

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

ANA THERESA SILVEIRA DE MORAIS

“CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA NS5 DO VÍRUS DA
FEBRE AMARELA E EIF3L”

São José do Rio Preto-SP
2012

ANA THERESA SILVEIRA DE MORAIS

**“CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA NS5 DO VÍRUS DA
FEBRE AMARELA E EIF3L”**

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, área de concentração Virologia, junto ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**São José do Rio Preto-SP
2012**

Morais, Ana Theresa Silveira de

Caracterização da interação entre a proteína NS5 do vírus da febre amarela e eIF3L / Ana Theresa Silveira de Moraes. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

145 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maurício Lacerda Nogueira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Febre Amarela. 2. NS5. 3. eIF3L. I. Nogueira, Maurício Lacerda. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 578

ANA THERESA SILVEIRA DE MORAIS

**“CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA NS5 DO VÍRUS DA
FEBRE AMARELA E EIF3L”**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, área de concentração Virologia, junto ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli
UNESP – FCFAR – Araraquara

Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto
USP – FMRP – Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Luciana Barros de Arruda
UFRJ – Rio de Janeiro

São José do Rio Preto, 10 de agosto de 2012

Sumário

1. Introdução	25
1.1. Febre amarela – Considerações gerais	25
1.2. <i>Flavivirus</i> – Aspectos estruturais e de replicação	30
1.3. Interações proteína-proteína entre NS5 e proteínas celulares.....	34
1.4. Proteínas relacionadas a NS5 através do ensaio de duplo híbrido.....	36
1.5. Proteína eIF3L.....	40
1.6. Relevância e Justificativa.....	42
2. Objetivos.....	45
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	45
3. Materiais e Métodos.....	47
3.1. Confirmação da interação NS5-eIF3L (<i>plasmid linkage</i>).....	47
3.1.1 Construção da isca RNAPol-pGBKT7.....	47
3.1.2. Transformação em levedura da isca do duplo-híbrido.....	49
3.1.3. Transformação em levedura da presa do duplo-híbrido.....	50
3.1.4. Transformação de plasmídeos controle em levedura.....	51
3.1.5. Teste de ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i>	52
3.2. Mapeamento do domínio de interação com RNA polimerase.....	52
3.2.1. Construção das iscas RNAPol deletantes.....	52
3.2.2. Análise em duplo-híbrido com as iscas RNAPol deletantes.....	53
3.2.3. Confirmação da interação entre o Domínio de Interação e a proteína eIF3L.....	54
3.2.4. Modelo Estrutural da proteína RNA polimerase.....	54

3.2.5. Mapeamento do Domínio de Interação com eIF3L.....	54
3.2.6. Interação de ID de outros <i>Flavivirus</i> com a proteína eIF3L.....	55
3.2.7. Mapeamento de resíduos críticos do Segmento 3 do Domínio de Interação.....	56
3.2.7.1. Construção do plasmídeo molde para mutagênese.....	57
3.2.7.1.1. Reação de Ligação.....	58
3.2.7.1.2. Transformação em células competentes <i>E. coli</i> DH5 α	59
3.2.7.1.3. Análise dos transformantes.....	59
3.2.7.1.4. Extração de DNA plasmidial recombinante.....	59
3.2.7.1.5. Inserção de mutações no plasmídeo molde.....	60
3.2.7.1.6. Transformação em células competentes <i>XL1-Blue</i> ..	61
3.2.7.1.7. Análise dos Transformantes.....	61
3.2.7.1.8. Extração de DNA plasmidial recombinante.....	61
3.2.7.1.9. Sequenciamento nucleotídico.....	61
3.2.7.2. Recombinação dos plasmídeos mutantes no vetor pGBKT7..	62
3.2.7.2.1. Ensaio de Restrição Enzimática.....	62
3.2.7.2.2. Reação de Ligação.....	62
3.2.7.2.3. Transformação em células competentes <i>E. coli</i> DH5 α	62
3.2.7.2.4. Análise dos transformantes.....	63
3.2.7.2.5. Extração de DNA plasmidial recombinante.....	63
3.2.7.2.6. Sequenciamento nucleotídico.....	63
3.2.7.3. Transformação em levedura dos plasmídeos mutantes (iscas) no duplo-híbrido.....	63

3.2.7.4. Transformação em levedura da presa eIF3L-pACT2 no duplo híbrido	64
3.2.7.5. Teste de ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i>	65
3.3. Confirmação da interação NS5-eIF3L <i>in vitro</i> (GST-pull down).....	65
3.3.1. Construção dos plasmídeos.....	65
3.3.2. Expressão de proteínas.....	66
3.3.3. Purificação de ID-GST e GST.....	66
3.3.4. GST-pulldown.....	67
3.4. Confirmação da interação NS5-eIF3L em culturas celulares.....	69
3.4.1. Co-Imunoprecipitação.....	69
3.5 Avaliação do efeito da superexpressão de eIF3L na replicação do vírus da Febre Amarela em cultura celular.....	70
3.5.1. Superexpressão de eIF3L.....	70
3.5.2. Ensaios de Atividade de Luciferase.....	71
3.5.3. <i>Western blotting</i>	71
3.6. Expressão e purificação da proteína eIF3L.....	71
3.6.1. Construção do plasmídeo.....	71
3.6.1.1. Amplificação do gene da proteína eIF3L.....	71
3.6.1.2 Ensaios de Restrição Enzimática.....	73
3.6.1.3. Reação de Ligação.....	73
3.6.2. Transformação em células competentes <i>E. coli</i> DH5 α	73
3.6.3. Análise dos transformantes.....	74
3.6.3.1. Triagem por PCR.....	74
3.6.3.2. Extração de DNA plasmidial recombinante.....	74
3.6.3.3. Sequenciamento nucleotídico.....	74

3.6.4. Transformação em células competentes <i>E. coli</i> BL(DE3)21.....	75
3.6.5. Análise dos Transformantes.....	75
3.6.6. Testes de expressão e solubilização da proteína recombinante	76
3.6.7. Expressão e solubilização da proteína recombinante em grande es- cala.....	77
3.6.8. Purificação em cromatografia de afinidade da proteína recombinante..	78
3.6.9. Testes de concentração e diálise de eIF3L purificada.....	78
3.6.10. Ensaio espectroscópico – <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	79
3.6.11. Purificação em cromatografia de gel filtração de eIF3L.....	79
3.7. Dicroísmo circular (CD).....	80
3.8. Análise estrutural de eIF3L por ferramentas computacionais.....	81
4. Resultados.....	84
4.1. Confirmação da interação NS5-eIF3L (<i>plasmid linkage</i>).....	84
4.1.1. Construção da isca RNAPol-pGBKT7.....	84
4.1.2. Transformação em levedura da isca do duplo-híbrido.....	84
4.1.3. Transformação em levedura da presa do duplo-híbrido.....	84
4.1.4. Transformação de plasmídeos controle em levedura.....	85
4.1.5. Teste de ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i>	85
4.2. Mapeamento do domínio de interação com RNA polimerase.....	88
4.2.1. Construção das iscas RNAPol deletantes.....	88
4.2.2. <i>Screening</i> em duplo-híbrido com as iscas RNAPol deletantes.....	88
4.2.3. Confirmação da interação entre o ID e a proteína eIF3L.....	90
4.2.4. Modelo Estrutural da proteína RNA polimerase.....	92
4.2.5. Mapeamento do domínio mínimo de interação de ID com eIF3L.....	93

4.2.6. Interação do ID de outros <i>Flavivirus</i> com a proteína eIFL.....	95
4.2.7. Mapeamento de resíduos críticos do segmento 3 do ID.....	98
4.2.7.1. Construção do plasmídeo molde para mutagênese.....	98
4.2.7.1.1. Análise dos Transformantes.....	98
4.2.7.2. Inserção de Mutações no plasmídeo molde.....	99
4.2.7.2.1. Análise dos Transformantes.....	99
4.2.7.2.2. Sequenciamento nucleotídico.....	99
4.2.7.3. Recombinação dos plasmídeos mutantes no vetor pGBKT7..	100
4.2.7.3.1. Análise dos Transformantes.....	100
4.2.7.4. Transformação em levedura dos plasmídeos mutantes (iscas) no duplo-híbrido.....	100
4.2.7.5. Transformação em levedura da presa eIF3L-pACT2 no duplo-híbrido.....	100
4.2.7.6. Teste de ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i>	100
4.3. Confirmação da Interação NS5-eIF3L <i>in vitro</i> (GST-pulldown).....	103
4.3.1. Construção dos plasmídeo.....	103
4.3.2. Expressão de proteínas.....	103
4.3.3. Purificação de ID-GST e GST.....	104
4.3.4. GST-pulldown.....	105
4.4. Confirmação da interação NS5-eIF3L em culturas celulares.....	106
4.4.1. Co-Imunoprecipitação.....	106
4.5. Avaliação do efeito da superexpressão de eIF3L na replicação do vírus da Febre Amarela em cultura celular.....	108
4.5.1. Superexpressão de eIF3L e ensaios de atividade de luciferase.....	108
4.6. Expressão e Purificação da proteína eIF3L.....	110

4.6.1. Amplificação do gene da proteína eIF3L.....	110
4.6.2. Ensaios de Restrição Enzimática.....	110
4.6.3. Análise dos Transformantes.....	110
4.6.4. Sequenciamento nucleotídico.....	111
4.6.5. Transformação em células competentes <i>E. coli</i> BL(DE3)21.....	111
4.6.5.1. Análise dos Transformantes.....	111
4.6.6. Testes de expressão e solubilização de eIF3L-pET21a.....	111
4.6.7. Expressão e solubilização de eIF3L-pET21a em larga escala.....	111
4.6.8. Purificação em Cromatografia de afinidade de eIF3L.....	112
4.6.9. Testes de concentração e diálise de eIF3L purificada.....	114
4.6.10. Ensaio espectroscópico – <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS).....	115
4.6.11. Purificação em Cromatografia de Gel Filtração de eIF3L.....	115
4.7. Dicroísmo Circular (CD).....	117
4.8. Análise estrutural de eIF3L por ferramentas computacionais.....	118
5. Discussão.....	126
6. Conclusão.....	134
7. Referências Bibliográficas.....	136

Dedico aos meus pais, Jair e Sueli e irmãos, Jair Jr. e Thiago.

Toda a dedicação, perseverança e paciência essenciais para a realização desse trabalho devo a
vocês, minha família.

Agradecimentos

1. A Deus, a força maior, que ilumina meu caminho e me dá sabedoria e paciência para enfrentar a vida.
2. Aos meus pais, Jair e Sueli e irmãos Jair Jr. e Thiago – muito obrigada por tudo que fizeram por mim, por terem me apoiado na decisão de mudar para Rio Preto para concretização de um sonho e terem se “acostumado” com a distância que muitas vezes nos separou em datas tão importantes. A distância infelizmente aumentará, mas tenho a certeza de que também estarão ao meu lado nessa nova fase que se inicia. Amo vocês.
3. Ao meu orientador, Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, que mesmo sem me conhecer, me recebeu em seu laboratório e me ofereceu a oportunidade de trabalhar em uma grande equipe. Agradeço à confiança depositada em mim, aos ensinamentos e incentivos à carreira profissional que se aproxima. Imenso aprendizado adquirido nesses anos.
4. À Prof. Dra. Roberta Vieira de Moraes Bronzoni, que mesmo não sendo, pra mim sempre foi considerada uma co-orientadora. Seus ensinamentos, sua experiência, sua dedicação e sua amizade foram fundamentais para o sucesso deste trabalho e ao meu crescimento profissional.
5. À UNESP-IBILCE, instituição à qual devo meu respeito, minha formação como Doutora em Microbiologia e a parte de meus conhecimentos.

6. Aos professores Dra. Fátima e Dr. Marcelo Fossey do Departamento de Física da UNESP-IBILCE. Obrigada pelos ensinamentos e empenho em parte dos experimentos.
7. Ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton, especialmente ao Prof. Dr. Mário Tyago Murakami e a técnica Andréia Meza Navarro que me receberam e me deram todo o suporte para a realização de alguns experimentos.
8. Aos amigos de hoje e sempre: Alessandra, Adriano, Tatiana, Sílvia, Roberta, Maurício, Lígia, Vinícius, Danilo, Tiago, Daiane, Simone, Luana, Felipe, Guilherme Sabino, Milena. Obrigada por todos os momentos maravilhosos compartilhados com vocês, meus queridos, vocês fizeram a minha estadia em Rio Preto muito melhor.
9. À toda a equipe do Laboratório de Pesquisas em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.
10. À FAPESP, pela sua relevância como órgão de fomento para a pesquisa científica e pela concessão de bolsa de doutorado direto que permitiu o desenvolvimento do nosso projeto.

“Experimente a alegria que o trabalho proporciona”

Henry Wadsworth Longfellow

Lista de Figuras

Figura 1.	Áreas sob risco de febre amarela e países que reportaram epidemias no período de 1985 a 2000.....	27
Figura 2.	Áreas epidemiológicas de risco para Febre Amarela no Brasil, 2008...	28
Figura 3.	Genoma dos <i>Flavivirus</i>	32
Figura 4.	Ciclo replicativo dos <i>Flavivirus</i>	33
Figura 5.	Princípio básico do sistema duplo-híbrido em levedura.....	38
Figura 6.	Genes repórteres da linhagem AH109 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	39
Figura 7.	Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pGBKT7...	48
Figura 9.	Sequência nucleotídica do Domínio de Interação, incluindo os três segmentos amplificados.....	55
Figura 10.	Alinhamento de aminoácidos 64 – 80 referentes ao ID de <i>Flavivirus</i> ..	56
Figura 11.	Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pGEM-T <i>Easy</i>	57
Figura 12.	Mapa de restrição e sítios de clonagem do vetor pET21a.....	72
Figura 13.	Espectro de Dicroísmo Circular.....	81
Figura 14.	Perfil de ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> na confirmação do domínio da interação entre RNAPol e a proteína eIF3L.....	87
Figura 15.	Determinação do domínio de interação entre fragmentos de RNA pol e eIF3L, segundo ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i>	89
Figura 16.	Ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> pela interação do ID	

com a proteína eIF3L.....	91
Figura 17. Modelo de homologia do domínio RNA polimerase da proteína NS5 do YFV.....	92
Figura 18. Ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> pela interação do ID-segmento 3 com a proteína eIF3L.....	94
Figura 19. Ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> pela interação do ID dos Flavivirus Dengue (tipos 3 e 4) e Encefalite de Saint Louis com a proteína eIF3L.....	96
Figura 20. Alinhamento de aminoácidos referentes ao ID de <i>Flavivirus</i>	97
Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a amplificação do ID de NS5 de YFV.....	98
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1% para triagem dos transformantes positivos contendo o <i>Interaction Domain</i> com mutações ID(D438N), ID (F433A/W434A/V437A); ID (R441A/H444A); ID (D438S)	99
Figura 23. Ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> pela interação de ID (D141N)-pGBKT7, ID (D141S)-pGBKT7, ID (R144A/H147A)-pGBKT7 com eIF3L; não ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> de ID (F136A/W137A/V140A) com eIF3L.....	102
Figura 24. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a amplificação do domínio ID.....	103
Figura 25. Expressão das proteínas ID-GST e GST em <i>E. coli</i> BL(DE3)21.....	104
Figura 26. Proteínas ID-GST e GST purificadas.....	105
Figura 27. Interação proteína-proteína de eIF3L-Flag com ID-GST.....	106

Figura 28. Co-imunoprecipitação entre eIF3L-Flag e NS5 YF em células de mamíferos.....	107
Figura 29. Superexpressão de eIF3L diminui replicação do vírus da Febre Amarela.....	109
Figura 30. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a amplificação de eIF3L.....	110
Figura 31. Expressão e solubilização da proteína eIF-pET21a em <i>E. coli</i> BL(DE3)21.....	112
Figura 32. Cromatografia de Afinidade da proteína eIF3L fusionada a His Tag..	113
Figura 33. Gel SDS-PAGE 10% da Purificação por Afinidade.....	114
Figura 34. Cromatograma da Filtração em Gel.....	116
Figura 35. Gel SDS-PAGE 10% da Filtração em Gel.....	117
Figura 36. Espectro de CD da proteína eIF3L.....	118
Figura 37. Hidrofobicidade da proteína eIF3L obtido pelo <i>PsiPred</i>	119
Figura 38. Predições de estruturas secundárias obtido pelo <i>PsiPred</i>	120
Figura 39. Modelo da proteína eIF3L obtida pelo <i>I-Tasser</i>	121
Figura 40. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína eIF3L.....	122
Figura 41. Predições obtidas de eIF3L pelo <i>Q-Site Finder</i> e <i>Predict Protein</i>	123
Figura 42. Docking molecular entre as subunidades K e L do complexo eIF3.....	124

Lista de Quadros

Quadro 1.	<i>Primers</i> para seqüenciamento do domínio RNA polimerase do gene NS5 do YFV clonados no vetor pGBKT7.....	49
Quadro 2.	<i>Primers</i> para amplificação e seqüenciamento dos fragmentos deletantes de RNA polimerase de NS5.....	53
Quadro 3.	<i>Primers</i> usados na amplificação do ID de <i>Flavivirus</i>	55
Quadro 4.	<i>Primers</i> usados na construção do plasmídeo ID-pGEMT Easy.....	58
Quadro 5.	<i>Primers</i> selecionados para mutações sítio-dirigidas no ID.....	60
Quadro 6.	<i>Primers</i> usados no sequenciamento dos plasmídeos mutantes ID-PGEMT.....	62
Quadro 7.	<i>Primers</i> usados na construção do plasmídeo-GST.....	66
Quadro 8.	<i>Primers</i> usados na construção do plasmídeo eIF3L-pET21a.....	73
Quadro 9.	<i>Primers</i> usados no sequenciamento do plasmídeo eIF3L-pET21a....	75
Quadro 10.	Interações entre plasmídeos usados como controles positivo e negativo nos ensaios de duplo-híbrido.....	85

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A	Aminoácido alanina
AD	<i>Activation domain</i>
Ade	Adenina
ADE2	Gene que participa da biosíntese de adenina
ATP	Adenosina trifosfato
BMV	Vírus do mosaico do tabaco
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CD	Dicroísmo Circular
cDNA	DNA complementar
Co-IP	Coimunoprecipitação
CT	<i>Cycle threshold</i>
CTD	<i>Carboxyl-terminal domain</i>
D	Aminoácido ácido aspártico
DENV	Vírus do dengue
DHF	Febre Hemorrágica do Dengue
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-BD	<i>DNA-binding domain</i>
DO ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nanômetros
dsRNA	<i>Double strand RNA</i>
DSS	Síndrome do Choque do Dengue
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylene diamine tetracetic acid</i>
eEF1 α	<i>Translation elongation factor 1α</i>
eIF3L	<i>Eukaryotic translation factor 3, subunit L</i>
F	Aminoácido fenilalanina
g	gravidade
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GST	Glutathione S- transferase
H	Aminoácido Histidina
HCV	Vírus da hepatite C
HCl	Ácido clorídrico

His	Histidina
<i>HIS3</i>	Gene que codifica a síntese do aminoácido histidina
ID	<i>Interaction Domain</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
JEV	Vírus da encefalite Japonesa
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de sódio
KDa	Kilodáton
KH_2PO_4	Di-hidrogenofosfato de potássio monobásico
<i>lacZ</i>	Gene que codifica a enzima β -galactosidase
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
Leu	Leucina
<i>LEU2</i>	Gene que codifica a síntese do aminoácido leucina
LiAc	Acetato de lítio
M	Proteína da membrana viral
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
<i>MEL1</i>	Gene que codifica a enzima α -galactosidase
Met	Metionina
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
MT	Metiltransferase
N	Aminoácido asparagina
NaCl	Cloreto de sódio
MVEV	Vírus da encefalite de Murray Valley
NaF	Fluoreto de sódio
Na_2HPO_4	Hidrogenofosfato de sódio dibásico
Na_3VO_4	Ortovanadato de sódio
NCR	<i>Noncoding region</i>
NP-40	<i>nonyl phenoxy polyethoxylethanol type 40</i>
NS	Proteína não-estrutural
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2A	Proteína não-estrutural 2A

NS2B	Proteína não-estrutural 2B
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4A
NS4B	Proteína não-estrutural 4B
NS5	Proteína não-estrutural 5
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAF	<i>Polymerase associated factor</i>
pb	Par de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietileno glicol
pFU	Unidade formadora de placa
pH	Potencial hidrogeniônico
prM	Proteína precursora da proteína M
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
R	Aminoácido arginina
rDNA	DNA recombinante
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
Rep	Replicon
RNA	Ácido ribonucleico
RNApol	RNA polimerase
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
S	Aminoácido serina
SD	Meio de cultura sintético definido
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SLEV	Vírus da encefalite de Saint Louis
SOC	Meio de cultura enriquecido para crescimento bacteriano
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TBEV	Vírus da encefalite transmitida por carrapatos

tRNA	RNA transportador
Trp	Triptofano
<i>TRP1</i>	Gene que codifica a síntese do aminoácido triptofano
UAS	<i>Upstream activating sequences</i>
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USA	United States of America
V	Aminoácido Valina
W	Aminoácido Triptofano
WNV	Vírus West Nile
WB	<i>Western blotting</i>
YFV	Vírus da febre amarela
YPD	<i>Yeast extract/peptone/dextrose</i>
C	Proteína do capsídeo viral
°C	Grau Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
cm	Centímetros
E	Proteína do envelope viral
h	Hora
KV	Kilovolt
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampere
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mg	Miligrama
s	Segundos
TA	Temperatura ambiente
U	Unidade
V	Volts
ng	Nanograma
nm	Nanomol

μFA	MicroFaraday
μL	Microlitro
μg	Micrograma
W	watts
pmol	Picomol
x g	Força gravitacional
Ω	Omega, unidade de resistência elétrica
%	Porcentagem
Δ	Deleção

Resumo

Introdução. O vírus da Febre Amarela (YFV) pertence ao gênero *Flavivirus* e causa uma importante doença. Nos últimos anos, uma alarmante ressurgência da circulação viral e expansão do vírus em áreas endêmicas têm sido detectadas na África e América do Sul. NS5 é uma proteína viral não estrutural com duas atividades essenciais para a replicação viral, uma de metiltransferase e outra de RNA Polimerase dependente de RNA (RdRp). Para o melhor entendimento dos mecanismos de replicação viral, interações entre NS5 e proteínas celulares têm sido amplamente estudadas. Assim, os objetivos desse estudo foram caracterizar a interação da proteína NS5 e eIF3L, avaliar a função de eIF3L na replicação do vírus da febre amarela, e caracterizar estruturalmente a proteína eIF3L. **Métodos.** Para identificar a interação de NS5 YFV com eIF3L, foi realizado ensaios em sistema duplo-híbrido usando RdRp NS5 YFV contra eIF3L. Para o mapeamento da interação, foram construídos mutantes deletantes de RNAPol e analisados em sistema duplo-híbrido. A região de interação de RNAPol foi segmentada em três fragmentos e analisada na presença de eIF3L. Para mapear os resíduos de NS5 críticos para a interação, foi realizada mutagênese sítio-dirigida no segmento 3 de ID. A interação foi analisada em ensaios *in vitro* e em cultura de células de mamíferos. A significância de eIF3L para a replicação do YFV foi investigada usando superexpressão de eIF3L em células BHK21-RepYF17D LucNeoIres. A proteína eIF3L foi purificada usando uma combinação de cromatografia de afinidade e de exclusão molecular para subsequente caracterização estrutural. **Resultados.** Nesse estudo, foi caracterizada a interação de NS5 com o fator eucariótico de início de tradução, eIF3L. A interação entre NS5 e eIF3L foi confirmada por ensaios de GST-Pulldown e Co-imunoprecipitação. Essa interação ocorreu numa região, conservada em vários flaviviruses, denominada *Interaction Domain*. A superexpressão de eIF3L diminuiu significativamente a replicação de YFV, indicando que eIF3L possui importante papel na replicação viral. A proteína recombinante eIF3L pode ser clonada, expressa em *E.coli* e purificada em uma única banda por cromatografia. Após o processo, eIF3L mantém sua estrutura secundária conservada e é viável para posteriores estudos funcionais e estruturais. **Conclusões.** Embora a precisa função de eIF3L em interações com outras proteínas não esteja claramente entendida, nossos resultados indicam que a proteína possui uma importante função na replicação do YFV.

Palavras-chave: 1. Febre amarela; 2. NS5; 3.eIF3L; 4. Interações proteína-proteína

Abstract

Introduction. Yellow fever virus (YFV) belongs to the *Flavivirus* genus and causes an important disease. An alarming resurgence of viral circulation and expansion of the YFV endemic zones have been detected in Africa and South America in recent years. NS5 is a viral protein that contains the methyltransferase and RNA-dependent RNA polymerase domains, which are essential during viral replication. Interactions among NS5 and cellular proteins have been studied for the understanding of viral replication. The aim of this study was to characterize the interaction of NS5 protein with EIF3L and evaluate the role of EIF3L in yellow fever replication. **Methods.** To identify the interaction of YFV NS5 with cellular proteins, we performed a two-hybrid screen using YFV NS5 RdRp domain as bait and a human cDNA library. For mapping the interaction, RNAPol deletions mutants were performed and analyses in two-hybrid system. The RNAPol region of interaction was segmented in three fragments and analyses into yeast containing eIF3L. To map residues of NS5 that are critical for its interaction, we performed a site-direct mutagenesis in segment 3 of ID. The interaction was confirmed *in vitro* assays and by *in vivo* coimmunoprecipitations. The significance of eIF3L for replication of YFV was investigated using overexpression of eIF3L in BHK21-RepYF17D LucNeoIres cells. eIF3L was purified using a combination of affinity and subsequent size exclusion chromatography for subsequent structural characterization. **Results.** In this work we describe and characterize the interaction of NS5 with the translation factor eIF3L. The interaction between NS5 and eIF3L was confirmed by *in vitro* binding and *in vivo* coimmunoprecipitation assays. This interaction occurs in a region (Interaction Domain of RNAPol domain) that is conserved in several flaviviruses and is therefore likely to be relevant to the genus. Overexpression of eIF3L decreased significantly YFV replication indicating that the interaction of eIF3L with YFV NS5 plays an important role in YFV replication. The recombinant human eIF3L protein can be cloned, expressed in *E. coli* and purified from soluble fraction in single chromatographic step. eIF3L maintains secondary structures and is viable to functional and structural studies. **Conclusions.** Although the precise function of eIF3L in the interactions with viral proteins is not entirely understood, these results indicate that the interaction of eIF3L with YF NS5 plays an important role in viral replication.

Keywords: eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L; YFV; protein nonstructural NS5; protein-protein interaction

INTRODUÇÃO

1.1 Febre Amarela - Considerações Gerais

A febre amarela caracteriza-se por ser uma doença infecciosa não contagiosa que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América do Sul e da África, ocasionando surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto em saúde pública. A doença é causada pelo vírus da febre amarela (YFV—*yellow fever virus*), protótipo do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, a qual inclui outros importantes vírus causadores de doença humana. O YFV é um arbovírus transmitido a vertebrados através da picada de insetos hematófagos da família *Culicidae*, especialmente dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus*. Na África tem sido registrado o isolamento viral a partir de carrapatos *Amblyoma variegatum*, em áreas secas, o que pode indicar o papel secundário desses insetos na cadeia de transmissão da virose (GARDNER & RYMAN, 2010; GOULD & SOLOMON, 2008; PASTORINO et al., 2010).

Sob o ponto de vista epidemiológico, a febre amarela divide-se em dois ciclos, silvestre e urbano, os quais se diferenciam principalmente pela natureza dos vetores e dos hospedeiros vertebrados (VASCONCELOS, 2003). No ciclo silvestre, a manutenção do vírus envolve macacos (*Callitrichidae* e *Cebidae*) como hospedeiros amplificadores e os mosquitos *Haemagogus janthinomys* e *Haemagogus leucocelaenus* como vetores principais (BOSSI et al., 2004). As pessoas são expostas aos mosquitos infectados quando adentram regiões de florestas através da realização de atividades ocupacionais ou recreativas sem vacinação prévia. No ciclo urbano, assim como ocorre com o dengue, o YFV é transmitido diretamente ao homem, que também serve como hospedeiro amplificador, pela picada do mosquito *Aedes aegypti*.

A infecção pelo YFV varia de quadros assintomáticos, os quais acometem metade dos indivíduos infectados, a formas leves ou moderadas com doença febril não específica acompanhada ou não de icterícia, em 30% dos casos, e casos graves de febre hemorrágica cursando com falência hepática, insuficiência renal e morte, em aproximadamente 20% das infecções (FIGUEIREDO, 2006). Não obstante, a febre amarela constitui a febre hemorrágica viral original descrita no mundo, hoje responsável por 1.000 vezes mais casos de doença e mortalidade do que o Ebola, a mais alarmante febre hemorrágica viral emergente da espécie humana (MONATH, 2001). Como todas as febres hemorrágicas de origem viral, a febre amarela apresenta alta letalidade e produz distúrbios hemorrágicos, síndromes de extravasamento de fluidos, com ou sem dano capilar, podendo comprometer fígado, rins e sistema nervoso central (BOSSI et al., 2004). A letalidade global está estabelecida entre 5% a

10%, mas entre os casos graves que evoluem com síndromes ictero-hemorrágica e hepato-renal pode alcançar 50%. Surto de febre amarela são descritos no Brasil desde o século XVII (VASCONCELOS, 2002).

A criação de uma vacina anti-amarílica aconteceu no ano de 1937. Desenvolvida a partir da cepa 17D atenuada do YFV, foi testada pela primeira vez no Brasil, mostrando excelentes resultados quanto à imunogenicidade e segurança. Foi quando então, em 1938, ela passou a ser produzida pelo Instituto Oswaldo Cruz, na cidade do Rio de Janeiro (FRANCO, 1976). Com o melhoramento da infra-estrutura urbana, nas primeiras décadas do século XX, aliado às medidas de combate ao vetor e ao advento da vacina anti-amarílica, o número de casos de febre amarela foi rapidamente reduzido. Os últimos episódios registrados da doença urbana no Brasil ocorreram em 1942, na cidade de Sena Madureira, no Estado do Acre (FRANCO, 1969). Nas Américas, o último registro consta do ano de 1954 em Trinidad (MONATH, 1988). Desde então, apesar da intensa re-infestação do *Ae. aegypti* ocorrida na América do Sul, acompanhada de extensas epidemias de dengue, nenhum caso urbano foi diagnosticado ou oficialmente notificado nas Américas, a não ser o registro não oficial de seis casos em Santa Cruz de la Sierra, na Bolívia (VAN DER STUFY et al., 1999) e em Assunção, no Paraguai.

Sabe-se que a África responsabiliza-se por mais de 90% dos casos de febre amarela anualmente notificados à OMS, incluindo transmissão urbana (MONATH, 2001). Áreas florestais e rurais da América do Sul e África (Figura 1), as quais correspondem às bacias dos rios Amazonas, Araguaia-Tocantins, Paraná e Orinoco na América do Sul, e Nilo e Congo na África são áreas sob risco de febre amarela (VASCONCELOS, 2003).



Figura 1. Áreas sob risco de febre amarela e países que reportaram epidemias no período de 1985 a 2000. Fonte: OMS

No Brasil, são reconhecidas 3 áreas epidemiológicas de risco para a febre amarela (Figura 2) – área endêmica, área de transição (também conhecida como epizootica ou de emergência) e área de risco potencial. Atualmente, a área endêmica inclui as regiões Norte e Centro Oeste e o Estado do Maranhão, e corresponde a mais de 2/3 do território nacional, onde vive uma população de cerca de 30 milhões de habitantes. Nos últimos anos, frente ao expressivo aumento da ocorrência e circulação do YFV, a área de transição aumentou, passando a incluir, além da parte ocidental de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, classicamente consideradas áreas de risco, as partes ocidentais dos estados do Piauí e Bahia no Nordeste, além de Santa Catarina e Rio Grande do Sul na região Sul. Essa extensão da área de abrangência ocorreu, dentre outros fatores, devido à grande mobilidade observada na população, correspondente a aproximadamente 18 milhões de habitantes. Já a área indene corresponde às regiões da costa brasileira que se estendem desde o Piauí até o Rio Grande do Sul, onde vivem cerca de 118 milhões de habitantes. A área de risco potencial inclui parcialmente os estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. A imunidade das populações vivendo nessas áreas varia consideravelmente. Na área endêmica estima-se que cerca de 95% da população já esteja vacinada contra a febre amarela. Observa-se índice similar ou ligeiramente inferior na área de transição. Nas demais áreas do mapa, a cobertura vacinal, salvo raras exceções, é muito baixa ou praticamente nula (VASCONCELOS, 2003).

Desde os anos 80, tem-se verificado a re-emergência da febre amarela silvestre no

Brasil. Até 1999, a vigilância da febre amarela era pautada exclusivamente na ocorrência de casos humanos. A partir daquele ano, com a observação de morte de macacos, denominadas de epizootias, e o subsequente aparecimento da doença na população, tais fatores passaram a ser vistos como sinalizadores de risco de casos humanos de febre amarela silvestre. Em 2007, foram notificadas epizootias de macacos por febre amarela em nove estados: Goiás, Tocantins, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Piauí, Distrito Federal e Rio Grande do Norte, tendo havido confirmação laboratorial para febre amarela de casos humanos e em macacos simultaneamente em Goiás (Figura 2). Em relação aos casos humanos, foram registrados casos em quatro estados: Amazônia, Pará, Roraima e Goiás (Figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

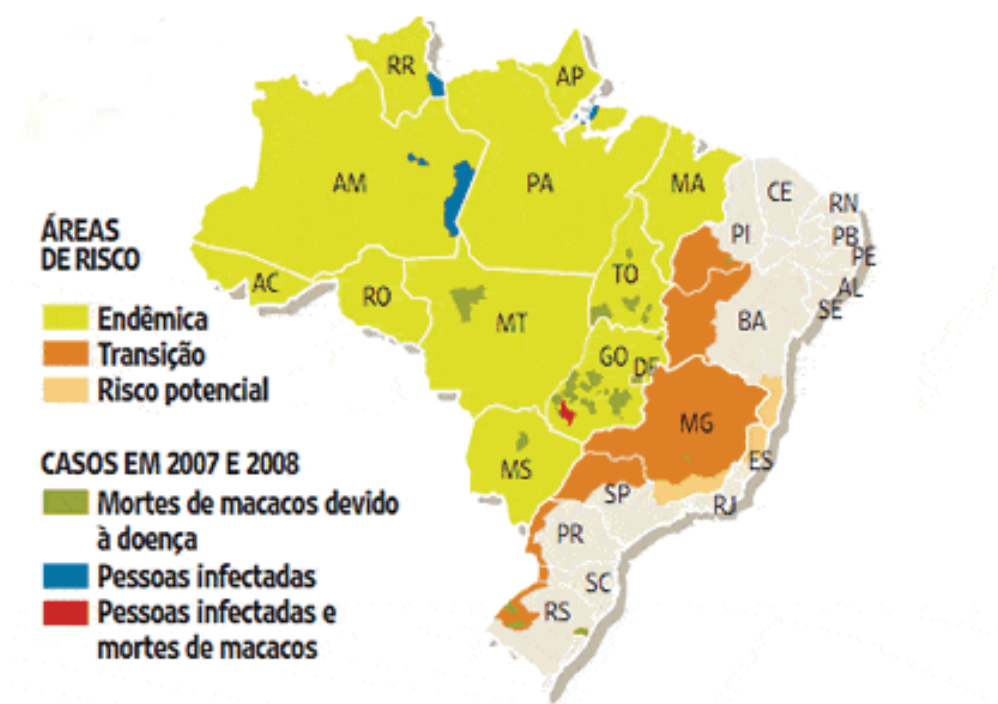


Figura 2. Áreas epidemiológicas de risco para a febre amarela no Brasil, 2008.

No período de novembro de 2008 à abril de 2009 foram confirmados 18 casos de febre amarela silvestre no Rio Grande do Sul, com uma letalidade de 38,8% ; no Estado de São Paulo foram confirmados 26 casos com evolução de 34,6% para o óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Entre outubro de 2008 a setembro de 2009 foram confirmadas 177 epizootias com diagnóstico para febre amarela. De 2009 à 2010 foram confirmados 28 casos no Estado de São Paulo (39,2% de óbitos), 1 caso em Minas Gerais, 16 casos no Rio Grande do Sul

(31,25% de óbitos), 2 casos em Mato Grosso (50% de óbito), 1 caso no Pará (100% de óbito) e 1 caso no Mato Grosso do Sul (100% de óbito) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

No Brasil, apesar da extensiva campanha de vacinação, aproximadamente 20% da população das áreas endêmica e de transição e quase 100% da população da área indene não estão vacinadas. Em adição, o mosquito *Ae. aegypti* encontra-se intensamente difundido em praticamente todos os estados do país. Indivíduos com febre amarela silvestre representam fontes potenciais de infecção para estes vetores, os quais podem iniciar epidemias urbanas explosivas e acometer milhares de pessoas entre a população não vacinada (mais de 118 milhões de pessoas susceptíveis) trazendo consequências importantes para a saúde pública e para a economia do país.

O diagnóstico clássico da febre amarela é realizado pelo isolamento viral em culturas celulares ou em camundongos recém-nascidos, seguidos de identificação pelos testes de Neutralização, Inibição da Hemaglutinação ou Imunofluorescência. Em casos fatais, antígenos virais podem ser detectados no fígado por imunohistoquímica (FIGUEIREDO, 2006). Os métodos baseados em RT-PCR significaram um avanço no diagnóstico das arboviroses, sobretudo do dengue e da febre amarela, fornecendo respostas rápidas e precisas, além de possibilitar o sequenciamento nucleotídico dos produtos amplificados que visam à identificação viral, estudos filogenéticos e de genotipagem, permitindo um adequado monitoramento destas viroses.

Dentre estes métodos, a *Multiplex-Nested-PCR* recentemente desenvolvida para o diagnóstico das principais arboviroses brasileiras, incluindo a febre amarela, apresenta a conveniência de uma única amostra clínica fornecer um diagnóstico diferencial entre esta doença e dengue, principalmente nos casos de febre hemorrágica (BRONZONI et al., 2005). Além do dengue hemorrágico, o diagnóstico diferencial deve ser realizado com outras enfermidades infecciosas como a leptospirose, malária, febre tifóide, hepatites virais e outras febres hemorrágicas (VASCONCELOS, 2003).

Não existe droga antiviral para o tratamento da febre amarela. A ribavirina e o interferon- γ já foram testados sem resultados satisfatórios. Assim, o tratamento desta doença baseia-se nos cuidados de suporte em terapia intensiva (FIGUEIREDO, 2006).

O combate à infestação por *Ae. aegypti*, com a eliminação de criadouros e o uso de inseticidas, é uma ferramenta fundamental para a prevenção do aparecimento de surtos de febre amarela urbana. Atuando simultaneamente nessa prevenção está a vacina anti-amarílica, desenvolvida em 1937 a partir da cepa 17D atenuada do YFV, foi testada pela primeira vez no Brasil, mostrando excelentes resultados quanto à imunogenicidade e segurança

(FIGUEIREDO, 2006).

1.2 *Flavivirus* - Características Estruturais e Replicação Viral

A família *Flaviviridae* apresenta três gêneros que compartilham similaridades morfológicas, na organização e na estratégia de replicação do genoma: *Pestivirus*, cujo principal representante é o vírus da diarréia viral bovina (BVDV); *Hepacivirus*, representado pelo vírus da hepatite C (HCV) e os *Flavivirus* (CHAMBERS et al., 1990).

O gênero *Flavivirus* compreende aproximadamente 80 espécies distribuídas mundialmente, causando sérias doenças nos seres humanos e animais. Grande parte delas é carregada por artrópodes (arbovírus) e transmitidas aos seus hospedeiros vertebrados pela picada de mosquitos ou carrapatos. Diversos membros do gênero são altamente patogênicos aos seres humanos e constituem grave problema de saúde pública, incluindo os vírus do dengue (DV), o vírus da febre amarela (YFV), o vírus West Nile (WNV), e o vírus da encefalite japonesa (JEV) (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009).

Os *Flavivirus* isolados no Brasil incluem os vírus do dengue (DENV tipos 1-4), responsáveis pela febre do dengue, febre hemorrágica do dengue (DHF) e síndrome do choque do dengue (DSS), o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), Bussuquara, Cacipacoré, Iguape, Ilhéus, Rocio e o YFV (FIGUEIREDO, 2000).

Os *Flavivirus* são partículas envelopadas e esféricas com diâmetro estimado entre 40 a 60 nm. Os vírions maduros são compostos por 6% de RNA, 66% de proteína, 9% de carboidrato e 17% de lipídio. O genoma, constituído por RNA de fita simples, linear e de polaridade positiva, possui aproximadamente 11 Kb em tamanho e apresenta um *cap* na posição 5', sendo a posição 3' não-poliadenilada. Este genoma é codificado como uma única ORF (*open reading frame*) a qual origina uma grande poliproteína que é processada, por meio de proteases virais e celulares, em três proteínas estruturais (capsídeo, C; precursor de membrana, prM; envelope, E) e sete não-estruturais (NS), respectivamente, na seguinte ordem: 5'-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (no caso dos *Hepacivirus* e *Pestivirus*, a NS5 é dividida em NS5A e NS5B) (Figura 3) (GARDNER & RYMAN, 2010).

Além do RNA genômico (gRNA), o gênero *Flavivirus* produz também um RNA subgenômico (sfRNA), não codificante de aproximadamente 0.5 kb que é derivado da região 3'UTR de gRNA. O sfRNA é um produto da degradação incompleta de gRNA, o que pode envolver a enzima celular 5'- 3' exoribonuclease XRN1, uma enzima chave na via de

decaimento de mRNA celular. sfRNAs estão envolvidos na replicação viral e patogenicidade, e pode ter uma função na modulação da resposta antiviral (PASTORINO et al., 2010; PIJLMAN et al., 2008).

Flanqueando a longa ORF nas extremidades 5' e 3' existem regiões não-traduzidas (UTRs) que contêm aproximadamente 100 e 400-700 nucleotídeos, respectivamente (Figura 3). A sequência 5'UTR é pouco conservada entre os *Flavivirus*, mas contém elementos de estrutura secundária comuns que influenciam a tradução do genoma. No entanto, a função mais significativa dessa região está em sua capacidade de se complementar à extremidade 3'UTR (da fita negativa) para formar um sítio de iniciação para a síntese de fita positiva (LINDENBACH et al., 2001). Alguns estudos sugerem interações potenciais desta região com fatores específicos do hospedeiro, entre eles, o estudo desenvolvido por Shi e colaboradores (1996), no qual proteínas celulares foram mostradas interagindo especificamente ao terminal *stem-loop* na região 3'UTR do WNV. A sequência 3'UTR apresenta regiões conservadas e funciona como um promotor para a síntese da fita negativa. Várias proteínas celulares se ligam a esta região, incluindo o fator de elongação da tradução 1 α (eEF1 α – *translation elongation factor 1 α*) (BLACKWELL et al., 1997), bem como as proteínas virais NS3 e NS5 (CHEN et al., 1997).

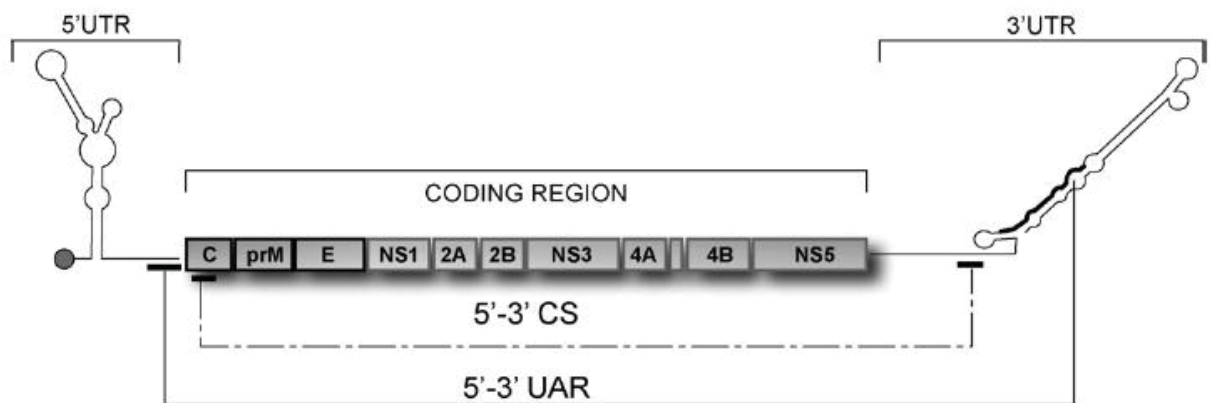


Figura 3. Genoma dos *Flavivirus*. Representação esquemática mostrando as regiões não-traduzidas (5' UTR e 3' UTR) do genoma viral. As três proteínas estruturais (Capsídeo, C; prM, precursor de membrana; E, envelope) e as sete proteínas não-estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) estão identificadas.

Fonte: Adaptado de Villordo & Gamanirk, 2009.

Em geral, a replicação dos *Flavivirus* inicia-se com a ligação da proteína E a receptores celulares específicos (possivelmente, glicosaminoglicanos sulfatados e heparan sulfato), na qual o ambiente ácido favorece alterações conformacionais na proteína E que induz a fusão com membranas celulares do hospedeiro, com a subsequente entrada do vírus por endocitose. Após a fusão do vírion à membrana da célula hospedeira, o nucleocapsídeo é entregue ao citoplasma, local onde a replicação do RNA ocorre. O RNA liberado codifica um polipeptídeo que sofre alterações pós-traducionais, originando as proteínas estruturais e não-estruturais. À medida que essas proteínas vão sendo traduzidas, uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) vai sintetizando cópias complementares (polaridade negativa) ao RNA, que servirão como molde para a síntese de novas moléculas de polaridade positiva da progênie. Esta replicação acontece no complexo de replicação citoplasmático, associado às membranas perinucleares. No retículo endoplasmático, o RNA viral é envolvido com a proteína C e empacotado em uma membrana contendo heterodímeros das proteínas prM e E. A prM impede a fusão prematura do vírus durante o transporte ao Complexo de Golgi, onde ocorre a maturação dos vírus com a clivagem de prM em M. Partículas virais maduras são então liberadas para o compartimento extracelular por exocitose (BOLLATI et al., 2010; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). O ciclo replicativo dos *Flavivirus* está representado esquematicamente na figura 4.

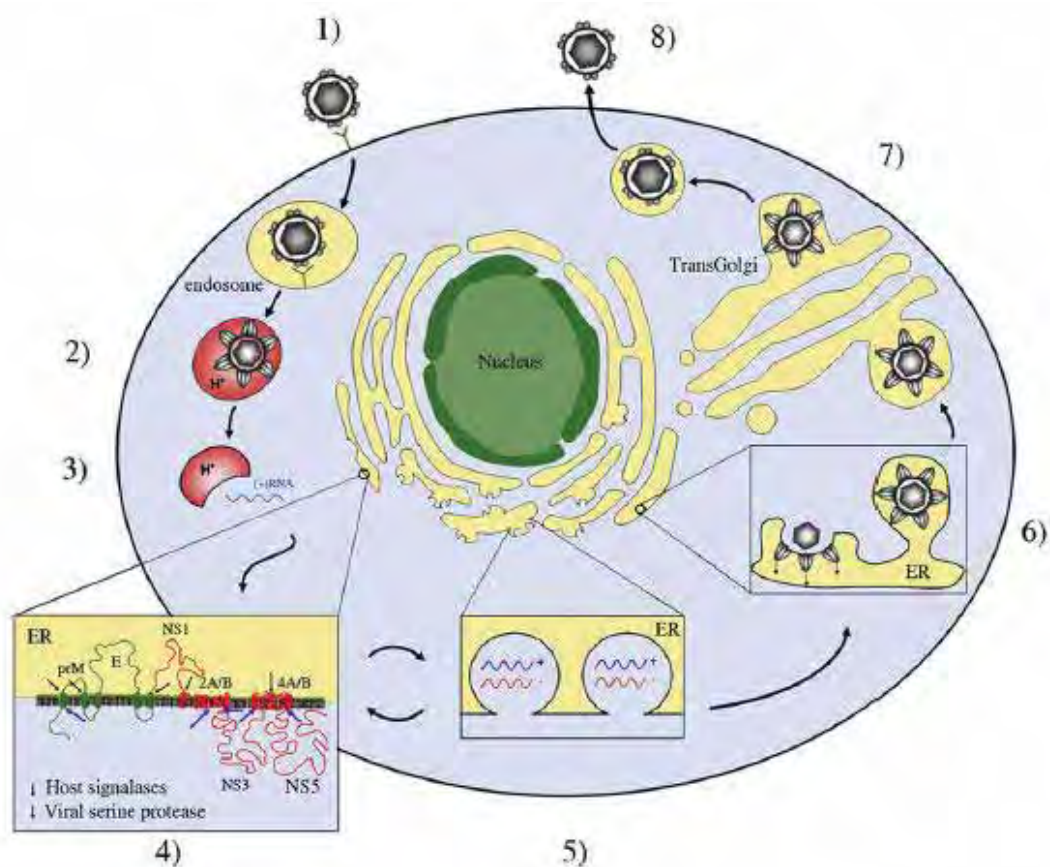


Figura 4. Ciclo replicativo dos *Flavivirus*.

Fonte: Adaptado de Fernandez-Garcia et al., 2009.

A proteína NS5, alvo deste estudo, é a maior e a mais conservada entre os *Flavivirus*, apresentando um peso molecular na ordem de 100 kDa. Duas atividades essenciais para a replicação viral estão relacionadas a essa proteína: uma de RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* – RdRp), na região carboxi-terminal, e outra de metiltransferase, em sua porção amino-terminal, a qual está envolvida na formação do *cap* RNA, provavelmente na metilação da estrutura *cap* RNA 5' (DAVIDSON, 2009; GARDNER & RYMAN, 2010). Alguns estudos com NS5 evidenciam ainda a relevância funcional desta proteína para a patogênese viral, uma vez que a realização de mutações na proteína reduziu a neurovirulência em camundongos (DUNSTER et al., 1999; XIE et al., 1998). Existe, assim, a possibilidade de que essas mutações alterem as bases da interação vírus-célula hospedeira, o que poderia interferir na patogênese da doença.

Quanto à sua localização celular, existem evidências de que, além da ação citoplasmática quando da replicação de RNA, NS5 é também identificada no núcleo de células infectadas com YFV e DENV (BUCKLEY et al., 1992; KAPOOR et al., 1995). Essa participação nuclear nas etapas de replicação viral foi confirmada pela detecção da interação entre a proteína NS5 do DENV-2 com a proteína *importin-β* do hospedeiro envolvida no transporte nuclear (JOHANSSON et al., 2001). Uchil e colaboradores (2006) mostraram que 20% da atividade total da RdRp de células infectadas com WNV, JEV e DENV acontecem no núcleo, assim como a maioria das replicases NS3 e NS5 de JEV. A presença de ambas as replicases na matriz nuclear revelou uma localização bem definida para o complexo de replicação viral neste local. Perante estas informações, torna-se necessário considerar o papel que a proteína NS5 pode desempenhar no núcleo da célula, como a interação com proteínas do hospedeiro e também a modificação de funções celulares.

1.3 Interações proteína-proteína entre NS5 e proteínas celulares

Interações proteína-proteína são intrínsecas a diversos processos biológicos essenciais, apresentando fundamental importância para ativação, regulação e controle de várias funções enzimáticas a elas relacionadas (CHIEN et al., 1991; MACDONALD et al., 2001; PHIZICKY & FIELDS, 1995), sendo necessárias para muitas funções virais. O conhecimento do significado dessas interações para a função celular, ou seja, sua identificação, a amplitude que tomam e a determinação de suas consequências, são questões essenciais para a resolução das bases das interações patógeno-hospedeiro e, conseqüentemente, para o desenho racional de drogas que possam atuar promovendo a ruptura dessas interações (BADTKE et al., 2006; GOLEMIS et al., 2001). Muitas doenças humanas podem ser ligadas à associação anormal entre proteínas, incluindo algumas formas de leucemia e doença neurodegenerativa. Interações proteína-proteína proveem alvos terapêuticos no tratamento do câncer e doenças infecciosas, e o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras dessas interações é um campo crescente de pesquisas (ARKIN et al., 2005).

A informação genética limitada promove uma dependência viral à maquinaria celular para muitos passos da síntese de macromoléculas. Processos como a montagem do complexo de replicação do RNA viral e sua transcrição caracterizam-se pelo envolvimento não apenas dos fatores virais, mas também de proteínas celulares, sendo a maioria delas componentes que atuam no processamento de RNA ou na tradução protéica em células hospedeiras, e que passam a exercer papel integral ou regulatório na replicação e transcrição do vírus.

Vários experimentos tem por objetivo detectar interações entre proteínas virais não-estruturais e proteínas celulares, incluindo NS5, têm sido efetuados no sentido de se compreender melhor o mecanismo de replicação e patogênese de alguns membros da família *Flaviviridae*, como o YFV, o DENV, HCV e BVDV. De fato, processos virais como a montagem do complexo de replicação do RNA e sua transcrição envolvem não somente fatores intrínsecos ao microrganismo, mas também proteínas celulares que exercem papel essencial para a maquinaria de transcrição e replicação viral (LAI et al., 1998). JOHNSON et al. (2001) mostrou em seus trabalhos que NS5 de BVDV interage com a proteína eEF1A (*translation elongation factor 1A*), a qual também foi detectada como parceira interativa de NS5 de WNV e DENV-4 (BLACKWELL et al., 1992; DE NOVA-OCAMPO et al., 2002). Chung e colaboradores (2000) identificaram a proteína karioferina $\beta 3$, a qual está envolvida no transporte de proteínas e de RNA, como um parceiro interativo da proteína NS5A do HCV. Majunder e colaboradores (2001) detectaram outro par para NS5A de HCV, a proteína p53 (proteína nuclear supressora de tumor) e correlacionaram tal interação com a promoção do crescimento celular e a contribuição na patogênese da infecção.

Outra interação proteína-proteína com NS5A de HCV foi descrita por Evans e colaboradores (2004), no qual detectaram como par interativo a proteína hVAP-A humana, a qual está envolvida no transporte intracelular de vesículas e, além de atuar como receptor para ligação de proteínas, é alvo necessário para a replicação eficiente do RNA.

Houshmand e colaboradores (2003) indicaram uma habilidade da proteína La de interagir com as extremidades 5' e 3' do RNA do DENV-4, bem como com NS3 e NS5, sugerindo uma função desta proteína na replicação destes vírus, bem como na de outros membros da família *Flaviviridae*.

Adicionalmente a todos esses achados, a constatação de que NS5 de todos os membros da família *Flaviviridae* é fosforilada por uma serino/treonina quinase celular desconhecida torna ainda mais evidente a ocorrência de interações entre proteínas celulares e NS5 (REED et al., 1998). De fato, Kapoor e colaboradores (1995) já descreviam que a interação entre NS3 e NS5 de DENV-2 era dependente da fosforilação de NS5.

Lai e colaboradores (1998) demonstrou que a RNA polimerase dependente de RNA viral (RdRP), purificada de células infectadas por diferentes vírus de RNA de polaridade positiva, estava associada a proteínas celulares. A remoção destes fatores celulares resultou na perda da atividade da RdRP viral ou de sua especificidade para o alvo, considerando como específica a replicação do RNA viral e não dos RNAs celulares. Isto sugere que fatores celulares são necessários para a síntese específica de RNA, sendo pré-requisitos fundamentais

para o sucesso de uma replicação viral.

Fundamentando-se em todas as considerações mencionadas, constata-se que a síntese do RNA viral envolve processos bastante complexos, com a interação entre o RNA viral, proteínas virais e também fatores celulares, ficando clara a relevância das interações protéicas dentro desse contexto. Diferentemente de HCV e de outros membros da família *Flaviviridae*, pouco se sabe sobre as interações proteína-proteína relacionadas à NS5 de YFV, e sua participação no processo de replicação viral.

Várias técnicas são utilizadas para detecção de interações proteína-proteína. O sistema de duplo-híbrido em leveduras envolve a fusão de proteínas nos domínios de ligação e ativação do fator transcricional de GAL4. Se a interação entre duas proteínas ocorrer na levedura, um gene repórter é expresso (MILLER et al., 2004). Experimentos de GST-*Pulldown* são também utilizados para identificar interações entre proteínas específicas e alvos desconhecidos ou para confirmar a suspeita de interações *in vitro* entre uma proteína fusionada à GST (Glutathione S-transferase) e uma proteína alvo conhecida (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Técnicas similares como co-imunoprecipitação são também utilizadas. Quando células são lisadas sob condições não-desnaturantes, muitas das interações proteína-proteína que existem nas células intactas são conservadas. Esse fato pode ser usado para detectar e identificar interações proteína-proteína fisiologicamente relevantes. Se uma proteína X é imunoprecipitada com um anticorpo para X, uma outra proteína Y que esta associada *in vivo* com X pode também ser precipitada. A imunoprecipitação de Y, baseada na interação física com X, é chamada de coimunoprecipitação (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

1.4 Proteínas Relacionadas à NS5 através do ensaio de duplo híbrido

O principal caminho para esclarecer a função de uma proteína dentro de um complexo é a correlação por associação, ou seja, genes co-expressos ou proteínas que interagem diretamente entre si são provavelmente participantes de um mesmo ou de processo celular relacionado. Assim, quando é detectada uma interação onde somente uma das proteínas tem função estabelecida, conseqüentemente pode-se inferir à parceira interativa de atividade desconhecida uma suposta atuação celular correlacionada (GOLEMIS et al., 2001).

Adicionalmente, a dedução da atividade funcional protéica pode ser conseguida através da utilização de métodos teóricos, os quais incluem análises bioinformáticas baseados na homologia de proteínas, relações filogenéticas e domínios de fusão de proteínas. Outro

procedimento que atua neste sentido é o mapeamento da interação proteína-proteína, o qual, além da identificação de uma suposta função para proteínas não caracterizadas, pode fornecer informações sobre domínios de interação, fato relevante para direcionar outros experimentos (BADTKE et al., 2006). Inúmeras estratégias têm sido desenvolvidas para identificar proteínas que se ligam a outras proteínas, incluindo os métodos genéticos clássicos, as abordagens bioquímicas como coimunoprecipitação e cromatografia de afinidade, como também os métodos baseados em biblioteca, dentre os quais está inserido o sistema duplo-híbrido em levedura (PHIZICKY & FIELDS, 1995). Possivelmente, o sistema duplo-híbrido em levedura tem sido a ferramenta predominante e mais poderosa para definir, caracterizar e entender a relevância das interações proteína-proteína (MACDONALD et al., 2001; KARIMOVA et al., 2002).

O ensaio de duplo-híbrido em levedura foi inicialmente introduzido por Fields e Song em 1989, quando mostraram que plasmídeos expressando proteínas de fusão GAL4_{BD}-SNF1 e GAL4_{AD}-SNF5 ativavam o gene repórter *GAL1-lacZ*. Trata-se de um ensaio genético-molecular pelo qual uma interação proteína-proteína é detectada *in vivo* através da reconstituição da atividade de um ativador transcricional. Ativadores transcripcionais podem ser separados em regiões discretas correspondentes a domínios de ligação ao DNA e domínios de ativação da transcrição (BRENT & PTASHNE, 1985; HOPE & STRUHL, 1986). O método é baseado em propriedades da proteína Gal4, um ativador transcricional da levedura *Saccharomyces cerevisiae* constituído por dois domínios funcionais distintos e separáveis – um domínio amino-terminal, localizado entre os aminoácidos 1 e 147, onde se ligam regiões específicas do DNA (UAS-GAL4), sendo denominado DNA-BD (*DNA-binding domain*); e um domínio carboxi-terminal, o qual está situado entre os aminoácidos 768 e 881 de Gal4, e se caracteriza por ativar o processo de transcrição da levedura, sendo chamado, portanto, de AD (*activating domain*). UAS são regiões reguladoras da transcrição no genoma da levedura, reconhecidas por ativadores transcripcionais específicos (KARIMOVA et al., 2002; KEEGAN et al., 1986). O DNA-BD de Gal4 reconhece sequências de ativação UAS, mas, isoladamente não é capaz de ativar a transcrição. O AD, por sua vez, apesar de poder interagir com o complexo da RNA polimerase II, não ativa o processo de transcrição por si só, devido à distância em que ele se encontra da região promotora UAS-GAL4. Mas os dois domínios do ativador não precisam estar ligados covalentemente. Apenas a reconstituição da proximidade entre esses domínios DNA-BD e AD já é suficiente para que a atividade transcricional de Gal4 seja restabelecida (PHIZICKY & FIELDS, 1995; CHIEN et al., 1991).

A idéia básica do sistema duplo-híbrido para detectar interações protéicas é, então,

construir e introduzir na levedura hospedeira plasmídeos codificando duas proteínas híbridas, um com o DNA-BD de GAL4 fundido a uma proteína X (isca), e o outro com o AD de GAL4 fundido a uma proteína Y (presa). A interação entre as proteínas X e Y refaz a proximidade entre os dois domínios de GAL4, e recruta a maquinaria transcricional para a região do promotor. A transcrição é, então, ativada, e a interação proteína-proteína é detectada através de um sinal fenotípico que é gerado a partir da ativação transcricional de genes repórteres da levedura, os quais contêm sítios de ligação para GAL4 (CHIEN et al., 1991; FIELDS & SONG, 1989). A ilustração do princípio básico de um ensaio de duplo-híbrido em levedura está na figura 5.

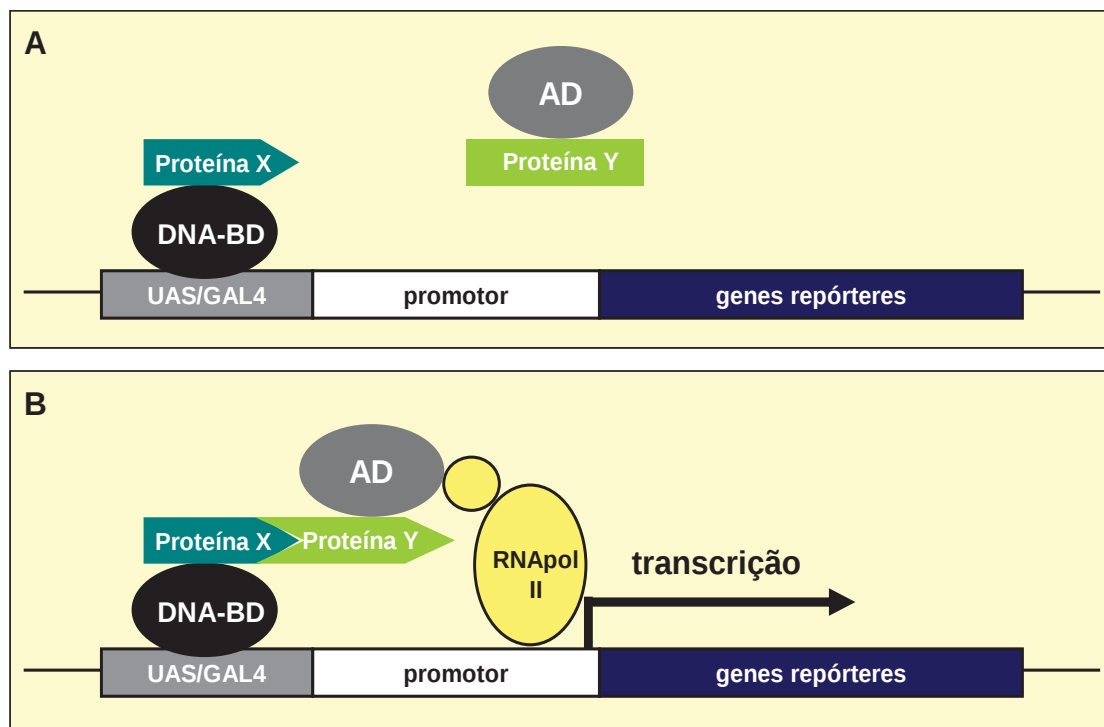


Figura 5. Princípio básico do sistema duplo-híbrido em levedura descrito por Fields e Song, 1989. A) O processo de transcrição não ocorre porque as proteínas híbridas X e Y não são parceiras interativas. B) A interação entre as proteínas X (fundida ao DNA-BD) e Y (fundida ao AD) reconstitui a proximidade entre os dois domínios da proteína Gal4, ativando a transcrição e promovendo a expressão de genes repórteres da levedura.

A cepa de levedura usada num experimento com sistema duplo-híbrido determina a eficiência de detecção das interações proteína-proteína. Uma cepa ideal deve ter duas propriedades: os genes repórteres devem ser altamente sensíveis, de forma a detectar uma

interação proteína-proteína fraca, bem como altamente seletivos, de forma a selecionar reais interações e eliminar as falsas (MORRIS-DESBOIS et al., 2001).

A linhagem AH109 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Clontech, USA) foi geneticamente construída para eliminar clones falso-positivos através de três genes repórteres – *HIS3*, *ADE2* e *lacZ* (ou *MEL1*), os quais estão sob controle de diferentes regiões promotoras (UAS) adjacentes à GAL4, conforme pode ser visto na figura 6. Esses repórteres são expressos a partir da proximidade entre os domínios de ligação ao DNA (DNA-BD) e de ativação da transcrição (AD) de GAL4 da referida levedura, ativando sua maquinaria transcricional e gerando, assim, um sinal fenotípico.

GAL1 UAS	GAL1 TATA	<i>HIS3</i>
GAL2 UAS	GAL2 TATA	<i>ADE2</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>lacZ</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>MEL1</i>

Figura 6. Genes repórteres da linhagem AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*

Foi realizado em nosso laboratório um *screening* para a detecção de interações entre a proteína NS5 do YFV com proteínas celulares em ensaio de duplo-híbrido usando levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem AH109 (MADRID, 2007, dissertação de mestrado).

Analizando fatores tais como a relevância nos processos de replicação viral, metabolismo de mRNA, controle do crescimento celular e, também, examinando interações conhecidas com outras proteínas virais, foram consideradas como de maior importância para os nossos resultados sete das proteínas identificadas como parceiras interativas do domínio RNA polimerase de NS5: Snf5, p54_{NRB}, HMG20B, U1A, eIF3L, GIPC1 e MIF. Neste estudo, foi caracterizada a interação de NS5 com a proteína eIF3L (MADRID, 2007, dissertação de mestrado).

1.5 Proteína eIF3L

Existem poucos trabalhos disponíveis sobre a proteína eIF3L (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L*), a qual pode receber também as denominações eIF3S6IP, eIF3EIP, eIF3S11, MSTPOO5, HSPC021, HSPC025 e PAF67.

Os primeiros relatos da proteína HSPC021 foram realizados por Morris-Desbois e colaboradores (2001), que através de experimentos de imunoprecipitação e análises por espectrometria de massa mostraram sua interação com Int-6. O gene *int-6* é um sítio comum de integração de provírus em lesões mamárias pré-neoplásicas e neoplásicas (MARCHETTI et al., 1995), gerando a produção de transcritos metilados e, conseqüentemente, de formas reduzidas da proteína, o que altera o controle do crescimento celular. A proteína Int-6 foi caracterizada como uma subunidade do fator 3 de iniciação de tradução eucariótica (eIF3) (ASANO et al., 1997). Morris-Desbois e colaboradores (2001) avaliaram se HSPC021 estava associada com eIF3. Foi constatada a co-eluição de HSPC021 com Int-6 e eIF3, e que HSPC021 estava incorporada em eIF3 tanto em lisados de reticulócitos de coelho quanto em células COS7. Uma interação proteína-proteína direta ocorreu entre HSPC021 e Int-6, mas a análise de diferentes mutantes de HSPC021 indicou que a maior região da proteína é necessária para a incorporação em eIF3 quando comparado com a ligação à Int-6. Dessa forma, os resultados estabeleceram que HSPC021 está firmemente associada com o fator de iniciação da tradução em mamíferos eIF3.

Também no ano de 2001, Seither e colaboradores descreveram e caracterizaram funcionalmente a proteína PAF67 como sendo associada a uma sub-população da enzima RNA polimerase I (Pol I) celular. PAF67 está inserida numa classe de proteínas acessórias à Pol I de mamíferos – as PAFs (*polymerase-associated factors*). A presença ou ausência de diversos PAFs pode ser a causa das diferenças funcionais das frações da Pol I celular, e sugere que os PAFs podem ser alvos de vias regulatórias.

Os resultados dos experimentos de Seither et al. mostraram a necessidade de PAF67 para que a Pol I transcrevesse especificamente moldes de rDNA. PAF67 está co-localizada com Pol I no nucléolo em sítios de transcrição ativa de rDNA, indicando uma função dessa proteína para a iniciação da transcrição de rDNA. Adicionalmente, os achados sugerem que a associação de PAF67 com Pol I habilita essa enzima para a montagem de um complexo de iniciação da transcrição produtivo na região promotora.

O fator eIF3, composto por 10-13 subunidades, apresenta um papel central na formação do complexo de pré-iniciação da tradução por recrutar a subunidade ribossômica 40S, preservar a dissociação entre as subunidades ribossômicas 40 S e 60 S, por promover a

associação com mRNA e o iniciador Met-tRNA, e interagir com outros fatores de iniciação envolvidos no início da tradução, estabilizando várias dessas interações. Os mecanismos moleculares pelas quais eIF3 desempenha essas funções são pouco esclarecidos (DAMOC et al., 2007).

Masutani e colaboradores (2007), mostrou em seu trabalho que algumas subunidades do complexo eIF3 são dispensáveis para o recrutamento da subunidade ribossômica 40S ao mRNA, sendo uma delas a subunidade eIF3L. Neste estudo, o complexo protéico eIF3 foi purificado para identificação de suas subunidades, e posteriormente usando um sistema de expressão em Baculovírus as subunidades individuais foram avaliadas quanto às suas interações umas com as outras em células Sf9. Por cromatografias e filtrações, foi identificado que 11 subunidades (inclusive eIF3L) interagem *in vivo*, constituindo o complexo eIF3. No entanto, foram feitas deleções em eIF3 para algumas subunidades, como eIF3L, e testadas quanto à capacidade de recrutamento do ribossomo 40S *in vitro*. Assim, foi mostrado que na ausência de eIF3L o recrutamento ribossômico acontece normalmente, podendo esta ter outra função no complexo eIF3, ainda desconhecida.

Damoc e colaboradores (2007), usaram em seu trabalho espectrometria de massa para determinar modificações pós-traducionais que poderiam regular a atividade de eIF3 durante o processo de início de tradução. Várias modificações pós-traducionais foram identificadas, uma delas na subunidade eIF3L, a qual sofre uma perda de metionina N terminal com subsequente formação de uma nova extremidade N terminal, uma serina N-acetilada.

Em 2008, Zhou e colaboradores, usando espectrometria de massa para avaliação das interações entre subunidades do complexo eIF3, definiu que as subunidades c: d: e: l: k contituem um módulo de interação. Esse módulo pode formar subcomplexos de dímeros, (l: k) e (e: l), trímero (e: l: k) e tetrâmeros (d: e: l: k) e (c: e: l: k). Além disso, foi avaliado a associação de eIF3 com HCV - IRES (*Internal ribosome entry site* do vírus da Hepatite C). Alguns vírus, como o HCV, não dependem de eIF3 para o recrutamento da subunidade ribossômica 40S para início da tradução, isso é feito por uma região de RNA do vírus IRES. Após a formação de IRES - 40S, é recrutado o complexo eIF3. Neste trabalho, foi mostrado que a subunidade eIF3L, dentre outras, não está diretamente envolvida na interação com IRES.

Assim, eIF3L não está envolvida diretamente no recrutamento da subunidade 40S do ribossomo, da mesma forma como não está envolvida no recrutamento em vírus com IRES. Esse fato confirma que eIF3L pode ter outra função no complexo eIF3, tal como a de estabilizar interações nos complexos formados.

Ainda recentemente foi demonstrado que eIF3L (antes identificada como eIF3S6IP) é modulada em células infectadas por YF vacinal (Scherer et al., 2007). Além disso, Schoggins et al., 2011 mostrou que a superexpressão de eIF3L reduz a replicação de YFV. Apesar desses encontrados, a função de eIF3L na replicação viral permanece desconhecida.

1.6. Relevância e Justificativa

A febre amarela é uma enfermidade que ocasiona relevante morbidade e mortalidade nas regiões tropicais da América do Sul. No Brasil, apesar da extensiva campanha de vacinação, aproximadamente 20% da população das áreas endêmica e de transição e quase 100% da população da área indene não estão vacinadas. Em adição, o mosquito *Ae. aegypti* encontra-se intensamente difundido em praticamente todos os estados do país. Indivíduos com febre amarela silvestre representam fontes potenciais de infecção para estes vetores, os quais podem iniciar epidemias urbanas explosivas e acometer milhares de pessoas entre a população não vacinada (mais de 118 milhões de pessoas susceptíveis) trazendo consequências importantes para a saúde pública e para a economia do país.

A replicação dos *Flavivirus* é um complexo mecanismo ainda não completamente compreendido, onde estão envolvidas interações entre o RNA viral, proteínas virais e proteínas celulares. Assim, é evidente a importância da identificação e caracterização das interações proteína-proteína participantes desse processo. Dentro desse contexto, uma das proteínas virais de considerável relevância para a replicação e patogenia dos *Flavivirus* é a NS5. A detecção e a caracterização de interações entre NS5 e proteínas celulares podem permitir um melhor entendimento da dinâmica da replicação viral e da modulação celular mediada pelo vírus, bem como fornecer meios para a elucidação dos mecanismos de patogênese, virulência e tropismo viral em infecções causadas pelo YFV ou outras flavivirose, incluindo as causadas pelos DENV. Além disso, o conhecimento das interações entre NS5 viral e fatores celulares pode fornecer dados significativos para o desenvolvimento de drogas que inibam especificamente uma interação proteína-proteína fundamental para o ciclo replicativo viral e o estabelecimento da febre amarela.

Considerando a relevância de eIF3L em complexos celulares, interações com patógenos, envolvimento na modulação de replicação viral e ausência de dados na literatura, torna-se importante também, elucidar as propriedades físico-químicas e estruturais da proteína.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo geral caracterizar a interação entre o domínio RNA polimerase da proteína N5S do vírus da febre amarela e a proteína celular eIF3L.

2.2 Objetivos específicos

1. Confirmar a interação NS5-eIF3L *in vitro*.
2. Confirmar e localizar a interação NS5-eIF3L em culturas celulares.
3. Avaliar o efeito da superexpressão de eIF3L na replicação do vírus da febre amarela em cultura celular.
4. Expressar e purificar em larga escala da proteína eIF3L para estudos estruturais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Confirmação da interação RdRp NS5-eIF3L (*plasmid linkage*)

3.1.1 Construção da isca RNAPol-pGBKT7

O domínio RNA polimerase (RNAPol), aminoácidos 297 a 910, de NS5 foi clonado no vetor pGBKT7 (CLONTECH Laboratories, Inc.) a partir dos produtos de PCR contendo sítios de restrição enzimática específicos. A inserção do gene de interesse neste vetor permite sua expressão em fusão com o domínio de ligação ao DNA (DNA-BD – DNA *binding domain*) da proteína Gal4, gerando, assim, uma proteína híbrida usada como isca para o sistema duplo-híbrido em levedura. A figura 7 representa o mapa do vetor pGBKT7.

A PCR foi realizada com os *primers* fRNAPOLEcoRI (5'TATGAATTCAATGACAACCCTACAGGACC3') e YFNS5PstRBD (5'TATCTGCAGTCAGATAAGCTCACCCAGTTGC3'), enzima *taq* DNA polimerase (*Platinum SuperMix High Fidelity*, Invitrogen) e pACNR-FLYF17D, plasmídeo que contém o genoma completo do YFV (gentilmente cedido pelo Dr. Charles Rice, *Rockefeller University*).

O produto da PCR e o vetor pGBKT7 foram duplamente digeridos com as enzimas EcoRI e PstI (Invitrogen) e purificado com etanol. Para a purificação, foram adicionados 3 volumes de etanol absoluto gelado, acetato de sódio para uma concentração final de 0,3 M, seguido por uma incubação de 30 min a -80°C. Os produtos da digestão foram centrifugados a 16000g por 20 min, o sobrenadante descartado e adicionados 3 volumes de etanol 70% gelado. Novamente os conteúdos foram centrifugados a 16000g por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet submetido à secagem por 15 min a 37°C e ressuspendido com 15 µl de água *Milli-Q*.

Após a geração dos fragmentos de restrição dos insertos RNAPol, bem como do vetor pGBKT7, estes foram ligados pela enzima T4 DNA Ligase (1 U/µL) (Invitrogen) na razão molar de vetor/inserto de 1:2. As reações de ligação foram incubadas a 16°C, durante 16 horas. Finalizado o período de incubação, seguiu-se à transformação bacteriana de 5 µl do produto de ligação em 50 µl de *E coli* DH5α quimicamente competente pelo método de cloreto de cálcio 0,1 M e plaqueado em meio seletivo de kanamicina 30 µg/ml (marcador de seleção do vetor pGBKT7).

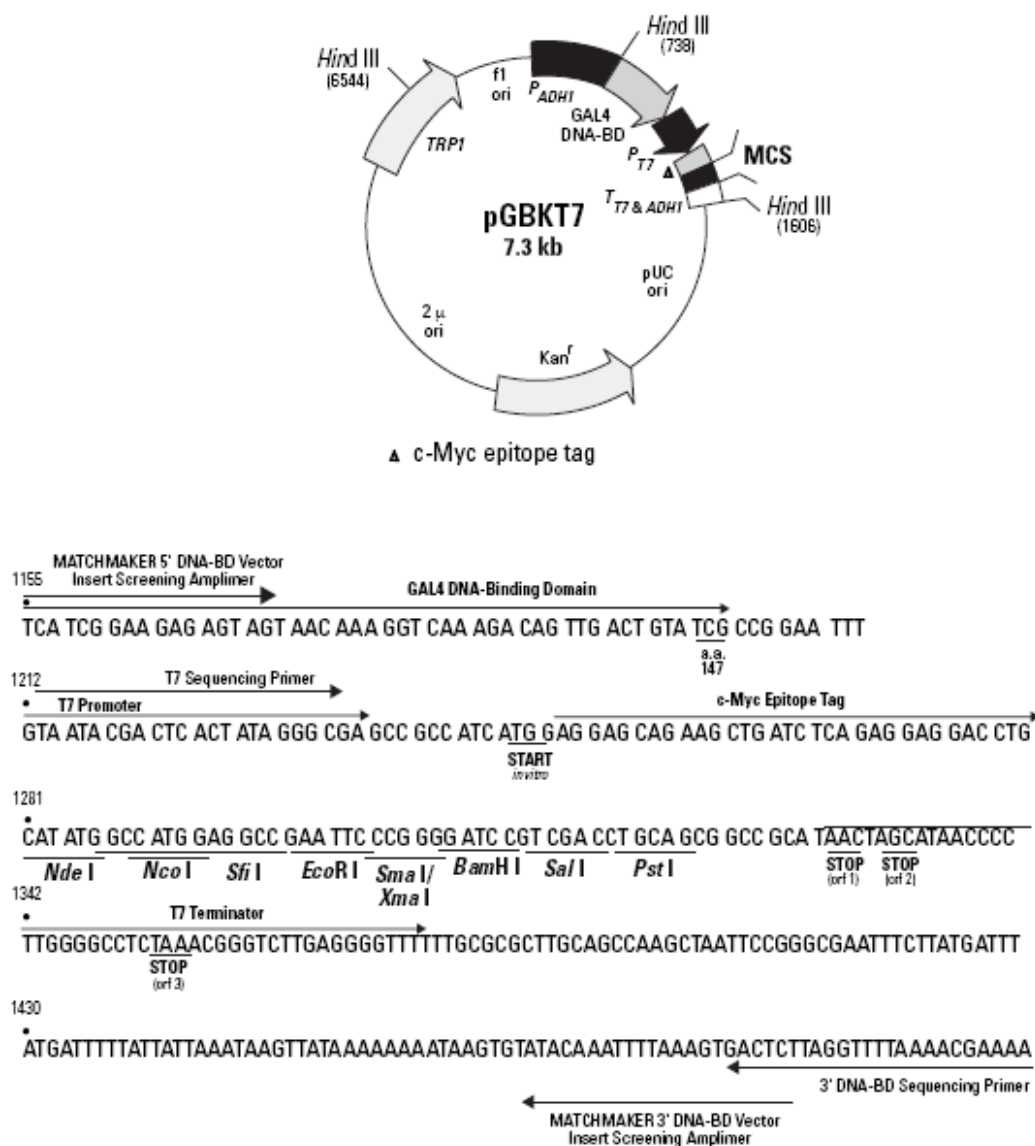


Figura 7. Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pGBKT7 (CLONTECH Laboratories, Inc.)

Para a produção de células competente, uma colônia da bactéria foi adicionada em 10 mL de meio líquido LB e incubada a 37°C por 16h com tampa semi-aberta. Em seguida, a cultura foi diluída na razão de 1:40 em meio LB, e novamente incubada nas mesmas condições até as células atingirem uma DO₆₀₀ de 0,4. A cultura foi então colocada no gelo por dez minutos, posteriormente centrifugada a 6000g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi

descartado e adicionado 2,4 ml de cloreto de cálcio gelado a 0,1 M. A solução foi homogeneizada cuidadosamente, centrifugada nas mesmas condições, e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 480 µl de cloreto de cálcio gelado a 0,1 M e a solução novamente homogeneizada cuidadosamente. As células competentes foram armazenadas no gelo até o momento do uso, não podendo ultrapassar o tempo de 48 horas.

Os transformantes foram avaliados por PCR utilizando os mesmos *primers* usados na amplificação. Os clones positivos com bandas de 1830 pb foram submetidos à extração de DNA plasmidial pelo kit MiniPrep High Pure Plasmid Isolation (Roche) para posterior sequenciamento pelo método de dideoxinucleotídeo, utilizando, para tanto, o kit BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA), *primers* a 3,2 pmol (Quadro 1). As seqüências obtidas foram analisadas no programa DS Gene 2.0 (Allcerys) (Dissertação MADRID,2007).

Quadro 1. *Primers* para sequenciamento do domínio RNA polimerase do gene NS5 do YFV clonados no vetor pGBKT7.

Amostra	Primer	Seqüência 5'- 3'
pGBKT7	T7	TAATACGACTCACTATAGGGC
	Gal4BDSeq3	CGTTTTAAACCTAAGAGTCAC
	Gal4BDSeq5	TCATCGGAAGAGAGTAG
RNApol NS5	NS5YFSEQ955F	GCGAGCATGGTAAATGGTG
	NS5YFSEQ1297F	TGGGAAGTGGTGGATGAAG
	NS5YFSEQ1663F	TTGAACTACATGAGCCCACATC
	NS5YFSEQ2223F	AGGAAGGGTGTCTCCAGGAAAC
	NS5YFSEQ1301R	TCCCAGAACTTTGGGTCTTG
	NS5YFSEQ1828R	CATAAGTCACTACCTGCCCCG
	NS5YFSEQ2400R	GTGGGTTGTTGGTTATCCATAC

3.1.2 Transformação em levedura da isca do duplo-híbrido

A isca RNApol-pGBKT7 foi transformada em levedura através da utilização do EZ-Yeast Transformation Kit – *Single Vector Transformation Protocol* (Q.BIO gene, USA).

Para tanto, inicialmente, a levedura *S. cerevisiae* AH109 (BD MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3, Clontech, USA) foi repicada em ágar YPD e incubada a 30°C durante dois ou três dias. Em seguida, uma massa celular de leveduras foi inoculada em 5 ml de meio YPD e incubada a 30°C, até DO₆₀₀ maior que 1 (16-18 horas). Atingida esta concentração celular, a cultura inicial foi transferida para dois novos tubos na diluição de

1:10, os quais foram centrifugados a 5900g por um minuto. Após remoção do maior volume possível de sobrenadante, foram adicionados sobre os precipitados de células *EZ-Transformation solution*, 2,0 µg de DNA do clone pGBKT7-RNAPol e DNA carreador, segundo recomendações do fabricante. Cada mistura foi, então, vigorosamente homogeneizada e incubada a 30°C por 30 minutos. Para a seleção dos transformantes, todo o conteúdo do tubo de transformação foi inoculado em ágar *drop-out* simples SD-Trp (com ausência do aminoácido triptofano, seleciona levedura que contém a isca devido à presença do marcador nutricional *TRP1* no pGBKT7). Após incubação a 30°C por dois a três dias, algumas colônias foram selecionadas e repicadas em ágar SD-Trp para estoque de leveduras contendo a isca RNAPol (Dissertação MADRID, 2007).

3.1.3 Transformação em levedura da presa do duplo-híbrido

A presa eIF3L-pACT2, clone isolado do *screening* feito com biblioteca de cDNA, (Dissertação Madrid, 2007) foi transformada em levedura através da utilização do EZ-Yeast Transformation Kit – *Single Vector Transformation Protocol* (Q.BIO gene, USA).

O vetor pACT2 (CLONTECH Laboratories, Inc.) está representado na figura 8. A inserção do gene de interesse neste vetor permite sua expressão em fusão com o domínio de ligação ao DNA (DNA-AD – DNA *activation domain*) da proteína Gal4, gerando, assim, uma proteína híbrida usada como presa para o sistema duplo-híbrido em levedura.

Para a transformação, a levedura *S. cerevisiae* AH109 contendo a isca RNAPol-pGBKT7 foi repicada em meio seletivo SD-Trp e incubada a 30°C durante dois ou três dias. Em seguida, repetiu-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a presa eIF3L-pACT2.

Para a seleção dos transformantes, todo o conteúdo do tubo de transformação foi inoculado em ágar *drop-out* simples SD-Trp-Leu (com ausência dos aminoácidos triptofano e leucina, seleciona levedura que contém a isca e a presa devido à presença do marcador nutricional *TRP1* no pGBKT7 e *LEU2* no pACT2). Após incubação a 30°C por dois a três dias, algumas colônias foram selecionadas e repicadas em ágar SD-Trp-Leu para estoque de leveduras contendo a isca e a presa em glicerol a -80°C (MADRID, 2007, dissertação de mestrado).

pACT2 AD Vector Information

GenBank Accession No.: U29899.

PT3022-5

Catalog 638822

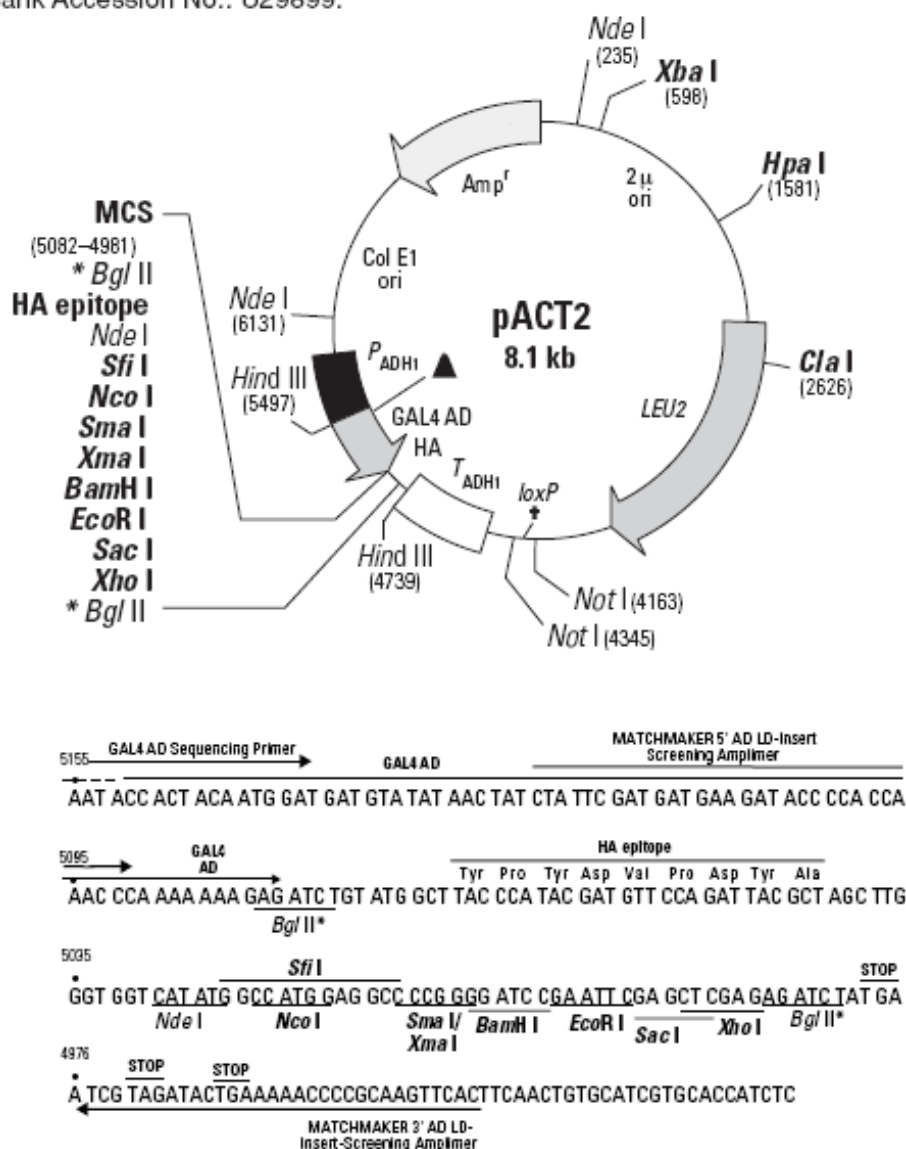


Figura 8. Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pACT2 (CLONTECH)

3.1.4 Transformação de plasmídeos controle em levedura

Conforme metodologia descrita acima, foram transformados sequencialmente, em levedura, plasmídeos usados como controles positivo e negativo para o estudo das interações proteína-proteína nos ensaios de duplo-híbrido.

Do grupo de plasmídeos que possuem DNA-BD de GAL4, além do pGBKT7 vazio, foram transformados o pGBKT7-Lam e o pGBKT7-53. O vetor pGBKT7-Lam expressa o DNA-BD em fusão com a proteína laminina C humana, a qual não está relacionada com a

formação de complexos, nem interage com a maioria das proteínas oferecendo, desta forma, um controle negativo para o estudo das interações protéicas. O vetor pGBKT7-53, por sua vez, expressa o DNA-BD de GAL4 em fusão com a proteína p53, a qual interage com o antígeno *large-T* de SV40 sendo, assim, usado como controle positivo.

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

A presença ou não de interações foi avaliada pelo teste de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* em ágar SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp a 30°C durante três dias (MADRID, 2007, dissertação de mestrado).

3.1.5 Teste de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*

Transformantes RNAPol-pGBKT7 + eIF3L-pACT2, controles positivo e negativo foram avaliados quanto à capacidade de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* de AH109, a partir da normalização do número de células por diluições seriadas das culturas e plaqueamento sob forma de *spots* nos meios apropriados. Para isto, foram preparadas culturas de cada levedura transformante em 2,0 mL de meio SD-Leu-Trp e incubadas a 30°C até DO₆₀₀ maior que 1. Em seguida, foram transferidos 100,0 µL de cada suspensão com DO₆₀₀ normalizada para um poço de microplaca e diluídas em série na razão de 1:10, com meio SD-Leu-Trp, para uma análise mais adequada do crescimento e do grau de ativação de um gene repórter. Foram aplicados, então, sob forma de *spots*, 4,0 µL da suspensão original e de cada diluição em ágar SD-Leu-Trp, SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp. A incubação das placas foi a 30°C até observação de crescimento, o que levou aproximadamente três dias (MADRID, 2007, dissertação de mestrado).

3.2 Mapeamento do domínio de interação com RNA polimerase

3.2.1 Construção das iscas RNAPol deletantes

Com o objetivo de mapear o domínio das interações proteína-proteína confirmadas no *plasmid linkage*, foram construídas 14 iscas contendo fragmentos deletantes amino (Δ 297-368; Δ 297-442; Δ 297-518; Δ 297-596; Δ 297-669; Δ 297-741; Δ 297-815) e carboxi-terminais de RNA polimerase de NS5 (Δ 826-910; Δ 752-910; Δ 677-910; Δ 605-910; Δ 527-910; Δ 451-

910; Δ377-910), as quais foram denominadas iscas RNAPol deletantes.

Para tanto, primeiramente, os 14 fragmentos deletantes de RNA polimerase foram produzidos, inseridos no vetor pGBKT7 e analisados conforme metodologia empregada para obtenção da isca contendo o segmento completo de RNA polimerase de NS5, descrita no item 3.1.1. Entretanto, os *primers* empregados para a amplificação dos fragmentos estão listados no Quadro 2, enquanto os utilizados para a reação de sequenciamento incluem ainda os do Quadro 1. Para a reação de ligação, foi utilizada a razão molar vetor/inserto 1:3 (MADRID, 2007, Dissertação de Mestrado).

Quadro 2. *Primers* para amplificação e sequenciamento dos fragmentos deletantes de RNA polimerase de NS5. As sequências para as enzimas de restrição estão sublinhadas.

Construção de RNAPol	Primer	Sequência 5'-3'
Deletantes forward	fRNAPOLEcoRI	TAT <u>GAA TTC</u> AAT GAC AAC CCC TAC AGG ACC
	2fEcoRIRNAPol	TAT <u>GAA TTC</u> GCG GGA ACT AGG AAG ATC
	3fEcoRIRNAPol	TAT <u>GAA TTC</u> CAC CAA CAA GGC AGG TGT
	4fEcoRIRNAPol	TAT <u>GAA TTC</u> GTG ATC AGA GAC CTG GCT
	5fEcoRIRNAPol	TAT <u>GAA TTC</u> CGA CGA GAC CAG AGA GG
	6fEcoRIRNAPol	TAT <u>GAA TTC</u> GTG GTC CGG CCC ATC
	7fEcoRIRNAPol	TAT <u>GAA TTC</u> GGA AGG GTG TCT CCA GG
	8fEcoRIRNAPol	TAT <u>GAA TTC</u> GTG TGG AAC AGA GTA TGG
Deletantes reversos	YFNS5pstRBD	TAT <u>CTG CAG</u> TCA GAT AAG CTC CAC CCA GTT GC
	2rPstIRNAPol	TAT <u>CTG CAG</u> TCA CCA TAC TCT GTT CCA CAC
	3rPstIRNAPol	TAT <u>CTG CAG</u> TCA TCC TGG AGA CAC CCT TCC
	4rPstIRNAPol	TAT <u>CTG CAG</u> TCA GAT GGG CCG GAC CAC
	5rPstIRNAPol	TAT <u>CTG CAG</u> TCA TCC TCT CTG GTC TCG TCG
	6rPstIRNAPol	TAT <u>CTG CAG</u> TCA AGC CAG GTC TCT GAT CAC
	7rPstIRNAPol	TAT <u>CTG CAG</u> TCA ACA CCT GCC TTG TTG GTG
	8rPstIRNAPol	TAT <u>CTG CAG</u> TCA GAT CTT CCT AGT TCC CGC

3.2.2 Análise de deleções em duplo-híbrido com as iscas RNAPol deletantes

Foram mapeadas as regiões em RNA polimerase responsáveis pela interação com a proteína eIF3L-pACT2. Para tanto, inicialmente, as 14 iscas RNAPol deletantes foram independentemente transformadas em levedura como já descrito. Em seguida, a presa, foi transformada nas leveduras contendo as iscas deletantes, conforme já descrito.

Os transformantes obtidos foram analisados quanto à ativação dos genes repórteres

HIS3 e *ADE2*, como descrito anteriormente. O domínio responsável pelo estabelecimento da interação entre RNAPol NS5 de YFV e eIF3L foi, então, definido segundo a ativação destes dois repórteres e denominado Domínio de Interação (ID) de RNAPol (MADRID, 2007, Dissertação de Mestrado).

3.2.3 Confirmação da interação entre o Domínio de Interação e a proteína eIF3L

A confirmação da interação entre o Domínio de Interação (ID), aminoácidos 370 a 449 de RNAPol, e a proteína eIF3L foi determinada em re-teste em duplo-híbrido. Inicialmente, o ID, de 240 pb, foi amplificado por PCR, utilizando os *primers* 2fEcoRIRNAPol (5`TATGAATTCGCGGGAAGTAGGAAGATC3`) e 7rPstIRNAPol (5`TATCTGCAGTCAACACCTGCCTTGTTGGTG3`), e clonado em vetor pGBKT7.

Transformação sequencial do pGBKT7-ID e pACT2-eIF3L, bem como dos controles, foi realizada em levedura, conforme previamente descrito. Os transformantes obtidos foram avaliados quanto à ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* (MADRID, 2007, Dissertação de Mestrado).

3.2.4 Modelo Estrutural da proteína RNA polimerase

Um modelo estrutural da RNAPol do YFV foi gerado com base na homologia entre as seqüências de aminoácidos referentes ao domínio RNA polimerase do YFV e do vírus Dengue, o qual apresenta uma estrutura cristalográfica de RNAPol definida (Protein Data Bank ID: 2J7U) (BRONZONI et al., 2011). Tal modelo foi gerado com a colaboração de Dra Carolina Santacruz-Pérez e João Barbosa do Centro de Biologia Molecular Estrutural do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas.

3.2.5 Mapeamento do domínio mínimo de interação com eIF3L

Para delimitar o domínio mínimo de interação entre RNAPol e eIF3L, o ID foi subdividido em três segmentos: Seg1, 2 e 3 (Figura 9), os quais foram amplificados e clonados em pGBKT7 para transformação sequencial com eIF3L-pACT2 em ensaios de duplo-híbrido. Os transformantes obtidos foram analisados segundo a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* (MADRID, 2007, Dissertação de Mestrado).

[gcg gga act agg aag atc atg aaa gtt gtc aac agg tgg ctg ttc cgc cac [ctg gcc
aga gaa aag aac ccc aga ctg tgc aca aag gaa gaa ttt att gca aaa gtc cga agt
cat gca gcc att gga gct] tac ctg gaa gaa caa gaa cag tgg aag act gcc aat gag
gct gtc caa gac cca aag] [ttc tgg gaa ctg gtg gat gaa gaa agg aag ctg cac
caa caa ggc agg tgt]

Figura 9. Sequência nucleotídica do Domínio de Interação, incluindo os três segmentos amplificados. [Segmento 1 = 132pb]; [Segmento 2 = 138pb] e [Segmento 3 = 51pb]. As sequências dos *primers* usados para amplificação destes segmentos estão sublinhadas.

3.2.6 Interação de ID de outros *Flavivirus* com a proteína eIF3L

A interação do ID de RNAPol NS5 dos *Flavivirus* dengue (DENV tipos 3 e 4) e Encefalite de *Saint Louis* (SLEV) com a proteína eIF3L foi analisada.

Para tanto, sequências nucleotídicas do gene NS5 destes vírus, incluindo YFV, obtidas no Genbank (acessos números: DENV3-AY858045; DENV4-AY762085; SLEV-AY632544 e YFV-DQ100292) foram alinhadas e analisadas utilizando o programa DS Gene 2.0 (Accelrys, USA). Com base neste alinhamento, a sequência do ID foi identificada para cada um dos *Flavivirus* e amplificada por PCR usando os *primers* descritos no Quadro 3. O produto amplificado foi inserido em vetor pGBKT7 para transformação sequencial com eIF3L-pACT2 e análise segundo a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* (MADRID, 2007, Dissertação de Mestrado).

Quadro 3. *Primers* usados na amplificação do ID de *Flavivirus*.

Primer	Sequência 3'-5'
fDENV3FABamHI	TATGGATCCTATGGCTTTGGAGAACCCTGGG
rDENV3FAPstI	CTCCTGCGAACACTTGCCCAATTTGTGGAGTTC
fDENV4FAEcoRI	TATGAATTCTGGCTGTGGGCCCTCCTTG
rDENV4FAPstI	TTACTGCAGACATTCCCTTCTTGGTGCAGAGCC
fSLEFABamHI	TATGGATCCTATGGCTGTGGGACTTCGTTGC
rSLEFAPstI	CTCCTGCGAGACTCTCCTTTAAGATGGGCTTC

3.2.7 Mapeamento de resíduos críticos do Segmento 3 do Domínio de Interação

Evidência funcional da interação entre as proteínas pode ser obtida inicialmente pelo mapeamento de resíduos de NS5 críticos para a interação com eIF3L. Isto foi realizado através de genética reversa, na qual foram introduzidas mutações no gene que codifica a proteína NS5, especificamente no segmento 3 (aminoácidos 433 a 449) do ID de RNapol, para investigar sua função gênica.

As regiões a serem alteradas em NS5 foram analisadas com a colaboração do Dr. João Barbosa (Laboratório Nacional de Luz Sincroton). A região FWELVDEERKLHQQGRC do segmento 3 do ID, a qual corresponde a uma sequência entre os aminoácidos 433 e 449, é considerada conservada entre os *Flavivirus* (Figura 10). Essa região foi então analisada com o uso de *softwares* específicos que predisseram as estruturas secundária e terciária da região mapeada. Em seguida, as mutações foram desenhadas e estão descritas no Quadro 5.

	433																449	
DEN3 PH86	F	W	K	L	V	D	R	E	R	E	L	H	K	Q	G	K	C	
DEN4 Sing 8978-1995	F	W	E	L	V	D	K	E	R	A	L	H	Q	E	G	R	C	
DEN 2 TnH-p11-93	F	W	E	L	V	D	K	E	R	N	L	H	L	E	G	K	C	
Edge Hill	F	W	A	L	V	D	K	E	R	R	A	H	L	E	G	R	C	
JEV\Vallore P20778	F	W	E	M	V	D	E	E	R	E	N	H	L	R	G	E	C	
SLE Arg 66	F	W	E	M	V	D	E	E	R	E	V	H	L	K	G	E	C	
YF	F	W	E	L	V	D	E	E	R	K	L	H	Q	Q	G	R	C	
Consensus	F	W	e	I	V	D	X	E	R	X	I	H	I	X	G	X	C	

Figura 10. Alinhamento de aminoácidos 433-449 referentes ao ID de *Flavivirus*.

(GenBank: DENV2-AF022437; DENV3-AY858045; DENV4-AY762085; Edge Hill-AF013372; JEV-AF080251; SLEV-AY632544; YFV-DQ100292). Fonte: Adaptado Madrid, 2007, Dissertação de Mestrado.

3.2.7.1 Construção do plasmídeo molde para mutagênese

Inicialmente, o ID do domínio RNA polimerase (NS5) foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega) a partir dos produtos de PCR contendo sítios de restrição enzimática específicos para posterior subclonagem no vetor pGBKT7.

O vetor pGEM®-T Easy possui múltiplos sítios de restrição, cauda de timina na extremidade 3`terminal para aumentar a eficiência de ligação do inserto ao plasmídeo, marcador de resistência à ampicilina, e o gene *lacZ* que codifica a enzima β -galactosidase. A enzima β -galactosidase converte a lactose presente no meio em galactose e glicose e um pigmento que tornam às colônias de coloração azul. Quando o gene de interesse está inserido no vetor, essa enzima perde sua atividade e então colônias brancas são formadas.

A Figura 11 representa o mapa do vetor.

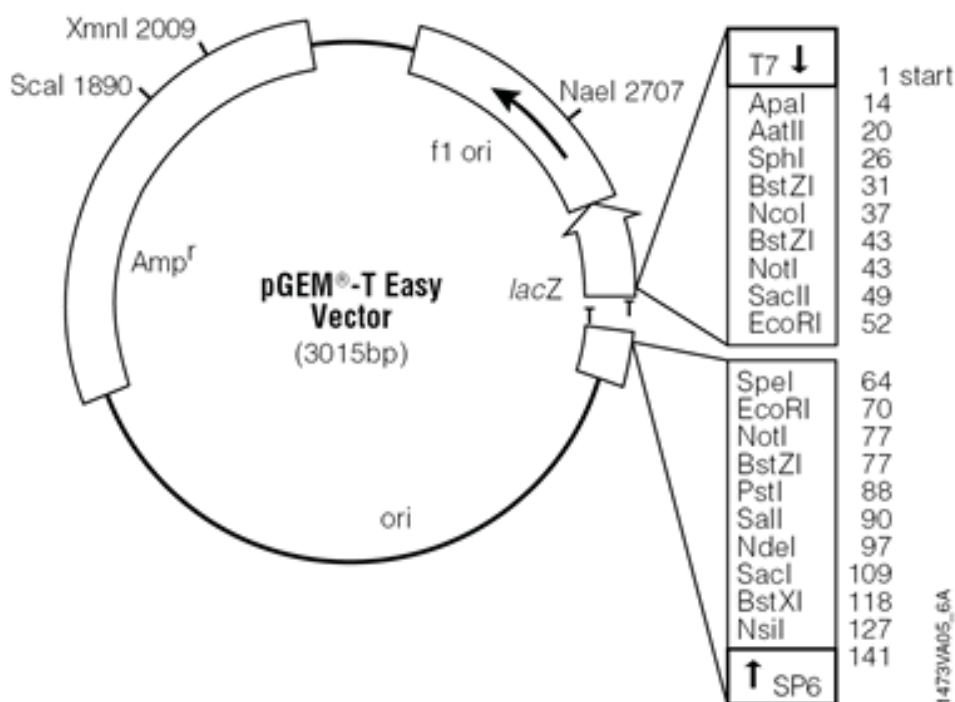


Figura 11. Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pGEM®-T Easy (PROMEGA)

Para a amplificação do inserto ID, foi empregado os *primers* 2fEcoRIRnaPol (10

pmol), cuja extremidade 5' contém sequência para a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) e 7rPstIRnaPol (10 pmol), com sequência para a enzima de restrição *PstI* (Invitrogen), também na extremidade 5'. A sequência de *primers* utilizados estão descritos no Quadro 4.

As reações de PCR foram feitas com enzima *taq* DNA polimerase Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen), acrescido de 0,5 µl de enzima Easy Taq DNA Polimerase (LGC Biotecnologia) para adição de uma cauda de adenina à extremidade 3' (garantia de maior eficiência de ligação ao vetor com cauda de timina), e DNA plasmidial pACNR-FLYF17D.

As ciclagens consistiram de um ciclo inicial de 94°C por um minuto, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por trinta segundos e 72°C por dois minutos, terminando com um ciclo de 72°C por 10 minutos para a finalização da extensão.

Eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para a verificação do produto da PCR de 240 pb. Os fragmentos amplificados foram extraídos pelo PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), purificados com etanol (protocolo item 3.1.1) e, posteriormente quantificados em espectrofotômetro.

Quadro 4. *Primers* usados na construção do plasmídeo ID-pGEM-T Easy

Primer	Seqüência 5'-3'
2fEcoRIrnaPol	TAT <u>GAA TTC</u> GCG GGA ACT AGG AAG ATC
7rPstIRnaPol	TAT <u>CTG CAG</u> TCA ACA CCT GCC TTG TTG GTG

3.2.7.1.1. Reação de Ligação

A reação de ligação foi feita segundo a equação:
$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{Kb inserto}}{\text{Kb vetor}} \times \frac{3}{1}$$

(inserto/vetor) pela enzima T4 DNA Ligase (1U/µL) (Invitrogen) e, incubada durante 16h/16°C. O produto da ligação foi precipitado com N-butanol. Para isso, foi adicionado ao produto da ligação 30 µl de água (RNase, DNase free) e 500 µl de N-butanol. A solução foi vortexada até ficar homogênea, e então centrifugada a 16000g/TA/10min. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco em temperatura e ressuspendido em 10 µl de água (RNase, DNase free).

3.2.7.1.2. Transformação em células competentes *E. coli* DH5α

O produto da ligação (5 µl) foi transformado em 50 µl de *E. coli* DH5α eletrocompetentes usando cuvetas de vidro (2 mm). O procedimento foi realizado em eletroporador (Eletroporator Eppendorf 2510) a 2,5 KV, 25 µFA e 200 Ω. Em seguida, foi adicionado 1 ml de meio Luria-Bertani (LB) e a mistura incubada a 37°C durante uma hora e meia. Ao final da incubação, a mistura foi centrifugada por um minuto a 16000g e o precipitado de células foi gentilmente ressuspendido e plaqueado em meio seletivo, contendo antibiótico ampicilina 50 µg/ml, X-Gal 2% (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranoside), IPTG 0,1 M (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) para indução de expressão gênica. Após secagem, as placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas, para crescimento dos transformantes.

3.2.7.1.3. Análise dos transformantes

Após a incubação, 10 colônias de transformantes ID-pGEMT foram selecionadas para triagem inicial quanto à presença de clones positivos. Para tanto, cada transformante foi inoculado em 4,0 mL de meio LB contendo antibiótico ampicilina 50 µg/ml, seguido por incubação a 37°C.

Decorrido o período de incubação de 16-18 horas, 2,0 µL de cada cultura foram analisados por PCR Easy Taq DNA Polimerase (LGC Biotecnologia) utilizando os mesmos *primers* usados na amplificação inicial (Quadro 4).

Para verificar a amplificação dos produtos de PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1%.

3.2.7.1.4. Extração de DNA plasmidial recombinante

Os clones positivos com bandas de 240 pb foram submetidos à extração de DNA plasmidial pelo kit MiniPrep High Pure Plasmid Isolation (Roche), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro.

3.2.7.1.5. Inserção de mutações no plasmídeo molde

O DNA plasmidial ID-pGEMT foi submetido à PCR utilizando quatro pares de *primers* (125 ng) contendo mutações desejadas, para isso, foi utilizando o kit Quick Change® II Site- Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Os *primers sense* e complementar foram desenhados de tal forma que reconhecessem a mesma sequência em fitas opostas e ambos contendo a mutação desejada. As sequências dos *primers* utilizados com as respectivas mutações introduzidas estão descritos no Quadro 5.

As reações de PCR foram feitas com a enzima *taq* DNA polimerase *PfuUltra* HF do kit, DNA plasmidial e os *primers*. As ciclagens consistiram de um ciclo inicial de 95°C por trinta segundos, seguido por 16 ciclos de 95°C por trinta segundos, 55°C por um minuto, terminando com um ciclo de 68°C por três minutos. Após as ciclagens, os produtos amplificados foram tratados com a endonuclease *DpnI* e incubados a 37°C durante uma hora. Essa enzima possui a sequência alvo 5'-Gm⁶ATC-3' e é específica para digerir DNA metilado, ou seja, todo o DNA parental molde, selecionando assim apenas o DNA sintetizado contendo as mutações.

Quadro 5. *Primers* selecionados para mutações sítio-dirigidas no Domínio de Interação.

Mutações	Primer	Sequência (5'-3')
F433A/W434A/V437A	sFWELV	ctgtccaagacccaaaggccgcggaactggcggatgaagaaagg
	rFWELV	cctttcttcatccgccagttccgcggcctttgggtcttggacag
D438N	sNEE	gttctgggaactggtgaatgaagaaaggaagctgc
	rNEE	gcagcttcctttcttcattcaccagttcccagaac
D438S	sSEE	gttctgggaactggtgagtgaagaaaggaagctgcaac
	rSEE	ggtgcagcttcctttcttcactcaccagttcccagaac
R441A/H444A	sRKLH	ggaactggtggatgaagaagcgaagctggccaacaaggc
	rRKLH	gccttggtggccagcttcgcttcttcatccaccagttcc

3.2.7.1.6. Transformação em células competentes *XL1-Blue*

Os produtos da PCR, com as possíveis mutações, foram transformados em bactéria *XL1-Blue* competentes, segundo recomendações do fabricante. O volume da transformação foi plaqueado em meio seletivo contendo ampicilina 50 µg/ml, X-Gal 2%.

3.2.7.1.7 Análise dos Transformantes

Foram selecionadas 10 colônias brancas de transformantes ID-pGEMT de cada mutação para triagem inicial quanto à presença de clones positivos. Para tanto, cada transformante foi inoculado em 4,0 mL de meio LB contendo antibiótico ampicilina 50 µg/ml, seguido por incubação a 37°C.

Decorrido o período de incubação de 16-18 horas, 2,0 µL de cada cultura foram analisados por PCR Easy Taq DNA Polimerase (LGC Biotecnologia) utilizando os mesmos *primers* usados na amplificação inicial (Quadro 4).

Para verificar a amplificação dos produtos de PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1%.

3.2.7.1.8. Extração de DNA plasmidial recombinante

Os clones positivos com bandas de 240 pb foram submetidos à extração de DNA plasmidial pelo kit MiniPrep High Pure Plasmid Isolation (Roche), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro.

3.2.7.1.9. Sequenciamento nucleotídico

Os clones positivos foram analisados para verificação das mutações inseridas no plasmídeo, bem como quanto à correta inserção do inserto no vetor pGEMT através de sequenciamento como já descrito no item 3.1.1, com os *primers* a 3,2 pmol descritos no Quadro 6.

Quadro 6. *Primers* usados no sequenciamento dos plasmídeos mutantes ID-PGEMT

Primer	Seqüência 5'-3'
T7PROMOTER	TAATACGACTCACTATAGGGC
7RPstIRnaPol	TAT CTG CAG TCA ACA CCT GCC TTG TTG GTG
2FEcoRIRnaPol	TAT GAA TTC GCG GGA ACT AGG AAG ATC
Gal4BDSeq3	CGTTTTAAACCTAAGAGTCAC

3.2.7.2 Recombinação dos plasmídeos mutantes no vetor pGBKT7

Após verificação das mutações no sequenciamento, os plasmídeos mutantes denominados ID (F433A/W434A/V437A)-pGEMT, ID (D438N)-pGEMT, ID (D438S)-pGEMT e ID (R441A/H444A)-pGEMT foram recombinados no vetor pGBKT7 para posterior teste em sistema duplo-híbrido.

3.2.7.2.1 Ensaio de Restrição Enzimática

Tanto os plasmídeos mutantes citados acima, quanto o vetor pGBKT7, foram submetidos ao ensaio de restrição enzimático com as enzimas *EcoRI* e *PstI* (Invitrogen) para digestão durante 2h a 37°C. Em seguida, foi feita eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação das digestões enzimáticas, e extração dos fragmentos do gel. Os fragmentos foram purificados com etanol e quantificados os DNAs em espectrofotômetro.

3.2.7.2.2 Reação de Ligação

As reações de ligação foram feitas segundo a razão de 1:2 (vetor/inserto) pela enzima T4 DNA Ligase (5U/ μ L) (Roche) e, incubada durante 16h a 4°C. Os produtos da ligação foram precipitados com N-butanol.

3.2.7.2.3 Transformação em células competentes *E. coli DH5 α*

Os produtos da ligação (5 μ l) foram transformados em 50 μ l de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. Ao final da incubação, a mistura foi centrifugada por um minuto a 16000g

e o precipitado de células foi gentilmente ressuspendido e plaqueado em meio seletivo, contendo antibiótico kanamicina 30 µg/ml (marcador de seleção do vetor pGBKT7). Após secagem, as placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas, para crescimento dos transformantes.

3.2.7.2.4 Análise dos transformantes

Após a incubação, 10 colônias dos transformantes de cada recombinação foram selecionadas para triagem inicial quanto à presença de clones positivos. Para tanto, cada transformante foi inoculado em 4,0 mL de meio LB contendo antibiótico kanamicina 30 µg/ml, seguido por incubação a 37°C.

Decorrido o período de incubação de 16-18 horas, 2,0 µL de cada cultura foram analisados por PCR Easy Taq DNA Polimerase (LGC Biotecnologia) utilizando os mesmos *primers* usados na amplificação inicial (Quadro 4).

Para verificar a amplificação dos produtos de PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1%.

3.2.7.2.5 Extração de DNA plasmidial recombinante

Os clones positivos com bandas de 240 pb foram submetidos à extração de DNA plasmidial pelo kit MiniPrep High Pure Plasmid Isolation (Roche), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro.

3.2.7.2.6 Sequenciamento nucleotídico

Os clones positivos foram analisados por sequenciamento, para avaliar a correta inserção dos insertos ao vetor pGBKT7.

3.2.7.3 Transformação em levedura dos plasmídeos mutantes (iscas) no duplo-híbrido

Inicialmente, a levedura *S. cerevisiae* AH109 foi repicada em ágar YPD e incubada a 30°C durante dois ou três dias. Em seguida, uma massa celular de leveduras foi inoculada em

aproximadamente 5,0 mL de meio YPD e incubada a 30°C, até DO₆₀₀ maior que 1 (16-18 horas). Atingida esta concentração celular, as culturas foram centrifugadas a 3000 g por um minuto. Foi então descartado o sobrenadante e adicionado água *MilliQ* para lavagem dos pellets, em seguida novamente centrifugadas e desprezado os sobrenadantes. As células foram ressuspensas em 1 ml de LiAc 100 mM (ácido lítico), incubadas por 15 minutos a 30°C, centrifugadas e o sobrenadante descartado. A massa de células competentes foi utilizada para as transformações das iscas ID (F433A/W434A/V437A)-pGBKT7, ID (D438N)-pGBKT7, ID (D438S)-pGBKT7, ID (R441A/H444A)-pGBKT7.

Para cada transformação foi adicionado primeiramente 25 µl de células competentes em tubos de 1,5 ml, em seguida 240 µl PEG (50%w/v), 36 µl de LiAc 1 M, 10 µl de DNA carreador *Herring Sperm* (Promega) (10 µg/µl) previamente aquecido por 5 minutos por 98°C e armazenado no gelo, 2 µg de DNA plasmidial e 45 µl de água *MilliQ* estéril. As soluções foram vortexadas até ressuspensão das células, e incubadas por 20 minutos a 42°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16000g durante 1 minuto, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas gentilmente em 200 µl de água *MilliQ* estéril. As suspensões celulares foram plaqueadas em ágar *drop-out* simples SD-Trp (com ausência do aminoácido triptofano, seleciona levedura que contém a isca devido à presença do marcador nutricional *TRP1* no pGBKT7). Após incubação a 30°C por dois a três dias, algumas colônias foram selecionadas e repicadas em ágar SD-Trp para estoque de leveduras contendo as iscas.

3.2.7.4 Transformação em levedura da presa eIF3L-pACT2 no duplo-híbrido

O plasmídeo eIF3L-pACT2 foi utilizado como presa no sistema duplo-híbrido para detecção de interações ou não com cada plasmídeo mutante.

Para a transformação, as leveduras *S. cerevisiae* AH109 contendo as iscas dos mutantes foram repicadas em meio seletivo SD-Trp e incubada a 30°C durante dois ou três dias. Em seguida, repetiu-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a presa eIF3L-pACT2.

Para a seleção dos transformantes, todo o conteúdo do tubo de transformação foi inoculado em ágar *drop-out* simples SD-Trp-Leu (com ausência dos aminoácido triptofano e leucina, seleciona levedura que contém a isca e a presa devido à presença do marcador nutricional *TRP1* no pGBKT7 e *LEU2* no pACT2). Após incubação a 30°C por dois a três dias, algumas colônias foram selecionadas e repicadas em ágar SD-Trp-Leu para estoque de leveduras contendo a isca e a presa.

3.2.7.5 Teste de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*

Os transformantes ID (F433A/W434A/V437A)-pGBKT7 + eIF3L-pACT2, ID (D438N)-pGBKT7 + eIF3L-pACT2, ID (D438S)-pGBKT7 + eIF3L-pACT2, ID (R441A/H444A)-pGBKT7 + eIF3L-pACT2, controles positivo p533D + T-AD e ID-pGBKT7 + eIF3L-pACT2, negativo pGBKT7Lam + pGADT7-T foram avaliados quanto à capacidade de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* de AH109.

3.3 Confirmação da interação NS5-eIF3L *in vitro* (GST-pull down)

3.3.1 Construção dos plasmídeos

A confirmação da interação da proteína NS5, ID do domínio RNA polimerase, com a proteína eIF3L foi realizada segundo metodologia empregada por Chung e colaboradores (2000). Inicialmente, foi construído o plasmídeo ID-GST a partir dos produtos de PCR contendo sítios de restrição enzimática específicos. A PCR foi realizada com os *primers* 2fEcoRIRNAPol e rFragAXho (Quadro 7), enzima *taq* DNA polimerase (*SuperMix High Fidelity*, Invitrogen) e pACNR-FLYF17D (plasmídeo que contém o genoma completo do YFV). O produto da PCR foi digerido com enzimas EcoRI e PstI (Invitrogen) e purificado com etanol para ligação no vetor de expressão em *E.coli* pGEX5x-1 (Invitrogen). O produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH5 α quimicamente competente pelo método de cloreto de cálcio 0,1 M. Os transformantes foram avaliados por PCR utilizando os mesmos *primers* usados na amplificação (Quadro 7) e os clones positivos com bandas de 240 pb foram submetidos à extração de DNA plasmidial pelo kit MiniPrep High Pure Plasmid Isolation (Roche) para posterior seqüenciamento pelo método de dideoxinucleotídeo, utilizando, para tanto, o kit BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA) e as sequências obtidas foram analisadas no programa DS Gene 2.0 (Alcercys).

O plasmídeo eIF3L-pSGFlag também usado no experimento foi cedido gentilmente por Pierre Jalinot, Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Lyon, France.

Quadro 7. Primers usados na construção do plasmídeo-GST

Primer	Seqüência 5'-3'
2fEcoRIRNAPol	TATGAATTCGCGGGAAGTAGGAAGATC
rFragAXho	TATCTCGAGTCAACACCTGCCTTGTTGGTG

3.3.2 Expressão de proteínas

O plasmídeo ID-GST e o vetor vazio pGEX5x-1 foram transformados em *E. coli* BL(DE3)21 (Stratagene) quimicamente competente pelo método de cloreto de cálcio 0,1 M, para teste da expressão protéica.

Uma colônia fresca do transformante foi inoculada em 1 ml de meio LB contendo o antibiótico cloranfenicol 100 µg/ml e ampicilina 50 µg/ml. As culturas foram incubadas a 37°C durante 16 horas. Em seguida, a cultura foi diluída na razão de 1:100 em meio LB com os mesmos antibióticos e incubada nas mesmas condições até DO₆₀₀=0,8. Uma alíquota de 1 ml foi colhida (zero hora) antes da indução com 1 mM IPTG. Seguiu-se a incubação durante 3 horas com colheitas de 1 ml realizadas a cada hora (1 h, 2 h e 3 h). As alíquotas foram mantidas em gelo até o momento em que foram centrifugadas a 16000g por 1 minuto. O pellet formado foi homogeneizado em tampão (2xSDS-loading buffer), aquecido a 99°C durante 5 minutos e aplicado em SDS-PAGE. O gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue* e fotografado em sistema de imagem Gel Logic 2200 (Kodak).

3.3.3 Purificação de ID-GST e GST

Inicialmente, as proteínas ID-GST e GST foram expressas em 500 ml de cultura de *E. coli* BL(DE3)21. O extrato celular foi homogeneizado em 20 ml de Tampão de Lise (Tampão Fosfato pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,2% de Triton X-100, 1 mM DTT, 5% Glicerol, 2 mM Benzamidina), sonicado (4 vezes de 20 segundos) e centrifugado a 16000g, durante 15 minutos. Alíquotas dos sobrenadantes e precipitados foram colhidas e analisadas em SDS-PAGE.

A purificação das proteínas na frações solúveis (sobrenadante) foi realizada por afinidade em coluna Glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences), com o auxílio de bomba peristáltica e fluxo de 1 ml/min. As proteínas purificadas foram analisadas em SDS-PAGE, concentradas e dialisadas usando o Centricon (Millipore), quantificadas pelo método

de Bradford utilizando o Bio Rad Protein Assay (Bio Rad) e armazenadas a 4°C.

3.3.4 GST-pulldown

No estudo, foi analisada a presença de interação entre o Domínio de Interação de NS5 do vírus da Febre Amarela e a proteína celular eIF3L através da técnica de proteínas de fusão GST.

Inicialmente, foram preparadas duas placas de 10 cm com aproximadamente $3,3 \times 10^6$ de células linhagem Hela (células epiteliais humanas provenientes de tumores cervicais) cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina 100U/ml e estreptomicina 100U/ml.

Após aproximadamente 16 horas de crescimento, com 90-95% de confluência da placa, as células foram transfectadas com o plasmídeo eIF3L-pSGFLAG usando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) na razão de 1:3 (DNA plasmidial:lipofectamina) em meio DMEM sem adição de antibióticos e soro fetal bovino, segundo recomendações do fabricante. O complexo DNA/lipofectamina foi adicionado à placa por 4-6h a 37°C em atmosfera úmida de 5%CO₂. Após decorrido esse tempo, o meio de cultura das placas foi substituído por DMEM 1%SFB com antibióticos e seguida a incubação por 48h nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. Como controle negativo, foram usadas células não transfectadas.

Após 48 horas, procedeu-se a lise celular. A monocamada celular foi previamente lavada 2x com tampão PBS Co-IP (0,15 M NaCl; 0,01 M Na₂HPO₄; pH 7,2), as células retiradas com auxílio de *scrap* e a suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 ml. A suspensão celular foi centrifugada a 1000g por 15 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas gentilmente com 3 a 5 volumes do pellet com tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5% NP-40; 1 mM NaF; 0,2 mM Na₃VO₄; 10 mM β-glicerolfosfato; inibidor de protease *Mini complete Roche*®), incubadas por 30 minutos a 4°C sob agitação branda. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 12000g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido, dosado pelo método de Bradford e estocado a 4°C até o momento do uso.

Para a realização do experimento foram adicionados 10 ug do ID-GST em duplicata em tubos de 1,5ml e 10 ug do GST em duplicata em outros tubos de 1,5ml, ambos diluídos em cerca de 1,250ml de tampão PBS filtrado gelado (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) acrescido de inibidores de proteases (cocktail *Mini complete Roche*®) e fosfatases (1mM NaF; 0,2mM Na₃VO₄; 10mM β-glicerofosfato). Em

seguida, foi adicionado nos tubos 50 µl de Slurry 50% (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare), preparado antes do uso segundo recomendações do fabricante. Os tubos foram incubados a 4°C em agitação branda por 1 hora. Decorrido o tempo, os tubos foram centrifugados a 800g a 4°C por 2 minutos, descartado o sobrenadante e as *beads* lavadas 5 vezes, nas 4 primeiras lavagens com 1ml de tampão PBS gelado e na última com tampão de lise para retirada de proteínas não ligadas à coluna de sepharose.

Foi então adicionado aproximadamente 600 µg de proteína (eIF3L-pSGFlag) do lisado celular nos tubos ID-GST 1 e GST 1; e 600 µg de proteína do lisado de células controle não transfectadas nos tubos ID-GST 2 e GST 2. O volume dos tubos foi completado em cerca de 1,250ml de tampão de lise descrito anteriormente. Os tubos foram incubados por 2 horas a 4°C em agitação branda. Posteriormente foram centrifugados a 800g a 4°C por 2 minutos e as *beads* lavadas 4 vezes com 1 ml do mesmo tampão de lise para retirada de proteínas não ligadas à coluna de sepharose. As *beads* foram ressuspensas em 50 µl de 2x SDS *loading buffer* e uma alíquota de 100 µg do lisado celular da transfecção foi ressuspensa em 5 µl 2x SDS *loading buffer* (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, contendo SDS 4%, glicerol 20%, 2-β-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,001 M) para teste de expressão da proteína eIF3L.

As amostras foram aquecidas a 99°C por 5 minutos para desnaturação protéica e aplicadas em SDS-PAGE 10% segundo, a 120 V, aproximadamente 3 horas em cuba vertical (MiniVE Vertical Electrophoresis System/ Amersham Biosciences). Após a corrida, foi realizado *Western Blotting* para detecção das interações. As proteínas foram transferidas em membrana de nitrocelulose PVDF (Immun-blot, Bio-Rad) em condições de 25 V, 300 mA, 1 h. Em seguida a membrana foi bloqueada em tampão de bloqueio (PBS 7,4 acrescido de 0,1% de Tween-20 e 10% de leite em pó desnatado) sob agitação branda/TA/1h. A membrana foi incubada em tampão de bloqueio contendo o anticorpo primário Anti-FLAG (1mg/ml; Sigma) produzido em mouse na diluição 1:1000. Após a incubação, a membrana foi lavada 3x durante 5 minutos com tampão PBS 0,3% Tween-20 para retirada de anticorpos não ligados. Prosseguiu-se então com a incubação da membrana com o anticorpo secundário Anti-Mouse (1mg/ml; Zymed) produzido em cabra, marcado com peroxidase, na diluição de 1:5000 durante 30 min em tampão de bloqueio. Após 3 lavagens de 5 min com PBS 0,3% Tween-20 para retirada de anticorpos não ligados, foi adicionado substrato quimioluminescente (ECL Plus ; GE Healthcare). A revelação foi feita em filme *High Performance Chemiluminescence Film* (Amersham Bioscience).

3.4 Confirmação da interação NS5-eIF3L em culturas celulares

3.4.1 Co-Imunoprecipitação

Para confirmar que a interação NS5-eIF3L forma um complexo *in vivo*, o teste de coimmunoprecipitação das proteínas NS5 e eIF3L foi realizado conforme metodologia descrita por Chua e colaboradores (2004), com algumas modificações. O ensaio foi realizado com o plasmídeo eIF3L-pSGFlag e vírus YFV de linhagem vacinal YF17D (Fiocruz, Brazil) para expressão da proteína NS5.

Inicialmente, foram preparadas quatro placas de 10 cm com aproximadamente $3,3 \times 10^6$ de células linhagem Vero (células de rim de macaco verde da África) cultivadas em meio *Minimum Essential medium* (MEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina 100U/ml e estreptomicina 100U/ml. Após aproximadamente 16 horas, com 90-95% de confluência das placas, o meio foi aspirado e adicionado meio MEM sem SFB e sem antibióticos.

As células Vero foram transientemente transfectadas com eIF3L-pSGFlag usando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) na razão de 1:3 (DNA plasmidial:lipofectamine) em meio MEM sem adição de antibióticos e soro fetal bovino, segundo recomendações do fabricante. Após 24 h, as células foram infectadas com 5 MOI de YFV cepa 17D e incubadas com MEM sem adição de SFB durante 2 h. As células infectadas foram lavadas com PBS e reincubadas em MEM com 1% SFB por 48 h na presença de 5% CO₂. Células Vero não transfectadas e não infectadas foram usadas como controle.

Após 48 horas, procedeu-se a lise celular. A monocamada celular foi previamente lavada 2x com tampão PBS Co-IP (150 mM NaCl; 0,01 M Na₂HPO₄; pH 7,2), e as células foram tiradas com o auxílio de *scrap*. A suspensão celular foi centrifugada a 420g a 4°C por 5min; o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas gentilmente com 3 a 5 volumes do pellet com tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0.1% NP-40; 5% glicerol; 1 mM NAF; 0.1 Na₃VO₄; 10 mM β-glicerolfosfato, e inibidor de protease *Mini complete* Roche) incubadas por 30min a 4°C em agitação branda. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 1000g a 4°C por 10min. O sobrenadante foi recolhido, dosado pelo método de Bradford e estocado a 4°C por curto período de tempo. A resina Anti-flag M₂ affinity gel (Sigma A₂₂₂₀) foi previamente ressuspensa antes do uso e 40μl dessa solução foi distribuída em 4 tubos de 1,5ml. Os tubos foram centrifugados a 5000g, 4°C por 30seg e descartado o sobrenadante. A resina foi lavada 2x com tampão TBS filtrado (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl) e equilibrada com 2x o volume das *beads* em tampão de lise.

Quantidades equivalentes dos extratos protéicos (0,5 mg) foram incubadas com a resina durante 3 h a 4°C em agitação branda. Os tubos foram centrifugados a 5000g, 4°C por 30seg e realizadas 3 lavagens com tampão TBS para retirada de proteínas não ligadas à resina Anti-Flag. Em seguida, ressuspendeu-se as *beads* em 50 µl de 2x SDS *loading buffer* e uma alíquota de 100µg dos lisados celulares controles foi ressuspensa em 5 µl 2x SDS *loading buffer* para teste de expressão das proteínas eIF3L e NS5-YFV.

Os complexos proteína-anticorpo foram resolvidos por SDS-PAGE como já descrito no item 3.3.4. A proteína NS5 foi identificada por Western blotting (item 3.3.4) usando anticorpo anti-YFNS5 (1:4000). Anti-YFNS5, produzido em coelho foi gentilmente cedido por Charles M. Rice, Rockefeller University (CHAMBERS et al., 1990) . Para a identificação da proteína eIF3L, foi usado anticorpo primário Anti-FLAG (1mg/ml; Sigma) na diluição de 1:1000. A revelação foi feita em filme High Performance Chemiluminescence Film (Amersham Bioscience).

3.5 Avaliação do efeito da superexpressão de eIF3L na replicação do vírus da Febre Amarela em cultura celular

3.5.1 Superexpressão de eIF3L

Para estabelecer a significância da interação de eIF3L com NS5YFV num contexto celular, foi avaliada a função de eIF3L em células BHK-21-Rep-YFV17D LucNeoIres, linhagem celular contendo um replicon YFV dual-reporter bicistrônico expressando um gene de resistência a neomicina e um gene reporter luciferase (OLIVEIRA & GIL, submitted).

Inicialmente, foi preparada uma placa de 96 wells com aproximadamente $2,38 \times 10^4$ de células BHK-21-Rep-YFV17D cultivadas em meio *Minimum Essential medium* (MEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina 100U/ml, estreptomicina 100U/ml e geneticina 500 µg/ml. As células BHK-21-Rep-YFV17D LucNeoIres com aproximadamente 70% de confluência foram transfectadas com o plasmídeo eIF3L-pCDNAFLAG usando reagente *LipofectamineTM 2000* (Invitrogen) de acordo com recomendações do fabricante. O vetor vazio pCDNAFLAG e células não transfectadas foram usadas como controles negativo. Como controle positivo de inibição da replicação viral, foi usado um RNAi contra NS1 YFV (PACCA et al., 2009). Após 48 h de transfecção, as células em cultura foram coletadas para análise da atividade de luciferase e expressão da proteína por *Western blotting*.

3.5.2 Ensaios de Atividade de Luciferase

Para os ensaios de atividade de luciferase, as células foram lisadas pela adição da solução *Lysis Buffer* (Promega) seguida de incubação à temperatura ambiente por 5 min. Os extratos celulares foram centrifugados à 12000g por 15 segundos em temperatura ambiente.

Os ensaios de luciferase foram realizados usando 10 µl de sobrenadantes celulares misturados com 100 µl do substrato Luciferina (*Luciferase 1000 Assay System*, Promega) antes das mensurações da atividade da luciferase usando Luminômetro (Berthold, Australia). Comparações entre três replicatas foram analisadas por test-t *Student* com significância de 5%.

3.5.3 Western blotting

Para análise em *Western blotting*, as células foram lisadas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, 10 mM β-glicerolfosfato, e inibidor de proteases *Cocktail Mini complete* Roche®).

Quantidades equivalentes de proteína foram ressuspendidas em 2x SDS *loading buffer* e aplicadas em SDS-PAGE 10% como já descrito no item 3.3.4. A proteína eIF3L foi identificada por Western blotting (item 3.3.4) usando anticorpo primário Anti-FLAG (1mg/ml; Sigma) na diluição de 1:1000. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão da proteína GAPDH, usando anticorpo primário Anti-GAPDH (1mg/ml; Sigma) na diluição de 1:10000. A revelação foi feita em filme *High Performance Chemiluminescence Film* (Amersham Bioscience).

3.6 Expressão e purificação da proteína eIF3L

3.6.1 Construção do plasmídeo

3.6.1.1 Amplificação do gene eIF3L

Inicialmente, foi construído o plasmídeo eIF3L-pET21a a partir dos produtos de PCR contendo sítios de restrição enzimática específicos.

O vetor pET21a (Novagen) carrega na sua porção C-terminal uma sequência His-tag, uma cauda de histidina com afinidade por íons níquel.

A Figura 12 representa o mapa do vetor.

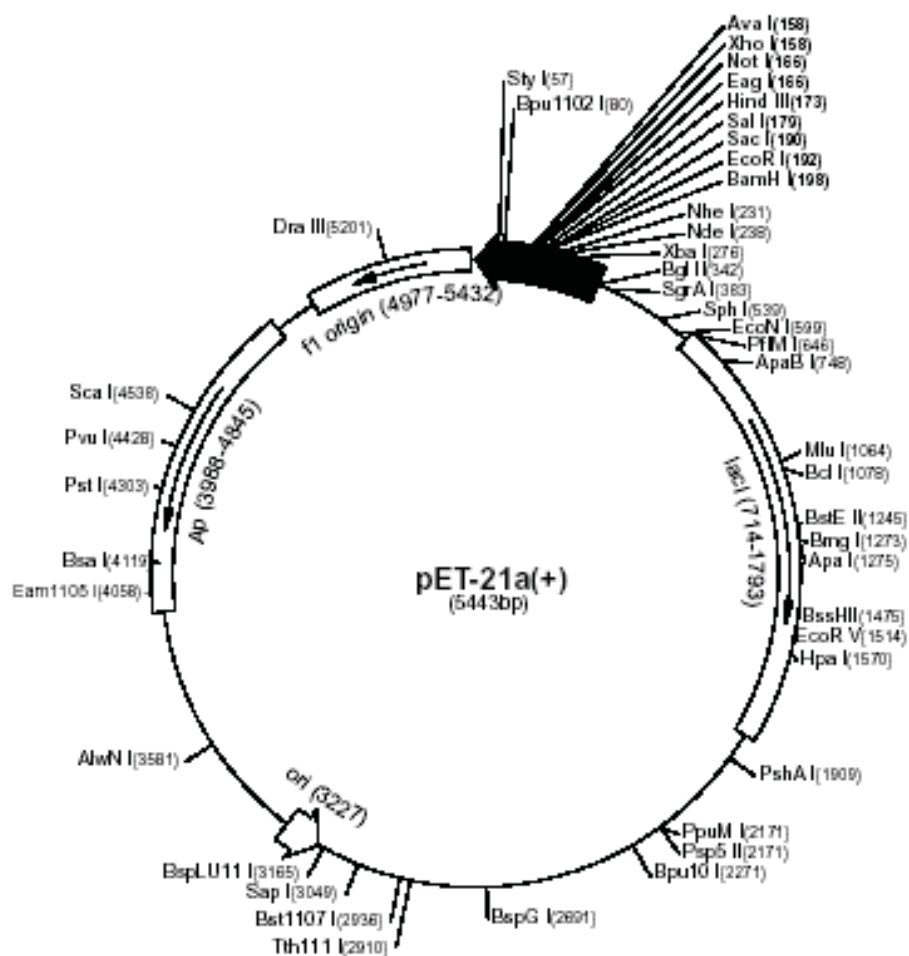


Figura 12. Mapa de restrição e sítios de clonagem do vetor pET21a (Novagen)

Para a amplificação do inserto eIF3L foi empregado os *primers* feIFpET21a (10 pmol), cuja extremidade 5' contém seqüência para a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) e reIFpET21a (10 pmol), com seqüência para a enzima de restrição *XhoI* (Invitrogen), também na extremidade 5'. A seqüência de *primers* utilizados estão descritos no Quadro 8.

As reações de PCR foram feitas com enzima *taq* DNA polimerase Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen) e DNA plasmidial eIF3L-pSGFlag. As ciclagens consistiram de um ciclo inicial de 94°C por dois minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minuto e 72°C por dois minutos, terminando com um ciclo de 72°C por 10 minutos para a finalização da extensão.

Eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para a verificação do produto da PCR

de 1600 pb. Os fragmentos amplificados foram extraídos pelo PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), purificados com etanol e, posteriormente quantificados em espectrofotômetro.

Quadro 8. *Primers* usados na construção do plasmídeo eIF3L-pET21a

Primer	Seqüência 5'-3'
feIFpET21a	TATGAATTCATGTCTTATCCCGCTGATGATTAT
reIFpET21a	TATCTCGAGAGGTCTCTGTCCCATCTTCTTCAGGG

3.6.1.2 Ensaios de Restrição Enzimática

Tanto o inserto eIF3L, quanto o vetor pET21a, foram submetidos ao ensaio de restrição enzimático com as enzimas EcoRI e XhoI (Invitrogen) para digestão durante 2h a 37°C. Em seguida, foi feita eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação das digestões enzimáticas do inserto e vetor, e extração dos fragmentos do gel. Os fragmentos foram purificados com etanol e quantificados os DNAs em espectrofotômetro.

3.6.1.3 Reação de Ligação

A reação de ligação foi feita segundo a razão de 1:2 (vetor/inserto) pela enzima T4 DNA Ligase (1U/μL) (Invitrogen) e, incubada durante 16h a 16°C. O produto da ligação foi precipitado com N-butanol.

3.6.2 Transformação em células competentes *E. coli DH5α*

O produto da ligação (5 μl) foi transformado em 50 μl de *E. coli* DH5α eletrocompetentes. Ao final da incubação, a mistura foi centrifugada por um minuto a 16000g e o precipitado de células foi gentilmente ressuspendido e plaqueado em meio seletivo, contendo antibiótico ampicilina 50 μg/ml (marcador de seleção do vetor pET21a). Após secagem, as placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas, para crescimento dos transformantes.

3.6.3 Análise dos transformantes

3.6.3.1 Triagem por PCR

Após a incubação, 10 colônias de transformantes eIF-pET21a foram selecionadas para triagem inicial quanto à presença de clones positivos. Para tanto, cada transformante foi inoculado em 4,0 mL de meio LB contendo antibiótico ampicilina (50 µg/ml), seguido por incubação a 37 °C.

Decorrido o período de incubação de 16-18 horas, 2,0 µL de cada cultura foram analisados por PCR Easy Taq DNA Polimerase (LGC Biotecnologia) utilizando os mesmos *primers* usados na amplificação inicial (Quadro 8).

Para verificar a amplificação dos produtos de PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1%.

3.6.3.2 Extração de DNA plasmidial recombinante

Os clones positivos com bandas de 1600 pb foram submetidos à extração de DNA plasmidial pelo kit MiniPrep High Pure Plasmid Isolation (Roche), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro.

3.6.3.3 Sequenciamento nucleotídico

Os clones positivos foram analisados quanto à ausência de mutações que possam ter sido originadas nas PCRs, bem como quanto à correta inserção dos insertos no vetor pET21a através de sequenciamento nucleotídico por método já descrito, utilizando os primers 3,2 pmol no Quadro 9. As sequências obtidas foram analisadas no programa DS Gene 2.0 (Accelrys).

Quadro 9. *Primers* usados no sequenciamento do plasmídeo eIF3L-pET21a

Primer	Seqüência 5'-3'
T7PROMOTER	TAATACGACTCACTATAGGGC
feIF198	GATTGACCAGAAAGTGTATGAGCT
feIF385	GGCAATGATGCTGTCTTCC
reIF385	GGAAGACAGCATCATTGCC
feIF651	CAATCCCCAAAATCTGGAATGTTCA
reIF651	CTATGAACATTCCAGATTTTGG
feIF880	ATCAAGGTGCTGGAGAACATC
reIF880	CGATGTTCTCCAGCACCTTGA
feIF1101	GCATGCGCTGCTGGCCAT
reIF1101	ATGGCCAGCAGCGCATGC
feIF1388	TCCTGAAGCTCTACACCAC
reIF1388	GTGGTGTAGAGCTTCAGGA
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGG

3.6.4 Transformação em células competentes *E. coli* BL(DE3)21

Inicialmente, foram preparadas células *E. coli* BL(DE3)21 (Stratagene) quimicamente competente pelo método de cloreto de cálcio 0,1 M. Para a transformação, 5 µl do DNA plasmidial de eIF3L-pET21a foi adicionado em 50 µl das células competentes. A solução foi incubada no gelo por 30 minutos, em seguida submetida a um choque térmico por 2 minutos a 42°C e novamente incubada no gelo por 2 minutos. Foram adicionados 250 µL de meio líquido SOC (meio SOB + 200 mM de glicose) e as bactérias foram submetidas a 37°C por 1 hora à 37°C. Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo (LB + ampicilina 50 µg/ml e cloranfenicol 100 µg/ml) e incubadas a 37°C por 16 horas.

3.6.5 Análise dos Transformantes

Após a incubação, 5 colônias de transformantes eIF3L-pET21a em BL21 foram selecionadas para triagem inicial quanto à presença de clones positivos. Para tanto, cada transformante foi inoculado em 4,0 mL de meio LB contendo antibiótico ampicilina (50 µg/ml), seguido por incubação a 37 °C.

Decorrido o período de incubação de 16-18 horas, 2,0 µL de cada cultura foram analisados por PCR Easy Taq DNA Polimerase (LGC Biotecnologia) utilizando os mesmos *primers* usados na amplificação inicial (Quadro 8).

Para verificar a amplificação dos produtos de PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1%.

3.6.6 Testes de expressão e solubilização da proteína recombinante

Para a padronização das melhores condições de expressão e solubilização da proteína eIF3L em *E.coli*, foram realizados testes, em pequena escala, com variações nas condições de temperatura de crescimento das culturas bacterianas, variações nas concentrações para indução com IPTG e solubilização.

Uma colônia fresca de eIF3L-pET21a selecionada de uma placa de transformação foi inoculada em 1ml de meio LB contendo antibióticos cloranfenicol (100 µg/ml) ampicilina (50 µg/ml). As culturas foram incubadas a 37°C, sob agitação, durante 16 horas. Após a incubação, o inóculo foi diluído (1:100) em 5 ml de meio LB com os mesmos antibióticos e incubado a diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 30°C e 37°C) até o crescimento celular ser observado na densidade óptica no valor de 0,6 unidades de absorbância a 600nm. Alíquotas de 1ml foram colhidas (0 h) antes da indução com variações de 0,2 mM; 0,5 mM; 1mM de IPTG (isopropil β -D- tiogalactopiranosídeo, análogo da lactose). Seguiu-se a incubação durante 3 horas, nas diferentes temperaturas. Após a indução, alíquotas de 1ml foram colhidas (3 h), e os restantes das culturas foram centrifugados a 16000g durante 10 minutos a 4°C. Para a lise celular, foi realizado um *screening* usando diferentes detergentes. A utilização de detergentes é feita para a supressão da formação de agregados insolúveis de proteína ou solubilização destes quando formados (KUDOU et al., 2011). Os detergentes não iônicos, fracos desnaturantes, utilizados foram t- octylphenoxypolyethoxylethanol (Triton X-100), octylphenoxypolyethoxylethanol (Nonidet P-40) e Monolaurato de sorbitan etoxilado 20 (Tween-20). Os detergentes iônicos, fortes desnaturantes, foram dodecilsulfato de sódio (SDS) e N- lauroylsarcosine (Sarkosyl). Na classe dos detergentes ziteriônicos foi utilizado o brometo de dodeciltrimetilamônio (CHAPS). Todos eles foram usados em concentrações de 0,5 a 2%. Foram usados também solventes altamente desnaturantes como a uréia e hidrocloreto de guanidina, com concentrações variando de 1 a 8 M. Além disso, o glicerol a 5% foi testado pela sua capacidade supressora de agregação.

3.6.7 Expressão e solubilização da proteína recombinante em grande escala

Sabendo-se das melhores condições de expressão e solubilização da proteína recombinante, foi realizada uma expressão em larga escala para produção de grande quantidade de eIF3L.

Uma colônia fresca de eIF3L-pET21a selecionada de uma placa de transformação foi inoculada em 10ml de meio LB contendo antibióticos cloranfenicol (100 µg/ml) ampicilina (50 µg/ml). As culturas foram incubadas a 37°C, sob agitação, durante 16 horas. Após a incubação, o inóculo foi diluído (1:100) em 500 ml de meio LB com os mesmos antibióticos e incubado a 25°C até o crescimento celular ser observado na densidade óptica no valor de 0,6 unidades de absorbância a 600nm. A densidade celular da cultura foi determinada por mensuração da OD em 600 nm usando espectrofotômetro *Bio Photometer* (Eppendorf). Uma alíquota de 1ml foi colhida (0 h) antes da indução com 1mM IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo, análogo da lactose). Seguiu-se a incubação durante 3 horas, a 25°C. Após a indução, uma alíquota de 1ml foi colhida (3 h), e o restante da cultura foi centrifugada a 16000g durante 10 minutos a 4°C. Foi descartado o sobrenadante e o pellet congelado a -20°C até o momento da lise celular. As frações coletadas durante a expressão foram diluídas em tampão *Loading Buffer* 2x e aplicadas em SDS-PAGE 10%.

O precipitado de bactérias proveniente da expressão foi ressuspenso em 10ml de tampão A [0,02M Na₂HPO₄; 0,5M NaCl; 5% glicerol; 2% sarkozyl; 0,005M Imidazol; 1mM PMSF (fenil-metil-sulfunil-fluoreto); pH 7,4]. Em seguida, foi adicionado Lysozima 10mg/ml (Sigma) para lise celular durante 30 min a 4°C e prosseguiu-se com ciclos de ultrassom em amplitude de 60%, com ciclos de 4s de pulso e 8s de descanso num tempo total de 10 min no equipamento *Sonics*. Foi adicionado à solução 0,8% de sulfato de estreptomicina (Sigma) durante 1h/4°C/ agitação, para precipitação do DNA presente na amostra. A amostra foi centrifugada a 16000g durante 20min a 4°C e o sobrenadante coletado para posterior purificação. Frações do sobrenadante e pellet foram coletadas, diluídas em tampão *Loading Buffer* 2x e aplicadas em SDS-PAGE 10% para análise da solubilidade das amostras.

3.6.8 Purificação em cromatografia de afinidade da proteína recombinante

Na cromatografia de afinidade um ligante com atração específica por alguma proteína da amostra é covalentemente acoplada à matriz da coluna. Quando uma amostra é aplicada na coluna, apenas as proteínas com afinidade ao ligante presente na resina permanecerão adsorvidas à matriz. O rompimento da ligação entre o ligante e a matriz pode ser feita por competição com ligantes de maior afinidade (BLOCK et al., 2009).

A proteína expressa a partir do vetor pET21a apresenta uma cauda de seis histidinas na sua região C-terminal, o que permite sua purificação por afinidade utilizando resinas com íons níquel.

O sobrenadante coletado, foi mantido a 4°C para purificação em cromatografia de afinidade com resina de níquel (HiTrap Chelating 5ml, GeHealthcare) em equipamento ÄKTA FPLC (GeHealthcare) para obtenção de uma proteína com alto grau de pureza.

A fração solúvel da proteína (sobrenadante) foi aplicada a 1ml/min na resina previamente equilibrada com 5 volumes da coluna (CV) de tampão A, e eluída em 20 CV com um gradiente linear de 0 a 100% de tampão B [0,02M Na₂HPO₄; 0,5M NaCl; 5% glicerol; 2% sarkozyl; 0,5M Imidazol; 1mM PMSF (fenil-metil-sulfunil-fluoreto); pH 7,4]. A absorbância das amostras em 280 nm foi analisada pelo software Unicorn 5.2 e as frações coletadas durante a purificação foram diluídas em tampão *Loading Buffer* 2x e aplicadas em SDS-PAGE 10% para análise da pureza das amostras.

3.6.9 Testes de concentração e diálise de eIF3L purificada

Devido ao fato de que eIF3L pudesse apresentar diferentes formas oligoméricas, os eluatos purificados dos picos 1 e 2 da cromatografia de afinidade foram concentrados e dialisados separadamente. Os diferentes testes de diálise e concentração foram realizados para avaliação do comportamento de eIF3L quanto à formação de precipitados e aderência aos filtros dos concentradores.

Os testes de diálise de eIF3L purificada (picos 1 e 2) foram realizados em membrana (Spectra/Por 6 – 8,00 kDa) a partir de 1 ml de eluato contra tampões com variação na concentração de sal. Os tampões utilizados foram 20 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl e 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl na proporção 1:100 (amostra/tampão).

Os testes de concentração foram realizados a partir de 1 ml de eIF3L purificada (picos 1 e 2) usando Centricon 30 kDa (Amicon); Amicon Ultra 30 kDa (Millipore); Diálise Reversa

usando PEG 20000. As amostras submetidas ao Centricon e Amicon foram concentradas a 4°C a uma rotação de 2000g para um volume final de 200 µl. Na diálise reversa, as amostras foram colocadas em membrana (Spectra/Por 6 – 8,00 kDa) e essa então coberta por PEG 20000 até uma redução de volume aproximada de 5 vezes. As concentrações das amostras foram determinadas através da medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro *Nano Drop Spectrophotometer 2000C* (Thermo Scientific). Frações foram coletadas durante os testes de concentração e estas diluídas em tampão *Loading Buffer 2x* e aplicadas em SDS-PAGE 10% para análise das amostras.

3.6.10 Ensaio espectroscópico – *Dynamic Light Scattering* (DLS)

O ensaio de DLS é utilizado para análise e verificação da homogeneidade (monodispersão) e estado de agregação da amostra, que são características essenciais para a realização de ensaios cristalográficos. Essas informações são importantes porque quanto mais homogênea for a amostra, maior a probabilidade de formação de cristais. Esse ensaio foi realizado com a finalidade de analisar se as amostras dos picos 1 e 2 da cromatografia de afinidade tinham características semelhantes ou se diferiam quanto à formação de agregados. Após a purificação por cromatografia de afinidade e concentração dos picos 1 e 2 (1,5 a 2,0 mg/ml), as amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a uma rotação de 16000g. O ensaio foi realizado utilizando o equipamento *Light Scattering Dyna Pro* (Proteins Solutions), a 18°C, utilizando no mínimo 50 µl da amostra a uma concentração de 2,0 mg/ml, aplicada em cubeta de quartzo evitando-se a formação de bolhas de ar. A amostra foi mensurada 200 vezes em um intervalo de 10 segundos e a análise dos resultados foram feitas usando o *software* Dynamics V6. A análise da amostra pelo feixe de raio laser detecta o coeficiente de translocação difusional, revelando o raio hidrodinâmico da proteína, assim estimando seu estado de agregação e a percentagem da massa molecular da amostra.

3.6.11 Purificação em cromatografia de gel filtração de eIF3L

A cromatografia de exclusão molecular ou gel filtração é uma técnica de separação controlada entropicamente, na qual as moléculas, na fase móvel, são separadas por sua colisão/interação com poros na fase estacionária (microesferas) de acordo com seu tamanho molecular (raio de Stokes).

A amostra concentrada proveniente da cromatografia de afinidade foi injetada em

coluna Sephadex 200 16/60 (Ge Healthcare) previamente equilibrada em tampão 20mM Tris pH 7,5; 150mM NaCl e conectada ao equipamento ÄKTA FPLC (GeHealthcare) a um fluxo de 0,5ml/min. A absorbância das amostras em 280 nm foi analisada pelo software Unicorn 5.2 e as frações coletadas durante a purificação foram diluídas em tampão *Loading Buffer* 2x e aplicadas em SDS-PAGE 10% para análise da pureza das amostras.

As frações com uma única banda de eIF3L foram misturadas, dialisadas com água ultrapura e liofilizadas e estocadas a - 20°C para análises espectroscópicas.

3.7 Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de luz polarizada ou dicroísmo circular (CD) é um método analítico amplamente utilizado para auxiliar a biologia estrutural na determinação da composição de estruturas secundárias de proteínas, e peptídeos. A origem dos espectros destas macromoléculas na região do ultravioleta próximo (180 a 250 nm) são predominantemente originados por transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos amida, os quais são influenciados pela geometria da cadeia peptídica, sendo os espectros reflexos das diferentes tipos de estruturas secundárias descritas pelos ângulos diedros ϕ e ψ (Figura 13A e 13B).

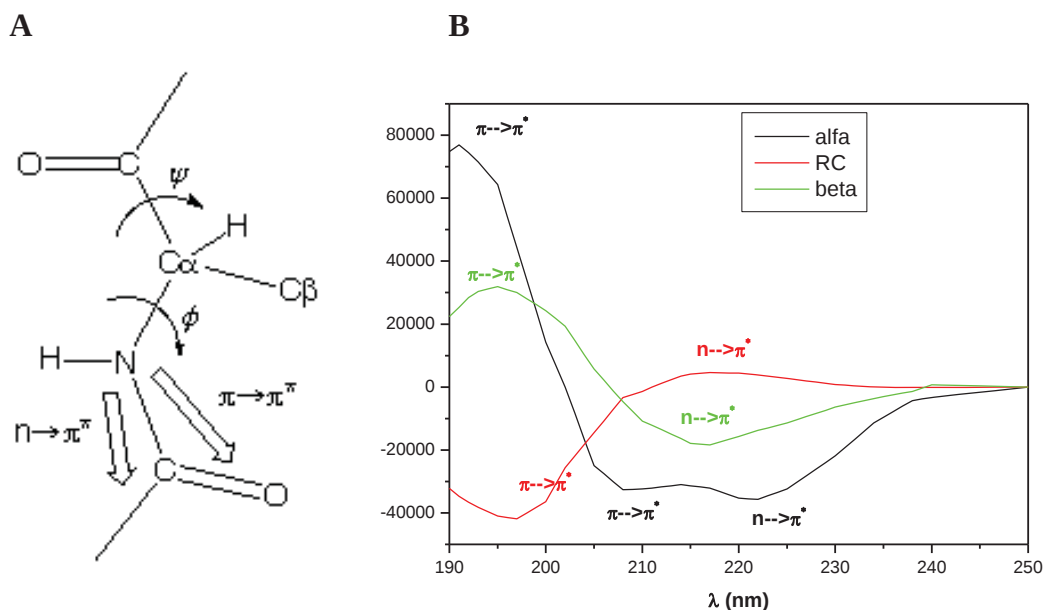


Figura 13. (A) Diagrama de ligação peptídica mostrando a orientação das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (setas grossas). (B) Espectros padrões de CD correspondentes a configurações hélice alfa (em preto), folha beta (em verde) e estrutura aleatória ou random coil (em vermelho).

Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) foram obtidos com um espectropolarímetro Jasco 815, com cubeta de 0,5mm de caminho óptico, termoestatizada a 20 °C, utilizando uma amostra de concentração 0,19mg/ml em tampão fosfato 150mM, pH 8,0. Cada espectro representa a média de 5 varreduras realizadas entre 190 e 260nm, com passos de 0,2nm, na velocidade de 50nm/min, e largura de banda de 1nm. A linha de base foi corrigida subtraindo o espectro da solução tampão obtido em condições idênticas. As intensidades dos espectros θ em mDeg. foram convertidas para unidades de elipticidade $[\Phi]$ em $\text{deg cm}^2 \text{decagramme}^{-1}$. A fração de estruturas secundárias foi analisada utilizando o programa de deconvolução espectral CDPPro (SREERAMAS & WOODY, 2000). Os resultados obtidos com as rotinas SELCON3, CDSSTR, e CONTINL foram similares, sendo utilizada para esta análise a média dos valores obtidos pelos três programas.

3.8 Análise estrutural de eIF3L por ferramentas computacionais

A estrutura tridimensional da eIF3L humana ainda não foi descrita na literatura. Assim, foram realizados estudos utilizando ferramentas computacionais para obtenção de algumas previsões. Previsões em relação às características estruturais (estrutura secundária,

regiões hidrofóbicas) e funcionais (modificações pós-traducionais, possíveis sítios de interação) foram realizadas pelos servidores *Psipred* (BUCHAN et al., 2010), *PredictProtein* (ROST et al., 2004) e *Q-Site Finder* (LAURIE et al., 2005).

Foi utilizado também a técnica de modelagem molecular para propor um modelo da proteína eIF3L. Para a modelagem da estrutura tridimensional da proteína foi utilizado o *I-Tasser* (ROY et al., 2010), um servidor baseado no método de *trading*. Este método utiliza potenciais estatísticos derivados da análise de padrões de enovelamento de proteínas com estruturas 3D conhecidas e armazenadas em uma base de dados (BUJNICKI, 2006). A partir destas estatísticas, uma proteína alvo pode ser predita mesmo não havendo estruturas homólogas na base de dados (KOLINSKI, 2004). O modelo foi otimizado pelo programa *Coot* (EMSLEY et al., 2010) e a qualidade do modelo validada pelo servidor *ProQ* (WALLNER et al., 2003) (usando LGscore e MaxSub) e *SAVES* (*Structural Analysis and Verification Server*). Para análise dos possíveis sítios presentes na proteína em estudo e melhor compreensão do seu mecanismo, foi realizado o *docking* entre as proteínas eIF3L e eIF3k (PDB: 1RZ4) pelo *PachDock* (DUHOVNY et al., 2002).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Confirmação da interação RNAPol NS5-eIF3L (*plasmid linkag*) (Dissertação MADRID, 2007)

4.1.1 Construção da isca RNAPol-pGBKT7

O domínio RNA polimerase (RNAPol), com aproximadamente 1830 pb, foi amplificado por PCR e visualizado utilizando eletroforese em gel de agarose, comprovando a amplificação.

O domínio amplificado foi inserido no vetor pGBKT7 e transformados em *E. coli*. Os transformantes obtidos (10 de cada construção) foram analisados por PCR para verificar a presença do inserto. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmou os transformantes positivos contendo domínio RNAPol de NS5.

A clonagem do domínio RNAPol de NS5 foi confirmada por seqüenciamento nucleotídico, o qual permitiu também a verificação da ausência de possíveis mutações que pudessem ter sido originadas nas PCRs, bem como a constatação da correta inserção do domínio no *frame* em pGBKT7. Desta forma, foi gerada a isca RNAPol NS5 para o *screening* em duplo híbrido.

4.1.2 Transformação em levedura da isca do duplo-híbrido

Para o *screening* em sistema duplo-híbrido foi realizada em levedura a transformação com a isca RNAPol-pGBKT7. Após aproximadamente três dias de incubação, verificou-se a presença de leveduras transformantes na placa com meio SD-Trp. Foram escolhidos três clones para armazenamento em freezer -80°C, e um deles para crescimento em meio líquido SD-Trp para a próxima etapa de transformação da presa.

4.1.3 Transformação em levedura da presa do duplo-híbrido

Foi realizada a transformação da presa eIF3L-pACT2 em levedura contendo previamente a isca RNAPol-pGBKT7. Após aproximadamente três dias de incubação, verificou-se a presença de leveduras transformantes na placa com meio SD-Trp-Leu. Foram escolhidos três clones para armazenamento em freezer -80°C, e um deles para crescimento em

meio líquido SD-Trp-Leu para a próxima etapa de ativação de genes repórteres.

4.1.4 Transformação de plasmídeos controle em levedura

Os controles foram transformados em levedura para serem usados no monitoramento do *screening* em sistema duplo-híbrido. Os resultados dessas transformações estão apresentados no Quadro 10. Houve crescimento de colônias em meio SD-His-Leu-Trp na transformação sequencial entre os plasmídeos usados para controle positivo, pGBKT7-53 com pGADT7-T. Para todas as outras transformações, o crescimento foi nulo, comprovando, assim, a inexistência de interações entre os plasmídeos usados para controle negativo.

Quadro 10. Interações entre plasmídeos usados como controles positivo e negativo nos ensaios de duplo-híbrido.

Transformações sequenciais em levedura		Resultados das interações	
Plasmídeos com DNA-BD de GAL4	Plasmídeos com AD de GAL4	SD-Leu-Trp	SD-His-Leu-Trp
pGBKT7-BD	pGADT7-AD pGADT7-T	Positivo Positivo	Negativo Negativo
pGBKT7-Lam	pGADT7-AD pGADT7-T	Positivo Positivo	Negativo Negativo
pGBKT7-53	pGADT7-AD pGADT7-T	Positivo Positivo	Negativo Positivo

4.1.5 Teste de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*

Os transformantes RNAPol-pGBKT7 + eIF3L-pACT2 e controles foram avaliados quanto à capacidade de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* de AH109 em placas SD-Leu-Trp, SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp através de diluições seriadas.

Após três dias de incubação a 30°C, foi observado crescimento de todas colônias

transformantes em meio-ágar SD-Leu-Trp, indicando que todos transformantes estavam com bom crescimento. No meio-ágar SD-His-Leu-Trp houve crescimento do controle positivo de interação (pGBKT7-53 + pGADT7-T) e de pGBKT7-RNApol + pACT-eIF3L, indicando interação positiva com ativação do gene repórter *HIS3*. No meio-ágar SD-Ade-His-Leu-Trp também houve crescimento no controle positivo de interação e na interação entre pGBKT7-RNApol + pACT-eIF3L, indicando interação positiva com ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*.

Os resultados são mostrados na Figura 14.

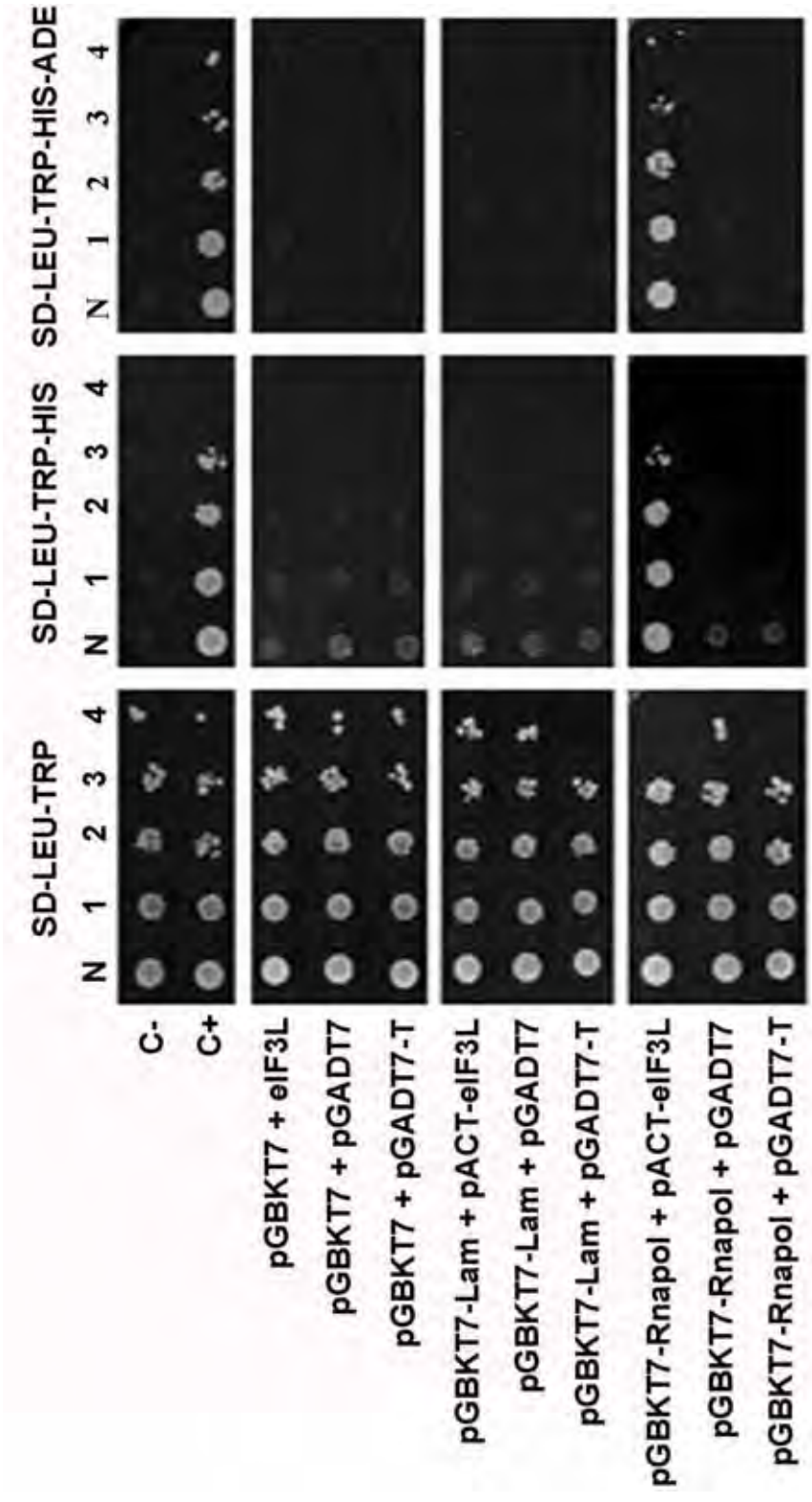


Figura 14. Perfil de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* na confirmação da interação entre o domínio RNA polimerase e a proteína eIF3L. N: amostra normalizada; 1-4: diluições seriadas de razão 10 da amostra; C - : controle negativo; C +: controle positivo.

4.2 Mapeamento do domínio de interação com RNA polimerase (Dissertação MADRID, 2007)

4.2.1 Construção das iscas RNAPol deletantes

Para realizar o mapeamento do domínio das interações proteína-proteína detectadas através do sistema duplo-híbrido foram geradas 14 iscas RNAPol deletantes. Assim, os 14 fragmentos deletantes de RNAPol foram amplificados, confirmados em eletroforese em gel de agarose 1%, inseridos no vetor pGBKT7 e transformados em *E. coli*.

Os transformantes obtidos foram, então, analisados por PCR para verificar a presença do inserto. Por fim, o sequenciamento genômico dos transformantes positivos pela PCR confirmou a correta inserção de cada fragmento deletante no *frame* de leitura do vetor pGBKT7 e excluiu a ocorrência de mutações nas seqüências.

4.2.2 Análise em duplo-híbrido com as iscas RNAPol deletantes

As iscas RNAPol deletantes geradas foram transformadas em levedura seguido de transformação sequencial do plasmídeo pACT2-eIF3L. Os transformantes obtidos foram analisados segundo a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*.

O crescimento de leveduras nos meios SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp indicou a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* pela interação dos fragmentos 1, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 com a proteína eIF3L. Tal resultado sugere que a região de interação (denominada *Interaction Domain* - ID) encontra-se entre os aminoácidos 370 e 449 de RNAPol NS5 (Figura 15).

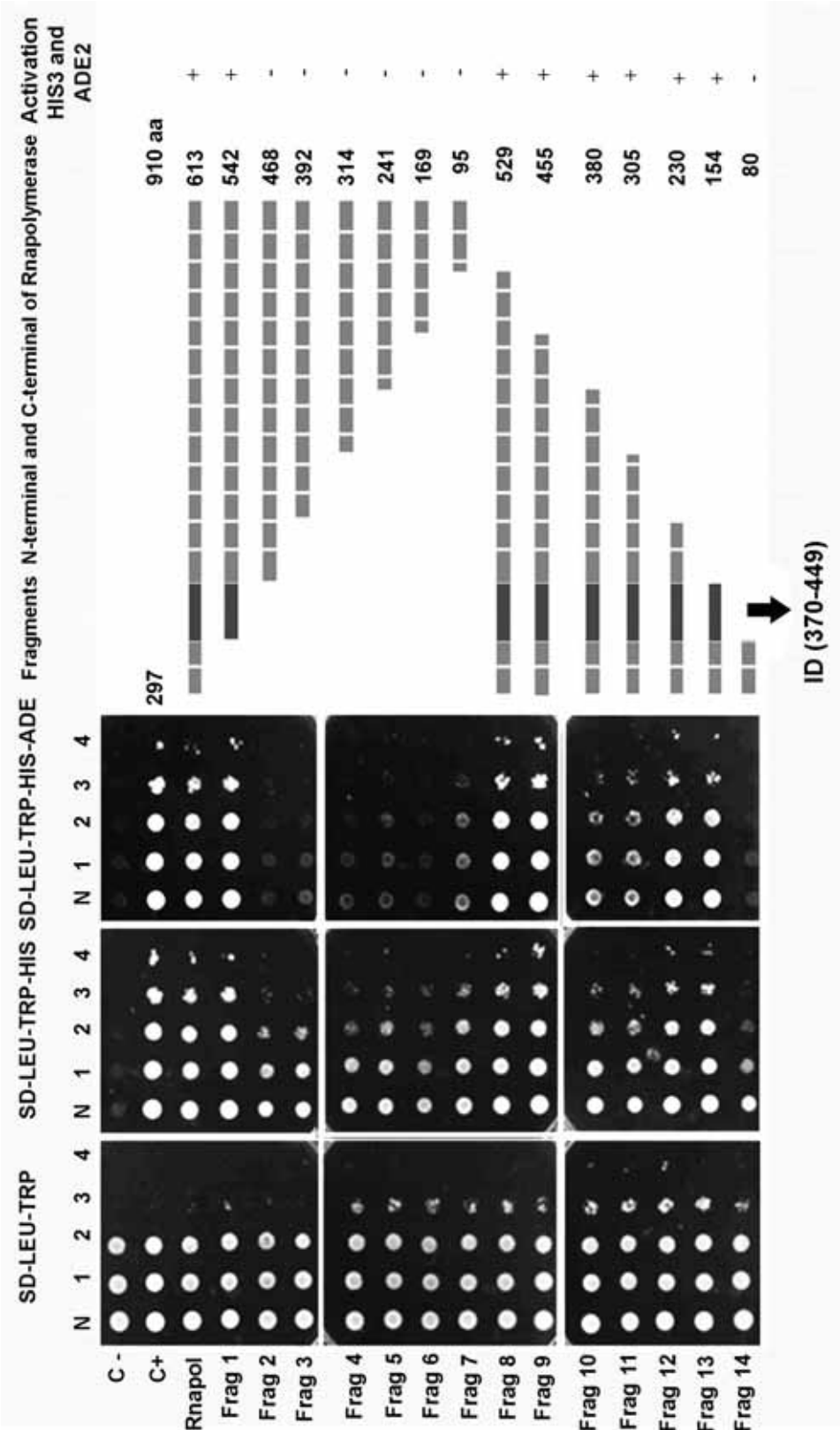


Figura 15. Determinação do domínio de interação entre fragmentos de RNA polimerase com a proteína eIF3L, segundo ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*. A área escura entre os aminoácidos 370 e 449 corresponde ao *Interaction Domain*.

4.2.3 Confirmação da interação entre o ID e a proteína eIF3L

Para a confirmação do ID de RNA polimerase como o domínio mínimo responsável pelas interações proteína-proteína com eIF3L foi gerada a isca ID RNAPol. Para isso, o ID foi amplificado, inserido no vetor pGBKT7 e transformado em *E. coli*. Os transformantes obtidos foram analisados por PCR para verificar a presença do inserto. O sequenciamento genômico de um transformante positivo na PCR confirmou a correta inserção do ID no *frame* de leitura do vetor pGBKT7 e excluiu a ocorrência de mutações na sequência.

O crescimento de leveduras nos meios SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp indicou a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*, confirmando a interação do ID com a proteína eIF3L. Não houve crescimento nos meios SD-Ade-His-Leu-Trp quando pGBKT7-ID foi transformado sequencialmente com pGADT7 vazio ou pGADT7-T, indicando que não houve auto-ativação pelo pGBKT7-ID (Figura 16).

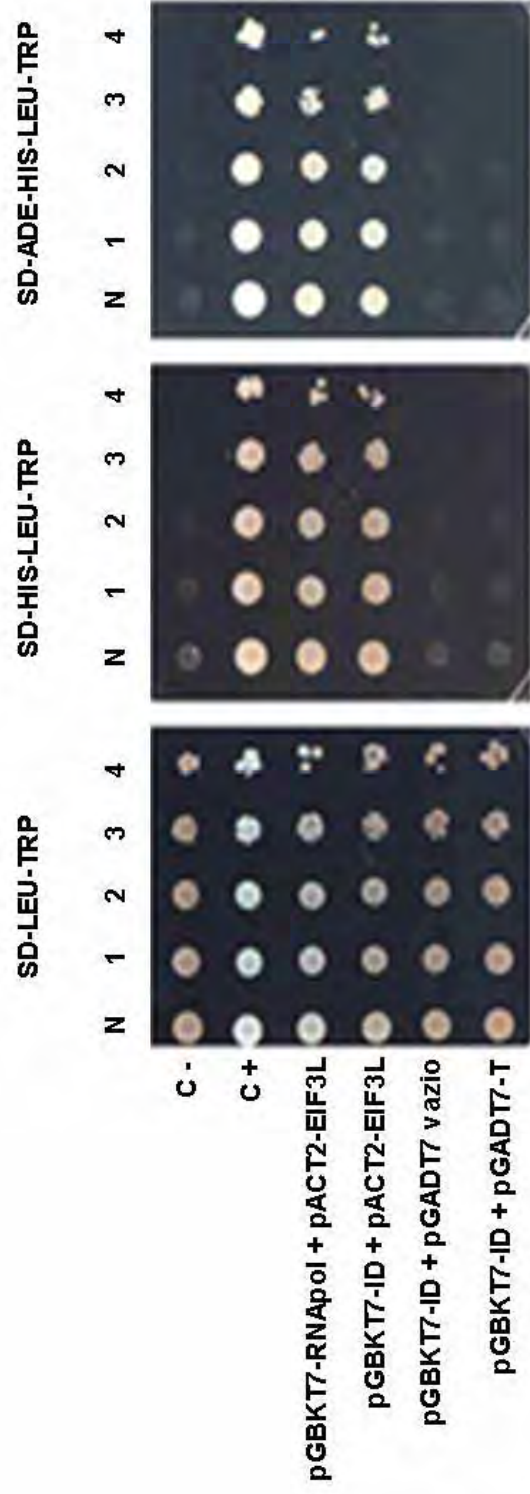


Figura 16. Ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* pela interação do ID com a proteína eIF3L. C-: controle negativo; C+: controle positivo; N: amostra pura; 1-4: diluições seriadas de razão 10 da amostra.

4.2.4 Modelo Estrutural da proteína RNA polimerase

Um modelo estrutural de RNAPol do YFV foi gerado com base na homologia entre as seqüências de aminoácidos referentes ao domínio RNA polimerase do YFV e do vírus Dengue.

A estrutura demonstra uma região externa entre os resíduos de aminoácidos 370 e 449 (em destaque nas cores vermelho e verde), a qual corresponde ao *Interaction Domain* (Figura 17) (BRONZONI et al.,2011).

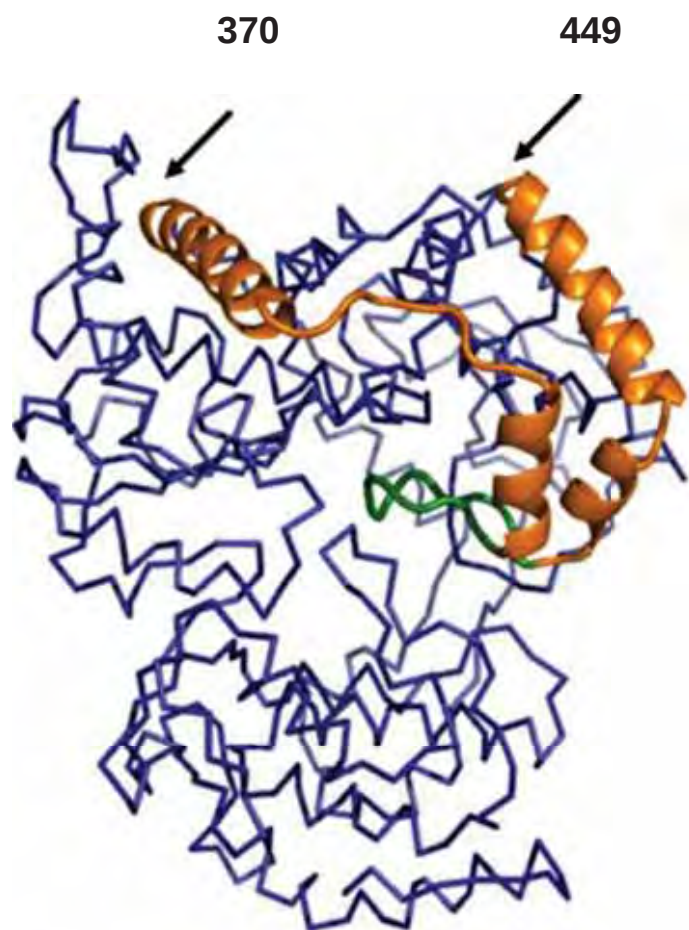


Figura 17. Modelo de homologia do domínio RNA polimerase da proteína NS5 do YFV. O ID está representando pelas cores alaranjada e verde. Adaptado de Bronzoni et. al, 2011.

4.2.5 Mapeamento do domínio mínimo de interação de ID com eIF3L

Para determinar o domínio mínimo de interação entre RNAPol e a proteína eIF3L, o ID foi subdividido em três segmentos: ID1, ID2 e ID3 e clonados em pGBKT7 para transformação seqüencial com eIF3L-pACT2 em ensaios de duplo-híbrido. O crescimento de leveduras nos meios SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp indicou a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* pela interação do Segmento 3 (ID3), terço final do ID, com a proteína eIF3L (Figura 18) (Dissertação MADRID, 2007).

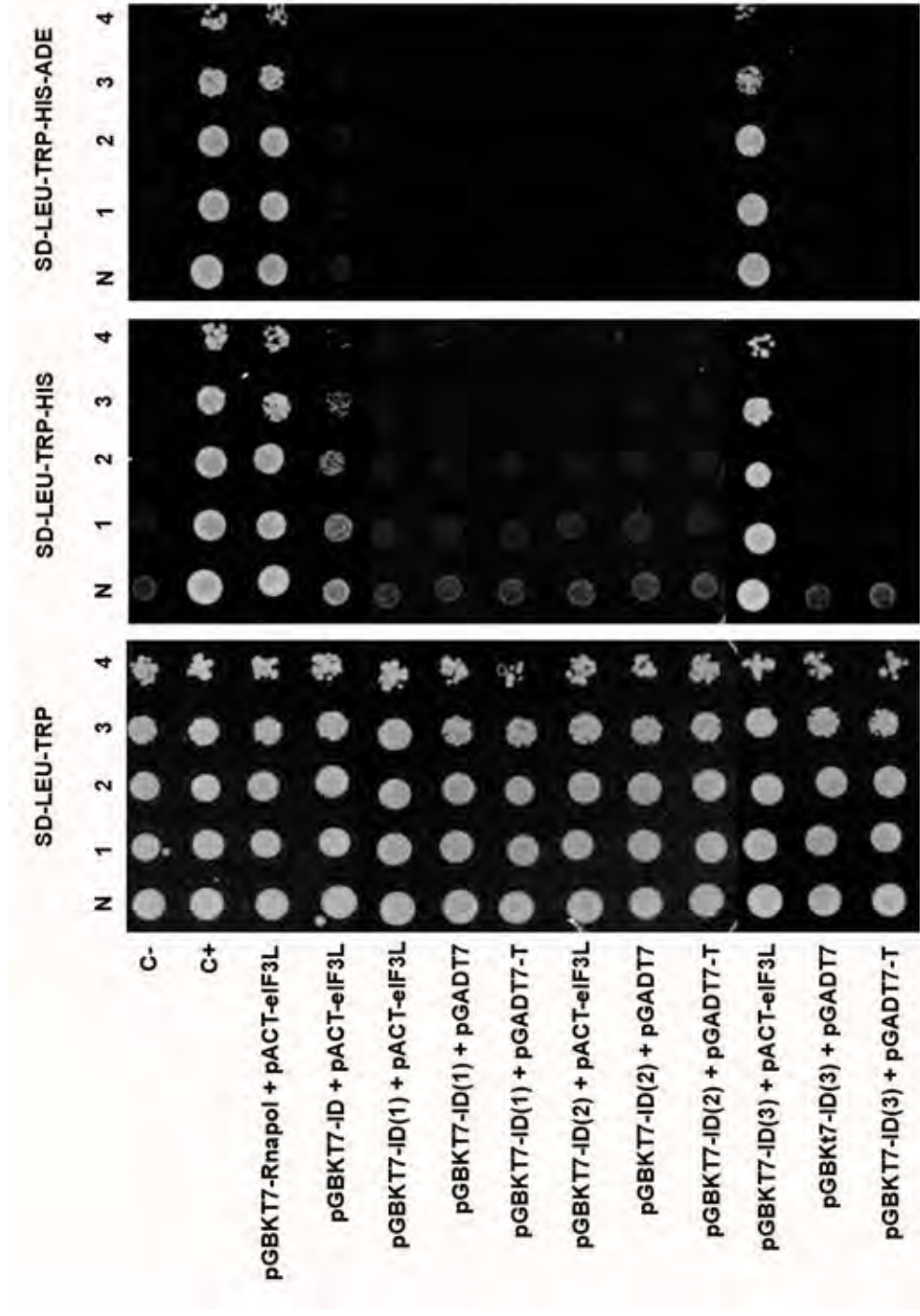


Figura 18. Ativação dos genes repórteres HIS3 e ADE2 pela interação do segmento 3 de ID com a proteína eIF3L. C-: controle negativo; C+: controle positivo; N: amostra pura; 1-4: diluições seriadas de razão 10 da amostra.

4.2.6 Interação do ID de outros *Flavivirus* com a proteína eIF3L

A interação do ID de RNAPol dos *Flavivirus* dengue (DENV tipos 3 e 4) e Encefalite de *Saint Louis* (SLEV) com a proteína eIF3L foi analisada.

O crescimento de leveduras nos meios SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp indicou a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* pela interação do ID de Dengue 3, 4 e SLE com a proteína eIF3L (Figura 19) (Dissertação MADRID, 2007).

Quando o alinhamento de aminoácidos referentes ao ID dos *Flavivirus* Dengue, SLE, Edge Hill e Encefalite Japonesa (JEV) foi realizado, regiões conservadas foram observadas, especialmente entre os resíduos 20 e 80 (correspondente aos aminoácidos 390 a 449 de NS5) (Figura 20).

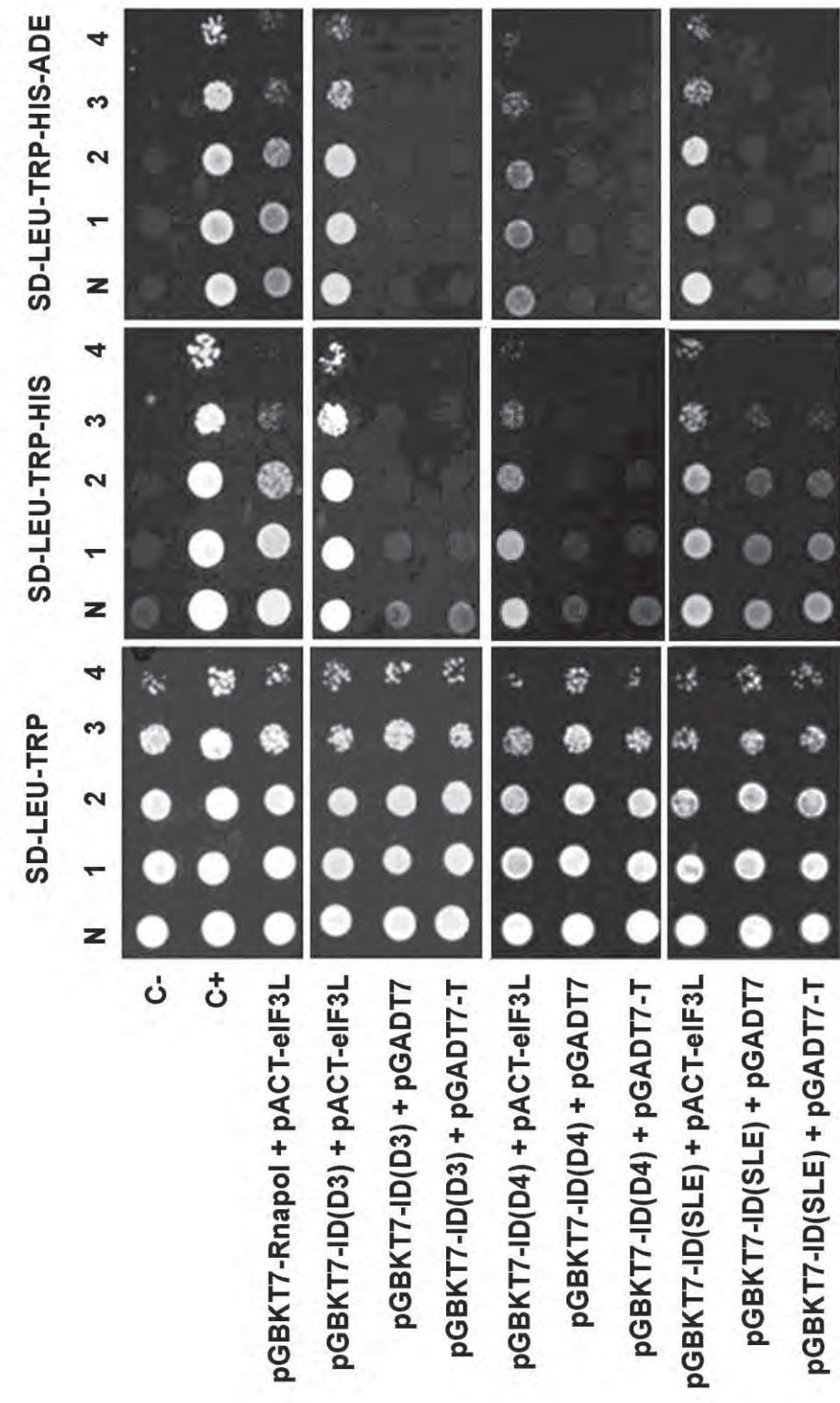


Figura 19. Ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* pela interação do ID dos *Flavivirus* Dengue (tipos 3 e 4) e Encefalite de Saint Louis com a proteína eIF3L. C-: controle negativo; N: amostra pura; 1-4: diluições seriadas de razão 10 da amostra.

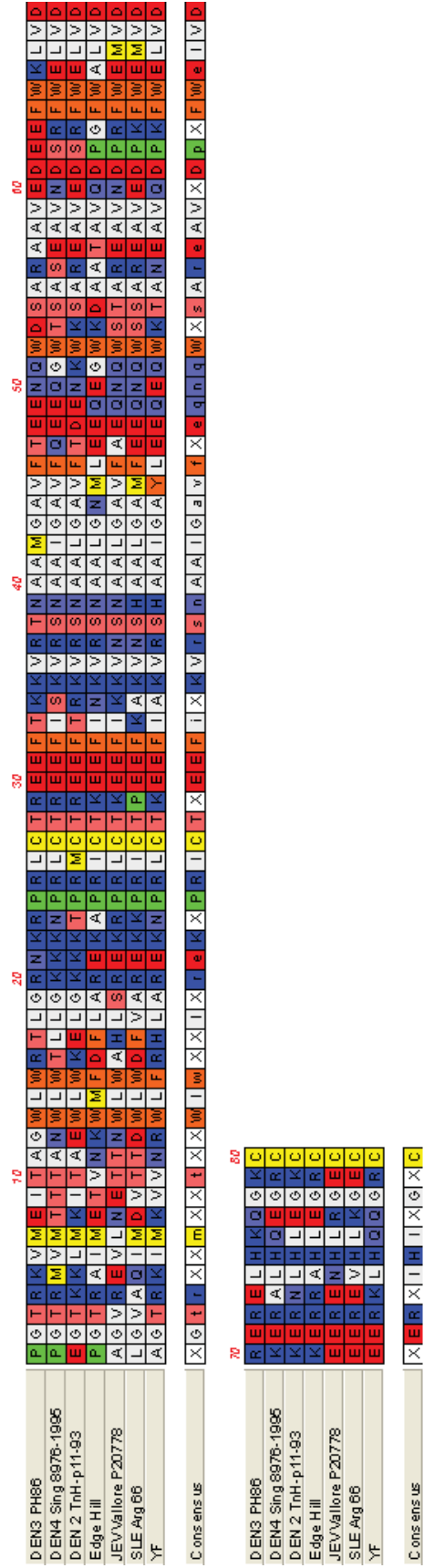


Figura 20. Alinhamento de aminoácidos referentes ao ID de *Flavivirus*. Adaptado de Bronzoni et. al, 2011.
(GenBank: DENV2-AF022437; DENV3-AY858045; DENV4-AY762085; Edge Hill-AF013372; JEV-AF080251; SLEV-AY632544; YFV-DQ100292)

4.2.7 Mapeamento de resíduos críticos do segmento 3 do ID

4.2.7.1 Construção do plasmídeo molde para mutagênese

Inicialmente, o ID do domínio RNA polimerase (NS5) foi amplificado por PCR para posterior clonagem no vetor pGEM®-T Easy. A eletroforese em gel de agarose comprovou a amplificação do ID de aproximadamente 240 pb, o qual pode ser visualizado na Figura 21.

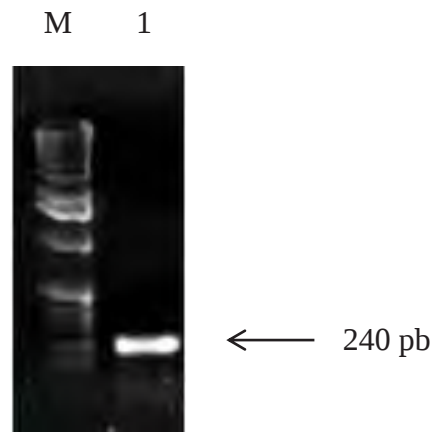


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a amplificação do ID de NS5 do YFV. 1: fragmento de aproximadamente 240pb, correspondente ao ID; M: marcador de pares de base (1Kb).

4.2.7.1.1 Análise dos Transformantes

O ID amplificado foi inserido no vetor pGEM®-T Easy e transformado em *E. coli*. Os transformantes obtidos foram analisados por PCR para verificar a presença do inserto. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmou a presença de bandas de 240 pb referente ao ID dos transformantes obtidos.

4.2.7.2 Inserção de Mutações no plasmídeo molde

4.2.7.2.1 Análise dos Transformantes

O DNA plasmidial ID-pGEMT foi submetido à PCR utilizando quatro pares de *primers* contendo mutações desejadas. Os produtos da PCR foram transformados em bactérias XL1-Blue e analisados em gel de agarose 1%. A Figura 22 mostra a presença de bandas de aproximadamente 240 pb referentes ao ID com mutações ID (D438N) (2 transformantes positivos), ID (F433A/W434A/V437A) (2 transformantes positivos) e ID (R441A/H444A) (3 transformantes positivos) e ID (D438S) (3 clones positivos), respectivamente.

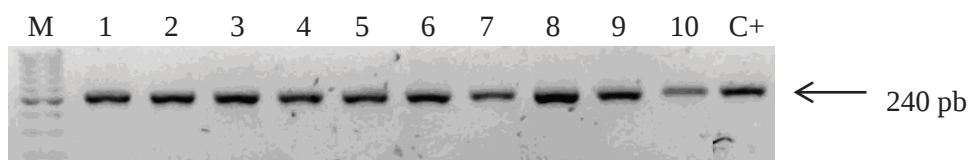


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1% para triagem dos transformantes positivos contendo o *Interaction Domain* com mutações ID (D438N) (1,2); ID (F433A/W434A/V437A) (3, 4); ID (R441A/H444A) (5-7); ID (D438S) (8-10); C+: controle positivo (pACNR-FLYF17D); M: marcador de pares de base (1 Kb).

4.2.7.2.2 Sequenciamento nucleotídico

As clonagens dos mutantes foram confirmadas por seqüenciamento nucleotídico, o qual permitiu a verificação das possíveis mutações que foram introduzidas, bem como a constatação da correta inserção dos dois domínios nos respectivos *frames* em pGEM®-T Easy. Desta forma, os mutantes confirmados foram subclonados no vetor pGBKT7 para o *screening* em duplo híbrido com a proteína eIF3L.

4.2.7.3 Recombinação dos plasmídeos mutantes no vetor pGBKT7

4.2.7.3.1 Análise dos Transformantes

Os produtos de ligação de ID (D438S)-pGBKT7, ID (D438N)-pGBKT7, ID (F433A/W434A/V437A)-pGBKT7 e ID (R441A/H444A)-pGBKT7 foram transformados em bactérias DH5 α e analisados em gel de agarose 1%, confirmando os transformantes positivos.

4.2.7.4 Transformação em levedura dos plasmídeos mutantes (iscas) no duplo-híbrido

Para o *screening* em sistema duplo-híbrido foi realizada em levedura a transformação com as iscas mutantes. Após aproximadamente três dias de incubação, verificou-se a presença de leveduras transformantes na placa com meio SD-Trp. Foram escolhidos três clones para armazenamento em freezer -80°C, e um deles para crescimento em meio líquido SD-Trp para a próxima etapa de transformação da presa.

4.2.7.5 Transformação em levedura da presa eIF3L-pACT2 no duplo-híbrido

Foi realizada a transformação da presa eIF3L-pACT2 em levedura contendo previamente as iscas mutantes. Após aproximadamente três dias de incubação, verificou-se a presença de leveduras transformantes na placa com meio SD-Trp-Leu. Foram escolhidos três clones para armazenamento em freezer -80°C, e um deles para crescimento em meio líquido SD-Trp-Leu para a próxima etapa de ativação de genes repórteres.

4.2.7.6 Teste de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*

Os plasmídeos mutantes foram utilizados para transformação sequencial com pACT2-eIF3L em ensaios de duplo-híbrido. Os transformantes obtidos foram analisados segundo a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*.

O crescimento de leveduras nos meios SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp indicou a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* pela interação dos mutantes ID (D438N)-pGBKT7, ID (D438S)-pGBKT7, ID (R441A/H444A)-pGBKT7 (Figura 23). Esse resultado mostra que essas mutações não são críticas para a ocorrência da interação com eIF3L. Já com o mutante ID (F433A/W434A/V437A)-pGBKT7 não houve ativação dos

genes repórteres *HIS3* e *ADE2* (Figura 23), o que indica que nessa mutação estão presentes os resíduos críticos para a interação com eIF3L.

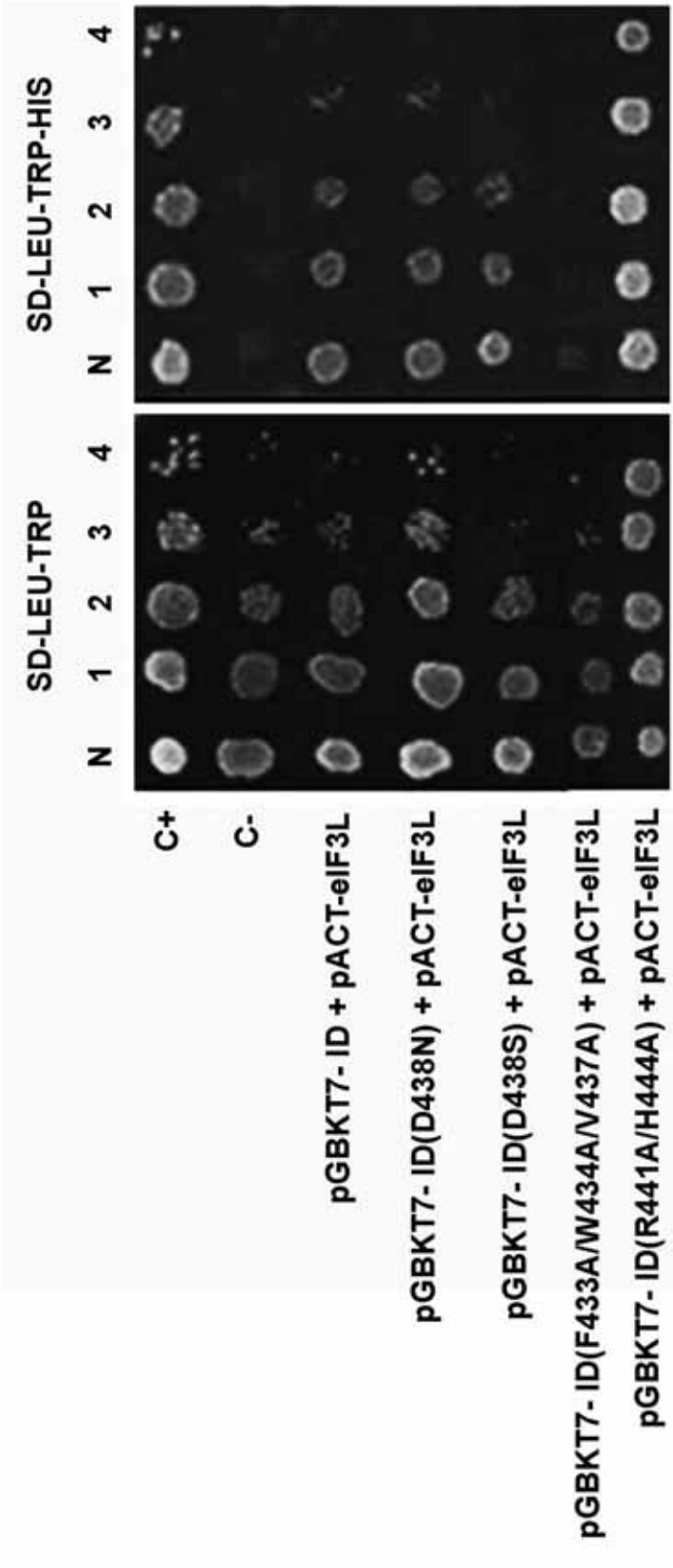


Figura 23. Ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* pela interação de ID (D438N)-pGBKT7, ID (D438S)-pGBKT7, ID (R441A/H444A)-pGBKT7 com eIF3L e não ativação do mutante ID (F433A/W434A/V437A)-pGBKT7 com eIF3L. C-: controle negativo; C+: controle positivo; N: amostra pura; 1-4: diluições seriadas de razão 10 da amostra.

4.3 Confirmação da Interação NS5-eIF3L *in vitro* (GST-pulldown)

4.3.1 Construção dos plasmídeos

O *Interaction Domain*, com aproximadamente 240 pb, foi amplificado por PCR. A eletroforese em gel de agarose comprovou a amplificação deste domínio, o qual pode ser visualizado na Figura 24.

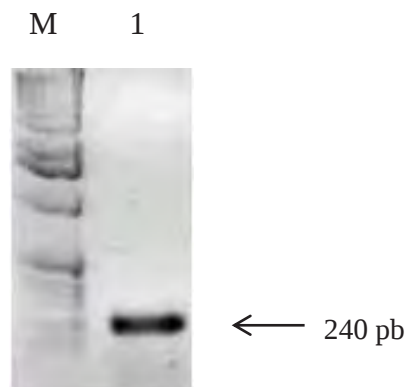


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a amplificação do domínio ID. 1: fragmento de aproximadamente 240 pb, correspondente ao ID; M: marcador de pares de base (1Kb).

O domínio amplificado foi inserido no vetor pGEX5X-1 e transformados em *E. coli*. Os transformantes obtidos foram analisados por PCR para verificar a presença do inserto e confirmado em eletroforese em gel de agarose 1%.

A clonagem do ID de NS5 no pGEX foi confirmada por sequenciamento nucleotídico, o qual permitiu também a verificação da ausência de possíveis mutações que pudessem ter sido originadas nas PCRs, bem como a constatação da correta inserção do domínio no *frame* em pGEX5X-1.

4.3.2 Expressão de proteínas

As proteínas foram expressas em *E.coli* BL21, mostrando bandas de tamanho esperado para pGEX5X-1 (26KDa) e ID-GST (33KDa) em SDS-PAGE com coloração Azul de Coomassie (Figura 25).

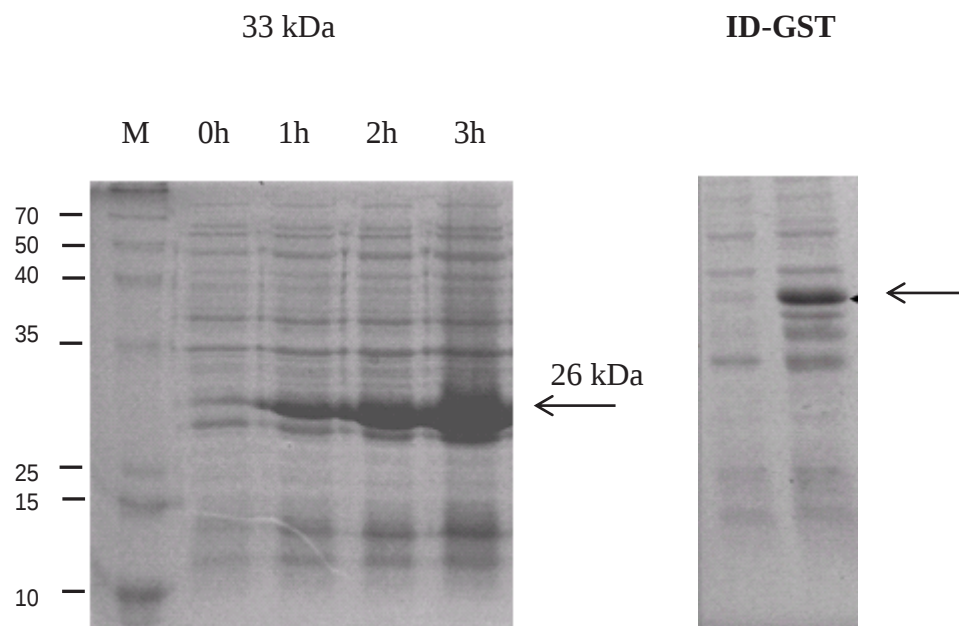


Figura 25. Expressão das proteínas ID-GST e GST em *E. coli* BL(DE3)21. M: marcador de peso. Expressão das proteínas antes da indução (0h), após 1, 2 e 3 horas após indução.

4.3.3 Purificação de ID-GST e GST

As proteínas purificadas da fração solúvel foram analisadas em SDS-PAGE de acordo com a Figura 26. Bandas de 26kDa referente à proteína GST e de 33kDa referente à proteína ID-GST podem ser observadas na Figura 26, indicando a adequada purificação das proteínas.

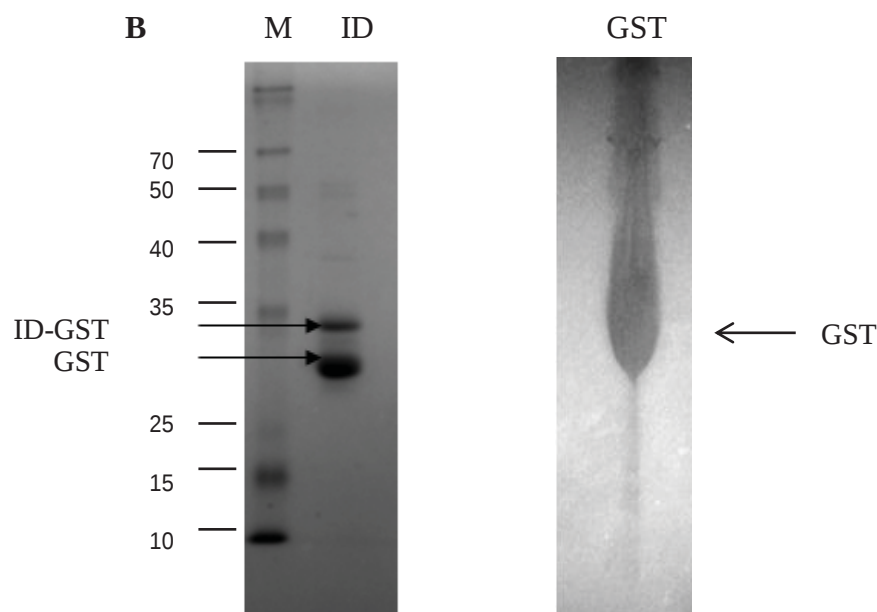


Figura 26. Proteínas ID-GST e GST purificadas. A) Purificação da proteína ID-GST; M: marcador de peso molecular. B) Purificação da proteína GST. Coloração Azul Coomassie.

4.3.4 GST-pulldown

A interação entre o *Interaction Domain* de NS5 YFV e eIF3L foi confirmada em ensaio de GST *pull-down*. O ensaio foi realizado usando as proteínas ID-GST e GST purificadas e ligadas a uma resina de glutathione-Sepharose em combinação com a proteína eIF3L-Flag (67 kDa) produzida em células Hela. Os complexos protéicos foram resolvidos em SDS-PAGE e analisados em *Western blotting* usando anticorpo Anti-Flag. Como mostrado na figura 27, eIF3L-Flag interage com a proteína de fusão ID-GST (coluna 3), mas não interage com o controle negativo GST (coluna 2).

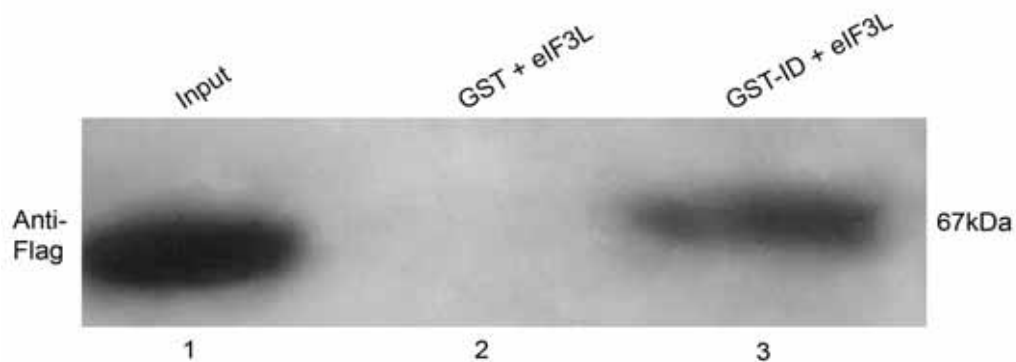


Figura 27. Interação proteína-proteína de eIF3L-Flag com ID-GST. (1) Input, eIF3L-Flag: controle positivo de expressão de eIF3L; (2) GST + eIF3L: ausência de interação inespecífica de eIF3L-Flag; (3) GST-ID + eIF3L: interação positiva de GST-ID com eIF3L-Flag.

4.4 Confirmação da interação NS5-eIF3L em culturas celulares

4.4.1 Coimmunoprecipitação

Ensaio de coimmunoprecipitação foram realizados para confirmar que a proteína NS5 (98 kDa) do vírus da Febre Amarela interage com eIF3L em células de mamíferos. Células Vero foram transfectadas com eIF3L-Flag e infectadas com YFV. Lisados celulares contendo ambas NS5 e eIF3L-Flag foram incubadas com *beads* Anti-Flag e os eluatos foram submetidos a análise por *Western blotting*. A figura 28A mostra a eficiente precipitação de eIF3L-Flag nas *beads* Anti-Flag. Como mostra a figura 28B, NS5 YFV foi eficientemente coimmunoprecipitado com eIF3L-Flag. Em contraste, NS5 YFV não foi precipitado na ausência de eIF3L-Flag. Similarmente, NS5 YFV não foi detectado em lisados de células contendo somente eIF3L-Flag. Assim, os resultados indicam que NS5 do vírus da febre amarela pode interagir com eIF3L em células de mamíferos.

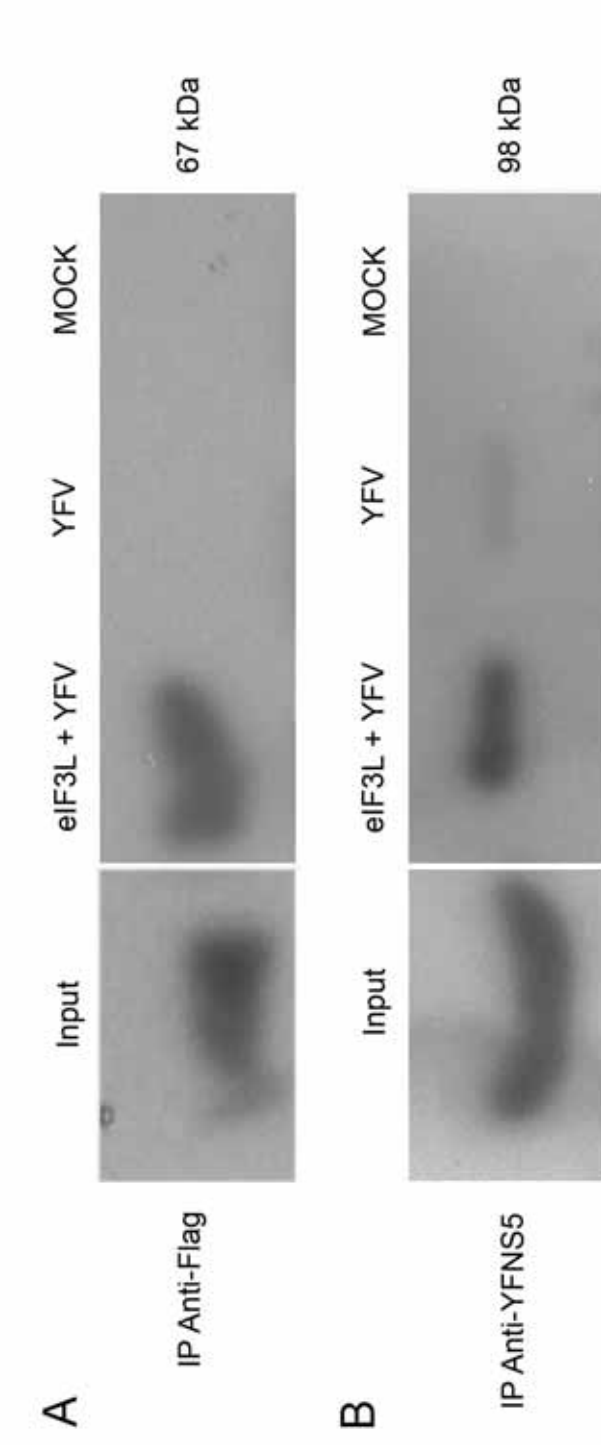


Figura 28. Coimmunoprecipitação entre eIF3L-Flag e NS5 YFV em células de mamíferos. As proteínas coimmunoprecipitadas foram analisadas por Western blotting usando um anticorpo Anti-NS5 YFV (A) Lisados celulares imunoprecipitados com anticorpo Anti-Flag. Input: controle positivo de eIF3L (67 kDa); eIF3L + YFV: eIF3L imunoprecipitada de células transfectadas e infectadas; YFV: células infectadas de células não transfectadas; MOCK: células não transfectadas e não infectadas. (B) Coimmunoprecipitação da proteína NS5 YFV com anticorpo Anti-NS5 YFV. Input: controle positivo de NS5 YFV de células infectadas (98 kDa); eIF3L + YFV: coimmunoprecipitação de NS5 YFV com eIF3L-Flag mostrando interação positiva; YFV, MOCK: NS5 YFV não foi coimmunoprecipitada em células não transfectadas.

4.5 Avaliação do efeito da superexpressão de eIF3L na replicação do vírus da Febre Amarela em cultura celular.

4.5.1 Superexpressão de eIF3L e ensaios de atividade de luciferase

Para estabelecer a significância dessas interações num contexto celular, nós avaliamos a função de eIF3L em células BHK-21-Rep-YFV17D LucNeoIres. As células foram transfectadas com o plasmídeo eIF3L-Flag ou vetor vazio como controle. Após 48 h, as células foram coletadas para análise em western blotting e ensaio de atividade de luciferase.

A superexpressão de eIF3L é mostrada na figura 29A, coluna 1, comparada às células não transfectadas ou transfectadas com o vetor vazio. Os níveis de atividade de luciferase nos lisados celulares foram significativamente reduzidos em 50% quando comparado aos controles (teste *t'-student*; $p < 0,05$) (Figura 29B).

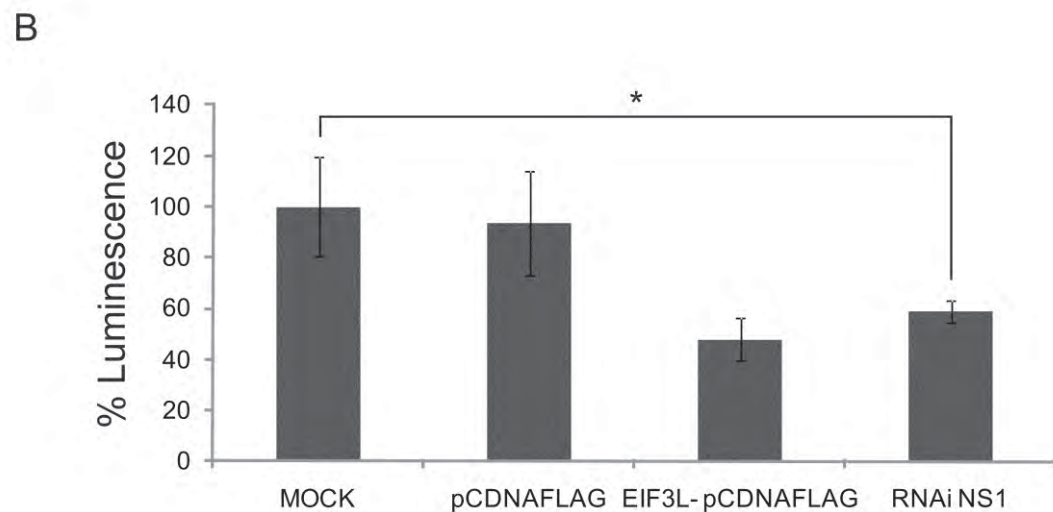
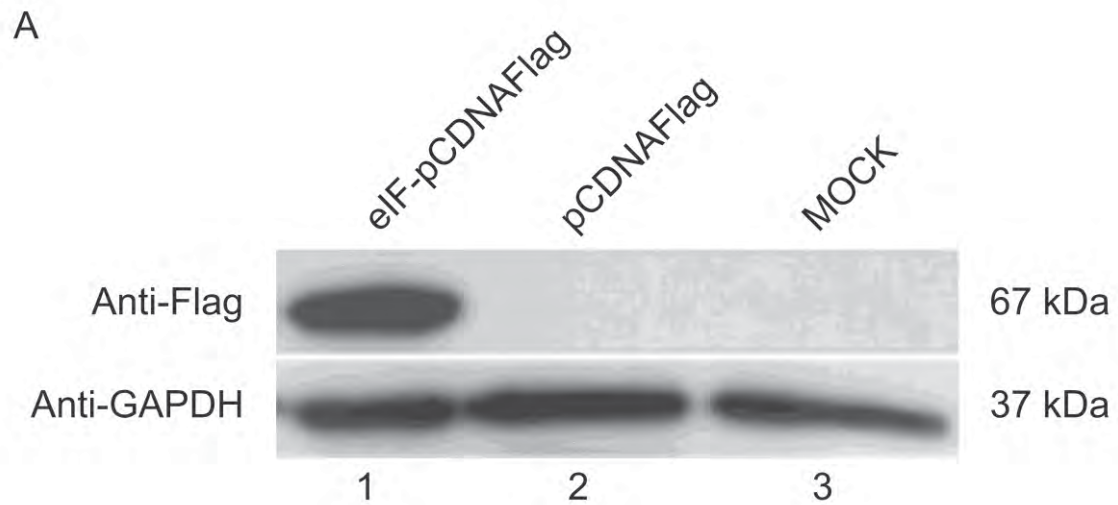


Figura 29. Superexpressão de eIF3L diminui replicação do vírus da Febre Amarela. (A) Superexpressão de eIF3L em BHK21-rep-YFV17D LucNeoIres usando anticorpo Anti-Flag ou anticorpo Anti-GAPDH como controle endógeno. eIF3L-pCDNAFlag: superexpressão de eIF3L; pCDNAFlag: controle vetor vazio; MOCK: células controle não transfectadas. (B) Mensuração da atividade de luciferase após 48 h de transfecção com eIF3L. MOCK: células controle; pCDNAFlag: controle vetor vazio; eIF3L-pCDNAFlag: superexpressão de eIF3L; RNAi NS1: controle positivo.

4.6 Expressão e Purificação da proteína eIF3L

4.6.1 Amplificação do gene da proteína eIF3L

O gene da proteína eIF3L, com aproximadamente 1600 pb, foi amplificado por PCR. A eletroforese em gel de agarose comprovou a amplificação, o qual pode ser visualizado na Figura 30.

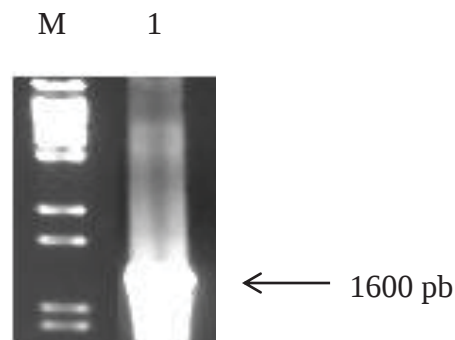


Figura 30. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a amplificação de eIF3L. 1: fragmento de aproximadamente 1600 pb, correspondente a eIF3L; M: marcador de pares de base (1Kb).

4.6.2 Ensaios de Restrição Enzimática

Tanto o inserto eIF3L, quanto o vetor pET21a, foram submetidos ao ensaio de restrição enzimático com as enzimas EcoRI e XhoI para digestão. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmou as digestões enzimáticas do inserto e vetor, os fragmentos foram extraídos do gel, purificados com etanol e quantificados.

4.6.3 Análise dos transformantes

O inserto eIF3L e o vetor pET21a foram ligados e transformados em *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. Os transformantes foram confirmados em gel de agarose 1%.

4.6.4 Sequenciamento nucleotídico

A clonagem de eIF3L no vetor pET21a foi confirmada por sequenciamento nucleotídico, o qual permitiu a verificação de possíveis mutações que poderiam ser introduzidas na PCR, bem como a constatação da correta inserção no *frame* em pET21a. Desta forma, os clones confirmados foram congelados em *freezer* -80°C, e um deles extraído o DNA para transformação em *E. coli* BL(DE3)21.

4.6.5 Transformação em células competentes *E. coli* BL(DE3)21

4.6.5.1 Análise dos Transformantes

O DNA plasmidial eIF3L-pET21a foi transformado em *E. coli* BL(DE3)21 para posteriores testes de expressão. Os transformantes obtidos foram amplificados por PCR e confirmados em gel de agarose 1%.

4.6.6 Testes de expressão e solubilização de eIF3L-pET21a

A proteína recombinante eIF3L-pET21a mostrou ser em sua maior parte insolúvel em diferentes condições de fermentação e solventes testados, permanecendo em corpúsculos de inclusão. As condições de expressão e fermentação ficaram estabelecidas com o uso de 1 mM de IPTG para indução, temperatura de 25°C e baixa rotação. A solubilização de eIF3L foi eficaz por adição de 2% sarkosyl e 5% glycerol (supressor de agregação) em tampão fosfato. Após padronizada essas condições, foi realizada a expressão e solubilização da proteína recombinante em maior escala para purificação e estudos espectroscópicos de eIF3L.

4.6.7 Expressão e solubilização de eIF3L-pET21a em larga escala

A proteína foi expressa em *E.coli* BL21 após 3 horas de indução por IPTG 1mM e analisadas em SDS-PAGE. A Figura 31 mostra a expressão de eIF3L (62 kDa) no tempo de 3h, após a indução por IPTG, e revela a proteína expressa na porção solúvel com adição do detergente sarkosyl, possibilitando os ensaios seguintes de purificação da proteína.

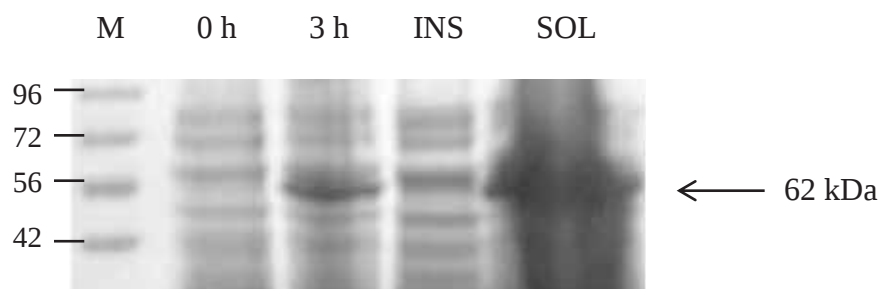


Figura 31. Expressão e solubilização da proteína eIF3L-pET21a em *E. coli* BL(DE3)21. 0 h: proteína eIF3L antes da indução com IPTG; 3 h: expressão da proteína eIF3L (62 Kda); INS: Fração insolúvel da proteína; SOL: Fração solúvel da proteína.. M: marcador de peso molecular. Coloração azul coomassie.

4.6.8 Purificação em Cromatografia de Afinidade de eIF3L

A proteína eIF3L foi purificada usando uma combinação de cromatografia de afinidade e subsequente cromatografia por exclusão de peso molecular.

Uma coluna de afinidade *HisTrap Chelating* (5 ml) (GE Healthcare) previamente equilibrada foi usada para purificação inicial da proteína com gradiente de 0.005-0.5 M de imidazol. A proteína recombinante foi eluída em três picos. No primeiro pico de absorbância, eIF3L foi eluída entre as frações 19 e 42, correspondendo a concentração de 50 mM de imidazol. No pico 2, eIF3L foi eluída entre frações 52 a 70, correspondendo a 100 mM de imidazol e no pico 3 eluída em 200 mM de imidazol (frações 73 a 85) (Figura 32).

As frações de todos os picos foram analisadas em SDS-PAGE e mostrou que o pico 1 possuía proteínas contaminantes, além de eIF3L. Nos picos 2 e 3, a proteína eIF3L estava quase totalmente pura. (Figura 33).

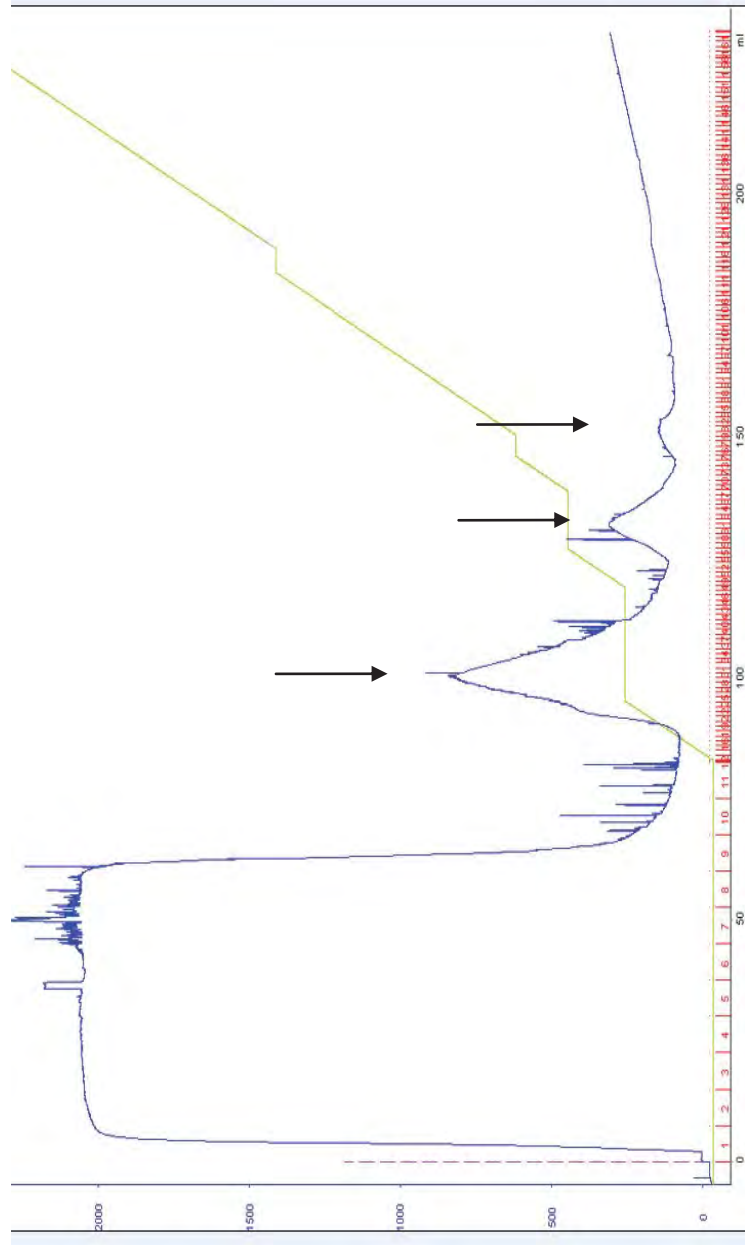


Figura 32. Cromatografia de Afinidade da proteína eIF3L fusionada a His Tag. Cromatograma: Linha azul indica a absorbância detectada pelo FPLC; linha verde indica concentração de imidazol e traços vermelhos indicam frações coletadas. As setas indicam em quais concentrações de imidazol foram observados picos de absorbância.

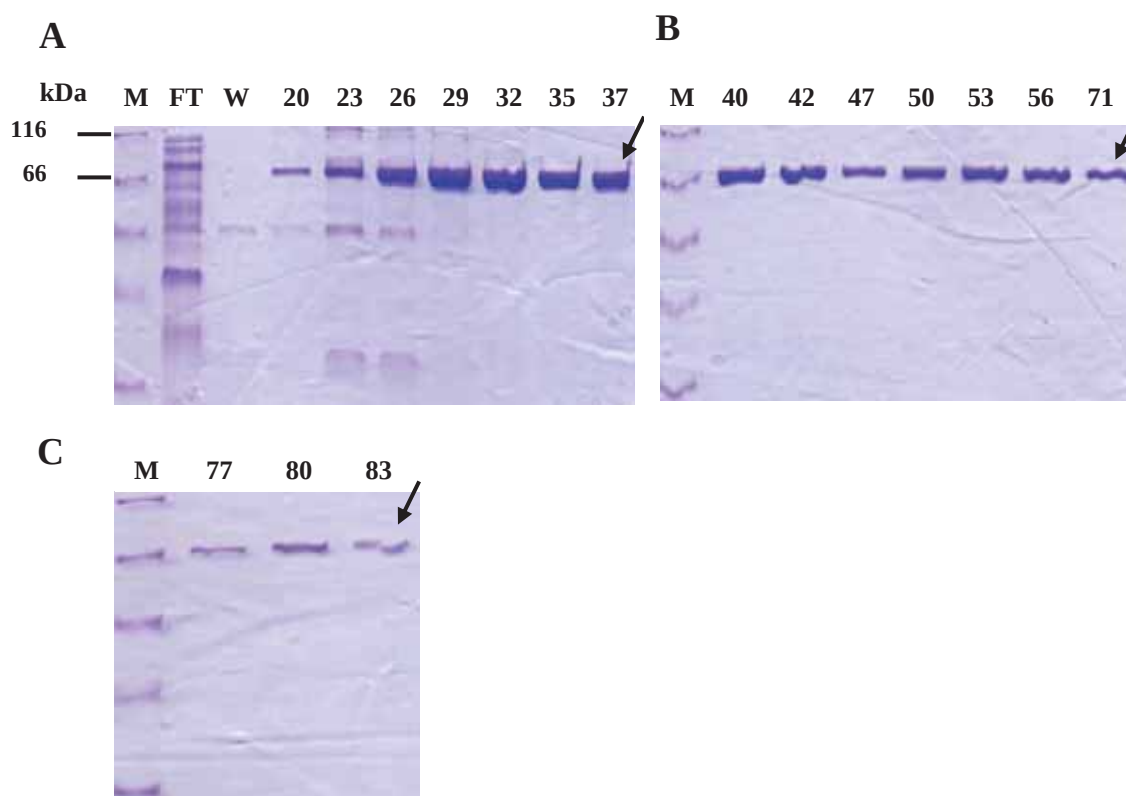


Figura 33. Gel SDS-PAGE 10% da Purificação de Afinidade: Gel A: M) Marcador de peso molecular Unistained Fermentas; FT) Flow-through, fração não ligada; W) lavagem; 20, 23, 26, 29, 32, 35, 37) eluídos frações 20 a 37 referente ao pico 1 da cromatografia. Gel B: M) Marcador de peso molecular Unistained Fermentas; 40 e 42) eluídos frações 40 a 42 referente ao pico 1 da cromatografia; 47, 50, 53, 56, 71) eluídos frações 47 a 71 referente ao pico 2 da cromatografia. Gel C: M) Marcador de peso molecular Unistained Fermentas; 77, 80, 83) eluídos frações 77 a 83 referente ao pico 3 da cromatografia. As setas indicam que a proteína eIF3L foi purificada, com um tamanho aproximado de 67 kDa. Coloração azul coomassie.

4.6.9 Testes de concentração e diálise de eIF3L purificada

Para verificar que os diferentes picos de eIF3L obtidos na purificação em cromatografia de afinidade não apresentavam diferentes formas oligoméricas, os eluatos dos picos 1 e 2 foram concentrados e dialisados separadamente.

Com os testes de diálise de eIF3L purificada (picos 1 e 2) realizados em membrana (Spectra/Por 6 – 8,00 kDa) com os tampões 20mM Tris pH 7.5, 50mM NaCl ou 20mM Tris

pH 7.5, 150mM NaCl, não houve formação de precipitados nas amostras (picos 1 e 2) com ambos tampões. Dessa forma, para diálises posteriores com grande volume de amostra, o tampão com menor concentração de sal, requerido para cristalização, poderá ser utilizado.

Foram realizados testes de concentração de eIF3L usando Centricon 30 kDa (Amicon); Amicon Ultra 30 kDa (Millipore) e Diálise Reversa usando PEG 20000. As amostras submetidas a todos os métodos não sofreram precipitação e aderência aos filtros dos concentradores. No entanto, o Amicon Ultra 30 kDa (Millipore) apresentou maior eficiência para concentrar a amostra, que foi quantificada a 280 nm resultando em 2 mg/ml de proteína. Assim, os ensaios seguintes foram realizados com esse concentrador.

4.6.10 Ensaio espectroscópico – *Dynamic Light Scattering* (DLS)

Esse ensaio foi realizado com a finalidade de analisar se as amostras dos picos 1 e 2 tinham características semelhantes ou se diferiam quanto à formação de agregados. As amostras mostraram uma massa de 99,8%, 2,0 nm de raio hidrodinâmico e 19,5% de monodispersividade (pico 1). Para o pico 2, massa de 99,7%, 1,8 nm de raio hidrodinâmico e 24% de monodispersividade. Ambos picos mostraram que a maior massa de proteína tinha uma monodispersividade em torno de 20% e sem características de agregação, indicando que a proteína estava conservando características do seu estado nativo. Assim, os dois picos foram reunidos e submetidos a cromatografia por exclusão de peso molecular para melhor purificação.

4.6.11 Purificação em Cromatografia de Gel Filtração de eIF3L

As frações misturadas dos picos 1 e 2 da cromatografia de afinidade foram submetidos a uma coluna de cromatografia Sephadex 200 para obtenção de maior pureza da amostra. A purificação mostrou um único pico de absorbância a 280 nm entre as frações 22 a 30 (Figura 34) e o SDS-PAGE mostrou uma única banda de eIF3L, indicando uma alta pureza de eIF3L (Figura 35). As frações foram reunidas, dialisadas contra água, liofilizadas e armazenadas a -20°C para análises espectroscópicas.

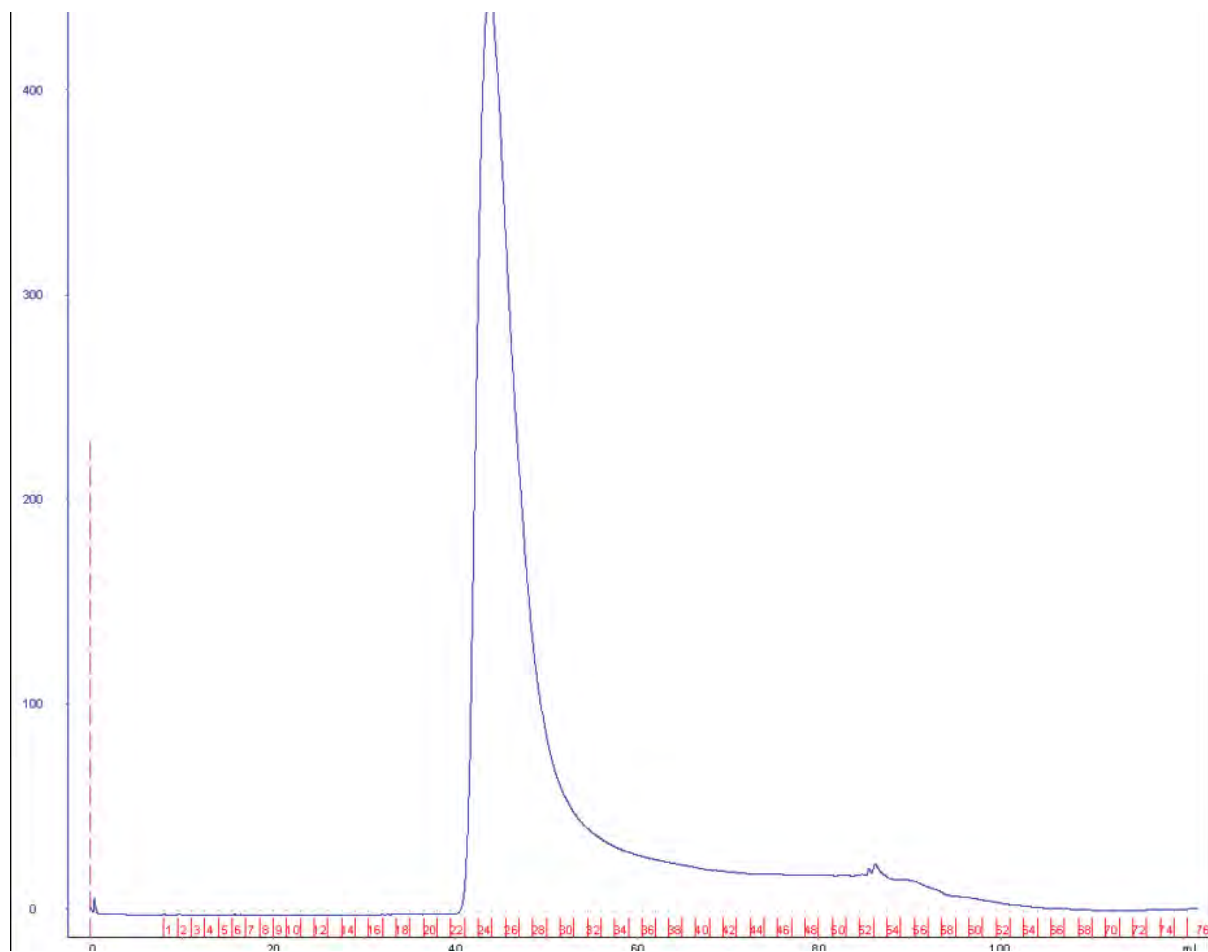


Figura 34. Cromatograma da filtração em gel. Em azul medida de absorbância de A_{280nm} .

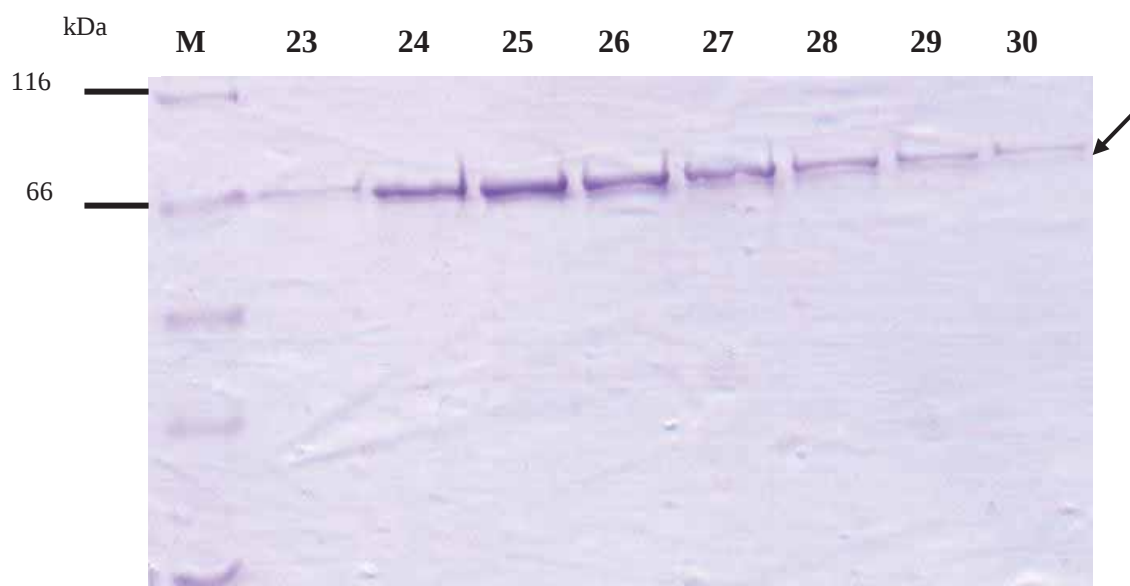


Figura 35. Gel SDS-PAGE 10% da Filtração em Gel: Gel A: M) Marcador de peso molecular Unistained Fermentas; 23 a 30) eluídos frações 23 a 30 da cromatografia em gel filtração. Coloração azul coomassie.

4.7 Dicroísmo Circular (CD)

Após a purificação, as frações da proteína eIF3L purificada a partir de uma cultura de 500ml de bactéria, foram liofilizadas. A proteína foi estocada a temperatura de -20°C . A amostra foi diluída em água e em seguida desalinizada utilizando concentrador Amicon 30 kDa. A concentração foi medida por absorção óptica em 280nm, utilizando o coeficiente de extinção molar obtido da composição de aminoácidos $\epsilon_{280}=103.280\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, massa molecular 66.726,9Da, sendo a concentração de eIF3L obtida de 3,0mg/ml.

O conteúdo de estrutura secundária da eIF3L foi calculado através do espectro de CD (Figura 36). O espectro obtido com um mínimo de elipticidade em 205 e 222nm indica que a proteína contém uma quantidade substancial de α -hélice. A análise de conteúdo de estrutura secundária obtido utilizando o programa CDPPro indica as seguintes frações das principais estruturas secundárias: 70% de hélice α , 4% folha β , 8% dobras ou “turn”, e 19% estruturas aleatórias ou “random coil”. Estes resultados validam o modelo obtido por modelagem molecular, no qual as frações de estrutura secundárias previstas são: (Hélice: 65%; folha Beta : 4%; “Loop” (L): 31%, sendo esta ultima a soma das estruturas referentes a dobras e

aleatórias. Estes resultados sugerem que a proteína recombinante humana eIF3L pode ser clonada e expressa em *E. coli* e purificada a partir de simples métodos de cromatografia das frações solúveis, mantendo a proteína em sua forma nativa e permitirá futuros estudos estruturais.

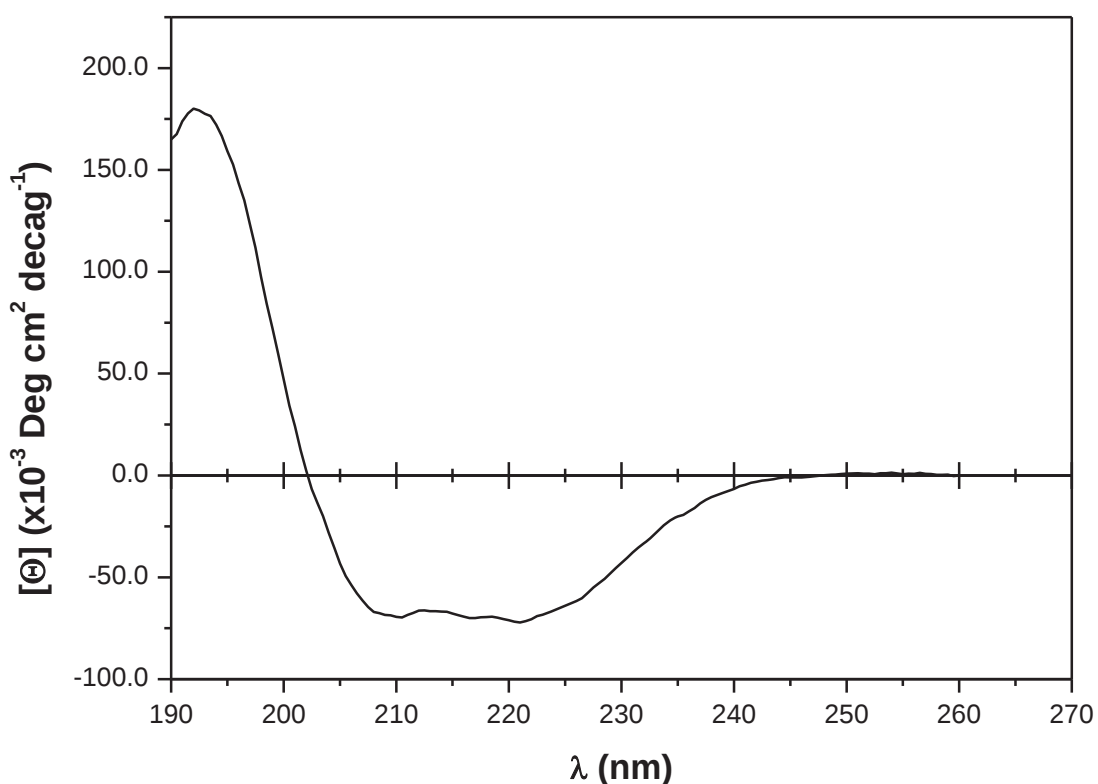


Figura 36. Espectro de CD da proteína eIF3L, obtido em cubeta de 0,5mm de caminho óptico, 20°C, concentração da amostra 0,19mg/ml, tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 8,0.

4.8 Análise estrutural de eIF3L utilizando ferramentas computacionais

Utilizando ferramentas computacionais para obtenção de algumas predições em relação às características estruturais e funcionais de eIF3L, foram realizadas análises pelos servidores *PsiPred*, *PredictProtein* e *Q-Site Finder*.

As análises realizadas pelo *PredictProtein* indicaram a existência de um sítio de N-glicosilação no resíduo N554 e 13 sítios de fosforilação nos resíduos S21, T62, T103, T204, S208, S233, S249, T354, T459, T482, S507, S515, T556.

A possível presença de regiões hidrofóbicas presentes na proteína eIF3L foi analisada, uma vez que a proteína se mostrou em corpúsculos de inclusão e insolúvel na presença de vários solventes. O *PsiPred* analisa possíveis regiões transmembrânicas existentes na proteína, isto é, regiões hidrofóbicas. Os resultados mostram a presença de 6 regiões hidrofóbicas como pode ser visualizado na Figura 37.

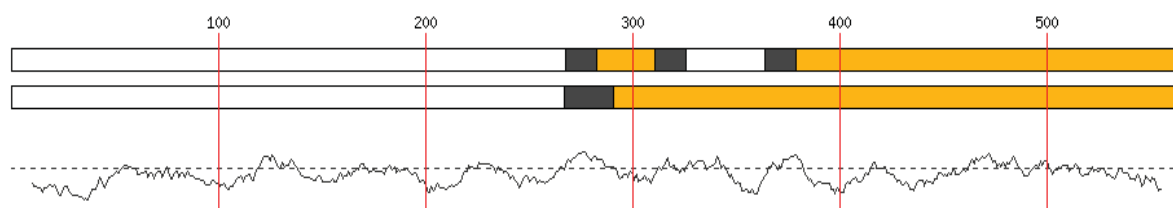


Figura 37. Hibrofobicidade da proteína eIF3L obtido pelo PsiPred. As duas barras superiores indicam regiões citoplasmáticas (branco), transmembrânicas (cinza) e extracelular (amarelo). Na parte inferior, regiões em que a linha cinza do gráfico estão acima da linha pontilhada correspondem as regiões hidrofóbicas da proteína eIF3L.

A análise das estruturas secundárias preditas pelo *PredictProtein* e *Psipred*, apresentou porcentagens similares: 65% hélice, 4% folha e 31% outras (Figura 38).

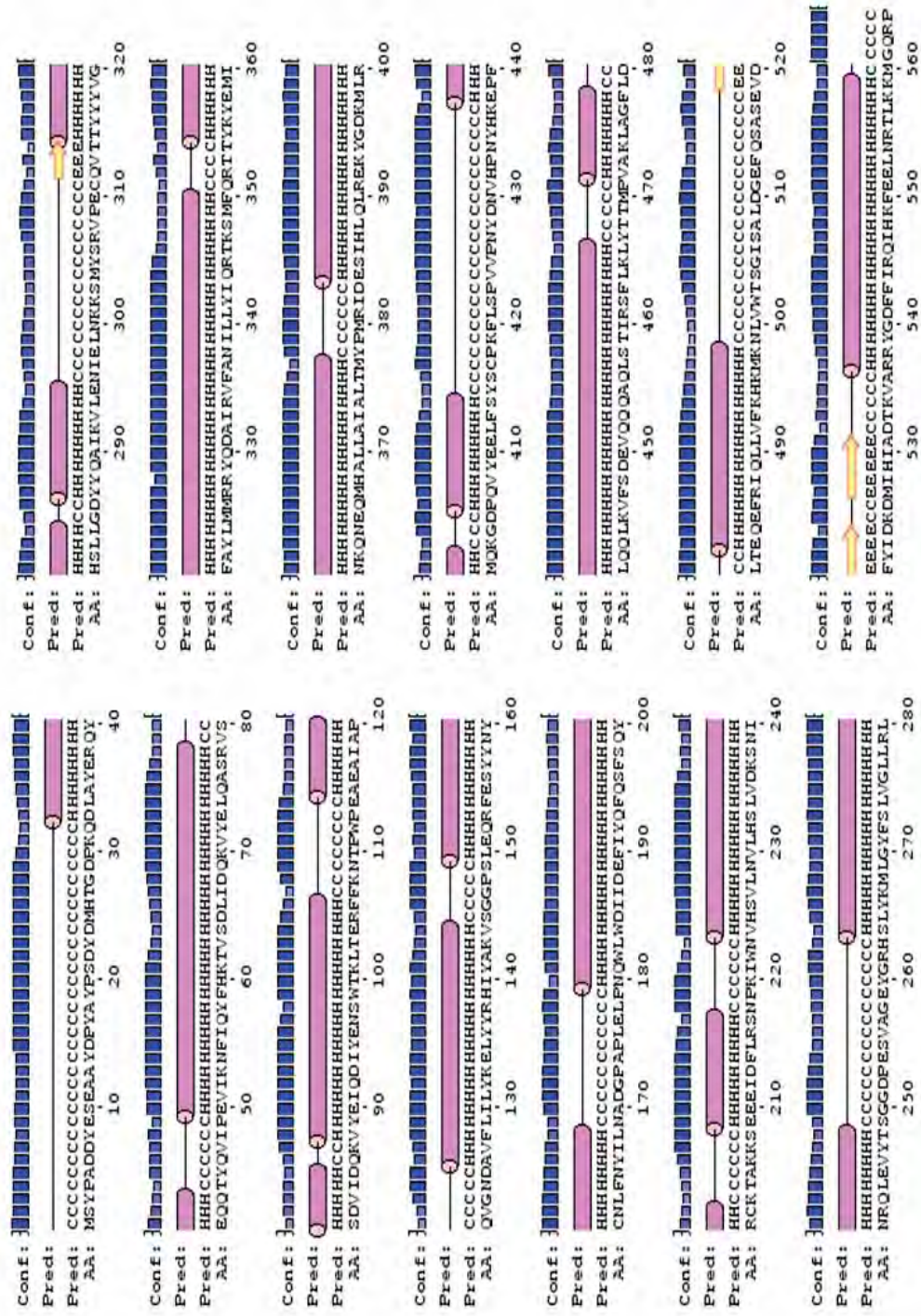


Figura 38. Predições de estruturas secundárias obtido pelo *PsiPred*. A linha superior com colunas em azul representa a confiabilidade da estrutura, na segunda linhas estão representadas as estruturas secundárias sendo rosa alfa-hélice, amarela folha-beta, e linha preta outras. Na última linha, a sequência de aminoácidos da proteína.

Utilizando a técnica de modelagem molecular, obteve-se um modelo tridimensional da proteína eIF3L usando o *I-Tasser* (Figura 39).

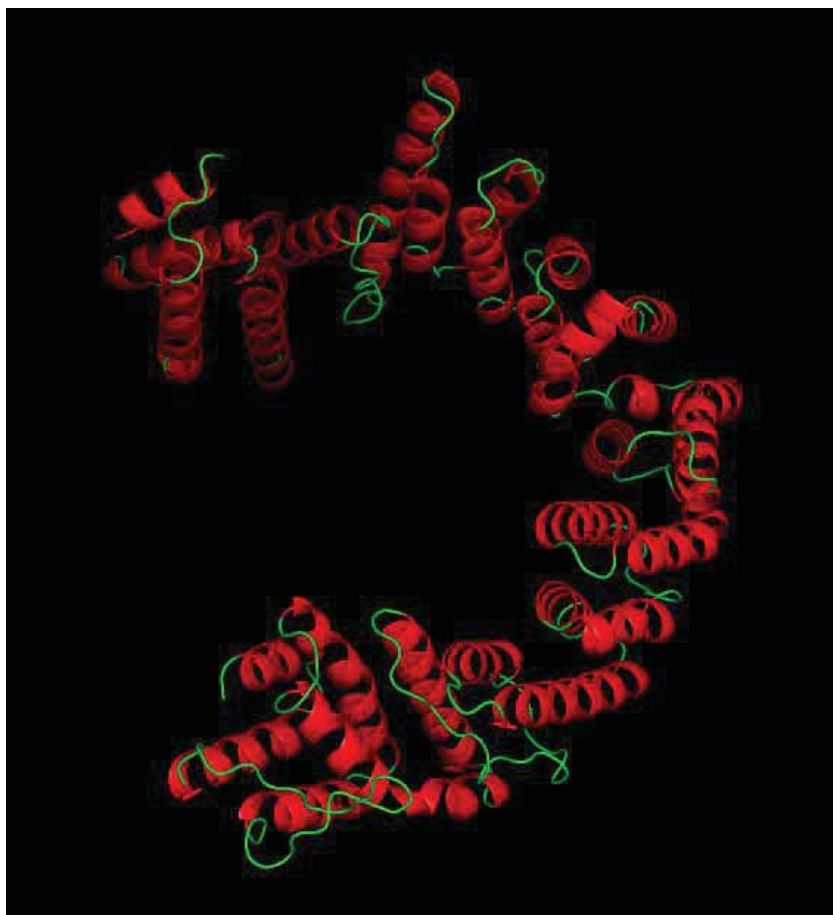


Figura 39. Modelo da proteína eIF3L obtida pelo *I-Tasser*. Em verde pode ser observada as regiões compostas por random coils, e em vermelho as regiões composta por α -hélice.

O gráfico de Ramachandran (Figura 40) calculado pelo *PROCHECK* apresentou 98.3% na região permitida, 0.6% na região generosamente permitida e 1.2% na região não permitida. A validação do modelo também foi analisada pelo *ProQ-Server* resultando em um LGscore de 2.029, que classifica o modelo da proteína como um modelo razoavelmente bom e um score de Maxsub de 0.185, que também classifica como um modelo razoavelmente bom. A pequena porcentagem de resíduos na região não permitida no gráfico de Ramachandran (1.2%) e a pontuação do ProQ-Server indicando um modelo razoavelmente bom revela uma boa validação do modelo da proteína eIF3L.

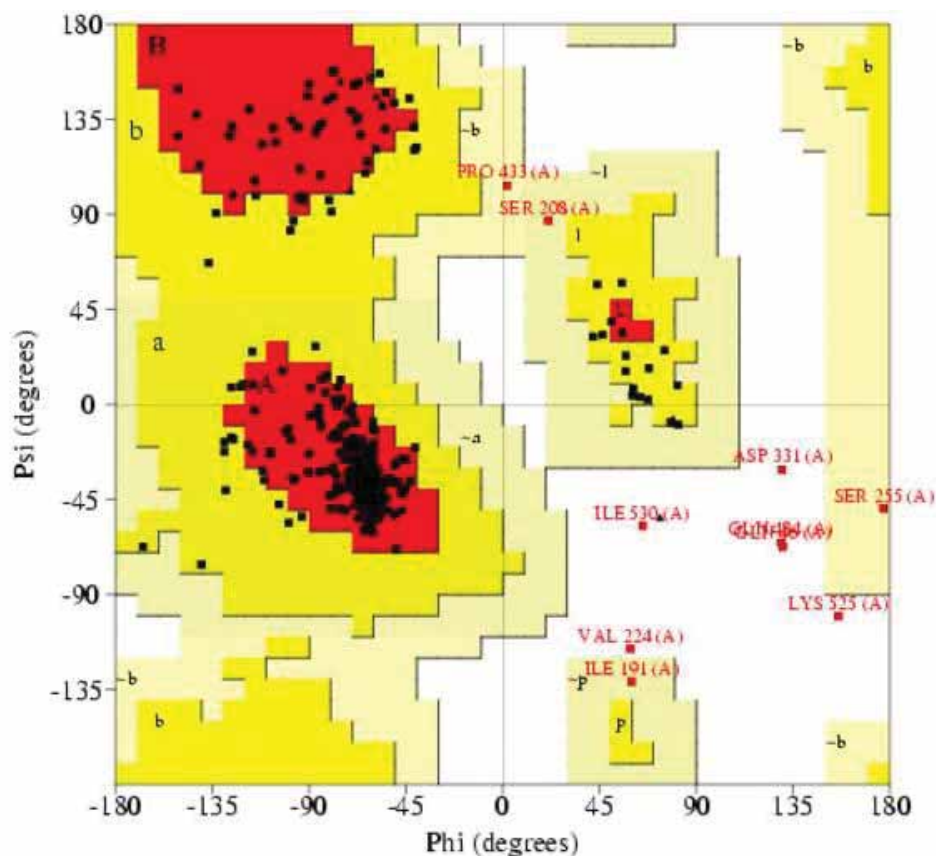
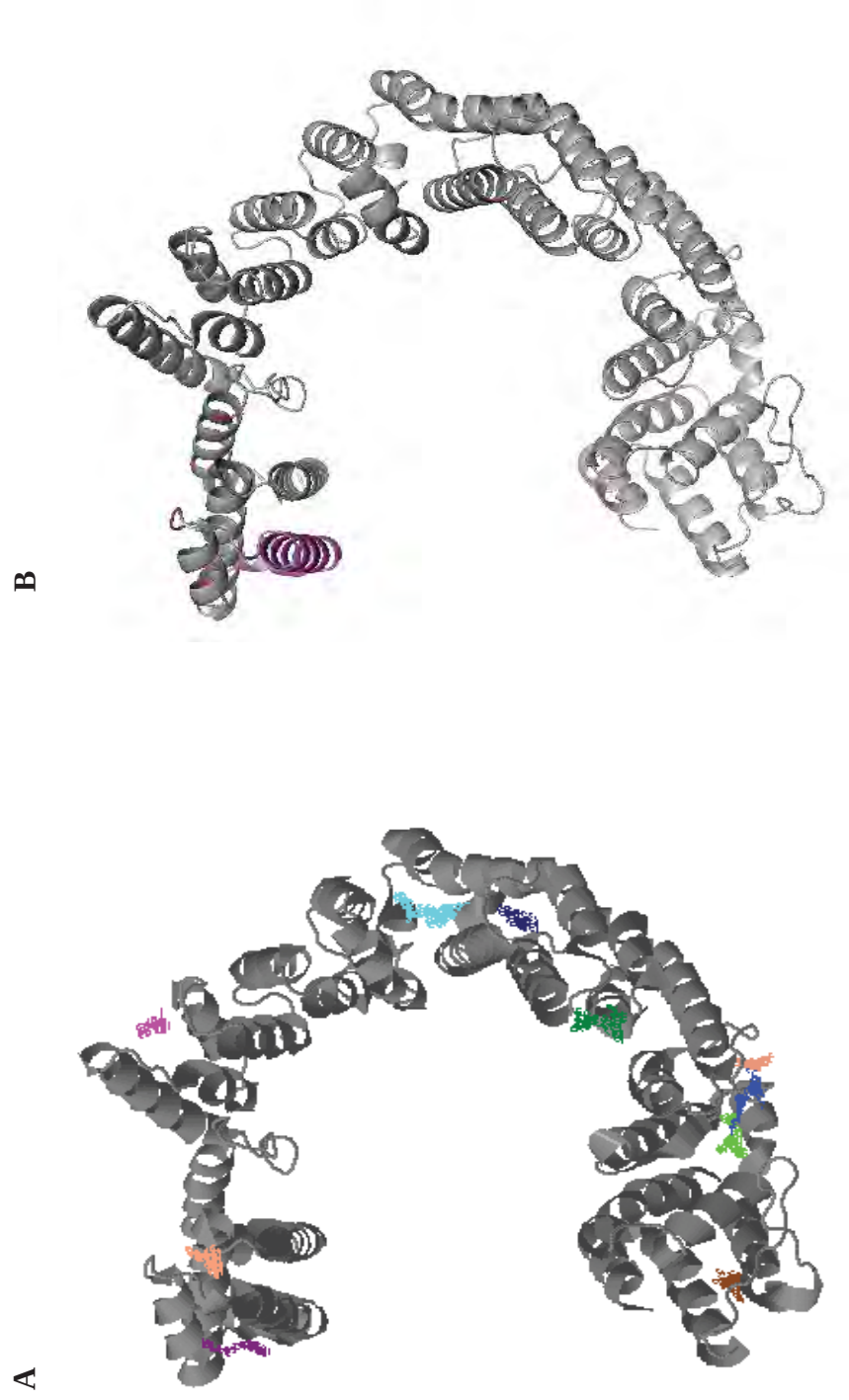


Figura 40. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína eIf3l predito pelo I-Tasser. Na região em vermelho pode ser visto os resíduos na região favorável. na amarelo escuro os resíduos na região permitida, na região amarelo claro resíduos generosamente permitidos e no branco resíduos na região não permitida

O modelo da proteína eIF3L foi submetido a análises de possíveis sítios de interação. O servidor *Q-Site Finder* encontrou 10 possíveis sítio de interação na proteína. Na Figura 41, é possível visualizar os possíveis sítios preditos. O *PredictProtein* também localizou resíduos, principalmente na região N-terminal, com potencial de interação com outras proteínas.



Figurea 41. Resultados das predições obtidas pelo Q-Site Finder A e PredictProtein B. A região colorida representa os sítios de interação preditos.

Para análise dos possíveis sítios de interação entre as subunidades K e L e para melhor entender essa estrutura, foi realizado o *docking* entre as proteínas eIF3L e eIF3K. O modelo de interação resultou em um *score* de 18802. (Fig. 42).

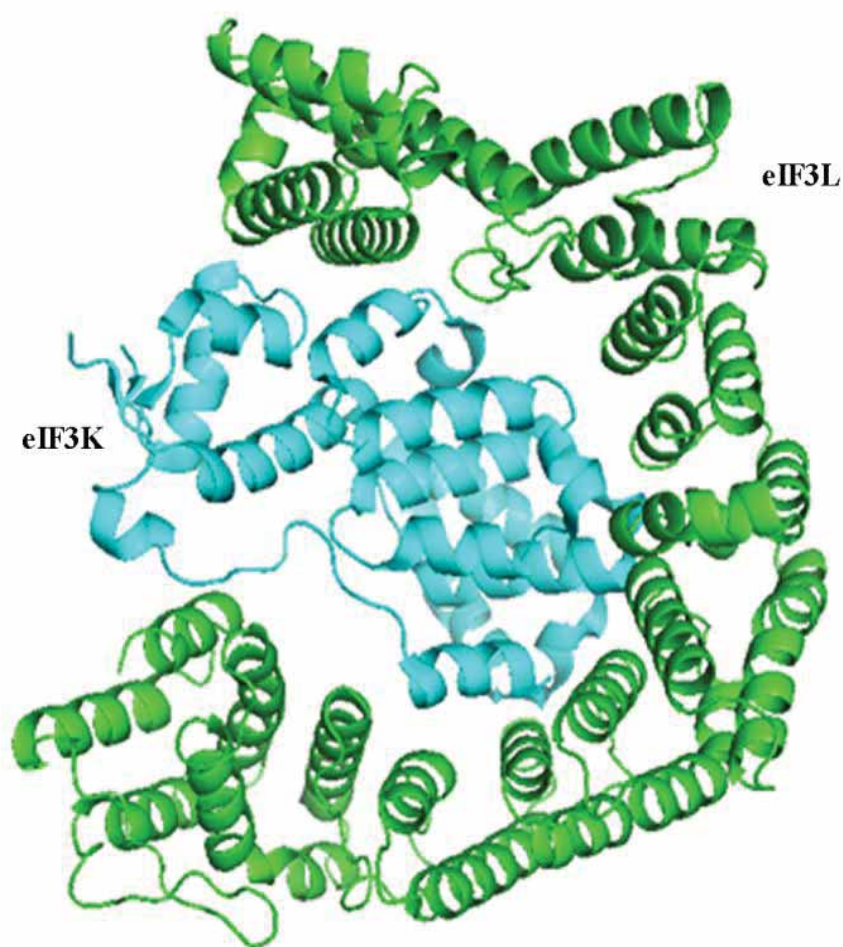


Figura 42. *Docking* molecular entre as subunidades K e L do complexo eIF3. A subunidade K está representada em azul e subunidade L em verde. A análise foi realizada usando Pach Docking com um *score* de 18802.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A febre amarela é uma doença hemorrágica, considerada emergente, ou reemergente de considerável importância para a saúde pública. O agente da febre amarela, vírus da febre amarela (YFV), pode causar epidemias de grande impacto e potencialmente fatais. Campanhas de vacinação em massa são realizadas para prevenir e controlar esses surtos, porém, o risco de epidemias de febre amarela especialmente em populações densas, cenários urbanos pobres na América do Sul e África têm aumentado devido à três fatores: aumento da densidade populacional do vetor *Aedes aegypti*; rápida urbanização, particularmente em partes da África, com populações migrando da zona rural para áreas urbanas; e baixa cobertura vacinal (GARDNER & RYMAN, 2010).

Apesar de extensivas campanhas de vacinação, é estimado que a febre amarela continue afetando anualmente 200.000 pessoas em regiões tropicais da África, América Central e América do Sul, com aproximadamente 30.000 casos fatais (GARDNER & RYMAN, 2010).

No Brasil, mais de 118 milhões de pessoas não estão vacinadas. Além disso, o mosquito *Ae. aegypti* encontra-se intensamente difundido em praticamente todos os estados do país. Indivíduos com febre amarela silvestre representam fontes potenciais de infecção para estes vetores, os quais podem iniciar epidemias urbanas explosivas, trazendo importantes consequências para a saúde pública e para a economia do país (BARRET et al., 2007; FIGUEIREDO, 2006).

Além da vacinação e o combate à infestação por *Ae. aegypti*, outro ponto de fundamental importância contra a febre amarela é o desenvolvimento de drogas antivirais capazes de interferir em etapas essenciais para o ciclo replicativo do vírus, como uma interação proteína-proteína.

A replicação dos *Flavivirus* é um complexo mecanismo ainda não completamente compreendido, no qual envolve não apenas proteínas virais, mas também proteínas celulares oriundas da maquinaria de transcrição e tradução celular. Estas proteínas celulares interagem com proteínas virais não-estruturais, entre elas NS2B, NS3 e NS5 e com a região 3'UTR do genoma viral para formar o complexo de replicação viral (replicase viral). Numerosos produtos gênicos e vias do hospedeiro têm sido recentemente implicados no ciclo replicativo dos *Flavivirus*, mas a relevância biológica de muitos desses processos permanece ainda não esclarecido (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009).

Como já mencionado, uma das proteínas virais de considerável relevância para a

replicação e patogenia dos *Flavivirus* é a NS5. Vários experimentos que pretende-se detectar interações entre a NS5 e proteínas celulares têm sido efetuados no sentido de se compreender melhor o mecanismo de replicação e patogênese de alguns membros da família *Flaviviridae*, como o YFV, o DENV, HCV e BVDV.

A descoberta de proteínas celulares que atuem como parceiras interativas de NS5 de YFV podem gerar ferramentas para a elucidação da importância funcional de NS5 em células infectadas, como também estabelecer uma base molecular para a atenuação viral dependente de NS5 e possibilitar, num futuro, uma abordagem proteômica e química para o desenho de drogas para a Febre Amarela.

Nesse contexto, foi realizado em nosso laboratório um *screening* para a detecção de interações entre o domínio RNA polimerase de NS5 do YFV com proteínas celulares em ensaio de duplo-híbrido (Dissertação MADRID, 2007), mediante a demonstração prévia de interações de NS5 de outros *Flavivirus* com proteínas celulares de hospedeiros (BLACKWELL & BRINTON, 1997; CHUNG et al., 2000; DE NOVA-OCAMPO et al., 2002; EVANS et al., 2004; HOUSHMAND & BERGQVIST, 2003; JOHNSON et al., 2001; LAI, 1998; MAJUNDER et al., 2001).

Em nosso *screening*, foi avaliado a interação de proteínas celulares somente com o domínio RdRp de NS5, uma vez que o domínio metiltransferase é provavelmente responsável por efeitos citotóxicos encontrados em ensaios de duplo- híbrido (Dissertação MADRID., 2007). Através da ativação de genes repórteres, foram identificadas 33 proteínas celulares interativas com RdRp NS5 YFV, sendo uma delas o fator de início de tradução eucariótico fator 3, subunidade L (eIF3L), passando a ser a proteína alvo deste estudo.

Em recente *screening* realizado por Le Breton e colaboradores (2011), também em sistema duplo-híbrido em levedura, a proteína eIF3L não foi identificada como parceira interativa de NS5, como no nosso estudo.

Além de ensaios duplo-híbrido em levedura, ensaios *in vitro* e em culturas de células de mamíferos foram realizados e comprovam que a proteína eIF3L realmente interage com RdRp-NS5, confrontando com os dados de Le Breton e colaboradores (2011). Além disso, ensaios de atividade de luciferase sugerem que a superexpressão de eIF3L em células de mamíferos resultem na diminuição da replicação viral, mostrando uma importante função na replicação viral. É importante considerar que a superexpressão de eIF3L não afeta a síntese global de proteínas na célula, como foi mostrado pelo controle endógeno GAPDH.

Na replicação viral, após a entrada do vírus na célula e desnudamento do nucleocapsídeo, a replicação se inicia com a imediata tradução do genoma. A extremidade 5'

do genoma de ssRNA (+) possui uma estrutura *cap* (N7meGpppA2`Ome-RNA) com uma função essencial no início da tradução e proteção do RNA viral contra a degradação por exonucleases endógenas (BOLLATI et al., 2010).

A tradução *cap*-dependente da longa ORF se inicia no códon AUG próximo à extremidade 5' do genoma viral. Para iniciar a tradução, o vírus necessita de fatores eucarióticos do hospedeiro iniciadores de tradução, conhecidos como eIFs (GARDNER & RYMAN, 2010). De fato, estudos prévios mostraram a associação de eIFs, incluindo eIF3 na replicação do vírus da hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência humana, tipo 1 (HIV-1), vírus Influenza e vírus da febre amarela (YFV) (CAI et al., 2010; EASTON et al., 2009; TAFFOREAU et al., 2011; VALENTE et al., 2009).

Estudos tem reportado o envolvimento de proteínas do complexo eIF3 modulando etapas de replicação viral, tal como eIF3F na inibição da replicação do HIV-1 (VALENTE, 2009). Schoggins e colaboradores (2011) mostrou através de *screening* que eIF3L é um fator celular que medeia a resposta antiviral por interferon tipo I contra a invasão de patógenos virais, então chamados de produtos de genes estimuladores de interferon (ISGs). Os autores mostraram que a superexpressão de eIF3L possui potencial efeito inibitório de aproximadamente 10% na replicação do vírus da febre amarela. Nesse estudo, nós mostramos que a superexpressão de eIF3L reduz significativamente em 50% a replicação do vírus da febre amarela. Em um contexto celular, a expressão de eIF3L (chamada anteriormente de eIF3S6IP) sofre regulação negativa em células PBMCs após vacinação com o YFV 17D (SCHERER et al., 2007). Esse achado pode sugerir que após a entrada nas células, o YFV induz a regulação negativa de eIF3L como um mecanismo de escape do sistema imune. Assim, nossos resultados estão suportados com esses encontrados na literatura e outros estudos são necessários para o entendimento dos mecanismos que envolvem eIF3L na replicação viral.

Logo após o início da tradução, as proteínas NS recém-traduzidas e processadas, se associam para formar a replicase viral. A replicase reconhece estruturas secundárias na extremidade 3' do RNA viral e a RdRp inicia a síntese de cópias de RNA (-) que são transcritas para a produção da nova progênie de genomas de RNA (+) (GARDNER & RYMAN, 2010). Em mamíferos, a RNA polimerase I (Pol I) é uma enzima que interage com proteínas acessórias, PAFs (polymerase-associated factors) incluindo eIF3L (antes denominada de PAF67), o que sugere o envolvimento dessa proteína também na iniciação de transcrição (SEITHER et al., 2001). Corroborando com esse dado, eIF3L também foi descrita recentemente como um fator celular requerido para atividade de RdRp na replicação do vírus

influenza (TAFFOREAU et al., 2011). Yuan e colaboradores (2002) mostrou que o fator de transcrição TIF-IA está fortemente associado com eIF3L (PAF67). Em adição, TIF-IA está associada com uma subpopulação de Pol I para formar uma enzima transcricionalmente ativa e é também alvo de diversas vias de sinalização. Assim, eIF3L interagindo com TIF-IA pode ser alvo de vias regulatórias em associação com a RNA polimerase de YFV.

Confirmada a interação de eIF3L com RdRp de NS5 YFV, foi realizada uma extensão da aplicação do sistema duplo-híbrido para a identificação de domínios mínimos de interação entre as proteínas, usando para este fim deleções em RdRp. Quando a região responsável pelo estabelecimento de uma interação proteína-proteína é mapeada, são geradas possibilidades que vão desde a identificação da funcionalidade para uma proteína não caracterizada, como para a produção de dados que direcionem estudos futuros relacionados (LEGRAIN et al., 2001).

Dessa forma, foi mostrada que a interação de eIF3L ocorreu em uma região de 79 aminoácidos de RNA polimerase de NS5 do YFV, a qual foi denominada de *Interaction Domain*, ID. Como reportado por Bronzoni e colaboradores (2011), um modelo predito da proteína NS5 de YFV mostrou que esta região de interação (ID) é naturalmente exposta na molécula e potencialmente capaz de interagir com outras proteínas, o que exclui a possibilidade de que ID estivesse internalizada na molécula e tenha se tornado exposta com as deleções realizadas.

Baseando-se na suspeita de que a interação de eIF3L pudesse ocorrer com outros *Flavivirus*, a sequência do ID de YFV foi comparada com as sequências de outros *Flavivirus*, sendo identificada uma homologia entre os aminoácidos 390 a 449 (BRONZONI et al., 2011). Em ensaios de duplo-híbrido, foi demonstrado que o ID de Dengue 4, Dengue 3 e vírus da Encefalite de Saint Louis também interage com eIF3L, sugerindo que esta interação é importante para outros membros do gênero (Dissertação MADRID, 2007).

Uma vez mapeada a região de interação de RdRp de NS5 do YFV, a técnica de mutagênese sítio-dirigida nos auxiliou na identificação de potenciais sítios de contato, resíduos de aminoácidos, envolvidos na interação de ID com eIF3L. As mutações foram desenhadas com a colaboração do Dr. João A. R. G. Barbosa, do Centro de Biologia Molecular Estrutural do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Campinas.

As mutações na região FWELV (F433A/W434A/V437A) de ID resultaram na eliminação da interação com eIF3L, sugerindo que aminoácidos dessa região podem ser críticos para a interação com eIF3L. Essas três mutações produzidas em FWELV poderiam ter causado alterações conformacionais na proteína prevenindo possíveis interações com outras

proteínas celulares. Entretanto, dados de outro estudo realizado em nosso laboratório (dados não mostrados) tem mostrado que as mesmas mutações não afetam a interação do domínio ID com a ribonucleoproteína celular polipeptídeo A (U1A), indicando que a estrutura do domínio pode não ter sido significativamente alterada com as mutações e o sítio de interação destas duas proteínas com ID é diferente.

Com os dados de nosso estudo, confirmou-se que eIF3L interage com o domínio RdRp de NS5 e possui relevante papel na modulação de YFV. Apesar de descrita atualmente como fator de início de tradução, não se sabe com exatidão se eIF3L atua nos processos de tradução e/ou transcrição durante a replicação do YFV, sendo necessários outros estudos para melhor compreensão da replicação viral.

Considerando a relevância de eIF3L em complexos celulares, interações com patógenos, envolvimento na modulação de replicação viral e ausência de dados na literatura, tornou-se importante também, a elucidação das propriedades físico-químicas e estruturais da proteína através de análises experimentais e computacionais. As análises computacionais foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza e Gabriela C. Araújo do Laboratório de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – São José do Rio Preto.

Vários sistemas para expressão de proteínas recombinantes têm sido utilizados para o entendimento das funções e estruturas das proteínas. Após a clonagem do gene em vetor de expressão em procariotos, a proteína eIF3L pôde ser expressa em células *E.coli* BL (DE3) 21 e mostrou ser insolúvel em diferentes condições de fermentação e solubilização, formando corpúsculos de inclusão. De acordo com Singh & Panda (2005), os agregados insolúveis de proteína podem ser formados pelo alto nível de expressão da proteína em *E.coli* ou pela hidrofobicidade de algumas proteínas. Diante desse fato, foi realizada uma análise computacional pelo software *PsiPred* para verificação da hidrofobicidade da proteína. A análise mostrou que eIF3L realmente possui regiões hidrofóbicas, o que possivelmente dificultou a solubilização de eIF3L.

Os corpúsculos de inclusão foram solubilizados utilizando um potente detergente, sarkosyl, juntamente com glicerol para supressão da agregação. Porém, o uso de detergentes com potencial desnaturante pode alterar completamente a estrutura secundária de proteínas, impossibilitando estudos espectroscópicos posteriores (TSUMOTO et al., 2003).

De acordo com Kudou et al., (2011) uma outra desvantagem do uso detergentes para solubilização é que eles se ligam com grande afinidade às proteínas, sendo necessárias diluições e diálises para removê-lo. Esse efeito negativo foi visualizado em nossos

experimentos, uma vez que após as etapas de purificação, a proteína foi submetida a um extenso período de diálise antes de ser concentrada por liofilização, e quando ressuspensa precisou ser dialisada novamente antes dos ensaios espectroscópicos.

Dessa forma, os ensaios de *Dynamic Light Scattering* (DLS) e Dicroísmo Circular (CD) se mostraram essenciais para garantir que a proteína eIF3L purificada não possuía agregados e se mantinha estruturada após a solubilização, excluindo a possibilidade de alterações estruturais. Nossos resultados mostraram que eIF3L mantém preservada sua estrutura secundária e é viável para posteriores estudos funcionais e estruturais, inclusive para ensaios de cristalização.

A ausência de dados na literatura à cerca da estrutura de eIF3L, nos levou a realizar uma predição da proteína por modelagem molecular usando o *software* I-Tasser. No modelo predito, encontramos uma alta similaridade de estruturas secundárias (65% hélice, 4% folha, 31% outras) com os resultados experimentais obtidos por Dicroísmo Circular (70% hélice, 4% folha, 8% dobras, 19% outras), aumentando a confiabilidade do modelo predito. O modelo predito foi validado como razoavelmente bom segundo análise realizada pelo *ProQ-Server*.

O modelo predito se trata de uma predição computacional a partir da estrutura primária de eIF3L na ausência de moldes depositados em bancos de dados, modelagem de proteínas *ab initio*. A determinação de um modelo molecular a partir desse método ainda não dispõe de algoritmos capazes de simular com total precisão os processos de enovelamento de uma proteína, reforçando a necessidade de estudos estruturais experimentais como a cristalografia para resolver a estrutura de eIF3L.

No presente estudo, foram realizadas também análises computacionais pelo *software* *Predict Protein* para verificação de potenciais sítios na eIF3L que pudessem sofrer modificações pós-traducionais. As modificações pós-traducionais podem regular a atividade e o envolvimento das subunidades do complexo eIF3 em interações durante o processo de início de tradução. As fosforilações de cadeias laterais de subunidades do complexo eIF3 estão diretamente envolvidas na interação entre as subunidades e nas interações com outros componentes celulares para início do processo de tradução. Além disso, essas fosforilações nas subunidades podem também regular a formação e estabilidade do complexo eIF3 (DAMOC et al., 2007; ZHOU et al., 2008). O resultado da nossa análise, indicou a existência de um sítio de N- glicosilação no resíduo N554 e 13 sítios de fosforilação nos resíduos S21, T62, T103, T204, S208, S233, S249, T354, T459, T482, S507, S515, T556 na proteína eIF3L. Esse resultado sugere que a proteína eIF3L é potencialmente capaz de formar interações com

outras proteínas nestes resíduos de aminoácidos. Análises de eIF3L pelo servidor *Q-Site Finder* encontrou 10 possíveis sítio de interação na proteína. Esses dados sugerem que eIF3L é potencialmente capaz de estabelecer interações com outras proteínas.

Futuros estudos funcionais da proteína eIF3L na interação proteína-proteína com NS5 de YFV serão promissores para a elucidação dos mecanismos de patogênese e virulência do vírus da febre amarela. Uma vez realizada, a cristalografia poderá fornecer informações a respeito de sítios moleculares de interação de RdRp de NS5 do YFV e consequentemente de possíveis alvos para o desenho de drogas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi mapeado e identificado um domínio de 79 aminoácidos, denominado de *Interaction Domain*, necessário para o estabelecimento da interação entre o fator de início de tradução eIF3L e o domínio RNA polimerase de NS5 do vírus da febre amarela em sistema duplo-híbrido em levedura. Essa interação proteína-proteína é relevante para o gênero *Flavivirus*. Resíduos de aminoácidos críticos para essa interação foram identificados no *Interaction Domain* por mutagênese sítio-dirigida.

A interação de eIF3L com RdRp de NS5 do YFV foi confirmada em ensaios *in vitro* e em culturas de células de mamíferos.

Os ensaios de superexpressão de eIF3L nos levou ao conhecimento de que a proteína inibe significativamente a replicação do vírus da febre amarela.

A proteína recombinante humana eIF3L pôde ser clonada e expressa em *E. coli* e purificada a partir de simples métodos de cromatografia das frações solúveis, mantendo a proteína em sua forma nativa, o que permitirá futuros estudos estruturais.

Embora a precisa função de eIF3L em interações com proteínas virais não seja claramente entendida, esses resultados sugerem que a interação de eIF3L com NS5 de YFV possua um importante papel na replicação viral. Futuros estudos dessa interação podem facilitar o entendimento da replicação dos *Flavivirus* e patogenicidade

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, R., KUDOU, M., TANAKA, Y., ARAKAWA, T., TSUMOTO, K. Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 381, p.306-310. 2009.

ARKIN, M. Protein-protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. **Curr Opin Chem Biol**. v.9, n.3, p.317-324. 2005.

ASANO, K., MERRICK, W. C., HERSHEY, J. W. The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome. **J Biol Chem**. v. 272, n. 38, p. 23477-23480.1997.

BADTKE, M. P., CAO, F., TAVIS, J. E. Combining genetic and biochemical approaches to identify functional molecular contact points. **Biol Proced Online**. v.8, p.77-86. 2006.

BARRET, A. D., HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu Rev Entomol**. v.52, p.209-229. 2007.

BLACKWELL, J. L., BRINTON, M. A. Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 39 stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. **J Virol**. v.7, p.6433-6444. 1997.

BLOCK, H., MAERTENS, B., SPRIESTERSBACH, A., BRINKER, N., KUBICEK, J., FABIS, R., LABAHN, J., SCHAFFER, F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. **Methods Enzymol**.v. 463.p.439-473. 2009.

BOLLATI, M., ALVAREZ, K., ASSENBERG, R., BARONTI, C., CANARD, B., COOK, S., COUTARD, B., DECROLY, E., DE LAMBALLERIE, X., GOULD, E. A., GRARD, G., GRIMES, J. M., HILGENFELD, R., JANSSEN, A. M., MALET H., MANCINI, E. J., MASTRANGELO, E., MATTEVI, A., MILANI, M., MOUREAU, G., NEYTS, J., OWENS, R. J., REN, J., SELISKO, B., SPERONI, S., STEUBER, H., STUART, DI., UNGE, T., BOLOGNESI, M. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. **Antiviral Res**. v.87, p.125-148. 2010.

BOSSI, P., TEGNELL, A., BAKA, A., VAN LOOCK, F., HENDRICKS, J., WERNER, A., et al. Bichat guidelines for the clinical management of haemorrhagic fevers and bioterrorism-related haemorrhagic fever viruses. **Euro Surveill**. v.9, n.12, p.1-8. 2004.

BRAHMS, S., BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. **J. Mol. Biol**. v.138, p.149-178. 1980.

BRENT, R., PTASHNE, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. **Cell**. v.43, p.729-736. 1985.

BRONZONI, R. V. M., BALEOTTI, F. G., NOGUEIRA, R. M. R., NUNES, M., FIGUEIREDO, L. T. M. Duplex-RT-PCR followed by nested-PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **J Clin Microbiol**. v.43, n.2, p.696-702. 2005.

BRONZONI, R. V. M., MADRID, M. C. F. S., DUARTE, D.V.B., PELLEGRINI, V. O. A., PACCA, C. C., CARMO, A. C. V., ZANELLI, C. F., VALENTINI, S. R., SANTACRUZ-PÉREZ, C., BARBOSA, J. A. R. G., LUTZ, C. S., RAHAL, P., NOGUEIRA, M. L. The small nuclear ribonucleoprotein U1A interacts with NS5 from yellow fever virus. **Arch. Virol**. V.156, p.931-938, 2011.

BUCHAN, D.W., WARD, S.M., LOBLEY, A.E., NUGENT, T.C., BRYSON, K. & JONES, D.T. Protein annotation and modelling servers at University College London. **Nucl. Acids Res**. v.38. Suppl, W563-W568. 2010.

BUCKLEY, A., GAIDAMOVICH, S., TURCHINSKAYA, A., GOULD, E. A. Monoclonal antibodies identify the NS5 yellow fever non structural protein in the nuclei of infected cells. **J Gen Virol**. v.73, p.1125-1130. 1992.

BUJNICKI, J. M. Protein structure prediction by recombination of fragments. **Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology**. v.7. p. 19–27. 2006.

CAI, Q., TODOROVIC, A., ANDAYA, A., GAO, J., LEARY, J. A., CATE, J. H. Distinct regions of Human eIF3 Are Sufficient for Binding to the HCV IRES and the 40S Ribosomal Subunit. **J Mol Biol**. v.403, p.185-196. 2010.

CHAMBERS, T. J., HAHN, C. S., GALLER, R., RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression and replication. **Annu Rev Microbiol**. v.44, p.649-688. 1990.

CHEN, C. J., KUO, M. D., CHIEN, L. J., HSU, S. L., WANG, Y. M., LIN, J. H. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese Encephalitis virus genomic RNA. **J Virol**. v.71, n.5, p.3466-3473. 1997.

CHIEN, C. T., BARTEL, P. L., STERNGLANZ, R., FIELDS, S. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. **Proc Nat Acad Sci USA**. v.88, n. 21, p.9578-9582. 1991.

CHUA, J. J. E., NG, M. M. L., CHOW, V. T. K. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus Research*. v.102. p.151-163. 2004.

CHUNG, K. M., KIM, J. L. J. E., SONG, O. K., CHO, S., LIM, J., SEEDORF, M., et al. Nonstructural protein 5A of hepatitis C virus inhibits the function of karyopherin β 3. **J Virol**. v.74, n.11, p.5233–5241. 2000.

DAMOC, E., FRASER, C. S., ZHOU, M., VIDELER, H., MAYEUR, G. L., HERSHEY, J. W. B., DOUDNA, J. A., ROBINSON, C. V., LEARY, J. A. Structural Characterization of the Human Eucaryotic Initiation Factor 3 Protein Complex by Mass Spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**. v.6, p.1135:1146. 2007.

DAVIDSON, A. D. New insights into flavivirus nonstructural protein 5. **Adv Virus Res**. v.74, p.41-101. 2009

DE NOVA-OCAMPO, M., LVEDA, N. V. S., ANGEL, R. M. Translation elongation factor-1 alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. **Virology**. v.295, p.337-347. 2002.

DUHOVNY, D., NUSSINOV, R., WOLFSON, H. J. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. In: Gusfield et al., Ed. Proceedings of the 2'nd Workshop on Algorithms in Bioinformatics (WABI) Rome, Italy, **Lecture Notes in Computer Science** 2452, pp. 185-200, Springer Verlag. 2002.

DUNSTER, L. M., WANG, H., RYMAN, K. D., MILLER, B. R., WATOWICH, S. J., MINOR, P. D., et al. Molecular and biological changes associated with HeLa cell attenuation of wild-type yellow fever virus. **Virology**. v.261, n. 2, p.309-318. 1999.

EASTON, L. E., LOCKER, N., LUKAVSKY, P. J. Conserved functional domains and a novel tertiary interaction near the pseudoknot drive translational activity of hepatitis C virus and hepatitis C virus-like internal ribosome entry sites. **Nucleic Acids Res**. v.37, p.5537-5549. 2009.

EMSLEY, P., LOHKAMP, B., SCOTT, W.G., COWTAN, K. Features and Development of Coot. **Acta Crst**. D66, p.486-501. 2010.

EVANS, M. J., RICE, C. M., GOFF, S. P. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.101, n. 35, p.13038-13043. 2004.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D., MAZZON, M., JACOBS, M., AMARA, A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host & Microbe**. v.5, n.4, p.318-328. 2009.

FIELDS, S., SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**. v.340, n.6230, p.245-247. 1989.

FIGUEIREDO, L. T. M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.39, p.203-210. 2006.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect**. v.2, p.1643-1649. 2000.

FRANCO, O. História da febre amarela no Brasil. **Departamento Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde**. Rio de Janeiro. 1969.

FRANCO, O. História da febre amarela no Brasil. **Ministério da Saúde**. Rio de Janeiro. 1976.

GARDNER, C. L., RYMAN, K. D. Yellow Fever: A Reemerging Threat. **Clin. Lab. Med**. 30, 237-260. 2010.

GOLEMIS, E. A., ADAMS, P. D., BASTIAENS, P. I. H., EINARSON, M. B., FISHER, R. J., HARPUR, A. G., et al. Protein interaction technologies. In: Sambrook J, Russell DW, editores. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.18.1-18.54. 2001.

GOULD, E. A., SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**. v.371, p.500-509. 2008.

GREENFIELD, N., FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**. v.8, p.4108–4116. 1969.

HOPE, I. A., STRUHL, K. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. **Cell**. v.46, n.6, p.885-894. 1986.

HOUSHMAND, H., BERGQVIST, A. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display. **Biochem Biophys Res Commun**. v.309, n.3, p.695-701. 2003.

JANSON, J. C., RYDEN, L. **Protein purification principles, high resolution methods, and applications**. 2nd ed. New York. Wiley-VCH Publishing. 1990.

JOHANSSON, M., BROOKS, A. J., JANS, D. A., VASUDEVAN, S. G. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- β and the viral helicase, NS3. **J Gen Virol**. v.82, p.735-745. 2001.

JOHNSON, C. M., PEREZ, D. R., FRENCH, R., MERRICK, W. C., DONIS, R. O. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1. **J Gen Virol**. v.82, p.2935-2943. 2001.

JOHNSON, W. C, JR. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. **Proteins: Struct. Funct. Genet**. v.35, p.307–312.1999.

KAPOOR, M., ZHANG, L., RAMACHANDRA, M., KUSUKAWA, J., EBNER, K. E., PADMANABHAN, R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. **J Biol Chem**. v.270, n.32, p.19100-19106. 1995.

KARIMOVA, G., LADANT, D., ULLMANN, A. Two-hybrid systems and their usage in infection biology. **Int J Med Microbiol**. v.292, n.1, p.17-25. 2002.

KEEGAN, L., GILL, G., PTASHNE, M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. **Science**. v.231, n. 4739, p.699-704. 1986.

KOLINSKI, A. Protein modelling and structure prediction with a reduced representation. **Acta Biochimica Polonica**, v.51. p. 349–371. 2004.

KUDOU, M., YUMIOKA, R., EJIMA, D., ARAKAWA, T., TSUMOTO, K. A novel protein refolding system using lauroyl-L-glutamate as a solubilizing detergent and arginine as a folding assisting agent. **Protein Expression and Purification**. v.75, p.46-54. 2011.

LAI, M. M. C. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. **Virology**. v.244, p.1-12. 1998.

LAURIE, A. T., JACKSON, R. M. Q-SiteFinder: na energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. **Bioinformatics**, v.21, p.1908-1916. 2005.

LE BRETON, M., MEYNIEL-SCHICKLIN, L., DELOIRE, A., COUTARD, B., CANARD, B., DE LAMBALLERIE, X., ANDRE, P., RABOURDIN-COMBE, C., LOTTEAU, V., DAVOUST, N. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. **BMC Microbiology**. p.211:234. 2011.

LEES, J. G., MILES, A. J., WIEN, F., WALLACE, B. A. **Bioinformatics** v.22, p.1955–1962. 2006.

LEGRAIN, P., WOJCIK, J., GAUTHIER, J. M. Protein-protein interaction maps: a lead towards cellular functions. **Trends in Gen.** v.17. p.346-352. 2001.

LINDENBACH, B. D., RICE, C. M. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editores. **Fields Virology**. 4ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.991-1041. 2001.

MACDONALD, P. N. **Two-hybrid systems – Methods and protocols**. New Jersey: Humana Press Inc. 2001.

MADRID, Maria Carolina Ferrari Sarkis. **Catálogo e descrição bibliográfica**: Identificação de interações proteína-proteína entre NS5 de febre amarela e proteínas celulares. São José do Rio Preto, 109p, 2007. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2007.

MAJUMDER, M., GHOSH, A. K., STEELE, R., RAY, R., RAY, R. B. Hepatitis C virus NS5A physically associates with P53 and regulates P21/Waf1 gene expression in a P53-dependent manner. **J Virol.** v.75, p.1401-1407. 2001.

MARCHETTI, A., BUTTITTA, F., MIYAZAKI, S., GALLAHAN, D., SMITH, G.H., CALLAHAN, R. Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia. **J Virol.** v.69, p.1932-1938. 1995.

MASUTANI, M., SONENBERG, N., YOKOYAMA, S., IMATAKA, H. Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. **The EMBO Journal**. v.26, n.14, p.3373-3383. 2007.

MILLER, J., STAGLJAR, I. Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins. **Methods Mol Biol.** v. 261, p. 247-262. 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. **Febre Amarela Silvestre, Rio Grande do Sul, 2008 e 2009**. 2009. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>>. Acesso em 15. Mai. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. **Febre Amarela Silvestre, Estado de São Paulo, 2009**. 2009. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>>. Acesso em 15. Mai. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. **Casos de Febre Amarela Brasil, Grandes Regiões, Unidades Federadas 1990-2010**. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1552>. Acesso em 20. Jun. 2012.

MONATH, T. P. Yellow fever. In: Monath TP, editor. **Arboviruses: ecology and epidemiology**. Boca Raton: CRC Press, p.139-241.1988.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **The Lancet Infect Dis**. v.1, p.11-20. 2001.

MORRIS-DESBOIS, C., RÉTY, S., FERRO, M., GARIN, J., JALINOT, P. The human protein HSPC021 interacts with Int-6 and is associated with eukaryotic translation initiation factor 3. **J Biol Chem**. v.276, p.45988-45995. 2001.

PACCA, C. C., SEVERINO, A. A., MONDINI, A., RAHAL, P., D'AVILA, S. G., CORDEIRO, J. A., NOGUEIRA, M. C., BRONZONI, R. V., NOGUEIRA, M. L. RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo. **Virus Genes**. v. 38, p.224-231. 2009.

PASTORINO, B., NOUGAIRÈDE, A., WURTZ, N., GOULD, E., DE LAMBALLERIE, X. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Res**. v.87, p.281-294. 2010

PHIZICKY, E. M., FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiol Reviews**. v.59, p.94-123. 1995.

PIJLMAN, G. P., FUNK, A., KONDRATIEVA, N., LEUNG, J., TORRES, S., VAN DER, A. A. L., LIU, W. J., PALMENBERG, A. C., SHI, P. Y., HALL, R. A., KHROMYKH, A. A. A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. **Cell Host Microbe** v.4, p.579-591. 2008.

REED, K. E., GORBALENYA, A. E., RICE, C. M. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family *Flaviviridae* are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. **J Virol**. v.72, p.6199-6206. 1998.

ROST, B., YACHDAV, G., LIU, J. The PredictProtein server. **Nucleic Acids Res.** Jul 1;32 (Web Server issue):W321-6. 2004.

ROY, A., KUCUKURAL, A., ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nat Protoc.** v.5. p.725-738. 2010.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W., editores. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual.** 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. p.18.56-18.61.

SCHERER, C. A., MAGNESS, C. L., STEIGER, K. V., POITINGER, N. D., CAPUTO, C. M., MINER, D. G., et al. Distinct gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients infected with vaccinia virus, yellow fever 17D virus, or upper respiratory infections. **Vaccine.** v.25, p.6458-6473. 2007.

SCHOGGINS, J. W., WILSON, S. J., PANIS, M., MURPHY, M. Y., JONES, C. T., BIENIASZ, P., RICE, C. M. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. **Nature** v.472, p.481-485.2011.

SEITHER, P., IBEN, S., THIRY, M., GRUMMT, I. PAF67, a novel protein that is associated with the initiation-competent form of RNA polymerase I. **Biol Chem.** v.382, p.1163-1170. 2001.

SHI, P. Y., LI, W., BRINTON, M. A. Cell proteins bind specifically to West Nile virus minus-strand 3' stem-loop RNA. **J Virol.** v.70, p.6278-6287. 1996.

SINGH, S. M., PANDA, A. K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** v. 99, n.4, p.303-310. 2005.

SOFER, G. K., NYSTROM, L.E. **Process chromatography: a practical guide.** New York: Academic Press. 1989.

SOFER, G. K., NYSTROM, L. E. **Process chromatography.** New York: Academic Press. 1991.

SREERAMA, N., WOODY, R. W. Circular Dichroism of Peptides and Proteins. **In Circular Dichroism: Principles and Applications** (Berova N, Nakanishi K, Woody R W, editores.) 2^a ed. Wiley, New York. 2000. p. 601–620.

TAFFOREAU, L., CHANTIER, T., PRADEZYNSKI, F., PELLET, J., MANGEOT, P. E., VIDALAIN, P. O., ANDRE, P., RABOURDIN-COMBE, C., LOTTEAU, V. Generation and Comprehensive Analysis of an Influenza Virus Polymerase Cellular Interaction Network. *Journal of Virology*. p.13010-13018. 2011.

TSUMOTO, K., UMETSU, M., KUMAGAI, I., EJIMA, D., PHILO, J. S., ARAKAWA, T. Role of Arginine in protein Refolding, Solubilization, and Purification. **Biotechnol. Prog.** v.20, p. 1301-1308. 2004.

TSUMOTO, K., UMETSU, M., KUMAGAI, I., EJIMA, D., ARAKAWA, T. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 312. p.1383-1386. 2003.

UCHIL, P. D., KUMAR, A. V., SATCHIDANANDAM, V. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. **J Virol**. v.80, p.5451-5464. 2006.

VALENTE, S. T., GILMARTIN, G. M., MOTT, C., FALKARD, B., GOFF, S. P. Inhibition of HIV-1 replication of eIF3F. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**. v.106, p.4071-4078. 2009.

VAN DER STUYFT, P., GIANELLA, A., PIRARD, M., CESPEDES, J., LORA, J., PEREDO, C., et al. Urbanization of yellow fever in Santa Cruz, Bolivia. **Lancet**. v.353, p.1558-1562. 1999.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.36, p.275-293. 2003.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. **Rev Bras Epidemiol**. v.5, p.244-258. 2002.

VILLORDO, S. M., GAMARNIK, A. V. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. **Virus Research**. v.139, p.230-239. 2009.

XIE, H., RYMAN, K. D., CAMPBELL, G. A., BARRETT, A. D. Mutation in NS5 protein attenuates mouse neurovirulence of yellow fever 17D vaccine virus. **J Gen Virol**. v.79, p.1895-1899. 1998.

WALLNER, B., ELOFSSON, A. Can correct protein models be identified? **Protein Sci**. v.12. p.1073-1086.2003.

YUAN, X., ZHAO, J., ZENTGRAF, H., HOFFMANN-ROHRER, U., GRUMMT, I. Multiple Interactions between RNA Polymerase I, TIF-IA and TAF_I subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. **EMBO Rep.** v.3, p.1082-1087. 2002.

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 2nd ed. Porto Alegre: Mercado Aberto. 2003. p. 75-87.

ZHOU, M., SANDERCOCK, A. M., FRASER, C. S., RIDLOVA, V., STEPHENS, E., SCHENAUER, M. R., YOKOI-FON, T., BARSKY, D., LEARY, J. A., HERSHEY, J. W., DOUDNA, J. A., ROBINSON, C. V. Mass Spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.105, n. 47, p.18139-18144. 2008.