atividade da serino-protease secretada Callicreina Humana 6 (*Human Kallikrein 6*), quando o pH cai de 9,0 para 7,5. Esses dados reforçam a importância de encontrarmos proteínas da célula hospedeira que possam modular de forma análoga a

atividade proteásica da NS3 e, dessa forma, possibilitar a busca de inibidores da NS3 protease mais eficazes.

IV.7) Avaliação da atividade ATPásica da NS3 do DENV-2

Alguns processos biológicos são termodinamicamente desfavoráveis e, portanto, não podem ocorrer sem o uso de uma fonte externa de energia. Em muitos casos, essa fonte de energia vem da hidrólise das moléculas de adenosina trifosfato (ATP) via ATPase. Esta energia pode ser utilizada para direcionar uma reação que é energeticamente desfavorável para uma termodinamicamente favorável. ATPases estão envolvidas em vários processos celulares como o enovelamento de proteínas, transporte intracelular, degradação de proteínas, iniciação do processo de replicação, reparo, remodelamento do DNA, e transporte de íons (Chène, 2002). Das sete proteínas não estruturais do DENV, a NS3 é a única proteína com atividade ATPásica. Estudos têm revelado que essa capacidade de hidrolisar o ATP como fonte de energia é de extrema importância para a translocação e dissociação da fita dupla de RNA viral.

Assim, analogamente ao estudo de correlação entre atividade enzimática e mudança conformacional das diversas construções da NS3 protease, realizamos este mesmo tipo de estudo de correlação para o domínio helicase da NS3. Assim, iniciamos os nossos estudos com a determinação dos parâmetros cinéticos de hidrólise do ATP das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase em diferentes valores de pH. O intervalo de pH utilizado foi baseado nos ensaios termodinâmicos de LS e intensidade de fluorescência (**Figuras 34 A e B**, e **35 A e B**). De acordo com estes ensaios, ambas as proteínas agregam em pH abaixo de 6,0 e começam a desnaturar em pH acima de 8,5.

Portanto, definimos nossos ensaios de hidrólise de ATP no intervalo de pH entre 5,5 e 8,5.

A hidrólise do ATP foi acompanhada por ensaio de colorimetria na qual a quantidade de fosfato inorgânico liberado no meio foi dosada. A velocidade inicial de hidrólise do ATP foi medida em diferentes concentrações de ATP (**Figura 45**). Os parâmetros cinéticos de K_M e k_{cat} foram determinados pelo gráfico de Lineweaver-Burk e os valores de k_{cat}/K_M foram calculados para o substrato e comparados entre si (**Figura 45 e Tabela 9**).

Inicialmente comparamos o perfil de hidrólise do ATP da NS3 íntegra com o da NS3 helicase em condições saturantes de substrato e observamos que a maior atividade ATPásica ocorreu em pH 6,0, com redução da atividade para os pHs mais altos (**Figura 44**). Em pH 6,0, verificamos também que a NS3 helicase apresentou uma afinidade maior ao ATP ($K_M = 0,21\text{mM}$) do que a NS3 íntegra ($K_M=0,87\text{mM}$) e que a constante catalítica da NS3 helicase ($k_{cat}=4,22\text{min}^{-1}$) foi 6 vezes maior do que a da NS3 íntegra ($k_{cat}=0,66\text{min}^{-1}$) (**Tabela 9**).

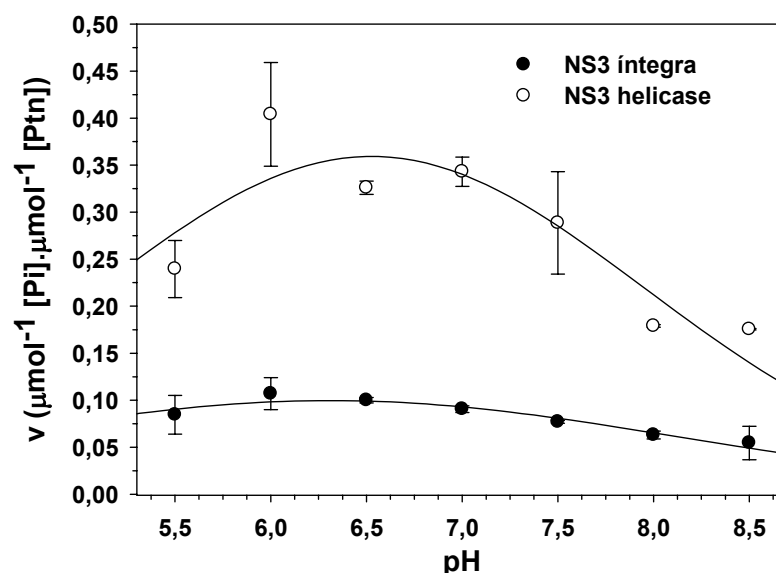


Figura 44: Análise da atividade ATPásica das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase em função do pH. Os valores de v referem-se às medidas de velocidade inicial em reações contendo 3mM de ATP e incubadas a 30°C.

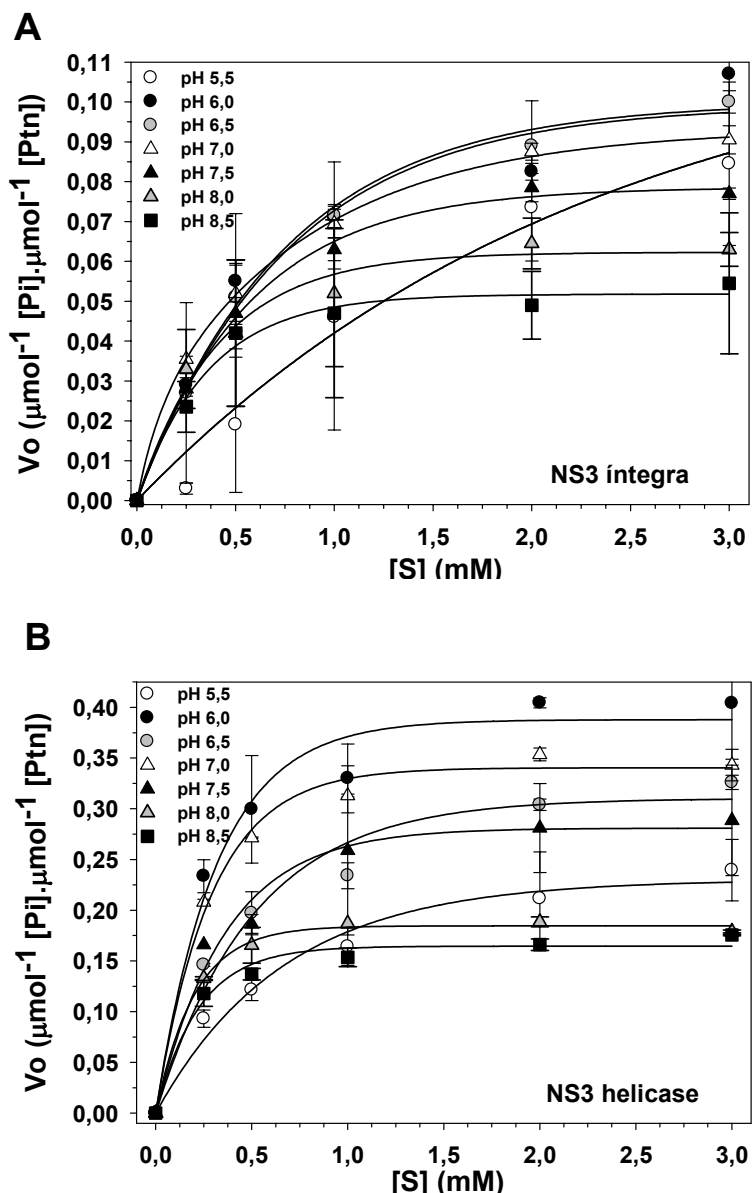


Figura 45: Análise da atividade ATPásica das proteínas (A) NS3 íntegra e (B) NS3 helicase em função da concentração de substrato em diferentes pHs. O ensaio de hidrólise do ATP foi realizado com 200nM da NS3 íntegra e 100nM da NS3 helicase, na presença de diferentes concentrações de ATP. A quantidade de Pi livre foi medida por ensaio colorimétrico e os resultados ajustados usando a equação de Michaelis-Menten ($V_o = V_{\text{max}} \cdot [S] / (K_M + [S])$).

Tabela 9: Parâmetros cinéticos da NS3 íntegra e NS3 helicase em diferentes pHs. Valores em negrito mostram as melhores atividades das proteínas.

<i>pH</i>	<i>NS3 helicase</i>				<i>NS3 íntegra</i>			
	<i>K_M</i> (<i>mM</i>)	<i>k_{cat}</i> (<i>min⁻¹</i>)	<i>k_{cat}/K_M</i> (<i>mM⁻¹min⁻¹</i>)	<i>V_{max.}</i>	<i>K_M</i> (<i>mM</i>)	<i>k_{cat}</i> (<i>min⁻¹</i>)	<i>k_{cat}/K_M</i> (<i>mM⁻¹min⁻¹</i>)	<i>V_{max.}</i>
5,5	0,43	2,45	5,67	0,24	1,49	0,56	0,38	0,11
6,0	0,21	4,22	20,33	0,42	0,87	0,66	0,76	0,13
6,5	0,35	3,49	10,00	0,35	0,43	0,56	1,33	0,11
7,0	0,20	3,78	18,67	0,38	0,50	0,53	1,06	0,10
7,5	0,21	2,94	14,02	0,29	0,65	0,51	0,78	0,10
8,0	0,12	1,98	16,99	0,20	0,30	0,33	1,11	0,06
8,5	0,13	1,77	13,46	0,18	0,39	0,30	0,76	0,06

Além disso, os parâmetros cinéticos calculados mostraram que a k_{cat} foi maior em pH 6,0 seguidos dos pH 6,5 ~ 5,0 > 7,0 ~ 7,5 > 8,0 ~ 8,5 e dos pH 6,5 ~ 7,0 > 7,5 > 5,5 > 8,0 > 8,5, respectivamente, para NS3 íntegra e NS3 helicase. Contudo, os valores de K_M variaram da seguinte forma: pH 8,5 ~ 8,0 > 7,5 ~ 7,0 ~ 6,0 > 6,5 > 5,5 para a NS3 helicase e pH 8,0 ~ 8,5 > 6,5 ~ 7,0 ~ 7,5 > 6,0 > 5,5 para a NS3 íntegra. Podemos observar uma relação inversa entre os valores de k_{cat} e K_M em relação à variação do pH, ou seja, à medida que o pH tornou-se mais básico K_M aumentou mas k_{cat} diminuiu, e o inverso ocorreu à medida que o pH tornou-se mais ácido (**Figura 45 e Tabela 9**). É importante ressaltar que a hidrólise do ATP não foi observada na ausência do Mg^{+2} , confirmando assim a dependência de ambas proteínas pelo cátion divalente.

Comparando os valores de K_M da NS3 íntegra e NS3 helicase, observamos que a segunda obteve maior afinidade de ligação ao ATP independente do pH, exceto em pH 6,5, cuja sua afinidade foi próxima à da NS3 íntegra ($K_M=0,35mM$ e $0,43mM$, respectivamente). Entretanto, observamos nesse mesmo pH que os valores de k_{cat} e k_{cat}/K_M da NS3 íntegra ($0,56 min^{-1}$ e $1,33 mM^{-1} min^{-1}$, respectivamente) foram

significativamente menores do que os da NS3 helicase ($3,49 \text{ min}^{-1}$ e $10,00 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$, respectivamente), demonstrando claramente que a atividade ATPásica da NS3 é maior na ausência do domínio proteásico (**Figuras 44, 45 e Tabela 9**).

A alta atividade de hidrólise do ATP pelo domínio helicásico pode estar relacionada ao posicionamento estrutural do domínio proteásico na NS3 íntegra. Este domínio deve estar posicionado de tal forma que oclui o sítio de formação do complexo ATP-Mg²⁺ no motivo Walker A da helicase (**Figura 46**), interferindo assim na interação do ATP com o sítio. Para confirmarmos esta hipótese, estudos de supressão de fluorescência foram realizados para monitorar possíveis modificações conformacionais que favoreçam a hidrólise do ATP nas proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase quando o pH é modificado.

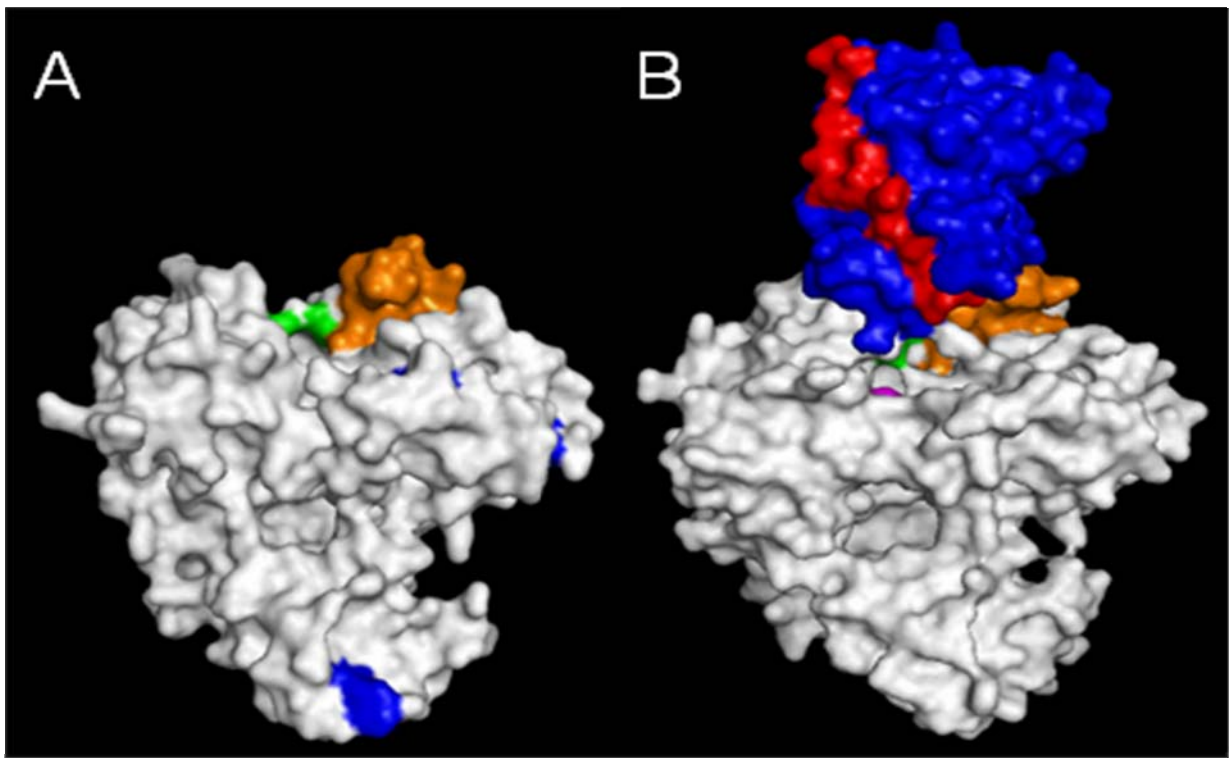


Figura 46: Mapa de superfície da NS3 helicase do DENV-2 (PDB 2bmf) e da NS3 íntegra do DENV-4 com cofator NS2B (PDB 2vbc). Em (A), o domínio helicase está representado. Em verde, é o resíduo de interação ao ATP, laranja; resíduos de interação com a protease, azul; resíduos de Trp, branco; domínio helicase. Em (B) está mostrada a NS3 íntegra + cofator. Em verde e rosa, motivo de ligação do complexo ATP-Mg²⁺; laranja, resíduos de interação com a protease; azul, domínio protease; vermelho, cofator NS2B.

IV.8) Correlação da atividade ATPásica com mudanças conformacionais da NS3

Vários estudos têm demonstrado que as proteínas podem adotar diferentes estados conformacionais de relevância biológica, com atividades catalíticas alteradas. Portanto, não é surpresa que uma ATPase com atividade reduzida ou depletada dê origem a inúmeras doenças humanas como o câncer, doenças cardiovasculares e gástricas, e infecções (Chène, 2002). Por outro lado, a diminuição da atividade ATPase em vírus e bactérias pode levar a uma redução da infecção.

Nossos estudos termodinâmicos demonstram que as proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase iniciam seus processos de desnaturação em pH 8,0 de acordo com a diminuição nos valores de CM. Contudo, em pH abaixo de 7,5, o CM da NS3 íntegra aumentou devido a um moderado processo de agregação que reduziu a exposição dos resíduos de Trp; por outro lado, a diminuição do CM do domínio helicase parece ser devido a uma descompactação da sua estrutura terciária (**Figuras 34 A e B, Figuras 35 A e B**). Para confirmar se esses eventos influenciam a atividade ATPásica da NS3 íntegra e NS3 helicase em diferentes pH, foram realizados ensaios de supressão de fluorescência com acrilamida e ATP, e de interação com bis-ANS.

Nesse estudo, consideramos que a NS3 íntegra e NS3 helicase encontram-se na forma nativa em pH 7,5 e que valores negativos e positivos de Δ CM indicam uma maior e menor exposição dos resíduos de Trp ao solvente, respectivamente. Inicialmente, calculamos o CM e o LS da NS3 íntegra e NS3 helicase em diferentes pHs, sendo que os tampões utilizados nos ensaios espectroscópicos foram os mesmos dos ensaios de hidrólise do ATP. De acordo com os valores de Δ CM e LS (**Figura 47**), a NS3 íntegra teve o CM do seu espectro de fluorescência aumentado à medida que o pH foi acidificado, indicando uma menor exposição dos resíduos que Trp, ou seja, um

evento de compactação da sua estrutura terciária (**Figura 47 A**). Por outro lado, quando avaliamos o LS desta proteína, observamos que este aumento pôde ser também devido à agregação proteica que ocorreu quando o pH foi diminuído de 7,0 para 5,5 (**Figura 47 B**).

Já para a NS3 helicase, o CM diminuiu progressivamente quando o pH foi acidificado, sugerindo que ela tenha se desnaturado visto que houve uma maior exposição dos seus resíduos Trp ao solvente. Também observamos que entre os valores de pH 6,0 e 8,5 não ocorreu aumento significativo do LS, que só foi observado em pH 5,5 ($A/A_0 = 4,4$ vezes). Este aumento da agregação da NS3 helicase pode estar associado ao pI da proteína ou ser devido à exposição dos resíduos hidrofóbicos $N^{464}P^{465}N^{467}N^{469}$ adjacente ao motivo IV (**Figura 46 A**) que interagem com o domínio proteásico na NS3 íntegra (**Figura 46 B**). Analisando estes resíduos quimicamente observamos que um deles apresenta cadeia lateral apolar (P^{465}) e enquanto três outros possuem cadeias laterais polares sem carga (N^{464} , N^{467} e N^{469}).

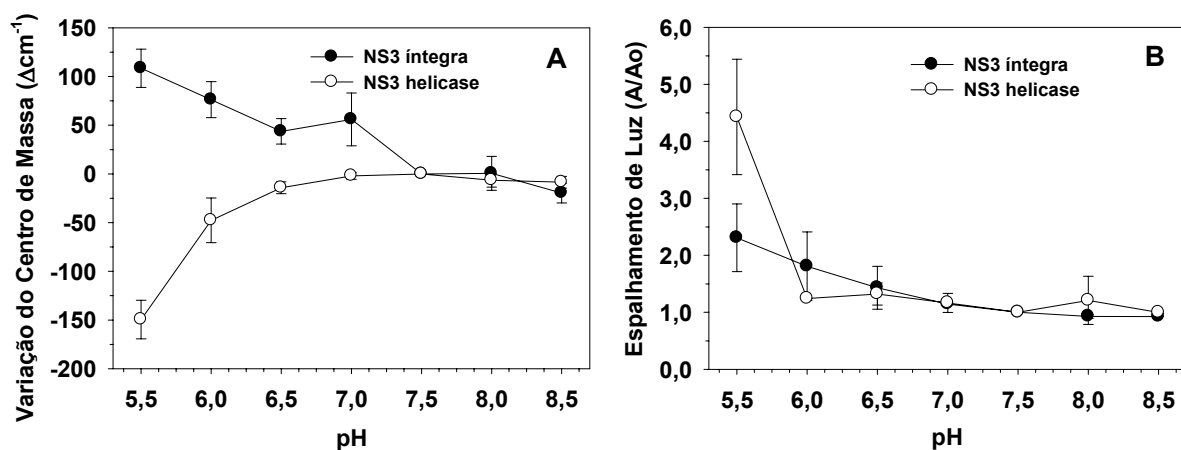


Figura 47: Valores de centro de massa espectral e LS em diferentes pHs das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase, na presença de $MgCl_2$. Valores de variação do CM (A) e valores de LS (B) foram determinados em cada valor de pH analisado.

Para confirmar se a estrutura terciária da NS3 helicase entrou em processo de “descompactação” e se o Δ CM da NS3 íntegra foi devido ao processo de agregação em pH ácido, realizamos o ensaio de supressão de fluorescência por acrilamida e de interação com o bis-ANS (**Figura 48**). À medida que o pH foi acidificado, a exposição dos resíduos de Trp da NS3 helicase ao solvente aumentou (pH 6,0 > 6,5 > 7,0 > 7,5) assim como houve uma maior exposição dos resíduos hidrofóbicos entre os pH 6,0 e 7,5 (essa faixa de pH não foi apresentada agregação) (**Figura 48 A**). Esses resultados reforçam a hipótese de que a proteína tenha se descompactando (**Figuras 47 A e B**). Já a NS3 íntegra não apresentou variação significativa nos valores de K_{sv} entre pHs 5,5 e 7,5, indicando ausência de mudança conformacional (**Figura 48 A, Tabela 10**). Porém, a sua estrutura apresentou exposição significativa dos seus resíduos hidrofóbicos em pH abaixo de 6,5 de acordo com a titulação por bis-ANS (**Figura 48 B e Tabela 10**).

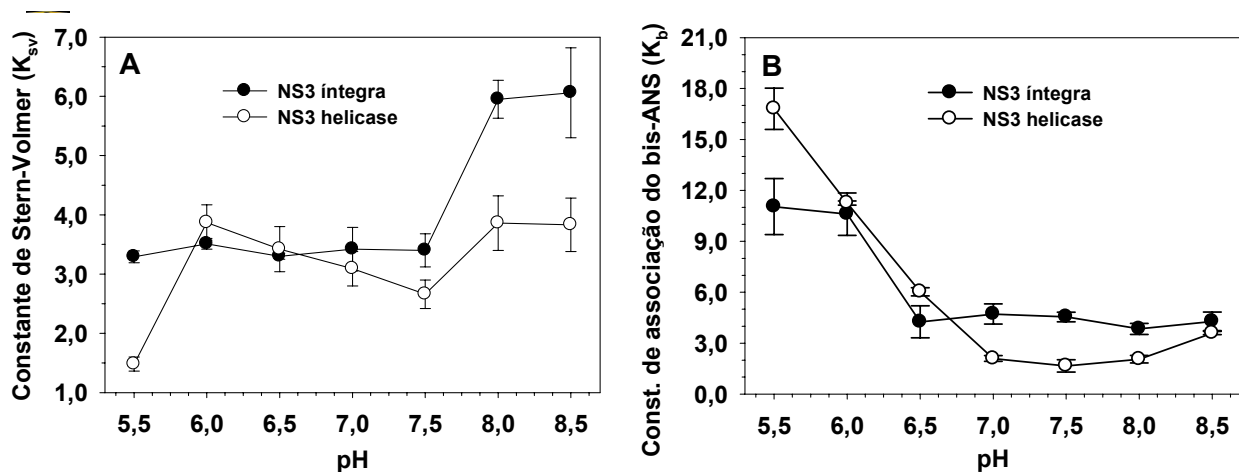


Figura 48: Supressão de fluorescência por acrilamida e titulação por bis-ANS das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase na presença de $MgCl_2$. (A) valores da K_{sv} e (B) de K_b após titulação por bis-ANS em diferentes pHs.

Tabela 10: Valores das constantes de supressão de fluorescência por acrilamida, ΔCM e LS das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase em diferentes pHs.

pH	NS3 helicase			NS3 íntegra		
	$\Delta CM(cm^{-1})^{\#}$	$A/Ao^{\#}$	$K_{sv} (M^{-1})^*$	$\Delta CM(cm^{-1})^{\#}$	$A/Ao^{\#}$	$K_{sv} (M^{-1})^*$
5,5	-149,54	4,43	1,48	108,54	2,31	3,29
6,0	-47,69	1,24	3,87	76,22	1,81	3,51
6,5	-14,18	1,32	3,42	43,68	1,43	3,30
7,0	-1,98	1,16	3,09	56,07	1,15	3,42
7,5	0,00	1,00	2,66	0,00	1,00	3,40
8,0	-6,50	1,21	3,86	0,63	0,93	5,95
8,5	-8,48	1,00	3,83	-19,65	0,93	6,06

a = constante de ligação do ATP;

* = sem a presença de ATP;

£ = dados obtidos na ausência de $MgCl_2$

Para confirmar se a afinidade de ligação do ATP às proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase está associada com as modificações conformacionais nas suas estruturas terciárias em diferentes pHs e/ou à oclusão gerada pelo domínio proteásico sobre o motivo de ligação da proteína NS3 ao ATP, ensaios de supressão de fluorescência do Trp por ATP foram realizados. Nossos resultados demonstraram que a constante de ligação (K_a) do ATP à NS3 helicase foi maior em pH 6,0 e 6,5 ($K_a = 2,86 \text{ mM}^{-1}$) (**Figura 49 e Tabela 11**), cujas atividades de hidrólise do ATP foram elevadas (**Figuras 44 e 45 B**). Este resultado nos sugere que a ótima atividade de hidrólise do ATP nestes pHs são decorrentes de modificações conformacionais que levam a maior exposição dos resíduos hidrofóbicos da NS3 helicase ao solvente (**Tabelas 10 e 11**).

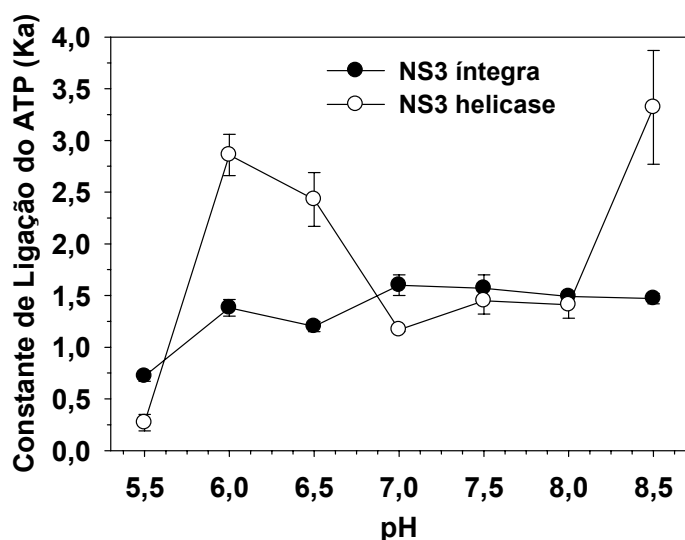


Figura 49: Ligação do ATP à NS3 íntegra e à NS3 helicase na ausência de $MgCl_2$. A figura mostra o resultado do K_a do ATP em diversos pHs. K_a é o coeficiente angular dos valores de supressão de fluorescência $[(F_0/F)-1]$ plotados contra a concentração de ATP de acordo com a Equação 8.

Tabela 11: Valores das constantes de supressão de fluorescência do Trp por ATP e de ligação de bis-ANS das proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase em diferentes pHs.

pH	NS3 Helicase		NS3 íntegra	
	$K_a (mM^{-1})^{\xi}$	$K_b (\mu M^{-1})$	$K_a (mM^{-1})^{\xi}$	$K_b (\mu M^{-1})$
5,5	0,27	16,80	0,72	11,04
6,0	2,86	11,25	1,38	10,60
6,5	2,43	6,03	1,20	4,25
7,0	1,17	2,09	1,60	4,72
7,5	1,45	1,66	1,57	4,55
8,0	1,41	2,05	1,49	3,84
8,5	3,32	3,59	1,47	4,29

K_a = coeficiente angular da titulação por ATP

K_b = coeficiente angular da titulação por bis-ANS

A partir dos resultados de ligação da sonda extrínseca bis-ANS (que tem a característica de se ligar a resíduos hidrofóbicos circundados por resíduos carregados positivamente expostos ao solvente) à NS3 helicase em pH 6,0, sugerimos que o aumento da exposição de tais resíduos favoreceu a atração do ATP (que tem carga negativa) pelo motivo Walker A da NS3 helicase, auxiliando dessa forma na formação do complexo ATP-Mg⁺² e hidrólise do ATP. Suspeitamos que essa modificação conformacional possa estar relacionada com o subdomínio 2 da helicase de acordo com as observações descritas no item IV.2. Essas modificações conformacionais não foram observadas na NS3 íntegra que manteve a sua estabilidade entre os pHs 6,5 e 7,5 (**Figura 48**).

De acordo com os experimentos de desnaturação da NS3 helicase em pH básico, verificamos um aumento do K_{sv} da supressão de fluorescência do Trp por acrilamida em pHs 8,0 e 8,5, devido provavelmente a uma maior acessibilidade dos resíduos de Trp ao solvente nestes pHs, ou seja, no início do processo de desnaturação. Por outro lado, os valores de K_a do ATP à NS3 helicase foram semelhantes em pH 7,5 e 8,0 ($1,45 \pm 0,13$ e $1,41 \pm 0,13 \text{ mM}^{-1}$, respectivamente) (**Tabela 11**), demonstrando que o início da desnaturação em pH 8,0 não afeta o motivo de ligação ao ATP. Mas, em pH 8,5, a ligação deste à proteína aumenta 2,3 vezes ($K_a = 3,32 \pm 0,55 \text{ mM}^{-1}$) provavelmente devido a maior exposição dos resíduos de Trp ao solvente, isto é, devido à desnaturação do motivo de ligação da NS3 helicase ao ATP (Walker A). No caso da proteína NS3 íntegra, os valores de K_a em pH 7,5, 8,0 e 8,5 ($1,57 \pm 0,13$, $1,49 \pm 0,05$ e $1,47 \pm 0,05 \text{ mM}^{-1}$, respectivamente) sugeriram que a proteína tenha iniciado seu processo de desnaturação sem alterar a ligação do ATP ao motivo Walker A (**Figura 49** e **Tabela 10**). Além disso, observamos que os valores K_a entre o pH 7,0 e 8,0 foram maiores para a NS3 íntegra do que para a NS3 helicase, confirmando que a oclusão do

motivo de ligação Walker A e B do domínio helicase pelo domínio proteásico não prejudicou a ligação do ATP à NS3 íntegra.

Em nossos ensaios termodinâmicos, observamos que a NS3 helicase em pH 5,5 entra em intenso processo de agregação embora valores de k_{cat} da NS3 helicase neste pH tenha sido semelhante as obtidas no pH 7,5 (2,45 e 2,94 min^{-1} , respectivamente), indicando uma alta hidrólise do ATP. Entretanto, quando avaliamos a supressão de fluorescência do Trp pelo ATP, verificamos que K_a em pH 5,5 é aproximadamente 5 vezes menor do que em pH 7,5 (0,27 mM^{-1} e 1,45 mM^{-1} , respectivamente). Embora contraditório, este resultado pode ser explicado, pois o experimento de supressão foi realizado na ausência do Mg^{+2} para evitar a hidrólise do ATP; conseqüentemente, a NS3 helicase não estava cataliticamente ativa. Assim, para verificar se a ligação do ATP na NS3 helicase em pH 5,5 varia quando a proteína encontra-se cataliticamente ativa, foram realizados ensaios de supressão de fluorescência por ATP na presença e ausência do cofator Mg^{+2} . Nossos resultados demonstraram um aumento significativo da K_a na presença de MgCl_2 ($K_a = 1,95 \text{ mM}^{-1}$) (**Figura 50**), propiciando desta forma a exposição do Walker A para a ligação do ATP. Esses dados sugerem que a exposição dos resíduos hidrofóbicos $\text{N}^{464}\text{P}^{465}\text{N}^{467}\text{N}^{469}$ pode favorecer a agregação da NS3 helicase, prejudicando assim a interação do ATP devido à oclusão do motivo Walker A.

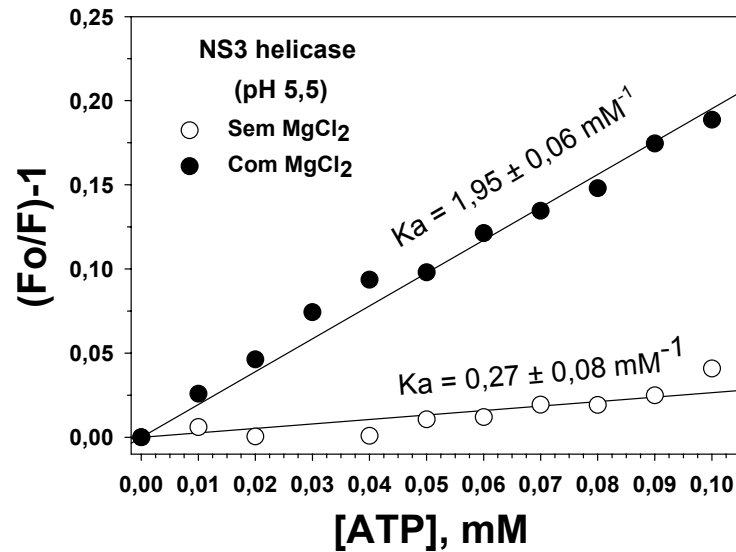


Figura 50: Ligação do ATP à proteína NS3 helicase em pH 5,5. Gráfico mostra o resultado da titulação do ATP sobre a proteína NS3 helicase em pH 5,5 na presença (●) e ausência (○) de MgCl₂. As medidas dos valores de supressão [(Fo/F)-1] foram plotados em relação à concentração de ATP.

Analisando a superfície eletrostática da NS3 íntegra do DENV-4, proposta por Luo *et al.* (2008), observamos que o sítio de interação ao ATP é circundado por resíduos de cadeias laterais polares com carga positiva. O resíduo Arg⁶⁴ encontra-se no domínio proteásico enquanto que Lys²⁰¹, Arg²⁰², Arg²⁰⁹, Lys²¹³ (α -helice 1) e Arg²³⁶ (alça adjacente a α -helice 2) encontram-se no domínio helicase (**Figura 15** e **Figura 51**), sugerindo que a sonda bis-ANS interaja preferencialmente com o sítio ATPase, promovendo a oclusão desta região. Para confirmar esta hipótese, ensaios de ATPase foram realizados com as proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase nos pHs 6,0 e 7,5 em função da concentração de bis-ANS. Observamos que ambas as proteínas apresentaram maior atividade de hidrólise em pH ~6,0 do que em pH 7,5 (**Figura 44**, **Tabela 8**). Entretanto, quando medimos a atividade hidrólise na presença de bis-ANS, a hidrólise do ATP foi ~3,5 vezes maior em pH 7,5 do que em pH 6,0 (**Figura 52** e **Tabela 12**), provavelmente devido à baixa exposição dos resíduos hidrofóbicos ao solvente.

Conforme avaliado nos ensaios de interação com bis-ANS (**Figura 48 B**), observamos que ambas as proteínas apresentaram exposição dos resíduos hidrofóbicos em pH 6,0. Quando incubamos o bis-ANS com as proteínas nesse pH, houve uma maior interação do bis-ANS na região circundante do motivo Walker A, prejudicando assim a interação e hidrólise do ATP. Já em pH 7,5, houve uma menor interação do bis-ANS com as proteínas, deixando assim o motivo Walker A livre para a ligação e hidrólise do ATP.

Quando a atividade ATPásica da NS3 helicase ligada ao bis-ANS, nossos resultados demonstram que a inibição da atividade em pH 6,0 iniciou com 0,97 μ M de bis-ANS, enquanto que em pH 7,5 só iniciou com 7,8 μ M de bis-ANS (**Figura 52**). Esses dados demonstram claramente que a exposição dos resíduos hidrofóbicos em função do pH está intimamente associada com a maior atividade do ATP em pH 6,0. Para confirmarmos se a inibição do bis-ANS, em ambas proteínas é competitiva ou não, ensaios cinéticos serão realizados.

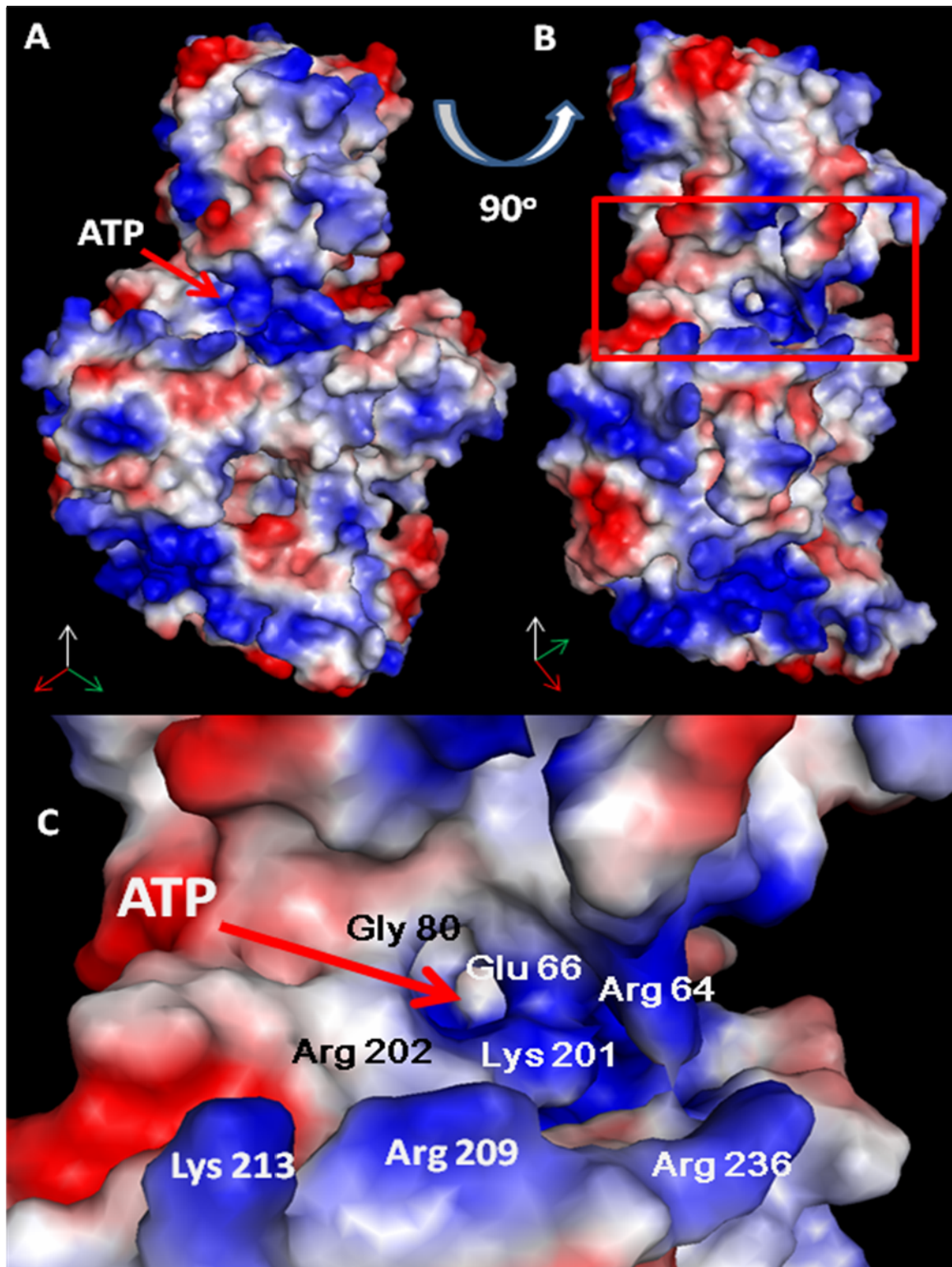


Figura 51: Visualização do potencial de superfície eletrostática da NS3 íntegra do DENV-4 (PDB: 2vbc). (A) Mostra a superfície eletrostática da CF40-NS3 íntegra, com as moléculas na mesma orientação das **Figuras 16A e 46B**, seta em vermelho demonstra a localização do sítio de ligação do ATP, (B) mostra a molécula em rotação de 90° e o retângulo em vermelho demonstrando a região ampliada no panel C; e (C) são observados os resíduos que circundam o sítio de interação ao ATP, que são os mesmos resíduos conservados no DENV-2.

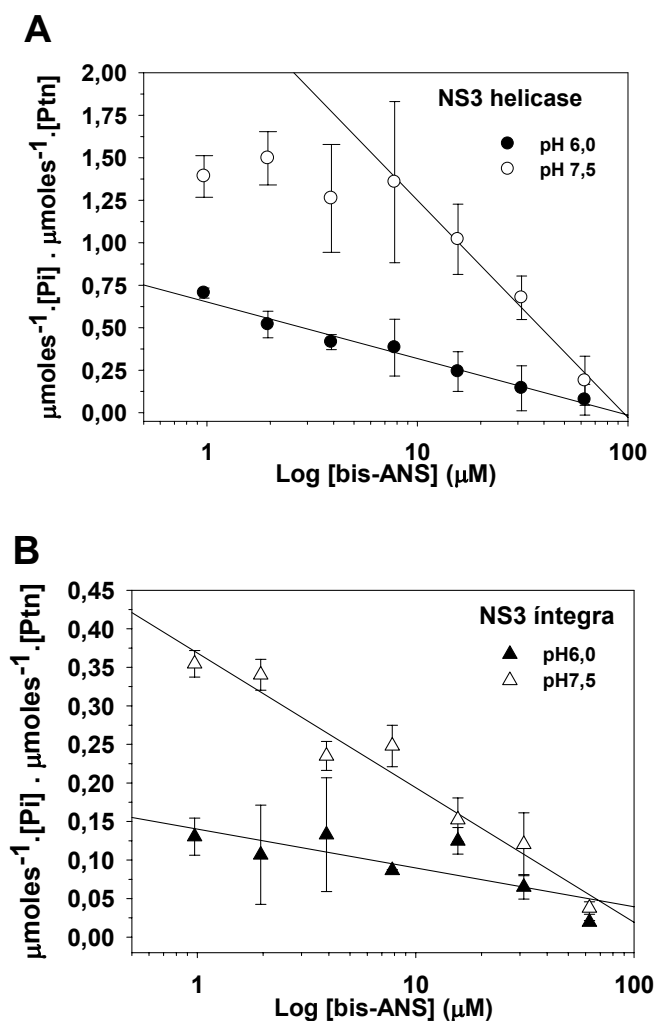


Figura 52: Análise da atividade ATPásica da NS3 helicase (A) e a NS3 íntegra (B) do DENV-2 em concentrações de bis-ANS diferentes valores de pH (6,0 e 7,5). Os ensaios de hidrólise do ATP foram avaliados utilizando 200nM da NS3 íntegra e 100nM da NS3 helicase, na presença de 0,5mM de ATP e de diferentes concentrações de bis-ANS (0,97, 1,95, 3,9, 7,8, 15,6, 31,2 e 62,5 μ M). A quantidade de Pi livre foi medida por ensaio colorimétrico após 30min de incubação a 30°C .

Tabela 12: Valores de coeficiente angular das regressões lineares dos dados da figura 52.

	Valores de coeficiente angular (μM^{-1})	
	pH 6,0	pH 7,5
NS3 íntegra	- 0,05 \pm 0,01	- 0,17 \pm 0,02
NS3 helicase	- 0,33 \pm 0,06	- 1,28 \pm 0,08

IV.9) Relevância biológica da estabilidade da NS3 helicase

Em 2004, Aizaki e colaboradores propuseram o modelo de formação do complexo de replicação (RC) do HCV nos *lipid rafts* (formados pelo colesterol e esfingolipídeos). Eles sugeriram que todas as proteínas não-estruturais do HCV seriam sintetizadas no RE, e transportadas em seguida para o complexo de Golgi onde se associariam aos *lipid rafts* (através de interações proteína-proteína e proteína-*lipid raft*) para formar uma rede de membranas (*membranous web*) no espaço perinuclear do citoplasma. Eles sugeriram também que quando esta rede retornasse para o RE, os *rafts* seriam decompostos devido à ausência de esfingolipídeos no RE, levando à liberação do RNA recém-sintetizado no citoplasma que seria então utilizado para tradução das proteínas e encapsulado pela proteína capsídica para a formação do vírus (Aizaki *et al.*, 2004).

Em 2000, Wu e colaboradores demonstraram que a cisterna do complexo de Golgi é mais ácida (pH 6,4) do que o lúmen do RE (pH 7,2). Essa variação no pH na cisterna foi associada ao complexo de enzimas v-ATPases que regulam o pH, gerando um gradiente eletroquímico. Este, por sua vez, direciona o transporte de H⁺ pela membrana, levando à acidificação de alguns compartimentos internos na célula eucariótica como: membranas de endossomas, Golgi, vesículas secretória, vacúolos ou lisossomas, e outros compartimentos do sistema de endomembranas.

Dentro deste contexto, há também relatos de que o RC do HCV poderia ser formado no RE e no Golgi, e que a rede de membranas seria afetada por membranas de ambas as organelas, sugerindo então que esta rede seria influenciada pelos pH 6,4 (Golgi) e pH 7,2 (RE) (Serafino *et al.*, 2003). Ensaios de atividades demonstraram que a NS3 helicase do HCV tem atividade ATPase máxima em pH ~6,0, levando-se à conclusão de que esta enzima é mais ativa no Golgi (Lam *et al.*, 2004). Esta

dependência da atividade em relação ao pH também foi observada para a NS3 protease do HCV, cuja atividade foi máxima em pH 8,0 (Taremi *et al.*, 1998).

No caso do DENV-2, a construção CF40-NS3Pro e a NS3 helicase apresentaram atividade enzimática máxima em pH 9,0 (**Figura 41**) e pH 6,0 (**Figura 44**), respectivamente. Portanto, é possível que estas atividades na mesma proteína sejam dependentes do estágio do ciclo de replicação e, conseqüentemente, do pH da organela em que a proteína NS3 se encontra (Lam *et al.*, 2004). Ainda com relação ao DENV, estudos têm mostrado que a proliferação hipertrófica de membranas intracelulares é uma característica proeminente das infecções por flavivírus (Rice, 1996). Foram observados que o RE rugoso de células infectadas tornam-se distendidos durante as primeiras horas da infecção, seguido do aparecimento de membranas vesiculares lisas (MVL) próximos da região perinuclear. Fortes evidências sugerem que as MVL promovam a síntese do RNA viral (Chua *et al.*, 2004).

Chua *et al.* (2004) identificaram em ensaios de duplo híbrido a interação da proteína NS3 do DENV-2 com a proteína de ligação a receptores nucleares (NRBP – *nuclear receptor binding protein*), que está associada com o tráfego do RE para o Golgi. Observou-se que a NS3 pode ser encontrada em estruturas vesiculares e que a NRBP (que se encontra no RE e Golgi) na região perinuclear de células infectadas. Eles concluíram ainda que a interação da NS3 com a NRBP afeta a distribuição intracelular desta proteína, e que isto pode ser importante para a geração de MVL e a maturação viral durante a replicação do DENV em células infectadas (Chua *et al.*, 2004).

Aizaki *et al.* (2004) demonstram que o RNA viral e as proteínas não estruturais do HCV estão associadas aos *lipid rafts* e conseqüentemente à formação do RC, ocorrendo a replicação do RNA viral dentro da rede de membranas. Essa descoberta

pode propiciar o desenvolvimento de uma nova estratégia para o controle da replicação do HCV *in vivo*. Já para o DENV é necessário confirmar se realmente o RC viral é formado por rede de membranas, como do HCV, ou por apenas pacotes de vesículas formadas pelo RE e/ou Golgi. Considerando esta segunda hipótese, avaliamos se as proteínas NS3 íntegra e NS3 helicase apresentam mudanças termodinâmicas em pH 6,4 e 7,2, realizamos experimentos de desnaturação por ureia, monitorados pela fluorescência intrínseca do Trp, de forma análoga aos realizados em pH 8,0 no item IV.2 (ver **Figuras 23 e 24**). Entretanto, a NS3 íntegra não apresentou variação significativa nas curvas de desnaturação quando submetida a pH 6,4 e 7,2 (dados não mostrados). Desta forma, os estudos a seguir foram realizados apenas para a NS3 helicase.

Comparando os valores de ΔG da NS3 helicase em pH 6,4 e 7,2 (**Figura 53**), verificamos que houve uma discreta variação do $\Delta G^{\circ}_{(H_2O)}$: o primeiro intermediário de enovelamento da proteína NS3 helicase apresentou-se mais estável em pH 7,2 ($\Delta G^{\circ}_{(H_2O)} = 2,71 \text{ kcal.mol}^{-1}$; $m = 1,17 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{M}^{-1}$) do que em pH 6,4 ($\Delta G^{\circ}_{(H_2O)} = 2,34 \text{ kcal.mol}^{-1}$; $m = 1,22 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{M}^{-1}$) (**Tabela 13**), entretanto o segundo intermediário permaneceu estável em ambas as condições de pH. A sua desnaturação por ureia também foi monitorada pela fluorescência extrínseca do bis-ANS naqueles dois valores de pH. De acordo com a **Figura 54**, a intensidade de fluorescência da NS3 helicase em pH 6,4 foi duas vezes maior que em pH 7,2, indicando uma maior exposição de resíduos hidrofóbicos naquele pH, o que explicaria a sua menor estabilidade (**Figura 54**).

Baseando-se então nesta menor estabilidade da NS3 helicase em pH 6,4, decidimos verificar se este pH também teria afetado a sua atividade de dissociação do DNA. Embora o genoma do DENV seja de RNA, utilizamos o DNA em nossas análises

para evitar a degradação daquele nucleotídeo (Benarroch *et al.*, 2004). De acordo com a **Figura 55**, a atividade helicásica da NS3 para a dissociação do DNA também foi menor em pH 6,4, sugerindo que o aumento da estabilidade do primeiro estado de enovelamento (subdomínios 1 e 2 da NS3 helicase) seja o responsável pela maior atividade helicásica em pH 7,2. Em suma, a maior exposição de seus resíduos hidrofóbicos em pH 6,4 favorece a interação e hidrólise de ATP (**Figuras 52 e 54**); enquanto que a menor exposição dos resíduos hidrofóbicos em pH 7,2 favorece o aumento da estabilidade dos subdomínios 1 e 2, que, por sua vez, favorece a dissociação da fita dupla de DNA (**Figuras 53, 54 e 55**).

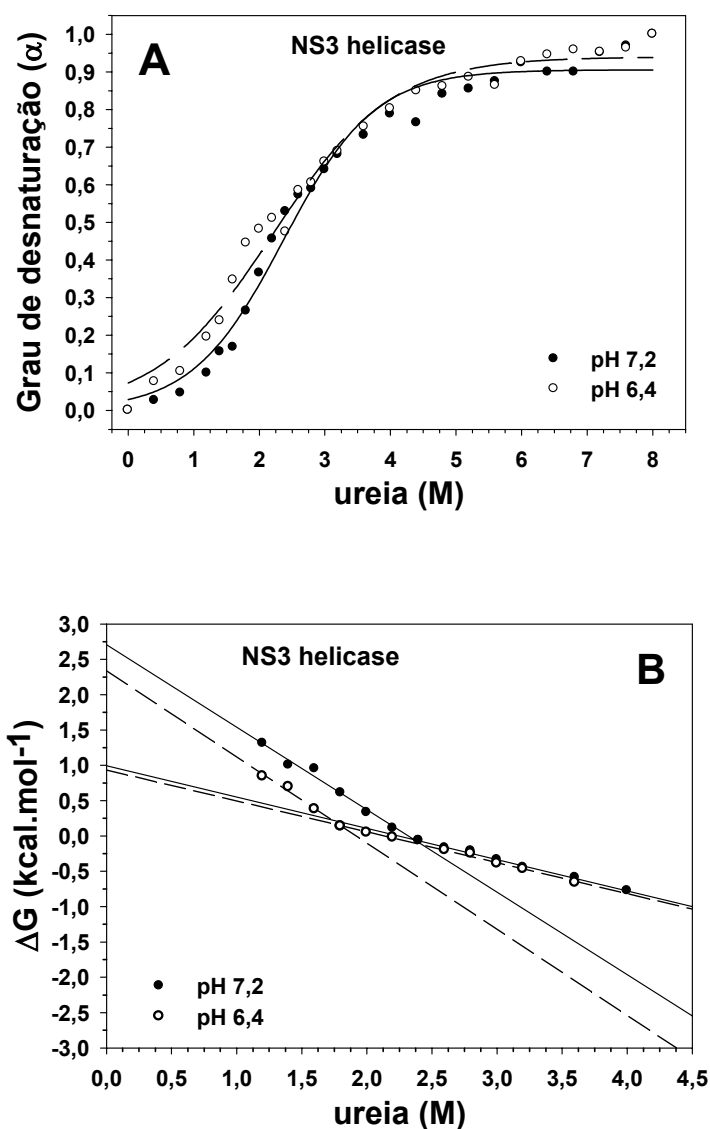


Figura 53: Curva de desnaturação da NS3 helicase por ureia em pH 6,4 e 7,2. (A) Grau de desnaturação da NS3 helicase em pHs 6,4 e 7,2; (B) valores de ΔG do após extraploção linear dos dados de intensidade de fluorescência intrínseca do Trp versus titulação de ureia Todas as análises da titulação por ureia foram realizadas nas mesmas condições de tampão (50mM de MOPS, 200mM de NaCl, 5mM de β -mercaptoetanol e 5% de glicerol), temperatura, tempo de incubação e concentração de proteína, tendo como única variável o pH (6,4 e 7,2).

Tabela 13: Parâmetros termodinâmicos de desnaturação das proteínas recombinantes NS3 helicase e NS3 íntegra em pH 6,4 e 7,2. Valores referentes aos dados da Figura 53.

<i>NS3 helicase</i>	$\Delta G^o_{(H2O)}$ (<i>kcal.mol⁻¹</i>)	<i>m</i> (<i>kcal.mol⁻¹M⁻¹</i>)	$[Ureia]_{50\% desn.}$ (<i>M</i>)	<i>r²</i>
Domínio Helicase pH 7,2 (1º Estado)	2,71	-1,17	2,23	0,99
(2º Estado)	0,99	-0,44		0,99
Domínio Helicase pH 6,4 (1º Estado)	2,34	-1,22	2,13	0,98
(2º Estado)	0,93	-0,44		0,99

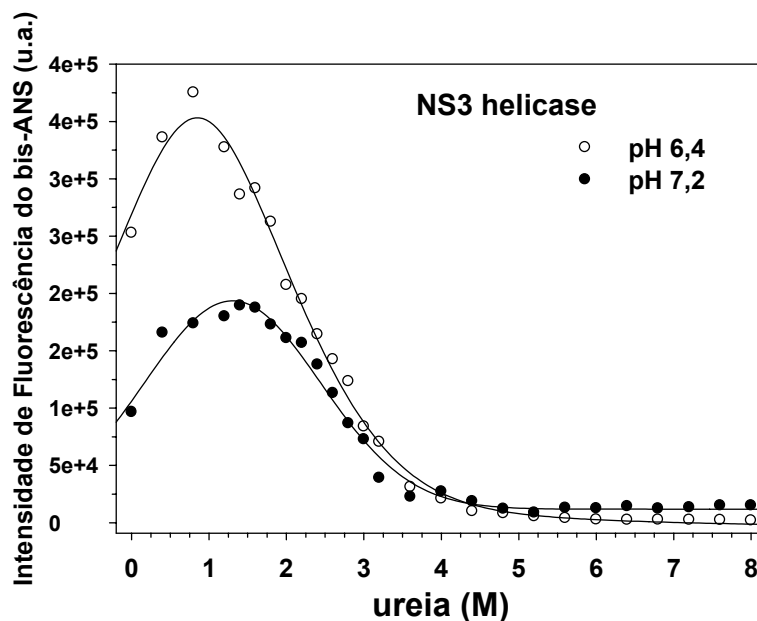


Figura 54: Espectros de emissão de fluorescência extrínseca do bis-ANS quando ligado à NS3 helicase em pHs 6,4 (o) e 7,2 (•) em função da concentração de ureia. As análises foram realizadas nas mesmas condições de tampão (50mM de MOPS, 200mM de NaCl, 5mM de β -mercaptoetanol e 5% de glicerol), 0,25 μ M proteína, 5 μ M de bis-ANS, 25°C e 1h de incubação.

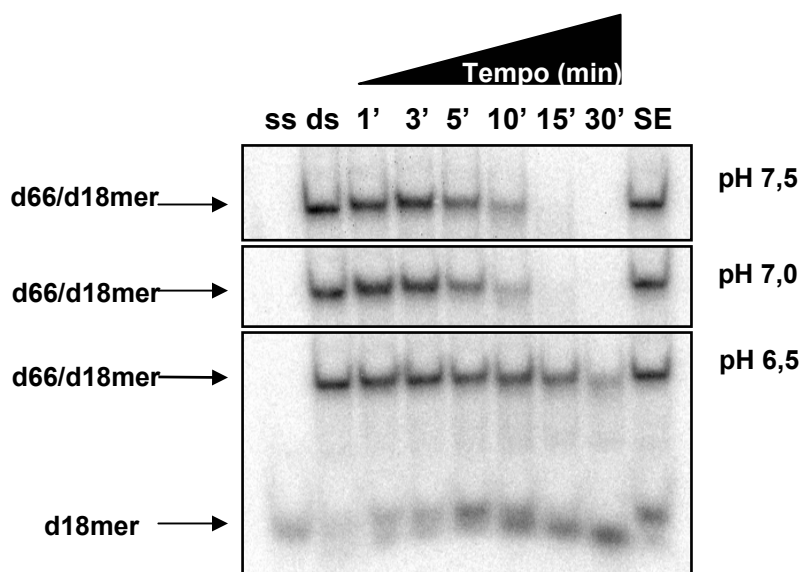


Figura 55: Ensaio de atividade helicásica do domínio NS3 helicase sobre a fita dupla de DNA. Análise do autoradiograma mostrando a dissociação parcial do oligonucleotídeo em função do tempo e pH. ss - fita simples; ds - fita dupla; SE - sem enzima.

IV.10) Sítio ATPase como potencial alvo para desenho de inibidores do DENV

Conforme relatado anteriormente, várias funções celulares necessitam de proteínas com atividade ATPásica e muitas destas proteínas têm sido associadas a infecções virais e bacterianas assim como a doenças humanas. Por isso, esta classe de proteínas tem se tornado alvo importante ao desenvolvimento racional de drogas, haja visto que, em 2002, inúmeros inibidores de ATPases já se estavam em *clinical trial* como Digoxin (Eichhorn e Gheorghide, 2002) e ICRF-193 (Hu *et al.*, 2002) para a insuficiência cardíaca e o câncer, respectivamente, ou já eram vendidos comercialmente como o Omeoprazol (Horn, 2000) e Gleevec (Traxler *et al.*, 2001). O interessante é que essas moléculas inibidoras da atividade ATPase não se ligam ao sítio de interação ao ATP mas em outros sítios alostéricos. No entanto, para se obter

um bom inibidor contra a atividade ATPásica, uma molécula deve ser capaz de competir com altas concentrações de ATP presentes na célula e deve ter uma alta seletividade devido à similaridade do sítio de ligação do ATP entre as ATPases e a outras proteínas que interagem com o ATP na célula (Cohen, 2002).

Inibidores competitivos do ATP devem imitar algumas interações feitas pelo nucleotídeo (adenosina) no sítio ativo. Portanto, é importante estudar como ocorre a interação do ATP com a ATPase, principalmente na região de ligação da adenosina. Este nucleotídeo pode interagir com a proteína através da formação de ligações de hidrogênio – tendo 2 doadores (átomos de hidrogênio na amina N6) e 3 aceptores (N1, N3 e N7) – e através de interações hidrofóbicas. Ambas as interações contribuem para a interação da enzima com o substrato (Chène, 2002). Foi observado ainda que o número e a natureza dos resíduos hidrofóbicos que circundam o anel de purina da adenosina variam amplamente entre as ATPases estudadas (Chène, 2002). E essa variação tem sido o principal alvo para o desenvolvimento de inibidores competitivos contra ATPase, impedindo assim a passagem do ATP ao sítio de ligação Walker A. Dessa forma, a seletividade de um inibidor contra a ATPase viral pode ser alcançada devido à diversidade estrutural das ATPases humanas, o que permitirá o desenho de compostos livres de fosfato que preencham a cavidade vazia da região de ligação com adenosina.

Em relação ao DENV, um dos grandes problemas no desenvolvimento de vacinas é a necessidade de que ela confira a mesma resposta imune contra os 4 sorotipos. Por outro lado, existe um grande obstáculo no desenvolvimento de compostos contra as viroses, que são as possíveis mutações em regiões de interação com o inibidor, levando conseqüentemente à resistência dos vírus à droga. Uma estratégia alternativa que deve ser utilizada no desenvolvimento de inibidores virais, é o

desenho compostos que interajam com resíduos de aminoácidos altamente conservados, já que estes resíduos têm evolutivamente uma baixa frequência mutacional, reduzindo assim os riscos de resistências virais à drogas.

Avaliando o sítio de ATPase da NS3 íntegra do DENV-4 (PDB 2vbc), observamos a presença dos resíduos R⁶⁴, E⁶⁶, G⁸⁰, K²⁰¹, R²⁰², R²⁰⁹, K²¹³ e R²³⁶, que circundam a fenda de interação do ATP e podem ser importantes para a interação da adenosina do ATP com a fenda (**Figura 51**). Estes mesmos resíduos de aminoácidos são observados no DENV-2, e por esse motivo, avaliamos se eles são também conservados entre os 4 sorotipos do DENV e entre os diversos flavivírus. Na **Figura 56**, observamos que os resíduos R⁶⁴, E⁶⁶, G⁸⁰, R²⁰⁹ e K²¹³ são idênticos entre os quatro sorotipos do DENV enquanto que os resíduos K²⁰¹, R²⁰² e R²³⁶ do DENV-2 são conservados nos outros sorotipos. Avaliamos se os resíduos na fenda ATPase são conservados em outros flavivírus a partir do alinhamento de 16 espécies da família *Flaviviridae* com os quatro sorotipos do DENV (**Figura 57**). O alinhamento demonstrou que o resíduo G⁸⁰ encontra-se conservado em todos dos membros da família, enquanto os resíduos G⁶⁶ e K²¹³ foram observados apenas nos quatro sorotipos do DENV, podendo estes resíduos serem utilizados como alvos específicos no desenho de inibidores contra dengue.

A análise do alinhamento dos resíduos 201, 202 e 209 indica uma prevalência de aminoácidos com cadeias laterais de carga positiva (K, R e H) na fenda de interação com o ATP (**Figura 57**), sugerindo a sua importância na atividade ATPásica e no processo evolutivo dos flavivírus. Já os resíduos 64 e 236, que fazem parte do domínio protease e helicase, respectivamente, apresentaram uma proximidade estrutural e uma associação filogenética bem interessante. De acordo com a árvore filogenética dos flavivírus, as flavivirose transmitidas por mosquito hematófago e por vetores

desconhecidos apresentam aminoácidos de cadeia lateral com carga positiva (R e K) em ambos os resíduos, enquanto aquelas transmitidas por artrópode hematófago (ex.: carrapato) não apresentam resíduos conservados (**Figura 58**).

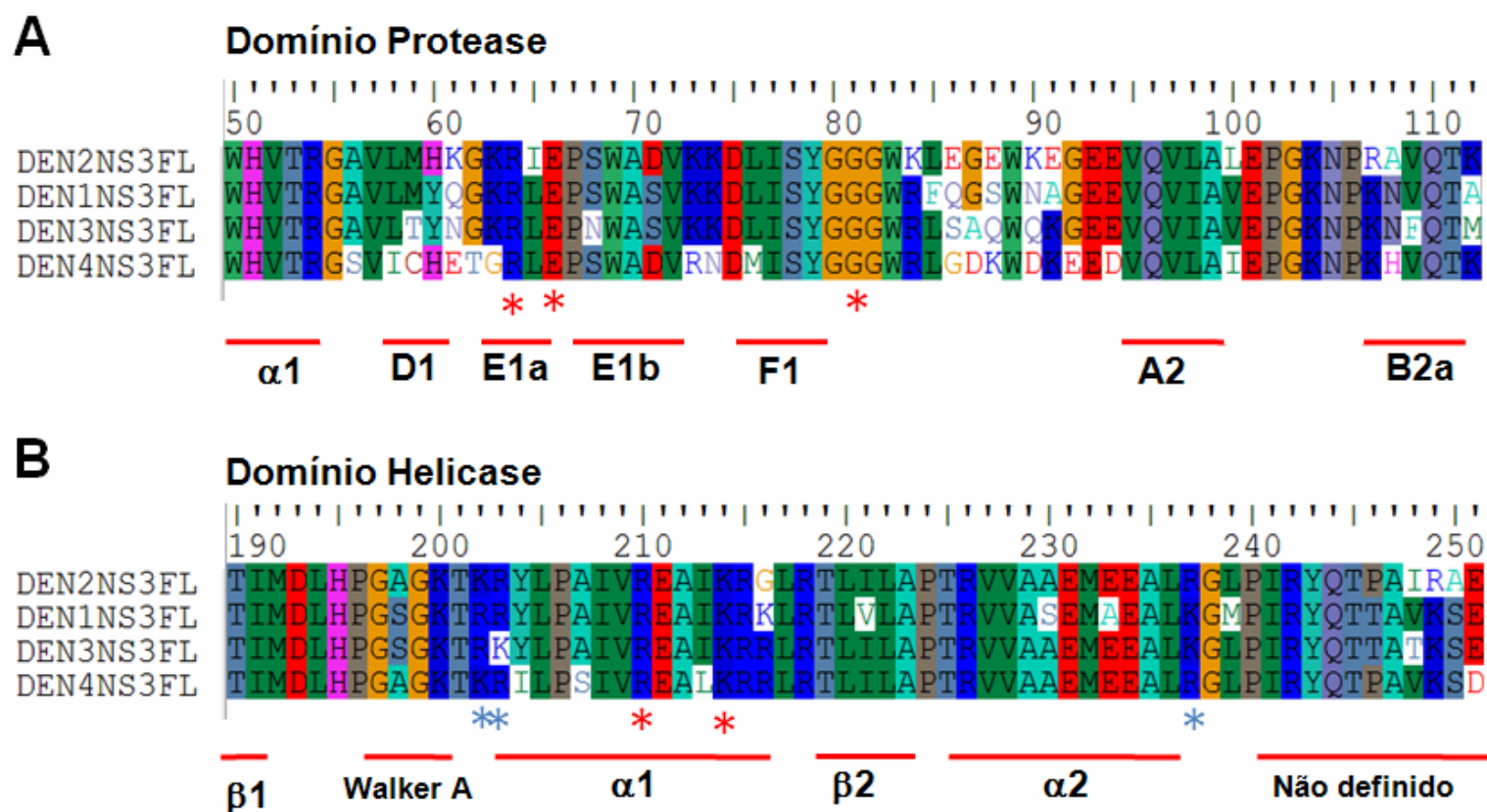


Figura 56: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da NS3 íntegra dos quatro sorotipos do DENV. (A) mostra o alinhamento do domínio protease e (B) o alinhamento do domínio helicase. Asteriscos em vermelho e azul mostram os resíduos conservados e não conservados, respectivamente, que circundam o sítio ATPase (Figura 51); elementos de estrutura secundária do domínio protease (Erbel *et al.*, 2006 – PDB 2fom) e helicase (Xu *et al.*, 2005 – PDB 2bmf) estão mostrados abaixo da seqüência. DEN1NS3FL, vírus da dengue sorotipo 1 seqüência NS3 íntegra; DEN2NS3FL, sorotipo 2; DEN3NS3FL, sorotipo 3 e DEN2NS4FL, sorotipo 4.

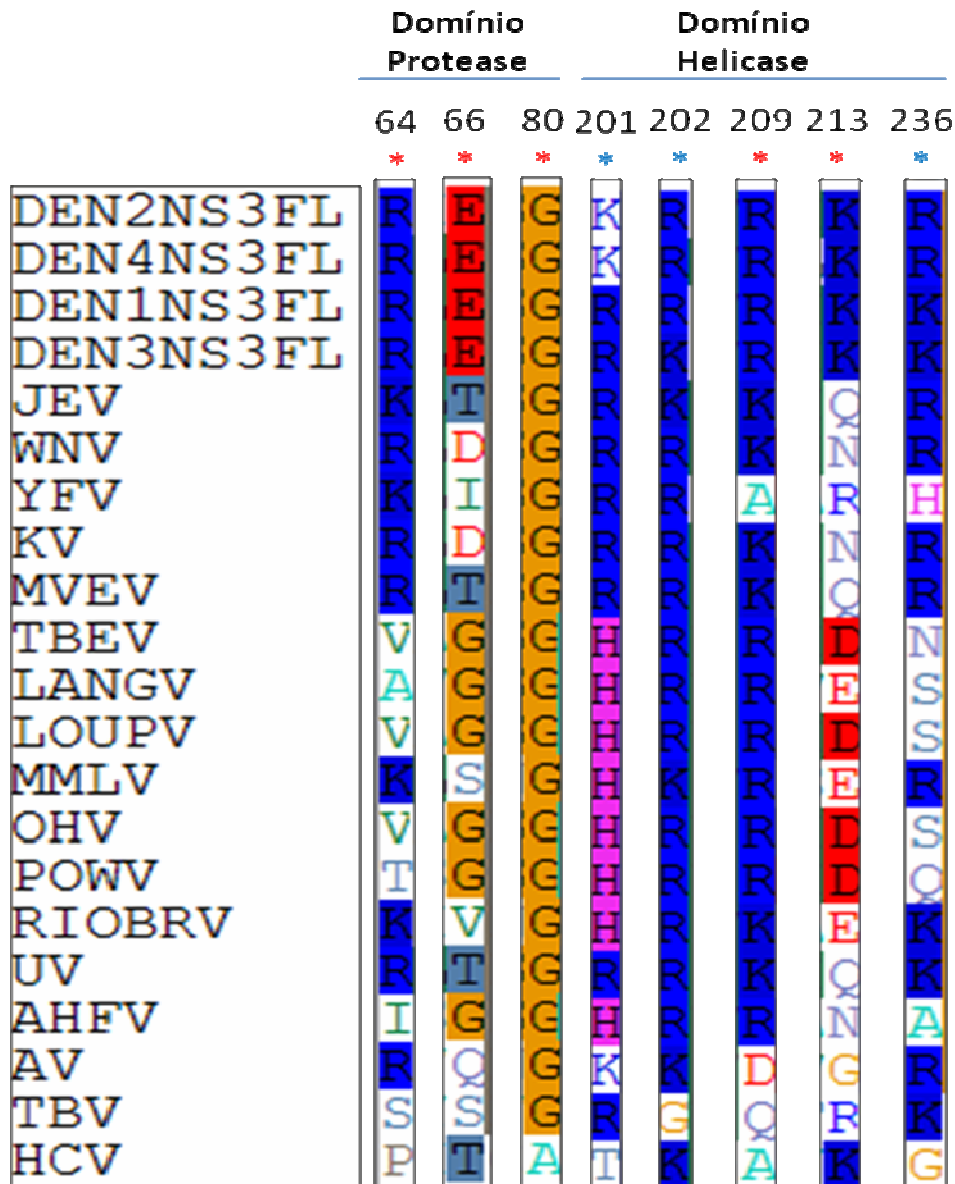


Figura 57: Alinhamento de seqüências de aminoácidos da NS3 íntegra dos quatro sorotipos do DENV e dos diversos flavivírus. Asteriscos em vermelho e azul representam os resíduos conservados e não conservados, respectivamente, que circundam o sítio ATPase; os números indicam o resíduo de aminoácido do DENV-2, e as siglas indicam os flavivírus. JEV, *Japanese encephalitis vírus*; WNV, *West Nile virus*; YFV, *Yellow fever virus*; KV, *Kunjin virus*; MVEV, *Murray valley encephalitis virus*; TBEV, *Tick-borne encephalitis virus*; LANGV, *Langat virus*; LOUPV, *Louping ill virus*; MMLV, *Montana myotis leukoencephalitis virus*; OHV, *Omsk hemorrhagic fever virus*; POWV, *Powassan virus*; RIOBRV, *Rio Bravo virus*; UV, *Usutu virus*; AHFV, *Alkhurma hemorrhagic fever virus*; AV, *Apoi virus*; TBV, *Taman bat virus*; HCV, *Hepatitis C virus* (família *Hepacivirus*).

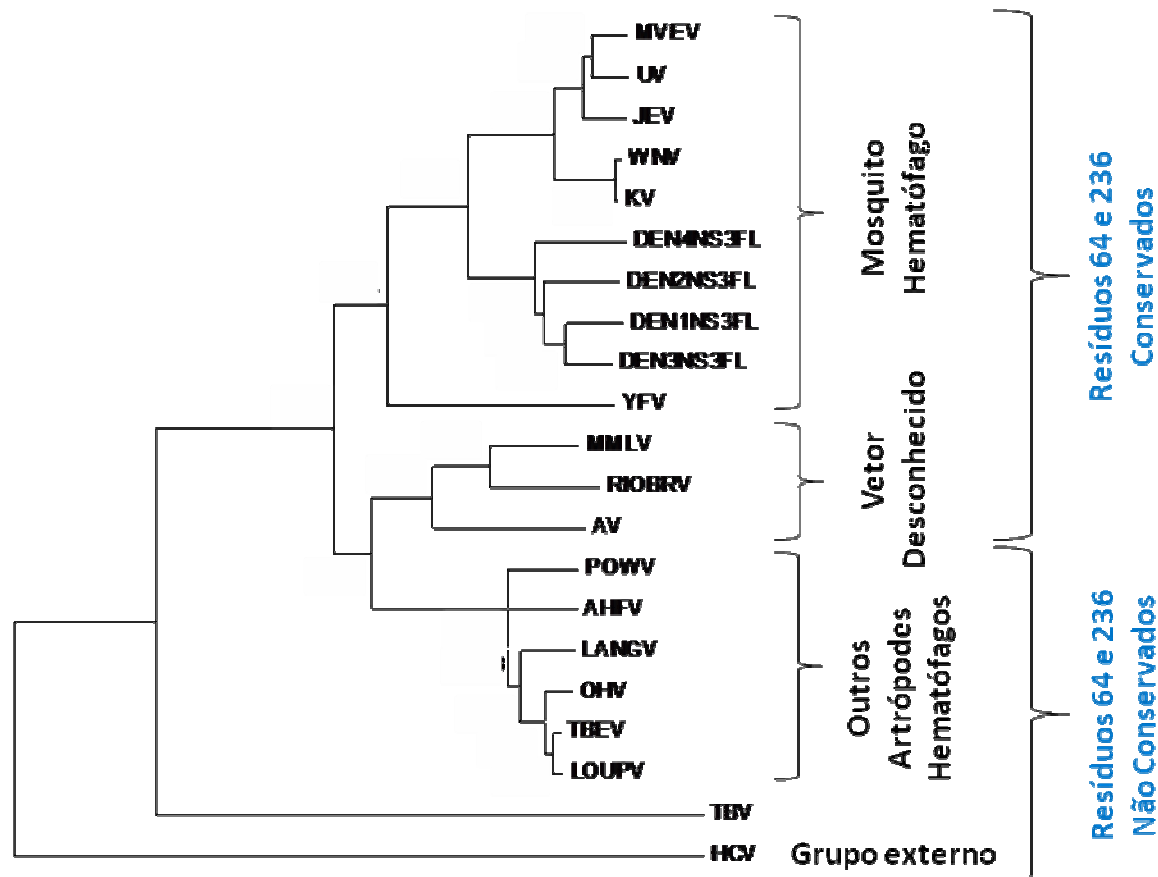


Figura 58: Árvore filogenética (parâmetro Neighbor-Joining) mostrando a relação evolutiva das sequências completas da NS3 íntegra de 16 espécies de flavivírus e dos quatro sorotipos DENV. Do lado esquerdo, as distâncias do dendograma estão representadas; a classificação filogenética dos flavivírus é mostrada na região central e do lado direito são mostrados os flavivírus que têm os resíduos 64 e 236 conservados e não conservados. HCV foi utilizado com grupo externo. As siglas estão descritas na **Figura 57**. Árvore filogenética foi construída usando-se o programa Mega 4.

Recentemente, a estrutura da NS3 íntegra do DENV-4 foi resolvida por cristalografia de raios-X e por SAXS (Luo *et al.*, 2008), sendo a primeira estrutura tridimensional da proteína NS3 íntegra de flavivírus descrita na literatura. Foi observado uma forma alongada com o domínio protease que interage com os subdomínios 1 e 2 da helicase e promove uma oclusão no sítio Walker A, favorecendo assim a interação do ATP (**Figura 16**). Contudo, Mastrangelo *et al.* (2007) calcularam por *ab initio* baseado na análise de dados obtidos por SAXS a suposta estrutura da NS3 íntegra do vírus Kunjin (KV), cuja forma também encontra-se alongada com o domínio protease interagindo com o subdomínio 1. Em um terceiro estudo, que comparou a estrutura da NS3 íntegra do DENV-4 com a do HCV, Luo *et al.* (2008) observou-se que a estrutura dos subdomínios da helicase de ambas proteínas eram similares. Porém, a posição da protease do HCV em relação ao domínio helicase era diferente da do DENV-4, por não apresentar forma alongada e por ter o domínio NS3 protease interagindo com os subdomínios 2 e 3 da helicase, deixando assim exposto o sítio ATPase (**Figura 16**).

Baseando nessas informações estruturais e os dados de alinhamento e filogenética (**Figuras 57 e 58**), verificamos que a NS3 íntegra do DENV-4 e do KV apresentam estruturas alongadas com os resíduos básicos conservados nas posições 64 e 236 (R e K), enquanto a do HCV não apresenta nenhuma destas duas características. Isso sugere que resíduos 64 e 236 possam ser importantes na topologia alongada da NS3 íntegra e, principalmente, na evolução dos flavivírus que têm como vetor de transmissão o mosquito hematófago. Devido à proximidade espacial de ambos resíduos (64 e 236) ao sítio ATPase, suspeitamos que eles sejam importantes para estabilizar a ligação da adenosina do ATP ao sítio catalítico. Já para o HCV, que apresenta este sítio exposto ao solvente (**Figura 16**), parece que eventos mutacionais nos resíduos 64 e 236 não afetam a atividade ATPásica. Assim, sugerimos

que os flavivírus, que não apresentam esses resíduos conservados, não necessitam da protease para auxiliar na interação do ATP com o domínio helicase.

O grande problema no desenvolvimento de inibidores contra o domínio helicase do HCV está associado a mudanças conformacionais transitórias que levam à aproximação e ao afastamento dos subdomínios 1 e 2 (Levin *et al.*, 2003), proporcionando uma baixa especificidade dos inibidores que se ligam na região ATPase e na fenda de dissociação do DNA (Kwong *et al.*, 2005).

Assim, ao avaliar o grau de deslocamento das estruturas da NS3 íntegra (cofator/protease/helicase) do DENV-4 (Luo *et al.*, 2008) e da NS3 helicase (sem o domínio protease) do DENV-2 (Xu *et al.*, 2005) (**Figura 59**), observamos que o subdomínio 2 da NS3 helicase do DENV-2 apresenta uma liberdade de movimentação bem maior do que os subdomínios 1 e 3. Porém, o subdomínio 2 do domínio helicásico da NS3 íntegra do DENV-4 apresentou uma leve restrição na sua movimentação, provavelmente devido à interação deste subdomínio com o domínio protease, demonstrando assim que este domínio protease estabiliza o domínio helicase. Observamos ainda que a estrutura secundária da hélice $\alpha 1$ (resíduos K²⁰², R²⁰⁹ e K²¹³) e da alça adjacente à $\alpha 2$ (resíduo R²³⁶) do subdomínio 1 da helicase do DENV-2 apresenta uma maior dinâmica quando comparada com a NS3 íntegra do DENV-4. Por outro lado, a dinâmica dos resíduos conservados (R⁶⁴, E⁶⁶ e G⁸⁰) do domínio protease, que formam o sítio de interação do ATP, é similar à dos mesmos resíduos da NS3 íntegra (**Figura 59**) e da CF40-NS3Pro (Erbel *et al.*, 2006) (não demonstrado).

Por isso, acreditamos que a disposição dos resíduos conservados e a estabilidade na NS3 íntegra (promovida pelo domínio protease) forme uma fenda estável e promissora para o desenvolvimento de inibidores que se ligam ao sítio ATPase. E com o propósito de avaliarmos se os resíduos R⁶⁴, E⁶⁶, G⁸⁰, R²⁰⁹ e K²¹³

(idênticos nos 4 sorotipos) estão na mesma orientação espacial (**Figura 60**), estudos de modelagem molecular serão realizados para compararmos a estrutura da NS3 íntegra do DENV-4 (Luo *et al.*, 2008 – PDB 2vbc) com a dos demais sorotipos da dengue.

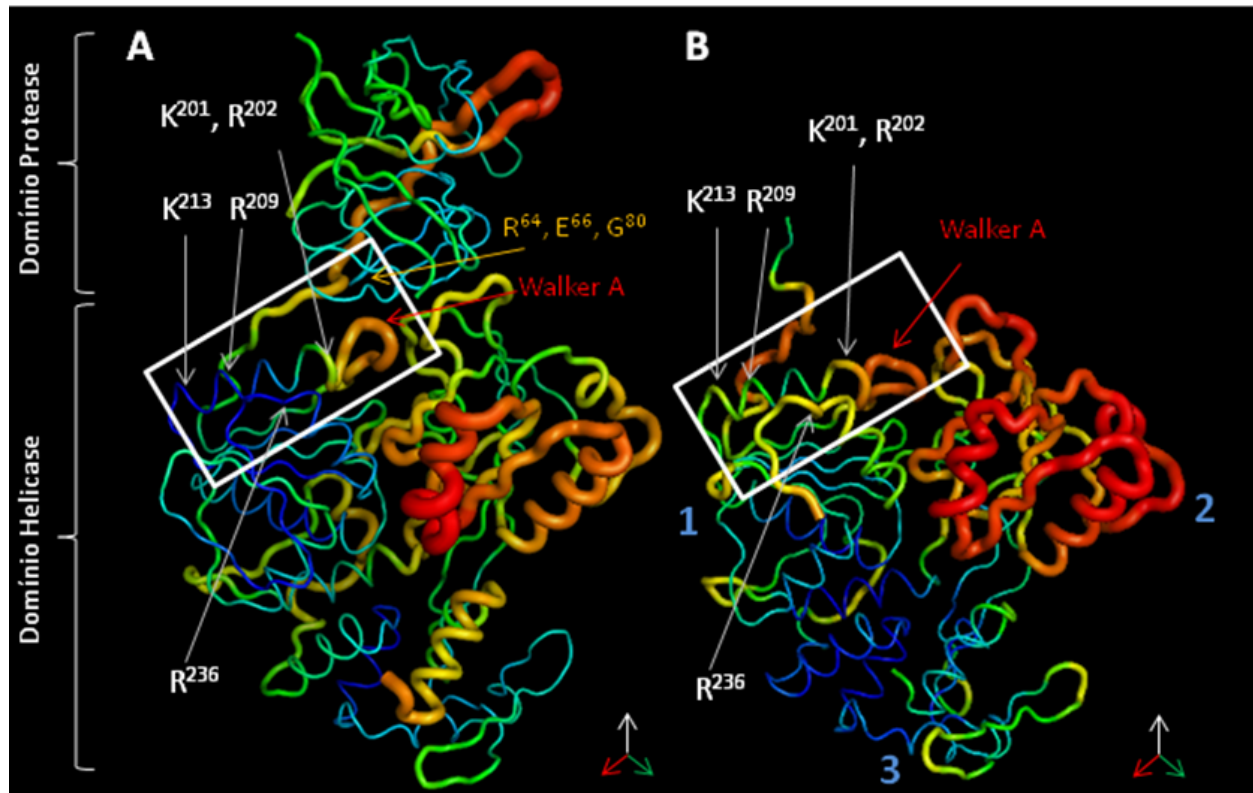


Figura 59: Análise comparativa do comportamento dinâmico da NS3 íntegra do DENV-4 com o da NS3 helicase do DENV-2 (Programa PyMol – análise *b factor putty*). É mostrada a estrutura cristalina da NS3 íntegra da DENV-4 (A) (PDB 2vbc) e da NS3 helicase do DENV-2 (PDB 2bmf) (B). O domínio helicase de ambas as proteínas encontra-se na mesma orientação e os números em azul mostram os subdomínios da helicase. O retângulo em branco indica a localização dos resíduos conservados na estrutura que formam a fenda de interação com o ATP. As regiões de melhor resolução são mostradas em diâmetro fino na cor azul, indicando maior estabilidade; à medida que espessura aumenta, a resolução é menor devido à dinâmica da cadeia polipeptídica, sendo as estruturas na cor amarela e vermelha regiões de mobilidade intermediária e alta, respectivamente. Setas em branco indicam a localização dos resíduos conservados na estrutura do domínio helicase; seta em vermelho, a do motivo Walker A; e seta em laranja a dos resíduos conservados no domínio prótese. A orientação das estruturas encontra-se no canto inferior direito.

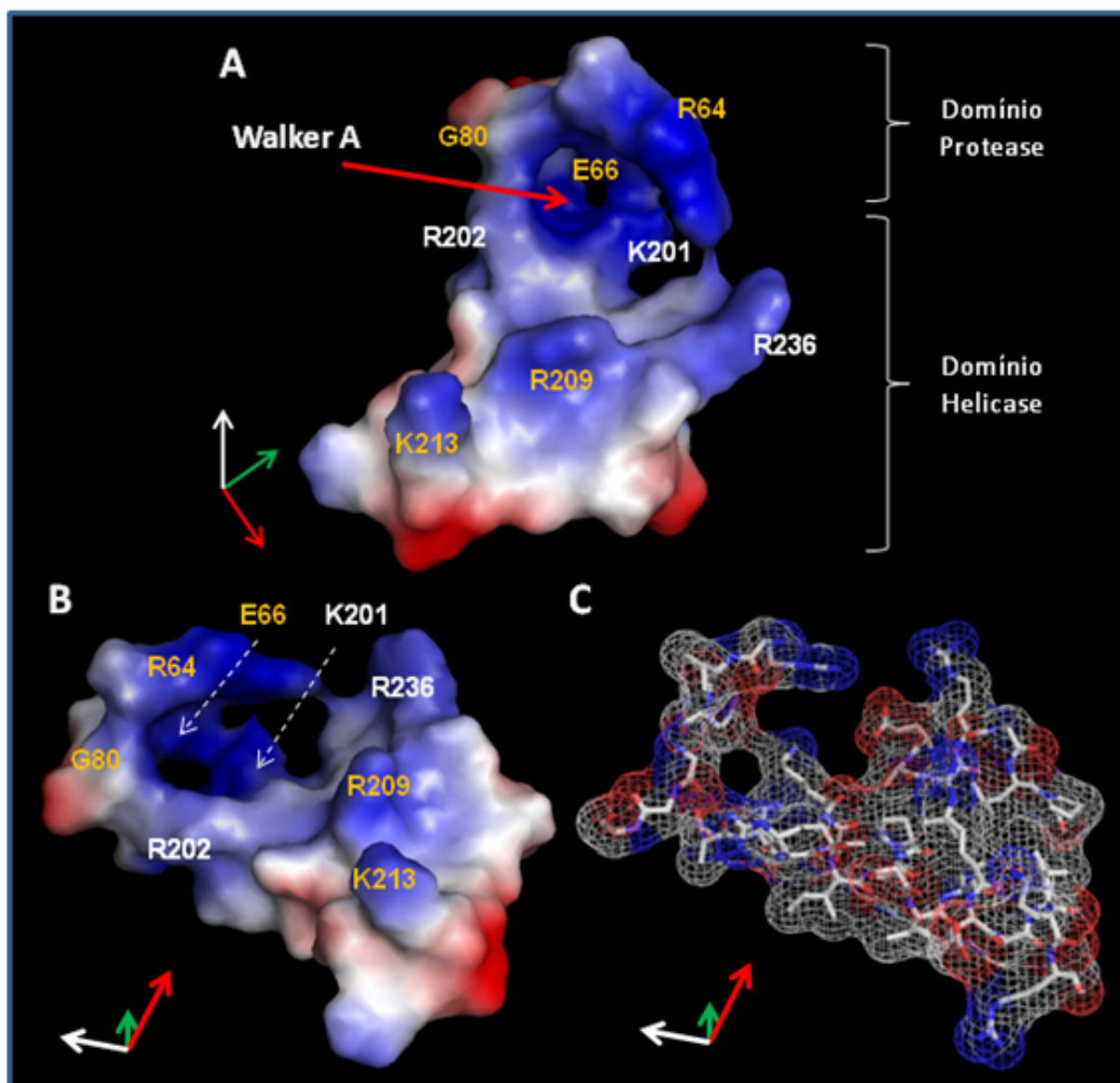


Figura 60: Potencial de superfície eletrostática do sítio de interação ao ATP da NS3 helicase do DENV-4 (PDB 2vbc). Três visualizações do potencial de superfície onde (A) moléculas estão representadas na mesma orientação da **Figura 51C**, sendo visualizados apenas os resíduos conservados da DENV-2 e DENV-4; (B) visualização das moléculas do painel A em uma rotação diferente; e (C) representação da estrutura em *mesh*. Potenciais positivos estão em azul, os negativos em vermelho e os neutros em branco; aminoácidos em laranja indicam os resíduos conservados e em branco os não conservados nos 4 sorotipos.

Ao contrário da NS3 íntegra do HCV que apresenta o sítio ATPase exposto, acreditamos que a fenda de interação ao ATP do DENV possa ser um promissor alvo para inibidores contra atividade NTPase/helicase, por apresentar as características adequadas como: i) fenda de interação ao ATP com resíduos conservados nos 4 sorotipos; ii) resíduos conservados situados em estruturas secundárias estáveis (de reduzida dinâmica); iii) região da proteína que interage com a adenosina do ATP; e iv) estrutura 3D da NS3 íntegra para os ensaios de *docking*.

É importante ressaltar que o processo de replicação do DENV deve ser bem elucidado, principalmente no que se refere à localização e formação do complexo de replicação. Observamos termodinamicamente que o domínio NS3 helicase em pH 6,4 apresentou maior interação e hidrólise do ATP, devido a uma maior hidrofobicidade dos subdomínios 1 e 2. Contudo, em pH 7,2, os subdomínios 1 e 2 da helicase apresentaram maior estabilidade devido à menor exposição dos resíduos hidrofóbicos, o que levou a menor interação e hidrólise do ATP. Havendo a confirmação de que o complexo de replicação do DENV seja semelhante ao do HCV, poderemos ter a NS3 do DENV funcionando com diferentes níveis de atividade ATPásica devido às condições de pH das organelas envolvidas no processo de replicação viral (Golgi - pH 6,4; RE - pH7,2). Além do mais, o bis-ANS inibiu 4 vezes mais a hidrólise do ATP em pH6,0 do que em pH 7,5. Isso pode ser um problema no desenho dos inibidores, pois a droga além de conferir inibição contra os 4 sorotipos, terá que apresentar a mesma eficiência de inibição em diferentes condições de pH. Enfim, muitas questões precisam ainda ser respondidas para a melhor compreensão da maquinária de replicação do DENV.

V) CONCLUSÕES

Neste trabalho, verificamos pelos ensaios de fluorescência que a NS3 helicase apresentou uma maior ΔCM e uma menor exposição dos resíduos de Trp do que a NS3Pro185aa e a NS3 íntegra, sugerindo que o domínio helicase é mais compacto. Observamos também que o domínio helicase apresentou intermediários de enovelamento nos subdomínios 1 e 2. Estes dados foram obtidos por comparação dos perfis de desnaturação da NS3 helicase do HCV com o da DENV-2. A NS3 íntegra, por outro lado apresentou menor nível de intermediário de enovelamento e isto aliado aos baixos valores de LS obtidos quando variamos o pH, sugerem que o domínio protease estabilize o domínio helicase.

Ainda, avaliando a NS3 protease com e sem o segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵, observamos que a construção NS3Pro168aa encontra-se parcialmente desenovelada apresentando $\Delta G^{\circ}_{(H_2O)}$ 3,5 vezes menor do que a NS3Pro185aa. Contudo, a construção sem o referido segmento apresentou maior interação e atividade proteolítica com o cofator NS2BCF40 do que a NS3Pro185aa. Isso sugere a importância do segmento E¹⁶⁹-K¹⁸⁵ na modulação da interação, atividade e estabilidade do domínio NS3 protease. Além disso, estudos têm demonstrado que a atividade deste domínio é dependente do cofator NS2B. Assim, comparando a construção CF40-NS3Pro185aa com a NS3Pro185aa observamos que o cofator NS2B fornece maior estabilidade e cooperatividade em pH básico, além de promover modificações conformacionais que reduzem a exposição de resíduos hidrofóbicos que podem interferir na interação de resíduos dibásicos na tríade catalítica.

Avaliamos ainda se a baixa atividade de hidrólise do ATP da NS3 íntegra estava associada com a oclusão do motivo Walker A pelo domínio protease. Nossos dados demonstraram que a NS3 helicase apresentou maior interação e atividade ATPásica em pH 6,0 provavelmente devido à exposição de resíduos hidrofóbicos que favorecem

a ligação do ATP à enzima. Contudo, em pH fisiológico, a interação do ATP com o motivo Walker A foi maior na NS3 íntegra, demonstrando que a localização do domínio protease sobre o subdomínio 1 e 2 da helicase não promove a oclusão do sítio ATPase.

Finalmente, no sítio ATPase da NS3 íntegra, encontram-se os resíduos conservados R⁶⁴, E⁶⁶, G⁸⁰, K²⁰¹, R²⁰², R²⁰⁹, K²¹³ e R²³⁶, que podem ser utilizados como alvo no desenvolvimento de inibidores da atividade helicase dos 4 sorotipos. Esses resultados podem conduzir a uma nova estratégia para o desenvolvimento de inibidores NTPase/helicase contra os flavivírus.

V) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizaki H., Lee K.J., Sung V.M.H., Ishiko H., and Lai M.M.C. (2004) Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology*. 324:450-461.
- Angelo P.F., Lima A.R., Alves F.M., Blaber S.I., Scarisbrick I.A., Blaber M., Juliano L and Juliano M.A. (2006). Substrate specificity of human kallikrein 6: salt and glycosaminoglycan activation effects. *J. Biol. Chem.* 281: 3116-3126.
- Arias C.F., Preugschat F., and Strauss J.H. (1993). Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology*. 193:888–899.
- Bartelma G., and Padmanabhan R. (2002). Expression, purification, and characterization of the RNA 5V-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology*, 299(1):122–132.
- Bazan J. F., and Fletterick R. J. (1989). Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology*. 171:637-639.
- Bazan J. F., and Fletterick R. J. (1990). Structural and catalytic models of trypsin-like viral proteases. *Seminars in Virology*. 1:311-322.
- Benarroch D., Selisko B., Locatelli G.A., Maga G., Romette J.L., and Canard B. (2004). 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*, 328:208–218.
- Brinkworth R.I., Fairlie D.P., Leung D., and Young P.R. (1999). Homology model of the dengue 2 virus NS3 protease: putative interactions with both substrate and NS2B cofactor. *Journal of General Virology*. 80:1167-1177.
- Caruthers J.M., and McKay D.B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12(1):123–133.

- Chambers T. J., Weir R. C., Grakoui A., McCourt D. W., Bazan J. F., Fletterick R. J., and Rice C. M. (1990b). Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *PNAS, USA* 87:8898-8902.
- Chanprapaph S., Saparpakorn P., Sangma C., Niyomrattanakit P., Hannongbua S., Angsuthanasombat C., and Katzenmeier G. (2005). Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 330:1237-1246.
- Chen Y., Maguire T., Hileman R.E., Fromm J.R., Esko J.D., Linhardt R.J., and Marks R.M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparin sulfate. *Nat. Med.* 3:866-871.
- Chène P. (2002). ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nature Reviews Drug Discovery*. 1:665-673.
- Chua J.J.E., Ng M.M.L and Chow V.T.K. (2004) The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interactions with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus Research*. 102:151-163.
- Chiu W.W., Kinney R.M., and Dreher T.W. (2005). Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J Virol*. 79:8303–8315.
- Clum S., Ebner K.E., and Padmanabhan R. (1997). Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. *J Biol Chem*. 272(49):30715-23.
- Cohen P. (2002). Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Rev. Drug Discov.* 1:309-315.

- Cui T., Sugrue R.J., Xu Q., Lee A.K.W., Chan Y.C. and Fu J. (1998) Recombinant Dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*, 246:409-417.
- Deen J.L. (2004). Editorial: the challenge of dengue vaccine development and introduction. *Trop. Med. Inst. Health*. 9:1-3.
- Egloff M.P., Benarroch D., Selisko B., Romette J.L., and Canard B. (2002) An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO Journal*. 21(11):2757-2768.
- Eichhorn E.J., and Gheorghide M. (2002). Digoxin. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 44:251-266.
- Eisenberg D.S., and Richards F.M. (1995). Modeling Proteins Stability as Heteropolymer Collapse in: *Advances in Protein Chemistry, v.46, Protein Stability*, Academic Press, page 59-104.
- Elshuber S., Allison S.L., Heinz F.X., and Mandl C.W. (2003). Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 84(1):183-191.
- Erbel P., Schiering N., D'Arcy A., Renatus M., Kroemer M., Lim S.P., Yim Z., Keller T.H., Vasudevan S.G., and Hommel U. (2006). Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. 13(4):372-373.
- Falgout B., Pethel M., Zhang Y.M., and Lai C.J. (1991). Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of Virology*. 65:2467-2475.
- Falgout B., and Markoff L. (1995). Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 69:7232-7243.

- Falgout B., Miller R.H., and Lai C.J. (1993). Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J. Virol.* 67:2034-2042.
- Figueiredo L.T.M. (2000). The Brazilian Flaviviruses. *Microbes and Infection.* 2 1643–1649.
- Figueiredo R.M.P., Naveca F.G., Bastos M.S., Melo M.N., Viana S.S., Mourão M.P.G., Costa C.A., and Farias I.P. (2008). Dengue Virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases.* 14(4):667-669.
- Fink J., Gu F., and Vasudevan S.G. (2006). Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev. Med. Virology.* 16:263-275.
- Fiske C.H. and Subbarow Y. (1927). The Nature of the “inorganic phosphate” in voluntary muscle. *Science.* 65(1686):401-403.
- Gibbons R.V., and Vaughn D.W. (2002). Dengue: an escalating problem. *BMJ.* 324:1563-1565.
- Gorbalenya A.E., and Koonin E.V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure–function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:419–429.
- Gorbalenya A. E., Donchenko A. P., Koonin E. V., and Blinov V. M. (1989). N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Research.* 17:3889-3897.
- Gozdek A., Stankiewicz-Drogoń A., Poznański J., and Boguszevska-Chachulska A.M. (2008). Circular dichroism analysis for multidomain proteins: studies of the irreversible unfolding of Hepatitis C virus helicase. *Acta Biochim Pol.* 55(1):57-66.

- Guirakhoo F., Heinz F.X., Mandl C.W., Holzmann H., and Kunz C. (1991). Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J. Gen. Virol.* 72(6):1323-1329.
- Halstead S.B. (2007). Dengue. *Lancet.* 370:1644-1652.
- Heinz F.X., and Allison S.L. (2001). The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr. Opin. in Microbiology.* 4:450-455.
- Horn J. (2000) The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin. Ther.* 22:266-280.
- Hu T., Sage H., and Hsieh T.S. (2002). ATPase domain of eukaryotic DNA topoisomerase II. Inhibition of ATPase activity by the anti-cancer drug biodioxopiperazine and ATP/ADP-induced dimerization. *J. Biol. Chem.* 277:5944-5951.
- Innis B.L. and Eckels K.H. (2003). Progress in development of a live-attenuated, tetravalent dengue virus vaccine by the United States Army Medical Research and Materiel Command. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69(suppl 6):1-4.
- Khromykh A.A., Sedlak P.L., and Westaway E.G. (1999). Trans-complementation analysis of the flavivirus Kunjin NS5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. *Journal of Virology,* 73(11):9247-9255.
- Kim J.L., Morgenstern K.A., Griffith J.P., Dwyer M.D., Thomson J.A., Murcko M.A., Lin C., and Caron P.R. (1998). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure.* 6:89-100.
- Kwong A.D., Roa B.G., and Jeang K.T. (2005). Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nature Reviews Drug Discovery.* Published online doi:10.1038/nrd1853.

- Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann M.G., Pletnev S.V., Corver J., Lenches E., *et al.* (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 108:717-725.
- Lakowicz J.R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd edition, Plenum Publisher, New York, 10013.
- Lai V.C., Dempsey S., Lau J.Y., Hong Z., and Zhong W. (2003). In vitro RNA replication directed by replicase complex isolated from the subgenomic replicon cells of hepatitis C virus. *J. Virol.* 77:2295-2300.
- Lam A.M.I., Rypma RS and Frick DN. (2004). Enhancer nucleic acid binding to ATP-bound hepatitis C virus NS3 helicase at low pH activates RNA unwinding. *Nucleic Acids. Research*, 32(13):4060-4070.
- Leung D., Schroder K., White H., Fang N.X., Stoermer M.J., Abbenante G., Martin J.L., Young P.R. and Fairlie D.P. (2001). Activity of Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Protease in the Presence of a Truncated NS2B Co-factor, Small Peptide Substrates, and Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49):45762–45771.
- Levin M.K., Gurjar M.M., and Patel S.S. (2003). ATP binding modulates the nucleic and affinity of hepatitis C virus helicase. *J. Biol. Chem.* 278:23311-23316.
- Li J., Lim S.P., Beer D., Patel V., Wen D., Tumanut C., Tully D.C., Williams J.A., Jiricek J., Priestle J.P. *et al.* (2005) Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. *J. Biol. Chem.* 280:28766–28774.
- Li L., Lok S.M., Yu I.M., Zhang Y., Kuhn R.J., Chen J., and Rossmann M.G. (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*. 319(5871):1830-1834.

- Lineweaver H and Burk D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56:658.
- Lobigs M. (1993). Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:6218–6222.
- Locatelli G.A., Spadari S., and Maga G. (2002). Hepatitis C virus NS3 ATPase/helicase: an ATP switch regulates the cooperativity among the different substrate binding sites. *Biochemistry.* 41(32):10332-10342.
- Lorenz I.C., Allison S.L., Heinz F.X., and Helenius A. (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 76:5480–5491.
- Luo D., Xu T., Hunke C., Grüber G., Vasudevan S.G., and Lescar J. (2008). Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. *Journal of Virology,* 82(1):173–183.
- Mastrangelo E., Milani M., Bollati M., Selisko B., Peyrane F., Pandini V., Sorrentino G., Canard B., Konarev P.V., Svergun D.I., de Lamballerie X., Coutard B., Khromykh A.A., and Bolognesi M. (2007). Crystal structure and activity of Kunjin virus NS3 helicase; protease and helicase domain assembly in the full length NS3 protein. *JMB.* 372(2):444-55.
- Matulis D., and Lovrien R. (1998). 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophys. J.* 74:422-429.
- Melino S., and Paci M. (2007). Progress for dengue virus diseases toward the NS2B-NS3Pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FESB Journal.* 274:2986-3002.
- Miagostovich M.P., Santos F.B., Furnian T.M., Guimarães F.R., Costa E.V., Tavares F.N., *et al.* (2006). Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus

- type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101(3):307-313.
- Mukhopadhyay S., Kuhn R.J., and Rossmann M.G. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology.* 3:13-22.
- Murthy H.M.K., Clum S., and Padmanabhan R. (1999). Dengue Virus NS3 Serine Protease. Crystal Structure and Insights into Interaction of the active site with substrates by Molecular Modeling and Structural analysis of Mutational Effects. *The Journal of Biological Chemistry.* 274(9):5573–5580.
- Navarro-Sanchez E., Altmeyer R., Amara A., Schwartz O., Fieschi F., Virelizier J.L., Arenzana-Seisdedos F., and Desprès P. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4(7):723-728.
- Neves D.P., Melo A.L., Genaro O., and Linardi P.M. (2000). Culicidae in Parasitologia Humana, Ed. Atheneu, 10ª edição, Capítulo 43:320-333.
- Nogueira R.M.R, Miagostovich M.P., Lampe E., Souza R.W., Zagne S.M.O., Schatzmayr H.G. (1993). Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1991: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect.* 111(1):163-170.
- Nogueira R.M.R., Araújo J.M.G., and Shatzmayr H.G. (2007). Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev. Panam. Salud Public / Pan. Am. J. Public Health.* 22(5):358-362.
- Osanaí C.H., Travassos-da-Rosa A.P.A., Tang A.T., do-Amaral R.S., Passos A.D., and Taill P.L. (1998). Surto de dengue em Boa Vista em Roraima. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* 25(1):53-54.
- Oya A., and Kurane I. (2007). Japanese encephalitis for a reference to international travelers. *J. Travel Med.* 14:259-268.

- Pang T. (2003). Vaccines for the prevention of neglected diseases – dengue fever. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:332-336.
- Perera R., Khaliq M., and Kuhn R.J. (2008). Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Research. IN PRESS.*
- Pokidysheva E., Zhang Y., *et al.* (2006). Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell.* 124(3):485-493.
- Preugschat F., Yao C.W., and Strauss J.H. (1990). In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B, and NS3. *J. Virol.* 64:689-697.
- Ramos C. (1989). Biología de la infección causada por el virus del dengue. *Salud Públ. Méx.* 31:54-72.
- Rice C.M. (1996). Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields B., Knipe D., and Howley P. (Eds.), *Fields Virology*, 3rd ed, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 931-959.
- Rost B. (1996). PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* 266:525-539.
- Sambrook J., and Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3rd edition, Cold Spring Harbor, New York.
- Serafino A., Valli M.B., Andreola F., Crema A., Ravagnan G., Betoline L., and Carloni G. (2003). Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro. *Journal of Medical Virology.* 70:31-41.
- Singleton M.R., and Wigley D.B. (2002). Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. *J. Bacteriol.* 184(7):1819–1826.

- Solomon T., and Mallewa M. (2001). Dengue and other emerging flaviviruses. *Journal of Infection*. 42:104-115.
- Stadler K., Allison S.L., Schalich J., and Heinz F.X. (1997) Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 71(11):8475-8481.
- Taremi S.S., Beyer B., Maher M., Yao N., Prosis W., Weber P.C., and Malcolm B.A. (1998). Construction, expression, and characterization of a novel fully activated recombinant single-chain hepatitis C virus protease. *Protein Sci.* 7:2143-2149.
- Theiler M., and Smith H.H. (1937). Use of yellow fever virus modified by in-vitro cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* 65:787-800.
- Traxler P., Bold G., Buchdunger E., Caravatti G., Furet P., Manley P., O'Reilly T., Wood J., and Zimmermann J.. (2001). Tyrosine kinase inhibitors: from rational design to clinical trials. *Med. Res. Rev.*, 21:499-512.
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., and Gay N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8):945–951.
- Weissmann G. (2008). Dengue fever in Rio: Macumba versus Voltaire. *The FASEB Journal*. 22:2109-2112.
- Wengler G. (1993). The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology*. 197:265–273.
- Wengler G., and Wengler G. (1991). The carboxy-terminal part of the NS3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology*. 84:707-715.

- Wu M.M., Llopis J, Adams S., McCaffery J.M., Kulomaa M.S., Machen T.E., Moore H.P.H., and Tsien R.Y. (2000). Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein–biotin. *Chemistry and Biology*, 7(3):197–209.
- Xu T., Sampath A., Chão A., Wen D., Nanao M., Chene P., Vasudevan S.G., and Lescar J. (2005). Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4Å. *Journal of Virology*. 79(16)10278-10288.
- Yan Y., Li Y., Munshi S., Sardana V., Cole J.L., Sardana M., Steinkuehler L., Tomei L., De-Francesco R., Kuo L.C., and Chen Z. (1998) Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: 2.2Å resolution structure in hexagonal crystal form. *Protein Sci.* 7:837-847.
- Yao N., Hesson T., Cable M., Hong Z., Kwong A.D., Le H.V., and Webber P.C. (1997). Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nat. Struct. Biol.* 4(6):463-467.
- Yao N., Reichert P., Taremi S.S., Prosser W.W., and Weber P.C. (1999). Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure*. 7:1353-1363.
- Zeng L., Falgout B., and Markoff L. (1998). Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3'-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication. *J Virol*. 72: 7510–7522.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)