

Maria Carolina Ferrari Sarkis Madrid

**Identificação de Interações Proteína-Proteína
entre NS5 do Vírus da Febre Amarela e
Proteínas Celulares**

**São José do Rio Preto
2007**

Maria Carolina Ferrari Sarkis Madrid

Identificação de Interações Proteína-Proteína entre
NS5 do Vírus da Febre Amarela e Proteínas
Celulares

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

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

São José do Rio Preto
2007

Madrid, Maria Carolina Ferrari Sarkis

Identificação de interações proteína-proteína entre NS5 do vírus da febre amarela e proteínas celulares / Maria Carolina Ferrari Sarkis
Madrid

São José do Rio Preto, 2007

109 p.

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

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

1. Febre amarela; 2. NS5; 3. Interações proteína-proteína; 4. Sistema duplo-híbrido em levedura.

MARIA CAROLINA FERRARI SARKIS MADRID

Identificação de Interações Proteína-Proteína entre
NS5 do Vírus da Febre Amarela e
Proteínas Celulares

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda
Nogueira

2º Examinador: Prof. Dr. Cláudio Antonio Bonjardim

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Eloiza Helena Tajara da Silva

Suplentes: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Prof^a. Dr^a. Dorotéia Rossi Silva Souza

São José do Rio Preto, 04/12/07.

Sumário

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Quadros	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	ix
Resumo	xii
Abstract	xiv
1. Introdução	2
1.1. Febre amarela – Considerações gerais	2
1.2. <i>Flavivirus</i> – Aspectos estruturais e de replicação	7
1.3. Sistema duplo-híbrido em levedura (<i>yeast two-hybrid system</i>)	15
1.3.1. Considerações sobre o sistema duplo-híbrido em levedura	20
1.4. Relevância e justificativa	21
1.5. Objetivos	22
1.5.1. Objetivo geral	22
1.5.2. Objetivos específicos	23
2. Material e Método	25
2.1. Construção das iscas do sistema duplo-híbrido	25
2.1.1. Vetor pGBKT7	25
2.1.2. Amplificação dos domínios metiltransferase e RNA polimerase de NS5 do YFV	27
2.1.3. Ensaio de restrição enzimática	28
2.1.4. Reação de ligação	29

2.1.5. Análise dos transformantes	30
2.1.5.1. Triagem por PCR	30
2.1.5.2. Extração de DNA plasmidial recombinante	31
2.1.5.3. Ensaio de restrição enzimática	31
2.1.5.4. Seqüenciamento nucleotídico	32
2.2. Sistema duplo-híbrido em levedura	33
2.2.1. Levedura	33
2.2.2. Meios de cultura para crescimento e manutenção de leveduras	34
2.2.3. Transformação em levedura das iscas do duplo-híbrido	35
2.2.4. Análise da expressão das iscas MT e RNAPol em levedura	36
2.2.4.1. Avaliação da toxicidade das iscas	36
2.2.4.2. Avaliação da expressão da isca RNAPol por <i>Western Blotting</i>	36
2.2.4.3. Teste de auto-ativação do gene repórter <i>HIS3</i> pela isca RNAPol	37
2.2.5. Triagem em sistema duplo-híbrido	38
2.2.5.1. Vetor pACT2	38
2.2.5.2. Transformação seqüencial de plasmídeos controle em levedura	40
2.2.5.3. Transformação seqüencial da biblioteca de cDNA de células Hela	41
2.2.5.4. Identificação dos clones positivos	42
2.2.5.4.1. Ativação de genes repórteres	42
2.2.5.4.2. Isolamento dos plasmídeos pACT2-cDNA da biblioteca (presas)	43

2.2.5.4.3. Ensaio de restrição enzimática	44
2.2.5.4.4. Seqüenciamento nucleotídico	44
2.2.5.5. <i>Plasmid Linkage</i> – Re-teste no sistema duplo-híbrido	45
2.2.6. Mapeamento do domínio da interação	46
2.2.6.1. Construção das iscas RNAPol contendo deleções	46
2.2.6.2. Triagem em duplo-híbrido com as iscas RNAPol contendo deleções	48
2.2.6.3. Confirmação do domínio da interação	49
2.2.6.3.1. Construção da isca contendo o domínio da interação	49
2.2.6.3.2. Triagem em duplo-híbrido com a isca FragA RNAPol	49
3. Resultados	51
3.1. Construção das iscas do sistema duplo-híbrido	51
3.1.1. Amplificação dos domínios metiltransferase e RNA polimerase de NS5 do YFV	51
3.1.2. Análise dos transformantes	52
3.1.2.1. Triagem por PCR	52
3.1.2.2. Ensaio de restrição enzimática	53
3.1.2.3. Seqüenciamento nucleotídico	57
3.2. Sistema duplo-híbrido em levedura	57
3.2.1. Análise da expressão das iscas MT e RNAPol em levedura	57
3.2.1.1. Avaliação da toxicidade das iscas	57
3.2.1.2. Avaliação da expressão da isca RNAPol por <i>Western Blotting</i>	58

3.2.1.3. Teste de auto-ativação do gene repórter <i>HIS3</i> pela isca RNAPol	59
3.2.2. Triagem em sistema duplo-híbrido	60
3.2.2.1. Transformação seqüencial de plasmídeos controle em levedura	60
3.2.2.2. Transformação seqüencial da biblioteca de cDNA de células Hela	61
3.2.2.3. Identificação dos clones positivos	61
3.2.2.3.1. Ativação de genes repórteres	61
3.2.2.3.2. Ensaio de restrição enzimática	63
3.2.2.3.3. Seqüenciamento nucleotídico	64
3.2.2.4. <i>Plasmid Linkage</i> – Re-teste no sistema duplo-híbrido	66
3.2.3. Mapeamento do domínio da interação	67
3.2.3.1. Construção das iscas RNAPol contendo deleções	67
3.2.3.2. Triagem em duplo-híbrido com as iscas RNAPol contendo deleções	69
3.2.3.3. Confirmação do domínio da interação	71
4. Discussão	76
4.1. Análise das interações proteína-proteína com o domínio RNA polimerase de NS5 do YFV	82
4.1.1. Proteína Snf5	82
4.1.2. Proteína p54 _{NRB}	84
4.1.3. Proteína HMG20B	85
4.1.4. Proteína U1A	85
4.1.5. Proteína eIF3S6IP	87

4.1.6. Proteína GIPC1	89
4.1.7. Proteína MIF	91
4.2. Mapeamento do domínio da interação	92
5. Conclusões	98
6. Referências Bibliográficas	100

Antonio Carlos, Suely, Toni e Marcelo.

Tudo o que sou, tudo o que aprendi e a coragem que eu adquiri durante todos esses anos
devo a vocês, meus queridos.

- ✓ A Deus, sobre todas as coisas, O qual orienta meus passos, ilumina e protege a minha vida.
- ✓ Ao meu orientador, Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, pelos ensinamentos, incentivos e, acima de tudo, pela oportunidade e imensa confiança depositada.
- ✓ Ao meu querido Marcelo – sem a sua certeza, seu apoio, sua força e seu amor nada do que vivo hoje, neste momento, estaria acontecendo.
- ✓ À FAPESP, pela sua relevância como órgão de fomento para a pesquisa científica e pela concessão de bolsa de mestrado que permitiu o desenvolvimento do nosso projeto.
- ✓ À FAMERP, instituição à qual devo meu respeito e parte de meus conhecimentos.
- ✓ Ao Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, onde adquiri parte da experiência que impulsionou o crescimento da minha vida profissional.
- ✓ Aos meus pais, Toninho e Suely – muito obrigada por tudo que fizeram! Tenho certeza de que, sempre quando necessário, estarão ao meu lado. Vocês se lembram das viagens para Rio Preto? E dos cafés na lanchonete da Faculdade? Amo vocês.

- ✓ Aos meus adorados familiares – Chafic, Olga, Belmiro, Leonor, Marlene, Sérgio, Celeste, Sílvio e Lindenir, pela admiração e ajuda incondicional.
- ✓ À Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida, a qual permitiu minha descoberta pelo meu orientador.
- ✓ À minha querida e fiel amiga, Ana Carolina Viegas do Carmo – sua ajuda, seu respeito e companheirismo, nas horas mais difíceis que passamos, foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui.
- ✓ À Roberta Vieira de Moraes Bronzoni – seus ensinamentos, sua experiência e perseverança não mudaram apenas o andamento do nosso projeto, mas, também, e principalmente, o meu modo de enfrentar as dificuldades e crescer a partir delas.
- ✓ Aos amigos de hoje e sempre: Sílvia, Karen, Vanessa e Adriano.
- ✓ Aos Profs. Drs. Sandro R. Valentini e Cleslei F. Zanelli e a todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Sua colaboração não foi apenas importante, mas fundamental para o sucesso do nosso trabalho.
- ✓ Aos Drs. Charles Rice, da *Rockefeller University*, Nova Iorque; Jörg Kolbarg, João A. R. G. Barbosa e Carolina Santacruz-Pérez, do Laboratório Nacional de Luz Síncroton, Campinas, pelo auxílio e cessão de reagentes.

*“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser
conhecer as borboletas.”*

Lista de Figuras

Figura 1.	Áreas epidemiológicas de risco para a febre amarela no Brasil	5
Figura 2.	Ciclo replicativo dos <i>Flavivirus</i>	9
Figura 3.	Princípio básico do sistema duplo-híbrido em levedura descrito por Fields e Song	19
Figura 4.	Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pGBKT7 ..	26
Figura 5.	Genes repórteres da linhagem AH109 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	34
Figura 6.	Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pACT2	39
Figura 7.	Fragmentos com deleções de RNA polimerase de NS5	47
Figura 8.	Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a amplificação dos domínios MT e RNAPol de NS5 do YFV	51
Figura 9.	Eletroforese em gel de agarose 1% para triagem dos transformantes positivos contendo domínios do gene NS5 do YFV	52
Figura 10.	Mapas dos sítios de restrição e inserção do clone positivo 1 pGBKT7-MT NS5	54
Figura 11.	Mapas dos sítios de restrição e inserção do clone positivo 1	55

pGBKT7-RNApol NS5	
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% dos grupos de digestões enzimáticas efetuados com o clone pGBKT7-MT 1 e com o vetor pGBKT7 vazio	56
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% dos grupos de digestões enzimáticas efetuados com o clone pGBKT7-RNApol 1 e com o vetor pGBKT7 vazio	56
Figura 14. Curva de crescimento comparativa entre leveduras <i>S. cerevisiae</i> AH109 transformadas com a isca MT, com a isca RNApol e com pGBKT7 vazio	58
Figura 15. <i>Western Blotting</i> para avaliação da expressão da proteína RNA polimerase pela levedura	59
Figura 16. Teste de auto-ativação do gene repórter <i>HIS3</i> pela isca RNApol	59
Figura 17. Perfil de restrição enzimática <i>BamH I</i> / <i>Xho I</i> dos 35 clones positivos pACT2-cDNA da biblioteca selecionados da triagem em duplo-híbrido	63
Figura 18. Perfis de ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> no <i>plasmid linkage</i> dos clones 7, 11, 13, 18, 23, 127 e 133, representados pelos clones 127 e 133	67
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose dos <i>amplicons</i> referentes aos fragmentos RNApol com deleções <i>forwards</i> (1 a 7) e reversas (8 a 14)	68
Figura 20. Perfil de ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> no mapeamento do domínio da interação de RNA polimerase com as proteínas Snf5 e eIF3S6IP	70

Figura 21. Representação esquemática de RNA polimerase (SC) e seus fragmentos com deleções (1 a 14) utilizados para o mapeamento do domínio da interação	71
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1% para triagem dos transformantes positivos contendo o fragmento A de RNA polimerase (1-6)	72
Figura 23. Perfil de ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> na confirmação do domínio da interação entre RNA polimerase e a proteína Snf5	73
Figura 24. Perfil de ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i> na confirmação do domínio da interação entre RNA polimerase e a proteína eIF3S6IP	74
Figura 25. <i>Clustaw Alignment</i> das seqüências protéicas referentes ao fragmento A dos <i>Flavivirus</i> DENV-2, DENV-3, DENV-4, Edge Hill, JEV, SLEV e YFV, contendo aproximadamente 80 resíduos aminoácidos ..	94
Figura 26. Modelo de similaridade do domínio RNA polimerase da proteína NS5 do YFV	96

Quadro 1. <i>Primers</i> para seqüenciamento dos domínios metiltransferase e RNA polimerase do gene NS5 do YFV clonados em vetor pGBKT7	33
Quadro 2. Transformações seqüenciais de plasmídeos controle em levedura	40
Quadro 3. Transformações seqüenciais em <i>S. cerevisiae</i> AH109 para re-testes das interações em duplo-híbrido, incluindo plasmídeos controles	46
Quadro 4. <i>Primers</i> para amplificação e seqüenciamento dos fragmentos com deleções de RNA polimerase de NS5	48
Quadro 5. Interações entre plasmídeos usados como controles positivo e negativo nos ensaios de duplo-híbrido	60
Quadro 6. Trinta e cinco clones positivos obtidos da triagem com a isca RNAPol, selecionados quanto à ativação de genes repórteres de AH109	62
Quadro 7. Identificação das proteínas humanas que interagiram com RNA polimerase NS5 do YFV em ensaio de duplo-híbrido em levedura	65
Quadro 8. Mapeamento do domínio das interações entre RNA polimerase e as proteínas Snf5 e eIF3S6IP	69

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AD	Domínio de ativação da transcrição
Ade	Adenina
ATP	Adenosina trifosfato
BMV	Vírus do mosaico do tabaco
BSA	Albumina sérica bovina
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
C	Proteína do capsídeo viral
cDNA	DNA complementar
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
DENV	Vírus do dengue
DNA-BD	Domínio de ligação ao DNA
dNTP	Deoxirribonucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E	Proteína do envelope viral
EDTA	Ácido tetracético diamino-etilênico
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
His	Histidina
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
JEV	Vírus da encefalite Japonesa
Kb	Kilobase
KDa	Kilodáton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani

Leu	Leucina
M	Proteína de membrana viral
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
mRNA	RNA mensageiro
MT	Metiltransferase
MVEV	Vírus da encefalite de Murray Valley
NCR	Região não-codificadora
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
ORF	Janela aberta de leitura
pb	Par de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietileno glicol
prM	Proteína precursora da proteína M
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNApol	RNA polimerase
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase
SD	Meio de cultura sintético definido
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida
SLEV	Vírus da encefalite de Saint Louis
SOC	Meio de cultura enriquecido para crescimento bacteriano
SV40	Vírus de símio 40
TBEV	Vírus da encefalite transmitida por carrapatos
tRNA	RNA transportador
Trp	Triptofano
UAS	Seqüência ativadora da seqüência acima

WNV	Vírus West Nile
YFV	Vírus da febre amarela
YPD	Meio de cultura composto por extrato de levedura, peptona e dextrose
<i>ADE2</i>	Gene que codifica a síntese do aminoácido adenina
HCl	Ácido clorídrico
<i>HIS3</i>	Gene que codifica a síntese do aminoácido histidina
<i>lacZ</i>	Gene que codifica a enzima β -galactosidase
<i>LEU2</i>	Gene que codifica a síntese do aminoácido leucina
LiAc	Acetato de lítio
<i>MEL1</i>	Gene que codifica a enzima α -galactosidase
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
<i>TRP1</i>	Gene que codifica a síntese do aminoácido triptofano

Introdução. A febre amarela é uma doença infecciosa causada pelo vírus da febre amarela (*yellow fever virus* – YFV), um *Flavivirus* transmitido ao homem pela picada do mosquito *Aedes aegypti*. Mesmo com a existência de uma vacina anti-amarílica, a enfermidade conserva-se endêmica na América do Sul e na África, gerando problemas de saúde pública que incluem surtos isolados, epidemias de impactos variáveis e, principalmente, o risco da possível re-emergência da sua forma urbana a partir da ocorrência de surtos silvestres.

Objetivo. Embora sejam mínimas as informações sobre os componentes do complexo de replicação do YFV, sabe-se que nele estão envolvidas interações entre o RNA viral, proteínas virais e proteínas do hospedeiro e, devido às evidências de interações proteína-proteína relacionadas à proteína NS5 de outros *Flavivirus*, o alvo principal do nosso trabalho foi NS5 do YFV. Como interações protéicas são de fundamental importância para ativação, regulação e controle de diversas funções biológicas a elas relacionadas fica evidente a relevância da identificação e caracterização das interações participantes desse processo para uma melhor compreensão da patogênese e para o desenho racional de drogas contra a febre amarela. **Material e Método.** O gene NS5 de YFV foi dividido em seus dois domínios, os quais foram clonados independentemente no plasmídeo com DNA-BD de GAL4, gerando as iscas metiltransferase e RNA polimerase. Em seguida, foi realizado um *screening* em sistema duplo-híbrido com a isca RNAPol contra biblioteca de

cDNA de células Hela clonada em vetor com AD de GAL4, uma vez que MT mostrou-se tóxica para a levedura hospedeira do experimento *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem AH109. **Resultados.** Os 204 transformantes obtidos foram testados quanto à capacidade de ativação dos genes repórteres *HIS3*, *ADE2* e *lacZ* de AH109 quando, então, apenas 35 amostras mostraram-se positivas para pelo menos dois dos repórteres testados. Após o seqüenciamento nucleotídico desses clones e comparação das seqüências com o GenBank, os resultados indicaram seqüências nucleotídicas codificadoras para 33 proteínas celulares diferentes como parceiras interativas de RNAPol NS5, dentre as quais foram eleitas as proteínas Snf5, p54_{NRB}, HMG20B, U1A, eIF3S6IP, GIPC PDZ e MIF para o prosseguimento dos experimentos. Para excluir a possibilidade de pertencerem a uma classe de clones falso-positivos e confirmar as interações proteína-proteína identificadas na triagem inicial, foi efetuado o *plasmid linkage*. Após tal confirmação, foram mapeadas as regiões em RNAPol responsáveis pelas interações com Snf5 e eIF3S6IP, tendo sido descoberta uma mesma região de aproximadamente 80 resíduos aminoácidos como o domínio mínimo requerido para tais interações, a qual foi denominada fragmento A. **Conclusões.** A relevância do fragmento A de YFV como determinante das interações protéicas tornou-se mais evidente quando sua seqüência foi comparada à de outros *Flavivirus*, mostrando a presença de uma homologia principalmente entre os aminoácidos 20 a 80, demonstrando que esse fragmento se comporta como uma região conservada entre os *Flavivirus* considerados. Além disso, a geração de um modelo de similaridade do domínio RNA polimerase da proteína NS5 de YFV, a partir de NS5 de DENV, demonstrou que a região de interação está exposta ao solvente, sendo, portanto, potencialmente capaz de formar interações.

Palavras-chave: 1. Febre amarela; 2. NS5; 3. Interações proteína-proteína; 4. Sistema duplo-híbrido em levedura.

Abstract

Introduction. Yellow fever is an infectious disease caused by the yellow fever virus (YFV), a *Flavivirus* transmitted to humans by *Aedes aegypti* mosquitoes. Despite the existence of the yellow fever vaccine, the disease is endemic in South America and Africa, causing public health problems such as dispersed outbreaks, epidemics with variable impact and the risk of re-emergence of the urban cycle due to the occurrence of sylvatic disease. **Aim.** The knowledge of the components of YFV replication complex is still incipient but it is known that there are interactions among viral RNA, viral proteins and host proteins and, due to evidences of the existence of protein-protein interactions related to the NS5 protein of other *Flavivirus*, the target of our study was YFV NS5 protein. Once protein-protein interactions present basic importance for the activation, the regulation and the control of diverse biologic functions related to these interactions, the identification and the characterization of them are essential for a better comprehension of the pathogenesis and for the rational design of drugs for YFV. **Material and Method.** The YFV NS5 gene was divided in its two domains, which were independently cloned in a GAL4 DNA-BD plasmid, generating the methyltransferase (MT) and RNA polymerase (RNAPol) baits. A two-hybrid system screening in *Saccharomyces cerevisiae* AH109 strain was performed utilizing RNAPol bait and cDNA library of Hela cells, which was cloned in a GAL4 AD

plasmid. MT bait showed to be toxic for the yeast. **Results.** All 204 obtained transformants were tested for activation of reporter genes *HIS3*, *ADE2* and *lacZ* from AH109 and only 35 samples indicated positivity to, at least, two of the reporter genes assessed. Thirty three distinct cellular protein partners of the RNAPol NS5 were identified after the sequencing of the clones and the comparison of its sequences with GenBank. Proteins Snf5, p54_{NRB}, HMG20B, U1A, eIF3S6IP, GIPC PDZ and MIF were chosen for next experiments. A plasmid linkage with these proteins was performed to exclude the possibility of false-positive clones and to confirm the protein-protein interactions identified in the initial screening. RNAPol regions responsible for the Snf5 and eIF3S6IP interactions were mapped and a region of approximately 80 aminoacids was identified as the minimum domain requested for the interactions, called fragment A. **Conclusion.** The prominence of this YFV fragment as a determinant of protein interactions became more evident when its sequence was compared to the sequences of other *Flavivirus*, signaling a homology from aminoacid 20 to 80, demonstrating that this fragment is a conserved region. Moreover, the production of a similarity model of RNA polymerase domain of YFV NS5 protein, using the known DENV NS5 protein structure, showed that the region of interaction is exposed and potentially capable of forming interactions.

Keywords: 1. Yellow fever; 2. NS5; 3. Protein-protein interaction; 4. Yeast two-hybrid system.

1. INTRODUÇÃO

1. 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. A doença é causada pelo vírus da febre amarela (YFV – *yellow fever virus*), o protótipo do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, a qual inclui outros importantes vírus causadores de doença humana. O YFV é um arbovírus, do inglês *arthropod borne virus*, ou seja, vírus transmitido a vertebrados através da picada de vetores artrópodes (mosquitos e carrapatos) infectados.

O espectro clínico da 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 formas ictericas graves, aparecendo em aproximadamente 20% das infecções.⁽¹⁾ 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.⁽²⁾ 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.⁽³⁾ 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%.⁽⁴⁾

No Brasil, a febre amarela apresenta dois ciclos – silvestre e urbano, os quais se diferenciam principalmente pela natureza dos vetores e dos hospedeiros vertebrados.⁽⁵⁾ 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.⁽⁶⁾ As pessoas são expostas aos mosquitos infectados quando elas adentram regiões de florestas através da realização de atividades ocupacionais ou recreativas. No ciclo urbano, assim como ocorre com o dengue, o YFV é transmitido diretamente ao homem pela picada do mosquito *Aedes aegypti*.

Surtos de febre amarela são descritos no Brasil desde o século XVII. Em 1849, uma seqüência de epidemias de febre amarela iniciou-se na cidade de Salvador e alcançou o Rio de Janeiro através da migração de marinheiros doentes. Entre os anos de 1850 e 1902, surtos ocorreram no Rio de Janeiro, causando o impressionante número de 58.063 mortes dentre uma população estimada em 166.000 habitantes. Na época, estas e outras ocorrências estavam diretamente relacionadas à construção de estradas de trem, fazendas de café e também à chegada de imigrantes europeus. No de 1900 com Emílio Ribas, que era na época Diretor do Serviço Sanitário do Estado de São Paulo, e de 1903 com Oswaldo Cruz, então Diretor Geral de Saúde Pública do Brasil, o estabelecimento do combate ao vetor *Ae. aegypti* era o principal mecanismo de contenção da doença no país.⁽⁷⁾ O ciclo silvestre do YFV foi reportado pela primeira vez em 1936, com base em surtos ocorrendo no estado do Espírito Santo e na Bolívia.

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.⁽⁷⁾

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.⁽⁸⁾ Nas Américas, o último registro consta do ano de 1954 em Trinidad.⁽⁵⁾ 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.⁽⁹⁾ Sabe-se que a África responsabiliza-se por mais de 90% dos casos de febre amarela anualmente notificados à OMS, incluindo transmissão urbana.⁽²⁾

A despeito da extensiva campanha de vacinação, desde os anos 80, tem-se verificado a re-emergência da febre amarela silvestre no Brasil. Anualmente são notificados vários casos da doença, principalmente nas regiões Amazônica, do Planalto Central e do Pantanal brasileiro, onde foram registrados, nos anos de 2000 a 2003, 203 casos e 91 óbitos (dados obtidos até abril de 2003, Ministério da Saúde).

No Brasil, são reconhecidas quatro áreas epidemiológicas de risco para a febre amarela (figura 1) – área endêmica, área de transição (também conhecida como epizoótica ou de emergência), área indene 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. Já na área indene, a cobertura vacinal, salvo raras exceções, é muito baixa ou praticamente nula.⁽¹⁰⁾



Figura 1. Áreas epidemiológicas de risco para a febre amarela no Brasil.

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.⁽¹⁾ 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 seqüenciamento 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.⁽¹¹⁾ 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.⁽¹⁰⁾

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.⁽¹⁾

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 17DD. Altamente imunogênica, segura e efetiva, está indicada a todos os indivíduos com mais de seis meses de vida, sendo ministrada com reforço a cada 10 anos. É uma vacina usada no Programa Nacional de Imunização nas zonas endêmicas,

de transição e de risco potencial, sendo essencialmente recomendada a todos os indivíduos que se desloquem à zona endêmica.⁽¹⁾

Apesar da não observação de casos urbanos da doença há 60 anos no Brasil, é fundamental que o risco da reurbanização da febre amarela seja considerado. Avaliando simultaneamente o aumento da distribuição e densidade populacional do vetor urbano *Ae. aegypti* pelo país e a migração de indivíduos infectados, em fase de viremia, do meio silvestre para cidades com alta densidade do vetor, epidemias urbanas explosivas de febre amarela poderiam ocorrer e acometer milhares de pessoas entre a população não vacinada e representar um sério problema de saúde pública.⁽¹²⁾

1.2. *Flavivirus* – Aspectos estruturais e de replicação

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*.⁽¹³⁾

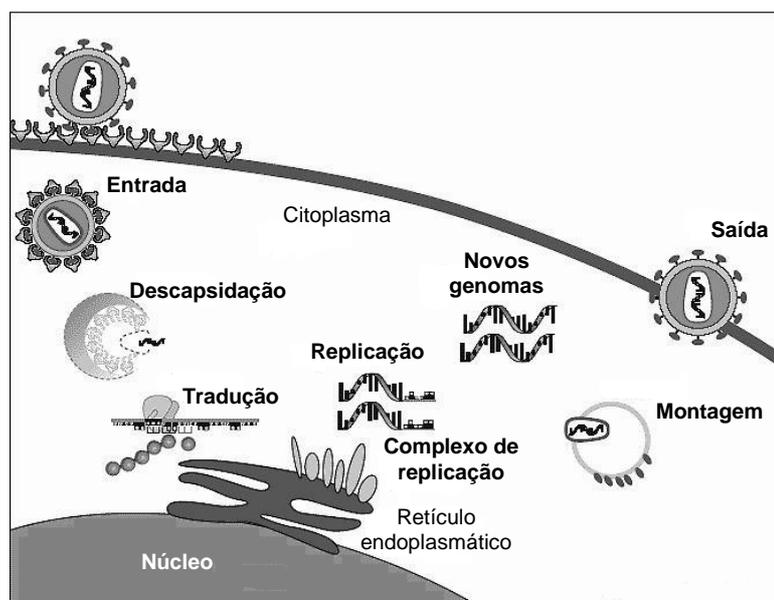
O gênero *Flavivirus* compreende aproximadamente 80 espécies distribuídas mundialmente, grande parte delas sendo patógenos humanos, incluindo os vírus da encefalite de Murray Valley (MVEV), da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV – *tick-borne encephalitis virus*), do West Nile (WNV) e da encefalite Japonesa (JEV). 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.⁽⁶⁾

Os *Flavivirus* são partículas esféricas com diâmetro estimado entre 40 a 60 nm, circundadas por envoltório de natureza lipoprotéica, contendo projeções superficiais. 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 e sete não-estruturais (NS), respectivamente, na seguinte ordem: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (no caso dos *Hepacivirus* e *Pestivirus*, a NS5 é dividida em NS5A e NS5B).

Flanqueando a longa ORF nas extremidades 5' e 3' existem regiões não-codificadoras (NCRs) que contêm aproximadamente 100 e 400-700 nucleotídeos, respectivamente. A seqüência 5'NCR 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'NCR (da fita negativa) para formar um sítio de iniciação para a síntese de fita positiva.⁽¹⁴⁾ Alguns estudos sugerem interações potenciais desta região com fatores específicos do hospedeiro, entre eles, o estudo desenvolvido por Shi e colaboradores (1996),⁽¹⁵⁾ no qual proteínas celulares foram mostradas interagindo especificamente ao terminal *stem-loop* na região 3'NCR do WNV. A seqüência 3'NCR 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 alongação da tradução 1α (eEF1 α – *translation elongation factor 1 α*),⁽¹⁶⁾ bem como as proteínas virais NS3 e NS5.⁽¹⁷⁾

Em geral, a replicação dos *Flavivirus* inicia-se com a ligação da proteína E a receptores celulares específicos (possivelmente, glicosaminoglicanos sulfatados e *heparan sulfato*), 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. Esta replicação acontece no complexo de replicação citoplasmático, associado às membranas perinucleares, a partir da síntese de um RNA intermediário de polaridade negativa, o qual é usado como molde para a síntese dos RNAs da progênie. A maturação do vírus ocorre em membranas intracelulares e os vírions brotam do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi dentro de vesículas citoplasmáticas, as quais se fundem com a membrana plasmática, liberando as novas partículas virais para o compartimento extracelular.⁽¹⁴⁾ O ciclo replicativo dos *Flavivirus* está representado esquematicamente na figura 2.



Fonte: Adaptado de Racanelli, 2003

Figura 2. Ciclo replicativo dos *Flavivirus*.

Dentre as proteínas estruturais que dão origem à partícula viral estão incluídas a do capsídeo (C), da membrana (M; a precursora desta proteína é chamada de prM) e do envelope (E). As proteínas não-estruturais apresentam funções essenciais para a replicação do vírus e englobam três grandes proteínas altamente conservadas NS1, NS3 e NS5, além de quatro pequenas proteínas hidrofóbicas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B.

A proteína C (com aproximadamente 11 KDa) tem função de formar um complexo ribonucleoprotéico que envolve o RNA genômico. Apresenta resíduos alcalinos nas extremidades amino e carboxi-terminais, os quais provavelmente agem em conjunto para a ligação específica com o RNA genômico. Já em sua porção central, a proteína C possui um domínio hidrofóbico que interage com membranas celulares e pode ter um papel na montagem do vírion.

A proteína M (que possui por volta de 8 KDa) está presente em partículas virais maduras e é formada a partir de sua precursora prM, cujo processamento também origina o segmento pr. Anticorpos contra prM podem mediar uma imunidade protetora, talvez pela neutralização de vírions que apresentam prM.

A proteína E (apresenta cerca de 50 KDa) é geralmente glicosilada e contém domínios transmembrana na extremidade carboxi-terminal, os quais fixam a proteína à membrana, como também servem como um sinal para a translocação de NS1. A proteína E é responsável pela ligação do vírus a receptores celulares. Mutações na proteína E do MVEV acarretam diminuição da cinética de entrada do vírus na célula e da virulência.⁽¹⁸⁾

As proteínas não-estruturais estão envolvidas no complexo de replicação dos *Flavivirus*. A primeira dessas proteínas, a NS1, que possui aproximadamente 46 KDa, existe sob três formas – associada à célula, na superfície da célula e no meio

extracelular. Inicialmente caracterizada como um antígeno solúvel presente no soro e em tecidos de animais experimentalmente infectados, hoje a forma extracelular de NS1 está fortemente relacionada com a indução de uma resposta imune humoral. Por outro lado, são várias as evidências sobre a participação de NS1 na replicação do RNA viral. Os experimentos de Mackenzie e colaboradores (1996) ⁽¹⁹⁾ e Westaway e colaboradores (1997) ⁽²⁰⁾ demonstraram a colocalização de NS1 e marcadores de replicação do RNA associados às estruturas de membrana que são supostos sítios de replicação. Além disso, a produção de um YFV contendo mutações em NS1 mostrou uma relevante queda no acúmulo de RNA.⁽²¹⁾ Outras análises genéticas evidenciaram que a interação entre NS1 e NS4A é crítica no processo citoplasmático de replicação do RNA.⁽²²⁾

NS2A é uma pequena proteína hidrofóbica de aproximadamente 22 KDa, provavelmente associada à membrana, envolvida no processamento da proteína NS1. A demonstração da localização de NS2A do *Flavivirus* Kunjin em possíveis sítios de replicação de RNA, somada à realização de estudos de interação proteína-proteína, sugerem sua ligação às proteínas NS3, NS5 e à 3'NCR.⁽²³⁾ É provável que a função da proteína NS2A esteja relacionada ao recrutamento de moldes de RNA para a região de replicase associada à membrana. Já NS2B, uma pequena proteína de 14 KDa associada à membrana, é caracterizada por formar um complexo com NS3, sendo um cofator indispensável para a função de serino-protease de NS3.

A proteína NS3 é altamente conservada entre os *Flavivirus*. Possui aproximadamente 70 KDa e está associada à membrana devido à interação com NS2B. NS3 contém várias atividades enzimáticas, uma delas relacionada ao processo de tradução da poliproteína. Os experimentos de Chambers e colaboradores (1993) ⁽²⁴⁾ mostraram que mutações em NS3 que eliminam sua atividade de protease impedem a

recuperação de vírus viáveis, concretizando o papel essencial desta enzima para o ciclo viral. Uma outra função de NS3 é a de RNA helicase, apesar do correto papel de uma RNA helicase ainda não estar bem estabelecido para os *Flavivirus*. No entanto, ela pode estar envolvida na dissociação das fitas de RNA recém formadas a partir da fita molde, durante a replicação do RNA, ou talvez desenrolar estruturas secundárias envolvidas na iniciação da síntese de RNA.⁽²⁵⁾ Além disso, NS3 foi mostrada ligada à região 3'NCR em associação com a proteína NS5.^(17,26) Por fim, NS3 apresenta atividade de RNA trifosfatase, a qual está envolvida provavelmente na modificação da extremidade 5' do genoma durante sua preparação para a adição do *cap* 5'.

Existem poucas informações a respeito de NS4A e NS4B, as quais são pequenas proteínas hidrofóbicas associadas à membrana (aproximadamente 16 KDa e 27 KDa, respectivamente) e pouco conservadas entre os *Flavivirus*. Com base na distribuição subcelular e interação com NS1, acredita-se que NS4A dos DENV atue na replicação do RNA. Sabe-se que NS4B do vírus Kunjin também se localiza no núcleo⁽²⁷⁾ e que NS4B de HCV é capaz de transformar células em cultura de tecido.⁽²⁸⁾ Em YFV, mutações na proteína NS4B estariam associadas a uma menor virulência da cepa Asibi.⁽²⁹⁾

A proteína NS5 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'.⁽¹³⁾ 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.^(29,30) 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.^(31,32) Essa participação nuclear nas etapas de replicação viral foi confirmada pela detecção da interação entre a proteína NS5 do DENV-2 com uma proteína do hospedeiro envolvida no transporte nuclear, a *importin-β*.⁽³³⁾ Legitimando esses achados, Uchil e colaboradores (2006)⁽³⁴⁾ 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.

Vários experimentos que objetivam 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.⁽³⁵⁾

Elucidando tais considerações, os trabalhos de Johnson e colaboradores (2001)⁽³⁶⁾ mostraram 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.^(16,37)

Chung e colaboradores (2000)⁽³⁸⁾ 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.

Majumder e colaboradores (2001)⁽³⁹⁾ 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).⁽⁴⁰⁾ Os experimentos 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.

Os experimentos de Houshmand & Bergqvist (2003)⁽⁴¹⁾ 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 proteína celulares e NS5.⁽⁴²⁾ De fato, Kapoor e colaboradores (1995)⁽³²⁾ já descreviam que a interação entre NS3 e NS5 de DENV-2 era dependente da fosforilação de NS5.

Dessa forma, a replicação do RNA viral 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'NCR do genoma viral para formar o complexo de replicação viral (replicase viral). Os componentes deste complexo de replicação, especialmente as proteínas celulares, ainda são pouco conhecidos, portanto trabalhos envolvendo a identificação destas proteínas seriam de grande valia para o melhor entendimento da replicação dos *Flavivirus*.

1.3. Sistema duplo-híbrido em levedura (*yeast two-hybrid system*)

Complexos de proteínas têm sido considerados componentes essenciais a praticamente todos os processos celulares incluindo a replicação do DNA, a transcrição, a tradução e os módulos de transdução de sinais. Acontecimentos comuns a muitos processos biológicos, as interações proteína-proteína conferem elevado grau de regulação, e podem produzir diversos efeitos mensuráveis que vão desde a alteração das propriedades cinéticas ou inativação das proteínas, atuação como mecanismos para canalização do substrato, formação de novos sítios de ligação, como também podem promover a mudança da especificidade de uma proteína para seu substrato.^(43,44)

O estudo das interações protéicas numa célula requer, primeiramente, a identificação das diferentes interações. Em seguida, é necessária a compreensão da amplitude que tomam na célula para, finalmente, entender as conseqüências para a função celular.⁽⁴³⁾ Porém, a caracterização das interações entre proteínas envolve diversas questões – uma proteína atua sozinha, em pequenos ou grandes complexos? Quantos são seus pares interativos? Qual é a afinidade da interação? Essas interações são transientes? Alterações, como os estados fosforilativos, afetam a interação? Mutações que afetam as interações têm efeitos biológicos? Agentes terapêuticos podem

ser desenvolvidos para modular as interações? A afinidade de uma interação *in vitro* reflete o ocorrido *in vivo*? Em suma, qual é o significado das interações proteína-proteína para a célula? As respostas levam ao conhecimento do verdadeiro sentido das interações proteína-proteína para o funcionamento celular e, conseqüentemente, geram ferramentas para a descoberta das bases das interações patógeno-célula hospedeira.⁽⁴⁵⁾

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 relacionado processo celular. 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.⁽⁴⁶⁾ Adicionalmente, a dedução da atividade funcional protéica pode ser conseguida através da utilização de métodos teóricos, os quais incluem análises bio-informáticas baseadas 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.⁽⁴⁷⁾

A disponibilização dos genomas de diferentes organismos completamente seqüenciados permitiu o desenvolvimento de ferramentas para a biologia funcional numa ordem proteômica, orientando estudos em larga escala para estabelecimento de mapas completos de interações entre proteínas – os “interatomas”. Muitos experimentos têm como objetivo produzir um *cluster* de proteínas com significância biológica e que estejam disponíveis para acesso mundial. Em adição ao aumento do conhecimento sobre

o organismo estudado, os interatomas podem salientar novas drogas alvo quando aplicados aos patógenos.^(46,47,48)

Inúmeras estratégias têm sido desenvolvidas para identificar proteínas que se ligam a outras proteínas, incluindo os métodos genéticos clássicos, as abordagens bioquímicas como co-imunoprecipitação e cromatografia de afinidade, como também os métodos baseados em biblioteca, dentre os quais está inserido o sistema duplo-híbrido em levedura (*yeast two-hybrid system*).⁽⁴³⁾ 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.^(49,50)

O ensaio de duplo-híbrido em levedura foi inicialmente introduzido por Fields e Song em 1989,⁽⁵¹⁾ 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 transcricionais podem ser separados em regiões discretas correspondentes a domínios de ligação ao DNA e domínios de ativação da transcrição.^(52,53) 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.^(50,54)

O DNA-BD de Gal4 reconhece seqüências de ativação UAS mas, isoladamente, não é capaz de ativar a transcrição. O AD, por sua vez, apesar de poder interagir com o complexo da RNA polimerase II, não ativa o processo de transcrição por si só, devido à distância em que ele se encontra da região promotora UAS-GAL4. Mas os dois domínios do ativador não precisam estar ligados covalentemente. Apenas a reconstituição da proximidade entre esses domínios DNA-BD e AD já é suficiente para que a atividade transcricional de Gal4 seja restabelecida.^(43,44)

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, e o outro com o AD de GAL4 fundido a uma proteína Y. A interação entre as proteínas X e Y refaz a proximidade entre os dois domínios de GAL4 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.^(44,51) A ilustração do princípio básico de um ensaio de duplo-híbrido em levedura está na figura 3.

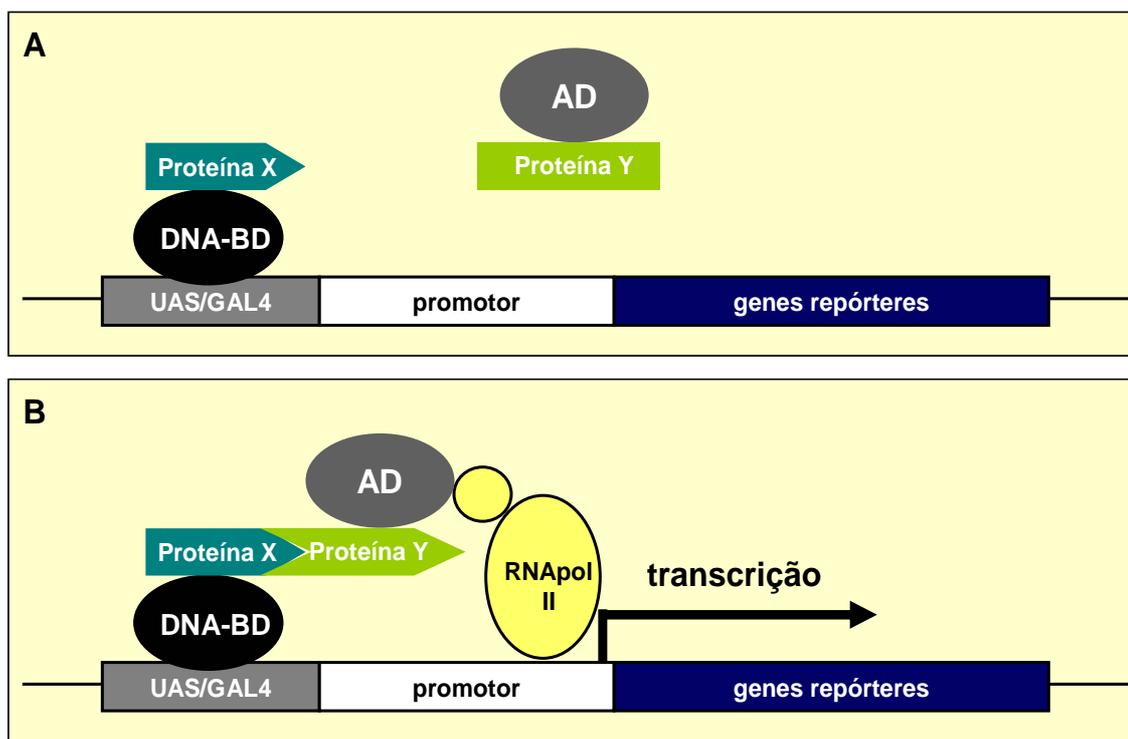


Figura 3. Princípio básico do sistema duplo-híbrido em levedura descrito por Fields e Song. A) O processo de transcrição não ocorre porque as proteínas híbridas X e Y não são parceiras interativas. B) A interação entre as proteínas X (fundida ao DNA-BD) e Y (fundida ao AD) reconstitui a proximidade entre os dois domínios da proteína Gal4, ativando a transcrição e promovendo a expressão de genes repórteres da levedura.

Apesar de ter sido desenvolvido inicialmente para detectar interações físicas entre duas proteínas conhecidas, em pouco tempo o sistema duplo-híbrido passou a ser amplamente utilizado em triagens de interações entre uma proteína conhecida e proteínas codificadas por bibliotecas de cDNAs de determinado órgão ou tecido. Normalmente, a proteína conhecida está fundida ao DNA-BD, sendo denominada “isca”, e as proteínas da biblioteca apresentam-se ligadas ao AD, sendo chamadas de “presas” nesse sistema.⁽⁵⁵⁾ Essas triagens resultam na disponibilidade imediata do gene clonado para qualquer nova proteína identificada.⁽⁴³⁾

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

expressão das seqüências sob seu controle.⁽⁵⁶⁾ A localização nuclear é direcionada através de seqüências internas no domínio de ligação da proteína híbrida ou por uma seqüência SV40, ligada à extremidade amino-terminal do domínio de ativação da referida proteína.⁽⁵⁷⁾

No presente experimento com sistema duplo-híbrido foram empregados, principalmente, os genes repórteres *HIS3* e *ADE2* da linhagem AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*. Os produtos da ativação destes genes levam à expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de histidina e adenina, respectivamente. Desta forma, a seleção das interações entre isca e presa foi efetuada a partir da utilização de meios de cultura com ausência desses nutrientes, os chamados meios *drop-out* triplos (SD-His-Leu-Trp) e quádruplos (SD-Ade-His-Leu-Trp). O gene *HIS3* é o repórter mais sensível, porém o menos seletivo, gerando um grande número de falso-positivos. O *ADE2* é especialmente usado porque, como é o único com promotor *GAL2*, é o gene repórter mais seletivo, eliminando um grande número de falso-positivos.⁽⁵⁸⁾

1.3.1. Considerações sobre o sistema duplo-híbrido em levedura

Na última década o sistema duplo-híbrido vem ganhando popularidade devido à facilidade e rapidez em isolar novas proteínas interativas.⁽⁵⁹⁾ Mas, apesar do sucesso estimado por volta de 70% em identificar reais interações, existem limitações inerentes à técnica. Uma vertente dessas limitações são os falso-negativos, os quais podem ser gerados por *folding* incorreto ou existência instável das proteínas na levedura, como também a não conservação da atividade da proteína enquanto estrutura híbrida.⁽⁴⁷⁾ Outra causa potencial de falso-negativos é quando a levedura hospedeira não promove as modificações pós-traducionais necessárias (como glicosilação) para que a proteína

assuma sua conformação nativa, ou mesmo por assumir uma conformação terciária diferente quando expressa em fusão com os domínios do fator de transcrição.⁽⁵⁵⁾

Outro entrave intrínseco ao duplo-híbrido são os falso-positivos. Uma das principais causas que geram este problema está relacionada às iscas que ativam fortemente um repórter, muito acima do *background*, chamadas de iscas auto-ativadoras, as quais não podem ser usadas. Um segundo ponto relevante é a presença de iscas tóxicas. Quando a expressão de uma isca é deletéria para a viabilidade da levedura hospedeira, há um elevado rendimento de clones falso-positivos numa triagem. Outras causas de ativação enganosa de genes repórteres numa triagem incluem a ocorrência de mutações na levedura hospedeira e a presença de proteínas “adesivas”, ou seja, proteínas largamente interativas que possuem propriedades próprias na sua estrutura secundária, gerando interações inespecíficas frequentes.⁽⁵⁹⁾

Analisando as possibilidades de ocorrência de problemas referentes à técnica, torna-se necessária a confirmação das interações proteína-proteína detectadas pelo sistema duplo-híbrido por outras metodologias, o que normalmente acontece através da utilização de abordagens bioquímicas.

1.4. 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 conseqüências 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 patogênia 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 proteínas 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.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral identificar interações entre os domínios metiltransferase e RNA polimerase da proteína NS5 do YFV com proteínas celulares, como também determinar os domínios mínimos necessários para o

estabelecimento de cada interação proteína-proteína detectada, através de experimentos com o sistema duplo-híbrido em levedura.

1.5.2. Objetivos específicos

1) Construção dos híbridos “iscas” contendo os domínios metiltransferase e RNA polimerase do gene NS5 de YFV fundidos ao DNA-BD de GAL4;

2) Identificação das proteínas celulares que interagem com o domínio RNA polimerase de NS5, através da realização de triagem em sistema duplo híbrido em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando uma biblioteca de cDNA de células Hela (“presa”);

3) Geração de construções contendo deleções do domínio RNA polimerase de NS5 (“iscas” com deleções);

4) Determinação do domínio mínimo necessário para o estabelecimento de cada interação proteína-proteína, através do sistema duplo-híbrido, mapeando as interações entre as construções contendo deleções e proteínas celulares.

2. MATERIAL E MÉTODO

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Construção das iscas do sistema duplo-híbrido

2.1.1. Vetor pGBKT7

O vetor pGBKT7 (CLONTECH Laboratories, Inc.) foi utilizado no presente estudo. 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. Outras características deste vetor incluem a presença do promotor *ADHI*, o qual promove a expressão de elevados níveis das proteínas híbridas em levedura, e a presença dos sinais de término de transcrição T7 e *ADHI* (T_{T7} & $ADHI$). A replicação autônoma do pGBKT7 em *E. coli* e em *Saccharomyces cerevisiae* é determinada pelas origens de replicação pUC e 2 μ ori, respectivamente. O vetor carrega gene que confere resistência à kanamicina, para seleção em *E. coli*, e o marcador nutricional *TRP1*, para seleção em leveduras.

A figura 4 representa o mapa do vetor pGBKT7.

pGBKT7 Vector Information

PT3248-5
Cat. No. 630303

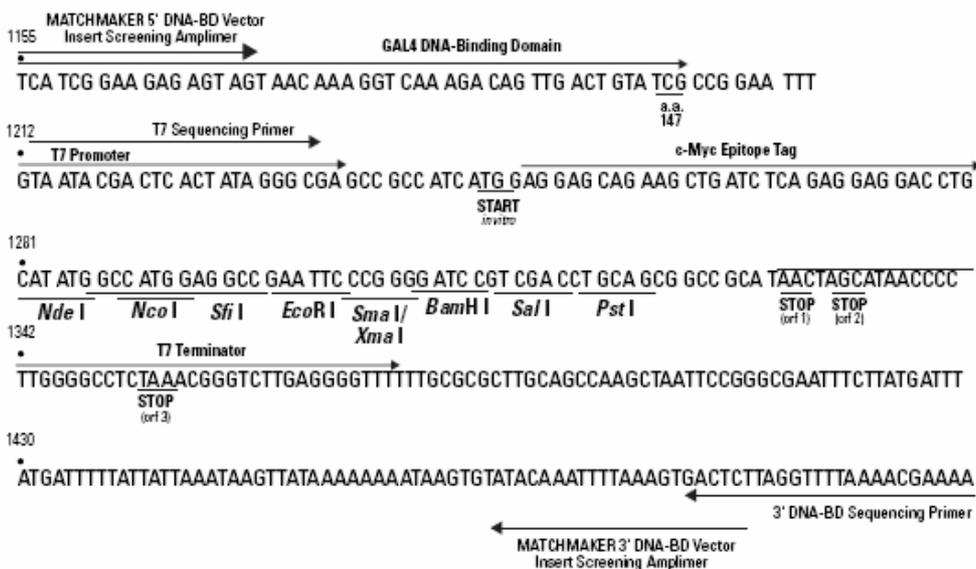
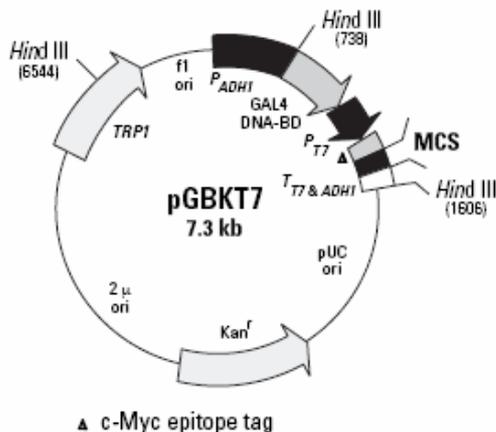


Figura 4. Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pGBKT7 (CLONTECH Laboratories, Inc.)

2.1.2. Amplificação dos domínios metiltransferase e RNA polimerase de NS5 do YFV

Os domínios metiltransferase (MT) e RNA polimerase (RNAPol) do gene NS5 foram independentemente clonados no vetor pGBKT7. Para tanto, tais domínios foram inicialmente amplificados pela técnica de PCR.

Para a amplificação do domínio MT foram empregados 2,0 µL dos *primers* fMTBamI (5'TATGGATCCGTGGGAGCGCGAATGGA3'), cuja extremidade 5' contém seqüência para a enzima de restrição *BamH* I (Promega, USA) e rMTPstISTOP, com seqüência para a enzima de restrição *Pst* I (Promega, USA), também na extremidade 5' (5'TATCTGCAGGTCTGTCTCAACTGCGTGT3').

Já a PCR para o domínio RNAPol utilizou 2,0 µL dos *primers* fRNAPOLEcoRI (5'TATGAATTCAATGACAACCCTACAGGACC3'), cuja extremidade 5' contém seqüência para a enzima *EcoR* I (Promega, USA) e YFNS5PstRBD (5'TATCTGCAGTCAGATAAGCTCACCCAGTTGC3'), com extremidade 5' contendo seqüência para a enzima *Pst* I.

As reações de PCR foram feitas com 45,0 µL de Platinum[®] PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen, USA) e 1,0 µL de DNA plasmidial pACNR-FLYF17D, o qual contém o genoma inteiro do YFV (gentilmente cedido pelo Dr. Charles Rice, *Rockefeller University*). As ciclagens consistiram de um ciclo inicial de 94°C por três 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 dos produtos das PCRs de 806 pb para o domínio MT e 1830 pb para RNAPol. Os fragmentos

amplificados foram extraídos pelo QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (Qiagen, USA), conforme orientações do fabricante, e posteriormente quantificados em espectrofotômetro ($1 A_{260} = 100,0 \mu\text{g/mL}$).

2.1.3. Ensaios de restrição enzimática

Para a construção do plasmídeo recombinante contendo o domínio MT (pGBKT7-MT NS5 de YFV), ou seja, a isca MT, tanto o inserto MT, gerado conforme descrito no item anterior, quanto o vetor pGBKT7, foram duplamente digeridos pelas enzimas *BamH* I e *Pst* I. Estes ensaios de restrição empregaram 2,0 μL de tampão B (Tris-HCl 60 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, MgCl₂ 60 mM, DTT 10 mM) (Promega, USA), 2,0 μL de BSA (0,1 mg/mL), 10 U de cada uma das referidas enzimas, aproximadamente 1,0 μg de DNA do inserto ou do vetor e água *Milli-Q* para um volume final de reação de 20,0 μL . A incubação aconteceu durante quatro horas a 37° C.

Para a construção do plasmídeo recombinante contendo o domínio RNAPol (pGBKT7-RNAPol NS5 de YFV), ou a isca RNAPol, o inserto RNAPol e o vetor foram duplamente digeridos pelas enzimas de restrição *EcoR* I e *Pst* I. Nestes ensaios, foram utilizados 2,0 μL de tampão H (Tris-HCl 900 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, MgCl₂ 100 mM) (Promega, USA), 2,0 μL de BSA (0,1 mg/mL), 12 U de *EcoR* I e 10 U de *Pst* I, aproximadamente 1,0 μg de DNA do inserto ou do vetor e água *Milli-Q* para um volume final de reação de 20,0 μL . A reação ficou incubada a 37° C durante quatro horas.

Eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para confirmação das digestões enzimáticas dos insertos e extração dos fragmentos de restrição *BamH* I / *Pst* I e *EcoR* I / *Pst* I de pGBKT7. Para a purificação dos fragmentos do vetor foi usado o QIAEX[®] II

Gel Extraction Kit (Qiagen, USA), de acordo com as orientações do fabricante, e posterior quantificação dos respectivos DNAs em espectrofotômetro ($1 A_{260} = 100,0 \mu\text{g/mL}$).

Para a purificação dos fragmentos *BamH I / Pst I* do inserto MT e *EcoR I / Pst I* do inserto RNAPol, foi efetuada extração com solução de fenol-clorofórmio. Para estas purificações, o volume final das reações de restrição dos insertos foi inicialmente ajustado para $100,0 \mu\text{L}$ com água *Milli-Q*, seguido por adição de solução de EDTA $0,5 \text{ M}$ para uma concentração final de 5 mM . Subseqüentemente, foi adicionada solução de fenol-clorofórmio volume/volume, seguido de homogeneização por aproximadamente 15 segundos. Após centrifugação por um minuto a 13.200 rpm , à temperatura ambiente, a fase aquosa foi retirada e transferida para um novo tubo. Para a remoção de quaisquer resíduos de fenol, seguiu-se uma extração somente com clorofórmio, com nova separação da fase aquosa originada pela centrifugação. Com as amostras de insertos já extraídas, foi realizada precipitação com acetato de sódio e etanol, finalizando com ressuspensão dos DNAs em 50% do volume inicial da reação com água *Milli-Q* e quantificação em espectrofotômetro ($1 A_{260} = 100,0 \mu\text{g/mL}$).

2.1.4. Reação de ligação

Após a geração dos fragmentos de restrição dos insertos MT e RNAPol, bem como do vetor pGBKT7, estes foram ligados pela enzima T4 DNA Ligase ($1 \text{ U}/\mu\text{L}$) (Invitrogen, USA), numa reação que utilizou $2,0 \mu\text{L}$ de tampão T4 DNA Ligase (Tris-HCl 250 mM pH 7.6 , MgCl_2 50 mM , ATP 5 mM , DTT 5 mM , PEG-8000 25%) (Invitrogen, USA) e água *Milli-Q* para um volume final de $10,0 \mu\text{L}$. As razões molares inserto/vetor usadas foram de 1:1, 2:1 e 3:1, de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{50,0 \text{ ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{tamanho do vetor (Kb)}} \times \text{RAZÃO MOLAR} \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} = \text{ng do inserto}$$

As reações de ligação foram incubadas a 16°C, durante 16 horas. Finalizado o período de incubação, seguiu-se à transformação bacteriana. Para tanto, 5,0 µL dos produtos de ligação referentes às construções pGBKT7-MT NS5 e pGBKT7-RNApol NS5 foram gentilmente adicionados a 50,0 µL de *E. coli* DH5α quimicamente competentes. Esta mistura foi, então, incubada no gelo por 30 minutos, com subsequente choque térmico a 42°C por um minuto e 30 segundos seguido de incubação no gelo por dois minutos. Foram adicionados 250,0 µL de meio SOC (meio de cultura enriquecido para crescimento bacteriano) à temperatura ambiente seguido de incubação a 37°C, com agitação de 200 rpm, por uma hora. Ao final da incubação, a mistura foi centrifugada por um minuto a 8.000 rpm e o precipitado de células foi gentilmente ressuspenso e plaqueado em meio seletivo, contendo antibiótico kanamicina. Após secagem, as placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas, para crescimento dos transformantes.

2.1.5. Análise dos transformantes

2.1.5.1. Triagem por PCR

Após a incubação, 10 colônias de cada grupo de transformantes pGBKT7-MT NS5 e pGBKT7-RNApol NS5 foram selecionadas para triagem inicial quanto à presença de clones positivos. Para tanto, cada um dos 20 transformantes foi inoculado em 4,0 mL de meio LB contendo antibiótico kanamicina (50,0 µg/mL), seguido por incubação a 37 °C, sob agitação de 200 rpm.

Decorrido o período de incubação de 16-18 horas, 2,0 µL de cada cultura foram analisados por PCR, usando os *primers* de amplificação dos domínios MT e RNAPol, conforme apresentado no item 2.1.2.

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

2.1.5.2. Extração de DNA plasmidial recombinante

Os plasmídeos recombinantes das culturas positivas na PCR foram isolados utilizando o *miniprep* High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, os DNAs plasmidiais foram quantificados em espectrofotômetro ($1 A_{260} = 100,0 \mu\text{g/mL}$).

2.1.5.3. Ensaio de restrição enzimática

Os clones positivos, bem como o vetor pGBKT7 vazio (controle negativo), foram analisados quanto ao perfil de restrição enzimática.

O mapeamento do vetor pGBKT7 foi realizado a partir dos seguintes ensaios de restrição: o primeiro com a enzima *Hind* III (10 U/µL); o segundo com *EcoR* I (12 U/µL) e o terceiro com *BamH* I (10 U/µL). Para as reações foram empregados 2,0 µL de tampão específico, 2,0 µL de BSA (0,1 mg/mL), 1,0 µL de enzima, aproximadamente 1,0 µg de DNA e água *Milli-Q* para um volume final de 20,0 µL. A incubação aconteceu durante duas horas a 37° C.

Para o mapeamento do clone pGBKT7-MT foram realizados três ensaios de restrição enzimática: o primeiro com *Hind* III (10 U/µL); o segundo com *EcoR* I (12 U/µL) e o terceiro com *BamH* I (10 U/µL) e *Pst* I (10 U/µL). As reações foram feitas

com 2,0 µL de tampão específico, 2,0 µL de BSA (0,1 mg/mL), 1,0 µL de enzima, aproximadamente 1,0 µg de DNA e água *Milli-Q* para um volume final de 20,0 µL. A incubação foi por duas horas a 37° C.

Para o clone pGBKT7-RNApol, o mapeamento foi feito com os seguintes ensaios de restrição: o primeiro com a enzima *Hind* III (10 U/µL); o segundo com *Bam*H I (10 U/µL) e o terceiro com *Eco*R I (12 U/µL) e *Pst* I (10 U/µL). As reações foram realizadas com 2,0 µL de tampão específico, 2,0 µL de BSA (0,1 mg/mL), 1,0 µL de enzima, aproximadamente 1,0 µg de DNA e água *Milli-Q* para um volume final de 20,0 µL, com incubação a 37°C por duas horas.

Eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para análise dos resultados.

2.1.5.4. Seqüenciamento 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 pGBKT7, pelo seqüenciamento nucleotídico. As reações de seqüenciamento foram realizadas com o ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, empregando-se aproximadamente 200,0 ng de DNA plasmidial, 4,0 µL de tampão de seqüenciamento (Tris-HCl, MgCl₂), 4,0 µL do *Ready Reaction Mix*, 1,0 µL de *primer* e água *Milli-Q* para um volume final de 20,0 µL. Os *primers* utilizados, numa concentração de 3,2 pmol/µL, estão listados no quadro 1. Os produtos obtidos foram submetidos ao ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA) e as seqüências foram analisadas utilizando o programa DS Gene 2.0 (Accelrys, USA). Os clones positivos foram armazenados em solução de glicerol 50% a - 80°C.

Quadro 1. *Primers* para seqüenciamento dos domínios metiltransferase e RNA polimerase do gene NS5 do YFV clonados em vetor pGBKT7.

Amostra	Primer	Seqüência 5' - 3'
pGBKT7	T7	TAATACGACTCACTATAGGGC
	Gal4BDSeq3	CGTTTTAAAACCTAAGAGTCAC
	Gal4BDSeq5	TCATCGGAAGAGAGTAG
MT NS5	NS5YFSEQ357F	GGGATGGAACATCATCACCTTC
	NS5YFSEQ609F	CGGAACAGTGATCAGGAACC
	NS5YFSEQ852R	CCTCTCAACCCTTCTTCTATG
RNApol NS5	NS5YFSEQ955F	GCGAGCATGGTAAATGGTG
	NS5YFSEQ1297F	TGGGAACTGGTGGATGAAG
	NS5YFSEQ1663F	TTGAACTACATGAGCCCACATC
	NS5YFSEQ2223F	AGGAAGGGTGTCTCCAGGAAAC
	NS5YFSEQ1301R	TCCCAGAACTTTGGGTCTTG
	NS5YFSEQ1828R	CATAAGTCACTACCTGCCCCG
	NS5YFSEQ2400R	GTGGGTTGTTGGTTATCCATAC

2.2. Sistema duplo-híbrido em levedura

2.2.1. Levedura

A linhagem de levedura usada num experimento com sistema duplo-híbrido determina a eficiência de detecção das interações proteína-proteína. Uma linhagem 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.⁽⁵⁶⁾

A linhagem AH109 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no presente estudo (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 5. Esses repórteres são expressos a partir da

proximidade entre os domínios de ligação ao DNA (DNA-BD) e de ativação da transcrição (AD) de GAL4 da referida levedura, ativando sua maquinaria transcricional e gerando, assim, um sinal fenotípico.

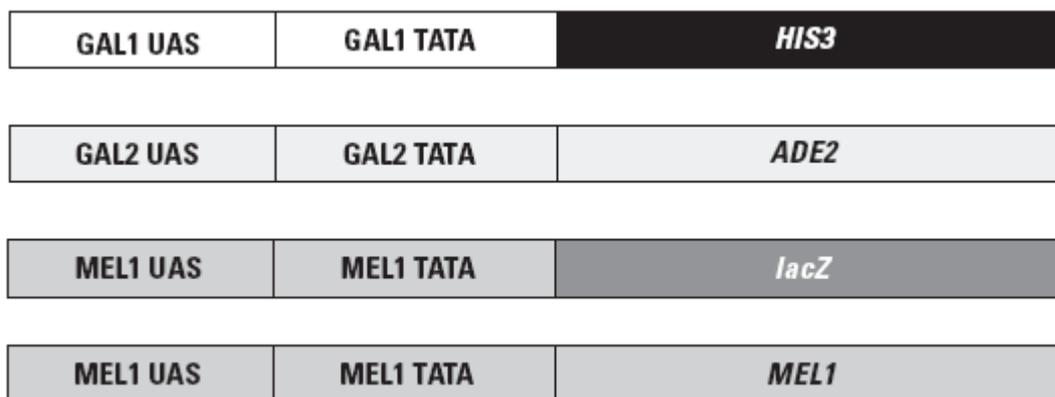


Figura 5. Genes repórteres da linhagem AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.2. Meios de cultura para crescimento e manutenção de leveduras

Para o crescimento rotineiro de leveduras foi utilizado o meio YPD, o qual é formado por uma combinação de 10,0 g de extrato de levedura, 20,0 g de peptona e 20,0 g de glicose.

Para a seleção de leveduras contendo os plasmídeos isca e presa, bem como seleção de interação proteína-proteína ativadora da transcrição de um determinado gene repórter, foram usados meios SD (meios sintéticos definidos, também chamados de “*drop-out*”). Estes são meios mínimos providos de sais, vitaminas, elementos localizadores, uma fonte de nitrogênio (base nitrogenada da levedura sem aminoácidos) e glicose. Dentre eles, foram utilizados os meios *drop-out* simples, duplos, triplos e quádruplos, respectivamente representados pelos meios: SD-Trp (com ausência do aminoácido triptofano, seleciona levedura que contém a isca); SD-Leu-Trp (com ausência dos aminoácidos leucina e triptofano, seleciona levedura que contém isca e

presa); SD-His-Leu-Trp (com ausência dos aminoácidos histidina, leucina e triptofano, seleciona interações capazes de ativar o gene repórter *HIS3*); SD-Ade-His-Leu-Trp (com ausência dos aminoácidos adenina, histidina, leucina e triptofano, seleciona interações capazes de ativar o gene repórter *ADE2*). A preparação dos meios seguiu orientações do fabricante (Q.BIO gene, USA).

2.2.3. Transformação em levedura das iscas do duplo-híbrido

As iscas MT e RNAPol foram separadamente transformadas 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 aproximadamente 2,0 mL de meio YPD e incubada a 30°C, sob agitação de 250 rpm, até DO_{600} maior que 1 (16-18 horas). Atingida esta concentração celular, 500,0 µL da cultura foram transferidos para dois novos tubos, os quais foram centrifugados a 8.000 rpm por um minuto. Após remoção do maior volume possível de sobrenadante, foram adicionados sobre os precipitados de células 125,0 µL do *EZ-Transformation solution*, aproximadamente 2,0 µg de DNA dos clones pGBKT7-MT e pGBKT7-RNAPol e 5,0 µL de DNA carreador. Cada mistura foi, então, vigorosamente homogeneizada e incubada a 30°C por 30 minutos. Para a seleção dos transformantes, todo o conteúdo de cada tubo de transformação foi inoculado em ágar SD-Trp, 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 MT e RNAPol.

2.2.4. Análise da expressão das iscas MT e RNAPol em levedura

2.2.4.1. Avaliação da toxicidade das iscas

A toxicidade das iscas MT e RNAPol para a levedura hospedeira foi avaliada segundo análise comparativa entre o crescimento destas e o crescimento do vetor pGBKT7 vazio, o qual foi previamente transformado em *S. cerevisiae* AH109 de acordo com o protocolo descrito no item 2.2.3.

Inicialmente, colônias de leveduras transformadas com as iscas e com pGBKT7 foram inoculadas em 10,0 mL de meio SD-Trp e incubadas durante dois dias, a 30°C, sob agitação de 250 rpm. Em seguida, as culturas foram normalizadas para uma DO₆₀₀ igual a 0,1 e incubadas nas mesmas condições durante sete horas. Neste período, em intervalos de uma hora, foram colhidos 200,0 µL de cada cultura para mensuração da DO₆₀₀. Os valores obtidos foram plotados em um gráfico e a curva de crescimento de cada grupo de levedura foi determinada.

2.2.4.2. Avaliação da expressão da isca RNAPol por *Western Blotting*

A expressão da isca RNAPol em levedura foi analisada pelo teste de *Western Blotting*, usando pGBKT7 vazio como controle da reação.

Inicialmente, leveduras transformadas com a isca RNAPol ou com pGBKT7 vazio foram inoculadas em 50,0 mL de meio SD-Trp. Após dois dias de incubação a 30°C, sob agitação de 250 rpm, as culturas foram normalizadas para uma DO₆₀₀ igual a

0,5 e centrifugadas a 5.000 rpm, durante cinco minutos. As células foram, então, lavadas com 0,5 mL de água *Milli-Q*, sendo que os precipitados resultantes foram diluídos em 200,0 µL de tampão de carregamento. Para a lise das leveduras, estas foram agitadas durante 20 segundos, a 4°C, com o auxílio de pérolas de vidro e, em seguida, incubadas a 98°C, por cinco minutos e centrifugadas a 8.000 rpm, a 4°C, durante cinco minutos. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% foi realizada com 10,0 µL dos lisados celulares e 6,0 µL de marcador de peso molecular (KDa), por aproximadamente duas horas a 100 V. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, USA), sob corrente elétrica de 100 V por uma hora. Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em PBST (tampão fosfato salino acrescido de 0,05% de Tween 20) durante uma hora, à temperatura ambiente. Seguiu-se incubação com o anticorpo primário anti-*Myc*, na diluição de 1:500 em PBST, durante uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada por três vezes com PBST e incubada com o anticorpo secundário anti-camundongo, na diluição de 1:5000 em PBST. Por fim, após três lavagens, a membrana foi incubada com reagente quimioluminescente ECL (Amersham, USA) por, aproximadamente, três minutos, seguido de análise radiográfica.

2.2.4.3. Teste de auto-ativação do gene repórter *HIS3* pela isca RNAPol

Para avaliar a capacidade de ativação autônoma do gene repórter *HIS3* pela isca RNAPol, foi empregado como presa o vetor pGADT7 vazio, o qual possui domínio de ativação da transcrição (AD) de Gal4. Para tanto, ele foi transformado seqüencialmente em levedura contendo a isca RNAPol, usando o EZ-Yeast Transformation Kit – *Single*

Vector Transformation Protocol (Q.BIO gene, USA), conforme orientações do fabricante.

Inicialmente, uma massa celular de *S. cerevisiae* AH109 previamente transformada com a isca RNAPol foi inoculada em aproximadamente 2,0 mL de meio SD-Trp e incubada a 30°C, sob agitação de 250 rpm, até atingir DO₆₀₀ maior que 1 (22-24 horas). Em seguida, 500,0 µL da cultura foram transferidos para um novo tubo que foi centrifugado a 8.000 rpm por um minuto. Após remoção do maior volume possível de meio de cultura do sobrenadante, foram adicionados sobre o precipitado celular 125,0 µL do *EZ-Transformation solution*, aproximadamente 2,0 µg de DNA do pGADT7 e 5,0 µL de DNA carreador. Esta mistura foi, então, vigorosamente homogeneizada e incubada a 30°C por 30 minutos. A seleção dos transformantes foi feita em meio SD-Leu-Trp, com posterior repique das colônias em meio SD-His-Leu-Trp para a checagem da expressão do repórter *HIS3*.

2.2.5. Triagem em sistema duplo-híbrido

2.2.5.1. Vetor pACT2

Gentilmente cedida pelo Dr. Jörg Kolbarg (Laboratório Nacional de Luz Síncroton, Campinas, SP), clonada no vetor pACT2 (CLONTECH Laboratories, Inc.), está a biblioteca de cDNA de células Hela para a triagem em duplo-híbrido contra a isca RNAPol. A inserção dos cDNAs no sítio múltiplo de clonagem do vetor pACT2, com corretas orientação e janela aberta de leitura, permite a expressão das proteínas codificadas em fusão ao domínio de ativação da transcrição (AD – *activation domain*) da proteína Gal4, gerando, assim, proteínas híbridas denominadas presas no sistema duplo-híbrido. O epítipo HA (hemaglutinina) também é expresso em fusão.

pACT2 AD Vector Information

GenBank Accession No.: U29899.

PT3022-5

Catalog 638822

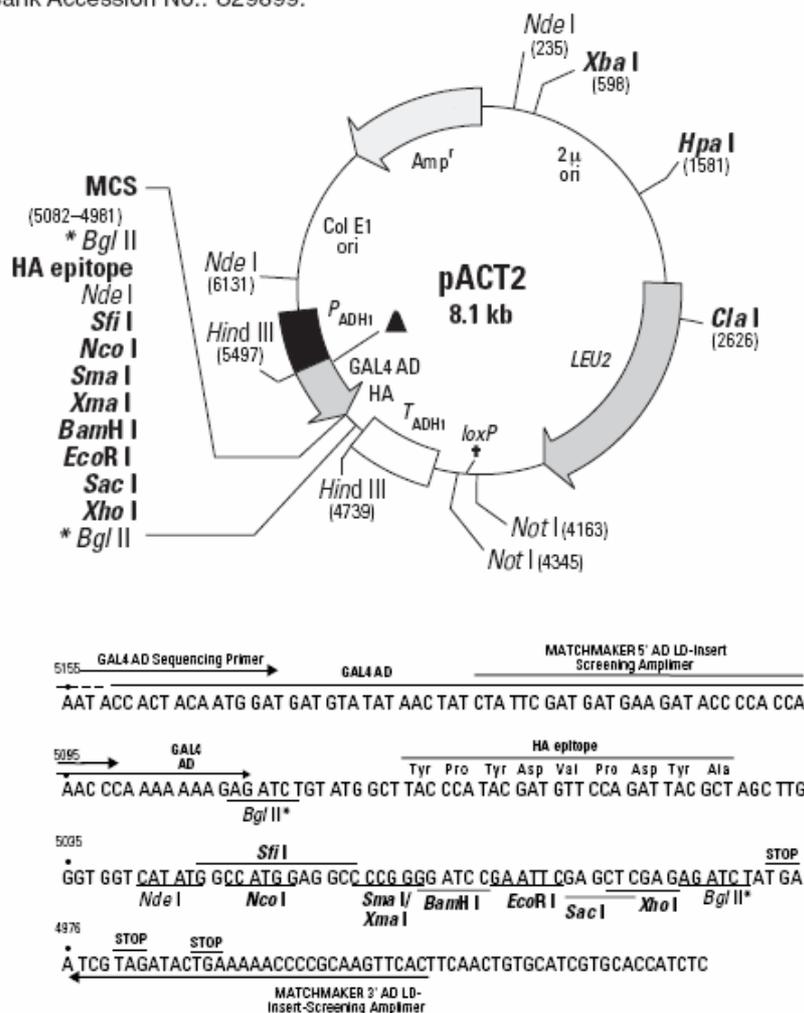


Figura 6. Mapa de restrição e sítios múltiplos de clonagem do vetor pACT2 (CLONTECH Laboratories, Inc.)

O vetor pACT2, cujo mapa está representado na figura 6, apresenta promotor *ADHI* que gera altos níveis de expressão das proteínas híbridas, as quais são direcionadas para o núcleo da levedura através da seqüência de localização nuclear do antígeno SV40, clonado na região 5' da seqüência GAL4 AD. O vetor pACT2 replica-se de forma autônoma em *E. coli* e em *S. cerevisiae* e carrega o gene *bla* que confere

resistência à ampicilina em *E. coli*, bem como o marcador nutricional *LEU2*, para seleção em leveduras.

2.2.5.2. Transformação seqüencial de plasmídeos controle em levedura

Conforme metodologia descrita no item 2.2.4.3, foram transformados seqüencialmente, em levedura, pares de plasmídeos usados como controles positivo e negativo para o estudo das interações proteína-proteína nos ensaios de duplo-híbrido (quadro 2).

Quadro 2. Transformações seqüenciais de plasmídeos controle em levedura.

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

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.

2.2.5.3. Transformação seqüencial da biblioteca de cDNA de células HeLa

Para a triagem em duplo-híbrido à busca de interações entre o YFV e proteínas humanas, foi realizada a transformação seqüencial, em larga escala, da biblioteca de cDNA de células HeLa em levedura já transformada com a isca RNAPol. Para isso, seguiu-se o protocolo *Library-scale transformations* do Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual (Clontech, USA), de acordo com orientações do fabricante.

Inicialmente, foram preparadas as células competentes de levedura. Para tanto, uma massa celular referente à *S. cerevisiae* AH109 transformada com a isca RNAPol foi inoculada em 150,0 mL de meio SD-Trp e incubada a 30°C, sob agitação de 250 rpm, até à fase estacionária de crescimento ou DO₆₀₀ maior que 1,5 (16-18 horas). Em seguida, esta cultura inicial foi diluída em 1,0 L de meio YPD de forma a produzir uma DO₆₀₀ igual a 0,2-0,3 e incubada a 30°C, sob agitação de 250 rpm, até DO₆₀₀ igual a 0,5 ± 0,1 (aproximadamente três horas). Atingida esta concentração, as células foram centrifugadas a 1.000 x g por cinco minutos, à temperatura ambiente, sendo o precipitado ressuspendido em 500,0 mL de tampão TE estéril (Tris-HCl, EDTA, pH

7.5). Então, após nova centrifugação, o precipitado de células foi finalmente ressuspenso em 8,0 mL de uma solução TE/acetato de lítio estéril e recém preparada.

Posteriormente, ao volume de 8,0 mL de leveduras competentes, foram adicionados 40,0 µg de DNA plasmidial pACT2-biblioteca de cDNA de células Hela, 10,0 mg de DNA carreador (DNA de espermatozoides de salmão, Invitrogen, USA) previamente desnaturados e 30,0 mL de uma solução PEG/acetato de lítio recém preparada. Tal mistura foi, então, homogeneizada vigorosamente e incubada a 30°C, sob agitação de 200 rpm. Depois de 30 minutos de incubação e adição de 3,5 mL de DMSO 100%, a mistura foi incubada em banho-maria a 42°C por 15 minutos, intercalados por homogeneizações ocasionais. Em seguida, as células foram colocadas no gelo por dois minutos e centrifugadas a 1.000 x g por cinco minutos, à temperatura ambiente, sendo o precipitado ressuspenso em 5,0 mL de tampão TE.

O volume final referente à mistura de transformação foi dividido em alíquotas de 200,0 µL e distribuído em 25 placas de cultura com meio SD-His-Leu-Trp, de forma a promover uma triagem quanto à expressão do gene repórter *HIS3*. Paralelamente, foi feito plaqueamento de alíquotas de 100,0 µL da mistura de transformação em meio SD-Leu-Trp, em três diferentes diluições, para servir como um controle da eficiência do protocolo de transformação. Todas as placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento dos transformantes, o que levou aproximadamente três dias.

2.2.5.4. Identificação dos clones positivos

2.2.5.4.1. Ativação de genes repórteres

Duzentos e quatro transformantes obtidos na triagem contra a biblioteca de cDNA humano foram testados quanto à ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*.

Para tanto, eles foram repicados nos meios seletivos SD-Leu-Trp (empregado para controle de crescimento dos demais meios), SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp e incubados a 30°C por dois a três dias.

Os transformantes foram submetidos ainda ao ensaio de *Filter Lift* para seleção das interações protéicas capazes de ativar o gene repórter *lacZ*, cujo produto, a enzima β -galactosidase, é medido pelo uso do substrato cromogênico X-Gal. Este ensaio foi realizado a partir da normalização do número de células das leveduras transformantes. Para isto, foram preparadas culturas de cada transformante em 2,0 mL de meio SD-Leu-Trp e incubadas a 30°C, sob agitação de 250 rpm, até DO_{600} maior que 1. Em seguida, após normalização das DO_{600} das culturas, 4,0 μ L de cada amostra foram aplicados, sob forma de *spots*, em membrana de nitrocelulose aderida à superfície de ágar YPD. Após 16-18 horas de incubação a 30°C, a membrana foi banhada em nitrogênio líquido por 15 segundos para lise das leveduras e transferida para uma placa sobre um papel de filtro (Whatman) embebido com solução de X-Gal. Por fim, a membrana foi incubada a 30°C até o aparecimento de colônia azul no controle negativo (pGBKT7-Lam + pGADT7-T).

Para as próximas etapas, foram selecionados os transformantes que ativaram pelo menos dois dos genes repórteres testados.

2.2.5.4.2. Isolamento dos plasmídeos pACT2-cDNA da biblioteca (presas)

Os transformantes selecionados quanto à ativação de genes repórteres foram analisados por restrição enzimática e seqüenciamento nucleotídico. Com esta finalidade, foi efetuado o isolamento dos plasmídeos pACT2, os quais contêm o cDNA da biblioteca, ou seja, aqueles que carregam o inserto que codifica a proteína interativa do domínio RNA polimerase de NS5.

Inicialmente, a partir da cultura de cada transformante em 4,0 mL de meio SD-Leu-Trp, foi extraído o DNA plasmidial da levedura, utilizando-se o RPM Yeast Plasmid Isolation Kit (Q.BIO gene, USA), conforme orientações do fabricante. Em seguida, para obtenção apenas do plasmídeo de interesse (presa), o DNA plasmidial extraído foi transformado em *E. coli* DH5 α quimicamente competente, de acordo com o item 2.1.4, e selecionado em ampicilina. Por fim, os clones positivos foram purificados pelo QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA) e quantificados em espectrofotômetro ($1 A_{260} = 100,0 \mu\text{g/mL}$).

2.2.5.4.3. Ensaio de restrição enzimática

Os DNAs plasmidiais pACT2-cDNA da biblioteca anteriormente selecionados foram analisados quanto ao perfil de restrição enzimática usando as enzimas *Bam*H I / *Xho* I (Promega, USA). Assim, as amostras foram duplamente digeridas em ensaio que aplicou 10 U de cada enzima, 2,0 μL de tampão E (Tris-HCl 60 mM pH 7.5, NaCl 1 M, MgCl₂ 60 mM, DTT 10 mM) (Promega, USA), 2,0 μL de BSA (0,1 mg/mL), aproximadamente 1,0 μg de DNA e água *Milli-Q* para um volume final de reação de 20,0 μL . A incubação ocorreu por uma hora a 37°C.

Em seguida, 10,0 μL de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação das digestões.

2.2.5.4.4. Seqüenciamento nucleotídico

Os DNAs plasmidiais pACT2-cDNA da biblioteca foram seqüenciados pelo método de dideoxinucleotídeo, conforme descrito no item 2.1.5.4, com o *primer* GAL4ADSeq (5'AATACCACTACAATGGATGAT3'), na concentração de 3,2

pmol/ μ L. As seqüências obtidas foram comparadas às seqüências disponíveis no GenBank pelo programa BLASTn (NCBI, USA).

2.2.5.5. *Plasmid Linkage* – Re-teste no sistema duplo-híbrido

Para confirmar as interações proteína-proteína identificadas na triagem inicial, excluindo a possibilidade de falso-positivos, sete clones (pACT2-cDNA 7, 11, 13, 18, 23, 127 e 133) foram selecionados para re-teste no sistema duplo-híbrido em levedura, procedimento este denominado *plasmid linkage*.

Para tanto, inicialmente, conforme indicado no quadro 3, cada um dos sete clones e os plasmídeos pGADT7 vazio e pGADT7-T foram transformados seqüencialmente em levedura contendo pGBKT7 vazio, ou pGBKT7-Lam ou a isca RNAPol, de acordo com metodologia descrita no item 2.2.4.3.

Na etapa seguinte, um transformante de cada grupo mencionado acima foi avaliado 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, sob agitação de 250 rpm, até DO_{600} maior que 1. Em seguida, foram transferidos 100,0 μ L de cada suspensão com DO_{600} normalizada para um poço de microplaca e diluída seriadamente (1:10) quatro vezes, 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 μ L 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.

Quadro 3. Transformações seqüenciais em *S. cerevisiae* AH109 para re-testes das interações em duplo-híbrido, incluindo plasmídeos controles.

Transformações seqüenciais em AH109	
ISCAS	PRESAS
pGBKT7 vazio	pACT2-cDNA 7 pACT2-cDNA 11 pACT2-cDNA 13 pACT2-cDNA 18 pACT2-cDNA 23 pACT2-cDNA 127 pACT2-cDNA 133 pGADT7-AD pGADT7-T
pGBKT7-Lam	pACT2-cDNA 7 pACT2-cDNA 11 pACT2-cDNA 13 pACT2-cDNA 18 pACT2-cDNA 23 pACT2-cDNA 127 pACT2-cDNA 133 pGADT7-AD pGADT7-T
pGBKT7-RNAPol NS5 de YFV	pACT2-cDNA 7 pACT2-cDNA 11 pACT2-cDNA 13 pACT2-cDNA 18 pACT2-cDNA 23 pACT2-cDNA 127 pACT2-cDNA 133 pGADT7-AD pGADT7-T

2.2.6. Mapeamento do domínio da interação

2.2.6.1. Construção das iscas RNAPol contendo deleções

Com o objetivo de mapear o domínio das interações proteína-proteína detectadas na triagem inicial e confirmadas no *plasmid linkage*, foram construídas 14 iscas

contendo fragmentos com deleções amino e carboxi-terminais de RNA polimerase de NS5, as quais foram denominadas iscas RNAPol contendo deleções.

Para tanto, primeiramente, os 14 fragmentos com deleções de RNA polimerase foram produzidos (figura 7), 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 2.1. Entretanto, os *primers* empregados para a amplificação dos fragmentos estão listados no quadro 4, enquanto os utilizados para a reação de seqüenciamento incluem ainda os do quadro 1. Para a reação de ligação, foi utilizada apenas a razão molar inserto/vetor 3:1.

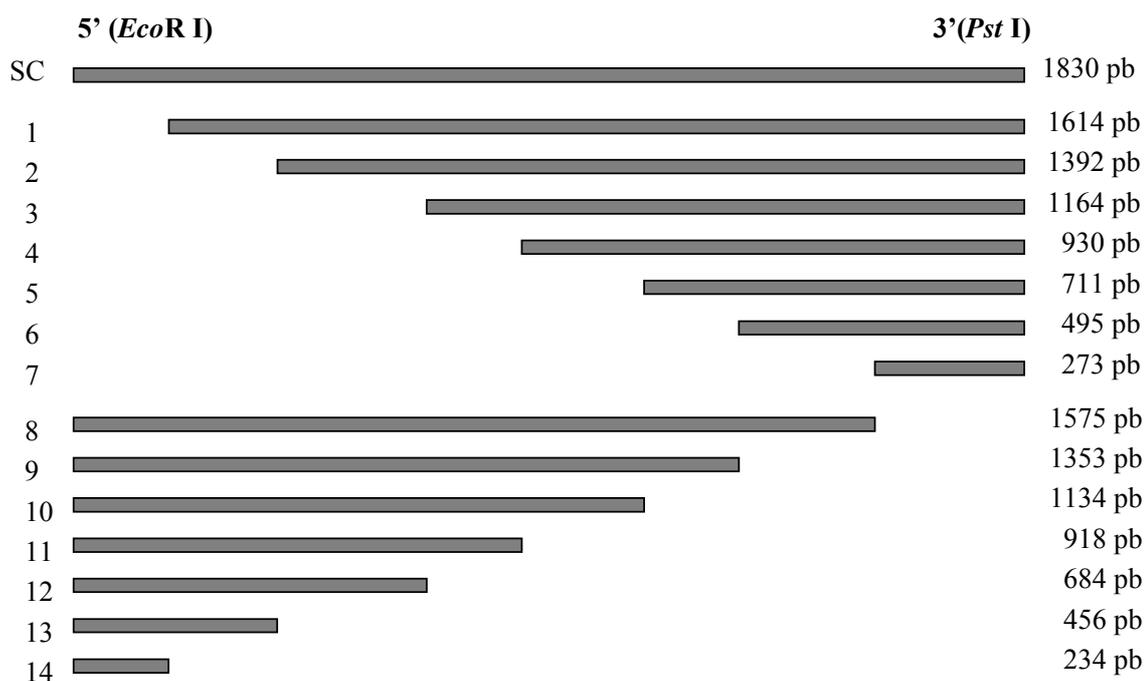


Figura 7. Fragmentos com deleções de RNA polimerase de NS5. SC: segmento completo de RNA polimerase. 1 a 7: fragmentos com deleções amino-terminais (*forward*). 8 a 14: fragmentos com deleções carboxi-terminais (*reversos*).

Quadro 4. *Primers* para amplificação e seqüenciamento dos fragmentos com deleções de RNA polimerase de NS5. As seqüências para as enzimas de restrição estão sublinhadas.

Construção de RNAPol	Primer	Seqüência 5'-3'
Deleções 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
Deleções reversas	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

2.2.6.2. Triagem em duplo-híbrido com as iscas RNAPol contendo deleções

Foram mapeadas as regiões em RNA polimerase responsáveis pelas interações com as proteínas codificadas pelos clones pACT2-cDNA 7 e 23. Para tanto, inicialmente, as 14 iscas RNAPol contendo deleções foram independentemente transformadas em levedura, seguindo o procedimento detalhado no item 2.2.3. Em seguida, cada presa, correspondente aos clones 7 e 23, foi transformada nas leveduras contendo as iscas com deleções, conforme a metodologia de transformação seqüencial apresentada no item 2.2.4.3.

Os transformantes obtidos foram analisados quanto à ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*, como exposto no item 2.2.5.5. O domínio responsável pelo

estabelecimento das interações entre RNAPol NS5 de YFV e as proteínas codificadas pelos clones 7 e 23 foi, então, definido segundo a ativação destes dois repórteres e denominado fragmento A de RNAPol.

2.2.6.3. Confirmação do domínio da interação

2.2.6.3.1. Construção da isca contendo o domínio da interação

Para a confirmação do fragmento A como sendo o domínio das interações, foi gerada uma isca contendo tal fragmento para teste em sistema duplo-híbrido contra os clones 7 e 23, a qual foi chamada isca FragA RNAPol.

Para isso, empregando os *primers* 2fEcoRIRNAPol e 7rPstIRNAPol (quadro 4), o fragmento A foi amplificado, digerido, ligado no vetor pGBKT7, transformado e analisado seguindo as descrições do item 2.2.6.1.

2.2.6.3.2. Triagem em duplo-híbrido com a isca FragA RNAPol

Da mesma forma que no item 2.2.6.2, a isca FragA RNAPol e cada uma das presas, pACT2-cDNA 7 e pACT2-cDNA 23, foram seqüencialmente transformadas em levedura.

Para excluir a possibilidade da isca FragA RNAPol auto-ativar os genes repórteres de AH109, foi feita também a transformação seqüencial dos DNAs plasmidiais de pGADT7 vazio e de pGADT7-T em levedura já transformada com a referida isca.

Conforme descrito no item 2.2.6.2, uma levedura transformante de cada construção foi avaliada quanto à ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2*.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Construção das iscas do sistema duplo-híbrido

3.1.1. Amplificação dos domínios metiltransferase e RNA polimerase de NS5 do YFV

Os domínios metiltransferase (MT), com aproximadamente 806 pb, e RNA polimerase (RNAPol), com aproximadamente 1830 pb, foram amplificados por PCR. A eletroforese em gel de agarose comprovou a amplificação destes domínios, os quais podem ser visualizados na figura 8.

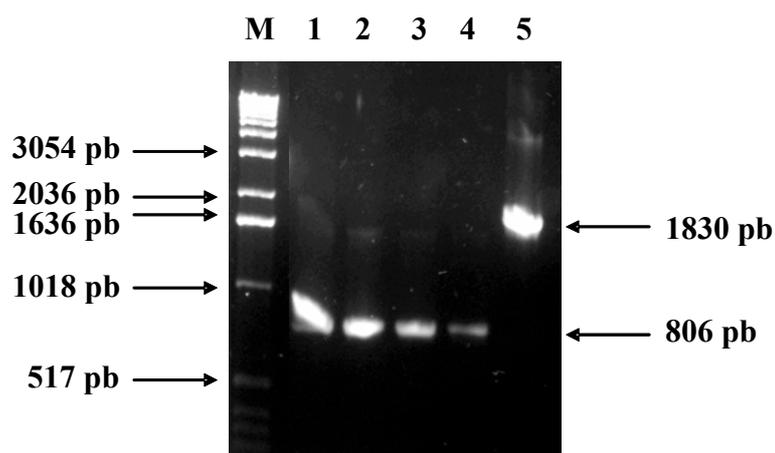


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a amplificação dos domínios MT e RNAPol de NS5 do YFV. 1-4: fragmentos de aproximadamente 806 pb, correspondentes ao domínio MT; 5: fragmento de aproximadamente 1830 pb, correspondente ao domínio RNAPol; M: marcador de pares de base (1Kb).

3.1.2. Análise dos transformantes

3.1.2.1. Triagem por PCR

Os domínios amplificados foram inseridos 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. A figura 9 demonstra a presença de bandas de 806 pb em 10 amostras referentes aos transformantes contendo o domínio MT e bandas de 1830 pb em oito das dez amostras contendo o domínio RNAPol.

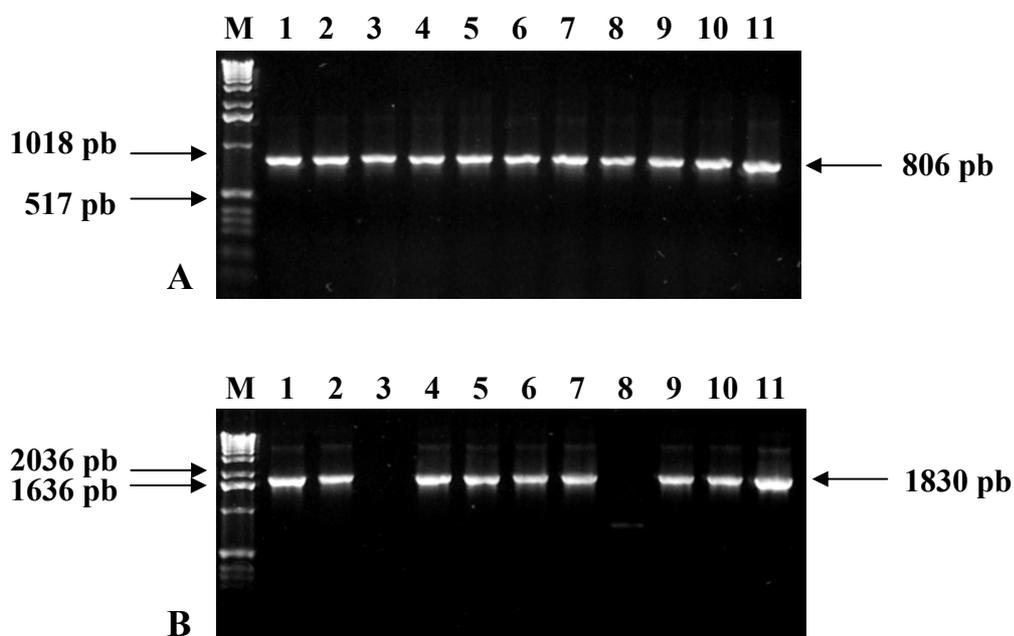


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% para triagem dos transformantes positivos contendo domínios do gene NS5 do YFV. A) 1-10: amplificação de fragmentos de 806 pb referentes aos transformantes pGBKT7-MT. B) 1-10: amplificação de fragmentos de 1830 pb correspondentes aos transformantes pGBKT7-RNAPol. 11: controle positivo (pACNR-FLYF17D); M: marcador de pares de base (1 Kb).

Dentre os transformantes analisados, foram selecionadas para o prosseguimento dos experimentos as amostras de número 1 referentes a cada construção.

3.1.2.2. Ensaio de restrição enzimática

Foram realizadas digestões enzimáticas tanto com as iscas MT e RNAPol quanto com o vetor pGBKT7 vazio, objetivando uma melhor averiguação dos sítios de restrição presentes nas construções originadas (figuras 10 e 11).

Com a realização da eletroforese em gel de agarose dos produtos dessas digestões, foram observados todos os perfis de restrição em conformidade com o esperado. Assim, nos ensaios com o vetor pGBKT7 vazio (figuras 12 e 13) foram gerados fragmentos de, aproximadamente, 800 pb, 1400 pb e 4900 pb na digestão com *Hind* III e 7300 pb com a enzima *EcoR* I. Nas reações com o clone pGBKT7-MT 1 (figura 12) os fragmentos de restrição corresponderam aos tamanhos aproximados de 1500 pb, 1600 pb e 4900 pb, na digestão com *Hind* III; 650 pb e 7500 pb quando feita a digestão com *EcoR* I; e 806 pb e 7300 pb da digestão dupla com *BamH* I / *Pst* I. O clone pGBKT7-RNAPol 1 (figura 13) originou fragmentos de, aproximadamente, 1494 pb, 2676 pb e 4938 pb, quando utilizada a endonuclease *Hind* III; 700 pb e 8408 pb da digestão com *BamH* I; e 1830 pb e 7.300 pb do ensaio de restrição com *EcoR* I / *Pst* I.

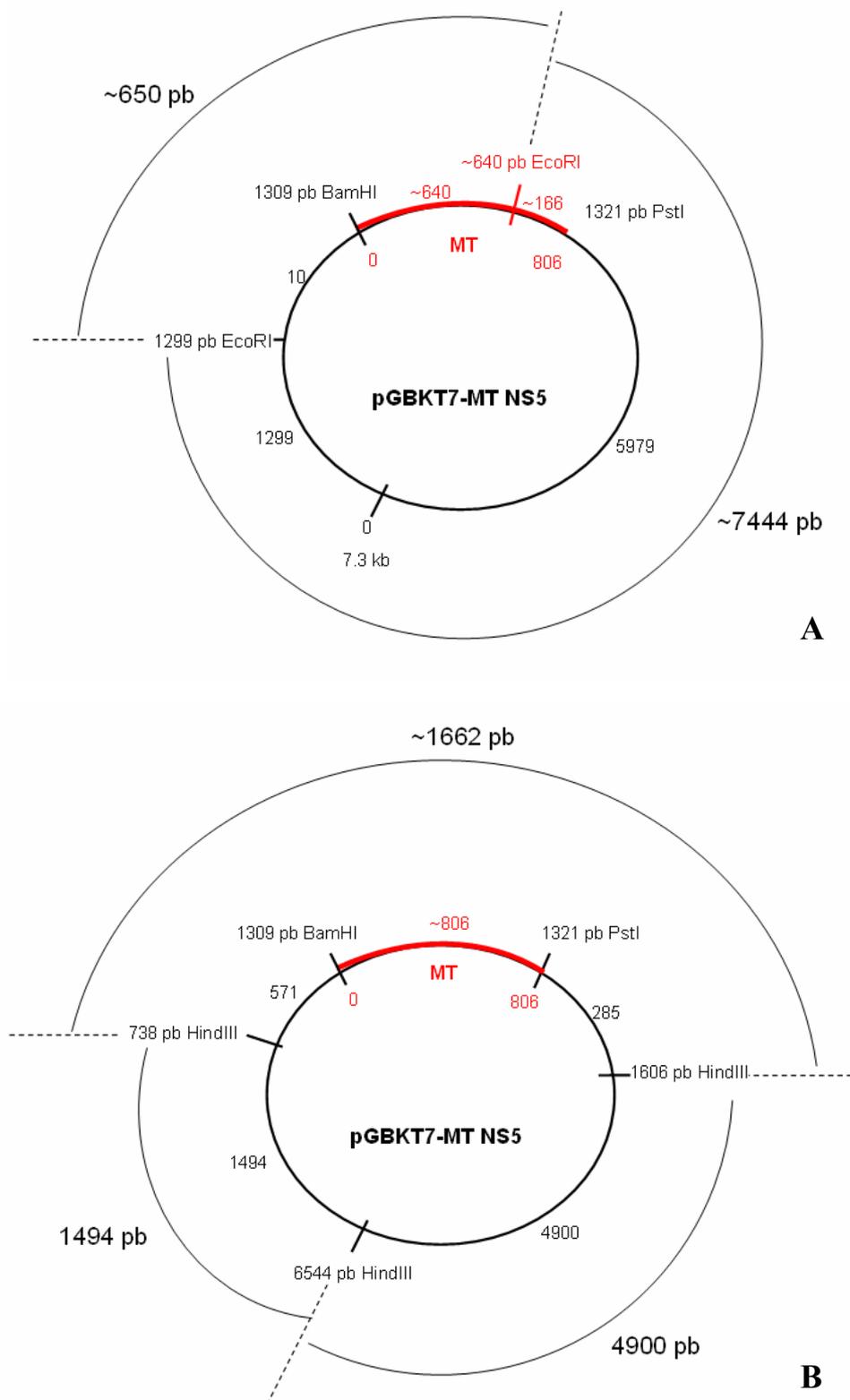
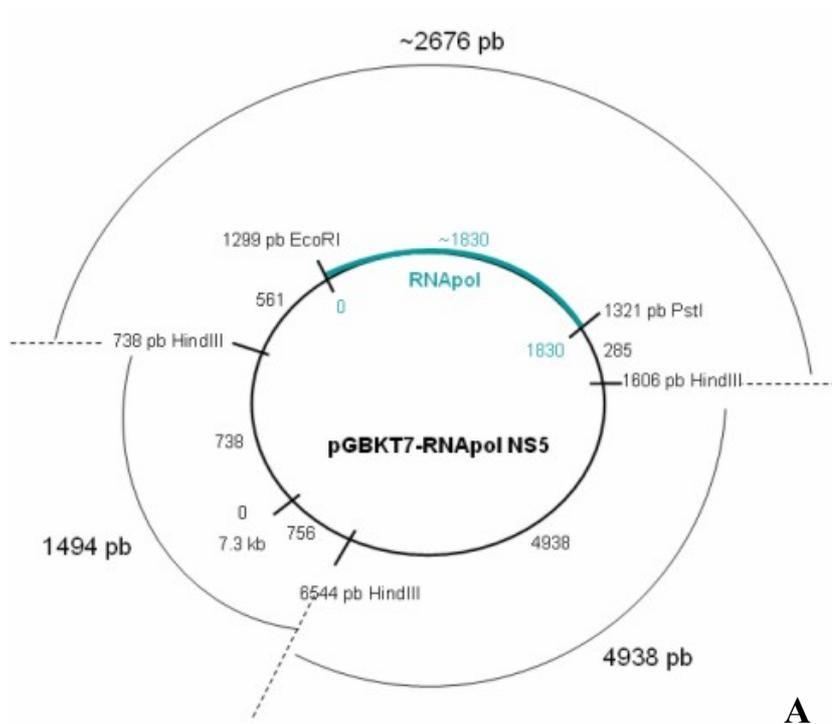
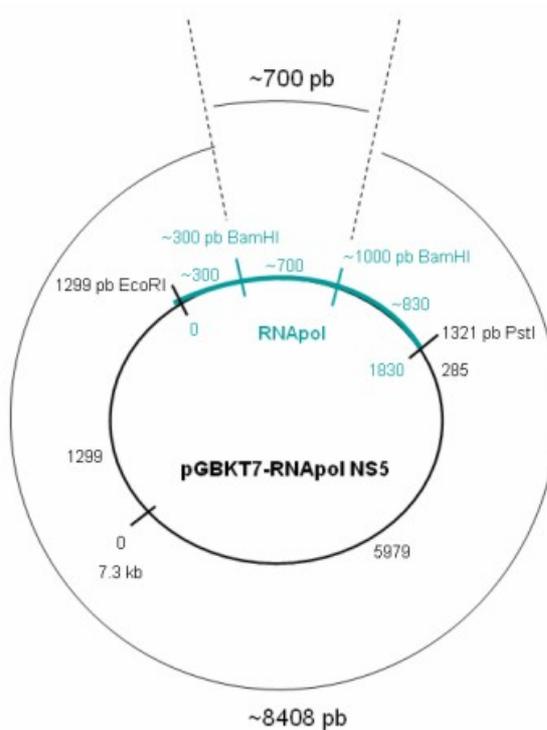


Figura 10. Mapas dos sítios de restrição e inserção do clone positivo 1 pGBKT7-MT NS5. **A.** Perfil de digestão com a enzima *EcoR* I. **B.** Perfil de digestão com a enzima *Hind* III.



A



B

Figura 11. Mapas dos sítios de restrição e inserção do clone positivo 1 pGBKT7-RNAPol NS5. **A.** Perfil de digestão com *Hind* III. **B.** Perfil de digestão com *Bam*HI.

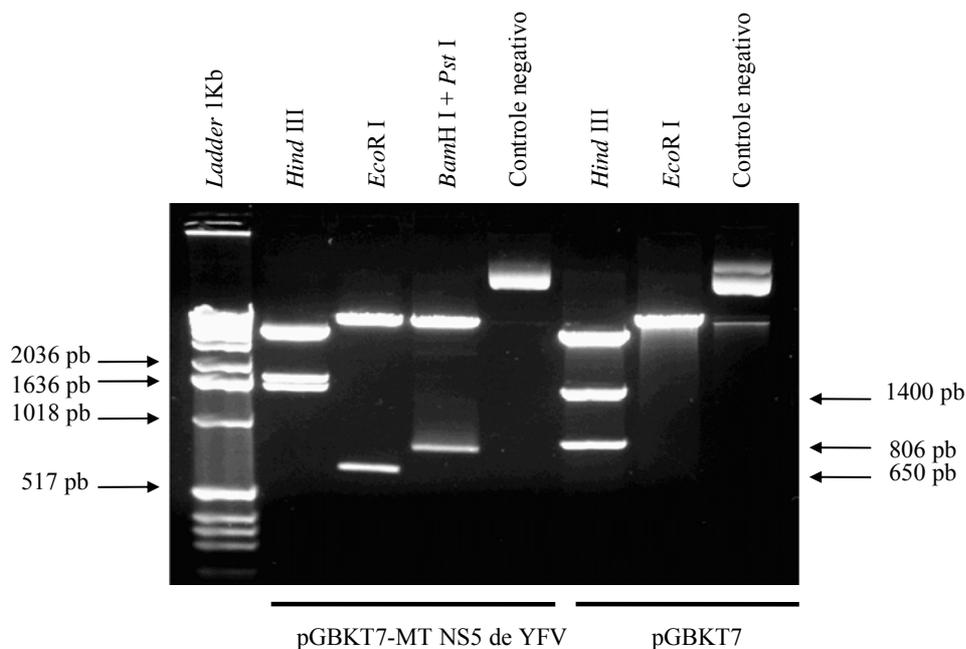


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% dos grupos de digestões enzimáticas efetuados com o clone pGBKT7-MT 1 e com o vetor pGBKT7 vazio. Os controles negativos referem-se às amostras não-digeridas.

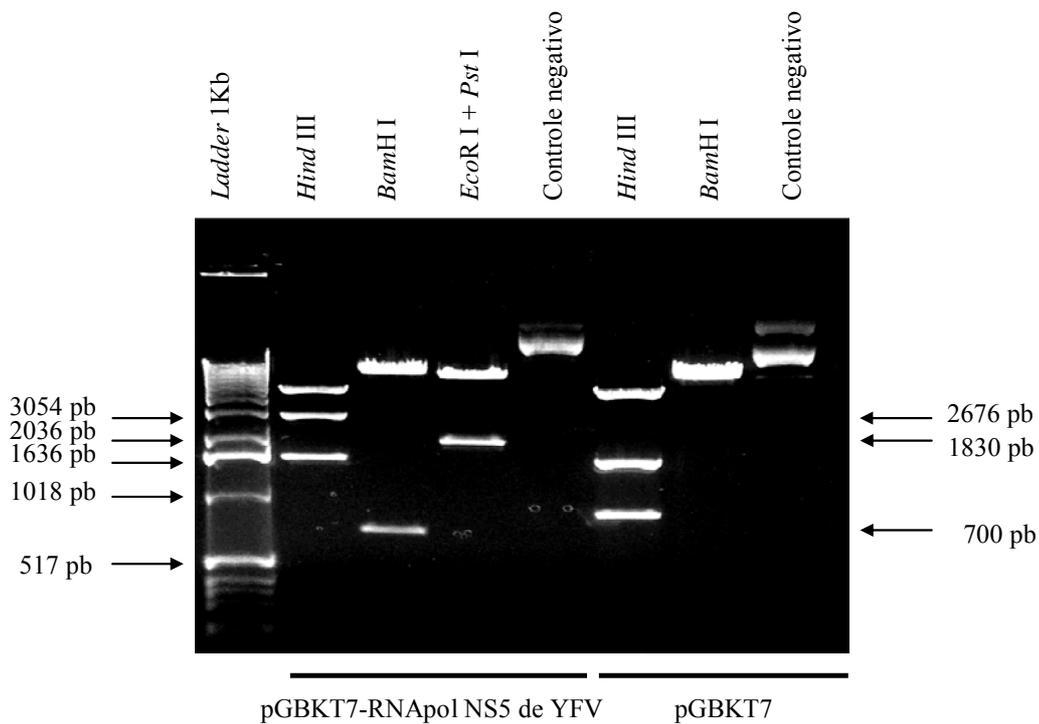


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% dos grupos de digestões enzimáticas efetuados com o clone pGBKT7-RNapol 1 e com o vetor pGBKT7 vazio. Os controles negativos referem-se às amostras não-digeridas.

3.1.2.3. Seqüenciamento nucleotídico

As clonagens dos domínios MT e RNAPol de NS5 foram confirmadas 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 dos dois domínios nos respectivos *frames* em pGBKT7. Desta forma, foram geradas, de forma independente, as iscas para a triagem em duplo híbrido – a isca MT NS5 e a isca RNAPol NS5.

3.2. Sistema duplo-híbrido em levedura

3.2.1. Análise da expressão das iscas MT e RNAPol em levedura

3.2.1.1. Avaliação da toxicidade das iscas

A estimativa da capacidade de toxicidade inerente às iscas MT e RNAPol sobre o metabolismo da espécie hospedeira foi avaliada. Os valores obtidos na análise comparativa de crescimento das leveduras transformadas com as duas iscas e também com pGBKT7 vazio foram plotados em um gráfico e a curva de crescimento obtida para cada grupo de levedura foi determinada (figura 14).

Os resultados mostraram uma redução na taxa de crescimento das leveduras transformadas com a isca MT, quando estabelecida a comparação com o crescimento das leveduras transformadas com pGBKT7 vazio e com a isca RNAPol, indicando um provável efeito tóxico da isca MT sobre AH109. Desta forma, os experimentos posteriores foram realizados somente com a isca RNAPol.

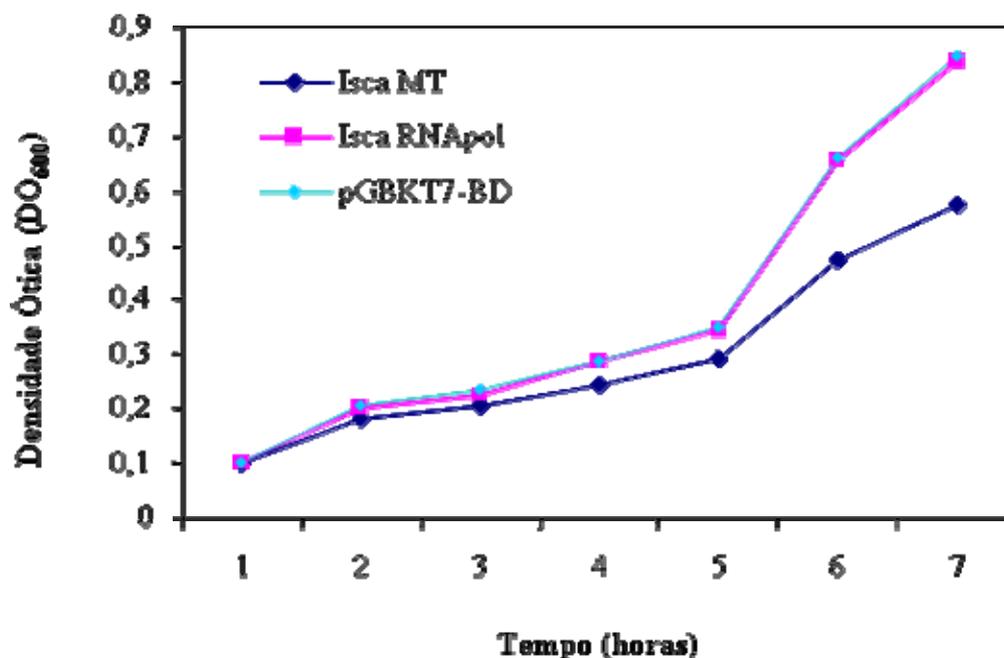


Figura 14. Curva de crescimento comparativa entre leveduras *S. cerevisiae* AH109 transformadas com a isca MT, com a isca RNAPol e com pGBKT7 vazio.

3.2.1.2. Avaliação da expressão da isca RNAPol por *Western Blotting*

O teste *Western Blotting* foi realizado para a confirmação da expressão, em levedura, da proteína RNA polimerase fusionada ao epítipo *c-Myc* do plasmídeo pGBKT7.

A análise do filme radiográfico revelou a presença de banda de aproximadamente 83 KDa para a proteína RNA polimerase, conforme ilustrado na figura 15, indicando, então, que a mesma foi expressa pela levedura hospedeira. Não houve banda esperada de 16 KDa para o controle pGBKT7 vazio, o que pode ser reflexo de uma baixa quantidade de proteína processada nesse teste.

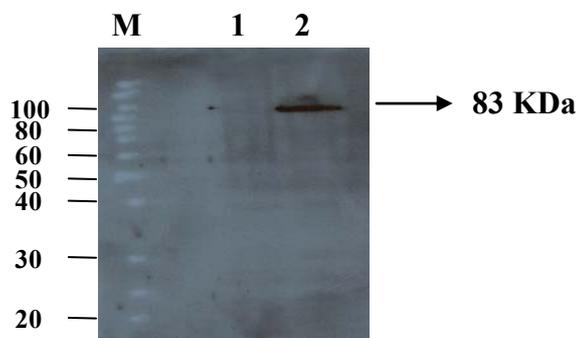


Figura 15. *Western Blotting* para avaliação da expressão da proteína RNA polimerase pela levedura. 1: *Myc*; 2: *Myc*-RNA polimerase. M: Marcador de peso molecular (KDa).

3.2.1.3. Teste de auto-ativação do gene repórter *HIS3* pela isca RNAPol

A possibilidade de ativação autônoma do gene repórter *HIS3* pela isca RNAPol foi avaliada em meio SD-His-Leu-Trp. O resultado mostrou que a levedura transformada com a isca RNAPol juntamente com o vetor pGADT7 vazio não cresceu em meio com deficiência do aminoácido histidina, quando comparado com o crescimento das mesmas colônias em meio SD-Leu-Trp, como pode ser visto na figura 16, demonstrando que a isca testada não apresenta capacidade de auto-ativação da expressão do referido gene repórter.

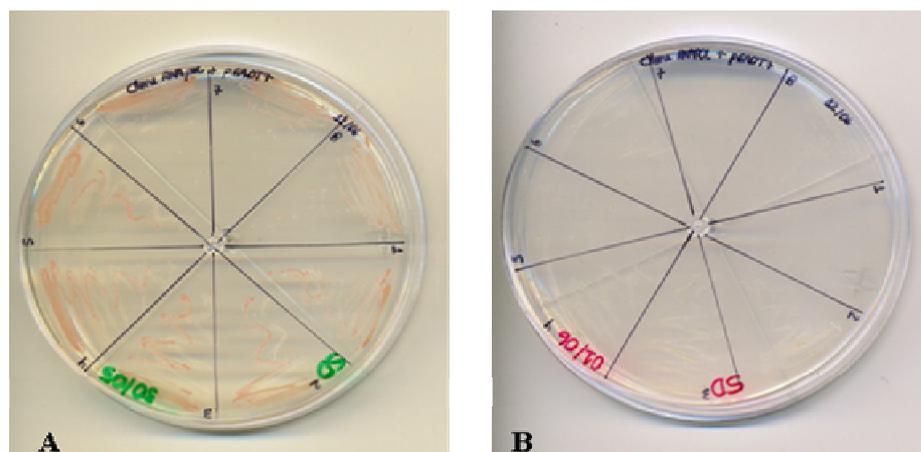


Figura 16. Teste de auto-ativação do gene repórter *HIS3* pela isca RNAPol. A) Repiques dos transformantes em meio SD-Leu-Trp. B) Repiques dos transformantes em meio SD-His-Leu-Trp.

3.2.2. Triagem em sistema duplo-híbrido

3.2.2.1. Transformação seqüencial de plasmídeos controle em levedura

Controles de interações e não-interações foram transformados em levedura para serem usados no monitoramento da triagem em sistema duplo-híbrido. Os resultados dessas transformações estão apresentados no quadro 5. Houve crescimento de colônias em meio SD-His-Leu-Trp na transformação seqüencial entre os plasmídeos usados para controle positivo, pGBKT7-53 e 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 5. Interações entre plasmídeos usados como controles positivo e negativo nos ensaios de duplo-híbrido.

Transformações seqüenciais 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	Positivo	Negativo
	pGADT7-T	Positivo	Negativo
pGBKT7-Lam	pGADT7-AD	Positivo	Negativo
	pGADT7-T	Positivo	Negativo
pGBKT7-53	pGADT7-AD	Positivo	Negativo
	pGADT7-T	Positivo	Positivo

3.2.2.2. Transformação seqüencial da biblioteca de cDNA de células Hela

Para a triagem em sistema duplo-híbrido foi realizada a transformação seqüencial, em larga escala, da biblioteca de cDNA de células Hela em levedura já transformada com a isca RNAPol. Após aproximadamente três dias de incubação, verificou-se a presença de leveduras transformantes nas 25 placas com meio SD-His-Leu-Trp. O mesmo padrão foi encontrado nas placas SD-Leu-Trp, as quais serviram como controle da eficiência do protocolo de transformação da biblioteca de cDNA, a qual ficou estimada em $9,6 \times 10^2$ cfu/ μ g DNA, indicando que $3,8 \times 10^4$ clones de levedura contendo a isca e a presa foram obtidos.

Entretanto, apenas 204 transformantes obtidos da triagem foram selecionados para os próximos experimentos.

3.2.2.3. Identificação dos clones positivos

3.2.2.3.1. Ativação de genes repórteres

Os 204 transformantes selecionados da triagem contra a biblioteca de cDNA humano foram testados quanto à capacidade de ativação de três genes repórteres da levedura AH109 – *HIS3*, *ADE2* e *lacZ*, os quais são controlados, respectivamente, pelos promotores GAL1, GAL2 e MEL1.

Os resultados (quadro 6) demonstraram a negatividade de 169 clones frente à ativação da expressão dos repórteres testados, dada à ausência de crescimento nos meios seletivos SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp, como também devido ao resultado negativo no *Filter Lift*. Estes transformantes foram, então, eliminados do estudo.

Quadro 6. Trinta e cinco clones positivos obtidos da triagem com a isca RNAPol, selecionados quanto à ativação de genes repórteres de AH109.

Ativação dos genes repórteres	
Positivos para <i>HIS3</i> e <i>lacZ</i>	Positivos para <i>HIS3</i>, <i>ADE2</i> e <i>lacZ</i>
	3
	6
	7
	11
	13
	16
	18
20	
	23
	25
26	
	27
28	
	29
	31
	32
39	
	40
	59
	60
	79
	80
	89
95	
	96
	97
	118
	121
125	
	126
	127
	129
133	
135	
	136

No entanto, 35 clones foram positivos, ou seja, capazes de ativar o processo de transcrição da levedura e, conseqüentemente, levar à expressão de genes repórteres. Dentre estes clones, 27 cresceram nos meios seletivos com ausência dos aminoácidos

histidina e adenina, e ainda mostraram positividade no teste *Filter Lift*, ou seja, eles ativaram os três repórteres considerados na avaliação. Os oito clones positivos restantes ativaram apenas *HIS3* e *lacZ*.

3.2.2.3.2. Ensaio de restrição enzimática

Os 35 clones correspondentes ao plasmídeo pACT2 com os insertos que são prováveis parceiros interativos do domínio RNAPol de NS5 foram analisados quanto ao perfil de restrição enzimática *BamH* I / *Xho* I. A digestão do plasmídeo pACT2 por estas duas enzimas libera o inserto, excluindo, a partir daí, um possível clone falso-positivo. Todas as colônias selecionadas foram consideradas positivas, pois, conforme pode ser visto na figura 17, a eletroforese demonstrou um perfil de digestão enzimática com a geração de, pelo menos, dois fragmentos de restrição.

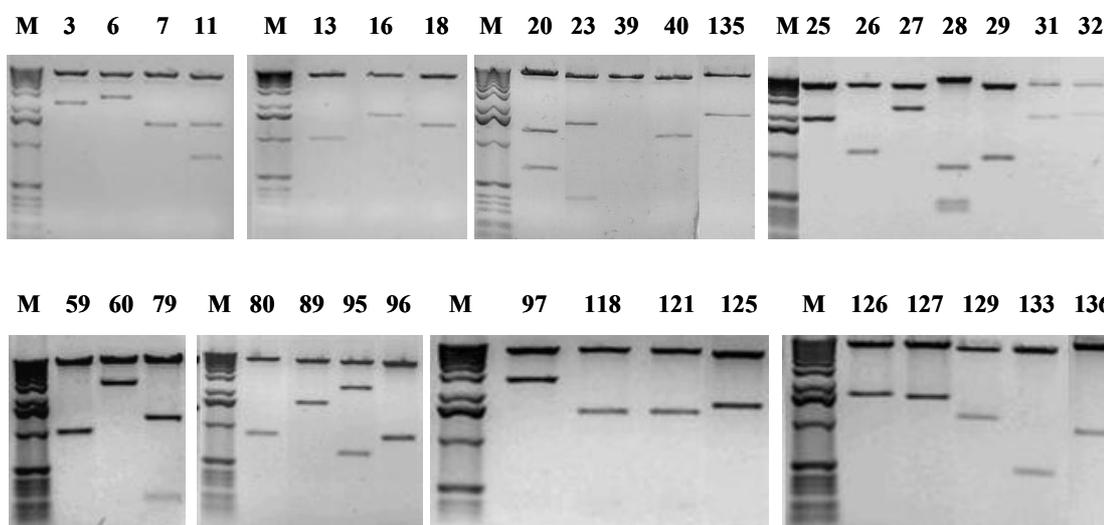


Figura 17. Perfil de restrição enzimática *BamH* I / *Xho* I dos 35 clones positivos pACT2-cDNA da biblioteca selecionados da triagem em duplo-híbrido. M: marcador de pares de base (1 Kb).

3.2.2.3.3. Seqüenciamento nucleotídico

Após seqüenciamento nucleotídico dos 35 clones pACT2-cDNA da biblioteca e comparação das seqüências obtidas com seqüências conhecidas no GenBank, os resultados indicaram proteínas diferentes para cada uma das amostras, com exceção dos clones 23, 121 e 135, os quais foram relacionados a uma mesma proteína (eIF3S6IP) e dos clones 31 e 118, devido ao insucesso da reação de seqüenciamento destes.

O quadro 7 mostra a identificação das proteínas humanas que se mostraram parceiras interativas do domínio RNA polimerase da proteína NS5 do YFV em ensaio de duplo-híbrido em levedura.

Quadro 7. Identificação das proteínas humanas que interagiram com RNA polimerase NS5 do YFV em ensaio de duplo-híbrido em levedura.

Clones positivos	Proteínas
3	SURF4
6	SNED1
7	Snf5
11	p54 _{NRB}
13	HMG20B
16	NARF
18	U1A
20	Citocina IK
23	eIF3S6IP
25	HOXA11
26	Clone cromossomo 19
27	CSRP2
28	GNAS
29	CDC85B
31	-
32	TRAF interacting protein
39	Poli A
40	LSFR1
59	CD63
60	Myopalladin
79	Formin-like 1
80	Folistattin-like 1
89	NOC4L
95	Dishevelled isoform A
96	SDHB
97	FLJ20989
118	-
121	eIF3S6IP
125	MBD2
126	HSLU7
127	GIPC1
129	NTHLI 3
133	MIF
135	eIF3S6IP
136	Proteína hipotética

3.2.2.4. *Plasmid Linkage* – Re-teste no sistema duplo-híbrido

Para o *plasmid linkage* foram escolhidas sete proteínas identificadas como parceiras interativas do domínio RNAPol, sendo elas Snf5, p54_{NRB}, HMG20B, U1A, eIF3S6IP, GIPC PDZ e MIF, referentes aos clones 7, 11, 13, 18, 23, 127 e 133, respectivamente.

Os resultados obtidos foram condizentes com os encontrados na triagem inicial, conforme descrito no quadro 6, confirmando as interações das sete proteínas com RNA polimerase de NS5 do YFV. Houve a comprovação de que a interação da isca RNAPol com as presas 7, 11, 13, 18, 23 e 127 é capaz de promover a expressão dos dois genes repórteres avaliados, *HIS3* e *ADE2*, enquanto a interação com o clone 133 ativa somente o repórter *HIS3* de AH109.

A demonstração desses perfis de ativação dos repórteres *HIS3* e *ADE2*, nos três meios onde ocorreram os plaqueamentos, está na figura 18, onde o resultado da re-transformação do clone 127 em levedura contendo a isca RNAPol representa também os perfis de ativação pelos clones 7, 11, 13, 18 e 23, enquanto o clone 133 (pACT2-cDNA de MIF) está representado separadamente devido ao diferente perfil de ativação dos repórteres testados. Da mesma forma, representados pelo clone 127, estão os resultados das re-transformações dos outros seis clones com os controles pGBKT7 vazio e pGBKT7-Lam (negativo), uma vez que foram equivalentes, não ocorrendo interação inespecífica.

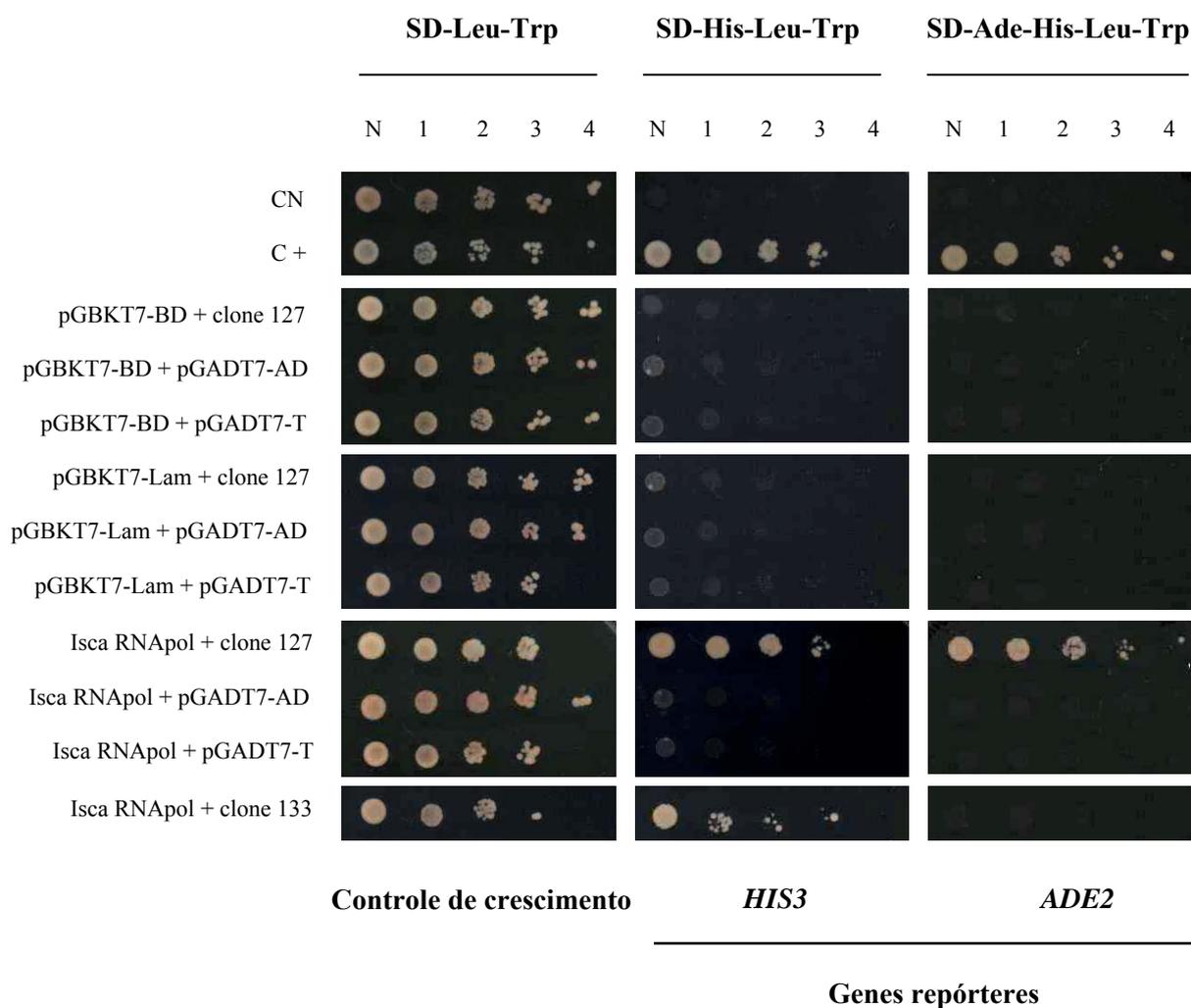


Figura 18. Perfis de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* no *plasmid linkage* dos clones 7, 11, 13, 18, 23, 127 e 133, representados pelos clones 127 e 133. CN: controle negativo; C +: controle positivo. N: amostra normalizada; 1-4: diluições seriadas de razão 10 da amostra em SD-Leu-Trp.

3.2.3. Mapeamento do domínio da interação

3.2.3.1. Construção das iscas RNAPol contendo deleções

Para realizar o mapeamento do domínio das interações proteína-proteína detectadas através do sistema duplo-híbrido foram geradas 14 iscas RNAPol contendo deleções. Assim, os 14 fragmentos de RNAPol com deleções foram amplificados (figura 19), inseridos no vetor pGBKT7 e transformados em *E. coli*.

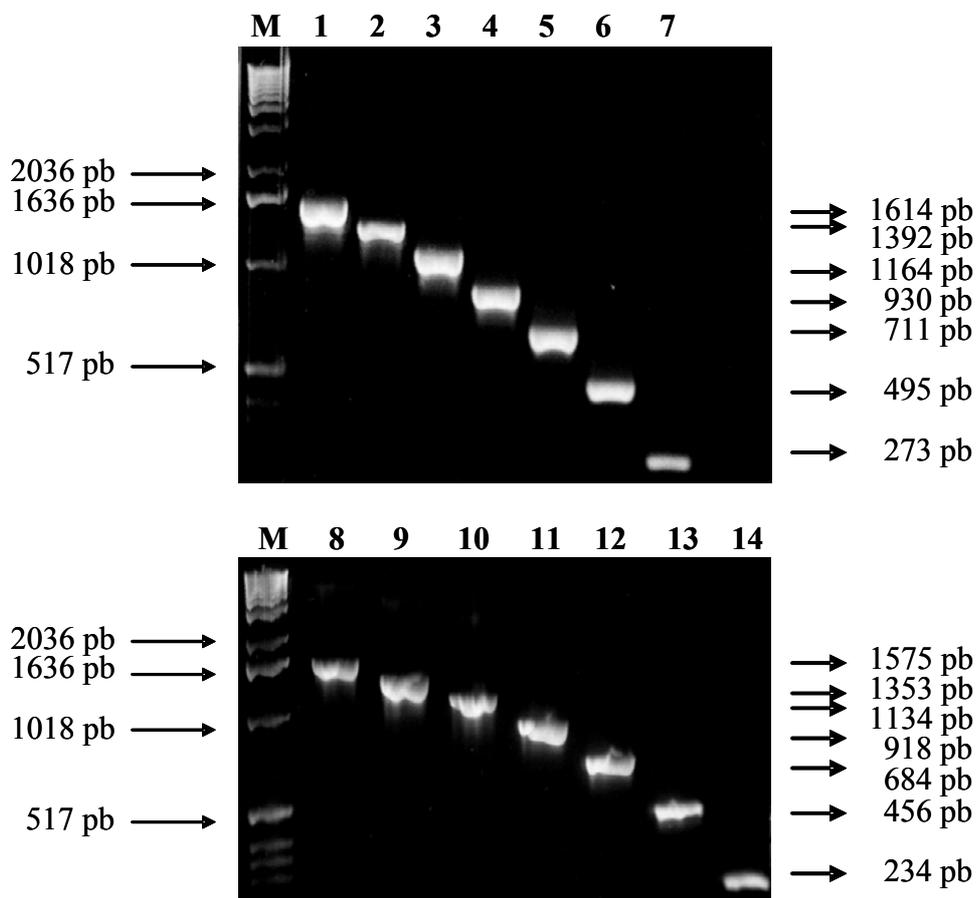


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* referentes aos fragmentos RNAPol com deleções *forwards* (1 a 7) e reversas (8 a 14). M: marcador de pares de base (1 Kb).

Os transformantes obtidos foram, então, analisados por PCR para verificar a presença do inserto. A eletroforese demonstrou a presença de bandas com tamanhos esperados de 1614 pb, 1392 pb, 1164 pb, 930 pb, 711 pb, 495 pb, 273 pb, 1575 pb, 1353 pb, 1134 pb, 918 pb, 684 pb, 456 pb e 234 pb, respectivamente para os fragmentos com deleções 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

Por fim, o seqüenciamento genômico dos transformantes positivos pela PCR confirmou a correta inserção de cada fragmento com deleção no *frame* de leitura do vetor pGBKT7 e excluiu a ocorrência de mutações nas seqüências.

3.2.3.2. Triagem em duplo-híbrido com as iscas RNAPol contendo deleções

Através de uma triagem em sistema duplo-híbrido em levedura com as 14 iscas RNAPol contendo deleções foi determinado o domínio mínimo responsável pelas interações entre RNA polimerase e as proteínas Snf5 e eIF3S6IP.

Os resultados obtidos, os quais estão apresentados no quadro 8 e na figura 20, demonstraram perfis de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* equivalentes para ambas as proteínas. Foi detectada interação proteína-proteína, tanto para Snf5 como para eIF3S6IP, com o segmento completo de RNA polimerase (isca RNAPol) e também com os fragmentos RNAPol com deleções 1, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Por outro lado, os transformantes contendo Snf5 ou eIF3S6IP e cada isca RNAPol com deleção 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 14 não foram capazes de ativar nenhum dos genes repórteres testados, refletindo a ausência de interação.

Quadro 8. Mapeamento do domínio das interações entre RNA polimerase e as proteínas Snf5 e eIF3S6IP.

Transformação seqüencial em AH109		Ativação de <i>HIS3</i> e <i>ADE2</i>
Iscas RNAPol	Presas pACT2-cDNA	
Isca com segmento completo RNAPol e isca 1	Snf5 (7) eIF3S6IP (23)	Positivo
Iscas 2, 3, 4, 5, 6 e 7	Snf5 (7) eIF3S6IP (23)	Negativo
Iscas 8, 9, 10, 11, 12 e 13	Snf5 (7) eIF3S6IP (23)	Positivo
Isca 14	Snf5 (7) eIF3S6IP (23)	Negativo

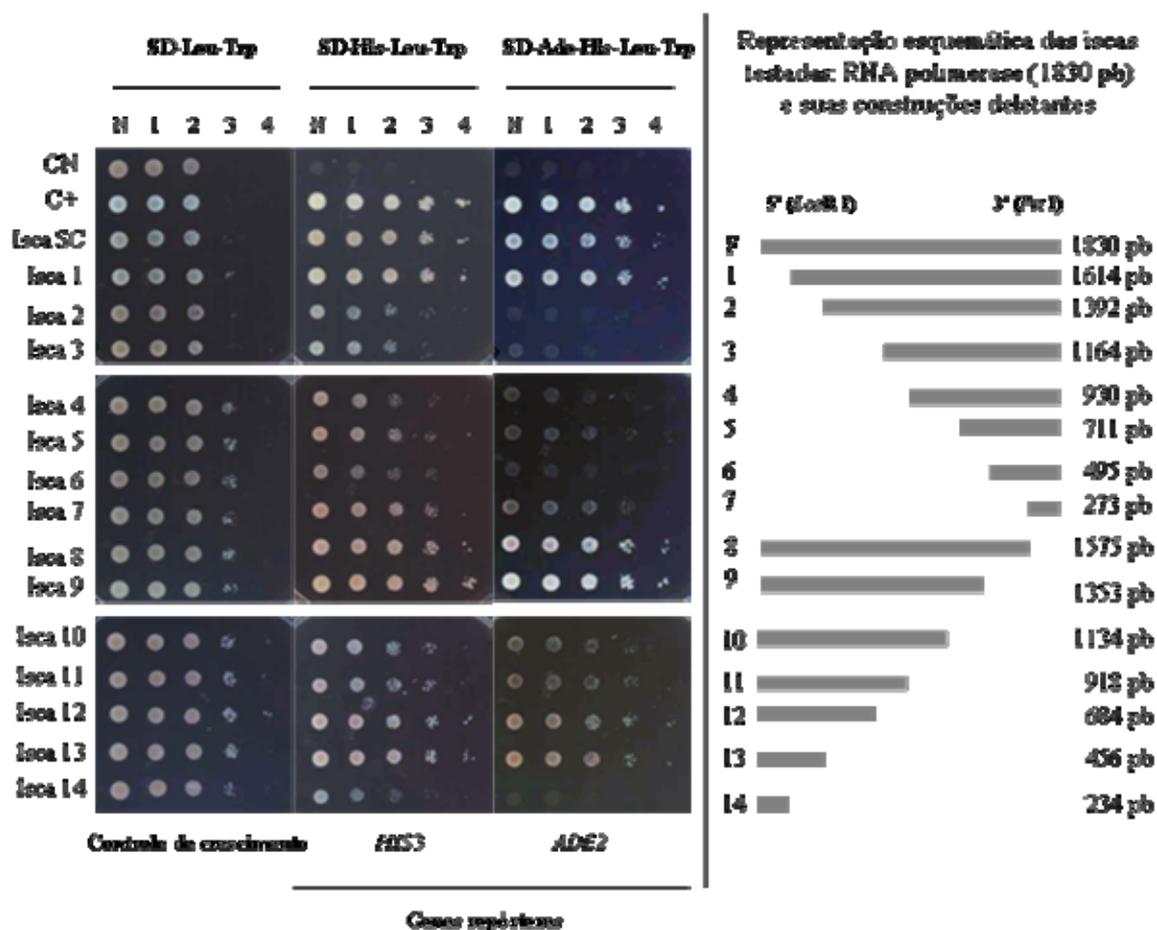


Figura 20. Perfil de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* no mapeamento do domínio da interação de RNA polimerase com as proteínas Snf5 e eIF3S6IP. N: amostra normalizada; 1-4: diluições seriadas de razão 10 da amostra; Isca SC: com o segmento completo de RNA polimerase; Iscas 1-14: com os fragmentos RNAPol com deleções.

Os resultados dessa triagem sugerem que o possível domínio de interação está compreendido entre os aminoácidos 73 e 152 de RNA polimerase. Tal domínio foi denominado fragmento A de RNAPol (figura 21).

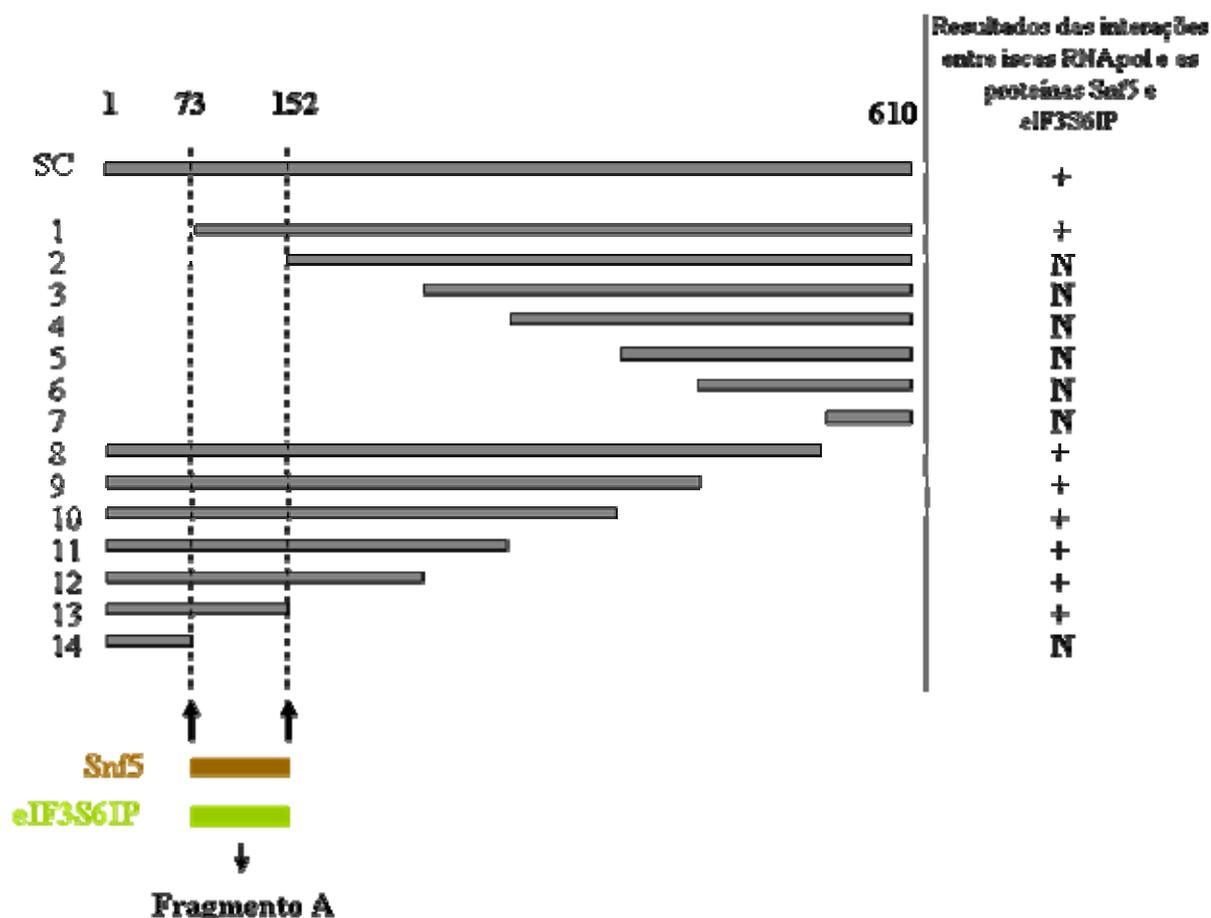


Figura 21. Representação esquemática de RNA polimerase (SC) e seus fragmentos com deleções (1 a 14) utilizados para o mapeamento do domínio da interação. As setas indicam o possível domínio de interação com as proteínas Snf5 e eIF3S6IP. (+): interação positiva; (N): interação negativa.

3.2.3.3. Confirmação do domínio da interação

Para a confirmação do fragmento A de RNA polimerase como o domínio mínimo responsável pelas interações proteína-proteína com Snf5 e eIF3S6IP foi gerada a isca FragA RNAPol. Para isso, o fragmento A foi amplificado, inserido no vetor pGBKT7 e transformado em *E. coli*. Os transformantes obtidos foram analisados por PCR para verificar a presença do inserto. A figura 22 demonstra a presença de bandas com o tamanho esperado de 240 pb referente à amplificação do fragmento. O

seqüenciamento genômico de um transformante positivo na PCR confirmou a correta inserção do fragmento A no *frame* de leitura do vetor pGBKT7 e excluiu a ocorrência de mutações na seqüência.

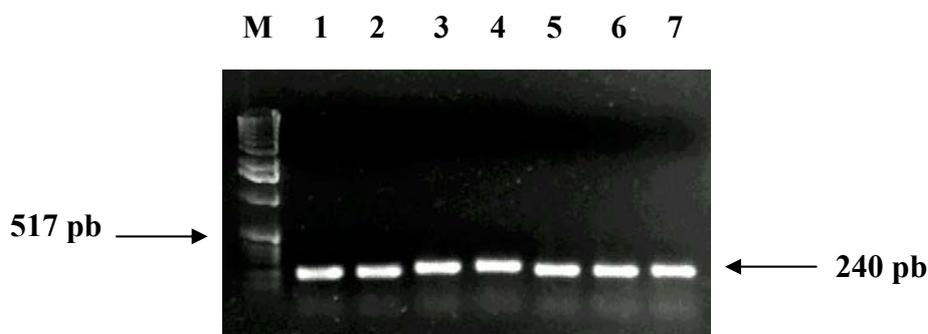


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1% para triagem dos transformantes positivos contendo o fragmento A de RNA polimerase (1-6). 7: controle positivo (pACNR-FLYF17D); M: marcador de pares de base (1 Kb).

A realização de uma triagem em duplo-híbrido com a isca FragA RNAPol permitiu a confirmação do fragmento A como sendo o menor fragmento em RNA polimerase responsável por estabelecer as interações proteína-proteína analisadas.

Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 23 (para a proteína Snf5) e 24 (para a proteína eIF3S6IP) e demonstraram perfis equivalentes de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* para ambas as proteínas. Assim, foi detectada interação, tanto para Snf5 como para eIF3S6IP, com o segmento completo de RNA polimerase (isca RNAPol) e também com a isca FragA RNAPol, uma vez que as leveduras transformantes contendo tais iscas e presas foram capazes de crescer em meios com ausência dos aminoácidos histidina e adenina. Ainda com a análise do perfil de crescimento em meios *drop-out* duplos, triplos e quádruplos ficou descartada a ocorrência de auto-ativação pela isca FragA RNAPol, devido à ausência de crescimento

dos transformantes contendo tal isca com pGADT7 vazio ou pGADT7-T em SD-His-Leu-Trp e SD-Ade-His-Leu-Trp.

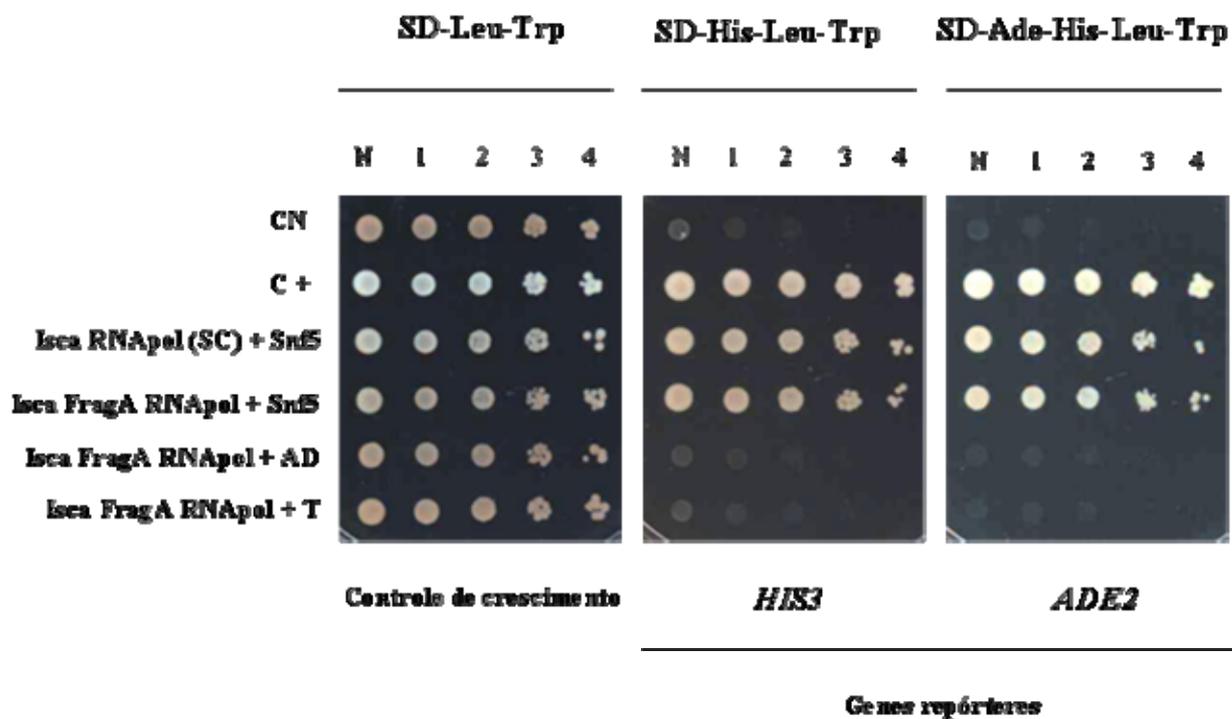


Figura 23. Perfil de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* na confirmação do domínio da interação entre RNA polimerase e a proteína Snf5. N: amostra normalizada; 1-4: diluições seriadas de razão 10 da amostra; CN: controle negativo; C +: controle positivo.

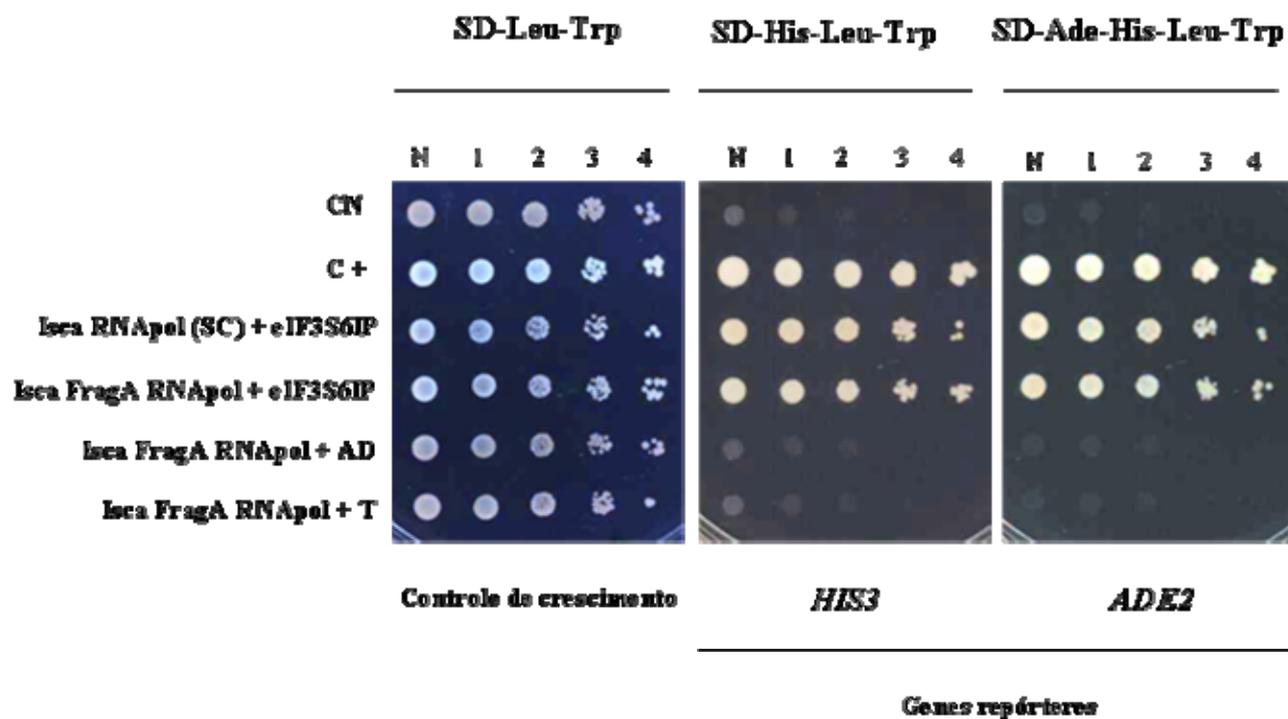


Figura 24. Perfil de ativação dos genes repórteres *HIS3* e *ADE2* na confirmação do domínio da interação entre RNA polimerase e a proteína eIF3S6IP. N: amostra normalizada; 1-4: diluições seriadas de razão 10 da amostra; CN: controle negativo; C+: controle positivo.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A febre amarela conserva-se como uma preocupante enfermidade para a atual saúde pública brasileira, devido a sua endemicidade em áreas tropicais da América do Sul e à considerável taxa de letalidade mundial. É causada pelo vírus da febre amarela (YFV), o qual é transmitido ao homem através do mosquito *Aedes aegypti*, o principal responsável pelos alarmantes números de casos de dengue observados no país.

Embora casos urbanos de febre amarela não sejam notificados no Brasil desde 1942, a ocorrência de casos silvestres somada à atual dispersão e aos índices de infestação de *Ae. aegypti* entre os mais de 118 milhões de pessoas que ainda não estão vacinadas, são motivos potenciais para a reurbanização da doença.

Além da vacina anti-amarílica 17DD e o combate ao vetor, outro ponto fundamental contra a febre amarela seria o desenvolvimento de drogas antivirais específicas capazes de romper etapas essenciais do ciclo replicativo viral, como uma interação proteína-proteína. De fato, a formação do complexo de replicação do YFV é um processo que envolve interações ainda não muito bem compreendidas entre proteínas celulares e proteínas virais. Dentre estas, destaca-se a proteína NS5.

Interações proteína-proteína são descritas como intrínsecas a diversos processos biológicos essenciais, apresentando fundamental importância para ativação, regulação e controle de várias funções biológicas a elas relacionadas.^(43,44,49) O conhecimento do significado dessas interações para a função celular, ou seja, sua identificação, a amplitude que tomam e a determinação de suas conseqüências, são questões essenciais para a resolução, dentre outras relevâncias, das bases das interações patógeno-hospedeiro e, conseqüentemente, para o desenho racional de drogas que possam atuar promovendo a ruptura dessas interações.^(45,60) Interações proteína-proteína provêm

alvos terapêuticos no tratamento do câncer e de doenças infecciosas, sendo o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras dessas interações um campo crescente de pesquisas.⁽⁶¹⁾

De forma equivalente, interações protéicas são necessárias para muitas funções virais. 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 de células hospedeiras e que passam a exercer papel integral ou regulatório na replicação e transcrição do vírus.

Neste contexto, Lai (1998)⁽³⁵⁾ demonstrou que a RdRp viral, purificada de células infectadas por diferentes vírus de RNA de polaridade positiva, estava associada à proteínas celulares. A remoção dessas proteínas resultou na perda da atividade da RdRp viral ou de sua especificidade para o alvo. Tal acontecimento sugere que proteínas celulares são necessárias para a síntese específica de RNA, sendo pré-requisitos fundamentais para o sucesso de uma replicação viral. Janda e Ahlquist (1993),⁽⁶²⁾ através de estudos sobre a replicação do *brome mosaic virus* (BMV) em levedura, já haviam apontado a participação de fatores celulares na síntese do RNA viral.

Apesar da ciência sobre a participação de proteínas virais não-estruturais na formação do complexo de replicação dos *Flavivirus*, as funções desempenhadas por NS5 ainda não estão completamente esclarecidas. No entanto, existem evidências da importância de NS5 para a patogênese viral, possivelmente através da sua atuação sobre

os determinantes da interação vírus-célula hospedeira.^(29,30) Não menos importante é o papel desempenhado por NS5 sobre a replicação viral. Além de apresentar as atividades de RdRp e metiltransferase fundamentais para este processo,⁽¹³⁾ a identificação de NS5 no núcleo de células infectadas por alguns *Flavivirus*, incluindo YFV e DENV,^(31,32) indica um envolvimento nuclear de tal proteína nos estágios de replicação viral. De fato, este acontecimento foi confirmado pelos experimentos de Johansson e colaboradores (2001)⁽³³⁾ e Uchil e colaboradores (2006),⁽³⁴⁾ tornando relevante a consideração do papel nuclear da proteína NS5, principalmente no que se refere à possibilidade de interação e modificação de proteínas e funções celulares, apesar da crença de que a replicação dos *Flavivirus* fosse exclusivamente citoplasmática.

O presente estudo aponta, dentro desse contexto, novas ferramentas para uma melhor compreensão da patogênese e replicação viral, assim como o papel da proteína NS5 – interações proteína-proteína entre NS5 de YFV e proteínas celulares, as quais foram detectadas através de sistema duplo-híbrido em levedura.

De fundamental relevância para o sucesso do presente estudo, o sistema duplo-híbrido tem sido a metodologia de escolha para o estudo de interações entre proteínas celulares e proteínas virais não-estruturais, incluindo NS5, objetivando um conhecimento mais abrangente sobre a replicação e a patogênese de alguns membros da família *Flaviviridae*, principalmente o YFV, DENV, HCV e o BVDV.

Originalmente introduzido na comunidade científica por Fields e Song em 1989,⁽⁵¹⁾ o sistema duplo-híbrido em levedura é um ensaio genético-molecular pelo qual uma interação proteína-proteína é detectada *in vivo*, através da reconstituição da função do ativador transcricional GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Neste ensaio, são construídos e introduzidos na levedura plasmídeos que codifiquem duas proteínas

híbridas – um com o DNA-BD de GAL4 fundido a uma proteína X (isca) e outro com o AD de GAL4 fundido a uma proteína Y (presa). A interação entre as proteínas X e Y recompõe a proximidade entre os dois domínios de GAL4 e recruta a maquinaria de transcrição para a região promotora. O processo é, então, ativado, e a interação proteína-proteína é detectada através da expressão de um sinal fenotípico, o qual é produzido a partir da ativação transcricional de genes repórteres da levedura.^(44,51)

Neste sentido, através de triagem em sistema duplo-híbrido em levedura contra biblioteca de cDNA de células renais de bovino susceptíveis à infecção por BVDV, Johnson e colaboradores (2001)⁽³⁶⁾ demonstraram que NS5 de BVDV interage com uma única proteína, a eEF1A (*translation elongation factor 1A*). Da mesma forma, NS5 de WNV e DENV-4 foi identificada como parceira interativa deste mesmo tipo de proteína.^(16,37)

Empregando a mesma metodologia, Chung e colaboradores (2000)⁽³⁸⁾ identificaram a proteína karioferina $\beta 3$, a qual pertence ao grupo de proteínas que fazem transporte de proteína e de RNA, como um par da proteína NS5A do HCV. Adicionalmente, através da geração de proteínas mutantes, o experimento apontou que a interação entre NS5A de HCV e karioferina $\beta 3$ pode inibir sua atividade e alterar o metabolismo celular, bem como contribuir com a proliferação viral.

Majumder e colaboradores (2001),⁽³⁹⁾ por sua vez, mostraram que a interação da proteína NS5A de HCV com a proteína p53 (proteína nuclear supressora de tumor) promove o crescimento celular, podendo contribuir na patogênese da infecção. Ao interagirem, NS5 sequestra a proteína p53 na membrana perinuclear. A proteína p53 inibe a expressão do gene p21/waf1, um regulador do crescimento celular. A diminuição de p53 no núcleo pode afetar a inibição da expressão do gene p21/waf1 e,

desta forma, promover o crescimento celular. Entretanto, outros estudos são necessários para elucidar a associação funcional entre p53 e NS5 na replicação viral.

Outra interação proteína-proteína com NS5A de HCV detectada através de sistema duplo-híbrido foi descrita por Evans e colaboradores (2004).⁽⁴⁰⁾ Os experimentos detectaram como par interativo de NS5A 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. Mutações em NS5A que bloqueiam a referida interação reduzem fortemente a replicação do HCV. Além disso, as análises demonstraram uma inversa correlação entre o estado fosforilativo de NS5A e a interação com hVAP-A, ou seja, os modelos no estudo sugeriram que a hiperfosforilação de NS5A rompe a interação, regulando negativamente a replicação do RNA viral.

Os experimentos de Houshmand e Bergqvist (2003)⁽⁴¹⁾ indicaram uma habilidade da proteína La em 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 dos DENV, bem como na de outros membros da família *Flaviviridae*. Desta forma, é possível que o complexo de replicação dos *Flavivirus* requeira a interação com a proteína La para a ocorrência da replicação. A proteína La pode desempenhar diferentes funções, como a modulação ou o favorecimento da interação entre as duas extremidades do genoma viral, conferindo ao mesmo uma conformação específica para a tradução ou replicação. Além disso, pode estar envolvida na mudança dos processos de tradução para os de replicação. É possível que a replicase viral possa interagir com o genoma viral somente depois da interação do RNA com a proteína La e outras proteínas celulares, e que NS3 e NS5 possam usar esta interação para se ligar ao complexo de

replicação viral no início de sua formação. Finalmente, a interação entre ambas as extremidades do genoma viral com a proteína La pode ser um pré-requisito para a ligação de outros fatores ainda não identificados, os quais podem participar da replicação dos DENV.⁽⁶³⁾

Contribuindo com os experimentos citados, assim como com os dados apresentados pelo presente estudo, uma forte evidência da ocorrência de interações proteína-proteína com NS5 é o fato de NS5 de toda a família *Flaviviridae* ser fosforilada por uma serino/treonina quinase celular, sugerindo que este mecanismo, conservado através da evolução viral, é importante para o ciclo replicativo dos *Flavivirus*.⁽⁴²⁾ Embora a função dessa fosforilação não seja conhecida, ela pode regular a interação entre NS5 e NS3, ou determinar a localização de NS5 no núcleo celular.⁽³²⁾

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 proteínas celulares, ficando evidente 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. Dessa forma, a descoberta de proteínas celulares que atuem como parceiras interativas de NS5 de YFV pode 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.

4.1. Análise das interações proteína-proteína com o domínio RNA polimerase de NS5 do YFV

Através de uma triagem em sistema duplo-híbrido em levedura contra uma biblioteca de cDNA de células Hela, o presente estudo identificou 33 interações entre o domínio RNA polimerase de NS5 do YFV e proteínas humanas.

Analisando fatores que pudessem determinar o envolvimento dessas proteínas com NS5, como a relevância nos processos de replicação viral, metabolismo de mRNA, controle do crescimento celular e examinando interações conhecidas com outras proteínas virais, foram consideradas como de maior importância para os presentes resultados sete das proteínas identificadas como parceiras interativas do domínio RNA polimerase de NS5: Snf5, p54_{NRB}, HMG20B, U1A, eIF3S6IP, GIPC1 e MIF. As principais características sobre cada uma destas proteínas estão apresentadas a seguir.

4.1.1. Proteína Snf5

Snf5, ainda conhecida como SMARCB1, INI1, RDT, Snr1, BAF47, Sfh1p, hSNFS e SNF5L1, é uma subunidade protéica do complexo remodelador de cromatina Swi/Snf estando, portanto, envolvida no controle da transcrição.⁽⁶⁴⁾

Os modificadores de cromatina, assim como os fatores de transcrição, são essenciais para a regulação da expressão gênica em eucariotos. Alterações no estado da cromatina podem influenciar tanto a acessibilidade do DNA nucleossomal quanto o recrutamento de proteínas regulatórias, desempenhando uma importante função na regulação da iniciação da transcrição (ativação ou repressão), contribuindo no controle de diversos processos celulares, como proliferação e diferenciação.⁽⁶⁴⁾

Lee e colaboradores (2002) ⁽⁶⁵⁾ descreveram a interação entre Snf5 e a proteína p53, supressora de tumor, como sendo necessária para a ativação da transcrição mediada por p53. A proteína p53 regula a transcrição de alguns genes que atuam no controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular sendo, por isso, de grande importância na regulação do crescimento celular normal. Nestes casos, a estrutura da cromatina pode atuar como um dos mediadores que regulam o reconhecimento de sítios de ligação por p53 durante o ciclo celular e, conseqüentemente, agir como um modulador da expressão gênica conduzida por p53.

Snf5 foi descrita como um poderoso supressor de tumor, cujo mecanismo de ação ainda permanece desconhecido. Sabe-se, porém, que essa atividade supressora depende da regulação da progressão do ciclo celular por Snf5. A inativação de Snf5 leva ao aumento dos níveis da proteína p53 que é acompanhado por apoptose e diminuição do crescimento celular.⁽⁶⁶⁾

Finalmente, Ariumi e colaboradores (2006) ⁽⁶⁷⁾ descobriram uma interação direta entre INI1 e a integrase (IN) de HIV-1, uma proteína que catalisa a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira, uma etapa essencial para a replicação do HIV-1. Embora o efeito desse evento sobre a replicação viral ainda seja desconhecido, sabe-se que a interação com a proteína INI1 estimula *in vitro* a atividade de IN. Além disso, tal interação pode limitar a localização do complexo de pré-integração do HIV-1 a genes transcricionalmente ativos, influenciando a integração viral a estas regiões do genoma e facilitando a transcrição do pró-vírus.

4.1.2. Proteína p54_{NRB}

p54_{NRB}, igualmente denominada P54, NMT55 ou NonO (proteína homóloga em camundongo), é um fator de transcrição que exhibe características multifuncionais em processos nucleares, tais como regulação transcricional, *splicing*, relaxamento do DNA, retenção nuclear de fita dupla de RNA, processamento de RNA viral e controle da proliferação celular. Por apresentar estas diferentes funções, pode estar presente em diversas localizações nucleares.⁽⁶⁸⁾

Emili e colaboradores (2002)⁽⁶⁹⁾ demonstraram que o domínio carboxi-terminal da RNA polimerase II de eucarioto desempenha uma importante função em promover etapas do processamento do pré-mRNA e que p54_{NRB} pode fazer uma ponte direta entre este domínio e componentes deste processamento, nas fases de iniciação e alongação da transcrição. Esta proteína também pode ter uma função indireta, como *chaperona-like*, de dobrar o domínio carboxi-terminal em uma forma que o permita participar do processamento do pré-mRNA.

Adicionalmente, Liang e Lutz (2006)⁽⁷⁰⁾ demonstraram p54_{NRB} como sendo componente de um complexo de proteínas não-snRNP, juntamente com PSF, p68 e uma forma da proteína U1A não associada ao complexo snRNP U1 nem ao RNA U1, chamada U1A snRNP-*free*. O experimento mostrou que anticorpos que reconhecem especificamente este complexo inibem o *splicing* e a poliadenilação do pré-mRNA *in vitro*, sugerindo que este complexo pode ter um importante papel funcional nestas etapas do processamento do mRNA. Embora p54_{NRB} tenha sido originalmente descoberta como sendo envolvida no *splicing* de pré-mRNA, os resultados evidenciaram um importante papel desta proteína na clivagem e poliadenilação, talvez através da regulação de etapas iniciais da montagem da maquinaria de poliadenilação.

4.1.3. Proteína HMG20B

HMG20B, ainda denominada BRAF25 ou 25, foi descrita no trabalho de Sumoy e colaboradores (2000),⁽⁷¹⁾ juntamente com HMG20A, como sendo proteínas codificadas por dois novos genes humanos pertencentes ao HMG *box*. O HMG *box* codifica um domínio de ligação ao DNA conservado, o qual é encontrado em muitas proteínas e está envolvido na regulação da transcrição e com a conformação da cromatina. As proteínas HMG20A e HMG20B apresentaram no experimento mencionado uma identidade estimada em 48,4%, sendo 73,9% dentro do domínio HMG. O domínio HMG de ambas as proteínas é similar ao domínio HMG da proteína NHP6A de leveduras (38% to 42%). Fora deste domínio, as proteínas HMG20 não apresentaram homologia significativa a outras proteínas conhecidas.

Devido à localização do gene BRAF25 na região cromossômica 19p13.3, a qual tem sido relacionada à aproximadamente 50% dos casos de câncer de ovário e, devido à conhecida existência da ligação genética do câncer de próstata com os cânceres de mama e ovário, Wang e colaboradores⁽⁷²⁾ investigaram, no ano de 2002, a expressão do gene BRAF25 em amostras prostáticas. Análises imunohistoquímicas usando anticorpos específicos contra BRAF25 revelaram uma forte coloração em seções referentes à hiperplasia prostática benigna (BPH). No entanto, a expressão de BRAF25 estava consideravelmente reduzida em amostras de câncer de próstata intermediário e ausente naquelas correspondentes a câncer avançado.

4.1.4. Proteína U1A

U1A, ou U1 snRNP-A, é a proteína A do complexo snRNP U1. snRNPs U (snRNPs U1, U2, U4, U5 e U6) são complexos ribonucleoprotéicos reunidos

seqüencialmente no pré-mRNA, no interior do spliceossomo, para reconhecer e remover novos íntrons emergentes da maquinaria de transcrição. U1, o componente mais abundante, tem um papel fundamental na definição do sítio 5' de *splicing* do pré-mRNA.

U1A pertence à família de proteínas ligantes de RNA (*RNA-binding proteins*), as quais são necessárias em vários processos de regulação celular, incluindo terminação transcricional, *splicing* do mRNA, transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma, localização intracelular dos transcritos, tradução do mRNA, estabilidade do mRNA e processamento do tRNA e rRNA. A característica mais preservada dessa família são os motivos de reconhecimento de RNA RRM1 e RRM2. Em U1A, apenas RRM1 interage especificamente com o *hairpin* II do snRNA U1 e, juntamente com outras proteínas, forma o snRNP U1 essencial para o *splicing* de pré-mRNA. Embora estudos *in vitro* tenham demonstrado que U1A não é essencial para a reação de *splicing*, sugere-se que essa proteína pode desempenhar um importante papel na comunicação dos sítios de *splicing* 5' e 3'.⁽⁷³⁾

Além disso, U1A liga-se à região 3'UTR de seu próprio pré-mRNA, inibindo a poliadenilação e, assim, regulando negativamente seu próprio nível de expressão. O pré-mRNA de U1A contém uma região denominada elemento inibitório de poliadenilação, na qual se encontram dois segmentos com sete nucleotídeos não-pareados chamados de *loop* 1 e 2. Estes segmentos ligam-se, cada um, a uma molécula da proteína U1A, formando um complexo que inibe especificamente a ação da enzima poli (A) polimerase (PAP) e, conseqüentemente, a adição da cauda poli (A) ao pré-mRNA de U1A.⁽⁷³⁾

Liang e Lutz (2006) ⁽⁷⁰⁾ descreveram uma forma de U1A presente em células humanas, em quantidades significativas, que não está associada ao complexo snRNP U1 ou ao RNA U1, mas é parte de um novo complexo de proteínas não-snRNP e que foi chamada U1A snRNP-*free* ou SF-A. Experimentos empregando anticorpos específicos contra este complexo inibiram *splicing* e poliadenilação, sugerindo a importância funcional do complexo nestas etapas do processamento do pré-mRNA. Além de PSF (*polypyrimidine-tract-binding protein-associated splicing factor*), foram demonstrados como componentes do complexo de proteínas não-snRNP as proteínas p54_{NRB} e p68.

4.1.5. Proteína eIF3S6IP

Existem poucos trabalhos disponíveis sobre a proteína eIF3S6IP (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein*), a qual ainda pode ser chamada de HSPC021 e PAF67.

Morris-Desbois e colaboradores (2001),⁽⁷⁴⁾ através de experimentos de imunoprecipitação e análises por espectrometria de massa, demonstraram a associação entre HSPC021 e Int-6. A proteína Int-6 tem sido caracterizada dentro de três diferentes abordagens. Estudos em camundongos infectados pelo vírus do tumor mamário de camundongo têm mostrado que o gene *int-6* é um sítio comum de integração do pró-vírus em lesões mamárias pré-neoplásicas e neoplásicas,⁽⁷⁵⁾ gerando a produção de transcritos mutilados e, conseqüentemente, de formas reduzidas da proteína, o que altera o controle do crescimento celular. Outro achado sobre Int-6 foi o isolamento do seu cDNA a partir de uma triagem em sistema duplo-híbrido usando como isca a proteína transformante Tax do vírus tipo 1 de leucemia de células T humanas (HTLV-1).⁽⁷⁶⁾ Por

fim, Int-6 foi caracterizada como uma subunidade do fator 3 de iniciação da tradução eucariótica (eIF3).⁽⁷⁷⁾

O fator eIF3 apresenta um papel central no estágio de iniciação da tradução por gerar e preservar a dissociação entre as subunidades ribossômicas 40 S e 60 S, por formar complexos de iniciação da tradução e recrutá-los para o mRNA e, ainda, promover a varredura do mRNA para o correto posicionamento do iniciador da tradução Met-RNAt_i^{Met}. Este complexo estabiliza várias interações proteína-proteína com outros fatores de iniciação da tradução.⁽⁷⁸⁾

Adicionalmente, Morris-Desbois e colaboradores (2001) ⁽⁷⁴⁾ investigaram a associação entre HSPC021 e eIF3. Foi constatada a co-eluição de HSPC021 com Int-6 e eIF3, sua co-imunoprecipitação com eIF3 e, finalmente, sua incorporação em eIF3 tanto em lisados de reticulócitos de coelho quanto em células COS7. Apesar da ocorrência de uma interação proteína-proteína direta entre HSPC021 e Int-6, 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. Desta forma, os resultados estabeleceram que HSPC021 está firmemente associada ao fator de iniciação da tradução em mamíferos eIF3 não sendo, entretanto, essencial para a atividade do mesmo. Provavelmente, HSPC021 apresenta um papel regulatório, o qual necessita de maiores esclarecimentos.

Ainda no ano de 2001, Seither e colaboradores ⁽⁷⁹⁾ descreveram e caracterizaram funcionalmente a proteína PAF67 como sendo associada a uma subpopulação 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 mostraram a necessidade de PAF67 para que a Pol I transcrevesse especificamente moldes de DNA. PAF67 está colocalizada com Pol I no nucléolo em sítios de transcrição ativa de DNA, indicando uma função dessa proteína para a iniciação da transcrição de DNA. Adicionalmente, os achados sugerem que a associação de PAF67 com Pol I habilita esta enzima para a montagem de um complexo produtivo de iniciação da transcrição na região promotora.

Recentemente, foi demonstrado que eIF3S6IP é modulada em células infectadas por YFV vacinal.⁽⁸⁰⁾

4.1.6. Proteína GIPC1

GIPC1, também nomeada GIPC PDZ, GIPC/TIP-2 ou GIPC1/GIPC/RGS19IP1, é membro da família de proteínas GIPC humanas (*GAIP-interacting protein, C terminus*), as quais possuem um domínio PDZ central, presente ainda em muitas outras proteínas humanas. Proteínas com domínio PDZ (*PSD-95-Discs-large-ZO1*) exercem funções relacionadas à montagem e ao agrupamento de receptores transmembrana, à organização de junções celulares, à transdução de sinal e à regulação transcricional, bem como têm um importante papel na organização de interações específicas com múltiplos pares.

Análises bio-informáticas revelaram que o gene GIPC1 está ligado ao gene receptor 1 de prostaglandina E (PTGER1) e ao gene DNAJB1 na região 19p13.2-p13.1 do cromossomo humano. Por esta razão, o gene GIPC1 pode apresentar um papel chave na carcinogênese e embriogênese através da modulação da sinalização de fatores de crescimento e adesão celular.⁽⁸¹⁾

Estudos sobre interações da proteína GIPC1 mostram como suas parceiras a proteína de ativação GTPase RGS19/RGS-GAIP (daí a sua denominação), o receptor TGF β tipo III, o receptor tirosina kinase (TrkA), a subunidade α 6A da integrina e a proteína Tax do vírus tipo 1 de leucemia de células T humanas (HTLV-1).⁽⁸²⁾

Kirikoshi e Katoh (2002)⁽⁸²⁾ investigaram a expressão do mRNA de GIPC1 humana em tecidos normais, linhagens de células cancerosas e tumores primários. Em vários tecidos normais, a expressão do mRNA de GIPC1 foi onipresente, mas seu nível na medula óssea e nos leucócitos do sangue periférico foi relativamente baixo. O mRNA de GIPC1 estava relativamente com uma elevada expressão em linhagens de células de câncer gástrico OKAJIMA, TMK1, MKN28, MKN45, MKN74, KATO-III, na linhagem AsPC-1 de câncer pancreático, linhagem celular SW480 de câncer colorretal e na linhagem A549 referente ao câncer de pulmão. Por outro lado, seus níveis estavam quase indetectáveis em linhagens celulares correspondentes à leucemia/linfoma. Devido ao fato de GIPC1 induzir um aumento na expressão do receptor TGF β tipo III na superfície celular e sensibilidade aumentada ao TGF β , a regulação negativa do mRNA de GIPC1 em tumores pode promover proliferação celular através da interferência da sinalização de TGF β .

Favre-Bonvin e colaboradores (2005)⁽⁸³⁾ demonstraram que a proteína GIPC1 interage com a proteína E6 do papilomavírus humano tipo 18 (HPV-18) e que esta interação leva à degradação de GIPC1. De fato, outras duas oncoproteínas virais – E4 do adenovírus tipo 9 e Tax do vírus tipo 1 de leucemia de células T humanas (HTLV-1) – tinham sido apresentadas como capazes de se ligar a proteínas que apresentam domínio PDZ.

Dessa forma, considerando a diversidade dos seus pares interativos, é difícil estabelecer uma função definida para a proteína GIPC1.

4.1.7. Proteína MIF

MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), ou ainda GIF, GLIF ou MMIF, foi primeiramente descrita como uma citocina inibidora da migração de macrófagos para o sítio de inflamação. Atualmente, sabe-se que é uma proteína amplamente expressa por células de resposta imune ou não e que exibe várias atividades na regulação da resposta imune e inflamatória, podendo estimular ou inibir a proliferação celular, bem como participar da regulação da apoptose, dependendo do tipo e do estado de ativação celular e do contexto fisiológico. A ativação da proliferação ou apoptose celular por MIF pode estar estritamente associada com seu efeito na ativação transcricional dependente de p53.⁽⁸⁴⁾

Estudos têm mostrado a contribuição de MIF no desenvolvimento de patogênese associada ao processo inflamatório agudo e crônico. A superexpressão de MIF tem sido descrita em vários tumores, incluindo carcinoma hepatocelular. Estudos realizados com o HBV relacionam a infecção crônica ao desenvolvimento de neoplasia hepatocelular. HBx é uma proteína transativadora transcricional codificada pelo HBV que ativa uma grande variedade de alvos celulares e viral, incluindo genes do hospedeiro para resposta inflamatória aguda e proliferação celular. É requerida para infecção viral e implicada na formação do carcinoma hepatocelular. Sabe-se que HBx e MIF podem causar, em células HepG2, diminuição da fase celular G₀/G₁, inibição da proliferação e apoptose. O efeito apoptótico de HBx pode ser dependente ou não da interação direta com outras moléculas como p53. A interação direta entre HBx e MIF pode suprimir o efeito

apoptótico de HBx, o que pode explicar a ligação entre a infecção por HBV e o carcinoma hepatocelular.⁽⁸⁵⁾

4.2. Mapeamento do domínio da interação

Uma extensão da aplicação do sistema duplo-híbrido corresponde à identificação de domínios de interação entre duas proteínas conhecidas. Se uma interação proteína-proteína é detectada, deleções podem ser feitas no DNA que codifica uma das proteínas que interagem para promover a identificação de um domínio mínimo para a interação.⁽⁴⁴⁾ 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 que ainda não está caracterizada, como também a produção de dados referentes à interação protéica, como os domínios de interação, que poderão ser empregados para o direcionamento de estudos futuros relacionados.⁽⁴⁷⁾

Desta forma, através de ensaio em duplo-híbrido, o presente estudou identificou uma região de aproximadamente 80 resíduos aminoácidos em RNA polimerase de NS5 do YFV, a qual foi denominada fragmento A, como o domínio mínimo responsável pela interação tanto com a proteína Snf5 quanto com eIF3S6IP.

A constatação da responsabilidade do fragmento A em estabelecer uma interação entre uma porção da proteína NS5 de YFV e duas proteínas humanas originou uma suspeita sobre a relevância desse fragmento para outros vírus do mesmo gênero.

Baseando-se nesta possibilidade, seqüências protéicas referentes ao fragmento A de alguns *Flavivirus*, entre eles DENV-2, DENV-3, DENV-4, Edge Hill, JEV, SLEV e YFV, foram alinhadas e analisadas. A geração desse alinhamento (figura 25) evidenciou uma homologia entre as seqüências protéicas analisadas, principalmente entre os

resíduos aminoácidos 20 e 80, demonstrando que o fragmento A comporta-se como uma região conservada entre os *Flavivirus* considerados para a avaliação.

Esta descoberta sugere que as interações proteína-proteína detectadas no presente experimento entre o domínio RNA polimerase da proteína NS5 e as proteínas Snf5 e eIF3S6IP possam não ser relevantes apenas para o YFV e sim para todos os outros *Flavivirus*. Este apontamento torna-se potencialmente mais proeminente se levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a febre amarela e para as doenças causadas por outros *Flavivirus*, rompendo a interação entre patógeno e célula hospedeira e impedindo o ciclo viral.

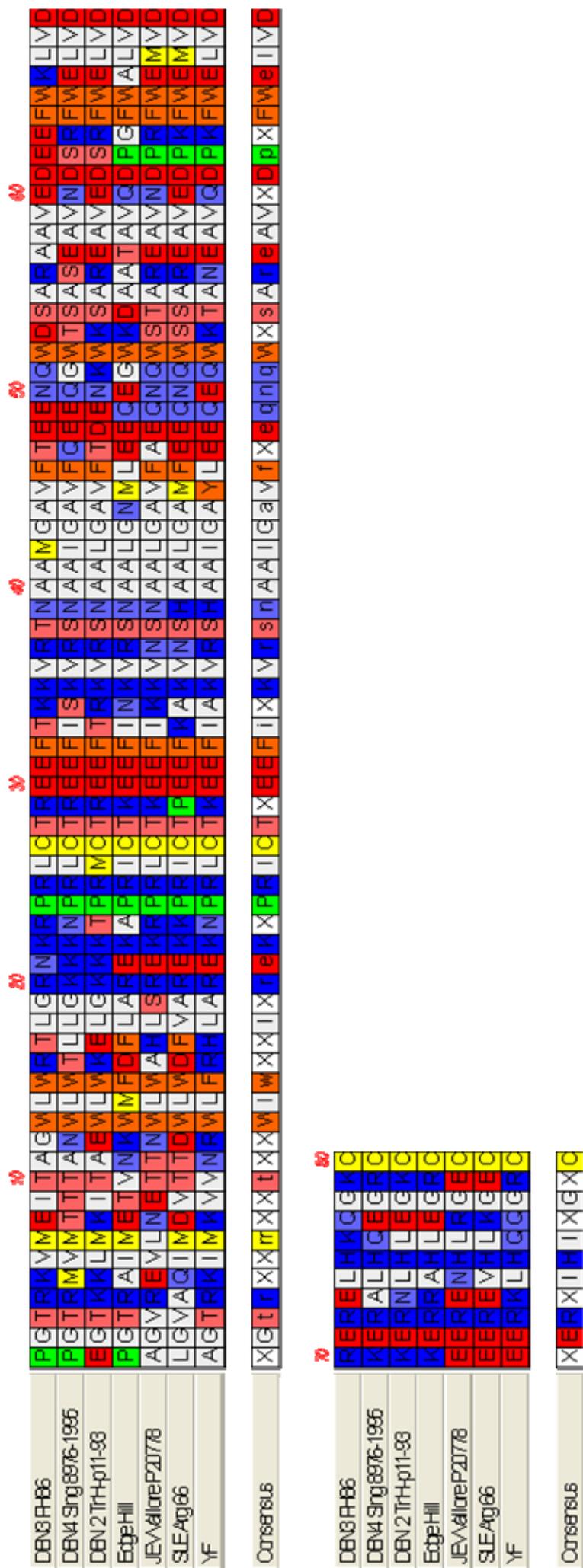


Figura 25. Cluster Alignment das sequências proteicas referentes ao fragmento A dos *Flavivirus* DENV-2, DENV-3, DENV-4, Edge Hill, JEV, SLEV e YFV, contendo aproximadamente 80 resíduos aminoácidos. A análise evidenciou uma homologia entre as sequências, principalmente entre os resíduos aminoácidos 20 e 80, demonstrando que o fragmento A se comporta como uma região conservada entre os *Flavivirus* considerados na avaliação. As sequências foram alinhadas e analisadas através do programa DS Gens 2.0 (Accelrys, USA).

Adicionalmente, a geração de um modelo de similaridade do domínio RNA polimerase da proteína NS5 de YFV pelos colaboradores Carolina Santacruz-Pérez e Dr. João A. R. G. Barbosa, do Centro de Biologia Molecular Estrutural do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - Campinas, evidenciou mais uma característica importante quanto ao fragmento A.

A figura 26 representativa deste modelo demonstra uma estrutura alfa-C em azul. A região mínima capaz de interagir com as proteínas Snf5 e eIF3S6IP, ou seja, o fragmento A, compreendido entre os resíduos aminoácidos 73 e 152, está representada pelas cores vermelha e verde. Conforme esperado, esta região de interação situa-se de forma exposta na estrutura, sendo um provável sítio para encaixe de proteínas a partir desse domínio mínimo. Entretanto, a porção verde do fragmento representa a região que não estava presente na estrutura PDB usada como modelo para esta construção devendo ser, portanto, considerada com cautela. A região vermelha mostra uma estrutura composta de quatro alfa-hélices, sendo uma amino-terminal isolada e as três restantes formam uma estrutura potencialmente única.

O modelo foi construído empregando o programa MODELLER, a partir da estrutura depositada no PDB sob código 2J7U (NS5 de DENV). A figura foi produzida pelo programa PYMOL.

Esta estrutura será subdividida no futuro para determinar a interação mínima entre a proteína NS5 e seus ligantes.

Estudos aprofundados sobre as interações proteína-proteína entre NS5 de YFV e as proteínas humanas detectadas pelo presente experimento são necessários para elucidar os mecanismos de patogênese, virulência e tropismo viral nas infecções, bem

como possibilitar a construção de drogas que inibam o ciclo replicativo do vírus e o estabelecimento da febre amarela.

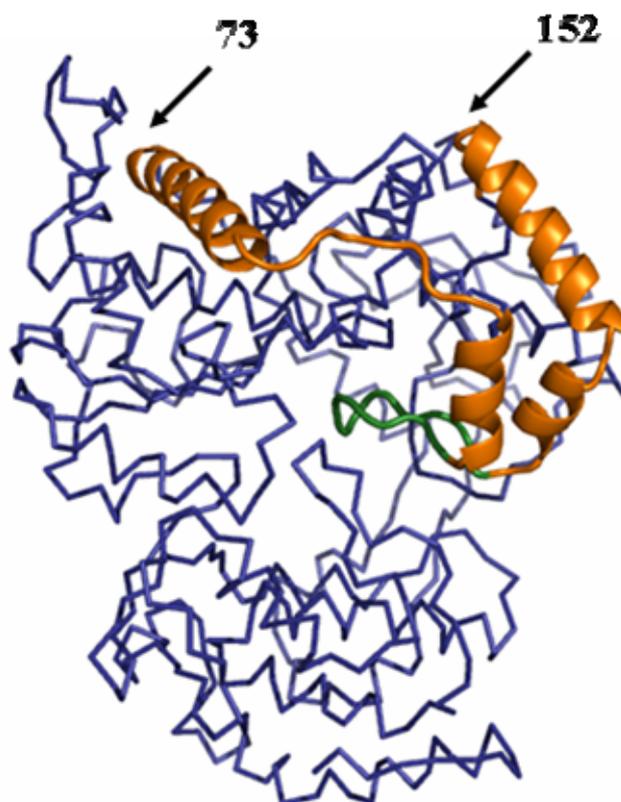


Figura 26. Modelo de similaridade do domínio RNA polimerase da proteína NS5 do YFV. O fragmento A está representando pelas cores vermelha e verde.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A construção das iscas contendo os domínios metiltransferase e RNA polimerase do gene NS5 de YFV foi efetuada com sucesso. A isca metiltransferase mostrou-se tóxica para a levedura hospedeira e foi eliminada do estudo, tendo sido a triagem em sistema duplo-híbrido contra uma biblioteca de cDNA humano realizado apenas com a isca RNA polimerase.

Foram identificadas 33 interações entre proteínas humanas e o domínio RNA polimerase do gene NS5 de YFV. No entanto, foram consideradas como de maior relevância para o presente experimento apenas sete dessas proteínas, sendo elas Snf5, p54_{NRB}, HMG20B, U1A, eIF3S6IP, GIPC1 e MIF.

A geração de iscas RNA polimerase contendo deleções possibilitou a identificação de uma região de 80 resíduos aminoácidos em NS5 de YFV, a qual foi denominada fragmento A, como sendo o domínio mínimo necessário para o estabelecimento da interação proteína-proteína com Snf5 e eIF3S6IP.

Os dados obtidos no presente estudo forneceram subsídios importantes para uma melhor compreensão da função da proteína NS5 dentro do processo de replicação dos *Flavivirus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Figueiredo LTM. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:203-210.
2. Monath TP. Yellow fever: an update. *The Lancet Infect Dis* 2001; 1:11-20.
3. 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* 2004; 9:1-8.
4. Vasconcelos PFC. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. *Rev Bras Epidemiol* 2002; 5:244-258.
5. Monath TP. Yellow fever. In: Monath TP, editor. *Arboviruses: ecology and epidemiology*. Boca Raton: CRC Press; 1988. p.139-241.
6. Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect* 2000; 2:1643-1649.
7. Franco O. História da febre amarela no Brasil. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 1976.
8. Franco O. História da febre amarela no Brasil. Departamento Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 1969.
9. 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* 1999; 353:1558-1562.
10. Vasconcelos PFC. Febre Amarela. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:275-293.
11. Bronzoni RVM, Baleotti FG, Nogueira RMR, Nunes M, Figueiredo LTM. Duplex-RT-PCR followed by nested-PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol* 2005; 43:696-702.
12. Barret AD, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol* 2007; 52:209-229.

13. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990; 44:649-688.
14. Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology* 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.991-1041.
15. Shi PY, Li W, Brinton MA. Cell proteins bind specifically to West Nile virus minus-strand 3' stem-loop RNA. *J Virol* 1996; 70:6278-6287.
16. Blackwell JL, Brinton MA. Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 39 stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *J Virol* 1997; 7:6433-6444.
17. Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese Encephalitis virus genomic RNA. *J Virol* 1997; 71:3466-3473.
18. Lee E, Stocks CE, Amberg SM, Rice CM, Lobiqs M. Mutagenesis of the signal sequence of yellow fever virus prM protein: enhancement of signalase cleavage *in vitro* is lethal for virus production. *J Virol* 2000; 74:24-32.
19. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 1996; 220:232-240.
20. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol* 1997; 71:6650-6661.

21. Muylaert IR, Galler RG, Rice CM. Genetic analysis of yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J Virol* 1997; 71:291-298.
22. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 1999; 73:4611-4621.
23. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 1998; 245:203-215.
24. Chambers TJ, Nestorowicz A, Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J Virol* 1993; 67:6797-6807.
25. Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:4713-4729.
26. Cui T, Sugrue RJ, Xu Q, Lee AK, Chan YC, Fu J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology* 1998; 246:409-417.
27. Westaway EG, Khromykh AA, Kenney MT, Mackenzie JM, Jones MK. Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus. *Virology* 1997; 234:31-41.
28. Park JS, Yang JM, Min MK. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267:581-587.

29. Dunster LM, Wang H, Ryman KD, Miller BR, Watowich SJ, Minor PD, et al. Molecular and biological changes associated with HeLa cell attenuation of wild-type yellow fever virus. *Virology* 1999; 261:309-318.
30. Xie H, Ryman KD, Campbell GA, Barrett AD. Mutation in NS5 protein attenuates mouse neurovirulence of yellow fever 17D vaccine virus. *J Gen Virol* 1998; 79:1895-1899.
31. Buckley A, Gaidamovich S, Turchinskaya A, Gould EA. Monoclonal antibodies identify the NS5 yellow fever non structural protein in the nuclei of infected cells. *J Gen Virol* 1992; 73:1125-1130.
32. Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem* 1995; 270:19100-19106.
33. Johansson M, Brooks, AJ, Jans DA, Vasudevan SG. 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* 2001; 82:735-745.
34. Uchil PD, Kumar AV, Satchidanandam V. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J Virol* 2006; 80:5451-5464.
35. Lai MMC. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology* 1998; 244:1-12.

36. Johnson CM, Perez DR, French R, Merrick WC, Donis RO. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1. *J Gen Virol* 2001; 82:2935-2943.
37. De Nova-Ocampo M, Iveda NVS, Angel RM. Translation elongation factor-1 alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology* 2002; 295:337-347.
38. Chung KM, Kim JLJE, Song OK, Cho S, Lim J, Seedorf M, et al. Nonstructural protein 5A of hepatitis C virus inhibits the function of karyopherin β 3. *J Virol* 2000; 5233-5241.
39. Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associates with P53 and regulates P21/Waf1 gene expression in a P53-dependent manner. *J Virol* 2001; 75:1401-1407.
40. Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:13038-13043.
41. Houshmand H, Bergqvist A. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309:695-701.
42. Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family *Flaviviridae* are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* 1998; 72:6199-6206.
43. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Reviews* 1995; 59:94-123.

44. Chien CT, Bartel PL, 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* 1991; 88:9578-9582.
45. Golemis EA, Adams PD, Bastiaens PIH, Einarson MB, Fisher RJ, Harpur AG, 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; 2001. p.18.1-18.54.
46. Hazbun TR, Fields S. Networking proteins in yeast. *PNAS* 2001; 98:4277-4278.
47. Legrain P, Wojcik J, Gauthier J-M. Protein-protein interaction maps: a lead towards cellular functions. *TRENDS in Gen* 2001; 17:346-352.
48. Flajolet M, Rotondo G, Daviet L, Bergametti F, Inchauspé G, Tiollais P, et al. A genomic approach of the hepatitis C virus generates a protein interaction map. *Gene* 2000. 242:369-379.
49. MacDonald PN. *Two-hybrid systems – Methods and protocols*. New Jersey: Humana Press Inc; 2001.
50. Karimova G, Ladant D, Ullmann A. Two-hybrid systems and their usage in infection biology. *Int J Med Microbiol* 2002; 17-25.
51. Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340:245-247.
52. Brent R, Ptashne M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 1985; 43:729-736.
53. Hope IA, Struhl K. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 1986; 46:885-894.

54. Keegan L, Gill G, Ptashne M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 1986; 231:699-704.
55. Domingues SF. Caracterização das interações proteicas envolvidas no tráfego celular do transportador de colina de alta afinidade – CTH1 [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
56. James P. Yeast two-hybrid vectors and strains. In: MacDonald PN, editor. Two-hybrid systems – Methods and protocols. New Jersey: Humana Press Inc; 2001. p.41-84.
57. McAlister-Henn L, Gibson N, Panisko E. Applications of the two-hybrid system. *Methods* 1999; 19:330-337.
58. James P, Haliaday J, Craig EA. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996; 144:1425-1436.
59. Serebriiskii IG, Golemis EA. Two-hybrid system and false positives: approaches to detection and elimination. In: MacDonald PN, editor. Two-hybrid systems – Methods and protocols. New Jersey: Humana Press Inc; 2001. p.123-134.
60. Badtke MP, Cao F, Tavis JE. Combining genetic and biochemical approaches to identify functional molecular contact points. *Biol Proced Online* 2006; 8:77-86.
61. Arkin M. Protein-protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. *Curr Opin Chem Biol* 2005; 9:317-324.
62. Janda M, Ahlquist P. RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* 1993; 72:961-970.
63. García-Montalvo, BM, Medina, M, Del Angel, RM. La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of dengue 4 virus RNA. *Virus Research* 2004; 102:141-150.

64. Gresh L, Bourachot B, Reimann A, Guigas B, Fiette L, Garbay S. The SWI/SNF chromatin-remodeling complex subunit SNF5 is essential for hepatocyte differentiation. *EMBO J* 2005; 24:3313-3324.
65. Lee D, Kim JW, Seo T, Hwang SG, Choi E-J, Choe J. SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem* 2002; 277:22330-22337.
66. Isakoff MS, Sansam CG, Tamayo P, Subramanian A, Evans JA, Fillmore, CM, et al. Inactivation of the Snf5 tumor suppressor stimulates cell cycle progression and cooperates with p53 loss in oncogenic transformation. *PNAS* 2005; 102:17745-17750.
67. Ariumi Y, Serhan F, Turelli P, Telenti A, Trono D. The integrase interactor I (INII) proteins facilitate Tat-mediated human immunodeficiency virus type I transcription. *Retrovirology* 2006; 3:47.
68. Shav-Tal Y, Zipori D. PSF and p54(nrb)/NonO - multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 2002; 531:109-114.
69. Emili A, Shales M, McCracken S, Xie W, Tucker PW, Kobayashi R, et al. Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *RNA* 2002; 8:1102-1111.
70. Liang S, Lutz CS. p54nrb is a component of the snRNP-free U1A (SF-A) complex that promotes pre-mRNA cleavage during polyadenylation. *RNA* 2006; 12:111-121.
71. Sumoy L, Carim L, Escarceller M, Nadal M, Gratacòs M, Pujana MA, et al. HMG20A and HMG20B map to human chromosomes 15q24 and 19p13.3 and constitute a distinct class of HMG-box genes with ubiquitous expression. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 88:62-67.

72. Wang C, McCarty IM, Balazs L, Li Y, Steiner MS. Immunohistological detection of BRAF25 in human prostate tumor and cancer specimens. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295:136-141.
73. Klein Gunnewiek JM, Hussein RI, van Aarssen Y, Palacios D, de Jong R, van Venrooij WJ, et al. Fourteen residues of the U1 snRNP-specific U1A protein are required for homodimerization, cooperative RNA binding, and inhibition of polyadenylation. *Mol Cell Biol* 2000; 20:2209-2217.
74. 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* 2001; 276:45988-45995.
75. Marchetti A, Buttitta F, Miyazaki S, Gallahan D, Smith GH, Callahan R. Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia. *J Virol* 1995; 69:1932-1938.
76. Desbois C, Rousset R, Bantiqniez F, Jalinot P. Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. *Science* 1996; 273(5277):951-3.
77. Asano K, Merrick WC, Hershey JW. 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* 1997; 272:23477-23480.
78. Merrick WC, Hershey JWB. In: Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N, editores. *Translational Control*. Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 1996. p.31-70.
79. 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* 2001; 382:1163-1170.

80. Scherer CA, Magness CL, Steiger KV, Poitingner ND, Caputo CM, Miner DG, 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* 2007; 25:6458-6473.
81. Katoh M. GIPC gene family (Review). *Int J Mol Med* 2002; 9:585-589.
82. Kirikoshi H, Katoh M. Expression of human GIPC1 in normal tissues, cancer cell lines, and primary tumors. *Int J Mol Med* 2002; 9:509-513.
83. Favre-Bonvin A, Reynaud C, Kretz-Remy C, Jalinot P. Human papillomavirus type 18 E6 protein binds the cellular PDZ protein TIP-2/GIPC, which is involved in transforming growth factor β signaling and triggers its degradation by the proteasome. *J Virol* 2005; 79:4229-4237.
84. Nguyen MT, Lue H, Kleemann R, Thiele M, Tolle G, Finkelmeier D, et al. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis 1. *J Immunol* 2003; 170:3337-3347.
85. Zhang S, Lin R, Zhou Z, Wen S, Lin L, Chen S, et al. Macrophage migration inhibitory factor interacts with HBx and inhibits its apoptotic activity. *Bio Res Commun* 2006; 342:671-679.