

# Caracterização estrutural da Nucleoproteína do vírus Sabiá

**Pesquisador responsável: Eduardo Henrique Salviano Bezerra**  
**Instituição sede: Laboratório Nacional de Biociências (LNBio)**  
**Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)**

## Introdução

Atualmente, sabe-se que os Vírus da Família Arenaviridae, do gênero Mammarenavirus estão divididos entre espécies do Velho e Novo Mundo. Distribuídos em cerca de 18 espécies<sup>1</sup>, os Vírus do Novo Mundo contêm cerca de cinco Arenavírus associados como causadores de Febres Hemorrágicas Sul-Americanas, sendo eles: Junín, Guanarito, Sabiá (SABV), Machupo e Chapare, na Argentina, Venezuela, Brasil e Bolívia, respectivamente. A fim de relacionar a estrutura e biologia dos vírus, o Lassa vírus (LASV), Arenavírus do Velho Mundo é descrito como referência problemática de saúde pública, que apresenta uma ameaça endêmica na África Ocidental, com probabilidades de expansão continental<sup>2</sup>. Sabe-se que o LASV é uma base promissora para análises realizadas com SABV, devido à grande comparabilidade entre as espécies. A estrutura geral da partícula dos arenavírus (Figura 1) é organizada em um envelope lipídico que contém um genoma de RNA bissegmentado ambissenso, e sua partícula viral é definida entre 50-300 nanômetros<sup>3</sup>, que codifica quatro proteínas. A glicoproteína (GPC), nucleoproteína (NP), polimerase viral (proteína L) e a proteína de matriz viral (proteína Z)<sup>4</sup>.

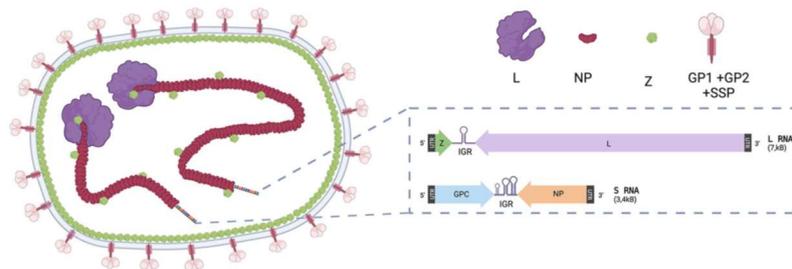


Figura 1: Organização da estrutura geral de arenavirus. (Fonte: Adaptado de Bezerra, 2023).

O Sabiá Vírus (SABV) tem sido relatado na literatura, considerado uma espécie ameaçadora causadora de febre hemorrágica brasileira<sup>5</sup>. Após a infecção por SABV, os sintomas não são específicos, e podem variar de dores abdominais, tosse, diarreia, febre, cefaléia, mal-estar, vômitos, até sangramento nas gengivas, tremores, choque, entre outros<sup>1</sup>, onde não há tratamento específicos ou imunoprofilaxia, somente para os sintomas ocasionados pela infecção.

Durante o processo de replicação viral, a nucleoproteína, a proteína alvo envolvida com o empacotamento do material genético do SABV assumindo diferentes conformações de acordo de sua forma livre ou complexada como ribonucleoproteína (RNP)<sup>6</sup>, adicionalmente apresentando uma atividade exonuclease responsável por degradar RNA de dupla fita para suprimir a imunidade do hospedeiro<sup>7</sup>. A purificação destas proteínas de SABV e a sua resolução estrutural é fundamental para o entendimento do mecanismo de formação da partícula viral e como são intermediadas as interfaces entre nucleoproteína com outras proteínas virais juntamente com o material genético do vírus. Proteínas recombinantes de arenavírus são amplamente utilizadas como modelos estruturais de entendimento para outros vírus como Lassa, LCMV e Junin<sup>8-11</sup>. A nucleoproteína também já é expressa como alvos no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico<sup>12</sup>. No entanto, a partir da clonagem, expressão e purificação da nucleoproteína recombinante de SABV, tende-se a entender as bases estruturais de como a proteína interage com o material genético do vírus e quais são os potenciais interfaces de sítios catalíticos para uma abordagem de procura de inibidores que possam modular a replicação viral. Desta maneira, a finalidade deste projeto se resume na caracterização estrutural da nucleoproteína, de forma com que seja uma direção para explorar e compreender a biologia viral do SABV para um planejamento racional de potenciais terapias e métodos de diagnóstico.

### **Objetivos:**

- Clonar em sistema heterólogo (Bactéria) a nucleoproteína de SABV.
- Desenvolver o protocolo de expressão e purificação da nucleoproteína.
- Cristalização da nucleoproteína utilizando o sistema robotizado e resolução da estrutura tridimensional da nucleoproteína por cristalografia de raios X.

### **Métodos:**

#### Expressão e purificação da nucleoproteína

A sequência do gene que corresponde à construção nucleoproteína de SABV para clonagem em bactéria será clonada em um vetor pET28a com uma calda 6xHis e sítio de clivagem para trombina. O vetor será transformado em *Escherichia coli* BL21 (DE3). As células irão crescer em meio LB e a expressão ocorrerá em 18°C induzida com 0.1 mM de IPTG e as células coletadas são lisadas por sonicação. O lisado de células de bactéria será centrifugado e o sobrenadante é aplicado à uma cromatografia de afinidade em uma coluna HisTrap FF 5mL com tampão Tris 50 mM com 100 mM NaCl, pH 8,0. A fração retida e lavada com o mesmo tampão adicionada de 500 mM de imidazol. A proteína é dializada contra o tampão e clivada com trombina por 16h para clivagem da calda 6xHis. A amostra é reaplicada na

coluna de HisTrap e coletada na fração não retida para ser concentrada e coletadas em uma coluna de gel filtração Superdex 200 16/600 e concentrada.

### Cristalografia de proteínas

As proteínas serão cristalizadas através do método da difusão de vapor utilizado de uma plataforma robotizada para triagens de condições de cristalização no robô de cristalização Mosquito®. Os cristais obtidos serão levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron SIRIUS, Campinas – SP, para coleta de dados na estação experimental MANACA. Um conjunto completo de dados será obtido a partir do uso de uma placa de imagem PILATUS. Os dados de difração de raios X serão integrados usando o programa XDS e reduzido utilizando a plataforma AUTOPROC da linha de luz. O método da substituição molecular será resolvido usando Phaser e o refinamento da estrutura será feito usando Phenix.

### **Referências**

1. Ellwanger, J. H. & Chies, J. A. B. Keeping track of hidden dangers - The short history of the Sabiá virus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* vol. 50 (2017).
2. Hastie, K. M. *et al.* Crystal Structure of the Oligomeric Form of Lassa Virus Matrix Protein Z. *J. Virol.* **90**, 4556–4562 (2016).
3. Wolff, S., Ebihara, H. & Groseth, A. Arenavirus Budding: A Common Pathway with Mechanistic Differences. *Viruses* **5**, 528–549 (2013).
4. Bezerra, E. H., Melo-Hanchuk, T. D. & Marques, R. E. Structural and molecular biology of Sabiá virus. *Exp. Biol. Med.* **248**, 1624–1634 (2023).
5. de Mello Malta, F. *et al.* Sabiá virus-like mammarenavirus in patient with fatal hemorrhagic fever, Brazil, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, (2020).
6. Lee, K. J., Novella, I. S., Teng, M. N., Oldstone, M. B. A. & de la Torre, J. C. NP and L Proteins of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Are Sufficient for Efficient Transcription and Replication of LCMV Genomic RNA Analogs. *J. Virol.* **74**, (2000).
7. Jiang, X. *et al.* Structures of Arenaviral Nucleoproteins with Triphosphate dsRNA Reveal a Unique Mechanism of Immune Suppression. *J. Biol. Chem.* **288**, 16949–16959 (2013).
8. West, B. R., Hastie, K. M. & Saphire, E. O. Structure of the LCMV nucleoprotein provides a template for understanding arenavirus replication and immunosuppression. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, (2014).
9. Hastie, K. M. *et al.* Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, (2011).
10. Papageorgiou, N. *et al.* Brothers in arms: Structure, assembly and function of arenaviridae nucleoprotein. *Viruses* vol. 12 (2020).
11. Zhang, Y. *et al.* Crystal structure of Junin virus nucleoprotein. *J. Gen. Virol.* **94**, (2013).
12. Fukushi, S., Tani, H., Yoshikawa, T., Saijo, M. & Morikawa, S. Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers. *Viruses* **4**, 2097–2114 (2012).