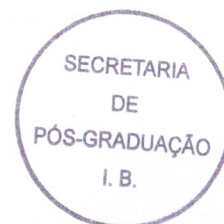


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Beatriz Santos Capela Alves

**“CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS HUMANAS MOV34 E
PACT E ANÁLISE DA SUA INTERAÇÃO COM O RNA DO
VÍRUS DA DENGUE”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Beatriz Santos Capela Alves
Nilson Ivo Tonin Zanchin
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Animal
e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

AL87c

Alves, Beatriz Santos Capela

Caracterização das proteínas humanas Mov34 e PACT e análise da sua interação com o RNA do vírus da dengue / Beatriz Santos Capela Alves. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Proteína Mov34 humana. 2. Proteína PACT humana. 3. Vírus da dengue. 4. Interação proteína-RNA. 5. Regiões 3' não traduzidas. I. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Characterization of the human Mov34 and PACT proteins and analyses of their interaction with dengue virus RNA.

Palavras-chave em inglês: Human Mov34 protein; Human PACT protein; Dengue viruses; Protein-RNA interaction; 3' untranslated regions.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética Animal e Evolução.

Banca examinadora: Nilson Ivo Tonin Zanchin, Celso Eduardo Benedetti, José Andrés Yunes, Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, Armando Morais Ventura.

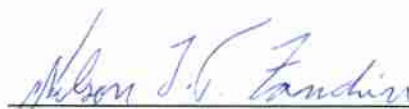
Data da defesa: 21/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 21 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin (Orientador)


Assinatura


Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


Assinatura

Prof. Dr. José Andrés Yunes


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo


Assinatura

Prof. Dr. Armando Morais Ventura


Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Assinatura

Profª. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Nilson, pela orientação, dedicação, paciência e por sempre acreditar na minha capacidade.

À minha mãe Virginia, por todo amor, carinho, compreensão, apoio e incentivo ao longo destes anos.

Ao meu pai Francisco, pelo amor, apoio e incentivo.

Ao Jorge, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e por sempre me encorajar a continuar seguindo em frente.

À toda minha família, especialmente meus avós Lucy e Celso, irmãos Carol, Chico e Jessica e ao Mario, pela torcida de sempre.

Aos meus irmãos de coração, Miriam, Jair e Tininha, pela eterna amizade e carinho e por todos os bons momentos que passamos juntos.

Às queridas amigas de lab Thais, Sandra, Pat, Ju Smetana, Flávia, Ju Oliveira pela troca de experiências, pelo ombro amigo e pelas boas risadas.

Aos colegas Dani, Tiago, Carlos, Gustavo, Priscila, Cédric, Alexandre, Daniel MT pelos anos de convívio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Tereza, Elaine e Adriana pelo muito que me ensinaram e por serem sempre prestativas.

À Givanil, Gabriela e Zildene pelo apoio técnico tão importante durante todos esses anos.

A todos os demais pesquisadores, funcionários e alunos do LNLS pela convivência.

Ao Prof. Dr. Celso Benedetti e à Prof. Dra. Carmen Ferreira pelas sugestões na banca prévia.

Aos Prof. Drs. Andrés Yunes, Luiz Tadeu Figueiredo, Armando Ventura, Michel Vincentz e Maurício Nogueira e à Prof. Dra. Silvia Gatti pela disposição em participar da avaliação deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP, pela excelente infra-estrutura, professores e funcionários.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao LNLS, pela ótima infra-estrutura para a pesquisa.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE ABREVIACÕES	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Ocorrência e características da dengue	1
1.2- Morfologia viral	2
1.3- Tradução e replicação do RNA viral	3
1.3.1- Regiões não traduzidas do genoma dos <i>Flavivirus</i>	4
1.3.2- Tradução do RNA viral	6
1.3.3- As proteínas não estruturais	7
1.3.4- Replicação viral	9
1.4- Infecção viral	12
1.4.1- Receptor celular	12
1.4.2- Fusão	13
1.4.3- Maturação viral	15
1.5- Respostas celulares à infecção	15
1.6- Interação de Proteínas Celulares com RNA de <i>Flavivirus</i>	19
2- OBJETIVOS	21
3- RESULTADOS	22
3.1- Resultados dos testes de interação entre a proteína Mov34 humana com a estrutura 3' <i>stem-loop</i> do RNA vírus da dengue	23
3.2- Artigo	41

3.3- Identificação de PACT, uma nova proteína humana capaz de interagir com a estrutura 3' <i>stem-loop</i> do RNA do vírus da dengue	50
4- DISCUSSÃO	74
4.1- A proteína Mov34 humana	74
4.1.1- Função	74
4.1.2- Estrutura	74
4.2- A proteína PACT	76
4.2.1- Ativação de PKR por PACT	81
4.2.2- Outras atividades de PACT	83
4.2.3- Ação antiviral de PACT	84
4.2.4- A importância de PKR na infecção por <i>Flavivirus</i>	85
4.2.5- Relevância da interação da PACT com a estrutura 3' <i>stem loop</i> do RNA vírus da dengue	86
5- CONCLUSÕES	87
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
7- APÊNDICE	98
8- DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA	109

LISTA DE ABREVIACOES

3-AT	3-aminotriazol
AD	domínio de ativação da transcrição
ADE	ampliação dependente de anticorpo
AdoMet	S-adenosil-L-metionina
ATF-6	fator de ativação da transcrição 6
bla	gene da betalactamase
BS	RNA transcrito a partir de pBlueScriptII KS(+) linearizado com <i>Sall</i>
BSA	albumina de soro bovino
CAT	cloranfenicol acetil transferase
cDNA	DNA complementar
cpm	contagem por minuto
Crio-EM	crio-eletromicroscopia
CYC	motivos de circularização encontrados nos terminais 5' e 3' do RNA
DC	célula dendrítica
DEN	vírus da dengue
DF	dengue clássica
DHF	dengue com febre hemorrágica
DO_{600nm}	densidade tica a 600 nm
dsDNA	DNA dupla-fita
dsRBM	motivo de ligação a RNA dupla-fita
dsRNA	RNA dupla-fita
DSS	febre hemorrágica com síndrome do choque
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
EMSA	ensaio de modificação da mobilidade eletroforética
FCS	soro fetal bovino
GAF	fator ativado por IFN- γ
GAS	seqüência ativada por IFN- γ
hnRNP	ribonucleoproteína heterogênea nuclear
HsMov34	proteína Mov34 humana
IFN	interferon
IFNAR	receptor de interferon tipo I (α/β)
IFNR	receptor de interferon
IFNγR	receptor de interferon γ

IL	interleucina
IP-10	proteína induzida por IFN 10
IPTG	isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
IRE	elemento de resposta a ferro
IRE1	enzima dependente de inositol 1
IRES	sítio de entrada interna do ribossomo
IRF	fator de regulação de interferon
IRP1	proteína reguladora de ferro 1
ISG	gene induzido por interferon
ISGF3	fator de indução de genes por IFN
ISRE	elemento de resposta estimulado por IFN
JEV	vírus da encefalite japonesa
kb	kilo base
kDa	kilo Daltons
KUN	vírus Kunjin
lacZ	gene que codifica a enzima β -galactosidase
LB	meio de cultura de bactérias Luria-Bertani
MIP-1a	proteína inflamatória de macrófago 1a
MTase	metiltransferase
NF-κB	fator nuclear κ B
NO	óxido nítrico
NS	proteína não estrutural
nt	nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	janela aberta de leitura
PBM	domínio de ligação a PACT
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
PERK	proteína similar à PKR residente no retículo endoplasmático
PI3K	fosfatidil inositol 3-quinase
PKR	proteína quinase ativada por RNA de fita-dupla
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
Proteína C	proteína do capsídeo
Proteína E	proteína do envelope
Proteína M	proteína da membrana

R	fração de proteínas retidas na resina de cromatografia
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RIG-I	RNA helicase, <i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RNAi	interferência de RNA
RT	temperatura ambiente
RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S	coeficiente de sedimentação
SD	meio mínimo sintético de levedura
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de duodecil-sulfato de sódio
sE	domínio solúvel da proteína E
SIGN	<i>specific ICAM3 grabbing nonintegrin</i>
SL	<i>stem-loop</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TBE	vírus da encefalite do carrapato
TNF-α	fator alfa de necrose tumoral alfa
TL	tampão de ligação
TRBP	proteína ligadora do RNA TAR do vírus da imunodeficiência humana tipo 1
U	unidades de enzima
UAR	<i>upstream AUG region</i>
UB	fração de proteínas não retidas na resina de cromatografia
UPR	resposta de proteína desenovelada
UTR	região não traduzida do RNA
UV	ultravioleta
VR	região variável
VSV	vírus da estomatite vesicular
W	fração da lavagem da resina de cromatografia
WNV	vírus do oeste do Nilo
XBP1	proteína ligante de X-Box
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
Y3H	ensaio de triplo-híbrido de levedura
YFV	vírus da febre amarela

RESUMO

O combate à dengue atualmente está limitado praticamente aos esforços de eliminação do mosquito transmissor, o *Aedes aegypti*, porém esta estratégia não tem se mostrado eficiente. O desenvolvimento de novos instrumentos de combate à dengue requer, portanto, maior conhecimento sobre a biologia do vírus com relação à sua interação com seus hospedeiros. O genoma do vírus é constituído por um RNA simples-fita de polaridade positiva e possui duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR). A região 5'UTR viral possui organização similar à dos mRNAs eucarióticos, diferentemente da região 3'UTR que é longa e não possui cauda de poli(A). Em vez disso, na região 3'UTR encontram-se estruturas conservadas entre os diferentes *Flavivirus*, dentre elas a estrutura 3' *stem-loop* (3'SL) que é indispensável para a replicação do RNA viral. O objetivo do nosso estudo foi identificar novas proteínas humanas capazes de interagir com a estrutura 3'SL do RNA do vírus da dengue. Dados da literatura descrevem que a proteína Mov34 de camundongo interage com 3'SL do vírus da encefalite japonesa. Devido à alta similaridade entre as proteínas ortólogas humana e de camundongo, bem como das respectivas estruturas 3'SL dos vírus da dengue e da encefalite japonesa, foi testada a interação entre a Mov34 humana com o 3'SL do vírus da dengue. Porém, em nenhuma das condições testadas foi possível obter evidência de interação da Mov34 humana com 3'SL dos vírus da dengue e da encefalite japonesa. Para a identificação de novas proteínas que são capazes de interagir com a estrutura 3'SL do RNA do vírus da dengue foi utilizado o ensaio de triplo-híbrido de levedura. A proteína humana PACT, conhecida como proteína celular ativadora de PKR, foi isolada neste ensaio utilizando 3'SL como isca. PKR é uma quinase ativada por PACT ou RNA dupla-fita. A ativação de PKR leva a um estado antiviral adquirido pela fosforilação do fator de iniciação da tradução eIF2 α e conseqüente inibição da tradução. Além disso, PKR está envolvida em outras vias de transdução de sinal e na resposta celular à proteínas desenoveladas. A ação antiviral de PACT é evidenciada pela ação de proteínas dos vírus influenza A e herpes simplex tipo 1 que inibem a ativação de PKR por PACT e por RNA dupla-fita. A interação direta de PACT com 3'SL do RNA do vírus da dengue foi confirmada por ensaio de UV-*crosslinking*. PACT possui três domínios de interação com RNA dupla-fita, sendo que os dois domínios N-terminais são responsáveis pela sua interação com o 3'SL. Foi identificada uma região específica do 3'SL, o *stem-loop* superior, onde PACT interage com maior afinidade. Além disso, foi mostrado que PACT endógena de células HEK293 é capaz de interagir com o 3'SL biotilado. Para caracterizar a função desta interação durante a infecção viral, foi desenvolvida uma linhagem celular com inibição da expressão de PACT através da técnica de RNA de interferência. Com esta linhagem poderemos analisar a importância da interação entre PACT e o RNA do vírus da dengue quanto à ativação e/ou inibição de PKR durante a infecção viral.

ABSTRACT

The combat to the dengue virus is basically limited to the efforts in eliminating the transmitter mosquito, the *Aedes aegypti*. But this strategy is not very efficient. The development of new instruments of combat to dengue virus requires improved knowledge about the virus biology and its relation to hosts. The dengue virus genome is a single-stranded RNA of positive polarity flanked by a 5' untranslated region (UTR) of ~100 bases and a highly structured 3' UTR of ~450 bases. As many other viruses, dengue encodes the enzymes required for its genome replication, but relies completely on the host translational machinery to synthesize its proteins. The essential difference between host cellular mRNAs and dengue virus genome RNA involves the 3'UTR, which instead of a polyadenylate tail contains highly conserved structural elements, including the 3' stem-loop (3'SL), located at the 3' terminus of the 3'UTR of many flaviviruses that is essential for their replication. The aim of this study is to identify new human proteins capable of interacting with dengue virus RNA 3'SL structure. Literature data describe that the murine Mov34 protein interacts with Japanese encephalitis virus 3'SL. Giving the high similarity between the human and murine ortholog proteins, as well as the conservation of the Flavivirus RNA 3'SL structure, we tested the interaction between the human Mov34 and the dengue virus 3'SL. However, no interaction was detected under the conditions used in this work. In addition, the yeast three-hybrid system was used to screen for novel proteins that interact with the dengue virus 3'SL. Human PACT, known as the cellular protein activator of PKR, was identified as a putative 3'SL-interacting protein. PKR is an interferon-inducible, PACT or double-stranded RNA activated protein kinase. Activated PKR phosphorylates the translation initiation factor eIF2 α , inhibiting translation of cellular and viral RNAs, leading to a cellular antiviral state. PACT and double-stranded RNA activation of PKR is inhibited by influenza A and herpes simplex type 1 virus proteins during viral infection, indicating that PACT plays a role in the cellular antiviral state. Direct interaction between PACT and 3'SL was confirmed by UV-crosslinking assays. PACT contains three double-stranded RNA interaction motifs, but only the two N-terminal motifs are responsible for 3'SL interaction. A 3'SL specific region, the top stem-loop, was identified to interact with PACT with higher affinity. Furthermore, HEK293 cells endogenous PACT interacts with biotin-labeled 3'SL. To further characterize PACT-3'SL interaction during dengue virus infection, a cell line with low expression of PACT was developed using the RNA interference technique. This cell line will be used to determine the propagation rate of dengue virus which is expected to reveal the importance of PACT either for the cell antiviral state or for dengue virus proliferation.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Ocorrência e características da dengue

O vírus da dengue é a causa mais comum de doenças arbovirais isto é, que são transmitidas por artrópodes, no mundo. Encontrado através dos trópicos, causa entre 50-100 milhões de casos de doenças por ano, incluindo 250.000-500.000 casos de dengue hemorrágica – uma manifestação severa da dengue – e 24.000 mortes. Em 2007 foram reportados cerca de 930.000 casos de dengue clássica, 26.000 casos de dengue hemorrágica e 317 mortes nas Américas, sendo que destes, 560.000 casos de dengue clássica, 1.500 casos de dengue hemorrágica e 158 mortes somente no Brasil (Organização Mundial da Saúde (OMS), www.who.int/tdr/index.html, Gubler 1998, Gibbons e Vaughn 2002). Mais de dois quintos da população mundial (2,5 bilhões) moram em áreas de risco de dengue. A dengue hemorrágica já foi documentada em mais de 60 países e o vírus da dengue é endêmico em mais de 100 países, incluindo o sudeste da Ásia, Américas Central e do Sul, Caribe e regiões do Pacífico Sul. No Brasil, concomitante com a campanha de erradicação do mosquito *Aedes aegypti* houve o desaparecimento das epidemias de dengue entre 1923 e 1981 quando a doença foi registrada novamente em Boa Vista, Roraima. A partir de 1986 iniciaram-se epidemias frequentes nas regiões sudeste, nordeste e centro-oeste (Figueiredo 2000). Desde então se tem registrado epidemias anualmente, sendo que a situação se agrava gradualmente com o número de casos atingindo em 2002 aproximadamente 800.000 (OMS).

O vírus da dengue (DEN) pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, juntamente com outros importantes representantes deste gênero, como o vírus da febre amarela (YFV), da encefalite japonesa (JEV), da encefalite do carrapato (TBE), dentre outros. O gênero *Flavivirus* inclui um total de aproximadamente 70 espécies transmitidas por mosquitos, carrapatos e algumas outras sem vetor conhecido (Lindenbach *et al.* 2007). São conhecidos quatro sorotipos do vírus da dengue, denominados tipo 1 (DEN1), 2 (DEN2), 3 (DEN3) e 4 (DEN4). Dentre os *Flavivirus* encontrados no Brasil temos: Bussuquara (BUS), Cacipacoré (CPC), DEN1, DEN2 e DEN3, Iguape (IGU), Ilhéus (ILH), Rocio (ROC), encefalite de São Luís (SLE) e YFV, incluindo o vírus selvagem e a linhagem atenuada vacinal 17DD (Figueiredo 2000).

As características clínicas da dengue variam com a idade do paciente. Além de infecções clinicamente indetectáveis, a doença pode ser classificada em: doença febril não específica, dengue clássica (DF), febre hemorrágica (DHF), febre hemorrágica com síndrome do choque (DSS) e outras síndromes não usuais como encefalopatia e falência fulminante do fígado (Isturiz *et al.* 2000). Os

sintomas mais comuns de DF são febre súbita acompanhada de dor de cabeça, dor atrás dos olhos, mialgias e artralgias generalizadas. O paciente também pode apresentar náusea, manchas vermelhas, alteração no paladar e sangramento de pequena abrangência. No caso de DHF esse sangramento é mais grave, acompanhado de trombocitopenia e aumento da permeabilidade vascular (OMS).

O antígeno da dengue foi encontrado em uma variedade de tecidos, mais predominantemente no fígado e sistema reticuloendotelial de pacientes infectados. Acredita-se que a replicação do vírus aconteça primariamente nos macrófagos e células dendríticas da pele. Como na febre amarela, o foco central de necrose é o fígado em pacientes que morreram de dengue (Gibbons e Vaughn 2002).

Todos os quatro sorotipos da dengue foram associados com a febre hemorrágica. Variações de linhagens virais podem influenciar a severidade da doença. Infecções secundárias são mais propensas a resultar em doença severa e febre hemorrágica (Vaughn *et al.* 2000). Isso é explicado pela teoria de ampliação dependente de anticorpo (ADE) (Sullivan 2001), onde anticorpos de reação cruzada, mas não neutralizantes, de uma infecção anterior se ligam ao novo sorotipo infectante e facilitam a entrada do vírus na célula, resultando em um maior pico de título viral. Títulos mais elevados podem resultar em uma amplificada cascata de citocinas e ativação de complemento, causando disfunção endotelial, destruição de plaquetas e consumo de fatores de coagulação, que resulta no extravasamento de plasma e manifestações hemorrágicas.

1.2- Morfologia viral

Micrografias eletrônicas mostram que o vírus da dengue maduro possui uma superfície relativamente lisa, com diâmetro de aproximadamente 500 Å e um núcleo eletrondenso cercado por uma bicamada lipídica. Este núcleo é composto pelo genoma de RNA envolto por dímeros da proteína do capsídeo (C, 100 aminoácidos). O núcleo é envolto por uma membrana lipídica que é coberta por dímeros de glicoproteína transmembranar do envelope (E, 495 aminoácidos) associado à proteína de membrana (M, 38 aminoácidos). 90 dímeros de E formam uma rede oligomérica icosaédrica densa na superfície viral que cobre completamente a membrana lipídica (Kuhn *et al.* 2002).

O genoma viral de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 kb possui na extremidade 5' uma estrutura *cap* tipo 1 ($^{7Me}G5'$ -ppp5'A $^{2'OMe}$), mas não possui uma cauda de poliadenina na extremidade 3' (Wengler e Wengler 1981). Ele funciona como único RNA mensageiro viral e possui uma única seqüência codificadora (*open reading frame* - ORF) de aproximadamente 10 kb (Figura 1.1). Uma grande poliproteína é traduzida desta ORF, que é subsequente processada em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e

NS5) (Chambers *et al.* 1990). A poliproteína é clivada pela protease viral NS2B/NS3 nas junções entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K e NS4B/NS5. A peptidase sinal do hospedeiro é responsável pela clivagem nas junções entre C/prM, prM/E, E/NS1 e 2K/NS4B. A enzima responsável pela clivagem de NS1A ainda não é conhecida (Lindenbach *et al.* 2007). A região codificadora é flanqueada por regiões 5' e 3' não traduzidas (5' e 3' UTR). Essas regiões possuem 96 e 451 bases, respectivamente, no vírus DEN2, incluindo motivos variáveis e conservados e estruturas secundárias.

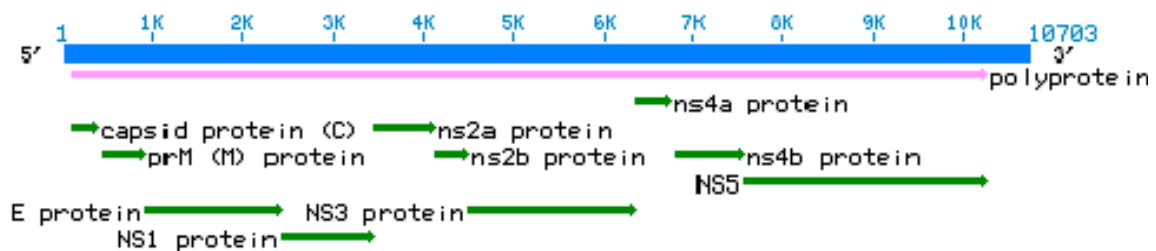


Figura 1.1: Organização geral do genoma do vírus da dengue. A linha azul corresponde ao genoma completo de RNA. A seta em rosa corresponde à poliproteína que este RNA codifica. As setas em verde correspondem às proteínas que são formadas após a clivagem desta poliproteína. O desenho está em escala e a localização de cada seta corresponde à sua localização no genoma. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

1.3- Tradução e replicação do RNA viral

Após a fusão da membrana do vírus com a membrana do endossomo, o nucleocapsídeo, e conseqüentemente o RNA, são liberados no citoplasma. Logo após a sua liberação no citoplasma o RNA viral é traduzido, produzindo as proteínas virais estruturais e não estruturais. O RNA é então replicado por complexos formados pelas proteínas virais não estruturais e proteínas do hospedeiro. Novas partículas virais são montadas com as proteínas estruturais e moléculas de RNA e as partículas maduras são então finalmente liberadas das células (Lindenbach *et al.* 2007). A seguir, estão descritas a tradução e a replicação do RNA viral após a sua entrada na célula do hospedeiro e os componentes virais importantes para cada uma destas etapas.

1.3.1- Regiões não traduzidas do genoma dos *Flavivirus*

Nos RNAs de *Flavivirus*, seqüências conservadas (CS1, CS2 e RCS2) na 3'UTR, estruturas *stem-loop* (SL) e motivos de circularização nas regiões 3' e 5' terminais (5'CYC e 3'CYC) foram identificadas por análise de seqüência e predição de estrutura secundária (Hahn *et al.* 1987) (Figura 1.2). Há uma marcante uniformidade entre os CYC dos vírus provenientes de mosquitos. O 5'CYC sempre começa entre os nucleotídeos 37 a 40 após o códon de iniciação da tradução. O 3'CYC sempre começa 99 a 112 nucleotídeos antes do 3' terminal (Khromykh *et al.* 2001).

A circularização de moléculas individuais de RNA do vírus da dengue através de interação RNA-RNA na ausência de proteínas foi demonstrada utilizando microscopia de força atômica (Alvarez *et al.* 2005a). Este trabalho evidencia que as regiões previamente descritas como sendo as possíveis seqüências de circularização (5' e 3' CYC) são essenciais, porém não suficientes, para a interação entre RNAs. Foi descrito um novo elemento de 16 nucleotídeos presentes no 5' e 3' UTR (5' e 3' UAR, *upstream AUG region*) (Figura 1.2) como sendo determinante para a associação RNA-RNA. Este trabalho sugere ainda que a complementaridade entre as extremidades do genoma é essencial para a viabilidade viral.

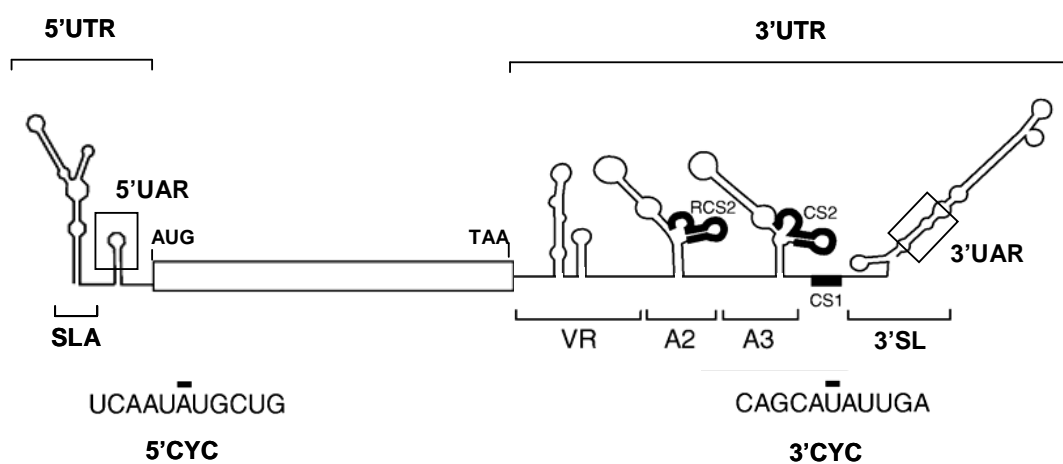


Figura 1.2: Representação esquemática do genoma do vírus da dengue mostrando as estruturas secundárias preditas nas regiões 5' e 3' não traduzidas. Os códons de iniciação (AUG) e terminação (TAA) da tradução estão indicados. As estruturas SLA (*stem-loop A*), VR (variável), A2 (que contém a região RCS2), A3 (que contém a região CS2), CS1 (que contém a seqüência 3'CYC) e 3'SL estão destacadas. As regiões complementares 5'-3'CYC e 5'-3'UAR também estão indicadas. O desenho não está em escala e foi adaptado de Alvarez *et al.* (2005b).

As estruturas secundárias conservadas foram identificadas por programas de computador que predizem estrutura secundária de RNA. Romero *et al.* (2006) avaliaram a congruência entre as predições da estrutura secundária do 3'UTR do RNA de DEN4 pelo programa Mfold (Zuker 2003) com mapas de nucleases desta região. Setenta por cento das clivagens enzimáticas no mapa de nucleases corresponderam à estrutura predita por Mfold. A principal diferença foi observada em regiões preditas por Olsthoorn e Bol (2001) que contribuiriam para a formação de pseudo-nós. O mapa de nucleases indica que estas regiões são clivadas por nucleases que reconhecem fita dupla e o programa Mfold, que não é capaz de prever pseudo-nós, indica que estas regiões são de fita simples.

Vários artigos publicados utilizaram o sistema de *replicon* para estudar a função de estruturas conservadas presentes nas regiões UTR do genoma viral. O *replicon* consiste no RNA viral cuja região que traduz as proteínas estruturais foi removida e no local desta foi inserido um gene repórter. As proteínas não estruturais são mantidas no *replicon*. Desta forma este é capaz de se replicar, mas não de formar novas partículas virais. Com este sistema é possível diferenciar a tradução da replicação do RNA utilizando cultura de células. Utilizado um *replicon* de vírus do oeste do Nilo (WNV) foi demonstrado que a complementaridade de bases do CYC, independentemente da sua seqüência, é importante para a replicação, mas não para a tradução, do RNA viral (Lo *et al.* 2003). O mesmo *replicon* foi utilizado para mostrar que o *loop* de 5 nucleotídeos presente no topo do 3'SL de WNV é importante para a síntese de RNA e que a seqüência das posições 2, 3 e 5, mas não da 4, do mesmo são absolutamente necessárias para a replicação do RNA viral, mas não para a sua tradução (Tilgner *et al.* 2005). Deste modo esta região poderia ser um elemento *in cis* de ligação de componentes (proteínas virais ou do hospedeiro) da replicase para a montagem do complexo de iniciação para a síntese do RNA de polaridade negativa. Além disso, foi demonstrado que a deleção de certos elementos conservados de estrutura secundária (CS2, CS1 e o 3'UTR completo) aumenta a eficiência de tradução deste *replicon* de WNV. No contexto de um *replicon* de DEN2, foi demonstrada a necessidade das regiões variável (VR) imediatamente a 3' do códon de terminação, A2 (que contém a seqüência conservada RCS2), A3 (que contém a seqüência conservada CS2), 3'SL e complementaridade de bases entre 5' e 3' CYC para a replicação, mas não para a tradução do RNA viral (Alvarez *et al.* 2005b), corroborando os dados apresentados por Tilgner *et al.* (2005). Curiosamente, a região VR mostrou-se dispensável para a replicação viral em células de mosquito C6/36 e indispensável em células de mamífero BHK.

1.3.2- Tradução do RNA viral

Após a fusão da membrana do vírus com a membrana do endossomo, o nucleocapsídeo, e conseqüentemente o RNA, são liberados no citoplasma. O RNA viral deve ser traduzido em diferentes condições ao longo do ciclo viral. Após a infecção, a tradução do RNA viral introduzido depende de elementos de ação *in cis* do RNA e da maquinaria de tradução do hospedeiro. Após alguns ciclos de tradução e de síntese de RNA, novas moléculas de RNA devem ser traduzidas na presença de proteínas virais em uma célula hospedeira modificada por produtos virais. Neste último cenário, uma complexa interação entre fatores virais e do hospedeiro irá influenciar a tradução do RNA viral.

O primeiro AUG da proteína do capsídeo está em um contexto pobre para seu reconhecimento pelo ribossomo, uma vez que o este AUG não está inserido na seqüência consenso de Kozak (G/ANNAUGG), ideal para a tradução de RNAs mensageiros em células eucarióticas. Porém, a tradução da poliproteína viral ocorre preferencialmente no primeiro AUG da seqüência (Clyde e Harris 2006). Foi identificada uma estrutura secundária filogeneticamente conservada denominada cHP (*capsid hairpin* – estrutura em grampo de cabelo) logo após o primeiro AUG. Esta estrutura dirige a seleção do códon de iniciação da tradução de um modo dependente de sua posição e independente da sua seqüência. Este modelo é consistente com o mecanismo em que a maquinaria de tradução fica parada enquanto a estrutura em grampo de cabelo é desfeita pela RNA helicase, fazendo com que o ribossomo fique mais tempo em contato com o códon de iniciação que se encontra em um contexto pobre para seu reconhecimento pelo ribossomo.

DEN utiliza uma estratégia ainda não identificada de iniciação da tradução quando a tradução dependente da estrutura *cap* está inibida (Edgil *et al.* 2006). Utilizando um RNA repórter flanqueado pelas regiões 5' e 3' UTR foi mostrado que, na ausência de um *cap* funcional ou em condições de inibição da tradução dependente de *cap*, a tradução do RNA depende da presença das regiões 5' e 3' UTR de DEN na mesma molécula. Este dado sugere a necessidade de circularização do RNA provavelmente via interação com proteínas do hospedeiro. Além disso, essa capacidade de tradução do RNA não está relacionada à presença de um elemento IRES na região 5' UTR. Os resultados sugerem um modelo em que a interação entre 5' e 3' UTR permite que o vírus seja traduzido por via canônica dependente de *cap* ou não-canônica, alternativa, em resposta às condições celulares.

Hahn *et al.* (1987) sugerem que a circularização do RNA genômico durante ou imediatamente depois da formação do complexo de replicação pode permitir aos ribossomos completar a tradução do RNA genômico, mas impedir a sua reassociação ao terminal 5' para reiniciação da tradução. Isto evitaria a colisão entre o ribossomo migrando no sentido 5'-3' e o complexo de replicação no sentido

3'-5'. Edgil *et al.* (2006) propõem um modelo de remodelagem da arquitetura de porções do RNA viral para a troca entre tradução e replicação. Na tradução haveria a formação de uma ponte de RNA-proteína entre 5' e 3' UTR, enquanto que na replicação a ponte seria formada por interações RNA-RNA entre CYC e UAR (*upstream AUG region*) nos extremos terminais do genoma viral. Neste modelo a troca entre tradução e replicação da mesma molécula de RNA é presumivelmente mediada por fatores virais e/ou celulares que facilitariam a comunicação entre os UTR virais.

1.3.3- As proteínas não estruturais

Todas as proteínas não estruturais de *Flavivirus* já foram implicadas na replicação do RNA viral (Mackenzie *et al.* 1996, 1998). Porém, funções específicas individuais estão sendo atualmente identificadas para estas proteínas.

NS1 é uma glicoproteína de 48 kDa sintetizada como um monômero solúvel que rapidamente dimeriza após modificações pós-traducionais no lúmen do retículo endoplasmático, com subsequente transporte para a superfície celular e liberação para o meio extracelular (Winkler *et al.* 1989). NS1 se liga à superfície de células não infectadas via interação com as glicosaminoglicanas (GAG) heparan-sulfato (HS) e condroitina-sulfato E, sendo que a sulfatação de GAG é uma modificação celular crítica para esta ligação (Avirutnan *et al.* 2007). Além disso, NS1 solúvel se liga preferencialmente em certos subtipos celulares, incluindo células endoteliais humanas de microvasos. Estes dados sugerem que o extravasamento vascular órgão específico que ocorre em infecções severas com DEN pode estar relacionada à relativa habilidade de células endoteliais em diferentes tecidos de se ligar à NS1 solúvel e com isso ser alvo de anticorpo anti-NS1 durante uma infecção secundária (Avirutnan *et al.* 2007).

NS2A é uma proteína hidrofóbica transmembranar de 22 kDa. A mutação I59N da proteína NS2A do vírus Kunjin (KUN) resulta em bloqueio seletivo da montagem ou secreção viral, que pode ser complementada com proteína NS2A selvagem expressa *in trans*. Isso demonstra que o RNA que possui a mutação pode ser empacotado em *virions* pelas proteínas estruturais produzidas *in cis* a partir da mesma molécula de RNA, implicando que a seqüência de RNA na vizinhança da mutação no NS2A não faz parte do sinal de empacotamento do RNA (Liu *et al.* 2003). Foram recuperados vírus revertentes onde mutações no NS2A recuperaram I59 original, ou vírus pseudo-revertentes onde N59 foi substituído por outro resíduo mais hidrofóbico que I, ou ainda vírus que mantiveram a mutação I59N e apresentaram mutação compensatória T149P (Leung *et al.* 2008). Análises de microscopia de células infectadas com o vírus com a mutação NS2A-I59N mostraram uma ausência de membranas induzidas pela infecção viral e a mutação compensatória T149P restaurou a indução de estruturas

membranares em níveis similares à infecção com vírus selvagem. Os resultados confirmam o papel de NS2A na montagem viral e a importância de resíduo hidrofóbico no códon 59 neste processo implica o envolvimento de NS2A na biogênese de membranas induzidas pelo vírus e sugere um papel vital destas membranas na montagem viral.

NS3 é uma proteína multifuncional, possuindo atividade de serino-protease no N-terminal, de RNA helicase/5'-trifosfatase e NTPase no C-terminal (Gorbalenya *et al.* 1989). A atividade de RNA helicase da NS3 é necessária para o desenovelamento de intermediários replicativos de fita dupla (Chambers *et al.* 1990). A estrutura cristalográfica do domínio serino-protease de NS3 de DEN foi descrita por Murthy *et al.* (1999), do domínio helicase/NTPase de JEV por Yamashita *et al.* (2008) e a estrutura da proteína com os dois domínios protease-helicase de DEN foi descrita por Luo *et al.* (2008). A atividade serino-protease de NS3 é dependente da dimerização com o cofator NS2B. Esta não somente estabiliza as duas estruturas em forma de barril de folhas beta encontradas no N e C-terminal do domínio serino-protease de NS3, como também completa o sítio de ligação ao substrato com a sua região C-terminal (Erbel *et al.* 2006). Liu *et al.* (2002) mostraram que deleções na região codificadora de NS3 de KUN não poderiam ser complementadas pela produção *in trans* da proteína, resultando em um defeito no empacotamento do RNA, sugerindo um papel *in cis* do produto gênico de NS3 na montagem viral. A tradução *in cis* de NS3, e não sinais presentes na seqüência do RNA neste gene, é essencial para o empacotamento do RNA (Pijlman *et al.* 2006), mas o exato papel desta proteína não estrutural na montagem viral ainda não foi elucidado.

NS4A e NS4B são proteínas transmembranares de 16 e 27 kDa respectivamente (Miller *et al.* 2006, 2007). NS4A foi identificada como a proteína chave responsável pela indução de estruturas membranares que parecem visualmente similares a membranas convolutas e conjuntos paracristalinos presentes nos estágios terminais da infecção viral (Roosendaal *et al.* 2006, Miller *et al.* 2007). Esta formação de estruturas membranares mostrou uma necessidade estrita da clivagem do domínio citoplasmático de NS4A no sítio 4A-2K pela protease NS2B/NS3 antes da clivagem entre 2K-NS4B pela peptidase sinal celular, sendo assim liberados NS4A e NS4B maduros. O domínio 2K serve de sinal para a translocação de NS4B para o retículo endoplasmático e a sua clivagem já foi demonstrada no vírus da febre amarela (YV) e DEN (Lin *et al.* 1993, Preugschat e Strauss 1991). NS4B interage com o domínio helicase de NS3 *in vitro* e *in vivo* e colocalizam na região perinuclear (Umareddy *et al.* 2006). NS4B dissocia NS3 de RNA de fita simples e aumenta a sua atividade de desenovelar RNA de dupla-fita em fita simples em ensaios *in vitro*.

NS5 é a maior das proteínas de *Flavivirus* e possui domínios de RNA polimerase dependente de

RNA (RdRp) (O'Reilly e Kao 1998, Poch *et al.* 1989) e um domínio de RNA-metiltransferase (Rozanov *et al.* 1992), cuja estrutura tri-dimensional foi descrita por Egloff *et al.* (2002). O domínio N-terminal de 33 kDa de NS5 de DEN (NS5MTaseDV) está envolvido em dois dos quatro passos necessários para a formação do $cap^{7Me}G5'-ppp5'A^{2'OMe}$ no RNA viral, a metilação da guanina-N7 e da adenosina-2'O. Sua atividade 2'O-metiltransferase (MTase) dependente de S-adenosil-L-metionina (AdoMet) foi demonstrada por Egloff *et al.* (2007). Ambas as atividades de metiltransferase dependem de um único sítio de ligação a AdoMet e mutações neste sítio é capaz de reduzir em mais de 90% a atividade de metiltransferase *in vitro* (Kroschewski *et al.* 2008). Vírus que contém mutações com redução severa da atividade MTase não são viáveis e a atividade N7-MTase, e não 2'O-MTase, parece ser essencial para a replicação viral. Vírus com mutações na enzima MTase com 25% da atividade de N7-MTase são capazes de se replicar em níveis iguais ao do vírus selvagem, indicando que níveis reduzidos de atividade MTase são suficientes para a replicação viral *in vivo* (Kroschewski *et al.* 2008). Entretanto, vírus com mutações E192A/K193A/E195A no domínio MTase que não afetam a sua atividade não são viáveis. Estas mutações estão expostas na superfície da hélice αE , fora do domínio catalítico. A recuperação de vírus com as mutações E192A/K193A/E195A e mutação adicional A70G no domínio protease NS3 sugere que a hélice αE de MTase, que inclui os resíduos 187 a 202, interage com o domínio protease de NS3 (Kroschewski *et al.* 2008). Algumas das proteínas não estruturais apresentam atividade nas respostas imunológicas à infecção viral, o que será discutido em outro tópico.

1.3.4- Replicação viral

Três espécies de RNA foram detectadas em células infectadas por *Flavivirus*: um RNA genômico de 40-44S; uma forma replicativa dupla-fita resistente a RNase de 20-22S; e uma forma replicativa intermediária de 20-28S, parcialmente resistente a RNase (Chu e Westaway 1985). Khromykh *et al.* (2003) mostram que os dois nucleotídeos 3' terminais CU, que são conservados no gênero *Flavivirus*, têm um papel crítico na replicação de RNA de KUN. Praticamente todas as proteínas não estruturais (NS) estão envolvidas no complexo de replicação de *Flavivirus*. NS3 e NS5 existem como um complexo em células infectadas por DEN, podendo ser os componentes não somente da replicase viral, mas também do complexo enzimático envolvido na produção do $cap 5'$.

As evidências indicam que as replicases virais são complexos ligados à membrana formados por proteínas virais e celulares, além do RNA viral (Chu e Westaway 1992, Lai 1998). Foi demonstrado que NS3 e NS5 do vírus da encefalite japonesa (JEV) se ligam cooperativamente ao *stem-loop* (SL) 3' terminal, indicando que esta ligação pode facilitar o processo de síntese da fita de RNA de polaridade

negativa (Chen *et al.* 1997a). You e Padmanabhan (1999) demonstraram que a síntese *in vitro* de RNA “*self-primed*” ocorre por elongação da terminação 3’ autêntica do molde de RNA, produzindo predominantemente RNA de fita dupla em estrutura de grampo de cabelo, com uma região de alça limitada de fita simples. Curiosamente, a síntese de RNA requer ambas regiões terminais 5’ e 3’ contendo os motivos de circularização (CYC), ou conectados na mesma molécula ou com a região 5’ terminal adicionada *in trans* à região 3’ terminal. Uma estrutura de *stem-loop* na região 5’UTR denominada SLA é responsável pelo reconhecimento do RNA viral pela RdRp (Filomatori *et al.* 2006). O domínio NS5pol recombinante é capaz de interagir com um complexo de RNA-RNA formado entre as regiões 5’ e 3’ UTR do genoma viral, sugerindo que NS5pol é capaz de reconhecer SLA em um contexto de genoma viral circular devido à interação entre 5’ e 3’ UTR. Um novo modelo de síntese de RNA de polaridade negativa de DEN foi proposto, onde a polimerase viral reconhece o 5’ terminal do RNA, e através de uma interação RNA-RNA de longo alcance o promotor 5’ e o 3’ terminal do genoma são unidos para facilitar a síntese do RNA (Figura 1.3). A predição da estrutura secundária da interação de 5’-3’ UTR do RNA de DEN mostra que a metade inferior do 3’SL altamente conservado se abre enquanto que a metade superior é mantida. Logo, a interação de 5’-3’ UAR (*upstream AUG region*) pode ter um papel na modulação da estrutura do 3’SL durante a iniciação da síntese de RNA. Neste caso, além de trazer o 3’ terminal do RNA próximo ao promotor 5’, a interação de longo alcance pode fazer com que os nucleotídeos 3’ terminais fiquem disponíveis para a RdRp (Filomatori *et al.* 2006).

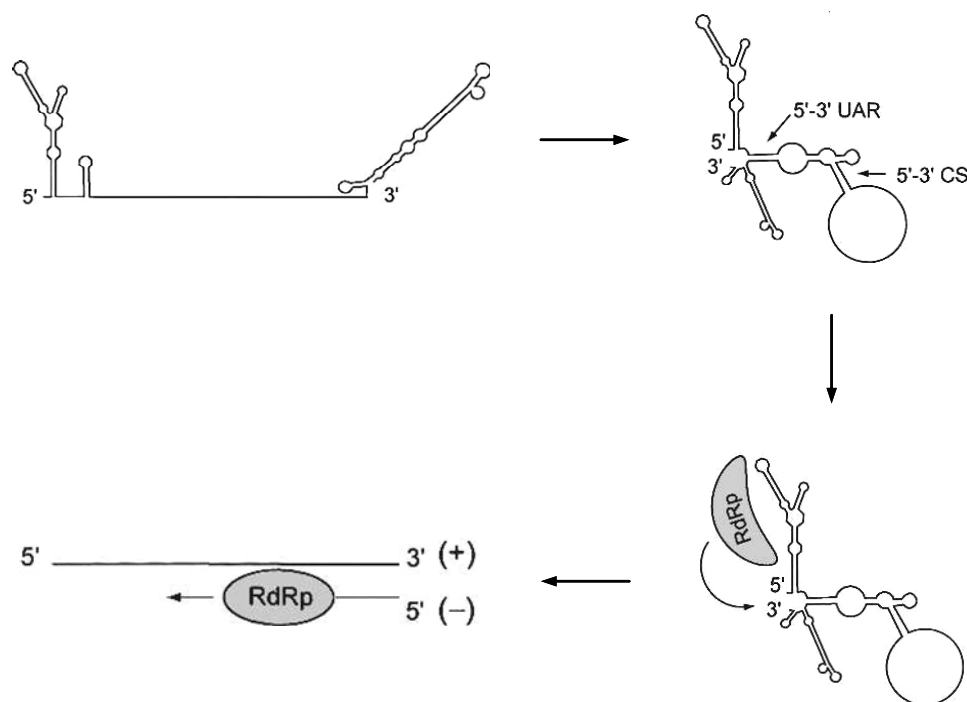


Figura 1.3: Modelo de síntese da fita de polaridade negativa do vírus da dengue. O genoma viral é circularizado na ausência de proteínas pela hibridização de 5'-3'UAR e 5'-3'CYC. A RdRp viral se liga ao SLA presente no 5'UTR e, por interações RNA-RNA entre os extremos terminais do genoma, a polimerase é transferida para o sítio da iniciação da replicação no terminal 3' do genoma. Figura adaptada de Filomatori *et al.* (2006).

Uma característica dos vírus de RNA de polaridade positiva é a habilidade de induzir rearranjos na membrana citoplasmática que aparentemente facilita a replicação eficiente do RNA (Lindenbach *et al.* 2007). Na maioria dos casos, estas estruturas membranares compartilham características em comum, como pequenas vesículas de 70 a 100 nm que contém estruturas em forma de fibras (dependendo do protocolo de fixação) ou vesículas com dupla membrana que circunda o RNA viral replicante. *Flavivirus* parecem ser os únicos a apresentar pelo menos duas ou três estruturas características dentre as membranas convolutas, conjuntos paracrystalinos ou pacotes de vesículas/estruturas de membranas lisas (Ng 1987). Análises estruturais detalhadas usando KUN revelaram que cada estrutura membranar pode ser imuno-marcada com anticorpos distintos contra proteínas específicas virais ou do hospedeiro, sugerindo que cada estrutura membranar desempenha uma função precisa durante a replicação (Mackenzie *et al.* 1998, 1999, 2005). Estas membranas, quando isoladas por centrifugação, contém RNA viral, proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS3, NS4A e NS5 e virtualmente toda a atividade de RdRp. A associação destas proteínas não estruturais com as membranas foi confirmada por microscopia de imunofluorescência ou imunocrioelétrica (Mackenzie *et al.* 1998, Westaway *et al.*

1997). A expressão de NS3 em cultura de células induz a formação de estruturas similares às membranas convolutas na região perinuclear (Chua *et al.* 2004). Além disso, NS3 interage com a proteína ligante do receptor nuclear (NRBP), uma proteína do hospedeiro que influencia o tráfego entre o retículo endoplasmático e o Golgi.

1.4- Infecção viral

1.4.1- Receptor celular

Os receptores celulares já identificados para o vírus da dengue são: heparan-sulfato em células Vero e CHO (Chen *et al.* 1997b), CD14 em monócitos e macrófagos (Chen *et al.* 1999), GRP78 (Jindadamrongwech *et al.* 2004) e proteína 37/67-kDa receptora de laminina em células hepáticas (Thepparit *et al.* 2004) e HSP70 e 90 em neuroblastomas e células U937 (Reyes-del Valle *et al.* 2005).

As células dendríticas residentes na derme são os principais alvos de infecção após a injeção de vírus pela picada do mosquito (Wu *et al.* 2000, Lozach *et al.* 2005). DC-SIGN (*dendritic cell specific ICAM3 grabbing nonintegrin*) é um receptor importante para a infecção viral, mas sua função endocítica não é necessária para a internalização de DEN nas células (Lozach *et al.* 2005). O homólogo de SIGN no fígado e linfonodos (L-SIGN) também mostrou atividade como receptor de DEN (Tassaneetrithep *et al.* 2003). Lozach *et al.* (2005) propõem que DC-SIGN concentra as partículas virais na superfície celular para permitir a interação eficiente entre o vírus e um receptor ainda não identificado que seria o responsável pela internalização viral e a fusão dependente de pH. A estrutura obtida por crio-EM da ligação de DEN2 com o domínio CRD (domínio de ligação a carboidrato) de DC-SIGN mostra que CRD monomérica se liga à glicanas N-ligadas na Asn 67 de cada 2 proteínas E vizinhas (Pokidysheva *et al.* 2006). Esta ligação deixa amplo espaço na superfície viral para a ligação ao receptor primário, o qual ainda não foi identificado. A proteína E de DEN 1 e 3 é glicosilada nas posições Asn67 e Asn153, enquanto que em DEN2 e 4 esta proteína é glicosilada somente na Asn67 (Johnson *et al.* 1994). Os vírus com proteína E mais glicosiladas se mostraram mais eficientes em infectar as células através de DC-SIGN (Navarro-Sanchez *et al.* 2003). O polimorfismo DC-SIGN1-336 do promotor de CD209 (gene que codifica DC-SIGN) tem forte associação com o risco de a pessoa infectada apresentar dengue clássica (Sakuntabhai *et al.* 2005). O alelo G de DC-SIGN1-336 afeta um sítio de ligação ao fator de transcrição Sp1 e testes *in vitro* mostram que a atividade transcricional de um fragmento contendo esta seqüência também é afetada, o que dá suporte à hipótese de que este variante tem papel funcional. Os autores propõem que o alelo G de DC-SIGN1-336 está associado à

proteção dominante contra DF, mas não influencia a ocorrência de dengue hemorrágica.

A proteína GRP78 interage com a cadeia pesada de imunoglobulinas. Curiosamente, o domínio III da proteína E de DEN possui estrutura similar às imunoglobulinas. Esta similaridade pode ser particularmente significativa na interação da proteína E com GRP78 (Jindadamrongwech *et al.* 2004). Apesar da proteína E ser altamente conservada entre os quatro sorotipos virais, o domínio III mostra grande variação na seqüência de aminoácidos. Tal variação pode levar à especificidade de reconhecimento de sorotipos identificada pela proteína 37/67-kDa receptora de laminina que foi capaz de induzir a entrada de DEN1, mas não dos outros sorotipos, em células hepáticas (Thepparit *et al.* 2004).

Outra forma de internalização viral é através de sua ligação a anticorpos de reação cruzada, mas não neutralizantes, produzidos em uma infecção anterior com um sorotipo diferente. O vírus se liga a este anticorpo, o complexo é reconhecido por receptores da porção Fc de anticorpos na superfície dos monócitos/macrófagos e fagocitado (Morens 1994). Foi postulado que esta via de infecção é responsável por um maior número de células infectadas e pelo aumento no pico de título viral. Este fenômeno é denominado ampliação dependente de anticorpo (ADE) (Sullivan 2001). Foi verificado que a infecção via ADE *in vitro* aumenta o título da progênie viral (Klimstra *et al.* 2005, Rulli *et al.* 2005, Chareonsirisuthigul *et al.* 2007). Por outro lado, altos níveis de DC-SIGN inibem a infecção via ADE (Goncalvez *et al.* 2007, Pierson *et al.* 2007, Boonnak *et al.* 2008).

1.4.2- Fusão

A glicoproteína E de *Flavivirus* pertence à classe II de proteínas de fusão estruturalmente conservadas que também são encontradas em alfavírus (Lescar *et al.* 2001). A proteína E de *Flavivirus* maduros formam homodímeros anti-paralelos (Modis *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2003a). Cada monômero possui três domínios distintos, denominados domínio I – o domínio N-terminal, estruturalmente central, o domínio II – o domínio de dimerização, e o domínio III – o domínio C-terminal similar à imunoglobulina. Este último domínio se estende perpendicularmente à superfície viral com uma ponta proeminente em relação ao restante da proteína E. Estudos demonstram que domínio III recombinante e anticorpos que reconhecem este domínio são capazes de inibir a entrada de *Flavivirus* nas células alvo (Hung *et al.* 2004, Chu *et al.* 2005, Chin *et al.* 2007). Além disso, *Flavivirus* com mutações no domínio III da proteína E mostram virulência atenuada ou habilidade de escapar à neutralização imune (Mandl *et al.* 2000, Ni *et al.* 2000), o que corrobora a sua função como o domínio de reconhecimento e ligação ao receptor.

A alça interna que contém o peptídeo de fusão, localizada na ponta do domínio II, está enterrada na interface do dímero no vírus maduro (Figura 1.4, A). A dissociação do dímero de E em monômeros, com concomitante exposição do peptídeo de fusão para permitir a sua interação com as membranas alvo (Figura 1.4, B), ocorre por quebras de contatos intra e interdiméricos na superfície viral (Allison *et al.* 2001). Em condições fisiológicas, esse processo é ativado pela acidez dos endossomos durante a endocitose mediada por receptores e é rapidamente seguido pela formação de trímero de E (Allison *et al.* 1995, Modis *et al.* 2004) (Figura 1.4, C). Na forma pré-fusão, os três domínios da porção solúvel da proteína E (sE) ficam alinhados em forma de bastão, dispostos tangencialmente em relação à membrana. A conformação trimérica fusogênica expõe a membrana viral para a fusão de membranas (Kuhn *et al.* 2002). A estrutura de sE trimérica pós-fusão mostra que o domínio III é deslocado de sua localização original se posicionando ao lado do domínio I com o seu C-terminal apontando na direção do peptídeo de fusão (Figura 1.4, F). Esse movimento resulta na formação de uma estrutura de grampo de cabelo, sugerindo que na forma inteira de E pós-fusão, os segmentos transmembranar e os peptídeos de fusão estão justapostos na membrana fusionada, o que geraria um movimento de alavanca que uniria as membranas do vírus e do endossomo (Modis *et al.* 2004).

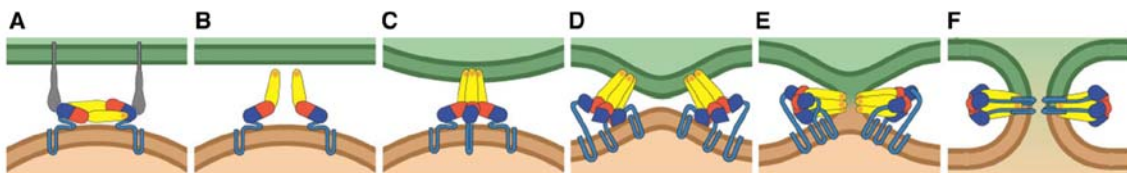


Figura 1.4: Mecanismo proposto para a fusão mediada pelas proteínas de fusão da classe II. A proteína E está representada com domínio I em vermelho, domínio II em amarelo e domínio III em azul. A região transmembranar está representada em azul claro e o peptídeo de fusão por um asterisco vermelho. **A**, O dímero de E se liga ao receptor na superfície da célula (em cinza) através do domínio III. **B**, pH reduzido no endossomo causa dissociação do dímero de E em monômeros, com concomitante exposição do peptídeo de fusão. **C**, Ocorre a formação de trímero de E, disposto tangencialmente em relação à membrana, com associação do peptídeo de fusão à membrana. **D**, interações triméricas deformam as membranas, procedendo à hemifusão intermediária em **E**. **F**, Fusão completa, peptídeo de fusão e região transmembranar justapostos na membrana fusionada. Figura adaptada de Modis *et al.* (2004).

1.4.3- Maturação viral

A replicação viral é iniciada após o desnudamento do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (Lindenbach *et al.* 2007). Após a tradução das proteínas virais e a replicação do RNA, *virions* imaturos são gerados por brotamento de nucleocapsídeos recém montados para dentro do lúmen do retículo endoplasmático. Durante este processo as partículas virais obtêm seu envelope bilipídico com o complexo de heterodímero de proteína prM-E. Em seguida as partículas amadurecem ao passar pelo Golgi e pela rede trans-Golgi. Nesta rede, prM é clivada pela proteinase furina em reação dependente de pH ácido, resultando na formação de partículas maduras contendo proteínas M e dímeros de proteína E. Finalmente, as progênies de partículas virais são liberadas da célula por exocitose (Lindenbach *et al.* 2007). Partículas virais imaturas contém 60 espículas proeminentes, cada uma consistindo em um trímero de heterodímeros de prM-E (Zhang *et al.* 2003b). Estas partículas imaturas podem ser clivadas em pH ácido por furina *in vitro*. A partícula imatura sofre rearranjo conformacional reversível em pH ácido, adquirindo uma superfície muito mais lisa e um diâmetro menor (530 Å) que a partícula imatura em pH neutro, que contém espículas e diâmetro de 600 Å (Yu *et al.* 2008). Após clivagem da proteína prM em pr e M pela furina na rede trans-Golgi, o produto proteolítico pr é mantido em associação com o homodímero de E em pH ácido, impedindo a sua mudança conformacional para trímero e a conseqüente fusão de membranas entre o vírus recém formado e a membrana do Golgi. Após a liberação do vírus no meio extracelular, há o conseqüente aumento do pH e pr é liberado da partícula viral madura (Yu *et al.* 2008).

1.5- Respostas celulares à infecção

A proteína E do vírus da dengue interage com a proteína CLEC5A presente na superfície de macrófagos (Chen *et al.* 2008). Porém, esta interação não resulta em internalização viral e sim em secreção de citocinas pró-inflamatórias [TNF- α , IL-6, IL-8, proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1 α e proteína induzida por interferon (IP)-10]. O tratamento de camundongos STAT1^{-/-} com anticorpo anti-CLEC5A inibiu o escape de plasma assim como hemorragias subcutâneas e em órgãos vitais, além de reduzir em 50% a mortalidade causada pela infecção por DEN. Camundongos deficientes em CXCR3 e IP-10 apresentaram mortalidade aumentada após infecção por DEN em relação aos camundongos selvagens (Hsieh *et al.* 2006), indicando um papel destas proteínas no controle da infecção primária por DEN. Infecções de hepatoma HepG2 e célula dendrítica por DEN2 induziram a produção de IL-8, RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β , enquanto que somente IL-8 e RANTES foram produzidos em células de rim HEK293 após infecção por DEN2. Além disso, a expressão de NS5

sozinha foi capaz de induzir a expressão e secreção de IL-8 em HEK293 (Medin *et al.* 2005).

A indução da expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e conseqüente produção de óxido nítrico foi observada tanto em pacientes com dengue clássica quanto *in vitro*. Além disso, a expressão de antígenos virais *in vitro* apresentou relação inversa com a expressão de iNOS (Neves-Souza *et al.* 2005). Células infectadas com DEN2 tratadas com NO apresentaram inibição da replicação do RNA viral, e ensaios *in vitro* mostraram que a atividade de NS5pol recombinante é inibida por NO (Takhampunya *et al.* 2006).

A infecção de camundongos por DEN via ADE medeia a supressão/diminuição da produção e/ou da ativação intracelular de mediadores antivirais, como TNF- α , IL-12 e IFN- γ , fatores de transcrição STAT1 e IRF-1, enzima óxido nítrico sintase 2 e conseqüente redução da produção de radicais de óxido nítrico. A produção de TNF- α devida à infecção viral via ADE é reduzida em relação à infecção via receptor natural nos dois primeiros dias de infecção, sendo que a produção se iguala após este período nas duas vias de infecção (Chareonsirisuthigul *et al.* 2007). Além disso, há o aumento da produção de IL-6 e IL-10 (Mahalingam e Lidbury 2002, Chareonsirisuthigul *et al.* 2007). TNF- α , IL-6 e IL-10 podem estar envolvidos em algumas respostas biológicas que são características de DHF/DSS. Por exemplo, TNF- α pode participar no aumento do hematócrito enquanto IL-6 e IL-10 podem mediar danos no fígado e no sistema de coagulação, respectivamente (Nguyen *et al.* 2004).

Camundongos possuem um gene de resistência a *Flavivirus* (Flv^r) que apresenta hereditariedade dominante autossômica. Os camundongos resistentes podem ser infectados por *Flavivirus*, mas os títulos virais em seus tecidos são de 1.000 a 10.000 vezes menores que os apresentados por animais susceptíveis (Shellam *et al.* 1998). O gene responsável pela resistência codifica a proteína OAS1b (Perelygin *et al.* 2002). Várias proteínas da família 2'-5' oligoadenilato sintetases sintetizam 2'-5' oligoadenilato ao serem ativadas por RNA dupla-fita. O 2'-5' oligoadenilato ativa a RNase L que desta forma degrada RNAs simples-fita tanto virais quanto celulares (Samuel 2001). Apesar de OAS1b fazer parte da família das OAS, esta não produz 2'-5' oligoadenilato (Scherbik *et al.* 2007). O gene de resistência codifica a proteína OAS1b inteira, enquanto que o gene de susceptibilidade produz uma proteína truncada no C-terminal. Camundongos susceptíveis transgênicos expressando a proteína OAS1b selvagem (OAS1b^f) tornaram-se resistentes à infecção por *Flavivirus* (Scherbik *et al.* 2007). Scherbik *et al.* (2006) verificaram que camundongos OAS1b^{+/+} RNase L^{-/-} ainda apresentavam resistência a *Flavivirus*. Logo, o mecanismo pelo qual OAS1b^f confere resistência à doença induzida por *Flavivirus* é independente de RNase L e ainda desconhecido.

Interferon (IFN) - α e - β são secretados por células infectadas com vírus e exibem múltiplas

propriedades biológicas incluindo efeitos antiproliferativos, antivirais e imunomodulatórios. IFN- γ é secretado por linfócitos T ativados e células NK e tem atividade antiviral direta, através da indução de moléculas efetoras (óxido nítrico) e indiretas, através do aumento da apresentação de antígeno e da indução da apoptose. Pré-tratamento de células em cultura com IFN- α e - β inibiu a infecção dependente ou independente de anticorpo por DEN2. Porém, o tratamento com IFN- α e - β poucas horas pós-infecção perde este efeito inibitório (Diamond *et al.* 2000). O pré-tratamento inibe a tradução do RNA viral que ocorre antes da replicação do RNA, em uma etapa após a iniciação da tradução (Diamond e Harris 2001). Esta inibição parece ser independente de proteína quinase ativada por RNA dupla-fita (PKR) e de RNase L, já que células deficientes nestes genes quando infectadas por DEN mantiveram a inibição da infecção por IFN (Diamond e Harris 2001). Estudos *in vivo*, utilizando camundongos sem vários componentes do sistema imunológico, mostraram que receptores de IFN- α/β (IFNAR) e IFN- γ (IFN γ R) têm funções críticas e não sobrepostas em eliminar a infecção primária por DEN (Shresta *et al.* 2004). A ação mediada por IFNAR limita a replicação inicial de DEN em sítios extraneurais e controla o subsequente espalhamento viral no sistema nervoso central (CNS). Já a resposta mediada por IFN γ R parece agir nos estágios tardios da doença ao restringir a replicação viral na periferia e ao eliminar o vírus do CNS.

Vários estudos tentaram identificar os mediadores da inibição da infecção por IFN. A ligação de IFN no seu receptor ativa a fosforilação de diversas proteínas, incluindo receptores, membros da família JAK de tirosina quinases e subunidades de fatores de transcrição chamados de STAT (*signal transducers and activators of transcription*). As STATs se associam formando homo e heterodímeros. Estes dímeros, com ou sem cofatores adicionais, migram para o núcleo, onde ativam a transcrição de genes responsivos a IFN (ISG - *interferon stimulated genes*). IFN- α/β induzem a formação do fator de transcrição ISGF3 (*IFN stimulated gene factor 3*), uma oligoproteína formada por STAT1, STAT2 e p48. ISGF3 se liga ao ISRE (*IFN stimulated response element*) dos promotores dos ISGs no núcleo e ativa a sua transcrição. IFN- γ ativa a fosforilação somente de STAT1 que homodimeriza e forma o GAF (*gamma-activated factor*). Este se liga ao GAS (*gamma-activated sequence*) nos promotores dos genes ativados por INF- γ , ativando a transcrição destes (Brierley e Fish 2005).

Utilizando camundongos STAT1^{-/-}, foi mostrado que o controle da infecção primária por DEN dependente de IFNR envolve mecanismos dependentes e independentes de STAT1 (Shresta *et al.* 2005). A via de STAT1 é necessária na eliminação da carga viral inicial, enquanto que a via independente de STAT1 controla a carga viral tardia e previne a doença em camundongos. Outra via ativada pela infecção viral identificada foi a de PI3K/Akt. Akt é fosforilada de forma transiente por

fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) nos estágios iniciais da infecção por JEV e DEN2 (Lee *et al.* 2005). A via de PI3K/Akt ativada por *Flavivirus* parece ter um papel antiapoptótico nas fases iniciais da infecção. Estudos com camundongos PKR^{-/-} e RNase L^{-/-} mostraram que estes são mais susceptíveis à infecção por WNV que os camundongos selvagens (Samuel *et al.* 2006). PKR e RNase L contribuem para a proteção mediada por IFN em cultura de células primárias de forma restrita a certos tipos celulares como macrófagos e neurônios corticais. Este fato poderia explicar os dados de que células de fibroblastos deficientes em PKR e RNase L ainda apresentavam proteção contra a infecção com pré-tratamento por IFN (Diamond e Harris 2001). A indução da expressão de IFN em células infectadas por *Flavivirus* é mediada por IRF-3 dependente de RIG-I, por NF-κB dependente de PI3K (Chang *et al.* 2006) e por PKR (Gilfoy e Mason 2007).

Apesar de DEN ser sensível ao pré-tratamento com IFN, o tratamento pós-infecção não é capaz de inibir a replicação viral. Alguns estudos identificaram as vias de inibição da sinalização de IFN por *Flavivirus*. A expressão de NS2A, NS4A e NS4B de DEN em cultura de células aumentou a replicação do vírus da doença de *Newcastle*, um vírus sensível a IFN (Muñoz-Jordán *et al.* 2003). Além disso, a expressão de NS4B, e em menor grau de NS2A e NS4A, diminuiu a expressão de genes induzidos por IFN-β. Células expressando NS4B ou infectadas por DEN não exibiram STAT1 nuclear após tratamento com IFN-β ou -γ, indicando que NS4B pode estar envolvida no bloqueio da sinalização de IFN durante a infecção por DEN. Jones *et al.* (2005) mostraram que células contendo um *replicon* com as proteínas NS de DEN2 pré-tratadas com IFN-α se tornaram resistentes aos efeitos antivirais deste IFN, já que o vírus da encefalomiocardite, sensível a IFN-α, foi capaz de se replicar após o pré-tratamento destas células com IFN-α. O *replicon* ou a infecção por DEN2 diminuiu os níveis de STAT2 total, um componente da sinalização de IFN-α, mas não de IFN-γ. STAT2 recruta STAT1 para a fosforilação (Leung *et al.* 1995), o que explicaria os dados de Muñoz-Jordán *et al.* (2003) no tratamento com IFN-β. Porém, estes observaram que a infecção por DEN2 também reduziu os níveis de STAT1 nuclear após tratamento com IFN-γ. As discrepâncias podem ser devidas às diferenças nas linhagens celulares utilizadas, uma vez que Jones *et al.* (2005) usaram linhagens mielóides humanas e Muñoz-Jordán *et al.* (2003) utilizaram linhagem de rim de macaco.

A resposta à proteína desenovelada (UPR - *unfolded protein response*) é uma mudança coordenada na expressão gênica que é ativada por perturbações nas funções do retículo endoplasmático. Em células de mamíferos a UPR é mediada por três proteínas transmembranares que agem como sensores: a proteína quinase PERK, similar à PKR, residente no retículo endoplasmático, o fator de ativação da transcrição 6 (ATF-6) e a enzima dependente de inositol 1 (IRE1). PERK ativada

fosforila eIF2 α , o que resulta na atenuação da tradução. Este fato é acompanhado pela ativação da transcrição de uma alça de retro-alimentação, que inclui o aumento de CHOP e GADD34. A associação desta última com a fosfatase PP1 leva à desfosforilação de eIF2 α . IRE1 ativada cliva um *intron* não convencional de 26 nucleotídeos do mRNA da proteína ligante de X-Box (XBP1), o que muda a sua pauta de leitura e leva à tradução de um fator de transcrição (sXBP1) que ativa a transcrição de uma série de genes que estão envolvidos na degradação protéica. Em paralelo, a acumulação de proteínas não enoveladas no retículo endoplasmático causa a saída de ATF-6 do seu compartimento, migrando para o complexo de Golgi onde é clivado por proteases S1P e S2P. O fragmento citossólico de ATF-6 é o fator de ativação da transcrição responsável pela indução da transcrição de XBP1 assim como de genes que codificam chaperonina do retículo endoplasmático. Infecção de células por JEV e DEN ativa a via de XBP1 da UPR, induzindo a expressão dos genes controlados por este fator de transcrição (Yu *et al.* 2006). NS2B-NS3 de DEN parece ser um potente indutor da via de XBP1. A redução dos níveis de XBP1 não afeta a susceptibilidade celular ao vírus, mas exacerba o efeito citopático induzido pelos *Flavivirus*. Além da indução da via de XBP1, DEN também induz as vias de PERK e ATF-6 de ativação da UPR (Umareddy *et al.* 2007). Estes trabalhos sugerem que os *Flavivirus* ativam UPR e se beneficiam da resposta celular para aliviar a citotoxicidade induzida pelos vírus.

1.6- Interação de Proteínas Celulares com RNA de *Flavivirus*

Uma grande questão quanto à transcrição e tradução do RNA dos *Flavivirus* é em relação a quais proteínas celulares têm papel nestes processos. Abaixo são mostrados alguns estudos que identificaram proteínas do hospedeiro que são capazes de se ligar ao RNA dos *Flavivirus*.

O fator de alongação da tradução 1A (eEF1A), o auto-antígeno La de mamíferos e a proteína ligadora de trato de polipirimidina (PTB) da linhagem celular C6/36 de mosquito interagem com 3'UTR de DEN4 (De Nova-Ocampo *et al.* 2002). Essas proteínas parecem possuir papéis essenciais na tradução e replicação virais. O autoantígeno La é uma proteína nuclear envolvida na terminação da transcrição pela RNA polimerase III. Essa proteína também está envolvida no transporte de proteínas do núcleo para o citoplasma, sendo deslocada do núcleo para o citoplasma em células infectadas por poliovírus (Meerovitch *et al.* 1993). La também interage com as proteínas NS3 e NS5 de DEN4 (García-Montalvo *et al.* 2004). Recentemente, foi demonstrado que La de C6/36, endógena ou recombinante, é capaz de se ligar a 3'UTR da fita positiva ou da fita negativa de DEN4 (Yocupicio-Monroy *et al.* 2007). La é deslocada do núcleo para o citoplasma quando a célula é infectada pelo vírus e co-localiza com a proteína viral NS3 em algumas regiões do citoplasma, sugerindo que esta proteína

pode ter um papel durante a replicação viral. Os autores sugerem um papel de La na regulação da tradução e replicação da mesma molécula de RNA já que ensaios de replicação *in vitro* demonstraram que La inibe a síntese da fita positiva ou negativa do RNA. PTB possui papel importante na replicação de HCV (Chang e Luo 2006) e na tradução do RNA do vírus da encefalomiocardite (Kim e Jang 1999). Porém, ainda não foi identificada ação desta proteína na biologia de DEN. eEF1A também interage com o 3'SL de WNV (Blackwell e Brinton 1997). Foi visto que eEF1A aumenta a síntese da fita negativa de WNV e co-immunoprecipita com o complexo de replicação viral (Davis *et al.* 2007), sugerindo que esta proteína facilita a interação entre o terminal 3' do genoma com o complexo de replicação.

As proteínas hnRNP Q (ribonucleoproteína heterogênea nuclear Q), hnRNP A1, hnRNP A2/B e YB-1 (*Y box binding protein 1*) também interagem com 3'UTR do RNA de DEN2 (Paranjape e Harris 2007). YB-1 é um domínio protéico relacionado ao choque por frio, que está envolvido em diversas funções celulares como regulação da transcrição, tradução e estabilidade de mRNA (Kohno *et al.* 2003). YB-1 parece ter um papel antiviral, já que células YB-1^{-/-} produziram mais partículas virais que células selvagens, além de traduzir o RNA viral mais eficientemente.

Ta e Vratil (2000) descreveram a interação entre Mov34 de murinos e a região 3'UTR de JEV. Essa proteína pertence a uma família cujos membros estão envolvidos no controle da iniciação da tradução e na transcrição. Por exemplo, as subunidades do fator de iniciação da tradução eIF3, p47 e p40, que são membros da família da Mov34, compartilham identidade significativa de aminoácidos na região N-terminal com a Mov34 de murinos, sendo no caso da p47 identidade total de aminoácidos de 27% e similaridade de 48%. Além disso, há evidências mostrando o envolvimento de homólogos da proteína Mov34 na regulação da transcrição, tradução e degradação de proteínas de eucariotos.

2- OBJETIVOS

O presente trabalho teve o objetivo principal de identificar e caracterizar funcional e estruturalmente novas proteínas humanas capazes de interagir com a região 3' não traduzida do RNA do vírus da dengue. Para o seu desenvolvimento, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- 1- Investigar a interação da proteína Mov34 humana com a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue.
- 2- Caracterizar estruturalmente a proteína Mov34 humana.
- 3- Identificar novas proteínas humanas capazes de interagir com a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue utilizando o sistema de triplo-híbrido de leveduras.
- 4- Caracterizar funcionalmente as novas interações proteína-3' *stem-loop* identificadas.

3- RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados em três capítulos. O primeiro deles apresenta os resultados dos ensaios de interação entre a proteína Mov34 humana e a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue. O segundo capítulo consiste em um artigo já publicado contendo análises estruturais da proteína Mov34 humana. O terceiro e último capítulo corresponde a um manuscrito reunindo os dados acerca da identificação e caracterização da proteína PACT humana, uma nova proteína humana capaz de interagir com a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue.

3.1- Resultados dos testes de interação entre a proteína Mov34 humana com a estrutura 3' *stem-loop* do RNA vírus da dengue

Ensaio de interação entre a proteína Mov34 humana e a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue

Beatriz S. C. Alves e Nilson I. T. Zanchin

Ensaio da interação entre a proteína Mov34 humana e a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue

Beatriz S. C. Alves e Nilson I. T. Zanchin

Centro de Biologia Molecular Estrutural – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Campinas, SP

Resumo

A proteína Mov34 é um dos componentes não ATPásicos da subunidade regulatória de 19S do proteossomo de 26S e possui função molecular não determinada. Dentre as evidências experimentais que indicam o envolvimento de homólogos da proteína Mov34 na regulação da transcrição, tradução e degradação de proteínas de eucariotos, há um trabalho que propõe que a Mov34 de camundongos interage com a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da encefalite japonesa. Esta estrutura secundária presente no genoma dos *Flavivirus* é extremamente conservada entre os vírus desta família, sendo indispensável para a replicação viral. Devido à alta similaridade entre as ortólogas humana e de camundongo, foi testada no presente trabalho a interação entre a Mov34 humana e a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue. Para tanto, foram realizados ensaios de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) e de UV-*crosslinking* em várias condições de tampões, aditivos, sondas e quantidade de proteína. Porém, em nenhuma das condições testadas foi possível obter a evidência de interação de Mov34 humana com a estrutura 3' *stem-loop* do RNA dos vírus da dengue e da encefalite japonesa.

Introdução

Em células eucarióticas, as proteínas intracelulares ubiquitinadas são digeridas pelo complexo de 26S proteassomo. Esse complexo é formado pela associação dependente de ATP do proteassomo de 20S (núcleo multicatalítico com atividade de proteinase) com dois complexos de 19S (Peters *et al.* 1994, Coux *et al.* 1996). Mov34, a subunidade 7 não ATPásica do proteassomo de 26S, é um dos componentes da subunidade regulatória de 19S do proteassomo. Além de degradação de proteínas ubiquitinadas, o proteassomo também possui função como regulador da transcrição como no caso da ativação do NF- κ B (Orian *et al.* 1995). Mov34 contém um motivo característico KEKE (K: lisina, E: glutamato) no seu C-terminal. Foi proposto por Realini *et al.* (1994a) que os motivos KEKE promovam a associação entre proteínas que os contém. A ortóloga humana de Mov34 (HsMov34, também conhecido por PSMD7) contém um domínio estrutural na sua região N-terminal denominado MPN (Mpr1p, Pad1p N-terminal) que é usualmente encontrado em complexos multiprotéicos como o proteassomo de 26S, o COP9 *signalossomo*, as subunidades *f* e *h* (também conhecidas como subunidades p47 e p40, respectivamente) do fator de iniciação da tradução 3 (eIF3) e em reguladores da transcrição (Asano *et al.* 1997, Aravind e Ponting 1998, Hinnebusch 2006). Apesar de possuir uma estrutura típica de metaloprotease, Mov34 não possui o motivo conservado JAMM de coordenação de zinco (Maytal-Kivity *et al.* 2002), não é capaz de coordenar zinco (Sanches *et al.* 2007) e a sua função ainda é desconhecida.

Fazendo uma busca em biblioteca de expressão de cDNA de cérebro de camundongo, Ta e Vrati (2000) identificaram que a proteína Mov34 de camundongo é capaz de se ligar à estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da encefalite japonesa, um membro dos *Flavivirus*. Os autores confirmaram a interação utilizando ensaios de *northwestern*, EMSA e *super-shift* EMSA (onde anticorpo contra Mov34 é adicionado ao ensaio de EMSA). A região 3'SL dos *Flavivirus* é bastante conservada entre os membros desta família. Esta estrutura é extremamente importante para a replicação do RNA destes vírus, funcionando como âncora para o complexo de replicação viral (Chen *et al.* 1997, You *et al.* 2001, Alvarez *et al.* 2005).

Dada a conservação tanto das proteínas ortólogas Mov34 humana e de camundongo, bem como das estruturas 3' *stem-loop* do RNA dos vírus da dengue e da encefalite japonesa, nós decidimos investigar se a proteína Mov34 humana tem a capacidade de interagir com a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue.

Materiais e Métodos

Clonagem do cDNA de Mov34 humana (HsMov34):

A HsMov34 (número de acesso no banco de dados GenBank: NP_002802) possui 324 aminoácidos e peso molecular aproximado de 37 kDa. O cDNA da HsMov34 foi amplificado por RT-PCR a partir de RNA total de células HeLa extraído com Trizol (Invitrogen). Foi utilizado o sistema “SuperScript™ One-Step RT-PCR” (Invitrogen) com os *primers* específicos direto (ONZ140: 5’-CAT ATG CCG GAG CTG GCA GTG CAG AAG GTG-3’) sítio de *NdeI* sublinhado e reverso (ONZ141: 5’-GGA TCC TTA CTT TTT CTC CTT TTT CTC CTC TTT C-3’) sítio de *BamHI* sublinhado e códon de terminação em negrito segundo o protocolo do fabricante. O fragmento foi clonado no vetor pGEMT (Promega) e posteriormente transferido para o vetor pET28a (Novagen) utilizando as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, dando origem ao plasmídeo pET28a-HsMov34 (Tabela 1) no qual a proteína recombinante é expressa em bactéria com uma hexa-histidina no N-terminal.

Tabela 1: Cepa de bactéria e plasmídeos utilizados neste estudo.

Cepa de bactéria	genótipo	referência
BL21(DE3) <i>slyD</i> ⁻	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> (DE3) <i>slyD</i> ⁻	Yan <i>et al.</i> (2001)
Plasmídeos	descrição	referência
pGEMT	Clonagem de produto de PCR através de pareamento de bases entre os nucleotídeos protrusos TA; ampicilina ^R	Promega
pGEMT-HsMov34	Mov34 humana clonada no vetor pGEMT	Este trabalho
pET28a	Expressão em <i>E. coli</i> de proteína recombinante com hexa- histidina no N-terminal; canamicina ^R	Novagen
pET28a-HsMov34	Mov34 humana clonada em pET28a/ <i>NdeI</i> - <i>BamHI</i>	Este trabalho
pRARE	Transcrição do RNA transportador de 6 códons raros em bactéria (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA); cloranfenicol ^R	Novagen
pT7-His-IRP1	Expressão da proteína IRP1 humana em <i>E. coli</i> ; ampicilina ^R	Hirling <i>et al.</i> (1994)
pT-GroE	Expressão das proteínas GroEL e GroES em <i>E. coli</i> ; cloranfenicol ^R	Yasukawa <i>et al.</i> (1995)
pHST7	Transcrição <i>in vitro</i> dirigida pela T7 RNA polimerase; ampicilina ^R	Jobling <i>et al.</i> (1988)
pSPT-Fer	Transcrição <i>in vitro</i> de IRE _E (<i>iron responsive element</i>) dirigida pela T7 RNA polimerase; ampicilina ^R	Müllner <i>et al.</i> (1989)
pHST7-3'SLDV	Transcrição <i>in vitro</i> de 3'SL do vírus da dengue dirigida pela T7 RNA polimerase	Este trabalho
pHST7-3'SLJEV	Transcrição <i>in vitro</i> de 3'SL do vírus da encefalite japonesa dirigida pela T7 RNA polimerase	Este trabalho

Expressão das proteínas recombinantes

A cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3)*slyD*⁻ (Yan *et al.* 2001) foi co-transformada com os plasmídeos pET28a-HsMov34 e pRARE. Uma colônia isolada foi inoculada em 25 mL de meio LB (Luria-Bertani) contendo canamicina a 50 µg/mL e cloranfenicol a 20 µg/mL e incubadas a 37°C, 200 rpm, 16-18 horas. O pré-inóculo foi diluído em 1 litro de LB a uma DO_{600nm} (densidade ótica a 600 nm) de 0,1. A cultura foi incubada a 37°C, 200 rpm por 2 horas. A temperatura foi reduzida para 18°C e a indução foi feita a uma DO_{600nm} da cultura de 0,6 com 0,5 mM de IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo) por um período de 16 horas. A proteína IRP1, utilizada como controle dos experimentos posteriores, foi expressa a partir da construção pT7-His-IRP1 (Hirling *et al.* 1994). Células BL21(DE3)*slyD*⁻ co-transformadas com pT7-His-IRP1 e pT-GroE (Yasukawa *et al.* 1995) foram induzidas a uma DO_{600nm} entre 0,8 e 1,0 com 0,5 mM de IPTG a 25°C por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000g, 4°C por 10 min.

Purificação das proteínas

Para a primeira etapa de purificação de HsMov34 e de IRP1 foi realizada uma cromatografia de afinidade a níquel. O extrato de 1 litro de indução foi preparado em 40 mL de tampão (50 mM fosfato de sódio pH 7,2; 5% glicerol, 100 mM NaCl e 1 mM PMSF [fluoreto de fenilmetilsulfonil]). As células foram tratadas com lisozima (100 µg/mL) em gelo por 1 hora e o extrato clarificado em sonicador. O extrato solúvel foi separado da fração insolúvel por centrifugação a 12.000g, 4°C por 30 min. Este foi incubado com 400 µL de resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) por 1 hora a 4°C e transferido para coluna BioSpin (Bio-Rad). Após lavagem da resina com 6 mL de tampão, foram realizadas eluições de 3 VC cada com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (5, 20, 50, 100 e 200 mM). As frações que continham HsMov34 foram reunidas e dialisadas contra tampão A (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM NaCl; 0,5 mM EDTA [ácido etilenodiaminotetracético] e 5% glicerol). Utilizando o sistema ÄKTA-FPLC (Amersham-Biosciences), HsMov34 foi aplicada em coluna de 5 mL SP-Sepharose HP (GE Healthcare), lavada com 25 mL de tampão A e eluída com gradiente de 0-100% de tampão B (igual ao tampão A, contendo 1 M NaCl) em 50 mL a um fluxo de 1 mL/min. As frações de IRP1 foram reunidas e dialisadas contra tampão C (20 mM HEPES pH 7,4; 20 mM KCl; 10% glicerol e 7 mM β-mercaptoetanol) e fracionadas em coluna de 5 mL Q-Sepharose HP (GE Healthcare) com gradiente de 0-100% de tampão D (igual ao tampão C contendo 1 M KCl) em 150 mL a um fluxo de 1 mL/min. As frações que continham as proteínas purificadas foram coletadas.

Clonagem do 3' *stem-loop* do vírus da Dengue e da Encefalite Japonesa

Os fragmentos correspondentes às estruturas 3' *stem-loop* do RNA dos vírus da dengue e da encefalite japonesa (3'SLDV e 3'SLJEV, respectivamente) foram clonados sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase no plasmídeo pHST7. Para a obtenção de cada fragmento foram desenhados 4 oligodesoxiribonucleotídeos que, quando anelados, reconstituem o DNA dupla-fita correspondente à região 3'SL de cada um dos vírus, conforme ilustrado na Figura 1. O RNA 3'SLDV corresponde aos nucleotídeos 10644 ao 10722 da linhagem 44 do vírus da dengue tipo 2 (número de acesso do GenBank: AF204177) e o RNA 3'SLJEV corresponde aos nucleotídeos 10891 ao 10976 da linhagem GP78 do vírus da encefalite japonesa (número de acesso do GenBank: AF075723).

1 µg de cada oligonucleotídeo (Figura 1) foi fosforilado separadamente com 10 U T4 polinucleotídeo quinase (Invitrogen), 1 mM ATP, 50 µg/mL BSA [albumina de soro bovino] e tampão da enzima (70 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl e 5 mM β-mercaptoetanol) em 25 µL. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora e inativada a 65°C por 10 min. Posteriormente, 10 µL de reação de fosforilação foram reunidos aos pares para anelamento (ONZ168+169, ONZ170+171, ONZ206+207 e ONZ208+209) conforme indicado na Figura 1. A reação de anelamento foi aquecida a 90°C por 10 min e resfriada lentamente até atingir a temperatura ambiente. 10 µL de cada reação de anelamento foram combinadas (ONZ168+169 com ONZ170+171 e ONZ206+207 com ONZ208+209) e ligados no vetor pHST7 (Jobling *et al.* 1988) sob o controle do promotor da RNA polimerase do fago T7 utilizando-se os sítios de restrição de *Bgl*III e *Eco*RI. Com estas construções, pHST7-3'SLDV e pHST7-3'SLJEV, é possível fazer a transcrição *in vitro* do 3'SL de DEN e JEV utilizando-se a T7 RNA polimerase. O RNA IRE, usado como controle positivo dos experimentos posteriores, foi transcrito a partir da construção pSPT-Fer (Müllner *et al.* 1989).

A

3'SLDV completo:

5'GAGAUCCUGCUGUCUCCUCAGCAUCAUCCAGGCACAGAGCGCCAGAAAUGGAAUGGUGCUGUUGAAUCAACAGGUUCU3'

Primers para construir 3'SL de DEN:

ONZ168 5'-GATCTGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCAGGCACA-3' (BglII)

ONZ169 5'-TGGCGCTCTGTGCCTGGAATGATGCTGAGGAGACAGCAGGATCTCA-3'

ONZ170 5'-GAGCGCCAGAAAATGGAATGGTGTGTTGAATCAACAGGTTCTG-3'

ONZ171 5'-AATTCAGAACCTGTTGATTCAACAGCACCATTCCATTTTC-3' (EcoRI)

Anelamento dos primers:

ONZ168 ONZ170

5' GATCTGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCAGGCACA GAGCGCCAGAAAATGGAATGGTGTGTTGAATCAACAGGTTCTG 3'

3' ACTCTAGGACGACAGAGGAGTCGTAGTAAGGTCGGTCTCGCGGCTTTTACCTTACCACGACAACCTAGTTGTCCAAGACTTAA 5'

ONZ169 ONZ171

B

3'SLJEV completo:

5'GGAGAUUCUUCUGCUCUAUCUCAACAUCAGCUACUAGGCACAGAGCGCCGAAGUAUGUAGCUGGUGGAGGAAGAACACAGGAUCU3'

Primers para construir 3'SL de JEV:

ONZ206 5'-GATCTTCTGCTCTATCTCAACATCAGCTACTAGGCACAGAG-3' (BglII)

ONZ207 5'-TCGGCGCTCTGTGCCTAGTAGCTGATGTTGAGATAGAGCAGAAGA-3'

ONZ208 5'-CGCCGAAGTATGTAGCTGGTGGTGAGGAAGAACACAGGATCTGAG-3'

ONZ209 5'-AATTCAGATCCTGTGTTCTTCTCACCACCAGCTACATACT-3' (EcoRI)

Anelamento dos primers:

ONZ206 ONZ208

5' GATCTTCTGCTCTATCTCAACATCAGCTACTAGGCACAGAG CGCCGAAGTATGTAGCTGGTGGTGAGGAAGAACACAGGATCTG 3'

3' AAGACGAGATAGAGTTGTAGTCGATGATCCGTGCTCGCGGCTTCATACATCGACCACCTCCTTCTTGTGTCCTAGACTTAA 5'

ONZ207 ONZ209

Figura 1: Esquema da construção do DNA dupla-fita sintético cuja transcrição *in vitro* gera a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue (3'SLDV) e da encefalite japonesa (3'SLJEV). **A,** Sequência completa de 3'SLDV, primers utilizados para a construção do DNA sintético e esquema do anelamento dos primers. **B,** Sequência completa de 3'SLJEV, primers utilizados para a construção do DNA sintético e esquema do anelamento dos primers. Nucleotídeos sublinhados correspondem aos sítios das enzimas de restrição indicadas.

Transcrição *in vitro*

A transcrição *in vitro* foi feita conforme o protocolo da enzima T7 RNA polimerase (Invitrogen). Os plasmídeos contendo os insertos a serem transcritos foram linearizados – pHST7-3'SLDV e pHST7-3'SLJEV com *EcoRI* e pSPT-Fer com *BamHI* – utilizando enzimas de restrição cujos sítios estão localizados na região 3' dos insertos. A transcrição foi feita com 0,1-0,5 µg de plasmídeo linearizado, 1 mM de cada nucleotídeo (ATP, CTP, GTP e UTP), 5 mM DTT, tampão da enzima (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM NaCl; 8 mM MgCl₂; 2 mM espermidina-HCl e 5 mM DTT) e 50 U T7 RNA polimerase em volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 37°C por 15 min. Após este período o DNA foi digerido com 0,5 µg de DNaseI (Gibco) e a reação foi extraída com fenol:clorofórmio. O RNA foi precipitado e ressuspendido em 20 µL TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA). O produto da reação foi analisado em gel de poliacrilamida 6% desnaturante com 8 M uréia em tampão 1X TBE (89 mM Tris; 2 mM EDTA; 89 mM ácido bórico). Para marcação do RNA com fósforo radioativo a concentração de UTP foi alterada para 0,1 mM e foi adicionado 50 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP na reação de transcrição *in vitro*. A incorporação de $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP no RNA foi quantificada em um cintilador Beckman-Coulter.

Interação proteína-RNA

O primeiro ensaio de EMSA (ensaio de retardo da mobilidade eletroforética) foi realizado conforme Ta e Vрати (2000). 200 ng de proteína purificada e dialisada em tampão de ligação (HsMov34 ou IRP1) foi incubada em um volume de 18 µL com tampão de ligação I (TLI, Tabela 2) e 1 U de inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen) a 30°C por 10 minutos. Após este período, o RNA diluído em tampão de ligação (50.000 cpm em 2 µL) foi adicionado à reação que foi incubada por mais 20 minutos. Após este período, 5 µL de tampão de amostra (30 mM Tris-HCl pH 7,5; 40% sacarose; 0,2% azul de bromofenol) foram adicionados à ligação e as amostras aplicadas em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante em 0,5X TBE (44,5 mM Tris; 1 mM EDTA; 44,5 mM ácido bórico) contendo 2,5% glicerol (razão acrilamida:bis-acrilamida 50:1). Após secagem do gel, este foi exposto por cerca de 12 horas em placa de imagem do *phosphorimager* Fla-3000G (Fujifilm, Japão). Posteriormente, a imagem gerada foi analisada no programa Image Gauge (Fujifilm, Japão).

Tabela 2: Lista de tampões de ligação (TL) utilizados nos ensaios de EMSA.

Tampão	Composição	Referência
TLI	14 mM HEPES pH 7,5; 6 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM DTT; 1 mM EDTA e 60mM KCl	Ta e Vрати (2000)
TLII	10 mM HEPES pH 7,6; 2 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT e 5% glicerol	Este trabalho
TLIII	10 mM HEPES pH 7,6; 3 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 5% glicerol e 40 mM KCl	Leibold e Munro (1988)

A reação também foi montada com os tampões TLII e TLIII (Tabela 2). Outra variação feita foi a retirada do azul de bromofenol do tampão de amostra, uma vez que este pode interferir com interações proteína-ácido nucléico (Klein e Schenborn 1994). Além disso, foi feita uma tentativa de ligação covalente entre o RNA e a proteína através de exposição à luz ultravioleta (*UV-crosslinking*). Neste ensaio, a ligação foi montada como no EMSA e transferida para gelo após os 20 minutos de incubação a 30°C. A ligação foi irradiada a 7,2 J/cm² com uma fonte de luz ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm. Após este período foram adicionadas 2,5 U de RNaseA e a reação foi incubada a 37°C por 30 min. Foram adicionados 20 µL tampão de amostra de SDS-PAGE e as amostras foram fracionadas em gel de SDS-10% PAGE. O gel foi fixado em 7% ácido acético, hidratado, secado e exposto como descrito anteriormente.

Resultados

O alinhamento das seqüências de aminoácidos da Mov34 de camundongo e humano mostra que estas proteínas apresentam 96,29% de identidade e 98,76% de similaridade (Fig. 2). As principais diferenças estão presentes no motivo KEKE presente no C-terminal das proteínas.

```

M. musculus  MPELAVQKVVVHPLVLLSVVDHFNRIGKVGNGKRVVGVLLGSWQKKVLDVSNFAVPFDE 60
H. sapiens   MPELAVQKVVVHPLVLLSVVDHFNRIGKVGNGKRVVGVLLGSWQKKVLDVSNFAVPFDE 60
*****

M. musculus  DDKDDSVWFLDHDYLENMYGMFKVNARERIVGWYHTGPKLHKNDIAINELMKRYCPNSV 120
H. sapiens   DDKDDSVWFLDHDYLENMYGMFKVNARERIVGWYHTGPKLHKNDIAINELMKRYCPNSV 120
*****

M. musculus  LVIIDVKPKDLGLPTEAYISVEEVHDDGTPTSCTFEHVTSEIGAEAEVEVGVEHLLRDIK 180
H. sapiens   LVIIDVKPKDLGLPTEAYISVEEVHDDGTPTSCTFEHVTSEIGAEAEVEVGVEHLLRDIK 180
*****

M. musculus  DTTVGTLSQRITNQVHGLKGLNSKLLDIRSYLEKVASGKLPINHQIYYQLQDVFNLLPDA 240
H. sapiens   DTTVGTLSQRITNQVHGLKGLNSKLLDIRSYLEKVATGKLPINHQIYYQLQDVFNLLPDV 240
*****:*****.

M. musculus  SLQEFVKAFYLKTNDQMVVYLASLIRSVALHNLINNKIANRDAEKKEGQEKEESKKEER 300
H. sapiens   SLQEFVKAFYLKTNDQMVVYLASLIRSVALHNLINNKIANRDAEKKEGQEKEESKKEER 300
*****:*.

M. musculus  KDDKEKEKS---DAKKEEKKEKK 321
H. sapiens   KEDKEKDKDKEKSDVKKEEKKEKK 324
*:*****:*.

```

Figura 2: Alinhamento das seqüências de Mov34 de *Mus musculus* e *Homo sapiens* (números de acesso no GeneBank: AAA39730 e NP_002802, respectivamente) utilizando o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Os aminoácidos idênticos estão marcados com *, os aminoácidos conservados estão marcados em azul, os aminoácidos semi-conservados estão marcados em vermelho e os aminoácidos não conservados estão marcados em verde. As seqüências apresentam 96,29% de identidade e 98,76% de similaridade.

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos que formam a estrutura 3' stem-loop dos vírus da dengue e da encefalite japonesa mostra que as seqüências apresentam aproximadamente 68% de identidade (Figura 3, A). A predição de estrutura secundária do 3'SL de DEN e de JEV pelo programa RNAstructure (Mathews *et al.* 2004) mostra que ambos apresentam estruturas muito similares (Figura 3, B).

A

```
DEN -GAGAUCUGCUGUCU-CCUCAGCAUCA--UCCAGGCACAGAGCGCCAGAAAUGGAA- 55
JEV GGAGAUCUUCUGCUCUAUCUCAACAUCAGCUACUAGGCACAGAGCGCCGAAGUAUGUAGC 60
***** *   ***   ***** * * ***** ***** *   *** *

DEN UGGUGCUGUUGAAUCA-ACAGGUUCU 80
JEV UGGUGGUGAGGAAGAACACAGGAUCU 86
***** **   *** * ***** **
```

B

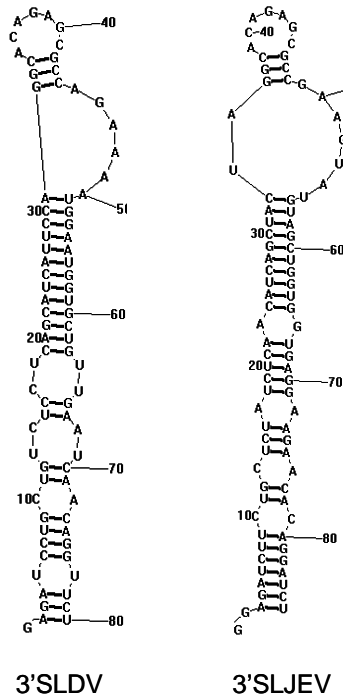


Figura 3: Comparação das estruturas 3' *stem-loop* do vírus da dengue e da encefalite japonesa. **A**, Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do 3'SL de DEN e de JEV utilizando o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). As seqüências apresentam cerca de 68% de identidade. **B**, Predição da estrutura secundária do 3'SL de DEN e de JEV pelo programa RNAstructure versão 3.71.

Podemos observar que as proteínas Mov34 de camundongo e de humano são extremamente similares em seqüência e que as estruturas secundárias preditas para o 3'SL de DEN e de JEV são muito parecidas. Isto nos motivou a testar se a interação entre a Mov34 de camundongo e o 3' *stem-loop* do vírus da encefalite japonesa descrita por Ta e Vрати (2000) é conservada entre a Mov34 humana e o 3' *stem-loop* do vírus da dengue.

Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Primeiramente, HsMov34 foi clonada em vetor pET28a (Novagen) de expressão de proteína recombinante em *E. coli*, gerando uma proteína com hexa-histidina no seu N-terminal. A expressão de HsMov34 resultou em uma proteína solúvel que foi purificada por cromatografia de afinidade a níquel seguida por cromatografia de troca iônica (Figura 4). A fração de HsMov34 utilizada no ensaio de EMSA está indicada por uma seta (Figura 4, B).

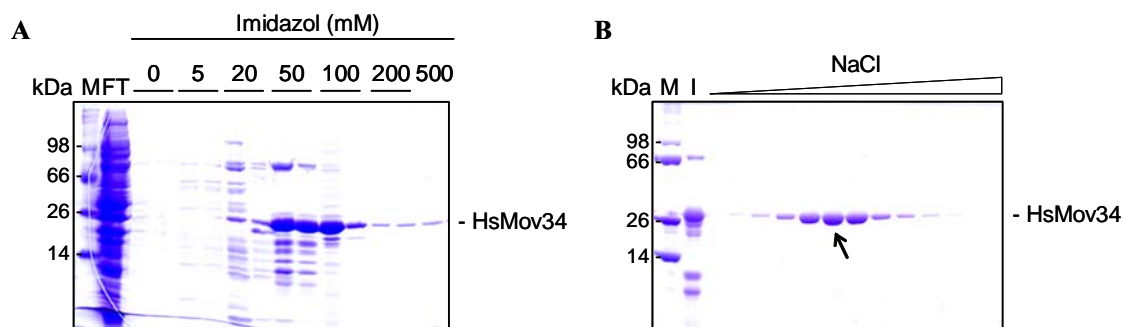


Figura 4: Purificação de HsMov34 recombinante. **A**, HsMov34 expressa com hexa-histidina no N-terminal foi purificada por cromatografia de afinidade a níquel. As frações eluídas com 50 e 100 mM de imidazol foram reunidas e utilizadas na etapa seguinte de purificação. M: marcador de peso molecular, FT: fração de proteínas que não interagiu com a resina. **B**, HsMov34 purificada por cromatografia de afinidade a metal foi posteriormente purificada por cromatografia de troca iônica utilizando coluna SP-Sepharose (GE Healthcare). A fração utilizada no ensaio de EMSA está indicada por uma seta. I: amostra injetada na coluna.

IRP1 (iron regulatory protein 1, Guo *et al.* 1994) foi utilizada como controle positivo do ensaio de EMSA. Esta proteína também foi expressa com uma cauda de histidina fusionada ao seu N-terminal e purificada por cromatografia de afinidade a níquel seguida por cromatografia de troca iônica (Figura 5). A fração de IRP1 utilizada no ensaio de EMSA está indicada por uma seta.

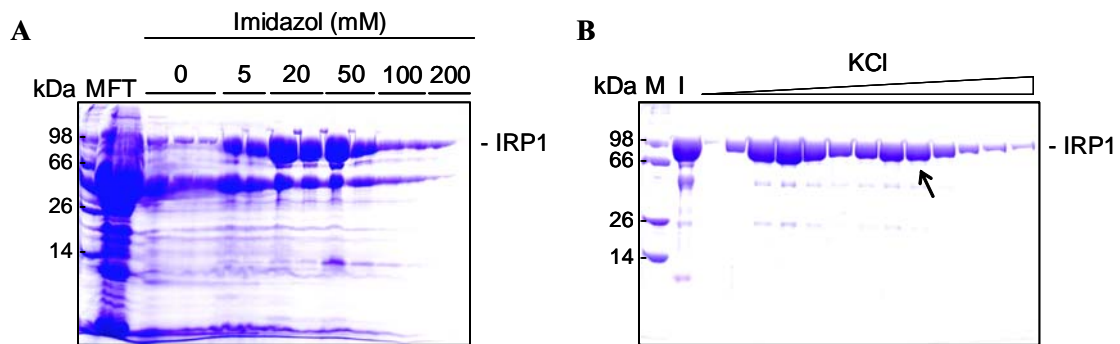


Figura 5: Purificação de IRP1 recombinante. **A**, IRP1 expressa com hexa-histidina no N-terminal foi purificada por cromatografia de afinidade a níquel. As frações eluídas com 5, 20 e 50 mM de imidazol foram utilizadas na etapa seguinte de purificação. M: marcador de peso molecular, FT: fração de proteínas que não interagiu com a resina. **B**, IRP1 purificada por cromatografia de afinidade a metal foi posteriormente purificada por cromatografia de troca iônica utilizando coluna Q-Sepharose (GE Healthcare). A fração utilizada no ensaio de EMSA está indicada por uma seta. I: amostra injetada na coluna.

Transcrição *in vitro*

Para testar o sistema de transcrição *in vitro*, foi feita a transcrição dos RNAs correspondentes à região 3' *stem-loop* de DEN e JEV assim como o RNA IRE, utilizado como controle positivo do ensaio de EMSA, com nucleotídeos não marcados radioativamente (Figura 6). O RNA 3'SLDV possui 80 nucleotídeos (nt), 3'SLJEV possui 86 nt e IRE 46 nt. Podemos observar na Figura 6 que os RNAs transcritos *in vitro* apresentam pureza e bandas de tamanhos esperados.

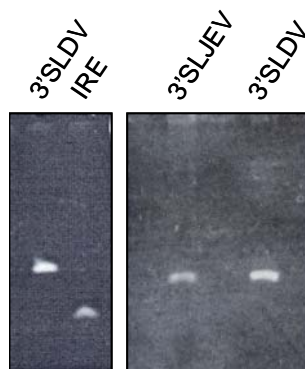


Figura 6: Análise da transcrição *in vitro* não radioativa dos RNAs IRE (iron responsive element), 3' *stem-loop* de DEN e de JEV em gel desnaturante de poliácridamida a 6% corado com brometo de etídeo.

Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA)

A interação da HsMov34 com o RNA 3'SLDV foi estudada utilizando-se ensaios de EMSA. Primeiramente, o ensaio foi realizado como descrito por Ta e Vрати (2000) utilizando-se o tampão TLI (Tabela 2) descrito pelos autores (Figura 7, A). Podemos observar que HsMov34 não foi capaz de interagir com o RNA 3'SLDV nestas condições. O controle positivo do ensaio (RNA IRE + proteína IRP1) interagiu conforme o esperado. A seguir, foi testada uma titulação com quantidades crescentes de HsMov34 (0,2; 0,5; 1 e 2 µg de HsMov34), mas ainda assim não foram obtidas bandas com padrão de corrida diferencial (dados não mostrados).

Ta e Vрати (2000) descreveram que o RNA 3'SLJEV interage com Mov34 de camundongo. Tendo em vista que o RNA 3'SLDV apresenta cerca de 68% de identidade com o RNA 3'SLJEV as diferenças entre os RNAs podem ser grandes o suficiente para que a interação de HsMov34 com o RNA 3'SLDV não seja conservada. Para testar esta hipótese, resolvemos clonar o RNA 3'SLJEV para utilizar como controle nos nossos ensaios. Neste novo ensaio, as sondas de RNA foram reaneladas para assegurar que apresentavam estrutura secundária. Além disso, foi retirado o azul de bromofenol do tampão de amostra, uma vez que este pode interferir com a interação entre proteína e ácido nucléico (Klein e Schenborn 1994). Um segundo tampão de ligação contendo íons Mg^{2+} e não K^+ também foi testado neste ensaio, o TLII (Tabela 2). Mg^{2+} é um importante co-fator na interação de várias proteínas com ácidos nucléicos (Noah e Lambowitz 2003) e também é importante para a formação e estabilidade de estruturas secundárias e terciárias de RNA (Gluick *et al.* 1997). Porém, podemos observar na Figura 7 B que HsMov34 não foi capaz de interagir com 3'SLDV e nem com 3'SLJEV nas condições testadas.

No caso da interação entre os RNAs 3'SLDV e 3'SLJEV e HsMov34 ser muito fraca, o complexo RNA-proteína poderia ser dissociado durante a corrida de eletroforese. Para nos assegurarmos de que isto não estava acontecendo, a reação de ligação foi exposta à radiação ultravioleta (reação de *UV-crosslinking*). Esta radiação gera ligações covalentes entre as moléculas ligantes que não são desfeitas durante a corrida de eletroforese em condições desnaturantes. Ainda assim, HsMov34 não foi capaz de interagir com os RNAs 3'SLDV ou 3'SLJEV (Figura 7, C).

Íons K^+ também podem ser importantes na interação entre ácidos nucléicos e proteínas (Record *et al.* 1976). A dependência a sal em proteínas ligantes fornece informação sobre a contribuição de interações eletrostáticas. Ácidos nucléicos em solução contém uma camada associada de contra-íons, que neutraliza a carga altamente negativa do esqueleto de fosfodiéster (Record *et al.* 1976). Esses contra-íons são deslocados por interações eletrostáticas com grupos positivamente carregados da proteína, levando a uma dependência da afinidade de ligação à concentração de sal (Record *et al.*

1976). Desta forma, foi testado um terceiro tampão de ligação, o TLIII (Tabela 2) na reação de UV-*crosslinking*. Neste tampão, além de íons Mg^{2+} , há a presença de íons K^+ . Como podemos observar na Figura 7 D, a ligação covalente dos RNAs 3'SLDV ou 3'SLJEV à HsMov34 também não foi observada nestas condições. Também apresentado na Figura 7 D, está um teste de UV-*crosslinking* utilizando as condições originais apresentadas por Ta e Vрати (2000), usando o RNA 3'SLJEV e 200 ng HsMov34 em tampão TLI.

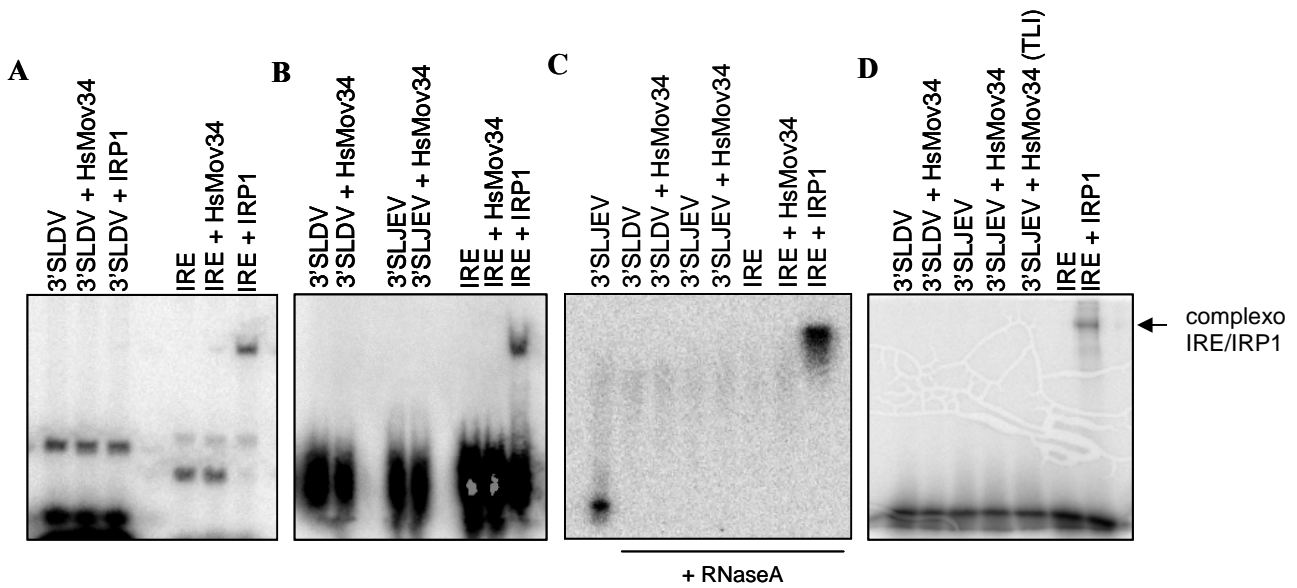


Figura 7: Ensaio de interação entre HsMov34 e 3'SL de DEN e de JEV marcados radioativamente. O RNA IRE e a proteína IRP1 foram utilizados como controles positivos do ensaio. **A**, EMSA utilizando o tampão de ligação I (TLI). **B**, EMSA utilizando os RNAs 3'SLDV e 3'SLJEV reanelados. Neste ensaio foi utilizado o tampão TLII. **C**, Ensaio de UV-*crosslinking* utilizando as mesmas condições do ensaio no item B. RNaseA foi adicionada ao ensaio de UV-*crosslinking* conforme indicado. **D**, Ensaio de UV-*crosslinking* onde foram utilizados RNAs reanelados e, quando não especificado, o tampão de ligação usado foi o TLIII. Neste ensaio não foi realizada a digestão do RNA livre com a enzima RNaseA. A seta indica as bandas de padrão de corrida eletroforética diferencial correspondente à interação entre os controles positivos utilizados nos ensaios a proteína IRP1 e o RNA IRE.

Discussão

Os resultados obtidos mostram que a interação entre o RNA 3'SL de DEN e de JEV com HsMov34 não foram observadas nas condições testadas. Uma vez que 3'SL de JEV não interagiu com HsMov34 nas mesmas condições do ensaio do artigo de Ta e Vрати (2000) algumas hipóteses podem ser elaboradas. A primeira é a de que HsMov34 não esteja na sua conformação tridimensional correta nas condições utilizadas nos ensaios. Análises estruturais de proteólise parcial e de dicroísmo circular apresentados no capítulo II indicam que HsMov34 está estruturada e provavelmente este não seria o motivo pelo qual a proteína não interagiu com os RNAs 3'SL de DEN e de JEV. No trabalho apresentado por Ta e Vрати (2000) a proteína Mov34 de camundongo também foi expressa em bactérias com uma cauda de histidina no N-terminal. Desta forma, a falta de interação entre HsMov34 com o 3'SL de DEN ou JEV não pode ser explicada pela ausência de modificações pós-traducionais em proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* ou pela presença da cauda de histidinas no N-terminal. Outra hipótese é de que, apesar de HsMov34 ter 96,29% de identidade e 98,76% de similaridade com Mov34 de camundongo, elas não são capazes de interagir com os mesmos RNAs. Porém, esta segunda hipótese é bastante improvável devido à alta similaridade entre as proteínas. E a terceira hipótese é de que a interação observada entre 3'SL de JEV e Mov34 de camundongo por Ta e Vрати (2000) não seja autêntica e com isso não seja possível repetir o experimento feito pelos autores. Porém, nós não podemos afirmar isto, já que não utilizamos Mov34 de camundongo nos nossos ensaios.

Uma revisão na literatura mostra que membros da superfamília Mov34 podem estar envolvidos na resposta celular à infecção viral. Oh *et al.* (2006) mostram que Jab1, a subunidade 5 do COP9 *signalossomo*, interage diretamente com a proteína do capsídeo do vírus do oeste do Nilo (WNV). A proteína C de WNV se localiza no nucléolo quando superexpressada e esta é translocada para o citoplasma em co-expressão com Jab1. Além disso, Jab1 promoveu a degradação da proteína C de WNV de maneira dependente de proteassomo. O sistema de proteassomo consiste em um núcleo proteolítico, o proteassomo de 20S, que se associa, em uma reação dependente de ATP, com o complexo regulatório de 19S para formar o proteassomo de 26S funcional. Na ausência de ATP, o proteassomo de 20S forma um complexo com o regulador de 11S induzido por IFN- γ e tanto o proteassomo de 20S quanto o regulador de 11S participam na geração de peptídeos antigênicos (Realini *et al.* 1994b). A proteína Tat do vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1 inibe fortemente a atividade do proteassomo de 20S e interfere com a formação do complexo proteassomo de 20S-regulador de 11S (Seeger *et al.* 1997). Uma subunidade do complexo eIF3 pertencente à família Mov34 interage com o produto do gene acessório de HIV (Vpr) e foi denominada hVIP/MOV34 (Mahalingam

et al. 1998). Os autores mostram que esta proteína está envolvida na regulação do ciclo celular e é um cofator celular para Vpr. hVIP, normalmente localizada no citoplasma, é deslocada para o núcleo na presença de Vpr (Ramanathan *et al.* 2002). Além disso, Mov34 não possui domínios conservados de interação com RNA. A estrutura cristalográfica do domínio MPN de Mov34 (Sanches *et al.* 2007) determina que esta proteína possui uma estrutura típica de metaloprotease, porém sem a presença de um íon coordenado. Isto corrobora o fato de Mov34 não ser capaz de interagir com moléculas de RNA, já que este tipo de estrutura não é caracterizado por interagir com ácidos nucleicos. Desta forma, o artigo de Ta e Vрати (2000) é o único a mostrar a interação de uma proteína da família Mov34 com RNA, um dado que não foi confirmado pelos nossos resultados.

Referências

- Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV. 2005. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*. 339:200-212.
- Aravind L, Ponting CP. 1998. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci*. 7:1250-1254.
- Asano K, Vornlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG, Hershey WB. 1997. Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. *J Biol Chem*. 272:27042-27052.
- Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. 1997. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol*. 71:3466-3473.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*. 65:801-847.
- Gluick TC, Gerstner RB, Draper DE. 1997. Effects of Mg^{2+} , K^{+} , and H^{+} on an equilibrium between alternative conformations of an RNA pseudoknot. *J Mol Biol*. 270:451-463.
- Guo B, Yu Y, Leibold EA. 1994. Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein without aconitase activity. *J Biol Chem*. 269:24252-24260.
- Hinnebusch AG. 2006. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem. Sci*. 31:553-562.
- Hirling H, Henderson BR, Kuhn LC. 1994. Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase. *EMBO J*. 13:453-461.
- Jobling SA, Cuthbert CM, Rogers SG, Fraley RT, Gehrke L. 1988. In vitro transcription and translational efficiency of chimeric SP6 messenger RNAs devoid of 5' vector nucleotides. *Nucleic Acids Res*. 16:4483-4498.
- Klein M, Schenborn E. 1994. *Promega Notes Magazine*. 45:25-27.
- Leibold EA, Munro HN. 1988. Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85: 2171-2175.

- Mahalingam S, Ayyavoo V, Patel M, Kieber-Emmons T, Kao GD, Muschel RJ, Weiner DB. 1998. HIV-1 Vpr interacts with a human 34-kDa mov34 homologue, a cellular factor linked to the G2/M phase transition of the mammalian cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:3419-3424.
- Mathews DH, Disney MD, Childs JL, Schroeder SJ, Zuker M, Turner DH. 2004. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:7287-7292.
- Müllner EW, Neupert B, Kühn LC. 1989. A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell.* 58:373-382.
- Noah JW, Lambowitz AM. 2003. Effects of maturase binding and Mg²⁺ concentration on group II intron RNA folding investigated by UV cross-linking. *Biochemistry.* 42:12466-12480.
- Oh W, Yang MR, Lee EW, Park KM, Pyo S, Yang JS, Lee HW, Song J. 2006. Jab1 mediates cytoplasmic localization and degradation of West Nile virus capsid protein. *J Biol Chem.* 281:30166-30174.
- Orian A, Whiteside S, Israel A, Stancovski I, Schwartz AL, Ciechanover A. 1995. Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem.* 270:21707-21714.
- Peters JM, Franke WW, Keinschmidt JA. 1994. Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem.* 269:7709-7718.
- Ramanathan MP, Curley E 3rd, Su M, Chambers JA, Weiner DB. 2002. Carboxyl terminus of hVIP/mov34 is critical for HIV-1-Vpr interaction and glucocorticoid-mediated signaling. *J Biol Chem.* 277:47854-47860.
- Realini C, Rogers SW, Rechsteiner M. 1994a. KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett.* 348:109-113.
- Realini C, Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M. 1994b. Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem.* 269:20727-20732.
- Record MT Jr, Lohman ML, De Haseth PL. 1976. Ion effects on ligand-nucleic acid interactions. *J Mol Biol.* 107:145-158.
- Sanches M, Alves BS, Zanchin NI, Guimarães BG. 2007. The crystal structure of the human Mov34 MPN domain reveals a metal-free dimer. *J Mol Biol.* 370:846-855.
- Seeger M, Ferrell K, Frank R, Dubiel W. 1997. HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation. *J Biol Chem.* 272:8145-8148.
- Ta M, Vrati S. 2000. Mov34 protein from mouse brain interacts with the 3' noncoding region of Japanese encephalitis virus. *J Virol.* 74:5108-5115.
- Yan SZ, Beeler JA, Chen Y, Shelton RK, Tang WJ. 2001. The regulation of type 7 adenylyl cyclase by its C1b region and *Escherichia coli* peptidylprolyl isomerase, SlyD. *J Biol Chem.* 276:8500-8506.
- Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, Fujimoto J, Yamamoto T, Ishii S. 1995. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem.* 270:25328-25331.
- You S, Falgout B, Markoff L, Padmanabhan R. 2001. In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *J Biol Chem.* 276:15581-15591.

3.2- Artigo

Characterization of the human ortholog of Mov34 reveals eight N-terminal residues important for MPN domain stability

Beatriz S. C. Alves, Sérgio Oyama Jr., Fábio C. Gozzo, Mario Sanches,
Beatriz G. Guimarães e Nilson I. T. Zanchin

Characterization of the human ortholog of Mov34 reveals eight N-terminal residues important for MPN domain stability

Beatriz S.C. Alves, Sérgio Oyama Jr., Fábio C. Gozzo, Mario Sanches, Beatriz G. Guimarães, Nilson I.T. Zanchin *

Center for Structural Molecular Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, LNLS, P.O. Box 6192, CEP 13084-971, Campinas SP, Brazil

Received 8 June 2006

Available online 30 June 2006

Abstract

Eukaryotic MPN domain proteins are components of the complexes proteasome lid, COP9-signalosome (CSN), and translation initiation factor 3 (eIF3). The proteasome lid Rpn11 and COP9-signalosome Csn5 subunits, which contain the conserved JAMM motif involved in zinc ion coordination, show catalytic isopeptidase activity. Homology modeling indicates that the MPN domain of Mov34 cannot coordinate a zinc ion in the same manner as catalytically active MPN domains. In this work, we show that the MPN domain of Mov34 is highly resistant to proteolysis and the major product comprises residues 9–186, which includes the conserved MPN domain. Two clones containing the MPN domain region (MPN1–177 and MPN1–186) including the eight N-terminal residues show a less pronounced band in the 220 nm region of the CD, indicating lower α -helical content relative to the clones lacking these residues (MPN9–177 and MPN9–186). However, clones lacking residues 1–8 show lower expression levels and thermal stability, indicating that residues 1–8 are required for proper folding and stability of this particular MPN domain.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: MPN domain protein family; Limited proteolysis; Circular dichroism; MPN domain stability

The eukaryotic protein complexes proteasome lid, COP9-signalosome (CSN), and translation initiation factor 3 (eIF3) share two groups of conserved proteins that contain either PCI (proteasome, COP9-signalosome, initiation factor 3) or MPN domains (Mpr1, Pad1, N-terminal; [1,2]). The MPN domain shows a typical metalloprotease fold and solution of the crystal structure of the *Archeoglobus fulgidus* MPN protein, AfJAMM, has identified the JAMM motif described as EX_nHXHX₁₀D where X is any residue [3,4]. Rpn11 and Csn5 are the subunits responsible for the isopeptidase activity of the proteasome and CSN complexes, respectively [5,6]. CSN has been shown to interact with the proteasome and to compete with the lid complex showing that these two

complexes display closely related roles in the proteasome-ubiquitin degradation pathway [7].

The zinc ligand amino acids of the JAMM motif are conserved in the MPN domain of Rpn11 and Csn5 but they are not found in the MPN domain of the proteasome lid subunit Mov34/PSMD7/Rpn8, the COP9-signalosome subunit Csn6, and the translation factor eIF3 subunits *f* and *h* [8]. Except for Rpn11 and Csn5, no catalytic activity has been assigned for these proteins so far, and it is reasonable to assume that in these cases the MPN domain plays a structural function only. It has been proposed that the MPN domain might play a role in protein–protein interaction [1] and the Csn5 interaction with MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif [9].

Structural comparisons between active and inactive MPN domains are not possible because there is no high resolution structure available for eukaryotic MPN domain

* Corresponding author. Fax: +55 19 3512 1004.
E-mail address: zanchin@lnls.br (N.I.T. Zanchin).

proteins. Obtaining novel structural information on the MPN domain proteins is important to understand the common features of the proteasome lid complex, CSN and eIF3 which play key functions in protein degradation, signal transduction, and protein synthesis, respectively. Our attempts to crystallize the human Mov34 protein have been unsuccessful, suggesting that it contains flexible regions interfering with the crystallization process. In this work, we identified a protease resistant domain which includes the conserved MPN domain region and constructed four variants of the protease resistant domain. Characterization of these constructs revealed that the amino acids 1–8 play an important role in the stability of this particular MPN domain. A homology model of the domain was constructed using AfJAMM and *Bacillus subtilis* cytidine deaminase (CAD) as partial templates, suggesting that the MPN domain of Mov34 cannot coordinate the zinc ion in the same manner as catalytically active MPN domains.

Materials and methods

Construction of expression vectors. The cDNA of human Mov34 (NCBI accession: P51665) was amplified by RT-PCR from total RNA isolated from HeLa cells using the “Super Script One-Step RT-PCR” system (Invitrogen). The oligonucleotide primers used in the RT-PCR were ONZ140 (5'-CAT ATG CCG GAG CTG GCA GTG CAG AAG GTG-3') and ONZ141 (5'-GGA TCC TTA CTT TTT CTC CTT TTT CTC CTC TTT C-3'), containing *NdeI* and *BamHI* restriction sites, respectively. The cDNA was inserted into the pGEM-T cloning vector (Promega), the sequence verified and subsequently transferred to a modified version of the pET28a vector (Novagen), named pET-TEV [10], using the *NdeI* and *BamHI* restriction sites. Proteins expressed from pET-TEV contain an N-terminal histidine tag followed by a TEV protease recognition site, so that the histidine tag can be removed by TEV digestion. Four expression vectors containing the protease resistant fragment were constructed into the vector pET-TEV as follows: pETMPN1–177 contains the cDNA sequence encoding residues 1–177, which was amplified by PCR using the full-length cDNA as a template and oligonucleotides ONZ140 (see above) and ONZ297 (5'-AGG TCC TTA TCG TAA CAA GTG TTC AAC TCC-3'); pETMPN1–186 contains the cDNA region encoding residues 1–186 (PCR-amplified using oligonucleotides ONZ140 (see above) and ONZ369 (5'-GGA TCC TTA AGT GCC CAC CGT CGT GTC TTT-3')); pETMPN9–177 contains the cDNA region encoding residues 9–177 (PCR-amplified using oligonucleotides ONZ368 (5'-CAT ATG GTG GTG GTC CAC CCC CTG GTG-3') and ONZ297 (see above)); pETMPN9–186 contains the cDNA region encoding residues 9–186 (PCR-amplified using oligonucleotides ONZ368 and ONZ369, see above). The PCR products were cloned into the pCRII cloning vector (Invitrogen) and the sequences verified prior to subcloning into *NdeI* and *BamHI* restriction sites of vector pET-TEV.

Recombinant protein expression and purification. *Escherichia coli* BL21(DE3)*plyD*⁻ [11] strain co-transformed with pRARE (Novagen) was used to express Mov34 and the MPN domain variants from vector pET-TEV. One colony of each derivative strain was inoculated in 50 mL LB medium supplemented with kanamycin (50 µg/mL) and chloramphenicol (20 µg/mL) and incubated overnight at 37 °C. 30 mL of the pre-culture was transferred to 2 L LB medium supplemented with kanamycin and chloramphenicol, and grown to an OD₆₀₀ of ~0.6 at 25 °C. The temperature was decreased to 20 °C and the culture was induced overnight with 0.5 mM IPTG (isopropyl-thio-β-D-galactoside). The cells were harvested by centrifugation and suspended in 40 mL buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 7.2, 300 mM NaCl, and 2 mM PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride). Cells were lysed using lysozyme treatment (100 µg/mL for 1 h on ice) and sonication. The insoluble material was pelleted by

centrifugation at 12000g, 4 °C for 30 min. The first-step to purify the histidine-tagged recombinant proteins was an affinity chromatography on a Ni²⁺ column as described below. Total extract from 2 L-cultures was injected on a 5-mL Hi-Trap chelating column (GE Healthcare) using an ÄKTA-FPLC system set at a flow rate of 1 mL/min. The column was washed with 10 CV (column volume) with buffer A and eluted with a step gradient of 0–10% buffer B (buffer A containing 500 mM imidazole) in 5 CV, 3 CV of 10% buffer B, and a gradient of 10–100% buffer B in 7 CV. Recombinant Mov34 was further purified using a 1-mL heparin column (Hi-Trap Heparin HP, GE Healthcare). For this purpose, affinity-purified Mov34 was dialyzed in buffer C (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.5 mM DTT (dithiothreitol), and 50 mM NaCl) and loaded onto the heparin column, which was washed with 10 CV of buffer C and eluted with a 15 CV gradient of 0–100% buffer D (buffer C supplemented with 1 M NaCl). Affinity-purified MPN domain variants were further purified using ion exchange on Q-Sepharose column (GE Healthcare). The eluate from the affinity columns was dialyzed in buffer E (20 mM sodium phosphate, pH 7.2, 0.5 mM DTT, and 20 mM NaCl) and loaded onto a 1-mL Q-Sepharose column, which was washed with 7 CV of buffer C and eluted with a 10 CV gradient of 0–50% buffer F (buffer E supplemented with 1 M NaCl). For circular dichroism analysis, the recombinant proteins were dialyzed against 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.5 mM DTT.

TEV protease digestion and limited proteolysis assays. Nine milligrams of Mov34 in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM DTT, and 0.5 mM EDTA was digested with 500 µg TEV protease in a final volume of 45 mL. The reaction mixture was incubated at 30 °C for 6 h. Subsequently, Mov34 was concentrated to 1 mg/mL using an Amicon centrifugal filter device (Millipore). For limited proteolysis experiments, TEV protease-digested Mov34 was subjected to digestion with 1% (w/w) of trypsin or chymotrypsin (60 µg Mov34/0.6 µg of protease at a final volume of 60 µL) at room temperature. Ten microliter of samples were collected at various times and the reactions were stopped by adding 10 µL of 2× SDS-PAGE sample buffer containing 1 mM PMSF and heated at 95 °C for 5 min. The proteolysis products were analyzed on 12.5% SDS-PAGE gels and by mass spectrometry.

Mass spectrometry identification of the Mov34 proteolysis resistant domain. Sixty micrograms of recombinant Mov34 protein was digested with 0.6 µg of chymotrypsin at room temperature for 2 h as described above. The reaction was stopped by adding 1 mM PMSF followed by freezing and analyzed on a Q-ToF Ultima spectrometer (Waters/Micromass) with a nanoflow interface. The peptide mix was desalted on an Opti-Pak C18 trap column (Waters) for 5 min and eluted from the C18 trap column at a 250 nL/min flow with a mobile phase containing water, acetonitrile, and formic acid (50:49.9:0.1, v/v). The instrument settings were 3 kV for the spray voltage, 100 V for the cone voltage, cone gas at 30 L/h, and source temperature of 100 °C. The final spectrum was processed using the MaxEnt I program (Waters/Micromass). To analyze internal peptides of the proteolysis resistant product, 10 µg of the Mov34 chymotrypsin digest was fractionated on a 12.5% SDS-PAGE. The band corresponding to the proteolysis resistant domain was excised from the gel, crushed and dehydrated with acetonitrile, and rehydrated with a cold trypsin solution (20 µg/mL). The digestion reaction mixture was incubated at 37 °C for 20 h. Peptides were extracted with 50% acetonitrile/5% TFA and analyzed by electro-spray ionization mass spectrometry as described above. The LC-MS/MS data was analyzed using MASCOT 2.1 search engine (Matrix Science Ltd.) with semi-trypsin as enzyme. The semi-trypsin option includes peptides that end at K or R residues or start after K or R, as is the case of protein digestion with chymotrypsin followed by trypsin.

Circular dichroism (CD) and thermal stability analysis. Far UV-CD spectra were recorded on a Jasco-810 spectropolarimeter using a Peltier system PFD 425S for temperature control. CD spectra were acquired at 20 °C using a 1 nm bandwidth and an optical path length of 1 mm using samples at 5 µM in sodium phosphate buffer containing DTT (25 mM sodium phosphate, pH 7.2, containing 0.5 mM DTT). Ellipticity is reported as the mean residual ellipticity [θ] (° cm² dmol⁻¹). Samples were subjected to thermal denaturation from 15 to 90 °C with 1 °C/min

temperature increase and spectra acquisition at 5 °C intervals. Thermal denaturation curves were also obtained by monitoring the ellipticity at 222 nm from 15 to 90 °C at temperature intervals of 5 °C. Each time point is represented by the average of 120 measurements. Refolding assays were started at 90 °C and the temperature lowered to 20 °C using 0.5 °C intervals.

Homology modeling of the Mov34 MPN domain region. The available crystal structure of the *Archeoglobus fulgidus* protein AfJAMM (PDB **1O10**; [3]) was used as the main template during the homology building process. As the Mov34 MPN domain shares only 20.1% identity and 31.5% similarity with AfJAMM, which are quite low values for reliable model building, additional information providing support for the use of this structure as a template was obtained from the cytidine deaminase (CAD) structure from *Bacillus subtilis* (PDB **1JTK**; [12]). As noticed by Tran and co-workers [3], despite the absence of primary sequence similarity, *Bacillus subtilis* CAD and AfJAMM display a remarkably high structural similarity with the superimposed structures showing a C α root-mean square (rms) deviation of 2.0 Å over 46 residues in the central sheet and two of the helices [3]. Eighteen out of 115 residues of CAD could be aligned with the Mov34 MPN domain sequence (Fig. 4A). Initially, a prediction of secondary structure was obtained for the Mov34 MPN domain sequence using the PSIPRED algorithm [13]. This information was used to guide a structural alignment of this protein with the two experimentally determined templates. This step was performed manually. Based on this, 20 homology models were generated by the MODELLER program [14]. The resulting structures were internally checked by the scoring function of MODELLER and externally verified by the PROCHECK program [15]. The results were used to improve the alignment and the cycle was repeated until a good stereochemical quality was achieved for the final model.

Results and discussion

Identification of a protease resistant fragment in human Mov34

Mov34 is a 324 amino acid protein grouped into the MPN (also named Jab1/JAMM) protein family due to sequence conservation in the N-terminal region. According to sequence alignments the MPN domain encompasses residues 21–143. The crystal structure of the *A. fulgidus* protein AfJAMM has already been determined and shows that the MPN domain is formed by a compact core of eight β -sheets flanked by a long α -helix between the first and second β -sheets, and by a short α -helix between the fourth and fifth β -sheets [3,4]. In AfJAMM, the catalytic zinc ion is coordinated by histidines 67 and 69, aspartic acid 80, and a water molecule. Primary sequence alignment does not indicate a conservation of this zinc-binding motif in the MPN domain of human Mov34 and its C-terminal region is predicted to be predominantly formed by α -helix (Fig. 2B). Histidine-tagged Mov34 was purified on immobilized Ni²⁺ columns followed by ion exchange chromatography on heparin (Fig. 1A). The tag can be efficiently removed by TEV protease digestion.

In order to obtain structural data on the Mov34 protein, we conducted experiments based on limited proteolysis and mass spectrometry. Limited digestion with trypsin and chymotrypsin for 3 h produced a fragment of approximately 20 kDa (Fig. 1B). Best results were observed for chymotrypsin, which after 1 h of incubation generated a fragment that remained undigested for further 2 h (Fig. 1B). Mass spec-

trometry analysis by electrospray ionization of the chymotrypsin digestion mix revealed two major products of molecular weight 19,874 and 20,100 (Fig. 2A). The mass spectrometry results were reproducible, although it was not possible to match precisely the molecular weight of 19,874 to any region of Mov34. The product of 20,100, on the other hand, shows a close match to the region encompassing amino acids 11–188 (predicted molecular weight 20099.80) although it is not possible to rule out the region comprising residues 9–186 (predicted molecular weight 20097.83). The finding that the protease resistant domain corresponds to the N-terminal domain of Mov34 was confirmed by LC-MS/MS analysis of the chymotrypsin resistant fragments fully digested with trypsin, which identified several peptides in the region spanning from residue 9–175 (Fig. 2B). A peptide containing residues 9–14 was detected in this analysis indicating that the N-terminal of a fraction of the chymotrypsin resistant fragment starts at residue number nine, although the best match found for the 20,100 product comprises the region that starts at residue eleven (11–188). Despite this discrepancy there is no doubt that the protease resistant fragment comprises the conserved MPN domain previously identified by sequence alignment, which includes residues from 21–143. In addition, the limited proteolysis assays indicate that although the C-terminal region of Mov34 is predicted to be predominantly formed by α -helix, it must show a certain flexibility to allow protease access.

Further characterization of the MPN domain region of Mov34 involved the construction of four truncated proteins. Based on the limited proteolysis and mass spectrometry results described above, we have first chosen to construct a truncated protein from residue 9–186 (MPN9–186). However, expression of this truncated protein in *E. coli* was very inefficient (Fig. 2C). Taking into account that Mov34 was highly expressed in *E. coli* (Fig. 1A), we decided to construct a protein truncated at residue 186 but containing the native N-terminal sequence, even though the recombinant proteins expressed from vector pET-TEV [10] contain a histidine-tag and a TEV protease recognition site in the N-terminal region, so that residues 1–8 of the MPN domain would effectively correspond to residues 17–24. The new construct, MPN1–186, showed a surprisingly higher level of expression in *E. coli* as compared to MPN9–186 (Fig. 2C), indicating that residues 1–8 are important for proper folding and stability of the truncated proteins. A second set of constructs was made in which the C-terminus was set at residue 177 to exclude residues 178–186 which, according to secondary structure prediction, form a coil region. The construct encoding residues 1–177 (MPN1–177) showed an expression level similar to MPN1–186 and both products can readily be identified by whole cell extract analysis on SDS-PAGE (Fig. 2C). By contrast, expression of construct encoding residues 9–177 (MPN9–177) was as low as expression of MPN9–186 (Fig. 2C). Despite their low level of expression, MPN9–177 and MPN9–186 could be purified for further characterization (Fig. 2C, lower panel).

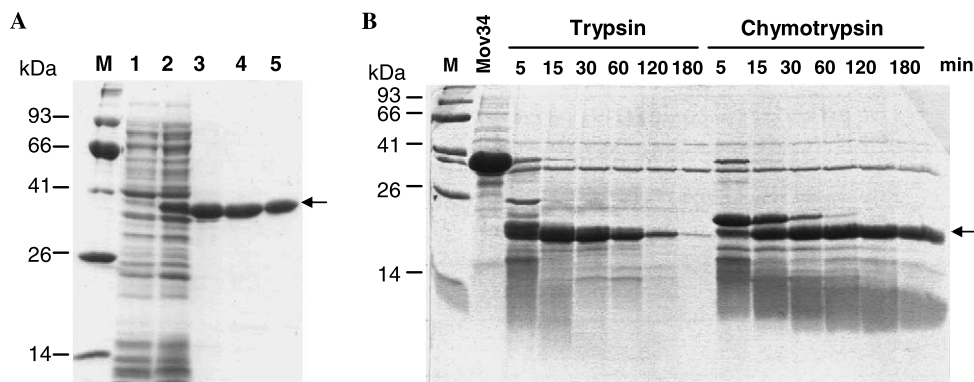


Fig. 1. Analysis of Mov34 purification and partial proteolysis. (A) SDS–PAGE analysis of Mov34 expressed in *E. coli* and purified by chromatography. 1, Total extract of non-induced cells; 2, total extract of cells induced with 0.5 mM IPTG; 3, affinity-purified Mov34; 4, Mov34 eluted from the heparin column; 5, Mov34 following dialysis against 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, and 0.5 mM DTT. The arrow indicates the purified Mov34 protein. (B) SDS–PAGE analysis of Mov34 subjected to limited proteolysis with trypsin and chymotrypsin. Numbers above each lane indicate the time in minutes when the reaction was stopped. Lane Mov34 indicates the undigested protein; M, molecular weight marker. The arrow indicates the ~20 kDa proteolysis resistant domain.

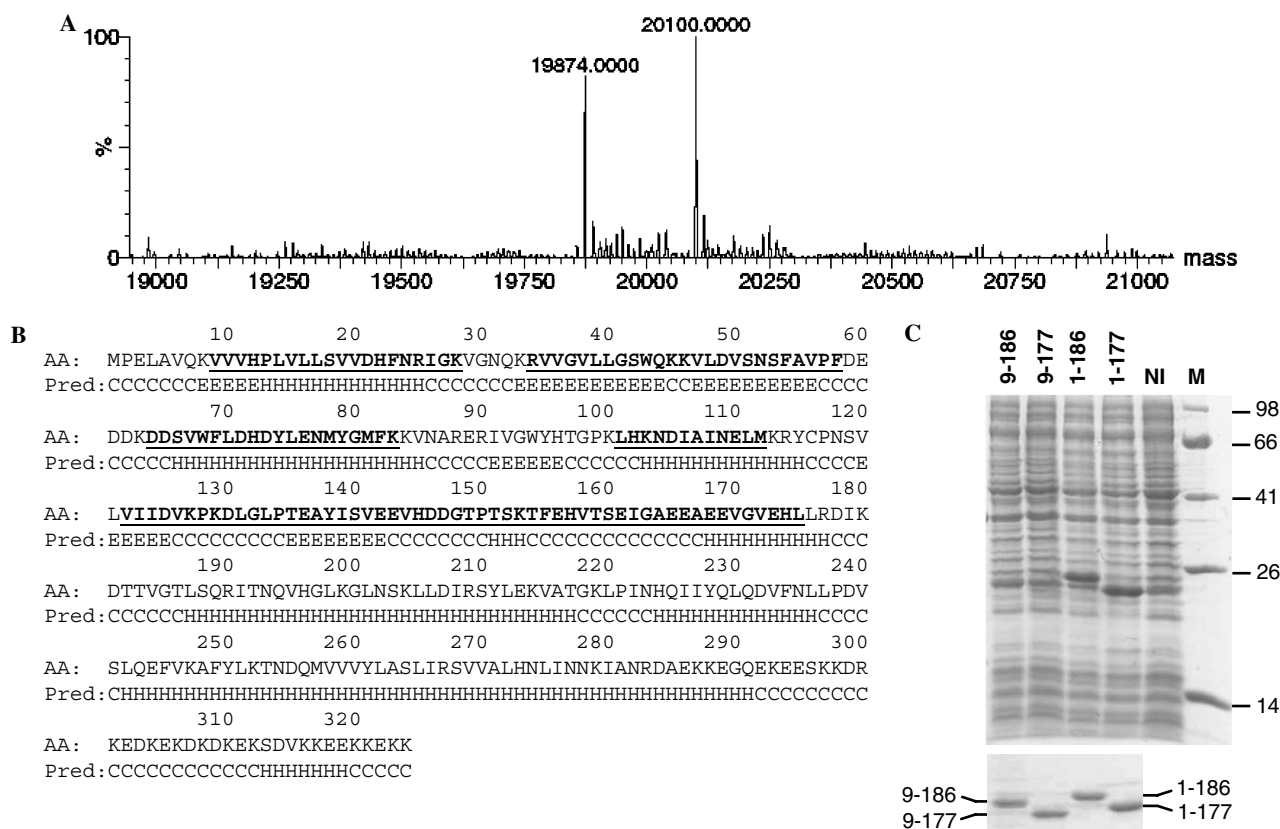


Fig. 2. Identification and expression of the Mov34 protease resistant fragment. (A) Singly charged deconvoluted ESI mass spectrum of MPN domain after digestion of Mov34 with chymotrypsin. (B) Amino acid sequence of Mov34 showing the peptides (bold underlined) found in the LC-MS/MS analysis of the chymotrypsin resistant domain which was subsequently subjected to digestion with trypsin. Predicted secondary structure elements (Pred) are indicated underneath the amino acid sequence (AA) *key words*: C, coiled coil; E, β -strand, and H, α -helix. (C) Expression and purification of the truncated MPN domain proteins. Upper panel, SDS–PAGE analysis of the non-induced (NI) and induced whole extracts from *E. coli* cells expressing MPN1–177; MPN1–186, MPN9–177, and MPN9–186 as indicated. Lower panel, purified truncated MPN domains as indicated. M, Molecular weight marker.

The expression assays indicated that residues 1–8 of Mov34 play a key role in the stability of the recombinant truncated proteins although these residues are predicted to be part of an N-terminal coil region. The stability of the truncated proteins was addressed by thermal denaturation followed by circular dichroism analyses as described below.

Secondary structure and thermal stability analyses of Mov34 and MPN domain

The CD spectrum of full-length Mov34 indicates a high content of α -helix (Fig. 3A) and a pronounced negative band in the 208 nm region that might indicate some degree

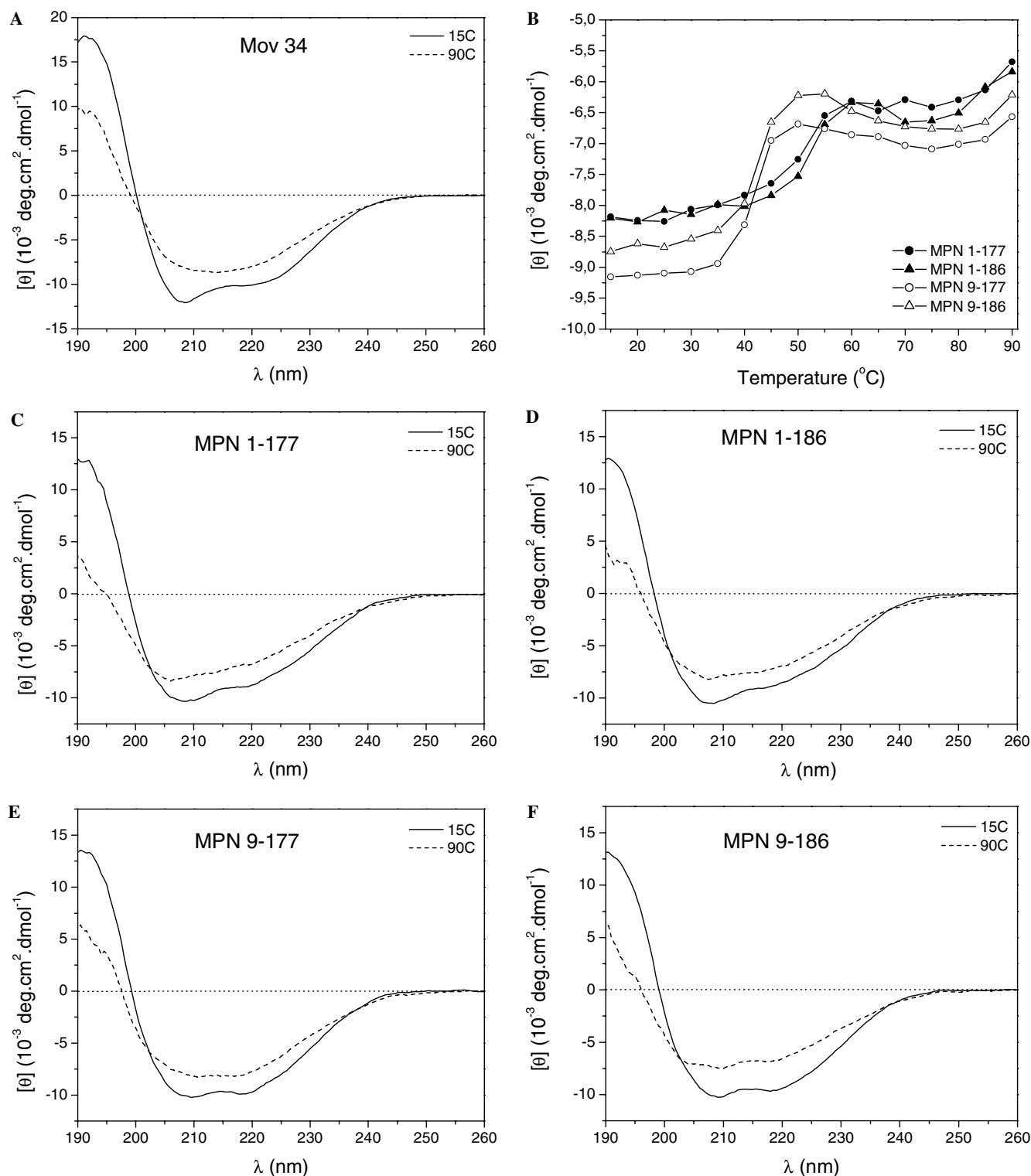


Fig. 3. Circular dichroism and stability analysis of Mov34 and truncated MPN domains. (A) CD spectra of Mov34 at 15 °C (solid line) and 85 °C (dotted line). (B) Thermal denaturation analysis of the MPN domain constructs. Curves were obtained by monitoring the ellipticity at 222 nm from 15 to 90 °C at temperature intervals of 5 °C. ●, MPN1-177; ▲, MPN1-186; ○, MPN9-177; △, MPN9-186. (C) CD spectra of MPN1-177 at 15 °C (solid line), and 85 °C (dotted line). (D) CD spectra of MPN1-186 at 15 °C (solid line) and 85 °C (dotted line). (E) CD spectra of MPN9-177 at 15 °C (solid line) and 85 °C (dotted line). (F) CD spectra of MPN9-186 at 15 °C (solid line) and 85 °C (dotted line). CD analyses were performed using protein samples at 5 μ M in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, and 0.5 mM DTT as described in Materials and methods.

of coil structure. The CD analysis of the truncated proteins revealed a critical difference between the constructs containing residues 1–8 relative to the constructs lacking these residues (Fig. 3C–F). At a first glance, the results seem intriguingly unexpected since CD spectra of constructs MPN1–177 and MPN1–186 (showing high expression in *E. coli*) show a pronounced band near 208 nm and a reduction in the CD signal near the 220 nm region, indicating reduction of α -helix signal and gain of coil content relative to the spectra of constructs MPN9–177 and MPN9–186 (Fig. 3C–F). The shift towards the 208 nm region is caused by the presence of residues 1–8, which also allow for higher expression in *E. coli* and indicate a higher stability of the constructs containing these residues. To test this hypothesis, Mov34 and the four truncated proteins were subjected to thermal denaturation followed by analysis of loss of the CD signal. Upon thermal denaturation, both full-length Mov34 and the truncated proteins show partial loss of CD signal and are not converted to a completely unfolded coil (Fig. 3A and C–F). Instead, they all lose the negative bands at the 208 and 222 nm regions but appear to retain some structure (Fig. 3A and C–F), undergoing a denaturation process that is irreversible (data not shown). Nevertheless, the thermal unfolding analysis showed that constructs MPN1–177 and MPN1–186 start to lose CD signal at 45–50 °C whereas constructs lacking residues 1–8 start to lose CD signal at a temperature as low as 35–40 °C (Fig. 3B), confirming that residues 1–8 confer higher resistance to denaturation despite the shift that they cause in the CD spectra. The identification and efficient expression of this protease resistant domain showing high stability should facilitate future studies on the structure determination of the Mov34 MPN domain.

Homology modeling of the MPN domain of Mov34

The Mov34 MPN domain shares 20.1% identity and 31.5% similarity with the *A. fulgidus* protein AfJAMM (PDB 1O10; [3]), the main template used in the homology modeling procedure (Fig. 4A). Even though these are quite low values for reliable model building, some additional information provided support for the use of this structure as a template. First, there is a clear coincidence in the patterns of the predicted (Mov34 MPN) and the determined (AfJAMM) secondary structure elements. The only exception is the presence of a predicted α -helical segment between residues S65 and V85 in MPN, which is absent in the crystal structure and in the secondary structure prediction of AfJAMM. However, it is interesting to note that AfJAMM X-ray structure lacks residues 48–60 what probably indicates a degree of mobility in this region [3]. On the other hand, Tran and co-workers [3] pointed out the remarkably structural similarity between AfJAMM and cytidine deaminase (CAD) from *B. subtilis* (PDB 1JTK; [12]), the only exception being the presence of an extra α -helix in this exact position. Taking all this information

into account, we decided to use the structure of CAD to complement the model building of Mov34 MPN.

The resulting homology model from this alignment (Fig. 4B) presented a good stereochemical quality. The Procheck analysis showed that 83.2% of the residues in the model remained in the most favored regions of the Ramachandran plot, being only 1.5% in disallowed regions. It is important to note that, given the available templates, the MPN sequence still lacks 3D coordinates for the segment between residues D61 and H72 (Fig. 4A). In this regard, there is no reliability for the structure obtained in this region.

An important feature that supported the use of AfJAMM structure as a template was the conservation, in the proposed alignment, of two residues participating in the zinc binding site: MPN H96 and D105 (Fig. 4A, highlighted in yellow). The second His residue of the H \times H motif is absent in MPN. Residues S80 and E25 of AfJAMM, also present in the zinc-binding site and important for catalytic activity and coordination of a water molecule, respectively, could be aligned with H102 and Q32 of MPN. Based on this alignment, one is tempted to propose that the MPN domain of Mov34 could still be able to form a putative zinc-binding site, composed by Q32, H96, H102, and D105. However, it is important to point out that there is no experimental evidence for zinc binding in this protein. Mutation of histidine and aspartate of the JAMM motifs of Jab1/Csn5 and Rpn11 has been shown to block the deubiquitination and deubiquitination activities of the signalosome and proteasome [5,6]. In AfJAMM, replacement of histidine and aspartate residues of the JAMM motif to alanine had no substantial effect on the CD spectrum or stability of the protein [3]. In addition, removal of the zinc ion of AfJAMM under metal-chelating conditions produced only a minor rearrangement of the residues in the active site cleft, and the backbones of zinc-free and zinc-containing forms are superimposable [3]. Similarly, CD measurements of Mov34 in the presence of EDTA did not alter the CD spectrum (data not shown). In summary, although homology modeling confirmed the lack of conservation of a histidine and an aspartate residue in the JAMM motif of Mov34 MPN, it indicated a putative substitute ion binding site composed by Q32, H96, H102, and D105. Therefore, the issue whether this protein can bind zinc or any other metal will remain open until experimental evidence can be produced.

In conclusion, we have identified a structural domain that is larger than the MPN domain predicted by Mov34 amino acid sequence alignment. Constructs MPN1–177 and MPN1–186 show secondary structure content consistent with the expected MPN fold and thermal stability consistent with compact and highly cooperative structures. Furthermore, residues 1–8 were demonstrated to be essential for high expression level and high stability. The efficient expression and high stability of the constructs MPN1–177 and MPN1–186 should facilitate future structure determination of the Mov34 MPN domain.

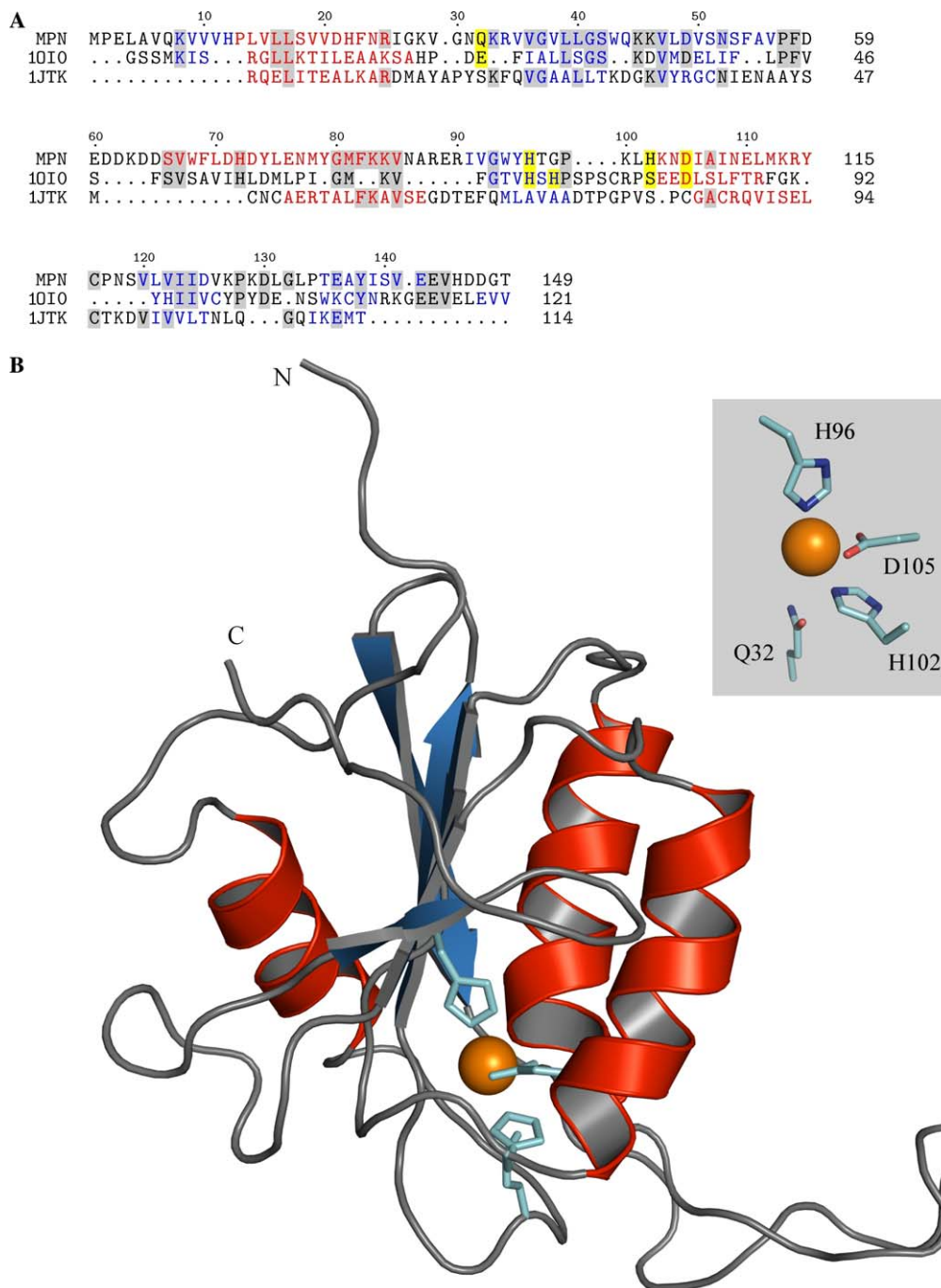


Fig. 4. Homology modeling of the Mov34 MPN domain. (A) Alignment of the Mov34 MPN domain with AfJAMM (*IOIO*) and cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* (*1JTK*). Red color indicates α -helix and blue color indicates β -sheet elements. (B) Model showing the overall fold of the MPN domain (residues 1–177). The box shows the putative zinc ion ligand residues.

Acknowledgments

This work was supported by Grant 00/02788-4 to N.I.T.Z. and the SMolBNet (00/10266-8) and CEPID/CBME (98/14138-2) programs from the Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP). B.S.C.A. and S.O.Jr. are recipients of FAPESP fellowships. We thank Tereza C. Lima Silva for technical support and Zildene G. Correa for DNA sequencing. We

thank Thelma A. Pertinhez for her helping with CD analysis.

References

- [1] K. Hofmann, P. Bucher, The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes, *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998) 204–205.
- [2] L. Aravind, C.P. Ponting, Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation, *Protein Sci.* 7 (1998) 1250–1254.

- [3] J.T.T.H. Tran, M.D. Allen, J. Löwe, M. Bycroft, Structure of the Jab1/MPN domain and its implications for proteasome function, *Biochemistry* 42 (2003) 11460–11465.
- [4] X.I. Ambroggio, D.C. Rees, R.J. Deshaies, JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome, *PLOS Biol.* 2 (2004) 113–119.
- [5] R. Verma, L. Aravind, R. Oania, W.H. McDonald, J.R. Yates III, E.V. Koonin, R.J. Deshaies, Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome, *Science* 298 (2002) 611–615.
- [6] G.A. Cope, G.S. Suh, L. Aravind, S.E. Schwarz, S.L. Zipurski, E.V. Koonin, R.J. Deshaies, Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1, *Science* 298 (2002) 608–611.
- [7] X. Huang, B.K.J. Hetfeld, U. Seifert, T. Kähne, P-M. Kloetzel, M. Naumann, D. Bech-Otschir, W. Dubiel, Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction, *FEBS J.* 272 (2005) 3909–3917.
- [8] V. Maytal-Kivity, N. Reis, K. Hofmann, M.H. Glickman, MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function, *BMC Biochem.* 3 (2002) 1–12.
- [9] A. Burger-Kentischer, D. Finkelmeier, M. Thiele, J. Schmucker, G. Geiger, G.E.M. Tovar, J. Bernhagen, Binding of JAB1/Csn5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif, *FEBS Lett.* 579 (2005) 1693–1701.
- [10] F.R.G. Carneiro, T.C. Silva, A.C. Alves, T. Haline-Vaz, F.C. Gozzo, N.I.T. Zanchin, Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 (2006) 260–268.
- [11] D.R. Roof, S.M. Horne, K.D. Young, R. Young, *slyD*, a host gene required for Φ X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl-*cis-trans*-isomerases, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2902–2910.
- [12] E. Johansson, N. Mejlhede, J. Neuhard, S. Larsen, Crystal structure of the tetrameric cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å resolution, *Biochemistry* 41 (2002) 2563–2570.
- [13] D.T. Jones, Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices, *J. Mol. Biol.* 292 (1999) 195–202.
- [14] A. Sali, T.L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779–815.
- [15] R.A. Laskowski, D.S. Moss, J.M. Thornton, Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures, *J. Mol. Biol.* 231 (1993) 1049–1067.

3.2- Identificação de PACT, uma nova proteína humana capaz de interagir com a estrutura 3' *stem-loop* do RNA do vírus da dengue

**Analysis of human PACT interaction with the dengue virus 3' stem-loop
RNA structure**

Beatriz S. C. Alves, Luiz T. Moraes Figueiredo e Nilson I. T. Zanchin

Analysis of human PACT interaction with the dengue virus 3' stem-loop RNA structure

Beatriz S. C. Alves¹, Luiz T. Moraes Figueiredo² and Nilson I. T. Zanchin^{1*}

1- Center for Structural Molecular Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Campinas, SP, Brazil

2- Center for Research in Virology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

* Corresponding author:

Nilson I. T. Zanchin

Center for Structural Molecular Biology

Brazilian Synchrotron Light Laboratory

Rua Giuseppe Maximo Scolfaro 10000

13083-100 – Campinas, SP, Brazil

Tel: 55 19 3512 1113

e-mail: zanchin@lnls.br

Key-words: Dengue virus, 3' stem-loop, PACT, RNA-protein interaction

Abstract

Dengue fever poses a serious public health threat throughout the global tropical region with approximately 2.5 million people at risk. The Dengue virus includes four serotypes (Dengue I-IV) and belongs to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae*. The genome is a positive-sense single-stranded RNA of approximately 10,600 bases, comprising an open reading frame encoding a precursor polyprotein flanked by a 5' untranslated region (UTR) of ~100 bases and a highly structured 3'UTR of ~450 bases. The polyprotein is processed by both host and viral proteases into three structural (C, capsid, E, envelope and prM, precursor membrane) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5). While the virus genome encodes the enzymes required for its replication, it relies completely on the host translational machinery to synthesize its proteins. The essential difference between host cellular mRNAs and Dengue virus genome RNA involves the 3'UTR, which instead of a polyadenylate tail contains highly conserved structural elements, including the 3' stem-loop (3'SL), a conserved structural feature located at the 3' terminus of the 3'UTR of many flaviviruses that is essential for virus replication. Using the yeast three-hybrid system to screen a human bone marrow cDNA library, we have isolated PACT as a new human protein that interacts with dengue virus 3'SL RNA structure. PACT is the cellular activator of PKR, an ubiquitously expressed eIF2 α kinase that was first identified as a component of the host defense mechanism induced by interferon. Direct interaction of PACT and dengue virus 3'SL RNA was confirmed by UV-crosslinking assays using recombinant PACT and radioactively labeled 3'SL. PACT contains three putative double-stranded RNA binding domains, but only the two N-terminal domains can interact with 3'SL RNA showing different affinities. Dengue virus 3'SL is the first biological relevant RNA identified to interact with PACT. By using competition assays, we have shown that PACT interacts preferentially with the top stem-loop region of 3'SL RNA. In order to investigate PACT role in Dengue virus replication we have generated HEK293 cells knockdown for PACT using a plasmid based RNAi system. The Dengue virus proliferation rate in cells knockdown for PACT relative to cells with normal PACT levels should answer the question whether PACT interaction with dengue virus 3'SL is important for PKR activation and cell protection against DV infection.

Introduction

Dengue fever is an infectious disease transmitted by mosquitoes and caused by any of the four related dengue virus serotypes. The dengue virus belongs to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae* that includes also the West Nile, yellow fever and Japanese encephalitis viruses. *Flavivirus* contain single-stranded RNA genomes of positive polarity of ~10,600 bases, encoding a open reading frame which is translated into a precursor polyprotein flanked by a 5' untranslated region (UTR) of ~100 bases and a highly structured 3'UTR of ~450 bases. The polyprotein is processed by both host and viral proteases into three structural (C, capsid, E, envelope and prM, precursor membrane) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5). Most viral genomes, such as dengue's, encode their own replication enzymes but, with rare exceptions, they are forced to rely on the cell translational machinery for the synthesis of its protein components. The viral 5'UTR is similar to the 5'UTR of eukaryotic mRNAs, possessing about 100 bases and a cap structure. The 3'UTR is long, containing stable secondary structures that are conserved among the different Flaviviruses (Wengler and Wengler 1981).

The functional roles of the Flavivirus UTRs have been studied using genetic deletion, replicons, reporter gene systems and viral RNA-protein interaction approaches. Initial deletion studies have shown that the 3'UTR secondary structures are essential for virus replication and viability (Markoff 2003). In addition, two conserved sequences (CS1 and CS2) at the 3'UTR, the 3' terminal stem-loop structure (3'SL) and the cyclization motifs at the 3' and 5' terminal regions (5'CYC and 3'CYC) have been implicated in viral genome replication (Hahn *et al.* 1987, Alvarez *et al.* 2005a, 2008). It has been demonstrated that NS3 and NS5 of the Japanese encephalitis virus bind cooperatively to 3'SL, indicating that this interaction may facilitate the process of the negative polarity RNA strand synthesis (Chen *et al.* 1997). Synthesis of self-primed RNA *in vitro* occurs by elongation of authentic 3' terminals of RNA templates (You and Padmanabhan 1999). The product of this synthesis is a predominant double stranded RNA with a hairpin structure, containing a limited single stranded region. Interestingly, the RNA synthesis requires both cyclization motifs, either connected in one molecule either the 5' terminal region supplemented *in trans* with the 3' terminal region. In addition, synthesis at the 3' terminal of the 3'UTR *in vitro* is not dependent only on the CYC conserved motifs, but depends also on the determinants of the conserved structures 3'SL (You *et al.* 2001). Studies using replicons have shown that deletion of the A2 and A3 conserved regions of the 3'UTR affects RNA synthesis (Alvarez *et al.* 2005b). Furthermore, it has been reported recently that enhancement of viral RNA synthesis following cyclization requires an intact stem loop A (SLA) in the 5'UTR, indicating that the

viral polymerase binds first to SLA and subsequently reaches the 3' end via long-range RNA-RNA interactions to start virus RNA synthesis (Filomatori *et al.* 2006). Gene expression assays have been used to show that both the 5' and 3'UTRs and the 3'SL alone enhance translation of reporter genes (Holden and Harris 2004, Chiu *et al.* 2005).

A major question about dengue virus RNA translation and replication regards to what host cellular proteins take part in these processes. Several studies have already been conducted aiming at identifying such proteins. De Nova-Ocampo *et al.* (2002) have described that some proteins of the Vero cellular lineage interact with the 3'UTR of dengue virus type 4, including the translation elongation factor 1 α (eEF1A), the mammalian La auto-antigen and the polypyrimidine tract-binding protein (PTB). eEF1A was reported to interact also with the 3'SL of the West Nile virus genomic RNA (Blackwell and Brinton 1997) and to facilitate synthesis of the negative-polarity RNA strand (Davis *et al.* 2007). Consistent with this finding, eEF1A colocalizes with viral replication complexes and co-immunoprecipitates with the viral proteins NS3 and NS5 (Davis *et al.* 2007). La was also reported to interact with the 5'UTR and with the dengue virus type 4 proteins NS3 and NS5 (García-Montalvo *et al.* 2004). By using RNA affinity chromatography, Paranjape and Harris (2007) have identified the interaction of Y-box-binding protein (YB-1) and of the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), hnRNP A1, hnRNP A2/B1, and hnRNP Q with the 3'UTR of the dengue virus. Refinement of the binding site indicated the YB-1 interacts with the 3'SL structure. Interestingly, YB-1 was reported to repress dengue virus replication (Paranjape and Harris 2007). On the other hand, cellular proteins may function in favor of virus replication. For example, both West Nile and dengue virus RNAs interaction with TIA-1/TIAR affect stress granule formation and facilitate virus genome replication (Emara and Brinton 2007).

The 3'SL comprises the 3'-terminal 100 nt and forms a highly stable and conserved secondary structure shared by all flaviviruses. It mediates anchoring of viral proteins responsible for replication and also of some host proteins and seems to play a pivotal function on flavivirus replication. In this work, we have used the yeast three-hybrid system (Y3H) to screen for novel human proteins that interact with the dengue virus 3'SL RNA (3'SLDV). This system consists in the expression of three chimerical molecules in yeast cells, which assemble in order to activate reporter genes (SenGupta *et al.* 1996). We have identified human PACT as a putative 3'SLDV-interacting protein using this system. PACT was initially identified as a cellular activator of PKR [protein kinase, interferon-inducible double-stranded RNA (dsRNA) dependent]. Although PKR activation upon viral infection is well characterized, PKR has also been implicated in several cellular events in the absence of virus or

dsRNA. PKR activation by PACT can cause inhibition of cellular protein synthesis and apoptosis (Ito *et al.* 1999, Patel *et al.* 2000, Peters *et al.* 2001, Huang *et al.* 2002, Lee *et al.* 2007). PACT has two N-terminal dsRNA binding motifs and a third C-terminal motif that is responsible by PKR activation (Patel *et al.* 2000, Peters *et al.* 2001). It has been reported that PACT interacts with synthetic dsRNA poly(I)-poly(C) *in vitro*, but this study is the first to identify a biologically relevant RNA that interacts with PACT.

Materials and Methods

Cell culture

HEK293 cells were maintained at 37°C with an atmosphere of 5% CO₂ in Minimum Essential Medium (MEM, Invitrogen) supplemented with 10% FCS (fetal calf serum) and streptomycin/penicillin (Gibco).

Plasmids and reagents

The 3'SLDV DNA fragment was obtained by annealing four synthetic oligodeoxynucleotides (ONZ168, 169, 170 and 171, Table 2) yielding a dsDNA fragment with the *Bgl*III and *Eco*RI overhang restriction sites at the 5' and 3' ends respectively. This fragment corresponds to nucleotides 10644-10722 of the dengue virus type 2 strain 44 (GenBank accession number: AF204177) and was cloned into the plasmid pHST7 digested with the restriction enzymes *Bgl*III and *Eco*RI generating pHST7-3'SLDV.

The bacterial ampicillin selection marker of plasmid pIII A/MS2-2 was replaced by chloramphenicol and the resulting plasmid named pRNA3H/MS2. The *bla* (beta lactamase) gene was interrupted by digesting with the restriction enzyme *Sca*I. The CAT gene (chloramphenicol acetyl transferase) along with its promoter was removed from plasmid pLysS (Novagen) using the restriction enzymes *Xmn*I and *Hinc*II and ligated into the linearized pIII A/MS2-2. 3'SLDV was amplified by PCR using pHST7-3'SLDV as template with primers ONZ216 and ONZ217 in order to create restriction sites for *Sma*I and *Sph*I. The PCR product was cloned into the pGEMT plasmid (Promega) using TA overhang ligation generating pGEMT-3'SLDV-*Sma*I/*Sph*I. 3'SLDV was transferred to pRNA3H/MS2 using the restriction enzymes *Sma*I and *Sph*I, yielding pRNA3H/MS2-3'SLDV.

The cDNA of the human PACT protein (GeneBank accession number: NM_003690) and of its M1M2, M2M3 and M3 domains were amplified using plasmid 6.7 as template which was isolated in

the yeast three-hybrid screen performed in this work (see below). PCR reactions were performed using primers: ONZ372 and ONZ373 for PACT; ONZ372 and ONZ374 for M1M2; ONZ375 and ONZ373 for M2M3 and ONZ376 and ONZ373 for M3. The PCR products were cloned into the pCRII vector (Invitrogen) using TA overhang ligation. The cDNA fragments were transferred to pETTEV using the restriction enzymes *NdeI* and *HindIII*. The proteins expressed from pETTEV contain a 6xHis-tag followed by a protease TEV cleavage site in the N-terminal region.

The pMaleficent shRNA delivery system (Heggestad *et al.* 2004) was chosen to generate a mammalian cell line knockdown for PACT. The PACT mRNA target sequence (5' TTT GCA GGC TAG AGT CAT TTA 3') was selected by using the "GenScript siRNA Target Finder". A scrambled version of PACT target (5' TGT TAG CAT TGT TCA GTC GAA 3') was selected by "GenScript siRNA sequence scrambler" and used as negative control. The DNA fragment encoding the shRNA against PACT (shPACT) was obtained by annealing oligodeoxynucleotides ONZ583 and ONZ584 and its scrambled version (shScr) was obtained by annealing ONZ585 and ONZ586. The resulting dsDNA fragments with *EspI* and *EcoRI* overhang restriction sites were cloned into the plasmid pMaleficent (Heggestad *et al.* 2004) yielding pMal-shPACT and pMal-shScr.

Yeast three-hybrid (Y3H) screening

The yeast three-hybrid system was kindly provided by Marvin Wikens from the Wisconsin University (USA). A yeast three-hybrid screen was performed using the yeast strain YBZ1 (Hook *et al.* 2005) harboring plasmid pRNA3H/MS2-3'SLDV. Expression of the 3'SL/MS2 fusion RNA was verified by RT-PCR using primers ONZ216 and ONZ217. Expression of the LexA-MS2 coat fusion was verified by immunoblotting with an antibody for *lexA* (Invitrogen). Self-activation of the reporter genes was tested with YBZ1 cells harboring plasmids pRNA3H/MS2-3'SLDV and pACT2 (Clontech). Large-scale sequential transformation of YBZ1 cells with a human bone marrow cDNA library (Clontech) cloned into pACT2 was performed using the PEG/lithium acetate protocol. The positive clones (His3^+) were initially selected on SD-LAUH (synthetic drop out medium lacking leucine, adenine, uracil and histidine) supplemented with 3 mM 3-aminotriazole (3-AT). Subsequently, His3^+ clones were subjected to a second round of selection based on the activation of the reporter gene *lacZ* using X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) filter assays. Plasmids were recovered from the selected yeast colonies by total DNA extraction followed by transformation into the *Escherichia coli* strain DH5 α . Subsequently, the plasmids was isolated from *E. coli* cells and the 3'SLDV-interacting proteins were identified by DNA sequencing followed by BLAST analyses

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). To confirm the specificity of the interaction with 3'SLDV the test plasmids were re-transformed into the strain YBZ1 with either pRNA3H/MS2 (empty vector), pIII/IRE-MS2 (vector with an unrelated RNA) or pRNA3H/MS2-3'SLDV (test RNA).

Recombinant protein expression and purification

PACT, M1M2, M2M3 and M3 were expressed using *E. coli* BL21(DE3)*slyD*⁻ cells (Yan *et al.* 2001) incubated at 18°C. The his-tagged recombinant insoluble proteins were purified by nickel affinity chromatography under denaturing conditions as described in “The QiaexpressionistTM” (Qiagen) and refolded by step-wise decrease of urea concentration as described by Patel and Sen (1998). This procedure prevents binding of *E. coli* RNA to the proteins. Briefly, *E. coli* BL21(DE3)*slyD*⁻ was grown on 500 mL Luria-Bertani medium containing kanamycin at 50 µg/mL and recombinant protein expression was induced with 0.5 mM isopropyl-thio-β-D-galactoside (IPTG) for 16 hours at 18°C. Bacterial pellets were suspended in 10 mL of ice cold lysis buffer [20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.1% Igepal and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)], treated with lysozyme, sonicated and centrifuged (20,000g, 10 min, 4°C). Inclusion bodies were suspended in 3 mL of buffer B [100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8.0], stirred for 1 hour at room temperature and centrifuged (20,000g, 30 min, 4°C). The supernatant was incubated with 1 mL Ni-NTA-Agarose (Qiagen) for 1 hour at room temperature. Subsequently, the resin was packed on a BioSpin column (Bio-Rad) and washed with 10 mL of buffer C (same as buffer B but at pH 6.3). Proteins were eluted from the resin with buffer C supplemented with increasing concentrations of imidazole (100, 200 and 500 mM). Fractions containing the recombinant protein were combined and dialyzed against refolding buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0 and 200 mM NaCl) with decreasing urea concentrations (6, 2, 1, 0.5 M urea) for at least 2 hours at each concentration and two exchanges of dialysis buffer without urea. Recombinant M3 was purified from the soluble fraction by nickel affinity followed by size exclusion chromatography. Protein extracts were prepared in binding buffer (BB, 20 mM sodium phosphate pH 7.2, 300 mM NaCl) as described previously. The soluble fraction was loaded on a 5 mL Hi-Trap chelating column (GE Healthcare) using an ÄKTA-FPLC system set at a flow rate of 1 mL/min. The column was washed with 50 mL of buffer A and eluted with a 75 mL gradient of 0–100% elution buffer (EB, BB containing 500 mM imidazole). The affinity purified M3 protein was dialyzed in size exclusion buffer (30 mM sodium phosphate pH 7.2, 50 mM NaCl) and loaded onto a Superdex 75 Prep Grade 16/60 size exclusion column with a flow rate of 0.8 mL/min. The purified recombinant proteins

were centrifuged (20,000g, 30 min, 4°C), divided into small aliquots, frozen by liquid nitrogen immersion and stored at -80°C.

RNA-protein interaction

Plasmids were linearized by digestion with restriction enzymes (pHST7-3'SLDV with *EcoRI*, pSPT-Fer with *BamHI* and pBluescriptII KS(+) with *Sall*) and used to transcribe the 3'SLDV, IRE or BS RNAs respectively, using T7 RNA polymerase (Invitrogen) according to manufacturer's recommendations. *In vitro* transcribed RNAs were purified by phenol-chloroform extraction followed by ethanol precipitation. RNAs were also transcribed with [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP (GE Healthcare) or biotin-14-CTP (Invitrogen) to obtain ^{32}P or biotin labeled RNA. 3'SLDV RNA segments were purchased from Invitrogen as described in Table 2 and illustrated in Figure 4 B. The reconstitution of 3'SLDV segments was made by annealing the synthetic oligoribonucleotides: RNANZ1 and RNANZ6 for full stem, RNANZ3 for top stem-loop and RNANZ4 and RNANZ5 for bottom stem. Each component of the specific region was mixed in equal amounts in RNA buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl and 5 mM MgCl_2). The reaction was boiled for 5 min, gradually cooled until achieve room temperature and transferred to ice.

For UV-crosslinking, purified recombinant proteins were diluted as indicated in the figure legends in 16 mM Hepes pH 7.6, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM 1,4-dithiothreitol (DTT) and 8.5% glycerol containing 1 U RNaseOUT (Invitrogen) and incubated for 15 min at room temperature. When specified, competitors RNAs were added (8, 16 and 40 pmol for 3'SL, IRE or BS and 16, 40 and 80 pmol for 3'SLDV deletions) and incubated for additional 15 min. ^{32}P -labeled 3'SLDV was added to the reaction in a final volume of 10 μL and the reaction was incubated for 30 min at room temperature. The reactions were transferred to ice, incubated for extra 10 min and irradiated at 3.6 J/cm^2 with a UV light source of 254 nm. When specified, 2.5 U RNaseA were added and the unprotected RNA digested for 20 min at 37°C. 15 μL of SDS-PAGE loading buffer was added and the samples were heated to 95°C for 5 min and fractionated in SDS-12% PAGE. Gel was dried and exposed to X-ray films at -80°C or to a *phosphorimager* Fla-3000G imageplate (Fujifilm, Japan).

For RNA affinity chromatography, S10 extract of HEK293 cells was prepared in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 0.05% Igepal and 1X protease inhibitor cocktail (Roche) and quantified using the BCA protein assay kit (Pierce). 4 μg of biotinilated RNA were incubated with 200 μg of total HEK293 protein extract containing 5 μg of yeast tRNA and 12 U RNaseOUT (Invitrogen) in a final volume of 80 μL . The reaction was incubated for 30

min at room temperature and transferred to 4°C for extra 30 min. The reaction was applied to 20 µL Streptavidin agarose resin (GE Healthcare) and incubated for 1 hour at 4°C with rotation. The supernatant was removed, the beads were washed 4 times with buffer and the resin-retained proteins were eluted with 15 µL SDS-PAGE loading buffer by heating to 95°C for 5 min. Protein samples were resolved by SDS-12% PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and PACT was detected by immunoblotting.

Immunoblotting

Following transfer, nitrocellulose membrane was blocked with 5% non-fat milk in TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 2 hours at room temperature (RT) and washed 3 times with TBST for 10 min at RT. Primary antibody for PACT (Abcam) was diluted 1:1,000 in TBST containing 0.3% BSA, added to membrane and incubated at 4°C for 16 hours with rotation. After incubation, membranes were washed as described above. Secondary antibody for goat IgG conjugated with peroxidase (Sigma) was diluted 1:8,000 in TBST containing 0.3% BSA, added to membrane and incubated for 2 hours at RT. Membranes were washed and developed with “ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents” (GE Healthcare).

shRNA stable transfection

HEK293 cells were co-transfected with plasmids pMal-shPACT or pMal-shScr and pHSB by electroporation. A 75 mm² cell culture flask at 90% confluence was used per electroporation. Cells were collected with PBS/EDTA solution (10 mM phosphate pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 10 mM EDTA) and washed 3 times with MEM without FCS. Cells were suspended in 300 µL MEM without FCS and 15 µg pMal-shPACT or pMal-shScr and 7.5 µg pHSB were added. Cells without DNA were also electroporated as a control. For electroporation, the cell suspension was transferred to a 2 mm electroporation cuvette and incubated for 5 min at RT and electroporated on a BioRad Gene Pulser XCell System set at 110V for 25 msec. After electroporation, the cuvettes were incubated for 20 min on ice. The cells were subsequently suspended in 10 mL MEM supplemented with 10% FCS. 9 mL were transferred to a 175 mm² flask and the remaining 1 mL was serially diluted in a 6 well plate. 0.7 µg/mL geneticin was added 48 hours post transfection. Cells were selected for 3 weeks with geneticin for resistant clone development. Each resistant clone was individually transferred to 25 mm² flask and amplified under 0.6 µg/mL geneticin pressure.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) and the cDNAs were obtained using the “First-Strand cDNA Synthesis” kit (GE Healthcare), random primer pd(N)₆ and 5 µg total RNA in 33 µL final volume reaction according to manufacturer’s instructions. 0.2 µL from the transcription reaction was used in the quantitative PCR reaction. It was set using “SyBr Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), specific primers for PACT (ONZ621 and ONZ622, 150 nM each) or for β-actin (ONZ645 and ONZ646, 85 nM each) in 25 µL final volume reaction. Quantitative PCR was performed by “Relative Quantification (ddCt) Plate” method of “7500 System SDS” software in “7500 Real Time PCR System” equipment (Applied Biosystems).

Table 1: Yeast and *E. coli* strains and plasmids used in this study.

strains	genotype	reference
YBZ1	<i>MATa, ura3-52, leu2-3, 112, his3-200, trp1-1, ade2, LYS2 :: (LexAop)-HIS3, ura3 :: (LexAop)-lacZ, LexA-MS2 coat (N55K).</i>	Hook <i>et al.</i> (2005)
BL21(DE3) <i>slyD</i> ⁻	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) (DE3) slyD⁻</i>	Yan <i>et al.</i> (2001)
DH5α	<i>F⁻ endA1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 deoR Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 λ-</i>	Grant <i>et al.</i> (1990)
plasmids	description	reference
pGEMT	TA overhang ligation of PCR fragment product; amp ^R	Promega
pCRII	TA overhang ligation of PCR fragment product; amp ^R , kan ^R	Invitrogen
pIIIA/MS2-2	Expression of MS2 RNA fusion driven by pol III RNA polymerase in yeast cells; <i>URA3, ADE2, amp^r</i>	SenGupta <i>et al.</i> (1996)
pIIIA/IRE-MS2	Expression of IRE (iron responsive element) RNA fused to MS2 in yeast cells; <i>URA3, ADE2, amp^r</i>	SenGupta <i>et al.</i> (1996)
pAD-IRP	Expression of IRP1 (iron regulatory protein 1) protein fused to <i>GAL4</i> activation domain in yeast cells; <i>LEU2, amp^r</i>	SenGupta <i>et al.</i> (1996)
pLysS	T7 lysozyme gene expression in <i>E. Coli</i> ; cm ^r	Novagen
pRNA3H/MS2	Derived from pIIIA/MS2-2; transcription of the MS2 RNA fusion; <i>URA3, ADE2, cm^r</i>	This work
pETTEV	Derived from pET28a, bacterial recombinant protein expression; N-terminal his-tag fusion, TEV protease cleavage site, kan ^r	Carneiro <i>et al.</i> (2006)
pBlueScriptII KS(+)	<i>In vitro</i> transcription driven by T7 RNA polymerase; amp ^r	Stratagene
pSPT-Fer	IRE (iron responsive element) <i>in vitro</i> transcription driven by T7 RNA polymerase; amp ^r	Müllner <i>et al.</i> (1989)
pHST7	<i>In vitro</i> transcription driven by T7 RNA polymerase; amp ^r	Jobling <i>et al.</i> (1988)
pMaleficent	Expression in human cells of shRNA driven by the histone H1 promoter; amp ^r , neo ^r	Heggestad <i>et al.</i> (2004)
pHSB	Expression in human cells of a humanized form of the Sleeping Beauty transposase driven by chicken β-actin promoter; amp ^r	Heggestad <i>et al.</i> (2004)
Plasmids constructed in this work	relevant features	
pHST7-3'SLDV	3'SLDV cloned into pHST7/ <i>BglII-EcoRI</i>	
pGEMT-3'SLDV-SmaI/SphI	3'SLDV flanked by <i>SmaI</i> and <i>SphI</i> restrictions sites cloned into pGEMT	
pRNA3H/MS2-3'SLDV	3'SLDV cloned into pRNA3H/MS2/ <i>SmaI-SphI</i>	
pCRII-PACT	PACT cloned into pCRII	
pETTEV-PACT	PACT cloned into pETTEV/ <i>NdeI-HindIII</i>	
pCRII-M1M2	PACT M1M2 domain cloned into pCRII	
pETTEV-M1M2	PACT M1M2 domain cloned into pETTEV/ <i>NdeI-HindIII</i>	
pCRII-M2M3	PACT M2M3 domain cloned into pCRII	
pETTEV-M2M3	PACT M2M3 domain cloned into pETTEV/ <i>NdeI-HindIII</i>	
pCRII-M3	PACT M3 domain cloned into pCRII	
pETTEV-M3	PACT M3 domain cloned into pETTEV/ <i>NdeI-HindIII</i>	
pMal-shPACT	shRNA against PACT cloned into pMaleficent/ <i>EspI-EcoRI</i>	
pMal-shScr	shRNA scrambled cloned into pMaleficent/ <i>EspI-EcoRI</i>	

Table 2: Oligonucleotides used in this study.

Name	Oligodeoxynucleotides sequence
ONZ168	5'-GATCTGAGATCCTGCTGTCTCCTCAGCATCATTCCAGGCACA-3'
ONZ169	5'-TGGCGCTCTGTGCCTGGAATGATGCTGAGGAGACAGCAGGATCTCA-3'
ONZ170	5'-GAGCGCCAGAAAATGGAATGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCTG-3'
ONZ171	5'-AATTCAGAACCTGTTGATTCAACAGCACCATTCCATTTTC 3'
ONZ216	5'-CCC GGGAGATCCTGCTGTCTCCTC-3'
ONZ217	5'-GCATGCAGAACCTGTTGATTCAAC-3'
ONZ372	5'-GGATCCCATATGTCCCAGAGCAGGCACCGCG-3'
ONZ373	5'-AAGCTTTTACTTTCTTTCTGCTATTAT-3'
ONZ374	5'-AAGCTTTTAAAATTTGGCAAGAAATTTCTCAG-3'
ONZ375	5'-GGATCCCATATGCCTATTGGTTCATTACAGGAA-3'
ONZ376	5'-GGATCCCATATGTGGCATTTCCTTGAGGAATTCT-3'
ONZ583	5'-TCCCGTAAATGACTCTAGCCTGCAAATTGATATCCGTTTGCAGGCTAGAGTCATTTATTTTTTG-3'
ONZ584	5'-AATTCAAAAAATAAATGACTCTAGCCTGCAAACGGATATCAATTTGCAGGCTAGAGTCATTTAC-3'
ONZ585	5'-TCCCGTTGACTGAACAATGCTAACATTGATATCCGTGTTAGCATTGTTTCAGTCGAATTTTTTG-3'
ONZ586	5'-AATTCAAAAAATTCGACTGAACAATGCTAACACGGATATCAATGTTAGCATTGTTTCAGTCGAAC-3'
ONZ621	5'-AACATTTTGAAAGCCAATGCAA-3'
ONZ622	5'-TGGAAGGGTCAGGCATTAAGG-3'
ONZ645	5'-TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG-3'
ONZ646	5'-GCATTTGCGGTGGACGAT-3'
Name	Oligoribonucleotides sequence
RNANZ1	5'-GAGAUCCUGCUGUCUCCUCAGCAUCAUCCA-3'
RNANZ3	5'-CAGCAUCAUCCAGGCACAGAGCGCCAGAAAAUGGAAUGGUGCUG-3'
RNANZ4	5'-GAGAUCCUGCUGUCUCCU-3'
RNANZ5	5'-UUGAAUCAACAGGUUCU-3'
RNANZ6	5'-UGGAAUGGUGCUGUUGAAUCAACAGGUUCU-3'

Results

Identification of human proteins that interact with 3'SLDV

In order to identify host proteins that interact with the dengue virus RNA 3' stem-loop structure (3'SL, Fig. 1 A), we used the yeast three-hybrid system (Y3H, Fig. 1 B) (SenGupta *et al.* 1996).

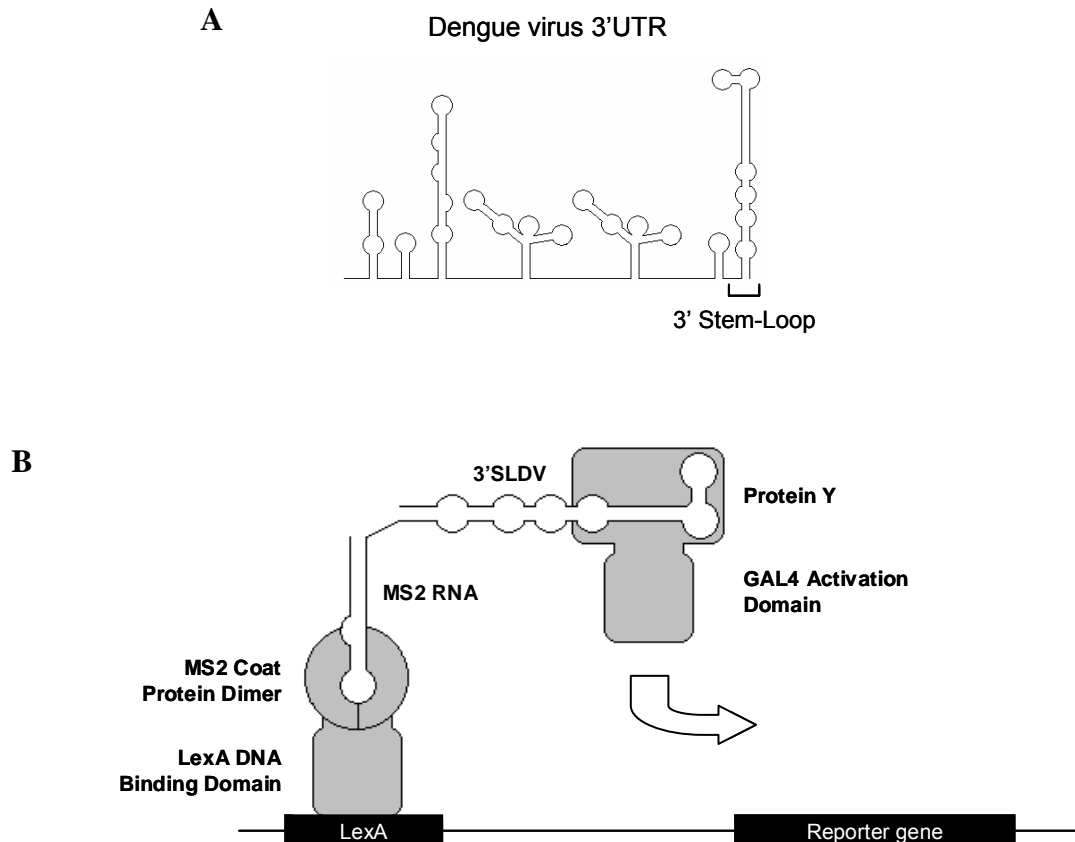


Figure 1: Dengue virus 3'SL and the yeast three-hybrid system (Y3H). **A**, Predicted secondary structures of the dengue virus 3'UTR. The 3' stem-loop structure (3'SL) used as probe in the Y3H assay is indicated. **B**, Graphic representation of the Y3H showing the interactions required for transcription activation of the reporter genes. The first chimerical molecule consists of a *lexA* DNA binding domain/MS2 coat protein fusion. The second molecule is a hybrid RNA that binds to the MS2 portion of the *lexA* DNA binding domain/MS2 coat protein fusion. The MS2 RNA is fused to a sequence of interest X, in our case the 3'SLDV, which binds to an RNA-binding polypeptide, Y. Y is linked to the *GAL4* transcription activation domain. When the interactions takes place, the reporter gene is activated. The interaction between RNA X and protein Y is monitored by assaying *HIS3* and *lacZ* expression levels.

The YBZ1 yeast strain (Table 1) harboring plasmid pRNA3H/MS2-3'SLDV was transformed with a human bone marrow cDNA library fused to the *GAL4* AD (Clontech). The large-scale sequential transformation yielded 35 positive clones from 5.9×10^5 transformants tested. Plasmid pACT2 was rescued from 34 β -galactosidase positive clones and the 3'SLDV-interacting proteins identified by DNA sequencing. The plasmids were re-transformed at YBZ1 to confirm the specificity of the interaction with 3'SLDV. 14 clones were RNA-dependent and only clone 6.7 was probe-specific (Fig. 2). The clone was identified as PACT, the human protein activator of PKR.

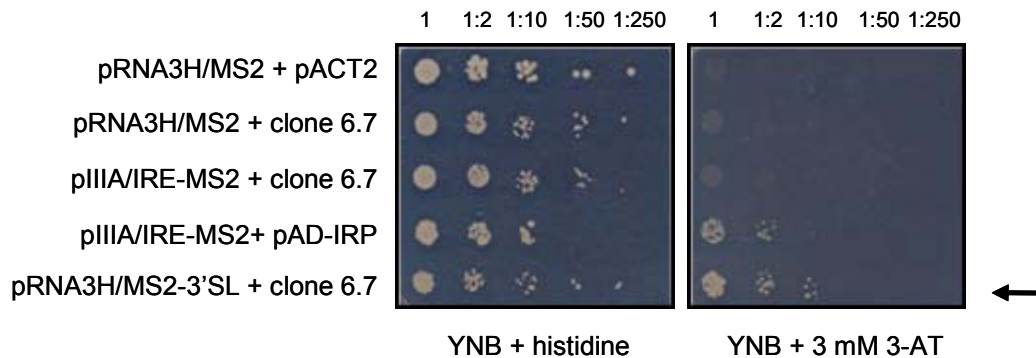


Figure 2: Clone 6.7 was isolated in a Y3H assay using 3'SLDV as bait to screen a human bone marrow cDNA library. Clone 6.7 is able to grow in minimal medium without histidine (with 3 mM 3-AT) only in the presence of 3'SLDV (indicated by an arrow). IRE+IPR1 (pIII A/IRE-MS2 + pAD-IRP) is the positive control of the assay. Clone 6.7 was identified as PACT, the human protein activator of PKR.

Recombinant human PACT interacts with dengue virus 3'SL

To confirm the direct interaction of PACT with the 3'SLDV RNA, PACT was expressed with an N-terminal histidine-tag in *E. coli* which resulted in production of an insoluble protein with the expected molecular weight of approximately 35 kDa (Fig. 3). PACT contains three double-stranded RNA binding domains (M1, M2 and M3). Expression vectors were constructed with the domain combinations M1M2, M2M3 and M3 containing an N-terminal histidine-tag (Fig. 3). Expression of the M1M2 and M2M3 resulted in production of insoluble proteins, while M3 was soluble. The insoluble proteins were refolded by step-wise decrease of urea concentration. This procedure prevents binding of *E. coli* RNA to the purified protein (Patel and Sen, 1998).

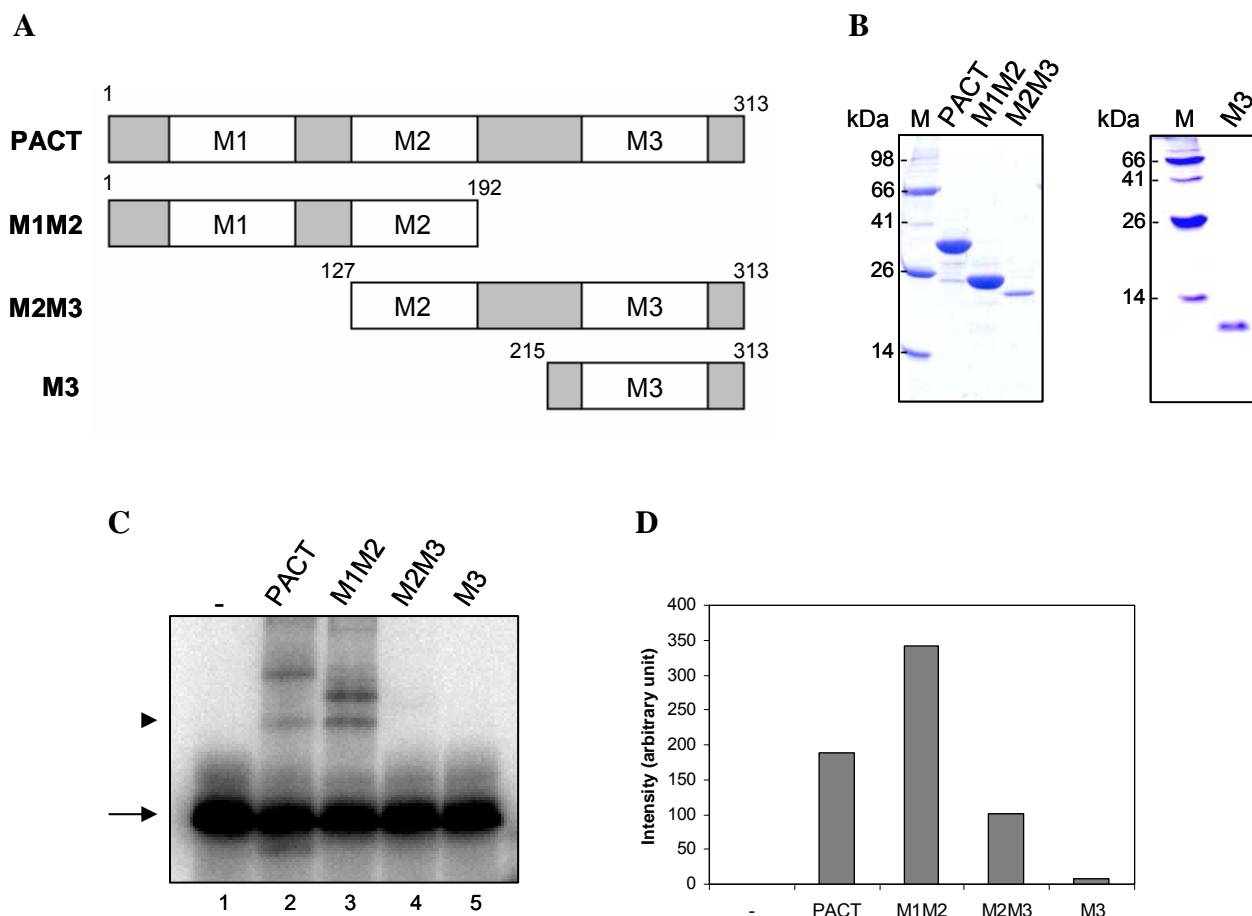


Figure 3: PACT interacts with the 3'SLDV RNA. **A**, Graphic representation of PACT and of its dsRNA binding domains M1, M2 and M3 that were expressed in *E. coli*. The amino acid composition of each domain is indicated. **B**, PACT, M1M2 and M2M3 were refolded after nickel affinity chromatography purification under denaturing conditions. Soluble M3 was purified by nickel affinity followed by size exclusion chromatography. **C**, Analysis of PACT, M1M2 and M2M3 interaction with 3'SLDV RNA. 4 pmol of recombinant protein was incubated with 0.3 pmol of radioactively labeled 3'SLDV RNA and UV-crosslinked. Reactions were fractionated on a SDS-13.5% PAGE and exposed to an image plate. The free probe is indicated by an arrow, and an unidentified band is indicated by an arrow head. **D**, Quantification of recombinant protein interaction with the 3'SLDV RNA. The graph shows the amount of probe bound to the protein relative to the amount of free probe.

RNA-protein interaction was confirmed by UV-crosslinking of recombinant protein incubated with ³²P-labeled 3'SLDV (Fig. 3 C, D). M1M2 domain shows ~1.8x higher affinity to the 3'SLDV RNA than PACT and ~3.4x higher affinity than M2M3. M3 showed very weak RNA interaction.

Recombinant human PACT interacts with the top stem-loop of the dengue virus 3'SL

In order to determine PACT-3'SLDV interaction specificity, we compared the PACT-3'SLDV interaction affinity to the affinity of PACT to the RNA IRE (iron responsive element), a 46 nt RNA used as Y3H positive control in combination with IRP1 and BS, a 92 nt synthetic RNA transcribed from pBluescriptII KS(+) (Stratagene). The probe and competitors were annealed in order to assure that the RNA contained secondary structure and double strands. Unlabeled competitor RNAs were added to the UV-crosslinking reaction at increasing concentrations relative to the radioactively labeled probe. Unlabeled 3'SLDV RNA competes more efficiently with ^{32}P -3'SLDV for PACT interaction than the unlabeled IRE or BS RNAs at the same concentration (Fig. 4 A, compare lanes 3, 6 and 9). This result indicates that PACT can interact with the 3'SLDV RNA with higher affinity than with the IRE or BS RNAs under the conditions used in this assay. In addition, PACT seems to interact more efficiently with IRE than with BS RNA (compare lanes 5-7 and 8-10). To identify the 3'SLDV region that interacts with PACT, deletions of the RNA molecule were designed based on the 3'SL subregions defined by Zeng *et al.* (1998). RNAs were synthesized that, when reannealed, can reconstitute the full stem, the top stem-loop and the bottom stem (Fig. 4 B). These RNAs were used as competitors in RNA interaction assays (Fig. 4 C). At the same concentration, the unlabeled top stem-loop competes more efficiently with ^{32}P -3'SLDV for PACT interaction than the unlabeled full stem or the bottom stem RNAs (Fig. 4 C, compare lanes 3, 6 and 9). This result indicates that PACT interacts with 3'SLDV preferentially at the region of top stem-loop.

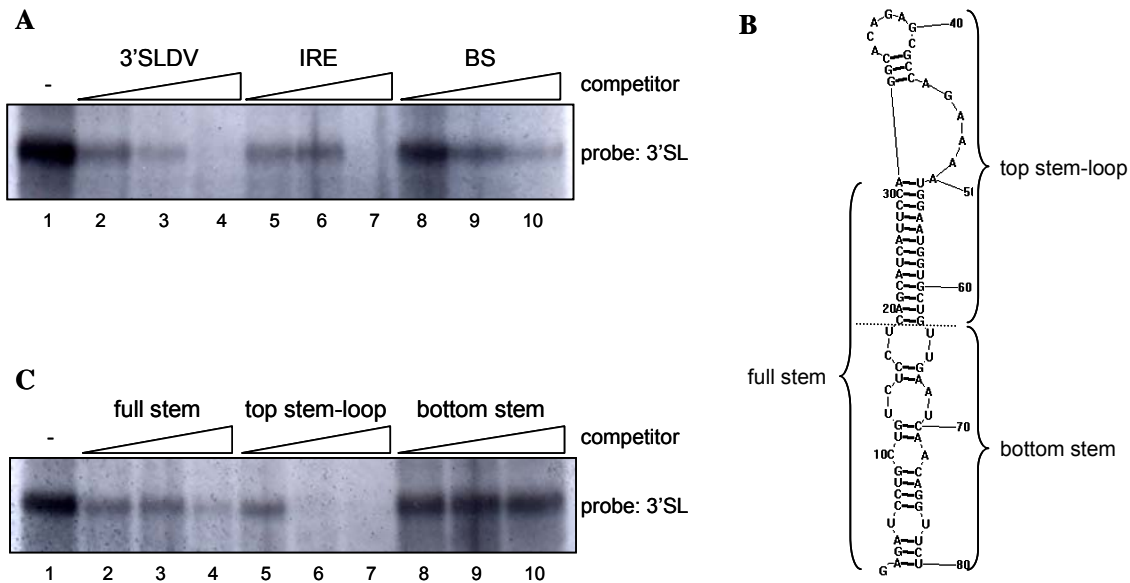


Figure 4: **A**, Recombinant PACT interacts with 3'SLDV with higher affinity than with IRE and BS. 25 pmol of purified recombinant protein was incubated with 8 pmol of radioactively labeled 3'SLDV RNA, exposed to UV light, treated with RNaseA and fractionated in SDS-12% PAGE (lane 1). Unlabeled competitor RNAs were added to the reaction: 8, 16 and 40 pmol of 3'SLDV (lanes 2-4), IRE (lanes 5-7) and BS (lanes 8-10). **B**, 3'SLDV regions based on Zeng *et al.* (1998). The regions are designated as full stem, bottom stem and top stem-loop. **C**, Recombinant PACT interacts with dengue virus 3'SL top stem-loop. Reaction was assembled as described in A. Unlabeled competitor RNAs were added to the reaction: 16, 40 and 80 pmol of full stem (lanes 2-4), top stem-loop (lanes 5-7) and bottom stem (lanes 8-10).

HEK293 cells endogenous PACT interacts with 3'SLDV

To test whether the HEK293 cells endogenous PACT interacts with the 3'SLDV RNA, biotin labeled 3'SLDV RNA was incubated with HEK293 S10 extracts and the RNA was purified using Streptavidin-agarose beads (Fig. 5). As controls, the IRE and BS RNAs were also biotin-labeled and used in the RNA affinity chromatography. Fractions of unbound protein, wash and resin-retained protein were fractionated on SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and PACT was identified by immunoblotting. HEK293 cells endogenous PACT interacted very poorly with resin without RNA (Fig. 4 lane 3) whereas it strongly interacted with biotinylated 3'SLDV RNA (lane 6) and also with IRE and BS RNAs (lanes 9 and 12). Interaction of PACT with IRE and BS biotinylated RNAs was expected in this assay since 3'SLDV-PACT interaction could be disrupted by adding high concentrations of the IRE and BS RNAs, indicating that PACT can interact with these molecules. A competition assay in the RNA affinity chromatography was attempted using increasing concentrations of unlabeled poly(I)-poly(C) to elute PACT, but PACT could not be eluted in this condition.

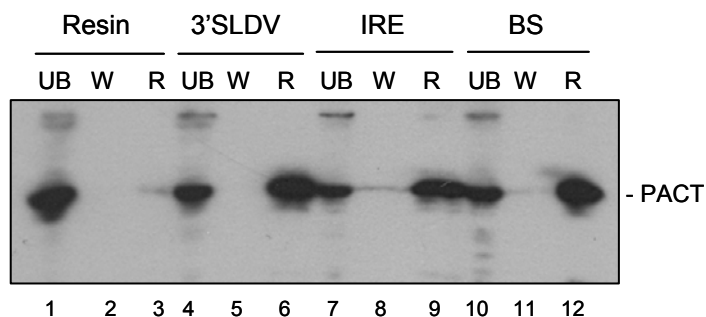


Figure 5: HEK293 cells endogenous PACT interacts with RNA. HEK293 S10 extract was incubated without biotin-labeled RNA (Resin) or with the biotin-labeled 3'SLDV, IRE or BS RNAs. The reaction was incubated with Streptavidin agarose beads. Fractions of unbound proteins (UB), wash (W) and the resin-retained proteins (R) were fractionated on SDS-12% PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. PACT was identified by immunoblotting.

PACT-knockdown cells

In order to investigate the role of PACT during dengue virus infection, we constructed PACT-knockdown HEK293 cells using the pMaleficent plasmid-based RNAi system (Heggestad *et al.* 2004). This system can generate cell lines with continuous expression of gene silencing hairpin RNA. The system combines the gene silencing capabilities of RNA Pol III driven short hairpin RNAs with the advantages of transposon-based gene delivery. Transposon-mediated genomic integration ensures that the hairpin RNA expression cassette, as well as the drug resistance gene, remains intact. Cell clones resistant to geneticin were selected and PACT knockdown was confirmed by quantitative RT-PCR and immunoblotting (Fig. 6).

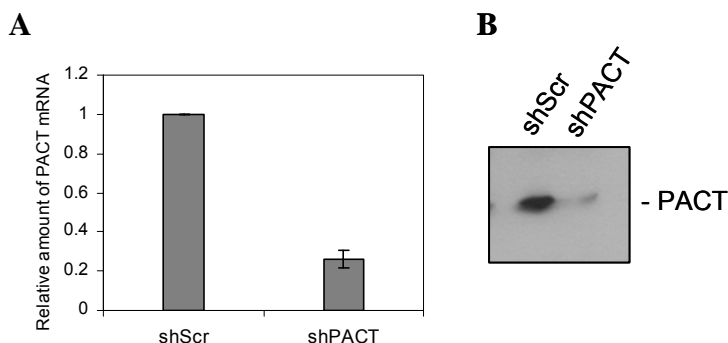


Figure 6. Analysis of PACT levels in HEK293 cells expressing short hairpin (shRNA) against PACT mRNA. **A**, Analysis of the PACT mRNA levels by quantitative RT-PCR. shScr indicates the control cells expressing the scrambled sequence of the shRNA, shPACT indicates the cells containing the shRNA against PACT. **B**, Analysis of PACT protein levels by immunoblotting in shScr and shPACT RNA containing cells.

A cell clone with approximately 80% PACT inhibition was selected for further analysis. It will be infected with dengue virus and evaluated for virus translation and replication efficiency. PKR activation and eIF2 α phosphorylation will also be determined. The dengue virus proliferation rate in cells knockdown for PACT relative to cells with normal PACT levels should answer the question whether PACT interaction with dengue virus 3'SL RNA is important for PKR activation and cell protection against dengue virus infection.

Discussion

Since the 3'SL of *Flavivirus* is central for viral replication, the need to identify the human proteins that are able to interact specifically with dengue virus 3'SL RNA is widely emphasized by many studies, which may help explain the mechanisms of interaction between the viral RNA and cellular host proteins during replication and translation of the virus RNA. The yeast three-hybrid system developed by SenGupta *et al.* (1996) and subsequently improved by Hook *et al.* (2005) is a useful tool to screen for specific protein-RNA interactions. This system has the advantage that it is an *in vivo* method based on a cDNA library screen, resulting in immediate gene identification and availability. PACT was identified as a putative 3'SLDV-interacting protein using this system. The evidence supporting the specificity of the PACT-3'SLDV interaction is initially based on the fact that PACT was able to interact with 3'SLDV RNA, but not with the IRE RNA which was the control used in the yeast three-hybrid assay, unlike other proteins that were isolated in the screen but did not distinguish the 3'SLDV from the IRE control RNA. In addition, the direct 3'SL-PACT interaction was confirmed *in vitro* using a UV-crosslinking assay performed with recombinant PACT and radioactively-labeled 3'SL RNA. Competition experiments showed that PACT binds the 3'SL RNA with a higher affinity than the IRE and BS RNAs and that the interaction with the 3'SL RNA should take place by binding to the top stem loop of the 3'SL RNA. HEK293 cells endogenous PACT could also interact with biotinylated 3'SLDV in RNA affinity chromatography assays, indicating that this interaction might be physiologically relevant. The 3'SLDV is the first biologically functional RNA identified to interact with PACT, since all PACT-RNA interaction analyses described previously were performed with synthetic double-stranded poly(I)-poly(C) RNAs (Patel and Sen 1998, Peters *et al.* 2001, Huang *et al.* 2002). Full length PACT and its domains M1M2 and M2M3 showed interaction with 3'SLDV RNA. M1M2 showed higher affinity to RNA than full length PACT and the M2M3 domains. These results are in agreement with the literature data describing that M1 has higher RNA

binding affinity than M2. M3 RNA interaction was very weak, and literature data indicate that this domain is not able to bind dsRNA (Peters *et al.* 2001, Huang *et al.* 2002).

PACT was initially identified as a cellular protein activator of PKR (Patel and Sen 1998, Ito *et al.* 1999), a serine/threonine protein kinase induced by interferon and previously known to be activated by dsRNA (double-stranded RNA), a frequent by-product of virus replication in cells. Upon binding to the activator, the ATP-binding site of PKR is unmasked due to a conformational change, and PKR undergoes autophosphorylation on several sites. The best described physiological substrate of PKR activity is the α -subunit of the eukaryotic translation initiation factor eIF2 (Samuel 1993). Phosphorylation of eIF2 α on serine 51 by PKR leads to general reduction of protein synthesis rates (Hershey 1991). PKR is also involved in regulation of cellular proliferation, differentiation, apoptosis and signal transduction (Meurs *et al.* 1993, Judware and Petryshyn 1991, Jagus *et al.* 1999, Williams 1999, Williams 1995, Kumar *et al.* 1997, Ruvolo *et al.* 2001). PACT and its mouse ortholog RAX contain three dsRNA binding motifs, but only the two N-terminal motifs have the conserved aminoacids required for dsRNA binding. The third motif does not bind dsRNA and is responsible for PKR activation (Peters *et al.* 2001). PKR activation by PACT can cause inhibition of cellular protein synthesis and apoptosis (Ito *et al.* 1999, Patel *et al.* 2000, Peters *et al.* 2001, Huang *et al.* 2002, Lee *et al.* 2007). PACT may have a role in host antiviral defense, since PACT activation of PKR during viral infection is inhibited by herpes simplex virus type 1 Us11 protein (Peters *et al.* 2002) and PACT and dsRNA activation of PKR is inhibited by influenza virus NS1 protein (Li *et al.* 2006).

The yeast three-hybrid data together with the *in vitro* PACT-3'SL interaction assays indicate that this interaction shows a higher specificity relative to the IRE RNA and to a random RNA sequence generated from *in vitro* transcription of the pBluescript plasmid. The fact that both PACT and PKR belong to the cellular antiviral response pathway suggests that the PACT-3'SLDV interaction is plausible in a physiological cellular context. Therefore, further investigation of the PACT function is required to determine its role in the PKR activation mechanism in the context of dengue virus infection.

References

- Alvarez DE, Lodeiro MF, Ludueña SJ, Pietrasanta LI, Gamarnik AV. 2005a. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol.* 79:6631-6643.
- Alvarez DE, de Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV. 2005b. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology.* 339:200-212.
- Alvarez DE, Filomatori CV, Gamarnik AV. 2008. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology.* 375(1):223-235.
- Aravind L, Ponting, CP. 1998. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation, *Protein Sci.* 7:1250-1254.
- Bennett RL, Blalock WL, Abtahi DM, Pan Y, Moyer SA, May WS. 2006. RAX, the PKR activator, sensitizes cells to inflammatory cytokines, serum withdrawal, chemotherapy, and viral infection. *Blood.* 108:821-829.
- Blackwell JL, Brinton MA. 1997. Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *J Virol.* 71:6433-6444.
- Carneiro FR, Silva TC, Alves AC, Haline-Vaz T, Gozzo FC, Zanchin NI. 2006. Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. *Biochem Biophys Res Commun.* 343:260-268.
- Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. 1997a. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol.* 71:3466-3473.
- Chiu WW, Kinney RM, Dreher TW. 2005. Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J Virol.* 79:8303-315.
- Davis WG, Blackwell JL, Shi PY, Brinton MA. 2007. Interaction between the cellular protein eEF1A and the 3'-terminal stem-loop of West Nile virus genomic RNA facilitates viral minus-strand RNA synthesis. *J Virol.* 81:10172-10187.
- De Nova-Ocampo M, Villegas-Sepúlveda N, del Angel RM. 2002. Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology.* 295:337-347.
- Emara MM, Brinton MA. 2007. Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:9041-9046.
- Figueiredo LTM. 1990. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovirus das famílias Togaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae e Rhabdoviridae. *Rev Soc Bras Med Trop.* 23:13-18.
- Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, Gamarnik AV. 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* 20:2238-2249.
- García-Montalvo BM, Medina F, del Angel RM. 2004. La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Res.* 102:141-150.

- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:4645-4649.
- Heggestad AD, Notterpek L, Fletcher BS. 2004. Transposon-based RNAi delivery system for generating knockdown cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 316:643-650.
- Hershey JW. 1991. Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*. 60:717-755.
- Holden KL, Harris E. 2004. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology*. 329:119-133.
- Hook B, Bernstein D, Zhang B, Wickens M. 2005. RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *RNA*. 11:227-233.
- Huang X, Hutchins B, Patel RC. 2002. The C-terminal, third conserved motif of the protein activator PACT plays an essential role in the activation of double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR). *Biochem J*. 366:175-186.
- Ito T, Yang M, May WS. 1999. RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling. *J Biol Chem*. 274:15427-15432.
- Jagus R, Joshi B, Barber GN. 1999. PKR, apoptosis and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 31:123-138.
- Jobling SA, Cuthbert CM, Rogers SG, Fraley RT, Gehrke L. (1988) In vitro transcription and translational efficiency of chimeric SP6 messenger RNAs devoid of 5' vector nucleotides. *Nucleic Acids Res*. 16:4483-4498.
- Judware R, Petryshyn R. 1991. Partial characterization of a cellular factor that regulates the double-stranded RNA-dependent eIF-2 alpha kinase in 3T3-F442A fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 11:3259-3267.
- Kumar A, Yang YL, Flati V, Der S, Kadereit S, Deb A, Haque J, Reis L, Weissmann C, Williams BR. 1997. Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB. *EMBO J*. 16:406-416.
- Lee ES, Yoon CH, Kim YS, Bae YS. 2007. The double-strand RNA-dependent protein kinase PKR plays a significant role in a sustained ER stress-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 581:4325-4332.
- Li S, Min JY, Krug RM, Sen GC. 2006. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology*. 349:13-21.
- Markoff L. 2003. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res*. 59:177-228.
- Meurs EF, Galabru J, Barber GN, Katze MG, Hovanessian AG. 1993. Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:232-236.
- Müllner EW, Neupert B, Kühn LC. 1989. A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell*. 58:373-382.
- Paranjape SM, Harris E. 2007. Y box-binding protein-1 binds to the dengue virus 3'-untranslated region and mediates antiviral effects. *J Biol Chem*. 282:30497-30508.
- Patel RC, Sen GC. 1998. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J*. 17:4379-4390.

- Patel CV, Handy I, Goldsmith T, Patel RC. 2000. PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem.* 275:37993-37998.
- Peters GA, Hartmann R, Qin J, Sen GC. 2001. Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol.* 21:1908-1920.
- Peters GA, Khoo D, Mohr I, Sen GC. 2002. Inhibition of PACT-mediated activation of PKR by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol.* 76:11054-11064.
- Ruvolo PP, Gao F, Blalock WL, Deng X, May WS. 2001. Ceramide regulates protein synthesis by a novel mechanism involving the cellular PKR activator RAX. *J Biol Chem.* 276:11754-11758.
- Samuel CE. 1993. The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans. *J Biol Chem.* 268:7603-7606.
- SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M. 1996. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8496-8501.
- The QiaexpressionistTM. 2003. 5th edition. Qiagen.
- Wengler G, Wengler G. 1981. Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology.* 113:544-555.
- Williams BR. 1995. The role of the dsRNA-activated kinase, PKR, in signal transduction. *Semin Virol.* 6:191-202.
- Williams BR. 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* 18:6112-6120.
- Yan SZ, Beeler JA, Chen Y, Shelton RK, Tang WJ. 2001. The regulation of type 7 adenylyl cyclase by its C1b region and *Escherichia coli* peptidylprolyl isomerase, SlyD. *J Biol Chem.* 276:8500-8506.
- You S, Padmanabhan R. 1999. A novel *in vitro* replication system for dengue virus. *J Biol Chem.* 274:33714-33722.
- You S, Falgout B, Markoff L, Padmanabhan R. 2001. In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *J Biol Chem.* 276:15581-15591.
- Zeng L, Falgout B, Markoff L. 1998. Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3'SL in the Dengue type 2 virus genome required for replication. *J Virol.* 72:7510-7522.

4- DISCUSSÃO

4.1- A proteína Mov34 humana

4.1.1- Função

A proteína Mov34 humana não foi capaz de interagir com a estrutura 3' *stem-loop* do RNA dos vírus da dengue e da encefalite japonesa, contrariando os resultados apresentados por Ta e Vрати (2000). A possibilidade de não ter sido possível detectar a interação por problemas técnicos foi excluída tomando em consideração os controles realizados em paralelo com a proteína IRP1 e o seu RNA alvo IRE. Apesar de Mov34 possuir uma estrutura típica de metaloprotease, esta não possui o motivo conservado JAMM (EX_nHS/THX₇SXXD) de coordenação de zinco, não sendo portanto capaz de coordenar metal (Sanches *et al.* 2007). Esta proteína ainda não teve a sua função molecular determinada. Porém, outra proteína da família Mov34 que possui um domínio MPN livre de metal, a proteína Prp8p de *Saccharomyces cerevisiae* (Pena *et al.* 2007), é capaz de se ligar a ubiquitina (Bellare *et al.* 2006). Isto sugere que outras proteínas que possuam o domínio MPN livre de metal, como a Mov34 humana, também possam interagir com ubiquitina. Porém, esta hipótese ainda não foi testada.

4.1.2- Estrutura

O capítulo II dos resultados apresenta um artigo publicado que descreve estudos estruturais da proteína Mov34 humana. Os estudos de proteólise limitada seguidos de espectrometria de massas permitiram a definição de um domínio estrutural com alto grau de segurança. A subsequente clonagem do domínio possibilitou que o mesmo fosse produzido em altos níveis em *E. coli*. Análises do conteúdo de estruturas secundárias bem como de estabilidade térmica deixaram claro que a região compreendendo os aminoácidos 1 a 186 forma a estrutura mais energeticamente favorável, o que permitiu sua subsequente cristalização. À época desta análise ainda não havia na literatura a descrição da estrutura cristalográfica de nenhuma proteína com domínio MPN livre de metal. Por isso foi gerado um modelo por homologia visando-se obter dados sobre a relação estrutura-função do domínio MPN da Mov34. Apesar das limitações da construção de modelos teóricos com base em *templates* de baixa similaridade como foi neste caso, onde uma proteína humana foi alinhada com outra de *Archaea*, o modelo mostrou-se relativamente consistente quanto ao enovelamento geral e à predição dos elementos de estrutura secundária. A principal discrepância entre o modelo e a estrutura cristalográfica do domínio MPN da Mov34 humana, apresentada no apêndice desta tese, envolve a possível interação da

proteína com zinco. Apesar da Mov34 humana não possuir o motivo JAMM conservado, no modelo por homologia procurou-se encontrar aminoácidos substitutos na sequência que poderiam coordenar um íon de zinco. Foi então proposto um domínio putativo de ligação a metal constituído pelos aminoácidos Q32, H96, H102 e D105. Porém, estudos cristalográficos do domínio MPN da Mov34 humana mostram que esta proteína não é capaz de coordenar metal, nem mesmo quando o cristal é mergulhado em uma solução de $ZnCl_2$ (Sanches *et al.* 2007). A Figura 4.1 mostra a posição dos aminoácidos Q32, H96, K100, H102 e D105 na estrutura cristalográfica do domínio MPN. Como se pode observar, na Mov34 humana a região correspondente ao sítio de ligação a zinco de proteínas que possuem o motivo JAMM conservado possui a substituição de uma histidina por uma lisina, a K100. Isto provavelmente aboliu a afinidade a metal da proteína Mov34 humana. A glutamina 32, um dos aminoácidos do domínio putativo de ligação a metal apresentado no capítulo II dos resultados, não aponta para o centro da região correspondente ao sítio de ligação a zinco, além de estar localizada em uma alça longe desta, comprovando que este aminoácido não participa da coordenação de metal nesta proteína.

A estrutura cristalográfica do domínio MPN também explica os dados de estabilidade térmica apresentados no capítulo II dos resultados desta tese. Os resíduos 8-11 do domínio MPN forma a fita β_1 que interage com β_3 e β_9 , formando uma folha beta (Figura 1 A do apêndice). Logo, a deleção dos resíduos 1-8 provavelmente rompeu esta folha beta comprometendo o enovelamento dos domínios MPN 9-177 e MPN 9-186. Isto explica o fato de que os domínios MPN 9-177 e MPN 9-186 apresentaram um conteúdo de α -hélice maior que os domínios MPN 1-177 e MPN 1-186 nas análises de dicroísmo circular, pois o rompimento de uma folha beta aumentaria a proporção relativa de α -hélice em relação ao resto do domínio, mudando o aspecto do gráfico. Além disso, o rompimento desta folha beta poderia comprometer a estabilidade dos domínios MPN 9-177 e MPN 9-186, o que é indicado pela redução da sua estabilidade térmica comparada com a estabilidade dos domínios MPN 1-177 e MPN 1-186. No caso da cristalização, a construção MPN 1-177 interrompe prematuramente a α -hélice C-terminal (α_4) que se forma corretamente na construção MPN 1-186. A estrutura cristalográfica mostra que o domínio MPN forma dímeros, sendo a α_4 essencial para a interação entre os monômeros através de um mecanismo de intercâmbio desta hélice entre os monômeros denominado “*domain swap*” (Figura 1 B do apêndice).

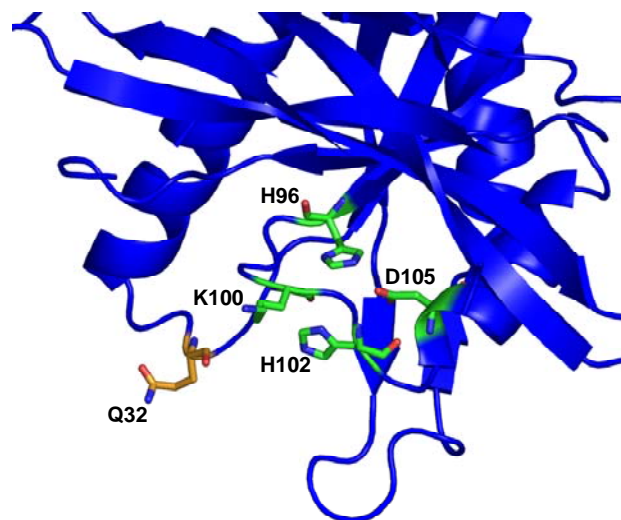


Figura 4.1: Detalhe da estrutura cristalográfica do domínio MPN da proteína Mov34 humana. Em verde estão destacados os aminoácidos presentes na posição estrutural equivalente à da região de coordenação de zinco das proteínas que possuem o motivo conservado JAMM. Em laranja está destacada a glutamina 32, um dos aminoácidos do domínio putativo de ligação a metal proposto no modelo por homologia no capítulo II dos resultados.

4.2- A proteína PACT

O capítulo III dos resultados apresenta um manuscrito em preparação que descreve a identificação de PACT como uma nova proteína humana capaz de interagir com a estrutura 3'SL do RNA do vírus da dengue. Neste manuscrito foi mostrado que PACT interagiu com maior afinidade com o RNA 3'SLDV do que com os RNAs controle IRE e BS. Além disso, a região *stem-loop* superior foi mapeada como sendo o principal sítio de ligação de PACT ao 3'SLDV. Este trabalho é o primeiro a identificar um RNA biologicamente relevante que interage com PACT, uma vez que todos os dados da literatura de interação de PACT com RNA foram feitos com o RNA dupla-fita sintético poli(I)-poli(C) (Patel e Sen 1998, Peters *et al.* 2001, Huang *et al.* 2002).

O método escolhido para a identificação de novas proteínas capazes de interagir com o 3'SL do vírus da dengue foi o sistema de triplo-híbrido de leveduras. No sistema desenvolvido por SenGupta *et al.* (1996) a linhagem de levedura L40-coat é derivada da linhagem L40 (Hollenberg *et al.* 1995), usada para integrar no genoma, junto com o gene marcador *TRP1*, o gene da proteína de fusão constituída da proteína *lexA* (ligadora de DNA) e da proteína do capsídeo do bacteriófago MS2 (MS2 Coat protein) que se liga a uma estrutura específica do RNA do MS2. No sistema de triplo-híbrido, a proteína de fusão *lexA/MS2* se liga ao RNA híbrido de MS2 fusionado ao RNA de interesse (Figura 4.2, RNA X). O RNA de interesse se ligaria de modo específico às proteínas da biblioteca de cDNA fusionados ao

domínio de ativação de *GAL4*, ativando a transcrição dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* (Figura 4.2, A). De $8,5 \times 10^4$ colônias testadas utilizando a cepa de levedura L40-coat transformada com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal de mamíferos, 303 cresceram na presença de 3 mM de 3-AT, 152 cresceram após repique em meio de cultura novo e 89 apresentaram coloração azul no teste da β -galactosidase. O plasmídeo foi isolado destas colônias e a presença de inserto foi confirmada pela digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. Somente 27 plasmídeos possuíam insertos e a identidade destes foi obtida por seqüenciamento de DNA. Dentre os 16 plasmídeos seqüenciados, foram identificadas algumas proteínas que sabidamente interagem com RNA, como proteínas ribossomais, proteína de exportação de RNA, ribonucleoproteína, entre outras. Porém, após a re-transformação destas com os vetores do triplo-híbrido que expressam a molécula híbrida de RNA, nenhuma apresentou interação específica com o RNA do vírus da dengue, já que as leveduras cresceram na presença do vetor vazio ou de um RNA não relacionado. Desta forma, este ensaio se mostrou extremamente laborioso e pouco eficaz. A proteína do capsídeo de MS2 utilizada no sistema deve se dimerizar para poder interagir com o RNA MS2 (Bardwell e Wickens 1990) (Figura 4.2, B). Deste modo, monômeros da proteína do capsídeo de MS2 ligados ao promotor teriam uma grande superfície exposta que poderia se ligar a outras proteínas com grande afinidade, ativando a transcrição dos genes repórteres sem a ligação ao RNA. Mais ainda, monômeros estariam inativos no ensaio, ocupando promotores de *lexA* improdutivamente. Isso pode levar a um grande número de falso positivos (independentes do RNA), que pode chegar a mais de 95% do número de colônias obtidas no sistema de triplo-híbrido, e com isso tornar a triagem mais trabalhosa e problemática (Hook *et al.* 2005), como confirmado pelos nossos resultados. Para contornar este problema, Hook *et al.* (2005) criaram uma nova cepa de levedura que facilita a detecção das proteínas presentes nas bibliotecas de cDNA que se ligam especificamente ao RNA de interesse. Esta nova cepa, denominada YBZ1, codifica um dímero antiparalelo *in tandem* da proteína do capsídeo de MS2 fusionado a um monômero de *lexA* conforme demonstrado na Figura 4.2 C. Além disso, cada subunidade do dímero possui uma mutação pontual (N55K) que aumenta a afinidade da interação proteína-RNA (Lim *et al.* 1994). Hook *et al.* (2005) demonstram que YBZ1 foi capaz de isolar um alto número de interações genuínas, dependentes de seqüência, enquanto L40-coat não foi capaz. Isso simplifica a triagem ao reduzir drasticamente o número de positivos independentes de RNA obtidos na transformação inicial, enquanto aumenta a fração de positivos que são seqüência-específicos em vários passos da triagem.

De $5,9 \times 10^5$ colônias testadas utilizando a cepa de levedura YBZ1 transformada com a biblioteca de cDNA de medula óssea humana, 35 cresceram na presença de 3 mM 3-AT e 34

apresentaram coloração azul no teste da β -galactosidase. O plasmídeo foi isolado destas colônias e a presença de inserto foi confirmada pela digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. 24 possuíam inserto e a identidade destes foi obtida por seqüenciamento de DNA. Novamente, proteínas ribossomais, uma subunidade do fator de iniciação da tradução eIF2B e proteínas que possuem *zinc finger*, dentre outras, foram isoladas no ensaio. A Tabela 4.1 apresenta um resumo das proteínas isoladas nos dois ensaios de triplo-híbrido realizados utilizando o 3'SL do RNA do vírus da dengue como isca. Representantes dos grupos de proteínas foram re-transformados em YBZ1 para verificar se a proteína isolada era capaz de ativar a transcrição do gene repórter na ausência do RNA híbrido específico. Somente o clone 6.7, identificado como sendo a proteína PACT, foi capaz de crescer exclusivamente na presença do RNA 3'SLDV. Logo, concluiu-se que este clone interage especificamente com o 3'SL RNA do vírus da dengue (3'SLDV) utilizando este tipo de ensaio. Apesar de trabalhoso, o ensaio de triplo-híbrido utilizando a cepa de levedura YBZ1 se mostrou eficaz em identificar novas interações proteína-RNA. Porém, nenhuma proteína com interação já conhecida com 3'SLDV, como autoantígeno La, eIF1A, YB-1, hnRNPQ, dentre outras, foi isolada em nossos ensaios de triplo-híbrido de levedura. Isto provavelmente se deve ao fato de o número de transformantes testados ter sido estatisticamente baixo. Todavia, a especificidade da interação PACT-3'SLDV justifica a continuidade da sua caracterização funcional.

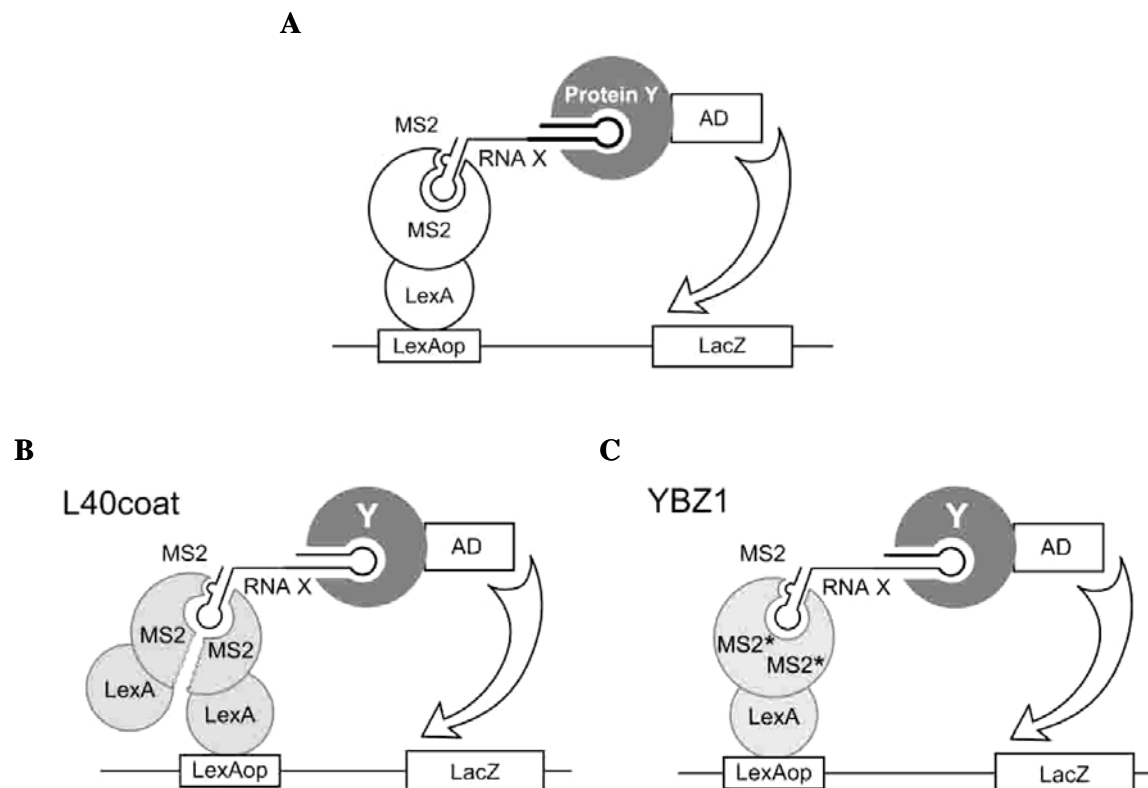


Figura 4.2: **A**, Esquema do sistema de triplo-híbrido em levedura. *lexAop*: operador *lexA*. Proteínas híbridas: *lexA* (domínio de ligação a *lexA*) fusionado com proteína ligante a MS2 e *GAL4 AD* (domínio de ativação da transcrição de *GAL4*) fusionado com proteínas de uma biblioteca de cDNA (proteína Y). RNA híbrido: MS2 fusionado com RNA de interesse (RNA X). Quando essas moléculas interagem conforme ilustrado, ocorre a ativação da transcrição dos genes repórteres, como o *lacZ*. Deste modo pode-se observar a interação entre as proteínas de fusão e o RNA isca de modo indireto. **B**, Esquema da interação entre as moléculas híbridas na cepa de levedura L40-coat. Destaque para o dímero de MS2 Coat que deve ser formado para a interação com o RNA MS2. **C**, Esquema da interação entre as moléculas híbridas na cepa de levedura YBZ1. O dímero *in tandem* da proteína do capsídeo de MS2 possui a mutação N55K, caracterizada por MS2*. Figura adaptada de Hook *et al.* (2005).

Tabela 4.1: Proteínas isoladas por triplo-híbrido utilizando 3'SL como isca.

Cepa de levedura: L40-coat, Biblioteca: cérebro fetal humano		
	Frame	E-value
Phosphorylated adaptator for RNA export	+1	1e-71
Homo sapiens zinc finger protein 771 (Blast N)	-	8e-151
Mitochondrial ribossomal protein L15	+1	4e-65
Ribossomal protein S15	+2	9e-42
Similar to insulinoma protein (rig)	+2	4e-19
Fator de transcrição AP1	+1	3e-40
PNAS-13		
Similar to RP9 (retinitis pigmentosa 9 protein)	+1	1e-14
Heat shock 105kDa/110kDa protein 1, isoform CRA_b	+1	3e-43
Chaperonin containing TCP1, subunit 5 (predicted)	+1	2e-40
Small nuclear ribonucleoprotein D1	+1	1e-41
Mitochondrial tumor suppressor 1 (MTUS1) (Blast N)	-	0.0
Similar to ribossomal protein S7	+1	5e-65
high-mobility group protein 2-like 1, isoform CRA_b e c	+1	2e-65
Similar to 40S ribossomal protein S3a (v-fos transformation effector protein)	+1	6e-62
Ribosomal protein L5, isoform CRA_b	+1	4e-31
Tissue factor pathway inhibitor precursor (TFPI) (Lipoprotein-associated coagulation inhibitor) (LACI) (Extrinsic pathway inhibitor) (EPI)	+1	4e-59
Similar to ribosomal protein S3a [Bos taurus]	+1	5e-76
Topoisomerase I binding, arginine/serine-rich	+1	9e-20
p53 binding protein		
poli A (10 clones isolados)		
Seqüenciamento não funcionou (3 clones isolados)		
Cepa de levedura: YBZ1, Biblioteca: medula óssea humana		
Retinoic acid receptor alpha, RAR alpha (PLZF=zinc finger protein, PLZF-RAR alpha isoform A=fusion protein)	+1	2e-41
Zinc finger and BTB domain containing 16 variant (3 clones isolados)		
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide variant (14-3-3) (5 clones isolados)	+1	9e-23
Transmembrane protein 49 (TMEM49), mRNA (Blast N)		0.0
Methyl-CpG binding domain protein 1 [Pan troglodytes]	+1	1e-06
Tetratricopeptide repeat domain 16, isoform CRA_b	+1	3e-58
Ribosomal protein S24, isoform CRA_e	+1	4e-24
Myeloid cell nuclear differentiation antigen	+1	2e-70
Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha, 26kDa, isoform CRA_b	+1	3e-28
Similar to HSPC323 (2 clones isolados)	+1	3e-17
60S ribosomal protein L22 (Epstein-Barr virus small RNA-associated protein) (EBER-associated protein) (EAP) (Heparin-binding protein HBp15)	+1	2e-42
Ribosomal protein S14	+1	2e-61
Azurocidin precursor (Cationic antimicrobial protein CAP37) (Heparin-binding protein)	+3	3e-16
Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	+1	2e-46
Seqüenciamento não funcionou (4 clones isolados)		

PACT e sua ortóloga em camundongo RAX foram identificadas independentemente como proteínas celulares ativadoras de PKR (Patel e Sen 1998, Ito *et al.* 1999). Estas proteínas são quase idênticas em seqüência. PACT, RAX e PKR são capazes de se ligar a dsRNA através dos motivos de ligação a dsRNA (dsRBM). dsRBM, um motivo conservado em diversas proteínas que ligam dsRNA, assume a estrutura α - β - β - β - α e se liga à forma A de dsRNA de uma maneira independente de seqüência (Tian *et al.* 2004). O mesmo motivo também medeia a interação direta entre proteínas, podendo gerar homo e heterodímeros entre proteínas membros desta família.

4.2.1- Ativação de PKR por PACT

PACT possui três motivos dsRBMs, denominados M1, M2 e M3. O domínio M3 é o menos conservado e não possui resíduos de lisina conservados que podem ser importantes para a interação com dsRNA. Os domínios M1 e M2 de PACT são responsáveis pela sua interação com os motivos dsRBM de PKR e o domínio M3 é o responsável pela ativação de PKR independente de dsRNA (Peters *et al.* 2001, Huang *et al.* 2002). O domínio M3 de PACT interage com PKR entre os aminoácidos 326-337, definido como o domínio de ligação a PACT (PBM), que se encontra dentro da região da enzima que possui atividade de quinase (Li *et al.* 2006a). PKR possui dois motivos dsRBMs compreendidos entre os aminoácidos 1-170, o dsRBM1 e o dsRBM2. Foi demonstrado que PBM se liga ao dsRBM2 (Li *et al.* 2006a), o que mantém PKR em uma conformação latente inativa. A ligação de dsRNA ao dsRBM2 ou a ligação do M3 de PACT ao PBM rompe esta interação intramolecular e induz mudanças conformacionais similares que levam à ativação da enzima. Os resíduos do PBM são conservados em PKRs de outros mamíferos, mas não em outras quinases de eIF2 α (Cai e Williams 1998), indicando que a interação de M3 de PACT é PKR específica.

Dados da literatura mostram que PACT endógena ativa PKR após tratamento da célula com tapsigardina, peróxido de hidrogênio, arsenito e privação de IL3 em célula dependente desta citocina (Ito *et al.* 1999, Lee *et al.* 2007). O tratamento de células que superexpressam PACT com actinomicina D e a retirada do soro do meio de cultura das células, além dos estresses já citados anteriormente, também ativam PKR endógena (Patel *et al.* 2000, Peters *et al.* 2001, Huang *et al.* 2002, Bennett *et al.* 2004). Além da ativação de PKR, foi descrito que PACT é fosforilada em consequência destes tratamentos (Ito *et al.* 1999, Patel *et al.* 2000). Os esforços da caracterização do sítio de fosforilação de PACT geraram dados contraditórios. Bennett *et al.* (2004) identificaram a serina 18 como sendo o sítio de fosforilação de RAX. Estes autores utilizaram programas de predição de fosforilação de proteínas e fizeram substituições destes sítios putativos por alanina. Utilizando cultura de células que expressavam

estes mutantes de RAX, S18A foi o único que não apresentou fosforilação após a retirada do soro do meio de cultura. Clones celulares expressando o mutante S18A foram mais resistentes à apoptose induzida por privação de IL3 e a ativação de PKR, e consequente fosforilação de eIF2 α , foram reduzidas em relação às células controle. Além disso, os dados indicam que o estado de fosforilação de RAX não altera a afinidade de interação desta com dsRNA ou PKR. Desta forma, os autores propõem que o mutante S18A atua como um dominante negativo ao interagir com PKR mas não a ativar em condições de estresse. Os resultados de Peters *et al.* (2006) são contraditórios aos apresentados por Bennett *et al.* (2004). Para identificar resíduos essenciais de M3 de PACT, foram feitas deleções e substituições de aminoácidos deste domínio. Desta forma foram obtidos os mutantes S246A e S287A de PACT que não são mais capazes de ativar a apoptose após o tratamento com actinomicina D de células que expressavam estes mutantes. Os autores mostram que os mutantes S246A e S287A não são mais capazes de ativar PKR e nem são fosforilados em condições de estresse celular. A substituição destas serinas por aspartato, um aminoácido mimético de fosfoserina, fez com que a proteína recuperasse a capacidade de mediar a apoptose induzida por actinomicina D. A substituição das serinas 246 e 287 por treonina, outro aminoácido capaz de ser fosforilado por serina/treonina quinase, manteve a fosforilação de PACT e indução de apoptose celular após tratamento com actinomicina D. Além disso, os autores mostram que a fosforilação da S246 de PACT é constitutiva enquanto que a fosforilação de S287 é induzida por estresse. Em células que expressam os mutantes de PACT com ganho de função S246D/S287D, a ativação de PKR, fosforilação de eIF2 α e indução de apoptose celular ocorrem mesmo sem a indução de estresse. Utilizando esta abordagem, os autores mostram que a substituição da S18 descrita por Bennett *et al.* (2004) por aspartato (S18D) não induz a apoptose celular sem a aplicação de estresse. Além disso, o mutante S18A induziu apoptose após tratamento com actinomicina D, indicando que a fosforilação desta serina não seria necessária para a indução de apoptose nas condições utilizadas. Os autores ainda mostram que a fosforilação de PACT aumenta a afinidade de interação desta com PKR. Estes dados corroboram os apresentados por Patel *et al.* (2000) e poderiam explicar a indução da ativação de PKR após a fosforilação de PACT. Bennett *et al.* (2004) e Peters *et al.* (2006) utilizaram linhagens e indutores de estresse celular diferentes. Logo, é possível que diferentes tipos de estresses celulares possam ativar PACT através da fosforilação de resíduos diferentes. Mais ainda, uma possível quinase que fosforila PACT ainda não foi identificada.

Para estudar a atividade de RAX durante a resposta celular a vários estresses citotóxicos, Bennett *et al.* (2006) geraram linhagens celulares com níveis de RAX reduzidos por RNAi, com expressão de RAX exógena e com expressão do mutante RAX(S18A). Os resultados destes autores mostram que RAX é

necessária para a ativação efetiva de PKR e ativação da apoptose durante diferentes estresses citotóxicos. Células com níveis reduzidos de RAX previnem a ativação de PKR e a fosforilação de eIF2 α , a degradação de I κ B, a expressão de IRF-1 e a fosforilação de STAT1 induzidos pelo tratamento com IFN- γ /TNF- α , resultando em aumento da sobrevivência celular. Em contraste, a expressão de RAX exógeno, mas não de RAX(S18A), sensibiliza a célula ao tratamento com IFN- γ /TNF- α , mitomicina C ou privação de soro em associação com aumento da atividade de PKR e apoptose. Além disso, a expressão reduzida de RAX promove formação de colônias celulares independentes de ancoragem. Conjuntamente, estes resultados indicam que RAX pode funcionar como um regulador negativo do crescimento que é requerido para a ativação de PKR em resposta a diferentes tipos de estresses indutores de apoptose.

Lee *et al.* (2007) determinaram que PKR está envolvida na apoptose mediada por UPR através da via eIF2 α /ATF4/CHOP independentemente da sinalização por PERK. O estresse do retículo endoplasmático induzido pelo tratamento com tapsigardina, uma droga que causa liberação de Ca²⁺ pelo retículo endoplasmático, não induz a expressão de PKR, mas ativa PKR pré-existente via a indução da expressão de PACT. Mais ainda, os autores mostram que PKR está envolvida na apoptose celular induzida por tapsigardina, enquanto que PERK parece estar envolvida na sobrevivência celular sob condições de estresse de retículo endoplasmático. A UPR protege as células de diversos estresses de retículo, como sobrecarga protéica, proteínas mal enoveladas, extravasamento de Ca²⁺, entre outros. Porém, no caso da manutenção das condições de estresse do retículo endoplasmático, os sinais de estresse ativam a via de apoptose celular (Lai *et al.* 2007). Conforme citado na introdução, a infecção pelo vírus da dengue induz e regula a via da UPR, indicando que o vírus pode se beneficiar com esta resposta celular pelo alívio da citotoxicidade induzida pela infecção. Já os resultados apresentados nesta tese mostram que PACT é capaz de interagir com a estrutura 3'SL do RNA do vírus da dengue. Logo, seria interessante estudar a ação de PACT e PKR na ativação de UPR na infecção por *Flavivirus*.

4.2.2- Outras atividades de PACT

Para determinação da função fisiológica de PACT, um camundongo onde o gene de RAX foi interrompido foi desenvolvido e a expressão da proteína foi completamente inibida. Os fenótipos mais notáveis no camundongo RAX^{-/-} foram o reduzido tamanho corporal e microtia severa (Rowe *et al.* 2006). Camundongos PKR^{-/-} (Yang *et al.* 1995) não apresentam os defeitos de desenvolvimento descritos para o *knock-out* de RAX, o que nos leva a assumir que PACT/RAX pode ter funções que não são mediadas por PKR.

TRBP, outro membro da família de proteínas que possuem dsRBM, foi originalmente identificada como a proteína ligadora do RNA TAR do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (*TAR binding protein*) (Gatignol *et al.* 1991). TRBP, assim como PACT, possui três motivos dsRBM. Estas proteínas apresentam alto grau de homologia e ambas interagem com PKR. Porém TRBP, ao contrário de PACT, age como um inibidor de PKR (Daher *et al.* 2001). A proteína Dicer humana, a RNase tipo III responsável pela geração de micro-RNA (miRNA) e pequeno RNA de interferência (siRNA) no mecanismo de silenciamento gênico conhecido como interferência de RNA (Bernstein *et al.* 2001), se associa com PACT e TRBP (Lee *et al.* 2006). Kok *et al.* (2007) mostraram que PACT e TRBP interagem diretamente entre si e se associam com a Dicer para facilitar a produção de siRNA (Kok *et al.* 2007). Apesar de PACT e TRBP serem capazes de interagir diretamente, ainda não se sabe se estas podem interagir como um heterodímero com PKR *in vivo* e como este complexo poderia influenciar na atividade de PKR.

4.2.3- Ação antiviral de PACT

A ação antiviral de PACT é evidenciada pela inibição da ativação de PKR por PACT por proteínas dos vírus influenza A e herpes simplex tipo 1. A região C-terminal da proteína Us11 (Us11C) do vírus herpes simplex tipo 1 inibe a ativação de PKR tanto por dsRNA quanto por PACT (Peters *et al.* 2002). Us11C se liga ao domínio de dimerização de PKR constituído pelos aminoácidos 1-170. Este domínio de PKR é também o responsável pela sua interação com dsRNA e PACT. Porém, a interação de Us11C com PKR, e conseqüente inibição da enzima, não inibe a interação de PKR com PACT. Us11C é capaz de interagir com PACT através dos seus dois domínios N-terminais de interação com dsRNA M1 e M2. A ativação de PKR por PACT Δ 1, um mutante de PACT sem o domínio M1 que não é capaz de interagir com Us11C, ainda é inibida por Us11C. Isto indica que a inibição de PKR por esta proteína viral é independente da sua interação com PACT.

A proteína NS1 do vírus influenza A se liga à região compreendida entre os aminoácidos 170-230 de PKR, uma região de articulação entre o domínio de dimerização e de quinase. Esta interação inibe a ativação de PKR tanto por PACT quanto por dsRNA (Li *et al.* 2006b). Apesar de NS1 ser capaz de se ligar a dsRNA, a inibição de PKR por esta proteína é independente de dsRNA, uma vez que um mutante de NS1 que não é capaz de interagir com dsRNA ainda inibe a ativação de PKR. A inibição da ativação da enzima por PACT não é mediada pela dissociação desta interação por NS1, já que as três proteínas podem ser co-immunoprecipitadas. A inibição da ativação de PKR pelas duas proteínas virais parece se dar pela intensificação das interações intramoleculares entre os domínios de dimerização e de

quinase de PKR, o que congelaria a enzima em um estado inativo.

Cultura de fibroblastos de embrião de camundongo (MEF) $RAX^{-/-}$ foi utilizada para estudar a ação de RAX na fosforilação de eIF2 α induzida pela infecção com o vírus da estomatite vesicular (VSV) (Rowe *et al.* 2006). eIF2 α foi fosforilada na ausência de RAX, o que indica que o ativador de PKR na infecção por VSV é o dsRNA e não PACT/RAX. Porém, os dados de Bennett *et al.* (2006) contradizem estes resultados. Estes autores utilizaram clones estáveis de MEF expressando RNAi contra RAX para reduzir os níveis de expressão desta proteína. A fosforilação de eIF2 α induzida pela infecção por VSV foi menor em clones celulares que apresentavam cerca de 80% de inibição da expressão de RAX em relação aos clones com níveis normais de RAX. As únicas diferenças entre os dois artigos são a técnica utilizada para reduzir os níveis de expressão de RAX e a multiplicidade de infecção utilizada. Porém, estas diferenças não são suficientes para explicar a contradição dos resultados apresentados. Logo, ainda não existe um consenso sobre a atividade antiviral de PACT.

4.2.4- A importância de PKR na infecção por *Flavivirus*

Diamond e Harris (2001) mostraram que cultura de célula de fibroblasto deficiente em PKR e RNase L apresenta inibição da infecção por DEN quando as células são pré-tratadas com IFN, indicando que estas enzimas não tem papel no controle da infecção por este vírus nestas condições. Somente em 2006 foi publicado um novo estudo mostrando a importância de PKR na infecção por *Flavivirus* (Samuel *et al.* 2006). Os autores mostram que camundongos $PKR^{-/-}$ e $RNase L^{-/-}$ são mais susceptíveis à infecção por WNV que os camundongos selvagens. Além disso, PKR e RNase L contribuem para a proteção mediada por IFN em cultura de células primárias de forma restrita a certos tipos celulares como macrófagos e neurônios corticais. Este fato poderia explicar os dados apresentados por Diamond e Harris (2001) utilizando cultura permanente de fibroblastos. As células em cultura foram pré-tratadas com IFN em todos os resultados *in vitro* apresentados. Porém, apesar de DEN ser sensível ao pré-tratamento com IFN, o tratamento pós-infecção não é capaz de inibir a infecção viral (Diamond *et al.* 2000). Logo, os dados apresentados nos levam a crer que PKR pode ter uma ação no controle da infecção por *Flavivirus* dependente de tipo celular e do tratamento por IFN.

4.2.5- Relevância da interação da PACT com a estrutura 3'SLDV

Os dados da literatura mostram que diversas vias importantes para a infecção celular por *Flavivirus* descritas nos tópicos acima, como a via da UPR, das STATs, IFNs, IRFs, TNF- α , NF- κ B, entre outras, foram relacionadas de alguma maneira com a ação da PACT. Isso indica que a interação descrita nesta tese entre PACT e a estrutura 3'SL do RNA do vírus da dengue pode ser importante na infecção por *Flavivirus*. Isto nos encoraja a caracterizar mais profundamente as conseqüências desta interação durante a infecção celular pelo vírus da dengue. Para tanto, foi gerado um clone celular com níveis de expressão de PACT reduzidos que será utilizado para estudar a importância desta proteína na infecção pelo vírus da dengue.

Foi demonstrado que PACT interage com hnRNP Q (Ewing *et al.* 2007) e dados não publicados de Quaresma *et al.* indicam que esta proteína está presente nos grânulos de estresse, co-localizando com TIA/TIAR. Curiosamente, a estrutura 3'SL(-), 3'SL da fita de RNA de polaridade negativa, e a proteína não estrutural NS3 de WNV e de DEN interagem com TIA/TIAR (Emara e Brinton 2007), o que poderia facilitar a síntese do genoma viral e inibir a formação de grânulos de estresse, prevenindo a inibição da tradução no hospedeiro. hnRNP Q, TIA e TIAR possuem 3 motivos de ligação a RNA simples-fita (RRM) cada, enquanto que PACT possui 3 motivos de ligação a RNA dupla-fita (dsRBM). Seria interessante estudar a interação destas proteínas entre si e com o RNA do vírus da dengue e qual a importância desta interação durante a infecção viral.

5- CONCLUSÕES

O presente trabalho teve o objetivo principal de identificar e caracterizar funcional e estruturalmente novas proteínas humanas capazes de interagir com a região 3' não traduzida do RNA do vírus da dengue. Os resultados obtidos geraram as seguintes conclusões:

- A proteína Mov34 humana não foi capaz de interagir com a estrutura 3'SL do RNA do vírus da dengue ou da encefalite japonesa nas condições testadas.
- A proteína Mov34 humana possui um domínio compacto resistente à proteólise parcial que corresponde ao domínio estrutural MPN.
- A proteína PACT humana, tanto recombinante quanto endógena, é capaz de interagir com a estrutura 3'SL do RNA do vírus da dengue.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol.* 69:695-700.
- Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX. 2001. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J Virol.* 75:4268-4275.
- Alvarez DE, Lodeiro MF, Ludueña SJ, Pietrasanta LI, Gamarnik AV. 2005a. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol.* 79:6631-6643.
- Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV. 2005b. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology.* 339:200-212.
- Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, Atkinson JP, Diamond MS. 2007. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* 3:1798-1812.
- Bardwell VJ, Wickens M. 1990. Purification of RNA and RNA-protein complexes by an R17 coat protein affinity method. *Nucleic Acids Res.* 18: 6587-6594.
- Bellare P, Kutach AK, Rines AK, Guthrie C, Sontheimer EJ. 2006. Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA splicing factor Prp8p. *RNA.* 12:292-302.
- Bennett RL, Blalock WL, May WS. 2004. Serine 18 phosphorylation of RAX, the PKR activator, is required for PKR activation and consequent translation inhibition. *J Biol Chem.* 279:42687-42693.
- Bennett RL, Blalock WL, Abtahi DM, Pan Y, Moyer SA, May WS. 2006. RAX, the PKR activator, sensitizes cells to inflammatory cytokines, serum withdrawal, chemotherapy, and viral infection. *Blood.* 108:821-829.
- Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ. 2001. The rest is silence. *RNA.* 7:1509-1521.
- Blackwell JL, Brinton MA. 1997. Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *J Virol.* 71:6433-6444.
- Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu SJ, Sun P, Porter K, Rudiman IF, Yuwono D, Puthavathana P, Marovich MA. 2008. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* 82:3939-3951.
- Brierley MM, Fish EN. 2005. Stats: multifaceted regulators of transcription. *J Interferon Cytokine Res.* 25:733-744.
- Cai R, Williams BR. 1998. Mutations in the double-stranded RNA-activated protein kinase insert region that uncouple catalysis from eIF2alpha binding. *J Biol Chem.* 273:11274-11280.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 44:649-688.
- Chang KS, Luo G. 2006. The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is required for efficient replication of hepatitis C virus (HCV) RNA. *Virus Res.* 115:1-8.
- Chang TH, Liao CL, Lin YL. 2006. Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF-kappaB activation. *Microbes Infect.* 8:157-171.
- Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. 2007. Dengue virus (DENV) antibody-dependent

- enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 88:365-375.
- Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. 1997a. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol.* 71:3466-3473.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. 1997b. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 3:828-829.
- Chen YC, Wang SY, King CC. 1999. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol.* 73:2650-2657.
- Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, Lee CK, Chiou TW, Wong CH, Hsieh SL. 2008. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature.* 453:672-676.
- Chin JF, Chu JJ, Ng ML. 2007. The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry. *Microbes Infect.* 9:1-6.
- Chu PW, Westaway EG. 1985. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology.* 140:68-79.
- Chu PW, Westaway EG. 1992. Molecular and ultrastructural analysis of heavy membrane fractions associated with the replication of Kunjin virus RNA. *Arch Virol.* 125:177-191.
- Chu JJ, Rajamanonmani R, Li J, Bhuvanakantham R, Lescar J, Ng ML. 2005. Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. *J Gen Virol.* 86:405-412.
- Chua JJ, Ng MM, Chow VT. 2004. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus Res.* 102:151-163.
- Clyde K, Harris E. 2006. RNA Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and Is Required for Viral Replication. *J Virol.* 80:2170-2182.
- Daher A, Longuet M, Dorin D, Bois F, Segéral E, Bannwarth S, Battisti PL, Purcell DF, Benarous R, Vaquero C, Meurs EF, Gagnon A. 2001. Two dimerization domains in the trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV-1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem.* 276:33899-338905.
- Davis WG, Blackwell JL, Shi PY, Brinton MA. 2007. Interaction between the cellular protein eEF1A and the 3'-terminal stem-loop of West Nile virus genomic RNA facilitates viral minus-strand RNA synthesis. *J Virol.* 81:10172-10187.
- De Nova-Ocampo M, Villegas-Sepúlveda N, del Angel RM. 2002. Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology.* 295:337-347.
- Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. 2000. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol.* 74:4957-4966.

- Diamond MS, Harris E. 2001. Interferon inhibits dengue virus infection by preventing translation of viral RNA through a PKR-independent mechanism. *Virology*. 28:297-311.
- Edgil D, Polacek C, Harris E. 2006. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation when cap-dependent translation is inhibited. *J Virol*. 80:2976-2986.
- Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. 2002. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J*. 21:2757-2768.
- Egloff MP, Decroly E, Malet H, Selisko B, Benarroch D, Ferron F, Canard B. 2007. Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *J Mol Biol*. 372:723-736.
- Emara MM, Brinton MA. 2007. Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:9041-9046.
- Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Rensus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U. 2006. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol*. 13:372-373.
- Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duewel HS, Stewart II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T, Figeys D. 2007. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol*. 3:89.
- Figueiredo LT. 2000. The Brazilian Flaviviruses. *Microbes Infect*. 2:1643-1649.
- Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, Gamarnik AV. 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev*. 20:2238-2249.
- García-Montalvo BM, Medina F, del Angel RM. 2004. La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Res*. 102:141-150.
- Gatignol A, Buckler-White A, Berkhout B, Jeang KT. 1991. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science*. 251:1597-1600.
- Gibbons RV, Vaughn DW. 2002. Dengue: an escalating problem. *BMJ*. 324:1563-1566.
- Gilfooy FD, Mason PW. 2007. West Nile virus-induced interferon production is mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol*. 81:11148-11158.
- Goncalvez AP, Engle RE, St. Claire M, Purcell RH, Lai CJ. 2007. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:9422-9427.
- Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. 1989. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res*. 17:3889-3897.
- Gubler DJ. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 11:480-496.
- Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH. 1987. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol*. 198:33-41.

- Hollenberg SM, Sternglanz R, Cheng PF, Weintraub H. 1995. Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol Cell Biol.* 15: 3813-3822.
- Hook B, Bernstein D, Zhang B, Wickens M. 2005. RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *RNA.* 11:227-233.
- Hsieh MF, Lai SL, Chen JP, Sung JM, Lin YL, Wu-Hsieh BA, Gerard C, Luster A, Liao F. 2006. Both CXCR3 and CXCL10/IFN-inducible protein 10 are required for resistance to primary infection by dengue virus. *J Immunol.* 177:1855-1863.
- Huang X, Hutchins B, Patel RC. 2002. The C-terminal, third conserved motif of the protein activator PACT plays an essential role in the activation of double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR). *Biochem J.* 366:175-186.
- Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC, Chang W. 2004. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol.* 78:378-388.
- Isturiz RE, Gubler DJ, Brea DE, Castillo J. 2000. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. *Infect Dis Clin North Am.* 14:121-140.
- Ito T, Yang M, May WS. 1999. RAX, a cellular activator for double-stranded RNA-dependent protein kinase during stress signaling. *J Biol Chem.* 274:15427-15432.
- Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. 2004. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol.* 149:915-927.
- Johnson AJ, Guirakhoo F, Roehrig JT. 1994. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. *Virology.* 203:241-249.
- Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, Foster GR, Jacobs M. 2005. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol.* 79:5414-5420.
- Khromykh AA, Kondratieva N, Sgro JY, Palmenberg A, Westaway EG. 2003. Significance in replication of the terminal nucleotides of the flavivirus genome. *J Virol.* 77:10623-10629.
- Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG. 2001. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol.* 75:6719-6728.
- Kim YK, Jang SK. 1999. La protein is required for efficient translation driven by encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *J Gen Virol.* 80:3159-3166.
- Klimstra WB, Williams JC, Ryman KD, Heidner HW. 2005. Targeting Sindbis virus-based vectors to Fc receptor-positive cell types. *Virology.* 338:9-21.
- Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. 2003. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays.* 25:691-698.
- Kok KH, Ng MH, Ching YP, Jin DY. 2007. Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem.* 282:17649-17657.
- Kroschewski H, Lim SP, Butcher RE, Yap TL, Lescar J, Wright PJ, Vasudevan SG, Davidson AD. 2008. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain. *J Biol Chem.* May 9. [Epub ahead of print].
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S,

- Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 108:717-725.
- Lai MM. 1998. Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology*. 244:1-12.
- Lai E, Teodoro T, Volchuk A. 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)*. 22:193-201.
- Lee CJ, Liao CL, Lin YL. 2005. Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *J Virol*. 79:8388-8399.
- Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. 2006. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. 25:522-532.
- Lee ES, Yoon CH, Kim YS, Bae YS. 2007. The double-strand RNA-dependent protein kinase PKR plays a significant role in a sustained ER stress-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 581:4325-4332.
- Lescar J, Roussel A, Wien MW, Navaza J, Fuller SD, Wengler G, Wengler G, Rey FA. 2001. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*. 105:137-148.
- Leung S, Qureshi SA, Kerr IM, Darnell JE Jr, Stark GR. 1995. Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 15:1312-1317.
- Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. 2008. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol*. 82:4731-4741.
- Li S, Min JY, Krug RM, Sen GC. 2006b. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology*. 349:13-21.
- Li S, Peters GA, Ding K, Zhang X, Qin J, Sen GC. 2006a. Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:10005-10010.
- Lim F, Spingola M, Peabody DS. 1994. Altering the RNA binding specificity of a translational repressor. *J Biol Chem*. 269:9006-9010.
- Lin C, Amberg SM, Chambers TJ, Rice CM. 1993. Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *J Virol*. 67:2327-2335.
- Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. 2007. Flaviviridae: the viruses and their replication. Em *Fields Virology 5^a* edição, Knipe DM, Howley PM, eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), 1101-1152.
- Liu WJ, Sedlak PL, Kondratieva N, Khromykh AA. 2002. Complementation analysis of the flavivirus Kunjin NS3 and NS5 proteins defines the minimal regions essential for formation of a replication complex and shows a requirement of NS3 in *cis* for virus assembly. *J Virol*. 76:10766-10775.
- Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA. 2003. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J Virol*. 77:7804-7813.
- Lo MK, Tilgner M, Bernard KA, Shi PY. 2003. Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. *J Virol*. 77: 10004-10014.

- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A. 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem.* 280:23698-23708.
- Luo D, Xu T, Hunke C, Grüber G, Vasudevan SG, Lescar J. 2008. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol.* 82:173-183.
- Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology.* 220:232-240.
- Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. 1998. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology.* 245:203-215.
- Mackenzie JM, Jones MK, Westaway EG. 1999. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J. Virol.* 73:9555-9567.
- Mackenzie JM. 2005. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic.* 6:967-977.
- Mahalingam S, Lidbury BA. 2002. Suppression of lipopolysaccharide-induced antiviral transcription factor (STAT-1 and NFkappaB) complexes by antibody-dependent enhancement of macrophage infection by Ross River virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:13819-13824.
- Mandl CW, Allison SL, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX. 2000. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J Virol.* 74:9601-9609.
- Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. 2005. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol.* 79:11053-11061.
- Meerovitch K, Svitkin YV, Lee HS, Lejbkowitz F, Kenan DJ, Chan EK, Agol VI, Keene JD, Sonenberg N. 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol.* 67:3798-3807.
- Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. 2006. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem.* 281:8854-8863.
- Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem.* 282:8873-8882.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2003. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6986-6991.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 427:313-319.
- Morens DM. 1994. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis.* 19:500-512.
- Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:14333-14338.
- Murthy HM, Clum S, Padmanabhan R. 1999. Dengue virus NS3 serine protease. Crystal structure and insights into interaction of the active site with substrates by molecular modeling and structural analysis of mutational effects. *J Biol Chem.* 274:5573-5580.

- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P. 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4:723-728.
- Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. 2005. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis.* 5:64.
- Ng ML. 1987. Ultrastructural studies of Kunjin virus-infected *Aedes albopictus* cells. *J Gen Virol.* 68:577-582.
- Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, Lin CF, Yeh TM, Do QH, Vu TQ, Chen LC, Huang JH, Lam TM, Liu CC, Halstead SB. 2004. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis.* 189:221-232.
- Ni H, Ryman KD, Wang H, Saeed MF, Hull R, Wood D, Minor PD, Watowich SJ, Barrett AD. 2000. Interaction of yellow fever virus French neurotropic vaccine strain with monkey brain: characterization of monkey brain membrane receptor escape variants. *J Virol.* 74:2903-2906.
- O'Reilly EK, Kao CC. 1998. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structure and computer predictions of secondary structure. *Virology.* 252:281-303.
- Olsthoorn RC, Bol JF. 2001. Sequence comparison and secondary structure analysis of the 3' noncoding region of flavivirus genomes reveals multiple pseudoknots. *RNA.* 7:1370-1377.
- Paranjape SM, Harris E. 2007. Y box-binding protein-1 binds to the dengue virus 3'-untranslated region and mediates antiviral effects. *J Biol Chem.* 282:30497-30508.
- Patel RC, Sen GC. 1998. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J.* 17:4379-4390.
- Patel CV, Handy I, Goldsmith T, Patel RC. 2000. PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem.* 275:37993-37998.
- Pena V, Liu S, Bujnicki JM, Lührmann R, Wahl MC. 2007. Structure of a multipartite protein-protein interaction domain in splicing factor Prp8 and its link to *Retinitis Pigmentosa*. *Mol Cell.* 25:615-624.
- Perelygin AA, Scherbik SV, Zhulin IB, Stockman BM, Li Y, Brinton MA. 2002. Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:9322-9327.
- Peters GA, Hartmann R, Qin J, Sen GC. 2001. Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Mol Cell Biol.* 21:1908-1920.
- Peters GA, Khoo D, Mohr I, Sen GC. 2002. Inhibition of PACT-mediated activation of PKR by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol.* 76:11054-11064.
- Peters GA, Li S, Sen GC. 2006. Phosphorylation of specific serine residues in the PKR activation domain of PACT is essential for its ability to mediate apoptosis. *J Biol Chem.* 281:35129-35136.
- Pierson TC, Xu Q, Nelson S, Oliphant T, Nybakken GE, Fremont DH, Diamond MS. 2007. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. *Cell Host Microbe.* 1:135-145.
- Pijlman GP, Kondratieva N, Khromykh AA. 2006. Translation of the flavivirus kunjin NS3 gene in *cis*

- but not its RNA sequence or secondary structure is essential for efficient RNA packaging. *J Virol.* 80:11255-11264.
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8:3867-3874.
- Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C, Gregorio GG, Hendrickson WA, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2006. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell.* 124:485-493.
- Preugschat F, Strauss JH. 1991. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology.* 185:689-697.
- Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 79:4557-4567.
- Romero TA, Tumban E, Jun J, Lott WB, Hanley KA. 2006. Secondary structure of dengue virus type 4 3' untranslated region: impact of deletion and substitution mutations. *J Gen Virol.* 87:3291-3296.
- Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM. 2006. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol.* 80:4623-4632.
- Rowe TM, Rizzi M, Hirose K, Peters GA, Sen GC. 2006. A role of the double-stranded RNA-binding protein PACT in mouse ear development and hearing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:5823-5828.
- Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE. 1992. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol.* 73:2129-2134.
- Rulli NE, Suhrbier A, Hueston L, Heise MT, Tupanceska D, Zaid A, Wilmes A, Gilmore K, Lidbury BA, Mahalingam S. 2005. Ross River virus: molecular and cellular aspects of disease pathogenesis. *Pharmacol Ther.* 107:329-342.
- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, Kalayanarooj SM, Tangnararatchakit K, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S, Chaiyaratana W, Yenchitsomanus PT, Suriyaphol P, Avirutnan P, Chokephaibulkit K, Matsuda F, Yoksan S, Jacob Y, Lathrop GM, Malasit P, Desprès P, Julier C. 2005. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* 37:507-513.
- Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 14:778-809.
- Samuel MA, Whitby K, Keller BC, Marri A, Barchet W, Williams BR, Silverman RH, Gale M Jr, Diamond MS. 2006. PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J Virol.* 80:7009-7019.
- Sanches M, Alves BS, Zanchin NI, Guimarães BG. 2007. The crystal structure of the human Mov34 MPN domain reveals a metal-free dimer. *J Mol Biol.* 370:846-855.
- Scherbik SV, Paranjape JM, Stockman BM, Silverman RH, Brinton MA. 2006. RNase L plays a role in the antiviral response to West Nile virus. *J Virol.* 80:2987-2999.
- Scherbik SV, Kluetzman K, Perelygin AA, Brinton MA. 2007. Knock-in of the Oas1b(r) allele into a flavivirus-induced disease susceptible mouse generates the resistant phenotype. *Virology.* 368:232-237.

- SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M. 1996. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:8496-8501.
- Shellam GR, Sangster MY, Urosevic N. 1998. Genetic control of host resistance to flavivirus infection in animals. *Rev Sci Tech*. 17:231-248.
- Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. 2004. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol*. 78:2701-2710.
- Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Snider HM, Beatty PR, Harris E. 2005. Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J Immunol*. 175:3946-3954.
- Sullivan NJ. 2001. Antibody-mediated enhancement of viral disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 260:145-169.
- Ta M, Vrati S. 2000. Mov34 protein from mouse brain interacts with the 3' noncoding region of Japanese encephalitis virus. *J Virol*. 74:5108-5115.
- Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. 2006. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol*. 87:3003-3011.
- Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 197:823-829.
- Thepparit C, Smith DR. 2004. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol*. 78:12647-12656.
- Tian B, Bevilacqua PC, Diegelman-Parente A, Mathews MB. 2004. The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:1013-1023.
- Tilgner M, Deas TS, Shi PY. 2005. The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology*. 331: 375-386.
- Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. 2006. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. 87:2605-2614.
- Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, Vasudevan SG, Chevet E, Gu F. 2007. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virol J*. 4:91.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanaroj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntaya-Korn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 181:2-9.
- Wengler G, Wengler G. 1981. Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology*. 113:544-555.
- Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. 1997. 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*. 71:6650-6661.
- Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. 1989. Newly synthesized dengue-2 virus

- nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology*. 171: 302–305.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*. 6:816-820.
- Yamashita T, Unno H, Mori Y, Tani H, Moriishi K, Takamizawa A, Agoh M, Tsukihara T, Matsuura Y. 2008. Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å. *Virology*. 373:426-436.
- Yang YL, Reis LF, Pavlovic J, Aguzzi A, Schäfer R, Kumar A, Williams BR, Aguet M, Weissmann C. 1995. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J*. 14:6095-6106.
- Yocupicio-Monroy M, Padmanabhan R, Medina F, del Angel RM. 2007. Mosquito La protein binds to the 3' untranslated region of the positive and negative polarity dengue virus RNAs and relocates to the cytoplasm of infected cells. *Virology*. 357:29-40.
- You S, Padmanabhan R. 1999. A novel *in vitro* replication system for dengue virus. *J Biol Chem*. 274:33714-33722.
- Yu CY, Hsu YW, Liao CL, Lin YL. 2006. Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J Virol*. 80:11868-11880.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. 2008. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*. 319:1834-1837.
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. 2003a. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*. 10:907-912.
- Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2003b. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J*. 22:2604-2613.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 31:3406-3415.

7- APÊNDICE

The Crystal Structure of the Human Mov34 MPN Domain Reveals a Metal-free Dimer

Mario Sanches, Beatriz S. C. Alves, Nilson I. T. Zanchin e Beatriz G. Guimarães

The Crystal Structure of the Human Mov34 MPN Domain Reveals a Metal-free Dimer

Mario Sanches*, Beatriz S. C. Alves, Nilson I. T. Zanchin and Beatriz G. Guimarães*

Center for Structural Molecular Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) Campinas, SP, Brazil

The 26S proteasome is a large protein complex involved in protein degradation. We have shown previously that the PSMD7/Mov34 subunit of the human proteasome contains a proteolytically resistant MPN domain. MPN domain family members comprise subunits of the proteasome, COP9-signalosome and translation initiation factor 3 complexes. Here, the crystal structure of two C-terminally truncated proteins, MPN 1-186 and MPN 1-177, were solved to 1.96 and 3.0 Å resolution, respectively. MPN 1-186 is formed by nine β-strands surrounded by three α-helices plus a fourth α-helix at the C terminus. This final α-helix emerges from the domain core and folds along with a symmetrically related subunit, typical of a domain swap. The crystallographic dimer is consistent with size-exclusion chromatography and DLS analysis showing that MPN 1-186 is a dimer in solution. MPN 1-186 shows an overall architecture highly similar to the previously reported crystal structure of the Archaeal MPN domain AfJAMM of *Archaeoglobus fulgidus*. However, previous structural and biophysical analyses have shown that neither MPN 1-186 nor full-length human Mov34 bind metal, in opposition to the zinc-binding AfJAMM structures. The zinc ligand residues observed in AfJAMM are conserved in the yeast Rpn11 proteasome and Csn5 COP-signalosome subunits, which is consistent with the isopeptidase activity described for these proteins. The results presented here show that, although the MPN domain of Mov34 shows a typical metalloprotease fold, it is unable to coordinate a metal ion. This finding and amino acid sequence comparisons can explain why the MPN-containing proteins Mov34/PSMD7, RPN8, Csn6, Prp8p and the translation initiation factor 3 subunits *f* and *h* do not show catalytic isopeptidase activity, allowing us to propose the hypothesis that in these proteins the MPN domain has a primarily structural function.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding authors

Keywords: PSMD7; 26S proteasome; Mov34; JAMM motif; Jab1/MPN dimer

Introduction

In eukaryotic cells, the intracellular proteins that are targeted for degradation are ubiquitinated prior to digestion by the 26S proteasome complex. This complex is formed by an ATP-dependent association of the 20S proteasome (multicatalytic proteinase core) with two 19S cap complexes.^{1,2} The PSMD7 (proteasome 26S non-ATPase subunit 7), also known as Mov34, is one of the ATP-independent compo-

nents of the 19S regulator subunit with unknown function. Mov34 contains a characteristic KEKE motif present at the C terminus. The human Mov34 ortholog (hsMov34, ~37 kDa) contains a domain with the structural motif MPN (Mpr1p, Pad1p N-terminal) on its N-terminal region, which is usually found in subunits of multiprotein complexes³ such as the 26S proteasome, the COP-signalosome, the subunits *f* and *h* (also known as subunits p47 and p40, respectively) of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) and in regulators of transcription and translation.^{4–6} The MPN domain sequence is highly conserved among the four human isoforms of Mov34 and also among other

E-mail addresses of the corresponding authors: msanches@lnls.br; beatriz@lnls.br

eukaryotic orthologs. A protein–protein interaction function has been proposed for the MPN domain.^{3,7} Additionally, studies with yeast Rpn11 and Csn5 have described ubiquitin-conjugated protein degradation and catalytic isopeptidase activities, respectively, for the Jab1/MPN domain metalloenzyme (JAMM) motif of Rpn11⁸ and Csn5.⁹ Consistent with these reports, the crystal structure of the *Archaeoglobus fulgidus* AfJAMM confirmed that it displays a metalloprotease fold and that the metalloisopeptidase (JAMM) motif, characterized by the sequence EX_nHS/THX₇SXXD, coordinates a zinc ion in the catalytic site.^{10,11} However, the hsMov34 lacks the canonical JAMM motif and is most certainly not directly involved in protein degradation. It has been recently shown that pre-mRNA splicing factor Prp8p binds ubiquitin with an affinity comparable to some known and functionally validated ubiquitin binding domains (UBDs).¹² Since Prp8p exhibits non-conservative deviations from the JAMM motif sequence, it has been proposed that other proteins alike may also possess ubiquitin-binding functions (for a review on UBDs see Hurley *et al.*¹³). Therefore, obtaining atomic-level structural information on MPN domain proteins is important to understand the common features of the proteasome lid complex, CSN and eIF3 which play key functions in protein degradation, signal transduction, and protein synthesis, respectively. In a previous work, we reported that Mov34 contains an N-terminal proteolytically resistant domain that includes the MPN domain region.¹⁴ Recombinant domains lacking residues 1 to 8 showed an unexpected instability while domains comprising residues 1–177 (MPN 1-177) and 1–186 (MPN 1-186) showed a relatively higher thermal stability. Here, we have used these C-terminally truncated MPN domains of Mov34 to perform crystallographic

studies in order to obtain high resolution structural data on a eukaryotic MPN domain.

Results and Discussion

Overall structure description

Identification and characterization of a proteolytically resistant domain of human Mov34 was previously reported by our group.¹⁴ This domain comprises the N-terminal region of Mov34, including the conserved MPN domain region, whereas the C-terminal portion is highly sensitive to protease digestion.¹⁴ During the characterization of this domain, four truncated proteins were obtained (MPN 1-177, MPN 1-186, MPN 9-177 and MPN 9-186) and those constructs containing the native N terminus showed higher stability.

Crystallographic structures of the constructions MPN 1-186 and MPN 1-177 were solved and refined at 1.95 Å and 3.00 Å, respectively, both in space group C2 with two molecules per asymmetric unit. On both structures the residues 145–150 in the tip of a loop are disordered and could not be modeled. Since the construction MPN 1-186 was solved at higher resolution the overall structure description and the general discussion throughout here will refer to subunit A of this domain, unless stated otherwise.

The subunit's core is tightly folded and contains the mixed β -sheet MPN motif with nine β -strands (β 1– β 9, Figure 1(a)) surrounded by three α -helices (α 1– α 3). A fourth helix (α 4) in the C-terminal region (residues 166–178) emerges from the protein core and folds along with a symmetrically related subunit, characterizing a domain swap, as shown by Figure 1(b). This structural assembly strongly

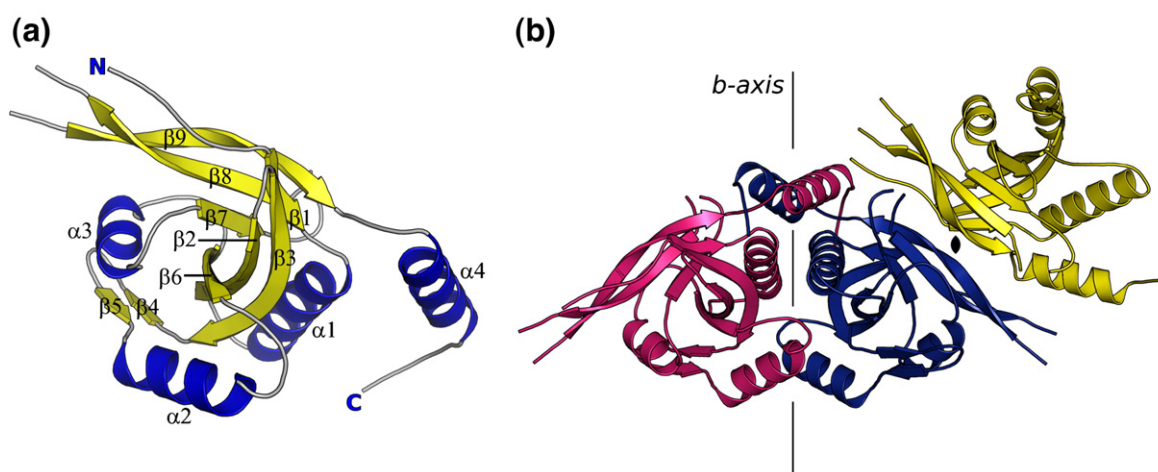


Figure 1. Crystal structure of the MPN 1-186 domain of hsMov34. (a) Overall cartoon representation of the globular subunit. The secondary structural elements are labeled. (b) Cartoon representation showing the two possible dimeric assemblies of the MPN 1-186 subunits. The subunits in blue and yellow represent the two chains in the asymmetric unit, related by a non-crystallographic 2-fold axis perpendicular to the paper plane. The subunits in blue and pink represent a crystallographic dimer and the 2-fold crystallographic axis along *b*-axis is represented as a black line. The crystallographic dimer (subunits blue and pink) is proposed to represent the dimer found in solution, based on energy calculations. The domain swap of the α -helix-4 is another indication of the stable dimeric nature of this assembly.

suggests that the protein exists as a dimer in solution. Analytical gel filtration analysis showed one peak, yielding an average molecular mass of 34,307 Da (Figure 2), which represents a deviation of 19% to the dimer (42,378 Da) and 62% to the monomer (21,189 Da). DLS measurement also supported a dimer in solution, with a calculated molecular mass of 38,400 Da.

When analyzing all possible contacts between subunits in the crystal, two different kinds of dimerization interfaces are observed: the A:B interface within the same asymmetric unit and the A:A (or B:B) interface between symmetrically related subunits (Figure 1(b)). According to the PISA Server¹⁶ the solvation free energies for the interface formation (Δ^iG) are -7.0 kcal/mol for the A:B type interface (best result) and -34.9 kcal/mol for the A:A type interface, which poses the former as a crystallographic artifact, with an interface area of 775.1 \AA^2 , and the latter as a biologically relevant dimerization interface with a buried area of 2281.2 \AA^2 . The subunits on the A:A dimer are related by a 2-fold symmetry axis and the interface is formed mainly by interactions of the helical elements $\alpha 1$, 2 and 4 on both subunits. The two subunits in the asymmetric unit (A:B dimer) are related by a 2-fold non-crystallographic axis and are associated through interaction of the structural element $\beta 9$ (Figure 1(b)).

MPN 1-177 and MPN 1-186 structures are highly similar, with a RMSD of 0.549 \AA . The highest variability between the two structures is found in the C terminus region where they differ in length and path. The last nine residues at the C-terminal of MPN 1-186 form an α -helix (Figure 1(a), helix $\alpha 4$). Deletion of these residues disrupts helix $\alpha 4$ in MPN

1-177, destabilizing its C-terminal region, which could be traced only as a coil up to residue Ala167. This disordered region is most probably the cause of the poor diffraction quality of MPN 1-177 crystals.

In a previous study, we have found that constructs MPN 9-177 and MPN 9-186, lacking residues 1 to 8, showed a lower thermal stability as compared to constructs MPN 1-177 and MPN 1-186.¹⁴ In the MPN 1-186 structure, residues 8–11 form the strand $\beta 1$, which interacts with $\beta 3$ and $\beta 9$, forming a β -sheet (Figure 1(a)). It is reasonable to propose that deletion of residues 1–8 disrupts this β -sheet and compromises MPN folding and stability.

Structural comparison between MPN 1-186 and AfJAMM

Previous sequence analyses of human Mov34 have shown that it contains an MPN-like domain region,⁵ which is part of the two crystal structures solved here. A comparison of the structure of MPN 1-186 with the contents of the Protein Data Bank using the Protein Structure Comparison Service SSM¹⁷ revealed a high structure similarity to the crystal structure of the Archaeal MPN domain AfJAMM of *A. fulgidus*.¹⁰ It has further suggested a lower structural similarity to the yeast cytosine deaminase (PDB code 1OX7), a zinc-bound protein that catalyzes the deamination of cytosine and is structurally related to bacterial cytidine deaminase. It has been previously shown¹⁰ that those deaminases are evolutionarily related to the *A. fulgidus* AfJAMM and, consequently, to the hsMov34 MPN domain.

The crystallographic model of MPN 1-186 superposes with the core of AfJAMM (PDB code 1OIO) resulting in a RMSD of 1.848 \AA (74 matching C $^\alpha$) with a good agreement for the secondary structural elements defining the JAB1/MPN motif (Figure 3). In both published structures of AfJAMM,^{10,11} the region spanning residues 47–61 (1OIO numbering) is disordered and could not be modeled. In the MPN 1-186 structure, the equivalent region comprises the helix $\alpha 2$ and strands $\beta 4$ –5 (see highlighted region in Figure 3).

Ambroggio and co-workers¹¹ suggested that AfJAMM could assemble into a dimer even though the protein behaves as a monomer in solution. The proposed AfJAMM dimer would be formed through a β -sheet extension involving strand $\beta 3$, based on the observation of such assembly in the crystal packing. Our calculations using the PISA sever¹⁶ show that this putative AfJAMM dimerization results in Δ^iG of -5.7 kcal/mol and a flat interface area of 729.1 \AA^2 per subunit. The suggested AfJAMM dimer does not correspond to any of the possible dimers (A:A or A:B) encountered in the MPN 1-186 crystal structure (Figure 4). In the MPN 1-186 structure, an equivalent mode of interaction is not possible due to an obstruction caused by the presence of helix $\alpha 2$, which is part of the unstructured region in AfJAMM (see Figure 3). The relatively small dimerization interface could explain the intermittence of the dimer and a confirmation of the dimeric nature of AfJAMM in solution remains to be demonstrated.

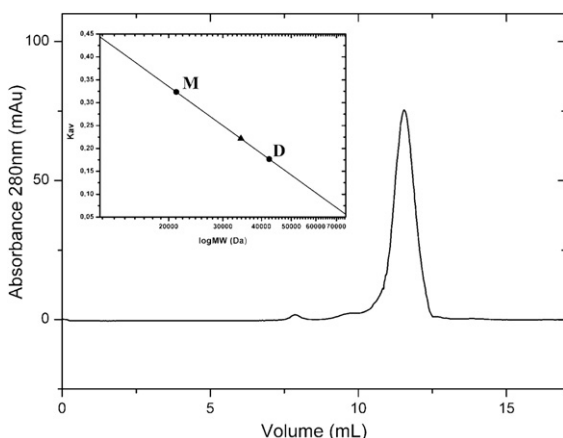


Figure 2. Gel filtration analysis of MPN 1-186. Gel-filtration chromatogram showing MPN 1-186 as a single peak. In the inset, the line represents the calibration curve for the experiment and is described by the equation $K_{av} = 2.43 - 0.49 \log MW$. The predicted values for dimeric (42,378 Da) and monomeric MPN 1-186 (21,189 Da) are indicated by circles in the plot (D and M refer to dimer and monomer, respectively), while the measured value (34,307 Da) is indicated by a triangle. The calculated value represents a deviation of 19% from the dimer and 62% from the monomer.

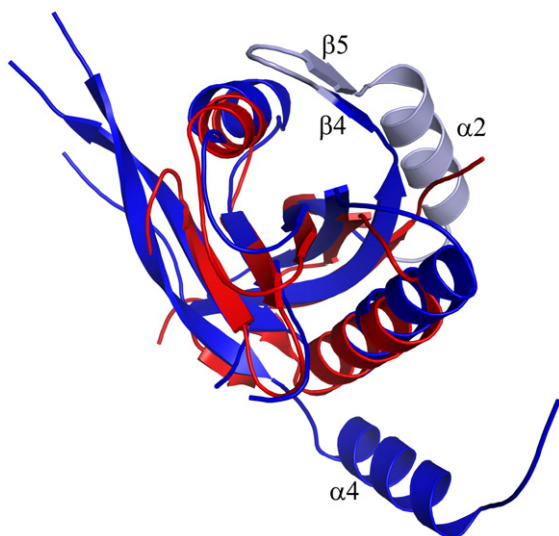


Figure 3. Superposition of the MPN 1-186 structure (in blue) with the MPN domain of *A. fulgidus*, AfJAMM (PDB code 1R5X, in red). Secondary elements in the core region of the domain show a close match. The MPN 1-186 residues corresponding to the missing region on the AfJAMM structure are colored in light blue (helix $\alpha 2$ and strands $\beta 4$ -5).

The metal-binding site

The AfJAMM domain contains a conserved zinc-binding site, which resembles those of metalloproteases such as thermolysin and ScNP.^{10,11} Even though the human Mov34 contains a MPN motif, experimental evidence has indicated that it does not bind metal.¹⁴ In fact, analysis of the region corresponding to the zinc-binding site of AfJAMM has shown that both MPN 1-186 and MPN 1-177 structures do not contain electron density where a metal ion could be modeled (Figure 5(a)), even though the putative metal-binding site is solvent-exposed. Superposition of the zinc-binding region of the two AfJAMM structures with the MPN 1-186 structure (Figure 5(b)) reveals a very similar arrangement of the amino acid residues involved in zinc binding. The residues His96 and Asp105 of MPN 1-186 structurally match those in AfJAMM with very good agreement. The surface-exposed site occupied by a solvent/buffer molecule in the AfJAMM structures (water or Tris) is now occupied by a loop connecting the structural elements $\beta 6$ and $\alpha 3$ in the MPN 1-186 and contains the His102, which could participate in metal coordination. Finally, the side-chain position of the second histidine of AfJAMM (H69/H72 in Figure 5(b)) is occupied by the main chain carbonyl group of the Lys100 residue of MPN 1-186. At a first glance, this arrangement appears to characterize a metal-binding site, since it contains four putative metal ligands arranged in a tetrahedron-like manner and occupies an equivalent structural position of the AfJAMM metal site (Figure 5(c)). In order to confirm the absence of metal in MPN 1-186, we collected a dataset at energy above

the Zn K-alpha absorption edge using one crystal soaked into $ZnCl_2$. The absence of zinc was confirmed by the lack of corresponding electron density in the anomalous difference map. The inability of this new arrangement to bind metal may indicate that the presence of four ligand residues in the human Mov34 putative metal site does not allow enough flexibility for the rearrangements necessary to bind a metal.

The metalloprotease-like MPN domain present on AfJAMM contains the metal-binding motif EX_nHS/THX_7SXXD . This pattern has been shown to appear in proteins related to RPN11,⁸ a subunit of the 19S proteasome lid with de-ubiquitination activity, and is also present in the COP9 signalosome subunit 5 (Jab1/Csn5),⁹ as is shown in Figure 6(a). In contrast, the metal-free MPN domain present in human Mov34 lacks this canonical motif, even though a few of the residues defining the motif could still be identified (Figure 6(b)). Recently, a question has been raised regarding whether Prp8p, a protein containing a MPN domain, can bind zinc ion, due to the fact that the JAMM motif exhibited by its sequence is only partially conserved.¹² Based on the sequence comparison shown in Figure 6(b) it is tempting to propose that other proteins containing the MPN domain but lacking the JAMM motif sequence can also be regarded as metal-independent. These proteins include the mammalian translation initiation factor 3 (eIF3) subunits *f* and *h*, the yeast RPN8 and other Mov34 orthologs. From this analysis, it is possible to distinguish between two kinds of MPN domains: a zinc-binding MPN, probably showing catalytic isopeptidase activity, and a metal-free MPN, which functions possibly as a structural motif or is involved in protein-protein interactions.

While this manuscript was under revision, the structure of the Prp8p of *Saccharomyces cerevisiae* was solved in a metal-free form,¹⁵ which is in agreement with our proposal presented above. Interestingly, scPrp8p was shown to interact with ubiquitin with an affinity comparable to some validated ubiquitin-binding domains,¹² suggesting that other metal-free MPN-containing proteins may also serve ubiquitin-binding functions. Even though the docking site for ubiquitin binding has not been established for Prp8p, mutation experiments¹² allied to structural analyses¹⁵ have led to the proposal of two possible ubiquitin-binding sites for that protein. Superposition of the hsMov34 MPN 1-186 structure with the scPrp8p MPN domain revealed a high similarity in the MPN core, including a good structural alignment of the proposed ubiquitin-binding sites. Those sites are solvent-exposed in MPN 1-186, even after considering dimer formation.

Conclusion

The proteolytically resistant domain of human Mov34 exists as a permanent dimer in solution as

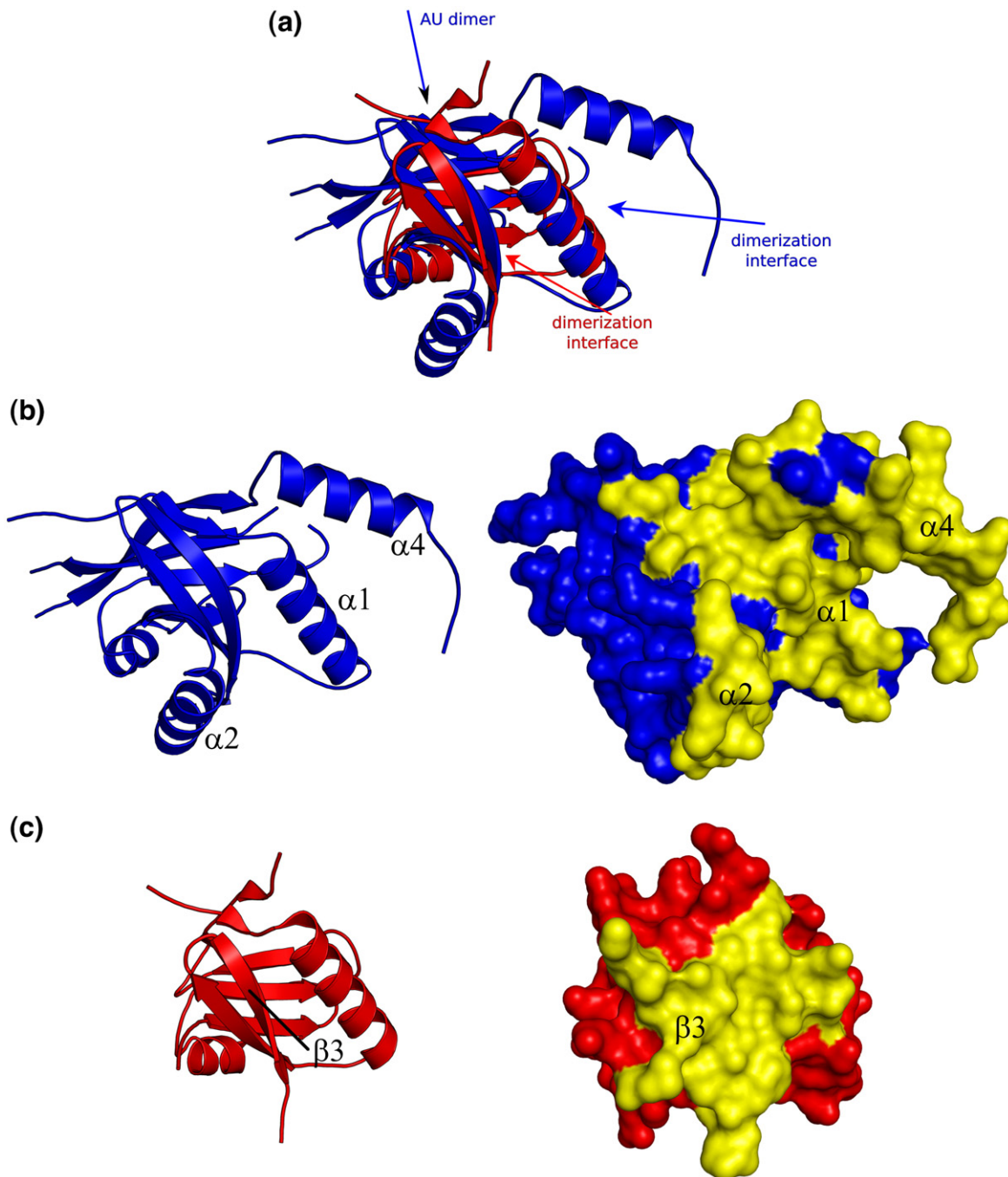


Figure 4. (a) Superposition of the MPN 1-186 structure (in blue) with the MPN domain of *A. fulgidus*, AfJAMM (PDB code 1R5X, in red). The dimerization interfaces for both structures are shown by blue and red arrows for the MPN 1-186 and AfJAMM, respectively. The assembly formed in the asymmetric unit (AU) of MPN 1-186 as a crystallographic artifact is also indicated by a blue arrow. The dimerization of MPN 1-186 involves mainly the secondary elements $\alpha 1, 2$ and 4 , while the proposed dimer of AfJAMM is formed mainly through a β -sheet extension on $\beta 3$. (b) Cartoon and surface representation of MPN 1-186 in the same orientation shown in (a). The yellow patch on the surface represents the residues involved in the dimerization contact. (c) Same as in (b) for the AfJAMM structure. The smaller dimerization interface in AfJAMM may explain its monomeric nature in solution while the larger and interdigitated surface of MPN 1-186 is characteristic of a stable assembly.

well as in the crystallographic structure, and contains a metal-independent MPN-like domain. Even though it appears that a putative metal-binding site could be formed by Mov34 (H96, H102, D105 and main chain carbonyl of K100), the experimental data show no evidence that this domain binds or has any affinity to

metals. These data indicate that the presence of a *quasi*-canonical JAMM motif on MPN domains does not suffice to confer metal-binding affinity. The MPN domain has been found in a variety of proteins, usually in subunits of multi-protein complexes such as the 26S proteasome, the eukaryotic translation

related to RPN8 and Mov34, probably involved in protein–protein interaction and in protein stability. Examples of the first include *A. fulgidus* AF2198 protein (AfJAMM), *S. cerevisiae* RPN11, human COP9 signalosome subunit 5 and human 26S proteasome-associated Pad1 homolog. The second type comprises human Mov34/PSMD7 26S proteasome subunit, *S. cerevisiae* RPN8, eIF3 subunits *f* and *h*, and human COP9 signalosome subunit 6. Up to now, no function was attributed to hsMov34, even though it seems likely that MPN-containing metal-free proteins contribute structurally for multi-protein associations and stability. The strictly dimeric nature of the MPN domain of hsMov34 goes on that direction, indicating that the subunits of big complexes can associate through their MPN domains. The role of the Prp8p on ubiquitin binding has also indicated that hsMov34 may contain a ubiquitin-binding domain. The ability or not of hsMov34 to bind ubiquitin, as well as the characterization of that interaction remains to be determined in a future work.

Materials and Methods

Expression and purification of MPN 1-177 and MPN 1-186

Recombinant MPN 1-177 and MPN 1-186 were obtained as described.¹⁴ Briefly, *Escherichia coli* strain BL21(DE3) *slyD*⁻¹⁸ carrying pET-TEV derivative vectors encoding the MPN variants were co-transformed with pRARE (Novagen) and incubated in LB medium supplemented with kanamycin (50 µg/ml) and chloramphenicol (20 µg/ml) at 37 °C. Pre-cultures were incubated under the same conditions and expression was achieved by inducing 2 l of LB medium overnight with 0.5 mM isopropyl-thio-β-D-galactoside (IPTG) at 20 °C. Cell extracts were prepared in buffer A (20 mM sodium phosphate (pH 7.2), 30 mM NaCl, 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)) and the recombinant proteins purified using a metal-chelating affinity chromatography column (GE Healthcare). The eluates of the affinity column were further purified using an ion-exchange chromatography on a Q-Sepharose column (GE Healthcare) as described.¹⁴ Proteolytic removal of the 6xHis tag was carried out in reactions containing His-tagged MPN at 133 µg/ml, His-tagged TEV protease at 6.7 µg/ml, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT. Reactions were incubated for 6 h at 30 °C and the 6xHis tag, undigested His-tagged MPN and His-tagged TEV protease were removed by affinity chromatography on a metal-chelating affinity column. The flowthrough containing the MPN protein was dialyzed against buffer containing 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), 200 mM NaCl, 0.1 mM DTT for further utilization in analytical gel filtration and DLS measurements. For crystallization, samples were dialyzed against buffer containing 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4), 1 mM DTT and concentrated to 12 mg/ml.

Analytical gel filtration chromatography and dynamic light scattering measurement

Analytical gel filtration chromatography was performed using a Superdex 75 10/30 column (GE

Healthcare) pre-equilibrated with 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), 200 mM NaCl, 0.1 mM DTT. The calibration curve was run with the suitable markers from the Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare), and is represented by the equation $K_{av} = 2.43 - 0.49 \log MW$, where K_{av} is the gel-phase distribution coefficient and MW is the molecular weight of the marker. The average value of two independent runs for the protein MPN 1-186 was used for the calculation of its molecular mass. A temperature controlled Dynamic Light Scattering (DLS) DynaPro apparatus from Protein Solutions was used. A fraction of the same sample that was loaded on the gel filtration column was used in the DLS experiment at 18 °C and the result is an average of 100 measurements.

Crystallization and data collection

Crystallization trials were performed using hanging-drop vapor diffusion method at 291 K. Drops containing equal volumes of protein sample and reservoir solution were equilibrated against 200 µl reservoirs on VDX 48 well plates (Hampton Research). Initial screens were performed using sparse matrix commercial screens Crystal Screen I and II (Hampton Research) and Wizard I and II (Emerald Biostructure). Since most of the initial hits contained polyethyleneglycol (PEG), the screens JBScreen 1-5 (Jena Bioscience) were also tested. Refinement of the conditions that rendered crystals was carried out by varying concentration of precipitants and salt and also pH and additives.

Crystallization assays were initially carried out with MPN 1-177 domain and crystals were readily obtained. However, diffraction of these crystals was limited to approximately 3.00 Å, despite extensive effort devoted to crystal optimization. Best MPN 1-177 crystals were obtained using 0.1 M sodium citrate (pH 5.5), 0.2 M NH₄OAc, 30% (w/v) PEG 4000 as reservoir solution and drops containing 5 µl of protein solution + 5 µl of reservoir solution, while data collection quality crystals for MPN 1-186 were obtained from drops made of 4 µl of protein solution mixed with an equal volume of a reservoir solution containing 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 4.2), 20% PEG 1000, 0.2 M LiSO₄ and 10 mM of MnCl₂ as additive. In both cases crystals were improved by using ultracentrifuged protein (100,000g for 1 h).

Prior to data collection, suitable crystals were soaked into a cryobuffer composed of mother liquor containing 30% (v/v) PEG400. Data collections were performed at 100 K at the D03B-MX1 beam line of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) using 1.427 Å radiation and recorded on a marCCD165 detector. The datasets were integrated using MOSFLM 6.2.6¹⁹ and scaled with SCALA 3.2.19²⁰ and the space group was determined as C2 with two molecules per asymmetric unit. Native datasets were truncated to a resolution of 1.95 Å and 3.00 Å, for MPN 1-186 and MPN 1-177, respectively. MPN 1-186 NaI derivative crystal was obtained by quick cryo-soaking²¹ the crystal for 30 s in a solution composed by the mother liquor supplemented with 0.5 M NaI and 30% PEG 400, yielding a data resolution of 2.1 Å. Diffraction data from MPN 1-186 crystals soaked into ZnCl₂ were collected at the LNLS W01B-MX2 beamline using a Marmosaic225 detector. Beam energy was set to 9.8 keV. The crystals were initially soaked into 1 mM ZnCl₂ for 30 min and subsequently into 10 mM ZnCl₂ for 10 min.

Table 1. Data collection, structure solution and refinement statistics

	MPN 1-186		MPN 1-177
Dataset	NaI	Native	Native
Wavelength (Å)	1.427	1.427	1.427
Space group	C2	C2	C2
Cell parameters <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å) β (°)	112.46, 97.42, 59.40, 121.89	114.10, 95.29, 58.99, 121.13	114.70, 96.01, 60.98, 122.14
Resolution range (Å)	35.05–2.10	30.21–1.95	51.64–3.00
R_{meas} (%) ^a	6.4 (49.3)	6.0 (58.0)	10.6 (67.9)
Completeness (%)	100 (100)	99.7 (99.5)	93.9 (96.3)
$I/\sigma(I)$	28.3 (4.3)	19.3 (1.9)	13.6 (2.0)
Redundancy	12.0 (11.8)	3.3 (3.1)	3.0 (2.9)
<i>Refinement</i>			
R factor/ R_{free} (%)		20.11/23.98	20.37/26.00
RMSD ^b from ideality			
Nond length (Å)	–	0.021	0.015
Bond angle (°)	–	2.050	1.59
Mean B value (Å ²)	–	27.95	29.48
No. of protein subunits in AU	–	2	2
No. of water molecules in AU	–	320	0
No. of PEG fragments in AU	–	7	0
No. of sulfate ions in AU	–	3	0
Ramachandran plot			
Most favored region (%)	–	91.0	80.9
Additional allowed region (%)	–	8.4	16.5
Generously allowed region (%)	–	0.3	1.8
Disallowed region (%)	–	0.3	0.7
PDB ID code	–	2O95	2O96

^a The redundancy independent R_{merge} reported by SCALA.¹⁸

^b Root mean square deviation.

Structure solution and refinement

Extensive attempts to solve the MPN 1-177 and MPN 1-186 structures by molecular replacement methods, using the structures of cytidine deaminase (1JTK²², 7.3% of sequence identity), AfJAMM (1OIO¹⁰ 11.7% and 1R5X,¹¹ 12.6% of sequence identity) and also a previously published homology model for MPN 1-177¹⁴ as search models, were unsuccessful. In this task the models were used as a whole or trimmed to account for insertion and deletions, and polyalanine models were also generated. The structure of MPN 1-186 was then solved by single-wavelength anomalous dispersion (SAD) using the NaI derivative dataset. Program SHELX D²³ was used to find two initial iodine sites. Initial phases calculation, incorporation of seven additional iodine sites and density modification procedures were carried out with autoSHARP.²⁴ The optimal solvent content of 64.7% suggested two molecules per asymmetric unit. Arp/wArp²⁵ was used to automatically build 290 out of 376 residues. Phase extension to the MPN 1-186 native data set was performed using MolRep²⁶ with the partially refined NaI derivative structure as search model. Positional and temperature factor refinement were performed with CNS 1.1²⁷ and REFMAC 5.1.24,²⁸ applying non-crystallographic symmetry relating chain A to B. Real space refinement was carried out by visual inspection of the model on the program Coot.²⁹ Water molecules were added progressively by inspection of the $2F_o - F_c$ and $F_o - F_c$ Fourier maps and validated according to stereochemical criteria, accounting for a total of 320 water molecules. During the last refinement cycles seven unaccounted continuous regions in the $F_o - F_c$ (contoured at 3σ) and $2F_o - F_c$ (contoured at 1σ) electron density maps were interpreted as PEG molecules coming from the crystallization solution. The longer one contains 12

ethyleneglycol residues. Three additional peaks in electron density maps were interpreted as SO_4^{2-} ions, due to their tetrahedral shapes. TLS routine³⁰ was used on the final stage of refinement. The quality of the final model was verified with PROCHECK.³¹

The MPN 1-177 structure was solved by molecular replacement using the final MPN 1-186 model as search model and refined as described above. Due to the low resolution of the data, no solvent or ion molecule could be modeled on the electron density. Data collection and refinement statistics for both structures are shown in Table 1.

ClustalW³² was used to build the amino acid sequence alignments. Structural superposition was performed using the program LSQMAN.³³ Cartoon representations of the structures were constructed using Pymol³⁴ and the secondary structure assignments were made with DSSP.³⁵

Protein Data Bank accession codes

The coordinates and structure factors for the crystal structures have been deposited in the RCSB Protein Data Bank with accession numbers: 2O95 for MPN 1-186 structure and 2O96 for MPN 1-177 structure.

Acknowledgements

This work was supported by grant no. 00/02788-4 to N.I.T.Z. and by the SMolBNet (no. 00/10266-8) and CEPID/CBME (98/14138-2) programs from the

Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP). B.S.C.A. is recipient of FAPESP fellowship (03/01900-3). We are also grateful to Tereza C. Lima Silva and Zildene Gonçalves Correa for technical assistance.

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jmb.2007.04.084](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.084)

References

- Peters, J.-M., Franke, W. W. & Keinschmidt, J. A. (1994). Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **269**, 7709–7718.
- Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801–847.
- Hofmann, K. & Bucher, P. (1998). The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *TIBS*, **23**, 204–205.
- Asano, K., Vornlocher, H.-P., Richter-Cook, N. J., Merrick, W. C., Hinnebusch, A. G. & Hershey, W. B. (1997). Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. *J. Biol. Chem.* **272**, 27042–27052.
- Aravind, L. & Ponting, C. P. (1998). Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci.* **7**, 1250–1254.
- Hinnebusch, A. G. (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 553–562.
- Burger-Kentischer, A., Finkelmeier, D., Thiele, M., Schmucker, J., Geiger, G., Tovar, G. E. & Bernhagen, J. (2005). Binding of JAB1/C5N5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif. *FEBS Letters*, **579**, 1693–1701.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., MacDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V. & Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, **298**, 611–615.
- Cope, A. G., Suh, G. S. B., Aravind, L., Schwarz, S. E., Zipursky, S. L., Koonin, E. V. & Deshaies, R. J. (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, **298**, 608–611.
- Tran, H. J. T. T., Allen, M. D., Löwe, J. & Bycroft, M. (2003). Structure of the Jab1/MPN domain and its implications for proteasome function. *Biochemistry*, **42**, 11460–11465.
- Ambroggio, X. I., Rees, D. C. & Deshaies, R. J. (2004). JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol.* **2**, 113–119.
- Bellare, P., Kutach, A. K., Rines, A. K., Guthrie, C. & Sontheimer, E. J. (2006). Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA splicing factor Prp8p. *RNA*, **12**, 292–302.
- Hurley, J. H., Lee, S. & Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem. J.* **399**, 361–372.
- Alves, B. S. C., Oyama-Jr, S., Gozzo, F. C., Sanches, M., Guimarães, B. G. & Zanchin, N. I. T. (2006). Characterization of the human ortholog of Mov34 reveals eight N-terminal residues important for MPN domain stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 608–615.
- Pena, V., Liu, S., Bujnicki, J. M., Lührmann, R. & Wahl, M. C. (2007). Structure of a multipartite protein-protein interaction domain in splicing factor Prp8 and its link to *Retinitis Pigmentosa*. *Mol. Cell*, **25**, 615–624.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2005). Detection of protein assemblies in crystals. In *CompLife 2005* (Berthold, M. R. *et al.*, eds), pp. 163–174, Springer-Verlag, Berlin.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallog. sect. D*, **60**, 2256–2268.
- Roof, W. D., Horne, S. M., Young, K. D. & Young, R. (1994). slyD, a host gene required for phi X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerases. *J. Biol. Chem.* **269**, 2902–2910.
- Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, **26**.
- Evans, P. R. (1993). Data reduction. *Proceedings of CCP4 Study Weekend*, 114–122.
- Dauter, Z., Dauter, M. & Rajashankar, K. R. (2000). Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides. *Acta Crystallog. sect. D*, **56**, 232–237.
- Johansson, E., Jehede, N., Neuhard, J. & Larsen, S. (2002). Crystal structure of the tetrameric cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, **41**, 2563–2570.
- Sheldrick, G. M. (1998). SHELX: Applications to macromolecules. In *Direct Methods for Solving Macromolecular Structures* (Fortier, S., ed), Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. & Bricogne, G. (2005). Automated structure solution with auto-SHARP. In *Crystallographic Methods* (Doublie, S., ed), Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Perrakis, A., Morris, R. M. & Lamzin, V. X. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.* **6**, 458–463.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallog. sect. D*, **50**, 760–763.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W. *et al.* (1998). Crystallography and NMR System: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D*, **54**, 905–921.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood structure method. *Acta Crystallog. sect. D*, **53**, 240–255.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallog. sect. D*, **60**, 2126–2132.
- Painter, J. & Merritt, E. A. (2006). Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Crystallog. sect. D*, **62**, 439–450.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283–291.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R.,

- Gibson, T. J., Higgins, D. G. & Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucl. Acids Res.* **31**, 3497–3500.
33. Kleywegt, G. J. (1994). A super position. *CCP4/ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, **31**, 9–14.
34. DeLano, W. L. (2002). *The PyMol Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
35. Kabsch, W. & Sanders, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577–2637.

Edited by R. Huber

(Received 15 December 2006; received in revised form 10 April 2007; accepted 17 April 2007)
Available online 10 May 2007

DECLARAÇÃO

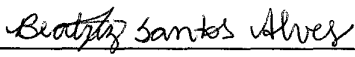
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado/doutorado intitulada “Caracterização das proteínas humanas Mov34 e PACT e análise da sua interação com o RNA do vírus da dengue”:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

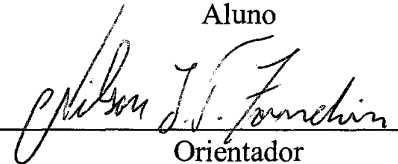
(x) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº NITZ 05.01), intitulado “Identificação e Caracterização Funcional e Estrutural de Proteínas Envolvidas no Processo de Tradução do Vírus da Dengue”

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).



Aluno



Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(x) Deferido () Indeferido



Nome: Profa. Dra. HELENA COUTINHO DE OLIVEIRA
Função: Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto: Identificação e Caracterização Funcional e Estrutural de Proteínas Envolvidas no Processo de Tradução do Vírus da Dengue

Pesquisador responsável: Prof. Dr. **Nilson Ivo Tonin Zanchin**

Experimentador: **Beatriz Santos Capela Alves**

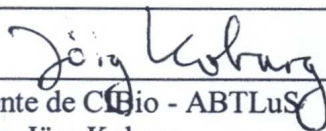
Nível do treinamento do experimentador: []-Iniciação científica, []-mestrado, []-doutorado, [x]-doutorado direto, []-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique: _____

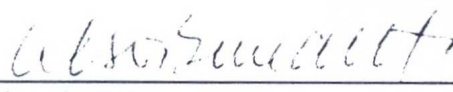
Resumo do projeto:

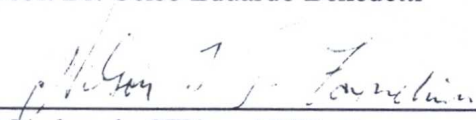
O combate à Dengue atualmente está praticamente limitado aos esforços de eliminação do mosquito transmissor, o *Aedes aegypti*, porém esta estratégia não tem se mostrado eficiente. O desenvolvimento de novos instrumentos de combate a Dengue requer, portanto, maior conhecimento sobre a Biologia do vírus com relação a sua interação com seus hospedeiros. O vírus codifica um número mínimo de proteínas necessárias para sua replicação, mas depende totalmente da maquinaria celular para a síntese de suas proteínas e este seria um possível ponto de bloqueio da infecção viral, já que a replicação depende da prévia síntese de suas proteínas. Pouco é conhecido sobre os fatores celulares envolvidos na tradução do RNA do vírus da Dengue. A região 5'UTR (região não-traduzida) viral possui organização similar à dos mRNAs eucarióticos, contendo em torno de 100 bases e uma estrutura *cap*. A região 3'UTR é longa, sem cauda de poli(A), contendo regiões conservadas entre os diferentes Flavivírus que formam estruturas secundárias estáveis. Como a região 5'UTR é similar a de mRNAs de eucariotos, os fatores que promovem a diferenciação deste RNA, fazendo com que a sua tradução seja realizada preferencialmente, colocando os mRNAs celulares em segundo plano, devem estar contidos na região 3'UTR. Este projeto tem por finalidade estudar o mecanismo de tradução do RNA do vírus da febre da dengue através da identificação e caracterização de proteínas que interagem com as regiões não traduzidas do genoma viral. Também será caracterizado o papel da proteína Mov34 na tradução destes RNAs, além de determinar sua estrutura tridimensional. Deste modo esperamos estar contribuindo para a aquisição de novos conhecimentos que futuramente poderão ajudar no desenvolvimento de novas formas de combate ao vírus da dengue.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 27.08.2007.

Parecer final: [X]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências, favor comentários abaixo:


 Presidente de CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Jörg Kobarg


 Membro da CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


 Membro da CIBio - ABTLuS
 Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin