

Patricia Ribeiro de Moura

**Análise funcional e estrutural da proteína HBx
do vírus da hepatite B**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PATRICIA RIBEIRO DE MOURA
Jörg Kobarg
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Biologia Funcional
e Molecular, na área de
Bioquímica

Orientador : Prof. Dr. Jörg Kobarg

2005

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

M865a

Moura, Patricia Ribeiro de
Análise funcional e estrutural da proteína HBx do vírus da hepatite B / Patricia Ribeiro de Moura. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Jörg Kobarg.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hepatite por vírus. 2. Hepatite B. 3. Dicroísmo circular. 4. Fluorescência. 5. Ressonância magnética nuclear. I. Jörg Kobarg. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Functional and structural analysis of the hepatitis B virus X protein.

Palavras-chave em inglês: viral hepatitis, hepatitis B, circular dichroism, fluorescence, nuclear magnetic resonance.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutorado.

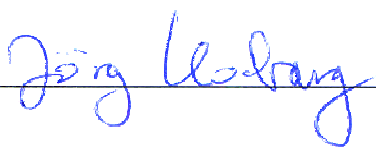
Banca examinadora: Jörg Kobarg, Débora Foguel, Charlotte Marianna Hársi, Beatriz Gomes Guimarães, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.

Data da defesa: 28/06/2005.

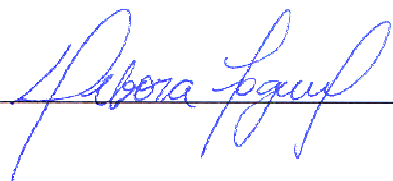
Data da defesa: 28 de junho de 2005.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jörg Kobarg (Orientador)



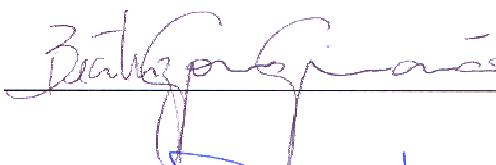
Profa. Dra. Débora Foguel



Profa. Dra. Charlotte Marianna Hársi



Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães



Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

*Ao meu pai, Carlos Eduardo,
com amor.*

Agradecimentos

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido, e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pela infra-estrutura onde este trabalho de doutorado foi desenvolvido. À secretária Andréia Vigilato, do departamento de BFM do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo apoio e pela assessoria nos trâmites burocráticos.

Ao Dr. Jörg Kobarg, pela orientação, confiança e incentivo, ao longo destes 7 anos de convívio, e por me apresentar ao mundo da Biologia Molecular. Ao Prof. Dr. Rogério Meneghini, pelo apoio no desenvolvimento deste projeto.

Aos membros titulares da banca, Profa. Dra. Débora Foguel, Profa. Dra. Charlotte Marianna Hársi, Dra. Beatriz Gomes Guimarães, Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, e aos suplentes, Prof. Dr. Hiroshi Aoyama e Dr. Celso Eduardo Benedetti, por terem aceitado o convite.

Ao Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, à Dra. Thelma de Aguiar Pertinhez e à Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães, pelas sugestões e críticas valiosas no exame de qualificação. Ao Dr. Francisco Javier Medrano Martin, um agradecimento especial pelas inúmeras discussões sobre Espectroscopia. Ao Dr. Alberto Spisni e à Dra. Thelma de Aguiar Pertinhez pela aquisição dos espectros de RMN, e ao Dr. Sérgio Oyama Jr. pela colaboração na construção do modelo da proteína HBx.

Aos integrantes do grupo de Biologia Molecular (BMO): Alexandre, Edmilson, Eliana, Eugenia, Daniel, Dario, Flávia, Gustavo, Kaliandra, Marcelo, Marcos Tadeu, Marcos Rodrigo, Samanta e Taís. Meu especial agradecimento aos “sobreviventes” do grupo HBx: Edmilson, Kaliandra e Samanta, que persistiram por todos estes anos no estudo da proteína HBx, e nunca “abandonaram o barco”!

Aos integrantes do grupo de RMN: Aline, Eliana, Leonardo, Maurício, Rita e Sérgio, pela acolhida carinhosa durante todos esses anos de agradável convívio. À Ana Olívia, Letícia, Eurípedes, Veruska e Wiliam, pelo carinho e momentos de descontração. Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Laboratório de Espectroscopia (LEC) e Laboratório de Cristalografia de Proteínas (LCP), e à todos do LNLS que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, como as técnicas Adriana, Eugenia, Givanil, Luciana, Sílvia, Tereza, Veruska e Zildene.

Agradeço ao Renato, Milton, Reginaldo e Cláudio, pelo carinho e apoio; à bibliotecária Margarida, pelos inúmeros artigos; e ao Fernando Lapa, pela ajuda com os relatórios financeiros. Também agradeço à prestativa equipe de segurança do LNLS, às secretárias da SAU, e às secretárias da Biologia, Marisa e Ísis.

À Amanda, Ellen, Henrique, Elaine e Sandra, pelo carinho e pelo apoio espiritual em todos os momentos difíceis nos dois últimos anos. Ao Eric, José Luis, Vanessa, Adriana, Samanta, Ana Lúcia, Andreia e Ana Cláudia, por trazerem um pouco de diversão à minha vida. Ao Túlio e ao primo Paulo Telles, por terem me recebido com tanto carinho em Boston. À minha amiga-irmã Cláudia, pelo apoio e carinho dedicados, e por “*cheer me up*” muitas, muitas e muitas vezes!

Ao Hélio, por manter o meu equilíbrio físico e mental através do *shiatsu* e da acupuntura, e ao Dr. Nelson, Dra. Anna e Dra. Benedita, por cuidarem do meu corpo físico. Ao Dr. Manuel Falcão e à equipe de enfermeiros e técnicos do Centro Médico de Campinas, que têm sido muito atenciosos e prestativos na recuperação de meu pai.

À Leandra, pelo apoio e carinho incondicionais, e por me incentivar a continuar estudando e não desistir de procurar o meu “caminho”. Não posso deixar de agradecer pelos inúmeros cafés, *cappuccinos*, lanches, lasanhas, saladas, salgadinhos, biscoitos, macarrão, sucos, sorvetes, frutas e pizzas, que me mantiveram viva nas inúmeras madrugadas e finais de semana que passei no LNLS...

Um agradecimento especial à dupla Leandra & Sérgio, meus fiéis companheiros de madrugada no LNLS. Muito obrigada, Leandra, Henrique, Sérgio e Aline, pelas preciosas sugestões na correção da tese!

Às famílias Amaya, Kascheres, Sakanaka e Stempfle, por serem uma extensão da minha família. À tia Ruth, tia Sophie, tia Leni, dona Emiko, Lúcia e Suzi Eliana, pelo apoio e presença nos últimos meses. Um agradecimento especial ao meu pai, mãe, irmão, vó Claudia, tio Nando e Júlia, pelo carinho, compreensão e tolerância nos últimos quatro “loucos” anos de doutorado.

E, por fim, aos inventores do café e do chocolate, meus eternos e fiéis companheiros (desde o mestrado, nos idos de 97) nas diversas noites que passei em claro, escrevendo a tese de doutorado, analisando os dados espectroscópicos e estudando...

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIACÕES	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 As hepatites virais	1
1.2 A hepatite B e o câncer de fígado	3
1.3 O vírus da hepatite B	4
1.4 A proteína HBx	8
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Plasmídeos, linhagens de células procariotas e eucariotas.....	13
3.1.1 Plasmídeos	13
3.1.2 Bactérias	14
3.1.3 Leveduras	15
3.1.4 Células de insetos <i>Sf9</i>	17
3.1.5 Células humanas HeLa	17
3.2 Manipulação de ácidos nucléicos	17
3.2.1 Síntese de oligonucleotídeos de DNA e de RNA	17
3.2.2 Extração de RNA total	20
3.2.3 Síntese de primeira fita de cDNA	21
3.2.3.1 <i>Northern blot</i>	22
3.2.4 Amplificação de DNA pela reação de PCR	23
3.2.4.1 PCR de colônia	23
3.2.5 Eletroforese em gel de agarose	24
3.2.6 Purificação de fragmentos de DNA e de produtos de PCR	24
3.2.7 Digestão de DNA com enzimas de restrição	24
3.2.8 Reação de ligação de DNA	24
3.2.9 Transformação de bactérias competentes por choque térmico	25
3.2.10 Extração de DNA plasmideal	25
3.2.11 Mutagênese sítio-dirigida	26
3.2.12 Sequenciamento de DNA	26
3.3 Expressão de proteína recombinante	27
3.3.1 Expressão em <i>Escherichia coli</i>	27
3.3.1.1 Procedimento para a indução da expressão	27
3.3.1.2 Lise bacteriana	27
3.3.1.3 Isolamento e purificação de corpos de inclusão	28

3.3.2 Expressão em células de inseto <i>Sf9</i> (sistema de Baculovírus)	29
3.3.2.1 Transfecção das células de inseto <i>Sf9</i>	29
3.3.2.2 Lise das células de inseto <i>Sf9</i>	29
3.3.3 Expressão em leveduras <i>Pichia pastoris</i>	29
3.3.3.1 Eletroporação	30
3.3.3.2 Seleção com geneticina (G418)	30
3.3.3.3 Indução da expressão	31
3.3.4 Expressão em células humanas HeLa	31
3.3.4.1 Transfecção estável de células humanas HeLa.....	31
3.3.4.2 Ensaios de cinética de degradação de mRNAs	32
3.3.4.3 Crescimento de células HeLa na presença e ausência de HBx	32
3.4 Purificação e análise de proteína recombinante	33
3.4.1 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade	33
3.4.1.1 Proteínas em fusão com a cauda de poli-histidina	34
3.4.1.1.1 Renaturação das proteínas recombinantes	34
3.4.1.2 Proteínas em fusão com a proteína GST	35
3.4.2 Análise de proteínas em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE)	36
3.4.2.1 <i>Western blot</i>	36
3.5 Ensaios funcionais	37
3.5.1 Interação proteína-oligonucleotídeo de RNA	37
3.5.1.1 Marcação de sondas radioativas	37
3.5.1.2 Ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética (<i>EMSA</i>) ...	38
3.5.1.3 Ensaios de <i>UV cross-linking</i>	38
3.5.2 Interação proteína-proteína <i>in vitro</i> (<i>pull down</i>)	39
3.5.3 Ensaios de ativação de gene repórter (mono-híbrido)	39
3.6 Ensaios espectroscópicos	41
3.6.1 Absorbância no UV-Visível	41
3.6.2 Dicroísmo circular (CD)	42
3.6.3 Emissão intrínseca de fluorescência	42
3.6.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	43
3.7 Modelagem molecular	44
3.7.1 Predição de estrutura secundária	44
3.7.2 Busca de estruturas conhecidas e alinhamento	44
3.7.3 Construção e avaliação do modelo	45
4. RESULTADOS	47
4.1 Construção dos plasmídeos	47
4.2 Expressão, purificação e renaturação das proteínas HBx	49
4.2.1 Proteínas em fusão com a cauda de poli-histidina	50
4.2.2 Proteínas em fusão com a proteína GST	57
4.3 Mapeamento da interação da proteína HBx com os oligonucleotídeos de RNA	60
4.4 Interação <i>in vitro</i> da proteína HBx com a proteína humana p53	67
4.5 Ativação de gene repórter em sistema de mono-híbrido em levedura	69
4.6 Expressão em sistemas eucarióticos	71
4.7 Cinética da degradação de mRNAs em células HeLa	74
4.8 Aumento do crescimento das células HeLa na presença de HBx	77

4.9 Caracterização estrutural da proteína HBx por dicroísmo circular	80
4.9.1 O tampão de diálise influenciou na estruturação da proteína HBx	82
4.9.2 A proteína HBx apresentou uma parcial estruturação secundária	87
4.9.3 A proteína HBx apresentou uma relativa estabilidade térmica	93
4.9.4 A adição de TFE causou alterações estruturais na proteína HBx	99
4.9.5 A adição de SDS alterou a estrutura secundária da proteína HBx	106
4.9.6 A adição do oligonucleotídeo de RNA AU-38 alterou a estrutura secundária da proteína mini-HBx(19-142)	110
4.9.7 A adição de NaCl não alterou a estrutura secundária da proteína mini-HBx(-Cys)(19-142)	112
4.10 Espectros de emissão de fluorescência	113
4.11 Análise por Ressonância Magnética Nuclear	125
4.12 Modelagem molecular da proteína HBx por homologia	132
5. DISCUSSÃO	138
6. CONCLUSÕES	147
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
8. ANEXOS	157
8.1 - Lista de produtos e equipamentos	158
8.2 - Mapas dos plasmídeos	159
8.3 - Artigos publicados	160
Artigo 1 - <i>Virus Research</i> (2001) 74 : 59-73.....	161
Artigo 2 - <i>Virus Research</i> (2005) 108 : 121-131.....	176
Artigo 3 - <i>Journal of Virological Methods</i> (2005) 126 : 65-74.....	187
8.4 - Súmula curricular	197

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos macroscópicos e microscópicos de um fígado normal, um fígado com cirrose e um fígado canceroso	2
Figura 2 - Distribuição geográfica da prevalência do antígeno HBsAg devido à infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV)	3
Figura 3 - Microscopia eletrônica das partículas do vírus da hepatite B (HBV)	4
Figura 4 - Esquema de uma partícula de Dane, mostrando as proteínas de superfície, o nucleocapsídeo, a DNA polimerase/transcriptase reversa e o DNA viral de fita parcialmente dupla	5
Figura 5 - Diagrama esquemático do ciclo replicativo do vírus da hepatite B (HBV) dentro de um hepatócito	6
Figura 6 - Representação esquemática do genoma do HBV, indicando as seqüências de leitura aberta preS1, preS2, S, preC, C, P e X	7
Figura 7 - Esquema da proteína HBx(1-154), mostrando as regiões conservadas, os domínios de trans-repressão e de trans-ativação, e as regiões de domínio do tipo Kunitz	9
Figura 8 - Influência da proteína HBx na ativação de NF- κ B e das cascatas de sinalização celular de MAPK e JAK/STAT	11
Figura 9 - Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína HBx completa (subtipo HBV <i>ayw</i>)	47
Figura 10 - Representação esquemática das proteínas HBx(1-154), mini-HBx(19-142) e dos 13 mutantes Cys/Ser mini-HBx(19-142)	48
Figura 11 - Análise da expressão a 37 °C em <i>E. coli</i> das proteínas 6xHis-HBx, 6xHis-mini-HBx e 6xHis-mini-HBx(-Cys) por SDS-PAGE 12,5 %	51
Figura 12 - Análise da expressão da proteína 6xHis-HBx em <i>E. coli</i> por SDS-PAGE 12,5%.....	52
Figura 13 - <i>Western blot anti-His</i> e <i>anti-HBx</i> das proteínas de fusão 6xHis-HBx, 6xHis-mini-HBx e 6xHis-mini-HBx(-Cys)	53
Figura 14 - Análise por SDS-PAGE das proteínas 6xHis-HBx, 6xHis-mini-HBx e mutantes Cys/Ser 6xHis-mini-HBx sob condições redutoras e não redutoras	54
Figura 15 - Análise da indução da expressão da proteína 6xHis-NusA-HBx em <i>E. coli</i> em diferentes temperaturas	55
Figura 16 - Análise da expressão da proteína 6xHis-NusA-HBx em <i>E. coli</i>	56
Figura 17 - Representação esquemática das proteínas de fusão GST-HBx(5-154), GST-HBx(5-78) e GST-HBx(80-142)	57
Figura 18 - Análise da expressão a 25 °C das proteínas de fusão GST-HBx(5-154), GST-HBx(5-78) e GST-HBx(80-142) em <i>E. coli</i> através de SDS-PAGE 12,5%	58
Figura 19 - Análise da expressão das proteínas GST e GST-HBx em <i>E. coli</i>	59
Figura 20 - Análise por SDS-PAGE 12,5% e <i>Western blot anti-GST</i> da expressão da proteína de fusão GST-p53(1-393) em <i>E. coli</i>	60
Figura 21 - Análise das interações entre a proteína GST-HBx(80-142) e os diferentes oligonucleotídeos de RNA através de <i>EMSA</i>	61
Figura 22 - Análise das interações entre as proteínas GST-HBx e os diferentes oligonucleotídeos de RNA através de <i>EMSA</i>	63
Figura 23 - Comparação da especificidade de ligação das proteínas GST-HBx aos oligonucleotídeos de RNA poli U(25) e AU-38 através de <i>EMSA</i>	64

Figura 24 - Mapeamento da especificidade de ligação da proteína HBx aos oligonucleotídeos de RNA através de <i>UV cross-linking</i>	65
Figura 25 - Análise das interações entre as proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina com o oligonucleotídeo de RNA AU-38 através de <i>UV cross-linking</i>	67
Figura 26 - Ensaio de interação <i>in vitro</i> (“pull down”) das proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina com a proteína GST-p53(1-393)	68
Figura 27 - Diagrama esquemático do sistema de mono-híbrido em levedura, e análise da influência dos resíduos de cisteína da proteína HBx na ativação do gene repórter em sistema de mono-híbrido em levedura	70
Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose do PCR de colônia das células HeLa transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1/Hygro(+) e pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154)	74
Figura 29 - Cinética da degradação dos mRNAs dos proto-oncogenes <i>c-fos</i> e <i>c-myc</i> em células HeLa, na ausência e presença da proteína HBx, analisada através de <i>Northern blot</i>	75
Figura 30 - Análise quantitativa da degradação dos mRNAs dos proto-oncogenes <i>c-fos</i> e <i>c-myc</i> das células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) ou com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154)	76
Figura 31 - Influência da proteína HBx no crescimento de células HeLa	78
Figura 32 - Influência da proteína HBx na viabilidade de células HeLa	79
Figura 33 - Predição de estrutura secundária da proteína HBx(1-154) através do programa <i>PSIPRED</i>	81
Figura 34 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra os tampões A, C e E	82
Figura 35 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra os tampões A-E e F-K	84
Figura 36 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra os tampões A, C, E, I e J	86
Figura 37 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) na presença de concentrações crescentes de uréia	88
Figura 38 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença de concentrações crescentes de uréia	90
Figura 39 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de uréia	92
Figura 40 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante de 10 µM da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) em água pH 6,0, durante o aquecimento de 4 °C a 90 °C seguido de resfriamento de 70 °C a 4 °C	94
Figura 41 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante de 10 µM da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) em água pH 6,0, durante o aquecimento de 4 °C a 90 °C seguido de resfriamento de 70 °C a 4 °C	96
Figura 42 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante de 10 µM da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0, durante o aquecimento de 4 °C a 90 °C seguido de resfriamento de 70 °C a 4 °C	98
Figura 43 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) na presença de concentrações crescentes de TFE	101

Figura 44 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença de concentrações crescentes de TFE	103
Figura 45 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de TFE	105
Figura 46 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) na presença de concentrações crescentes de SDS	106
Figura 47 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença de concentrações crescentes de SDS	108
Figura 48 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de SDS	109
Figura 49 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença do oligonucleotídeo de RNA AU-38	111
Figura 50 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de NaCl	112
Figura 51 - Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra diferentes tampões	114
Figura 52 - Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra diferentes tampões	115
Figura 53 - Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra diferentes tampões	116
Figura 54 - Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM das proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0, e na presença de uréia 6 M	117
Figura 55 - Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM das proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisadas contra água pH 6,0, e na presença de 24 µM de ANS	119
Figura 56 - Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra o tampão B, e na presença de concentrações crescentes de uréia	121
Figura 57 - Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 4 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada sequencialmente contra o tampão D contendo concentrações decrescentes de uréia	122
Figura 58 - Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C e a 37 °C de 2 µM da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 e na presença de 100 mM NaCl	123
Figura 59 - Espectro de ¹ H RMN unidimensional de ~400 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água / 5% D ₂ O, pH 6,0 a 25 °C	125
Figura 60 - Espectro de ¹ H RMN unidimensional de ~330 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em 20% TFE- <i>d</i> ₃ / 5% D ₂ O, pH 6,0 a 25 °C	127
Figura 61 - Espectros de ¹ H RMN unidimensionais a 10 °C, 20 °C, 25 °C e 37 °C de ~400 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0 contendo 100 mM NaCl	128
Figura 62 - Região de impressão digital (NH-Hα) do espectro de ¹ H-TOCSY de ~400 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água / 5% D ₂ O, pH 6,0 a 25 °C	129

Figura 63 - Região de impressão digital (NH-H α) do espectro de ^1H -NOESY de ~330 μM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água / 5% D_2O , pH 6,0 a 25 °C	130
Figura 64 - Região de impressão digital (NH-H α) do espectro de ^1H -NOESY de ~330 μM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em 20% TFE- d_3 / 5% D_2O , pH 6,0 a 25 °C	131
Figura 65 - Alinhamento refinado manualmente das seqüências primárias do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) e da proteína LipDH(388-472)	132
Figura 66 - Gráfico de Ramachandran que avalia a qualidade estereoquímica do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91)	133
Figura 67 - Parâmetros das propriedades dos resíduos do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) gerado através do programa MODELLER e analisado pelo pacote de programas PROCHECK	133
Figura 68 - Superfície de acessibilidade ao solvente e representação em fita do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) gerado através do programa MODELLER e visualizado pelo programa InsightII	134
Figura 69 - Superfície eletrostática do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) gerado através do programa MODELLER e visualizado pelo programa WebLab Viewer	135
Figura 70 - Superfície de acessibilidade ao solvente e representação em fita do modelo do fragmento mini-HBx(7-91) gerado através do programa MODELLER e visualizado pelo programa InsightII	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de algumas proteínas que interagem com a proteína HBx	10
Tabela 2 - Plasmídeos utilizados na clonagem e na expressão de proteína	13
Tabela 3 - Plasmídeos utilizados nos experimentos de ativação de gene repórter em sistema mono-híbrido de levedura	14
Tabela 4 - Oligonucleotídeos de DNA específicos para as clonagens em plasmídeos apropriados	18
Tabela 5 - Oligonucleotídeos de DNA utilizados na amplificação de fragmentos dos proto-oncogenes <i>c-fos</i> e <i>c-myc</i> e da beta-actina	19
Tabela 6 - Oligonucleotídeos de DNA específicos para seqüenciamento	19
Tabela 7 - Oligonucleotídeos de RNA específicos para os ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética (<i>EMSA</i>) e de <i>UV cross-linking</i>	20
Tabela 8 - Tampões utilizados para a renaturação das proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina	35
Tabela 9 - Plasmídeos gerados com as clonagens	46
Tabela 10 - Condições de indução da expressão em <i>E. coli</i> das proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina	50
Tabela 11 - Condições de expressão em <i>E. coli</i> da proteína GST e das proteínas HBx fusionadas à proteína GST	57
Tabela 12 - Número total de células HeLa recuperadas em cada tempo de incubação e porcentagem de células viáveis para as duas linhagens celulares	78
Tabela 13 - Dados característicos para as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) de acordo com o programa <i>ProtParam</i>	80
Tabela 14 - Variação na estrutura secundária da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra os tampões A, C e E	82
Tabela 15 - Valores de concentração da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra os diferentes tampões	83
Tabela 16 - Valores dos mínimos dos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) renaturada contra os diferentes tampões de diálise	83
Tabela 17 - Variação na estrutura secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra os diferentes tampões	85
Tabela 18 - Variação na estrutura secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra os tampões A, C, E, I e J	87
Tabela 19 - Variação na estrutura secundária de 10 μ M da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de uréia	89
Tabela 20 - Variação na estrutura secundária de 5 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de uréia	91
Tabela 21 - Variação na estrutura secundária de 5 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de uréia	93
Tabela 22 - Variação na estrutura secundária de 10 μ M da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra água pH 6,0 em algumas temperaturas	95
Tabela 23 - Variação na estrutura secundária de 10 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra água pH 6,0 em algumas temperaturas	97

Tabela 24 - Variação na estrutura secundária de 10 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 em algumas temperaturas	99
Tabela 25 - Variação na estrutura secundária de 10 µM da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de TFE	100
Tabela 26 - Variação na estrutura secundária de 5 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de TFE	102
Tabela 27 - Variação na estrutura secundária de 5 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de TFE	104
Tabela 28 - Variação na estrutura secundária de 5 µM da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de SDS	107
Tabela 29 - Variação na estrutura secundária de 5 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de SDS	108
Tabela 30 - Variação na estrutura secundária de 5 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys) (19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de SDS	110
Tabela 31 - Variação na estrutura secundária de 15 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra o tampão B na presença de 0,5 pmol do oligonucleotídeo de RNA AU-38 em diferentes tempos de incubação	111
Tabela 32 - Variação na estrutura secundária de 5 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de NaCl	113
Tabela 33 - Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra diferentes tampões	114
Tabela 34 - Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra diferentes tampões	115
Tabela 35 - Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys) (19-142) dialisada contra diferentes tampões	116
Tabela 36 - Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM das proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisadas contra água pH 6,0 e na presença de uréia 6 M	117
Tabela 37 - Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM das proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisadas contra água pH 6,0 e na presença de 24 µM de ANS	120
Tabela 38 - Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra o tampão B e na presença de concentrações crescentes de uréia	121
Tabela 39 - Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 4 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada sequencialmente contra o tampão D	122
Tabela 40 - Dados de emissão de fluorescência a 25 °C e a 37 °C de 2 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0, e na presença de 100 mM NaCl e de 6 M Gdn-HCl	124

LISTA DE ABREVIACÕES

AD	domínio de ativação transcricional da proteína Gal4 (<i>Activation domain</i>)
ANS	ácido 1-anilino-naftaleno-8-sulfônico
APS	persulfato de amônio
BD	domínio de ligação ao DNA da proteína Gal4 (<i>Binding domain</i>)
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CD	Dicroísmo Circular
DEPC	dietil-pirocarbonato
D₂O	água deuterada
DOTAP	<i>N-[1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate</i>
DTT	1,4 ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EMSA	ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
Gdn-HCl	cloridrato de guanidina
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
GST	glutathiona-S-transferase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HBV	vírus da hepatite B
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	quilo Dalton
LB	Luria Bertani
MCS	sítio de clonagem múltipla (<i>Multiple cloning site</i>)
MOPS	ácido 4-morfolino propano sulfônico
mRNA	RNA mensageiro
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
Ni-NTA	ácido níquel-nitrilotriacético
OD₆₀₀	densidade ótica a 600 nm

ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
pb	pares de bases
PCR	reação da polimerase em cadeia (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	polietilenoglicol
Pipes	<i>piperazine-1, 4-bis (2-ethanesulfonic acid)</i>
PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonila
ppm	partes por milhão
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TEMED	N, N, N', N' tetrametil etilenodiamina
TFE	álcool trifluoroetanol
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Tris	tris-hidroximetil aminometano
Tween 20	<i>polyoxyethylene sorbitanmonolaurate</i>
u. a.	unidade arbitrária
UTR	região não traduzida
UV	ultravioleta
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
WB	<i>Western blot</i>

RESUMO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) é uma das causas do desenvolvimento do câncer de fígado. O genoma do HBV codifica a onco-proteína HBx, uma proteína multi-funcional de 17 kDa que possui 10 resíduos de cisteína, e que está relacionada com a indução do câncer de fígado em camundongos transgênicos para HBx. Apesar de não ter uma função definida, sabe-se que a proteína HBx é um potente trans-ativador transcricional, ativando a transcrição de muitos promotores virais e celulares através de interações proteína-proteína, uma vez que HBx não interage diretamente com o DNA de fita dupla. Desta forma, HBx pode afetar a replicação e proliferação virais, e interferir nos processos celulares de apoptose e carcinogênese. Neste trabalho, a proteína HBx foi expressa em *E. coli*, em fusão com a proteína GST ou com a cauda de poli-histidina, e utilizada em ensaios funcionais e estruturais. Através de ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética e *UV cross-linking*, observou-se que a proteína HBx possui uma afinidade maior pelos oligonucleotídeos de RNA ricos em bases “A”, “U” e “AU”, com tamanho superior a 21-mer, e que os resíduos de cisteína não interferiram na ligação da HBx com o oligonucleotídeo de RNA AU-38. A ausência dos resíduos de cisteína da proteína HBx também não interferiu na ativação do promotor alvo para a proteína p53, em sistema de mono-híbrido em levedura, nem tampouco na interação *in vitro* da HBx com a proteína humana p53, o que foi confirmado através de um ensaio de co-precipitação. Em cultura de células HeLa, a proteína HBx causou um aumento do crescimento celular e uma leve estabilização dos mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc*, como mostraram os ensaios de cinética de degradação de mRNAs, e esta estabilização poderia contribuir para o fenótipo transformador da onco-proteína HBx. Os experimentos de dicroísmo circular e de fluorescência mostraram que a proteína HBx encontrava-se parcialmente estruturada em solução aquosa, mas apresentou uma tendência à estruturação sob determinadas condições experimentais, o que poderia ser uma consequência de uma provável flexibilidade conformacional inerente à proteína HBx. Uma estrutura flexível poderia explicar as interações observadas entre a HBx e uma variedade de proteínas celulares e ácidos nucléicos de fita simples, de modo que a proteína HBx poderia interferir nos processos de sinalização, transcrição, apoptose e nos mecanismos de reparo de DNA, que levariam ao desenvolvimento do câncer de fígado.

ABSTRACT

Chronic infection of the hepatitis B virus (HBV) is one of the causes leading to liver cancer. The HBV genome encodes the 17 kDa onco-protein HBx, a multi-functional protein that contains 10 cysteine residues and is related to induce liver cancer in transgenic mice. The exact function of HBx is still unknown. However, it has been shown that HBx is a potent trans-activator, which activates transcription of many cellular and viral promoters indirectly through protein-protein interactions, although it does not bind to double-stranded DNA directly. Besides, the HBx protein can affect viral replication and proliferation, and it interferes with cellular apoptosis and carcinogenesis. In this work, the recombinant HBx protein was expressed in *E. coli* as a GST or 6xHis fusion protein, and used in functional and structural assays. By *Electrophoretic Mobility Shift Assay* and *UV cross-linking* assays, it was observed that the HBx protein was able to bind to the “A”, “U” and “AU” rich RNA oligonucleotides, and that the cysteine residues of the HBx protein were not required for its binding to the AU-rich RNA oligonucleotide (AU-38). The lack of cysteine residues in the HBx protein did not interfere with the p53 promoter activation in the yeast one-hybrid system, or neither in the *in vitro* interaction through a co-precipitation assay of the HBx and human p53 protein. In HeLa cells, the HBx protein increased the cellular growth and caused a slight *c-fos* and *c-myc* mRNA stabilization. This mRNA stabilization could contribute for the transforming character of the onco-protein HBx. Both the circular dichroism and fluorescence spectroscopic assays had shown that the HBx protein was partially structured in aqueous solution, but the protein presented a propensity to gain secondary structure under specific experimental conditions. The HBx inherent conformational flexibility might explain its interaction with a wide array of cellular proteins and single-stranded nucleic acids, in a way that the HBx protein interferes with signaling cellular processes, modulates transcription, apoptosis and DNA repair, and contributes to the development of the liver cancer.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de fígado é um dos cânceres mais comuns no mundo, e a hepatite B é uma das causas do seu desenvolvimento (Alter, 2003). A hepatite é causada por uma inflamação no fígado em resposta a diversos fatores como, por exemplo, o uso excessivo de álcool, efeitos colaterais de drogas ou medicamentos tóxicos, doenças imunológicas e infecções virais (Arbuthnot & Kew, 2001). As infecções virais são a causa mais comum de inflamação hepática, de modo que as hepatites virais são um importante problema de saúde pública mundial (Fattovich, 2003).

1.1 As hepatites virais

Os sintomas produzidos pela hepatite viral crônica variam de uma simples gripe até a perda de memória, ocorrência de vermelhidões na pele, dores nas articulações e fadiga. No caso da hepatite aguda, a fadiga intensa também se faz presente, acompanhada de febre baixa, de falta de apetite, pele e olhos amarelados, urina escura e desconforto gastrointestinal. Contudo, há pacientes com hepatite aguda ou crônica que são assintomáticos, de modo que os sintomas não são um parâmetro para acompanhar a evolução da doença.

Enquanto a recuperação da infecção viral em muitos casos é espontânea, existem casos em que a hepatite aguda pode levar à morte em poucos dias, com a perda total e rápida das funções hepáticas, como no caso da hepatite fulminante. Em outros casos, a hepatite crônica progride para a cirrose hepática, que se caracteriza por necrose (destruição das células), fibrose (células de cicatrização) e nódulos de regeneração, de modo que as células regeneradas não conseguem mais realizar as mesmas funções das células hepáticas normais.

Quando a cirrose se prolonga, outras complicações severas podem levar ao desenvolvimento do câncer de fígado (Robinson, 1994; Hollinger, 1996) como ilustrado na figura 1. Nessa figura, temos a visão macroscópica de um fígado normal, com cirrose e com câncer, além de uma visão microscópica mostrando as alterações morfológicas presentes em cortes de fígado normal, com fibrose, e de um fígado com cirrose e infiltrado inflamatório.

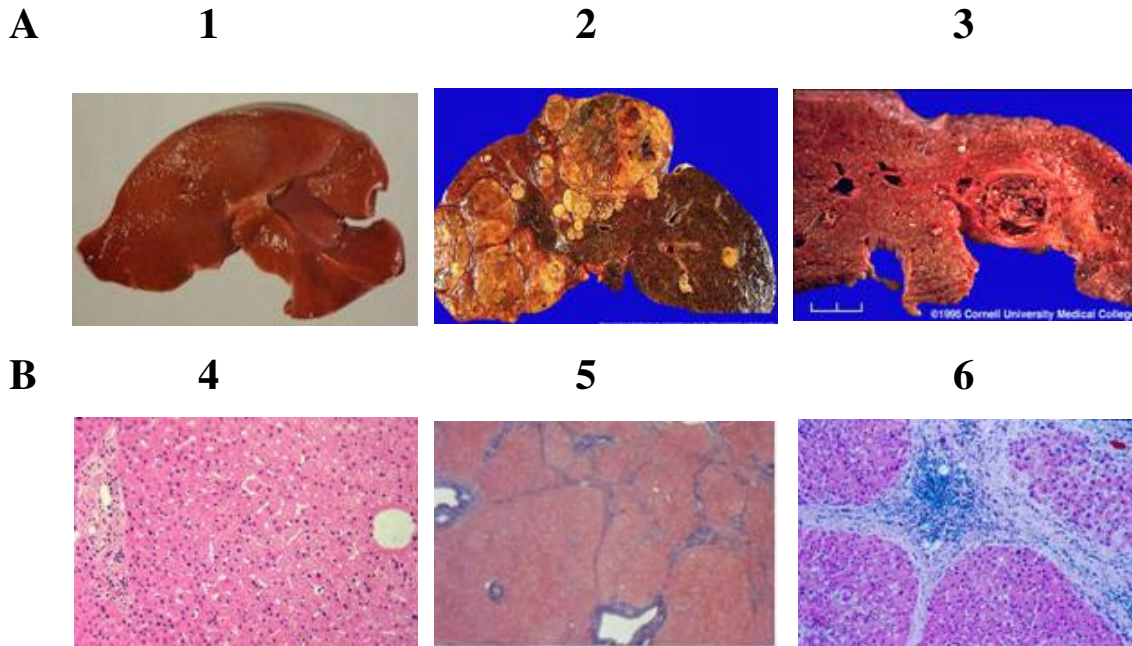


Figura 1 - A) Aspectos macroscópicos de um fígado normal (1), um fígado com cirrose (2) e um fígado canceroso (3). **B)** Aspectos microscópicos de um corte histológico de um fígado normal (4), um fígado com fibrose (5), e um fígado apresentando cirrose e infiltrado inflamatório (6). (http://www.mackenzie.com.br/universidade/exatas/boletim/saiba_mais/hepatite.htm)

Atualmente existem cerca de sete tipos de vírus conhecidos por serem causadores de hepatite, e são denominados A, B, C, D, E, F e G (Seeger & Mason, 2000). Dentre os diferentes tipos de hepatites virais, a mais comum é causada pelo vírus A (HAV), que produz uma inflamação aguda do fígado, mas a recuperação do paciente ocorre após alguns dias ou semanas, sem causar uma destruição do fígado. No caso da hepatite B, ocorre uma melhora dos pacientes adultos em 95% dos casos, como na hepatite A, mas a grande maioria (90%) das crianças infectadas desenvolve a hepatite crônica.

O vírus causador da hepatite C (HCV) consegue burlar o sistema imunológico do hospedeiro, causando a hepatite crônica que pode acarretar a morte do indivíduo ou promover um transplante de fígado de emergência (Waris & Siddiqui, 2003). Enquanto os vírus E, F e G são de rara ocorrência, o vírus da hepatite D (HDV) ocorre em 5% dos indivíduos cronicamente infectados pelo HBV, e pode transformar a infecção hepática atenuada em uma doença com características agressivas e destrutivas como a cirrose, que pode evoluir para o câncer hepático.

1.2 A hepatite B e o câncer de fígado

Dentre as hepatites virais, a hepatite B é considerada a mais perigosa, uma vez que o vírus causador da hepatite B (HBV) é responsável por mais de 80% dos casos de câncer de fígado no mundo (Anthony, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde, mais de 400 milhões de pessoas são portadores crônicos do vírus HBV, e cerca de 1 milhão de óbitos ocorrem por ano no mundo, em decorrência do câncer de fígado. Os portadores crônicos do HBV possuem um risco 200 vezes maior de desenvolverem câncer de fígado em relação à população em geral (Arbuthnot & Kew, 2001).

No mundo, a distribuição geográfica da incidência de infecção crônica pelo HBV mostra que em países da Europa e nos Estados Unidos existe uma baixa prevalência do antígeno HBsAg (0,1-1%), enquanto que há uma alta incidência de infecção crônica pelo HBV em regiões de subdesenvolvimento como a China, a África e parte da América do Sul, incluindo o Brasil (Figura 2).

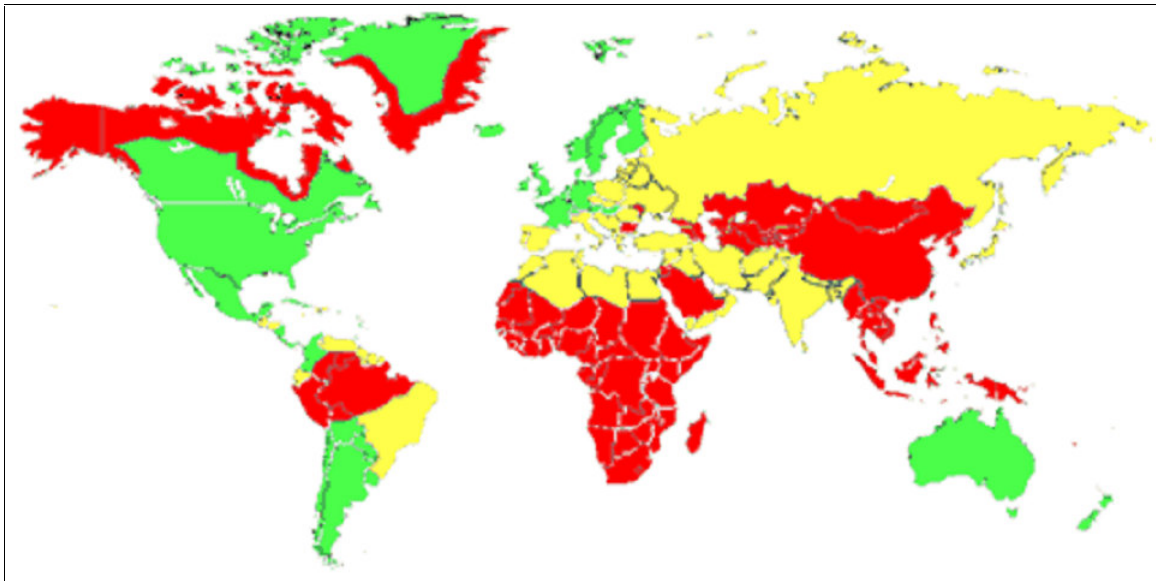


Figura 2 - Distribuição geográfica da prevalência do antígeno HBsAg devido à infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV). Em vermelho, as regiões de alta prevalência do antígeno HBsAg (maior ou igual a 8%); em amarelo, as regiões de prevalência intermediária (de 2 a 7%); em verde, regiões com baixa prevalência (menor que 2%) do antígeno HBsAg. Adaptação dos dados fornecidos pelo órgão *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos (<http://www.cdc.gov>).

No Brasil, o Ministério da Saúde estima que pelo menos 15% da população brasileira já teve contato com o vírus HBV. Em 2000, cerca de 6820 casos de hepatite B foram confirmados, sendo que a região da bacia Amazônica, na região Norte do país, apresenta uma alta incidência de infecção pelo HBV, quando comparada com as regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste (Ministério da Saúde/Cenepi, 2000).

Os programas de vacinação preventiva contra o vírus causador da hepatite B têm diminuído a incidência de novas infecções, mas ainda não existe cura para os indivíduos infectados. Por essa razão, ainda é muito alto o número de indivíduos que morrem por ano devido ao desenvolvimento de câncer de fígado e cirrose, em decorrência da infecção pelo HBV. No Brasil, cerca de 60 milhões de doses de vacina recombinante contra a hepatite B serão produzidas no Instituto Butantan para o próximo ano de 2006, e estas doses serão distribuídas para os programas de vacinação da UNICEF, RAHO e para outros países em desenvolvimento (<http://www.butantan.gov.br>).

1.3 O vírus da hepatite B

O vírus da hepatite B (HBV) é um vírus de DNA, pertence à família *Hepadnaviridae* e foi descoberto por Dane em 1973 (Hollinger, 1996). No sangue contaminado são encontrados três tipos de partículas distintas. A partícula infecciosa é conhecida como partícula de Dane, mas existem outras partículas não infecciosas, umas de pequeno diâmetro (20 nm) e outras com formas tubulares, ambas constituídas exclusivamente por antígeno de superfície (Figura 3).

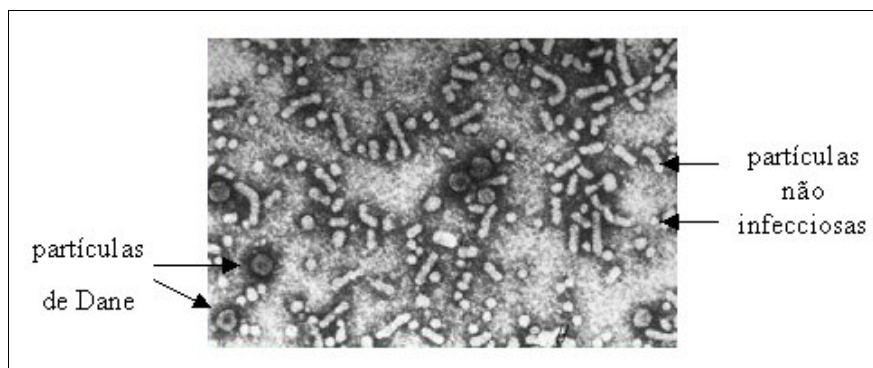


Figura 3 - Microscopia eletrônica das partículas do vírus da hepatite B (HBV), mostrando as partículas de Dane, e as esferas e filamentos secretados (partículas não infecciosas) (Adaptado de http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAhepadna.html)

A partícula de Dane possui 42 nm de diâmetro e é constituída por uma estrutura interna (nucleocapsídeo) e um invólucro externo (antígeno de superfície) (Figura 4). No interior do nucleocapsídeo são encontrados a DNA polimerase/transcriptase reversa e o genoma do vírus. O invólucro externo (envelope viral) é composto por proteínas, glicoproteínas e lipídeos.

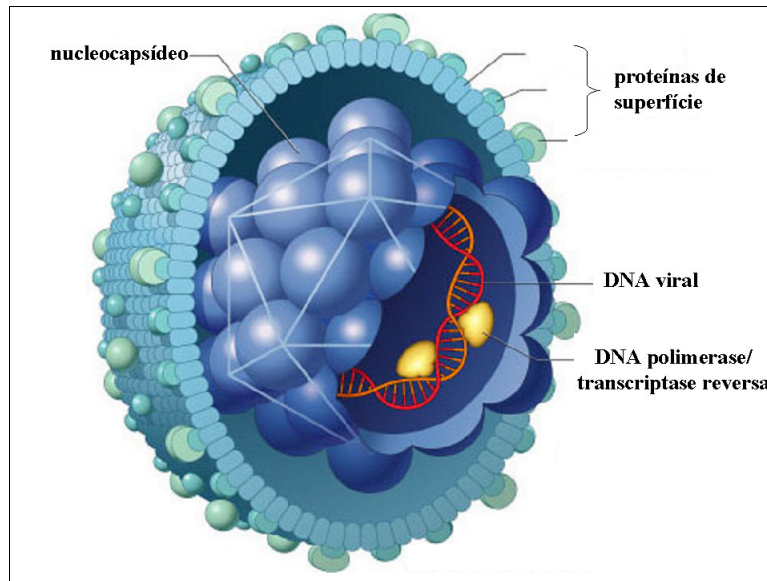


Figura 4 - Esquema de uma partícula de Dane, mostrando as proteínas de superfície, o nucleocapsídeo, a DNA polimerase/transcriptase reversa e o DNA viral de fita parcialmente dupla (Adaptado de <http://www.rit.edu/~japfaa/infectious.html>).

O período de incubação viral varia de 30 a 180 dias, mas cerca de 2 meses são necessários para que o vírus seja detectado no sangue (Ganem, 1996). A transmissão do HBV ocorre através do contato com o sangue contaminado (por meio de seringas, ferimentos, tatuagens, acupuntura, transfusões) ou com os fluidos corpóreos (através de relação sexual desprotegida) ou durante o parto, de mãe para filho. O HBV é um vírus bastante resistente a variações térmicas, e pode resistir a - 20 °C por vários anos e a 160 °C (calor seco) por 1 hora.

O mecanismo de entrada do vírus HBV no hepatócito ainda não está bem estabelecido, mas sabe-se que o HBV se liga especificamente a um receptor localizado na membrana do hepatócito (Figura 5). Após a fusão do envelope viral com a membrana da do hepatócito, as proteínas virais do nucleocapsídeo entram na célula e o genoma do

HBV é translocado para o núcleo, onde é circularizado (cccDNA). No núcleo, quatro transcritos virais são produzidos, poliadenilados e transportados para o citoplasma, onde são produzidas as proteínas do nucleocapsídeo, o antígeno eAg, a DNA polimerase (P), as proteínas de superfície e a proteína HBx.

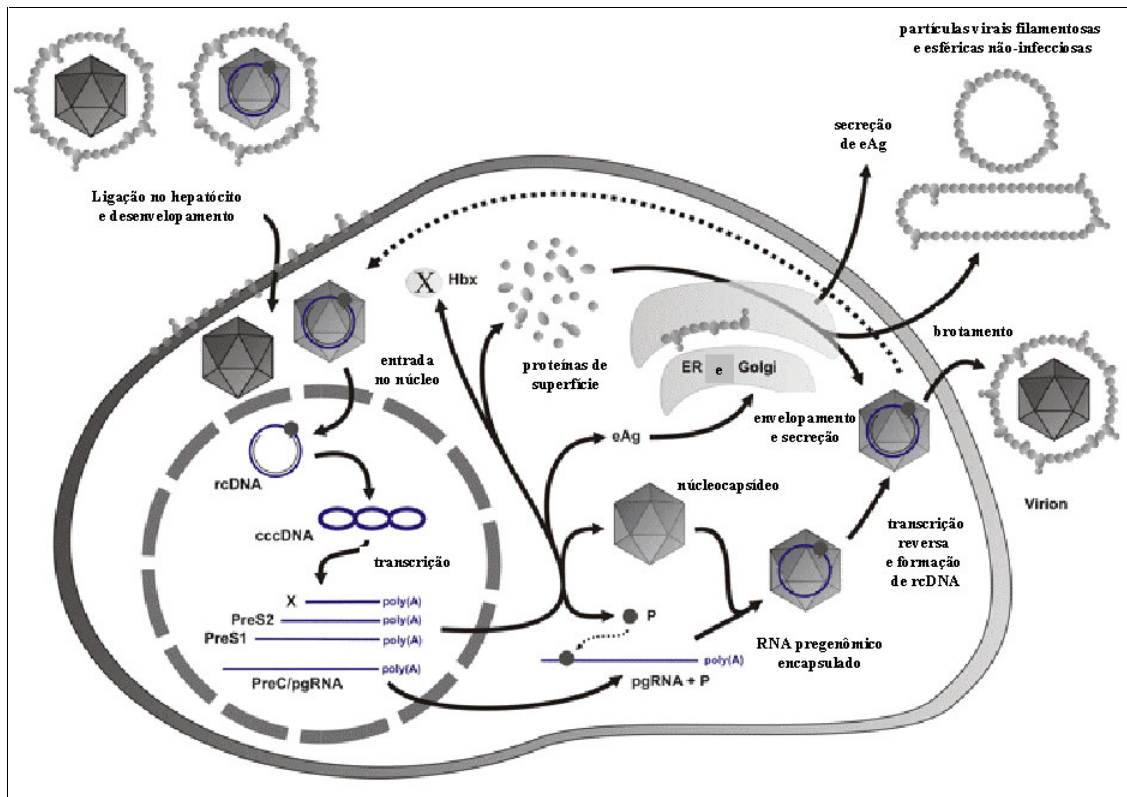


Figura 5 - Diagrama esquemático do ciclo replicativo do vírus da hepatite B (HBV) dentro de um hepatócito. As partículas infecciosas se ligam aos receptores celulares, perdem os envelopes lipoprotéicos e liberam os nucleocapsídeos dentro da célula. Dentro do núcleo do hepatócito, o DNA genômico de fita parcialmente dupla é convertido a cccDNA, e este é utilizado como molde para a transcrição dos 4 transcritos virais, que são exportados para o citoplasma. O RNA pré-genômico (pgRNA) é transcrito reversamente em DNA pela polimerase (P) dentro dos nucleocapsídeos imaturos. Os nucleocapsídeos contendo o DNA genômico podem ser redirecionados para o núcleo (seta pontilhada), ou podem ser envelopados pelas glicoproteínas de superfície (no Golgi e Retículo Endoplasmático) antes de serem exportados como virions maduros, e estes vão infectar outros hepatócitos (Adaptado de <http://hbvrp.wits.ac.za>).

O RNA pré-genômico (pgRNA) é encapsulado pelo nucleocapsídeo, e a DNA polimerase transcreve reversamente o pgRNA em DNA genômico. Os nucleocapsídeos

contendo o DNA genômico podem retornar ao núcleo do hepatócito, ou serem envelopados pelas proteínas de superfície, no Golgi e Retículo Endoplasmático, antes de serem exportados como virions maduros (Figura 5). Os virions caem no sangue circulante e vão infectar outros hepatócitos do hospedeiro.

O hospedeiro natural do HBV é o homem, mas foram encontrados vírus HBV similares em outros animais como as marmotas (WHV), esquilos (GSHV), gansos (HHBV) e patos (DHBV). Os vírus WHBV e GSHV possuem alta homologia sequencial com o HBV (cerca de 70%), mas não são capazes de infectar os humanos e outros primatas (Seeger & Mason, 2000).

O genoma do HBV é compacto e possui aproximadamente 3,2 kb de comprimento. A cadeia mais longa (negativa) é completa, e possui cerca de 3200 nucleotídeos, enquanto que a cadeia menor (positiva) é incompleta, e o seu comprimento varia entre 50 a 70% da cadeia longa (Figura 6). A molécula adota uma configuração circular devido à sobreposição das duas cadeias complementares na região coesiva. Flanqueando esta região existem duas seqüências repetidas de 11 bases (DR1 e DR2, *direct repeats*) que são importantes para a replicação do genoma do HBV (Hollinger, 1996).

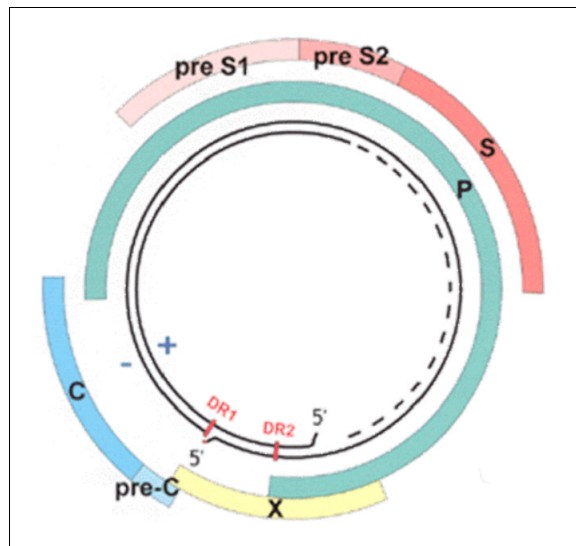


Figura 6 - Representação esquemática do genoma do HBV, indicando as seqüências de leitura aberta preS1, preS2, S, preC, C, P e X. A cadeia mais longa (negativa) possui cerca de 3200 nucleotídeos, enquanto que a cadeia menor (positiva) varia entre 50 a 70% da cadeia longa. As seqüências DR1 e DR2 também são mostradas em vermelho (Adaptado de http://www.socgenmicrobiol.org.uk/JGVDirect/18197/Figs/F1_pg.htm).

As quatro seqüências de leitura aberta que se sobrepõem no genoma do HBV vão codificar para as 7 proteínas virais. O gene pré-S/S codifica para as três proteínas de superfície que fazem parte do envelope lipoprotéico do vírus: pré-S1 (envolvida no reconhecimento do HBV pelos receptores do hepatócito), pré-S2 e pequeno S. O gene pré-C/C codifica para uma proteína solúvel (HBeAg) e para a proteína estrutural do nucleocapsídeo (HBcAg), que envolve a DNA polimerase/transcriptase reversa e o DNA de fita parcialmente dupla, protegendo-o da degradação por nucleases exógenas.

O gene P compreende cerca de 75% da extensão do genoma do HBV e codifica uma proteína multifuncional que funciona como uma transcriptase reversa (para a síntese da cadeia negativa do DNA a partir RNA genômico) ou como uma DNA polimerase endógena. O gene X codifica uma proteína trans-ativadora chamada HBx que é expressa em baixas concentrações em indivíduos infectados pelo HBV, mas que parece ter uma função essencial no desenvolvimento do câncer de fígado e na replicação viral (Kim *et al.*, 1991; Zoulim *et al.*, 1994).

1.4 A proteína HBx

A proteína HBx é a menor proteína codificada pelo genoma do HBV, possui 154 aminoácidos, peso molecular de ~17 kDa, e não possui uma função definida. Alguns estudos mostraram que a proteína HBx é capaz de trans-ativar vários genes celulares (Caselmann, 1996) e induzir as células à apoptose (Arbuthnot *et al.*, 2000), enquanto que outros estudos mostraram que a proteína HBx está envolvida no estabelecimento da infecção viral (Chen *et al.*, 1993; Zoulim *et al.*, 1994) e na transformação celular que leva ao desenvolvimento do câncer de fígado (Kim *et al.*, 1991).

Em cultura de hepatócitos, a superexpressão da proteína HBx causou alterações morfológicas de caráter oncogênico nas células (Seifer *et al.*, 1991), assim como induziu as células hepáticas à apoptose (Kim *et al.*, 1998). Além disso, os experimentos com camundongos transgênicos mostraram que ocorreu o desenvolvimento do câncer de fígado nos camundongos que expressavam a proteína HBx em todos os seus tecidos (Kim *et al.*, 1991). Entretanto, ainda não se sabe como a proteína HBx interfere nos mecanismos celulares que levam ao desenvolvimento do câncer de fígado.

A proteína HBx é uma proteína multifuncional, que possui um domínio de regulação negativa (trans-repressão) na região N-terminal (Misra *et al.*, 2004) e um domínio de trans-ativação na região C-terminal (Kumar *et al.*, 1996; Chen & Oon, 1999) (Figura 7). Apesar da proteína HBx ser um potente trans-ativador celular, não foi identificado um domínio característico na sua sequência de aminoácidos.

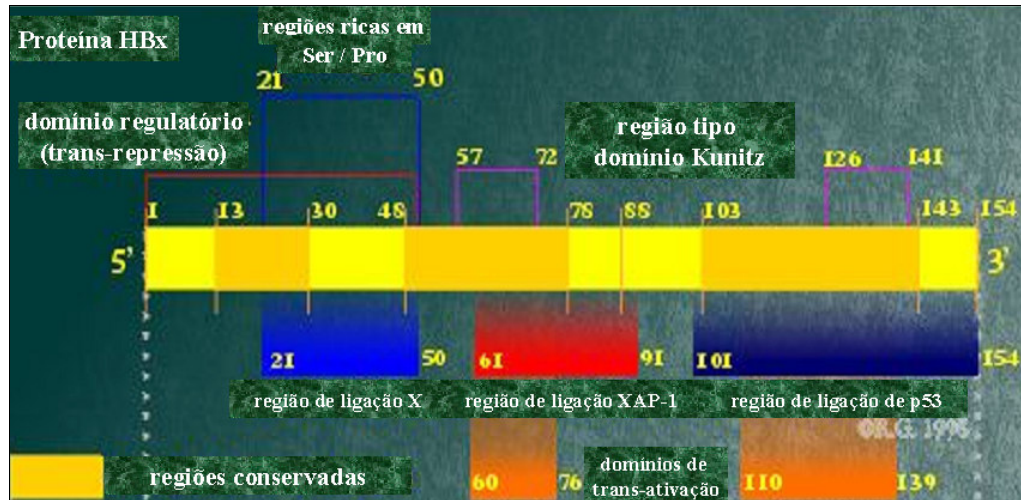


Figura 7 - Esquema da proteína HBx(1-154), mostrando as regiões conservadas (em laranja), os domínios de trans-repressão (1-48) e de trans-ativação (60-76 e 110-139), e as regiões de domínio do tipo Kunitz (57-72 e 126-141). As regiões de interação da proteína HBx com as proteínas X (21-50), XAP-1(61-91) e p53 (101-154) também são mostradas. (Adaptado de <http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbx.htm>)

Apesar de ser expressa em baixas concentrações nos hepatócitos, o que dificulta a sua detecção, a proteína HBx pode ser encontrada tanto no citoplasma como no núcleo celular (Henkler *et al.*, 2001), mas ela não está associada com os virions maduros, nem tampouco com as partículas dos nucleocapsídeos. Contudo, alguns estudos mostraram que a proteína HBx transita entre o núcleo e o citoplasma, através de um sistema de exportação nuclear dependente de Crm-1 (Forgues *et al.*, 2001).

Devido à sua ampla distribuição na célula, a proteína HBx pode interagir com várias proteínas celulares como os fatores de transcrição (RXR, TBP, RPB5, TFIIB), as proteínas supressoras de tumor (p53 e pRB), as proteínas envolvidas no reparo de DNA

(UVDDDB1) e na sinalização celular (ERK e MAPK), e no controle do ciclo celular (ciclina A), entre outras (Tabela 1). Desta forma, a proteína HBx pode afetar a replicação e a proliferação virais, direta ou indiretamente, o que pode ser relevante para o desenvolvimento do câncer de fígado associado ao HBV.

Tabela 1 - Exemplos de algumas proteínas que interagem com a proteína HBx.

Proteínas	Região de interação	Método de detecção
Fatores de transcrição:		
Egr1	HBx (53-142)	<i>EMSA</i>
P53	HBx (102-136)	<i>EMSA, pull down</i>
RPB5	HBx (51-148)	<i>pull down</i>
TFIIB	HBx (51-148)	<i>pull down</i>
Reparo de DNA:		
ERCC2	HBx (34-154)	<i>pull down</i>
ERCC3	HBx (34-154)	<i>pull down</i>
UVDDDB1	HBx (51-101)	duplo híbrido
Outras proteínas:		
XAP3	HBx (90-122)	duplo híbrido
XIP	HBx (14-154)	duplo híbrido

Apesar da proteína HBx não interagir com o DNA de fita dupla, alguns estudos mostraram que a HBx é capaz de interagir com o DNA de fita simples (Qadri *et al.*, 1996). Contudo, a proteína HBx é capaz de aumentar a interação de fatores de transcrição com o DNA (Barnabas *et al.*, 1997) através da interação de HBx com as regiões do tipo zíper de leucina (bZip) dos fatores de transcrição (Green *et al.*, 1999). Essa interação causa uma estabilização do dímero de zíper de leucina formado e aumenta a interação do dímero com o DNA (Schneider & Schepartz, 2001).

A maioria dos estudos sobre a proteína HBx sugere que a sua função pleiotrópica e a sua capacidade de induzir o crescimento de tumor são uma consequência da sua habilidade em interagir com uma grande variedade de proteínas celulares (Hildt *et al.*, 1996). Por causa das inúmeras interações proteína-proteína, a proteína HBx é capaz de interferir tanto nos processos de transcrição gênica como nos processos de sinalização celular, na resposta aos estímulos de estresse oxidativo, degradação protéica, controle do ciclo celular, proliferação celular e apoptose (Murakami, 1999; Arbuthnot *et al.*, 2000) (Figura 8).

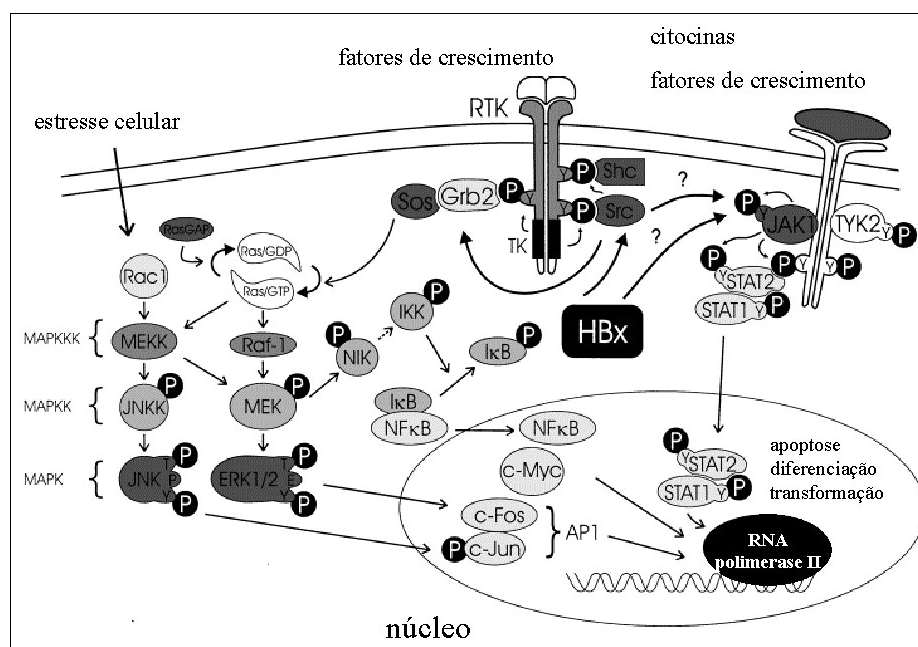


Figura 8 - Influência da proteína HBx na ativação de NF-κB e nas cascatas de sinalização celular de MAPK e JAK/STAT. (Adaptado de Arbuthnot & Kew, 2001).

Até o presente momento, nenhuma informação sobre a estrutura tridimensional da proteína HBx foi depositada no PDB. Por isso, neste trabalho realizaremos estudos estruturais associados a estudos funcionais, na tentativa de elucidar a estrutura tridimensional da proteína HBx pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo funcional e estrutural da proteína HBx do vírus da hepatite B. Como objetivos específicos para as abordagens funcionais e estruturais, tivemos:

- 1- Expressão da proteína HBx em sistemas de expressão procariótico (*Escherichia coli*) e eucarióticos (células de inseto *Sf9*, leveduras *Pichia pastoris*);
- 2- Mapeamento da especificidade de interação da proteína HBx com os oligonucleotídeos de RNA através de ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA) e de *UV cross-linking*;
- 3- Análise da influência dos resíduos de cisteína da proteína HBx na sua interação com a proteína humana p53 e com o oligonucleotídeo de RNA AU-38;
- 4- Estudo da ativação de gene repórter dependente da ativação do promotor alvo para a proteína humana p53, em sistema de mono-híbrido em levedura, na presença da proteína HBx;
- 5- Análise da cinética da taxa de degradação de mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* em cultura de células humanas HeLa, na presença da proteína HBx;
- 6- Análises espectroscópicas da proteína HBx por dicroísmo circular e emissão intrínseca de fluorescência;
- 7- Análise da proteína HBx por ressonância magnética nuclear (RMN);
- 8- Construção de um modelo estrutural da proteína HBx por homologia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes químicos utilizados no preparo de soluções e nos experimentos de purificação de proteínas foram obtidos das empresas Aldrich, Fluka, Merck, Sigma e Synth. No caso dos experimentos de biologia molecular, os “kits”, os reagentes específicos, as enzimas de restrição e os seus tampões adequados, foram obtidos das empresas que estão listadas no anexo 8.1.

3.1 Plasmídeos e linhagens de células procariotas e eucariotas

3.1.1 Plasmídeos

Os plasmídeos listados na tabela 2 foram utilizados nas clonagens e na expressão de proteína recombinante em bactérias (*Escherichia coli*), em células de inseto (*Spodoptera frugiperda*, Sf9), em células humanas (HeLa) e em leveduras (*Pichia pastoris*). Todos os mapas dos plasmídeos utilizados neste trabalho estão no anexo 8.2.

Tabela 2 - Plasmídeos utilizados na clonagem e na expressão de proteína.

Plasmídeo	Promotor	Peptídeo e/ou proteína de fusão	Marca de seleção em <i>E. coli</i>	Finalidade
pCMV-Ad/HBx	<i>CMV</i>	-	ampicilina	contém o cDNA do HBx (<i>ayw</i>)
pBluescript II KS (+/-)	<i>T3</i>	-	ampicilina	subclonagem e sequenciamento
pGEM-T Easy	<i>T7</i> e <i>SP6</i>	-	ampicilina	subclonagem e sequenciamento
psW202	<i>tac</i>	peptídeo sinal Omp A e 6xHis no N-terminal	ampicilina	expressão em bactérias (<i>E.coli</i>)
pET-28a(+)	<i>T7</i>	6xHis no N-terminal	canamicina	expressão em bactérias (<i>E.coli</i>)
pET-44a(+)	<i>T7</i>	6xHis/NusA no N-terminal	ampicilina	expressão em bactérias (<i>E.coli</i>)
pGEX-2TK	<i>tac</i>	glutathiona-S-transferase (GST) no N-terminal	ampicilina	expressão em bactérias (<i>E.coli</i>)
pGEX-p53(1-393)	<i>tac</i>	glutathiona-S-transferase (GST) no N-terminal	ampicilina	expressão em bactérias (<i>E.coli</i>)
pBSV-8His	<i>polihedrina</i>	peptídeo sinal do fator humano H no N-terminal e 6xHis no C-terminal	ampicilina	expressão em células de insetos (<i>Sf9</i>)
pPIC9K	<i>AOX1</i>	-	ampicilina e geneticina	expressão em levedura (<i>P. pastoris</i>)
pcDNA3.1/Hygro(+)	<i>CMV</i>	-	ampicilina e higromicina	expressão em células humanas (HeLa)

O plasmídeo pCMV-Ad contendo o gene que codifica a proteína HBx selvagem (1-154 aminoácidos; subtipo *ayw*) foi gentilmente cedido pelo Dr. Robert J. Schneider da Universidade de Nova York (Estados Unidos). Este plasmídeo foi usado como molde nas reações de PCR para amplificar as deleções da proteína HBx, para as posteriores clonagens nos diferentes sistemas de expressão de proteínas.

O plasmídeo pGEX-p53(1-393) foi gentilmente cedido pelo Dr. Gianni Del Sal (Laboratório Nazionale CIB, Trieste, Itália), e utilizado para a expressão em *E. coli* da proteína humana p53 em fusão com a proteína GST.

Para os experimentos de ativação de gene repórter em sistema de mono-híbrido em levedura, utilizou-se os plasmídeos listados na tabela 3.

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados nos experimentos de ativação de gene repórter em sistema de mono-híbrido em levedura.

Plasmídeo	Promotor	Proteína de fusão ou sequência de DNA	Marca de seleção em <i>E. coli</i>	Marca de seleção em levedura
pBTM116	<i>ADHI</i>	LexA ₍₁₋₂₀₂₎ no domínio de ligação (BD)	canamicina	-TRP
pGAD424	<i>ADHI</i>	GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ no domínio de ativação (AD)	ampicilina	-LEU
p53BLUE	<i>PCYC1</i>	sequência de DNA alvo para proteína humana p53	ampicilina	-URA

Os genes codificadores para a proteína HBx(1-154) e para as deleções mini-HBx(19-142) e mini-HBx(-Cys)(19-142) foram clonados no plasmídeo pBTM116, gerando proteínas HBx em fusão com a proteína LexA₍₁₋₂₀₂₎ (domínio de ligação ao DNA). O gene codificador para a proteína humana p53 completa (1-393) foi clonado no plasmídeo pGAD424 em fusão com o domínio de ativação da transcrição GAL4₍₇₆₈₋₈₈₁₎, originando o plasmídeo pGAD424-p53(1-393) que foi utilizado nos ensaios de mono-híbrido em levedura.

3.1.2 Bactérias

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de bactérias *E. coli*: DH5 α (Hanahan, 1983) e BL21 (DE3) (Studier & Moffat, 1986). Para a manutenção e

seleção dos clones, utilizou-se o meio de cultura LB¹ acrescido do antibiótico específico para a seleção dos clones transformados com o plasmídeo de interesse. Para o meio LB sólido, ágar bacteriológica (1,5%) foi adicionada ao meio LB líquido contendo o antibiótico específico, e distribuiu-se em placas de Petri descartáveis e estéreis (Sambrook *et al.*, 1989).

Para a obtenção de células competentes, uma colônia de bactéria (DH5α ou BL21) foi inoculada em meio Psi² pH 7,6 a 37 °C, sob agitação constante a 200 rpm, por um período de 18 horas. Transferiu-se 1 mL deste pré-inóculo para um *erlenmeyer* contendo 250 mL de meio Psi fresco, que permaneceu a 37 °C, sob agitação constante a 200 rpm, por cerca de mais 3 horas, até o valor de densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) atingir 0,8-1. As células foram coletadas por centrifugação a 1010 x g, por 20 minutos a 4 °C, o *pellet* foi re-suspendido em 25 mL de tampão de transformação I³ e permaneceu em repouso no gelo por 20 minutos. Após nova centrifugação a 1010 x g, por 10 minutos a 4 °C, retirou-se o sobrenadante, e o *pellet* foi re-suspendido em 8 mL de tampão de transformação II⁴. Alíquotas da suspensão de bactérias competentes foram estocadas a - 80 °C antes do uso.

3.1.3 Leveduras

Para os experimentos de expressão de proteína em levedura do tipo *Pichia pastoris*, utilizou-se a linhagem KM71 (*his4*, *aox1::ARG4*, *arg4*) que possui uma mutação no gene *his4* e fenótipo Mut^S Arg⁺ para facilitar a seleção dos clones transformantes. As leveduras *Pichia pastoris* são metilotróficas e utilizam o metanol como fonte de carbono, de modo que a expressão das proteínas é controlada pela adição de metanol ao meio de cultura.

Para a preparação de células competentes, uma colônia de *P. pastoris* foi inoculada em meio líquido YPD⁵ por 15 horas, a 30 °C sob agitação constante a 200 rpm.

¹ meio de cultura LB: 1% peptona; 0,5% extrato de levedura; 0,5% NaCl - autoclavado por 20' a 115 °C.

² meio Psi pH 7,6: 1,6% peptona; 1% extrato de levedura; 0,5% NaCl; 0,04% KH₂PO₄; 0,05% Na H₂PO₄

³ tampão de transformação I: 30 mM KOH; 30 mM ácido acético; 100 mM MgCl₂; 77 mM RbCl₂; 13,2 mM CaCl₂; 15% glicerina

⁴ tampão de transformação II: 10 mM MOPS; 7,7 mM RbCl₂; 100 mM CaCl₂; 0,1 mM NaOH; 15% glicerina

⁵ meio líquido YPD: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose

Diluiu-se 100 µL do pré-inóculo em 100 mL de meio líquido YPD estéril e manteve-se a agitação a 30°C por mais 15 horas. Neste período de tempo, mediu-se em um espectrofotômetro a densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) até que a mesma atingisse o valor de 1,5, quando as células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g, 4 °C por 5 minutos. Re-suspendeu-se o *pellet* de células em 100 mL de água gelada estéril e centrifugou-se novamente a 1500 x g, 4 °C, por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e as células foram re-suspendidas em 50 mL de água gelada estéril antes de serem centrifugadas a 1500 x g, por 5 minutos a 4 °C. Mais uma vez, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi re-suspendido em 4 mL de uma solução gelada de sorbitol 1 M estéril. Após centrifugação a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e re-suspendeu-se o *pellet* de células em 1 mL de sorbitol 1 M estéril gelado, aliquotando-se 150 µL de células competentes para tubos *ependorfs* de 1,5 mL, que foram mantidos em gelo. As células competentes recém preparadas foram utilizadas na eletroporação com o DNA de interesse para a posterior expressão das proteínas 6xHis-HBx(1-154) e 6xHis-mini-HBx(19-142) em *Pichia pastoris*.

No caso dos experimentos de ativação do gene repórter da beta-galactosidase dependente da ativação do promotor alvo para a proteína humana p53, em sistema de mono-híbrido em levedura, utilizou-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* linhagem W303⁶. Essas leveduras foram crescidas em meio YPD⁵ e transformadas com o plasmídeo p53BLUE (Tabela 3), originando as leveduras transgênicas W303mut, que possuem a sequência de DNA alvo para a proteína humana p53 integrada ao seu genoma. As leveduras W303mut foram crescidas em meio seletivo SD-U⁷ para a sua posterior transformação com os demais plasmídeos (pGAD424-p53(1-393), pBTM116 vazio, e pBTM116 contendo as seqüências codificadoras para as proteínas HBx(1-154), mini-HBx(19-142) e mini-HBx(-Cys)(19-142)), para os ensaios de ativação de gene repórter em sistema de mono-híbrido em levedura.

⁶ *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem W303): genótipo *ade2-1/ade2-1*; *ura3-1/ura3-1*; *his3-11,15/his3-11,15*; *trp1-1/trp1-1*; *leu2-3,112/leu2-3,112*

⁷ meio seletivo SD-U: YNB sem aminoácidos e sulfato de amônio; 2% glicose

3.1.4 Células de inseto Sf9

As células de inseto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) foram cultivadas em placas de cultura contendo 50 mL de meio TC-100 (Invitrogen) acrescido de penicilina e estreptomicina na concentração final de 10 µg/mL. As células de inseto foram mantidas em incubadora a 27 °C, na ausência de CO₂, para a posterior transfecção com o baculovírus recombinante (O' Reilly *et al.*, 1994).

3.1.5 Células humanas HeLa

As células humanas HeLa foram cultivadas em placas de cultura contendo 20 mL de meio DME⁸, na ausência de soro fetal, e mantidas em incubadora a 37 °C saturadas com 5% de CO₂, até que houvesse um número suficiente de células para a transfecção (Freshney, 1994). As células HeLa transfectadas estavelmente com os plasmídeos pcDNA3.1/Hygro(+) ou pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) foram mantidas em meio DME acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 250 µg/mL de higromicina (meio DME/SGH).

3.2 Manipulação de ácidos nucléicos

3.2.1 Síntese de oligonucleotídeos de DNA e de RNA

Os oligonucleotídeos de DNA foram desenhados a partir da análise das seqüências das regiões 5' e 3' do cDNA que codifica a proteína HBx, assim como as seqüências das regiões 5' e 3' dos sítios de clonagem múltipla dos plasmídeos utilizados nas clonagens (Tabela 2, Anexo 8.2).

As principais características dos oligonucleotídeos de DNA sintetizados estão resumidas na tabela 4.

⁸ meio DME: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

Tabela 4 - Oligonucleotídeos de DNA específicos para as clonagens em plasmídeos apropriados. Os sítios de restrição presentes nas seqüências dos oligonucleotídeos estão sublinhados.

Nome	Seqüência	Tm (°C)	Finalidade
X-GST-S	<i>Bam</i> HI 5'-GCG <u>GATCC</u> TTGAGCTGCCAACTCGATCCTGCGCGG-3'	68	clonagem de HBx em pBS-KS, e de HBx e HBx(5-78) em pGEX-2TK
X-GST-AS	<i>Eco</i> RI 5'-GCGAAT <u>TC</u> TTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGC-3'	57	clonagem de HBx em pBS-KS e pGEX-2TK
pET-X-S	<i>Nde</i> I 5'-ACGAATTCCATAT <u>G</u> GCTGCTAGGTTGTGCTGCC-3'	61	clonagem de HBx em pET-28a(+)
pET-X-AS	<i>Xho</i> I 5'-GTTCTCGA <u>G</u> TTAGGCAGAGGTGAAAAAG-3'	55	clonagem de HBx em pET-28a(+)
X-Mut-S	<i>Eco</i> RI <i>Nde</i> I 5'-GGAATTCATAT <u>G</u> CGTCCCGTCGGCGCTGAATC-3'	63	clonagem de mini-HBx em pET-28a(+)
X-Mut-AS	<i>Bam</i> HI 5'-CGG <u>GATCC</u> TTAGACCAATTTATGCCTACAGCC-3'	59	clonagem de mini-HBx em pET-28a(+)
C69-S	5'-CTCATCTGCCGGACCCAGTGCACCTTCGCTTC-3'	63	clonagem de mini-HBx(-Cys) em pET-28a(+)
C69-AS	5'-GAAGCGAAGTGCACCTGGGTCCGGCAGATGAG-3'	63	clonagem de mini-HBx(-Cys) em pET-28a(+)
PIC-X-S	<i>Eco</i> RI 5'-TTAGAATTCGACATGGCTGCTAGGTTGTGCTGC-3'	59	clonagem de HBx em pET-44a(+) e em pBTM116
PIC-X-AS	<i>Not</i> I 5'-ATAGTTTATAGCGGCGCGCTTAGGCAGAGGTGAAAAAG-3'	61	clonagem de HBx em pET-44a(+) e em pPIC9K
X-GST-S2	<i>Bam</i> HI 5'-GCGGATCCGAGACCACCGTGAAACGCCAC-3'	65	clonagem de HBx(80-142) em pGEX-2TK
XWV-AS3	<i>Eco</i> RI <i>Xba</i> I 5'-TGGAAATTC TCTAGATTATTAGCGACGTGCAGAGGTGAAGCG-3'	62	clonagem de HBx(5-78) em pGEX-2TK
XWV-AS2	<i>Eco</i> RI <i>Xba</i> I 5'-TGGAAATTC TCTAGATTATTAGACCAATTTATGCCTACAGCCTC-3'	59	clonagem de HBx(80-142) em pGEX-2TK, e HBx em pBSV-8His
XV-S	<i>Pst</i> I 5'-TGAACTGCAGATGCACCATCATCACCATCACAAGCTTGGT-3'	63	clonagem de HBx em pBSV-8His e em pcDNA3.1/Hygro(+)
XPWW-A	<i>Xba</i> I 5'-AGTCTCTAGATTATTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTGCA-3'	57	clonagem de HBx em pcDNA3.1/Hygro(+)
PIC9-His-X-S	<i>Eco</i> RI 5'-TAGAATTCATCATCACCATCACCATCTGGTTCCGCGTGGATCCATGGCTGCTAGGTTGTGCTG-3'	71	clonagem de His-HBx em pPIC9K
PIC9-X-AS	<i>Not</i> I 5'-ATAGTTTATAGCGGCGCGCTTAGGCAGAGGTGAAAAAG-3'	61	clonagem de His-HBx em pPIC9K
PIC9-His-miniX-S	<i>Eco</i> RI 5'-TAGAATTCATCATCACCATCACCATCTGGTTCCGCGTGGATCCCGTCCCGTCGGCGCTGAATC-3'	72	clonagem de His-mini-HBx em pPIC9K
PIC9-His-miniX-AS	<i>Not</i> I 5'-TATAGTTTATAGCGGCGCGCGATCCTTAGACCAATTTATGCCT-3'	62	clonagem de His-mini-HBx em pPIC9K
pBTM-HBx-AS	<i>Pst</i> I 5'-TTTTCTGCAGTTAGGCAGAGGTGAAAAAGTT-3'	54	clonagem de HBx em pBTM116

Para amplificar os fragmentos dos proto-oncogenes *c-fos* (431 pb) e *c-myc* (345 pb), assim como o fragmento da beta-actina (~400 pb), utilizou-se os oligonucleotídeos

de DNA listados na tabela 5, que foram desenhados de acordo com as seqüências 5' e 3' dos cDNAs que codificam os proto-oncogenes analisados.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos de DNA utilizados na amplificação de fragmentos dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* e da beta-actina.

Nome	Seqüência	Tm (°C)	Finalidade
fos-S	5'-CTACGAGGCGTCATCCTCCCG-3'	55	amplificar <i>c-fos</i>
fos-AS	5'-AGCTCCCTCCTCCGGTTGCGGCAT-3'	59	amplificar <i>c-fos</i>
myc-S	5'-CCAGCAGCGACTCTGAGG-3'	50	amplificar <i>c-myc</i>
myc-AS	5'-CCAAGACGTTGTGTGTTC-3'	43	amplificar <i>c-myc</i>
actina-S	5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3'	57	amplificar beta-actina
actina-AS	5'-GCTTCTCCTTAATGTCACGCACGA-3'	55	amplificar beta-actina

Os oligonucleotídeos de DNA utilizados para os seqüenciamentos nos plasmídeos pBS-KS, pET-28a(+), pGEX-2TK e pBTM116 foram desenhados para se anelarem próximo aos sítios de clonagem múltipla (Tabela 6).

Tabela 6 - Oligonucleotídeos de DNA específicos para seqüenciamento.

Nome	Seqüência	Tm (°C)	Finalidade
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	56	seqüenciamento em pBS-KS
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3'	64	seqüenciamento em pBS-KS
pET-S	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	43	seqüenciamento em pET-28a(+)
pET-AS	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	46	seqüenciamento em pET-28a(+)
pGEX-S	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'	57	seqüenciamento em pGEX-2TK
pGEX-AS	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'	57	seqüenciamento em pGEX-2TK
pBTM-S	5'-AACAACGTCGACCTGCGGAGCTCAGTTACAGCTTG-3'	63	seqüenciamento em pBTM-116
pBTM-AS	5'-CAACCTGCAGCCTCAGTAAATATCTGTTAAGGA-3'	57	seqüenciamento em pBTM-116

Todos os oligonucleotídeos de DNA citados acima foram sintetizados pela empresa GIBCO-BRL/Life Technologies do Brasil. Os oligonucleotídeos de RNA foram desenhados a partir da região 3' não traduzida de TNF- α (fator tumoral necrosante α) e sintetizados pela empresa Dharmacon Research. As seqüências de cada um dos oligonucleotídeos de RNA estão indicadas na tabela 7.

Tabela 7 - Oligonucleotídeos de RNA específicos para os ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética (*EMSA*) e de *UV cross-linking*.

Nome	Seqüência
AU-11	5'-UUUAAUUUAUUA-3'
AU-21	5'-UUAUU AUUUAUUUAUUAUUUA-3'
AU-21 Mut	5'-UUAUUUAUAUAUAUAUUAUAUA-3'
AU-38	5'-GUGAUUAUUUAUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAG-3'
poli A (25)	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'
poli C (25)	5'-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3'
poli G (25)	5'-GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3'
poli U (25)	5'-UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU-3'

3.2.2 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído das células HeLa não transfectadas e das células HeLa transfectadas estavelmente com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) ou com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154). As células HeLa transfectadas com os plasmídeos foram tratadas com actinomicina D em diferentes tempos (0, 3, 6 e 8 horas) antes de serem coletadas por centrifugação para a extração do RNA total. O protocolo de extração de RNA total utiliza o reagente TRIzol, e este protocolo foi fornecido pela empresa GIBCO-BRL/Life Technologies do Brasil.

Após coletar as células HeLa por centrifugação a 2000 x g, os *pellets* foram re-suspendidos em 1 mL de TRIzol e as suspensões homogeneizadas foram transferidas para tubos pequenos do tipo *eppendorf* e mantidas à temperatura ambiente por cerca de 5 minutos. Após a adição de 200 µL de clorofórmio, os *eppendorfs* foram agitados vigorosamente por 15 segundos, mantidos à temperatura ambiente por mais 3 minutos, e centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase superior incolor (contendo o RNA total) foi transferida com cuidado para outro *eppendorf* antes da adição de 500 µL de isopropanol. Os *eppendorfs* foram invertidos vagarosamente e incubados à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos.

Após a centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* gelatinoso foi lavado com 1 mL de etanol 75% (preparado com água tratada com DEPC). As amostras foram agitadas em vórtex e depois centrifugadas a

7500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e os *ependorfs* permaneceram abertos, à temperatura ambiente, por cerca de 20 minutos, antes da adição de 25 µL de água tratada com DEPC. As amostras foram incubadas a 55 °C por 10 minutos, sob agitação, e depois mantidas em gelo para a análise do RNA total.

A análise do RNA total é feita através da medida de densidade ótica (OD_{260}/OD_{280}), de acordo com a metodologia descrita em Sambrook *et al.* (1989). Cerca de 5 µL de RNA total foram diluídos em 995 µL de água tratada com DEPC para a quantificação através da medida de absorbância, utilizando-se o espectrofotômetro *Ultrospec 3000*. Os 20 µL de RNA total restantes foram armazenados a -80 °C antes de serem utilizados nos experimentos de síntese de primeira fita de cDNA (item 3.2.3) e nos experimentos de *Northern blot* (item 3.2.3.1).

3.2.3 Síntese de primeira fita de cDNA

O RNA total das células HeLa (não transfectadas e não tratadas com o reagente actinomicina D) foi utilizado para a síntese de primeira fita de cDNA, utilizando-se o *First Strand cDNA Synthesis Kit*. Para a síntese de primeira fita de cDNA utilizou-se 5 µg de RNA total acrescidos de água tratada com DEPC para um volume final de 7 µL. Esta mistura foi aquecida a 65 °C por 10 minutos antes da adição dos demais reagentes: 5 µL de *bulk mix*, 1 µL de DTT a 200 mM, 1 µL do oligonucleotídeo d(T)₁₈ a 5 µg/mL e 1 µL do oligonucleotídeo d(N)₆ a 0,2 µg/mL. Após misturar todos os reagentes, a amostra foi incubada a 37 °C por 1 hora em um banho termostaticado, e depois foi aquecida a 90 °C por 5 minutos antes de ser mantida em gelo.

A primeira fita de cDNA sintetizada foi utilizada para a amplificação dos fragmentos dos genes *c-fos* (431 pb), *c-myc* (345 pb) e beta-actina (~400 pb), através de uma reação de PCR utilizando-se os pares de oligonucleotídeos fos-S/fos-AS, myc-S/myc-AS e actina-S/actina-AS (Tabela 5). Cerca de 2 µL de cDNA foram utilizados em cada reação de PCR. Os fragmentos dos genes *c-fos*, *c-myc* e beta-actina amplificados por PCR foram clonados no plasmídeo pGEM-T Easy, para a confirmação das seqüências através de seqüenciamento, antes de serem utilizados como sondas de DNA no experimento de *Northern blot*.

3.2.3.1 Northern blot

As amostras de RNA total extraído de células HeLa transfectadas estavelmente com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) ou com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx, e tratadas com actinomicina D por 0, 3, 6 e 8 horas, foram diluídas para que atingissem a concentração final de 5 µg/µL. Cerca de 4 µL (20 µg) de cada amostra de RNA total foram diluídos em 16 µL de tampão de amostra de RNA⁹. A mistura foi incubada por 10 minutos a 90°C e, em seguida, mantida em gelo por 5 minutos, antes da sua aplicação no gel de agarose desnaturante¹⁰. O gel de agarose correu a 50 V por 3 horas, utilizando o tampão MOPS 1X como tampão de corrida.

Após 3 horas de corrida, o gel de agarose contendo o RNA total extraído das células HeLa foi transferido para a membrana de nitrocelulose *Hybond-N*, de acordo com o protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989). O gel de agarose foi incubado por 20 minutos à temperatura ambiente em água tratada com DEPC e, em seguida, em tampão SSC 10X, por cerca de 15 minutos. A transferência foi feita à temperatura ambiente por 15-18 horas, utilizando-se o tampão SSC 10X.

Para o experimento de *Northern blot*, os cDNAs dos genes *c-fos*, *c-myc* e beta-actina foram marcados radioativamente com [α -³²P] dATP, utilizando-se o *Random Primed DNA Labeling Kit*. Num volume final de 20 µL de reação, adicionou-se 1 µL de cDNA (previamente incubado a 100 °C por 10 minutos e, em seguida, em gelo por 5 minutos); 3 µL de uma mistura de dCTP, dTTP, dGTP; 2 µL de *reaction solution*; 4 µL de [α -³²P] dATP; 9 µL de água tratada com DEPC; 1 µL de enzima *Klenow*. Após 30 minutos de incubação em banho termostaticado a 37 °C, purificou-se as sondas de DNA com o *QIAquick Spin - QIAquick PCR purification kit*.

Para a hibridização DNA-RNA, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 4 horas a 42 °C em 15 mL de solução de pré-hibridação¹¹. Após este tempo de incubação, a sonda radioativa (pré-aquecida a 100 °C por 10 minutos e, em seguida, mantida em gelo

⁹ tampão de amostra de RNA: 1 µL tampão MOPS 10 X; 3,5 µL de formaldeído; 10 µL de formamida; 0,5 µL de brometo de etídeo a 1 µg/mL; 1 µL de água tratada com DEPC

¹⁰ gel de agarose desnaturante: 1g agarose dissolvido em 85 mL de água tratada com DEPC; 5 mL formaldeído; 10 mL tampão MOPS 10X, pH 8.0

¹¹ solução de pré-hibridação: SSC 5X, Denhard's 5X, 50% formamida, 1% SDS

por 5 minutos) foi adicionada à solução de pré-hibridação, e a membrana de nitrocelulose foi incubada nesta solução de hibridação, sob agitação constante a 37 °C por 15 horas.

Após 15 horas, a membrana de nitrocelulose foi incubada duas vezes, por 20 minutos a 42 °C, em uma solução de SSC 2X contendo 0,1% SDS (w/v), para a remoção de marcações radioativas inespecíficas. Em seguida, a membrana foi incubada por 2 minutos em SSC 2X e selada para a exposição em placa BAS-IP MS2325 por 48 horas, quando foi analisada no aparelho *Phosphorimager scan Bio-Imaging Analyzer BAS-1800II*. A quantificação da luminescência foto-estimulada foi calculada utilizando-se o programa *Image Gauge*, e os valores obtidos foram graficados para a análise da cinética da taxa de degradação de mRNAs de *c-fos* e *c-myc* em células HeLa.

3.2.4 Amplificação de DNA pela reação de PCR

A 2 µL do DNA plasmideal molde (cerca de 80 ng) foram adicionados 1 µL (10 pmol) dos oligonucleotídeos *sense* e *antisense* (específicos para cada amplificação; ver Tabelas 4 e 5), 1 µL de dNTP a 10 mM, 2,5 µL do tampão Taq DNA polimerase 10X¹², 1 µL Taq DNA polimerase (0,1 U/µL), e 16,5 µL de água destilada para totalizar um volume de 25 µL de reação, realizadas sempre em duplicata. Em média, a reação de PCR consistiu de 35 ciclos de amplificações (desnaturação a 95 °C por 1 minuto; anelamento por 1 minuto, com temperatura dependente da T_m do oligonucleotídeo utilizado - ver tabela 4; extensão a 72 °C por 3 minutos) seguidos de uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

3.2.4.1 PCR de colônia

As colônias de bactérias DH5α transformadas com os plasmídeos contendo fragmentos de cDNA de HBx foram selecionadas pela técnica de PCR de colônia. Utilizando as mesmas condições descritas em 3.2.4, as colônias de bactérias foram re-suspendidas em volumes finais de 25 µL de reação, com o uso de ponteira estéril, e submetidas a 95 °C por 15 minutos antes de prosseguir com os ciclos de amplificação.

¹² tampão Taq DNA polimerase 10X: 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 9

3.2.5 Eletroforese em gel de agarose

As análises de DNA foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, de acordo com o protocolo descrito em Sambrook et al. (1989). As amostras de DNA (plasmídeos, produtos de amplificação por reação de PCR, produtos de digestão com enzimas de restrição) foram preparadas em tampão de corrida¹³, antes de serem aplicadas no gel. As eletroforeses foram corridas a 80 V (Volts) em tampão TAE¹⁴ por 20-40 minutos. Os géis de agarose foram corados em solução contendo brometo de etídeo a uma concentração final de 1 µg/mL, antes de serem visualizados em um transluminador de UV (302 nm), e fotografados com a câmera KODAK (DC120) para documentação.

3.2.6 Purificação de fragmentos de DNA e de produtos de PCR

Os produtos de amplificação por PCR foram purificados com o *QIAquick spin - QIAquick PCR purification kit* ou com o *QIAquick Extraction Gel Kit*, de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. Para a purificação com o *QIAquick Gel Extraction Kit*, as bandas presentes no gel de agarose foram cortadas e o DNA de interesse foi eluído com água estéril.

3.2.7 Digestão de DNA com enzimas de restrição

Os plasmídeos e os produtos de amplificação por PCR previamente purificados foram digeridos com as enzimas de restrição específicas para cada clonagem (Tabela 4), de acordo com a metodologia descrita em Sambrook *et al.* (1989). Para cada µg de DNA utilizou-se 1 U (unidade) de enzima para a digestão dos plasmídeos e dos produtos de amplificação por PCR, e as reações prosseguiram em banho termostático a 37 °C por um intervalo variável de 3 a 20 horas. As reações de digestão foram inativadas a 80 °C por 10 minutos antes da purificação dos fragmentos de DNA.

3.2.8 Reação de ligação de DNA

As ligações dos plasmídeos aos fragmentos de DNA, previamente digeridos com as mesmas endonucleases de restrição e purificados, foram realizadas de acordo com a

¹³ tampão de corrida: 20% de glicerol e 0,015% de azul de bromofenol

¹⁴ tampão TAE: 40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

metodologia descrita em Ausubel *et al.* (1995). Em média, para um volume final de 10 µL de reação, foram misturados cerca de 1 µL do plasmídeo digerido e purificado, 5 µL do inserto digerido e purificado, 1 µL de ATP 10 mM e 2 µL do tampão de ligação 5X antes do aquecimento a 45 °C por 5 minutos. Após repouso em gelo por 2 minutos, 1 µL de DNA ligase foi adicionado à reação, e esta permaneceu em banho termostatizado com temperatura controlada a 16 °C por cerca de 20-22 horas. Os plasmídeos obtidos foram utilizados para a transformação de bactérias competentes DH5α por choque térmico.

3.2.9 Transformação de bactérias competentes por choque térmico

Cerca de 75 µL de bactérias competentes DH5α foram incubadas com 5 µL de reação de ligação por 30 minutos, em banho de gelo, antes de prosseguir com o choque térmico: 42 °C por 2 minutos, gelo por 2 minutos. Após a adição de 800 µL de meio SOC¹⁵, as bactérias foram mantidas sob agitação a 200 rpm, a 37 °C por 45 minutos. Cerca de 150 µL de suspensão de bactérias foram inoculados em placas LB-ágar contendo o antibiótico específico, e mantidas em estufa a 37 °C por 18 horas. As colônias de bactérias resistentes ao antibiótico foram testadas através do PCR de colônia.

Para a transformação de *E. coli* BL21 (DE3), 50 µL de bactérias foram incubados com 1 µL (~400 ng) de DNA plasmideal e a mistura foi mantida em gelo por 30 minutos, antes de prosseguir com o choque térmico a 42 °C, como descrito acima. Foram inoculados cerca de 75 µL da suspensão de bactérias em placas LB-ágar contendo o antibiótico específico, e as placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 18 horas. As bactérias que cresceram foram selecionadas para os testes de indução da expressão protéica.

3.2.10 Extração de DNA plasmideal

As colônias obtidas com a transformação de bactérias competentes (DH5α), e selecionadas através do PCR de colônia, foram incubadas em meio LB contendo 50 µg/mL de antibiótico específico (ampicilina ou canamicina), sob agitação a 200 rpm, por

¹⁵ meio SOC: 0,5% extrato de levedura, 2% peptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glicose

18 horas a 37 °C. O DNA plasmideal foi extraído com o *Miniprep Plasmid DNA kit*, *Midiprep Plasmid DNA kit* ou com o *Maxiprep Plasmid DNA kit*.

Para confirmar a presença dos fragmentos de DNA, 4 µL (cerca de 1,6 µg) de DNA plasmideal foram digeridos com as enzimas de restrição específicas para cada clonagem. Após 3 horas de incubação em banho termostático a 37 °C, as amostras de digestão foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Somente os plasmídeos contendo o fragmento de DNA desejado foram transformados com *E. coli* BL21 (DE3), para a posterior expressão da proteína recombinante.

3.2.11 Mutagênese sítio-dirigida

Para a mutação sítio-dirigida dos cinco resíduos de cisteína da proteína mini-HBx(18-142) para resíduos de serina, utilizou-se o *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit*. Os protocolos detalhados estão descritos no manual de instrução que acompanha o produto, e os oligonucleotídeos específicos para cada uma das mutações foram sintetizados pela empresa GIBCO-BRL/Life Technologies do Brasil. O trabalho de mutagênese sítio-dirigida da proteína mini-HBx(18-142) foi realizado em colaboração com o aluno de doutorado Edmilson Rui, como parte de seu projeto intitulado: “Mutagênese da proteína HBx do vírus da hepatite B e estudo da interação com RNA e proteínas humanas”.

3.2.12 Sequenciamento de DNA

Os clones que confirmaram a presença do fragmento de DNA desejado foram seqüenciados com base na técnica de Sanger *et al.* (1977), utilizando-se o seqüenciador automático de DNA *ABI PRISM 377 Genetic Analyser*. As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando 800 ng dos DNAs plasmideais previamente purificados por precipitação com álcool isopropílico 75%, seguido de lavagem com etanol 70%. Em cada uma das reações, utilizou-se os oligonucleotídeos específicos (Tabela 6) na concentração final de 1 pmol. As reações foram preparadas de acordo com a metodologia descrita no manual de instruções do fabricante do *DNA Sequencing kit Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Read Reaction*. As seqüências obtidas foram submetidas ao banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e analisadas através do programa *BLAST*. Para os

alinhamentos de seqüências de aminoácidos, utilizou-se o programa *CLUSTALW multiple alignment* (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl).

3.3 Expressão de proteína recombinante

3.3.1 Expressão em *Escherichia coli*

3.3.1.1 Procedimento para a indução da expressão

As bactérias competentes BL21 (DE3), transformadas com os plasmídeos para a expressão em *E. coli* foram pré-inoculadas em meio LB contendo o antibiótico específico (ampicilina ou canamicina) na concentração de 50 µg/mL, e incubadas por 18 horas a 37 °C, sob agitação constante a 200 rpm. Após diluição 1:30 da pré-cultura em meio fresco LB+antibiótico, as bactérias foram incubadas sob as mesmas condições, acima indicadas, até atingirem a fase logarítmica ($OD_{600} = 0,8$).

Para a expressão das proteínas, adicionou-se de IPTG na concentração final de 0,1 a 1 mM. Após incubação em diferentes temperaturas (20 °C, 25 °C, 30 °C ou 37 °C), por um período variando de 3 a 14 horas, as bactérias foram coletadas por centrifugação (4000 x g, 20 minutos, 4 °C). Alíquotas de 1 mL da cultura não-induzida e induzida com IPTG foram retiradas para posterior análise da expressão das proteínas através de SDS-PAGE.

3.3.1.2 Lise bacteriana

As bactérias coletadas por centrifugação foram re-suspendidas em tampão PBS¹⁶ contendo 1 mL de lizozima (50 mg/mL) e 1 mM de PMSF. Após incubação em gelo por 30 minutos, as bactérias foram submetidas a três ciclos consecutivos de lise pelo congelamento em N₂ líquido e descongelamento em banho termostatizado a 37 °C. Após o último descongelamento, DNase (1 µg/mL) foi adicionada e as amostras foram incubadas a 37 °C por 20 minutos. Para a separação das frações solúveis e insolúveis do

¹⁶ tampão PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄ e 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4

lisado bacteriano, as amostras foram centrifugadas a 18600 x g, por 15 minutos a 4 °C, e as frações separadas foram analisadas através de SDS-PAGE.

3.3.1.3 Isolamento e purificação de corpos de inclusão

O protocolo de isolamento e purificação de corpos de inclusão foi elaborado com base em outros protocolos descritos na literatura (Baneyx, 1999; Valax & Georgiou, 1999), e adaptado para a purificação da proteína HBx. Este protocolo substitui o protocolo anterior de lise bacteriana (3.3.1.2) apenas para as proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina que foram expressas na forma de corpos de inclusão.

As bactérias coletadas por centrifugação após o período de indução por IPTG foram re-suspendidas em tampão de lise¹⁷ contendo lisozima (0,1 mg/mL). Após incubação em gelo por 30 minutos, as bactérias foram submetidas a três ciclos consecutivos de lise pelo congelamento em N₂ líquido e descongelamento em banho termostaticado a 37 °C. Após o último descongelamento, adicionou-se DNase (1 µg/mL) e a amostra foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Depois da incubação, a amostra foi sonicada (pulsos de 20-30%, por 30 segundos, 5 repetições) no aparelho *Sonifier 450* e centrifugada por 15 minutos a 18600 x g, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi re-suspendido em tampão de lavagem 1¹⁸.

Após centrifugar a amostra a 9500 x g, 4 °C, por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e re-suspendeu-se o precipitado no mesmo tampão de lavagem 1, repetindo o mesmo procedimento de centrifugação e lavagem por mais duas vezes, ou até que o sobrenadante estivesse límpido. Depois da última centrifugação, re-suspendeu-se o precipitado no tampão de lavagem 2¹⁹, centrifugou-se as amostras a 9500 x g, 4 °C, por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem até que o sobrenadante não espumasse.

Depois da última lavagem com o tampão de lavagem 2, o precipitado foi re-suspendido em tampão de extração²⁰ e a amostra foi centrifugada a 13700 x g, 4 °C, por 20 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-

¹⁷ tampão de lise: 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF

¹⁸ tampão de lavagem 1: 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 3 M uréia, 1% Triton X-100

¹⁹ tampão de lavagem 2: 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM DTT

²⁰ tampão de extração: 10 mM Tris-HCl, 100 mM fosfato de sódio, 8 M uréia, pH 8,0

histidina foi filtrado (0,22 μm) e armazenado a 4 °C para posterior purificação por cromatografia de afinidade em *Ni-NTA*, sob condições desnaturantes.

3.3.2 Expressão em células de inseto *Sf9* (sistema de Baculovírus)

3.3.2.1 Transfecção das células de inseto *Sf9*

As células de inseto *Sf9* foram transfectadas através do método de transfecção lipídica, utilizando como agente transfectante o reagente DOTAP, 2 μg de minipreparação do vetor de transferência recombinante (pBSV-8His/HBx) e 0,5 μg do BaculoGoldTM linearizado, de acordo com instruções do *BaculoGoldTM Transfection kit*. O aumento do título do baculovírus recombinante foi realizado através de 3 a 4 subcultivos com novas células de inseto *Sf9*. O sobrenadante destas células foi utilizado para promover novas infecções.

3.3.2.2 Lise das células de inseto *Sf9*

Depois de 4 dias de infecção, as células de inseto foram coletadas por centrifugação a 4000 x g, por 10 minutos a 4 °C, e mantidas a -80 °C para a separação das frações solúveis e insolúveis. O *pellet* de células foi re-suspendido em 300 μL de PBS¹⁵ e, após vórtex à temperatura ambiente, adicionou-se 10 μL de PMSF (100 μM) e 10 μL de DNase (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mantendo a amostra em gelo. Sonicou-se a amostra (pulsos de 20-30%, por 15 segundos, 5 repetições) no aparelho *Sonifier 450* e deixou-se a amostra incubando sob agitação, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Centrifugou-se a amostra a 14000 rpm, por 30 minutos a 4 °C em centrífuga de bancada do tipo *Eppendorf*. O sobrenadante foi retirado e centrifugado mais uma vez, antes da análise por SDS-PAGE e *Western blot*.

3.3.3 Expressão em leveduras *Pichia pastoris*

Cerca de 16 μL (32 μg) da maxipreparação de DNA plasmideal de pPIC9K, pPIC9K/His-HBx(1-154) e pPIC9K/His-mini-HBx(19-142) foram digeridos com 2 μL da enzima de restrição *Sal I* (1 U/ μL), e os produtos da digestão foram purificados com o

QIAquick Gel Extraction Kit, de acordo com o protocolo descrito anteriormente (3.2.6). Os plasmídeos linearizados foram utilizados na eletroporação com as leveduras *Pichia pastoris* linhagem KM71.

3.3.3.1 Eletroporação

Cerca de 150 µL de células competentes KM71 foram adicionadas à cubeta de eletroporação de 0,4 cm e mantidas em gelo, antes da adição de 25 µL do DNA plasmideal linearizado com *Sal* I. A mistura permaneceu em gelo por cinco minutos antes do pulso a 1500 V (Volts), 25 µF (micro Faraday) e 200 Ω (Ohms), utilizando o aparelho *BioRad Gene Pulser*. Cerca de 1 mL de sorbitol 1 M gelado foi adicionado a cada cubeta, que foi mantida em gelo. Plaqueou-se alíquotas de 200 µL em placas MD²¹ e as placas foram mantidas a 30 °C por 3 dias. Utilizou-se a linhagem KM71 não transformada como controle de crescimento. Os transformantes que cresceram nestes 3 dias foram repicados em novas placas MD para a confirmação dos clones transformantes, antes da seleção com o antibiótico geneticina (G418).

3.3.3.2 Seleção com geneticina (G418)

Todas as colônias transformantes foram repicadas em placas YPD contendo concentrações crescentes de antibiótico geneticina (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 1,75; 2,0; 3,0; 4,0 mg/mL). Para isso, cada colônia foi re-suspendida em 50 µL de água estéril e 1 µL de cada suspensão foi adicionado nas placas YPD contendo diferentes concentrações de geneticina. As placas foram mantidas a 30 °C por 5 dias, quando os clones resistentes foram repicados mais uma vez em placas YPD/G418, antes de serem repicados em placas MD²⁰ e MM²². Após 2 dias, os clones que cresceram em meio MD e muito pouco em meio MM foram repicados mais uma vez em placas MD e MM, antes dos testes de indução com metanol.

²¹ placas MD: 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 2% glicose, 1,5 % ágar bacteriológica

²² placas MM: 1,34% YNB; 4x10⁻⁵% biotina; 0,5% metanol; 1,5% ágar bacteriológica

3.3.3.3 Indução da expressão

As colônias selecionadas para o teste de indução foram crescidas em 25 mL de meio tamponado BMGY²³ por 18 horas a 30 °C, sob agitação constante (220 rpm) em um *erlenmeyer* de 250 mL, para promover uma boa aeração durante o crescimento das leveduras. Quando o valor de densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) estava entre 2 e 3, as células foram coletadas por centrifugação a 1500 x g, por 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado com cuidado, as células foram re-suspensas em 10 mL de meio BMMY²⁴ e mantidas sob agitação a 30 °C por 7 dias. Retirou-se 1 mL da cultura para o controle da indução, e 50 µL de metanol foram acrescentados diariamente à cultura, por um período de 7 dias ininterruptos.

Cerca de 1 mL de cultura foi coletado a cada 24 horas, e o sobrenadante foi separado por centrifugação a 6500 rpm em centrífuga de bancada *Eppendorf* por 1 minuto, à temperatura ambiente. O *pellet* foi armazenado a -80 °C, e uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi diluída 1:1 com o tampão de amostra²⁵, e foi desnaturada por cinco minutos a 95 °C antes de ser analisada por SDS-PAGE.

3.3.4 Expressão em células humanas HeLa

3.3.4.1 Transfecção estável de células humanas HeLa

Inicialmente, as midipreparações de DNA dos plasmídeos pcDNA3.1/Hygro(+) (15 µg) e pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) (30 µg) foram misturadas com 2 mL de meio DME (sem soro e sem antibiótico). Em seguida, 2 mL de meio DME (sem soro e sem antibiótico) contendo 120 µL de lipídios catiônicos DOTAP foram adicionados a cada uma das soluções, para a transfecção de células humanas HeLa. As duas soluções foram misturadas e deixadas em repouso por 15 minutos, para a inserção dos plasmídeos pcDNA3.1/Hygro(+) e pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) nas vesículas lipídicas. As soluções foram transferidas para frascos de cultura contendo células HeLa em 10 mL de

²³ meio tamponado BMGY: 1% extrato de levedura; 2% peptona; 1,34% YNB; 4x10⁻⁵% biotina; 1% glicerol; 100 mM de fosfato de potássio pH 6

²⁴ meio BMMY: idem BMGY, substituindo 1% de glicerol por 0,5% de metanol

²⁵ tampão de amostra: 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 mM EDTA; 1% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 8% glicerol; 0,025% azul de bromofenol

meio DME (sem soro e sem antibiótico). Após 8 horas de incubação a 37 °C, cerca de 7 mL de meio DME contendo 30% de soro fetal bovino foram adicionados a cada um dos frascos de cultura, e os mesmos foram mantidos a 37 °C, em uma incubadora saturada com 5% de CO₂, por mais 18 horas.

Para a seleção das células HeLa que foram transfectadas estavelmente com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154), adicionou-se higromicina (500 µg/mL) aos frascos de cultura, e os clones positivos foram isolados. Retirou-se 50 µL de meio DME contendo as células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154), centrifugou-se a 6500 rpm em centrífuga de bancada *Eppendorf*, e descartou-se o sobrenadante. As células coletadas foram utilizadas em uma reação de PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos XV-S e XPWW-A (Tabela 4) para amplificar o cDNA codificador da proteína HBx. O clone selecionado com higromicina, e confirmado pela reação de PCR, foi utilizado nos ensaios de cinética de degradação de mRNAs.

3.3.4.2 Ensaios de cinética de degradação de mRNAs

Para os ensaios de cinética de degradação de mRNAs de *c-fos* e *c-myc*, utilizou-se a técnica de *Northern blot* (item 3.2.3.1). As células HeLa transfectadas estavelmente com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) foram tratadas com actinomicina D por 0, 3, 6 e 8 horas, para serem utilizadas como controle, e as células HeLa transfectadas estavelmente com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) também foram tratadas com actinomicina D por 0, 3, 6 e 8 horas, antes da extração de RNA total (item 3.2.2).

3.3.4.3 Crescimento de células HeLa na presença e ausência de HBx

As células HeLa transfectadas estavelmente com os plasmídeos pcDNA3.1/Hygro(+) e pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx foram crescidas em meio DME acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, e 250 µg/mL de higromicina (para a manutenção da linhagem transformada). As células HeLa foram coletadas por centrifugação e cerca de 20 x 10⁴ células foram subcultivadas em placas do tipo 6 poços

contendo 2 mL de meio DME/SGH²⁶. As placas foram mantidas em incubadora a 37 °C, saturada com 5% de CO₂, e as células foram coletadas após 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Ao final de cada tempo de incubação, as células HeLa foram coletadas por centrifugação, o meio foi descartado, e o *pellet* de células foi lavado com tampão PBS e re-suspendido em 500 µL de HBSS²⁷ e 500 µL de uma solução de *Trypan Blue* 0,4%. A mistura foi mantida em repouso por 10 minutos antes da contagem de células vivas e células mortas (coradas com o *Trypan Blue*). Para isso, alíquotas de 10 µL de cada uma das amostras, para cada tempo de coleta, para as duas linhagens de células, foram retiradas para a contagem das células na câmara de Neubauer.

Para determinar o número total de células, em cada tempo, para as duas linhagens de células, calculou-se a média dos valores obtidos em triplicata, e os dados obtidos foram graficados. Para o cálculo da viabilidade celular, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade celular} = (\text{n}^{\circ} \text{ de células vivas} / \text{n}^{\circ} \text{ total de células}) \times 100\%$$

onde o número de células vivas foi determinado através da não coloração com o reagente *Trypan Blue*.

3.4 Purificação e análise de proteína recombinante

3.4.1 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade

A purificação das proteínas de fusão baseou-se em dois sistemas de cromatografia de afinidade: o sistema *His-tag*, para a purificação das proteínas em fusão com a cauda de poli-histidina, e o sistema GST, para a purificação das proteínas fusionadas à proteína glutathione-S-transferase (GST).

²⁶ meio DME/SGH: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina e 250 µg/mL de higromicina

²⁷ HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

3.4.1.1 Proteínas em fusão com a cauda de poli-histidina

As proteínas fusionadas à cauda de poli-histidina presentes nas frações insolúveis dos lisados bacterianos foram solubilizadas em tampão de extração²⁸, antes de serem purificadas em coluna de afinidade, à temperatura ambiente, utilizando-se a resina comercial *Ni-NTA (Nitrilo triacetato) Agarose Beads*. Os protocolos detalhados estão descritos no manual de instrução que acompanha o produto (*QIAExpressionist Ni-NTA Protein Purification System* – QIAGEN).

As amostras de proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) foram filtradas (0,22 µm) e degaseadas antes da purificação. A purificação foi realizada em condições desnaturantes (uréia 8 M), e os tampões utilizados foram previamente filtrados antes de serem degaseados em bomba de vácuo por 15 minutos. Aplicou-se 1 mL de resina de *Ni-NTA* à coluna de vidro, para cada litro de cultura induzido, utilizando-se um *FPLC/AKTA Purifier* para o empacotamento da resina, que foi equilibrada com o tampão de extração. Após a aplicação da fração insolúvel do lisado (proteínas desnaturadas), lavou-se a coluna com o tampão de extração no pH 6,3. As proteínas de fusão foram eluídas com o tampão de extração no pH 4,5, e coletadas em *ependorfs* de 1,5 mL, para posterior análise das frações através de SDS-PAGE e de *Western blot*.

3.4.1.1.1 Renaturação das proteínas recombinantes

As frações oriundas da purificação (sob condições desnaturantes) das proteínas HBx foram dialisadas contra 500 mL de diferentes tampões renaturantes (Tabela 8), utilizando membranas semi-permeáveis de 12000 Da. As diálises foram realizadas sob agitação lenta, a 4 °C, com pelo menos de 2 a 5 trocas de tampão a cada 8-12 horas (Rudolph *et al.*, 1998).

As diálises contra os tampões D, F, H e I foram sequenciais, de modo que concentrações decrescentes de uréia (6, 4, 3, 2, 1, e 0,1 M) foram adicionadas aos tampões durante as trocas consecutivas (Rudolph & De Bernardez Clark, 1999). No caso dos outros tampões listados na tabela 8, as diálises foram realizadas de forma direta, sem a adição de uréia. Após as diálises diretas ou sequenciais, as proteínas foram clareadas

²⁸ tampão de extração: 10 mM Tris-HCl, 100 mM fosfato de sódio, 8 M uréia, pH 8

por centrifugação a 2000 x g e utilizadas nos ensaios de interação proteína-oligonucleotídeo de RNA (item 3.5.1) e nos ensaios espectroscópicos (item 3.6).

Tabela 8 – Tampões utilizados para a renaturação das proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina.

Tampão	Composição
A	água, pH 6,0
B	10 mM Pipes, pH 6,0
C	10 mM Pipes, pH 7,0
D	10 mM Pipes, 1 mM DTT, pH 7,0
E	PGDE (25 mM Pipes, 50 mM KCl, 80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoetanol, 0,1% Triton X-100, 5% glicerol), pH 6,0
F	10 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 8,0
G	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,5
H	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM DTT, pH 8,5
I	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoetanol, pH 8,0
J	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG, pH 8,0
K	Acetato de sódio/ácido acético, pH 5,6

3.4.1.2 Proteínas em fusão com a proteína GST

As proteínas GST, GST-HBx(5-154), GST-HBx(5-78), GST-HBx(80-142), GST-p53(1-393), provenientes da fração solúvel do lisado de bactérias, foram purificadas por cromatografia de afinidade, à temperatura ambiente, utilizando-se a resina comercial *glutathione sepharose 4B*.

As amostras de proteína e os tampões utilizados na purificação foram previamente filtrados (0,22 µm) e degaseados em bomba de vácuo por 15 minutos. Aplicou-se 1 mL de resina à coluna de vidro, para cada litro de cultura induzido, utilizando-se um FPLC/AKTA *Purifier* para o empacotamento da resina, que foi equilibrada com o tampão PBS¹⁵. Após a aplicação da fração solúvel do lisado, as proteínas em fusão com a proteína GST foram eluídas com o tampão PBS contendo 10 mM de glutathione reduzida. As frações da purificação foram coletadas em *eppendorfs* de 1,5 mL, para posterior análise através de SDS-PAGE e de *Western blot*.

3.4.2 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Alíquotas das frações solúveis e insolúveis dos lisados bacterianos e das frações purificadas (em coluna de *Ni-NTA* ou de *glutathione sepharose 4B*) foram analisadas por SDS-PAGE, em géis de poliacrilamida a 10% ou 12,5%. As amostras foram diluídas na proporção de 1:1 com tampão de amostra²⁴, e foram desnaturadas a 95 °C, por cinco minutos, antes de serem aplicadas nos géis. As eletroforeses foram corridas à temperatura ambiente a 25 mA, por cerca de 1 hora, utilizando como tampão de corrida o tampão Tris-glicina²⁹. Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram corados por 20 minutos em uma solução de *Coomassie Blue Staining*³⁰, e descorados em solução de 5% de ácido acético e 12,5% de metanol.

3.4.2.1 Western blot

As amostras de proteína foram separadas em géis de poliacrilamida a 10% ou a 12,5%. Após a eletroforese, o gel a ser transferido foi incubado na solução Ânodo II³¹ por cinco minutos. A membrana de PVDF *ImmobilonTM-P* foi pré-incubada em metanol e lavada com água estéril antes do uso.

Utilizou-se o sistema *Semi-Dry Blotting System* para a transferência das proteínas contidas no gel para a membrana de PVDF. Em contato com o ânodo do aparelho de transferência, foram colocados dois papéis (Whatman 3MM) embebidos na solução Ânodo I³², e sobre estes um papel embebido na solução Ânodo II. Seguindo a montagem do “sanduíche”, colocou-se a membrana (pré-incubada em metanol e lavada com água estéril), o gel de poliacrilamida a ser transferido e três papéis embebidos no tampão Cátodo³³, que foram colocados em contato com o pólo negativo do aparelho de transferência. O tempo de transferência variou entre 1 hora e 1 hora e 30 minutos, a 50 mA por membrana.

²⁹ Tris-glicina: 25 mM Tris base; 250 mM glicina; 0,1% (w/v) SDS

³⁰ solução de *Coomassie Blue Staining*: 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético e 0,25% (v/v) *Coomassie Blue*

³¹ solução Ânodo II: 25 mM Tris-HCl pH 8, 20% metanol

³² solução Ânodo I: 300 mM Tris-HCl pH 8,0, 20% metanol

³³ tampão Cátodo: 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 20% metanol, 40 mM ácido α -capróico

Após a transferência, o “sanduíche” foi desmontado e a membrana foi bloqueada com uma solução contendo 5% de BSA e 0,1% de Tween-20 em tampão TBS 1X³⁴ e incubada à temperatura ambiente por 3 horas, ou a 4 °C por 18 horas. Depois da incubação em BSA, a membrana foi lavada três vezes com TBS 1X, antes da sua incubação, à temperatura ambiente, com os anticorpos primários *anti-GST* ou *anti-penta His* (diluídos 1:3000 em TBS 1X) ou com o *anti-soro anti-HBx* (diluído 1:100 em TBS 1X). Após duas horas de incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBS 1X, e incubada por 2 horas com o anticorpo secundário *anti-mouse-IgG* (para os anticorpos primários *anti-GST* ou *anti-penta His*) ou com o anticorpo secundário *anti-rabbit-IgG* (para o *anti-soro anti-HBx*), diluídos 1:5000 em tampão TBS 1X.

Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes com TBS 1X, antes da revelação utilizando o *Western Blotting Luminol Reagent*, de acordo com as especificações do fabricante. A exposição da membrana ao filme X-OMAT foi feita por intervalos de tempo de 30 segundos a 2 minutos, e depois os filmes foram revelados.

3.5 Ensaios funcionais

3.5.1 Interação proteína-oligonucleotídeo de RNA

3.5.1.1 Marcação de sondas radioativas

Os oligonucleotídeos de RNA (Tabela 7) foram marcados radioativamente nas suas extremidades 5' com [γ -³²P] dATP pela ação da *T4 polinucleotídeo kinase* (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1995). Para um volume final de reação de 50 μ L, adicionou-se 10 μ L de [γ -³²P] dATP (cerca de 5 μ Ci), 1 μ L de oligonucleotídeo de RNA na concentração de 30 pmol/ μ L, 1 μ L de dATP não marcado na concentração final de 48,5 pmol/ μ L, 1 μ L (20 unidades) de *T4 polinucleotídeo kinase*, 5 μ L de tampão OPA³⁵ e 32 μ L de água tratada com DEPC. A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora quando foi

³⁴ tampão TBS 1X: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,2

³⁵ tampão OPA: 10 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio e 50 mM acetato de potássio

interrompida pela adição de 2,5 µL de uma solução de EDTA 500 mM pH 8 (25 mM na reação).

Os oligonucleotídeos de RNA marcados radioativamente foram purificados numa coluna de gel filtração (colunas NAP-5), de acordo com instruções do fornecedor, e alíquotas de 15-120 fmol de sondas marcadas foram utilizadas nas reações de interação com as proteínas recombinantes em fusão com a cauda de poli-histidina (6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142), 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) e mutantes Cys/Ser 6xHis-mini-HBx(19-142)), ou em fusão com a proteína GST (GST-HBx(5-154), GST-HBx(5-78) e GST-HBx(80-142)).

3.5.1.2 Ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA)

As proteínas HBx em fusão com GST foram utilizadas na análise das interações entre os oligonucleotídeos de RNA (Tabela 7), marcados com o radioisótopo [γ - 32 P] dATP, através de EMSA. Os oligonucleotídeos de RNA e as proteínas foram incubadas em gelo por 30 minutos, num volume final de reação de 25 µL contendo 50 mM de acetato de potássio, 5 mM de Tris-HCl pH 7,5, 5 mM de acetato de magnésio, 10 µg/mL de BSA e 4% de glicerol. Após a incubação em gelo, os complexos RNA-proteína foram imediatamente fracionados em um gel não-desnaturante a 6% (40:1 de acrilamida: bisacrilamida) (Carey, 1991). As eletroforeses foram corridas a 200 V por cerca de 3 a 4 horas em tampão de corrida 0,5 X TBE³⁶. Os géis foram secos por aquecimento a 65 °C por 1 hora e 30 minutos, e submetidos à auto-radiografia a -80 °C por um período mínimo de 12 horas, utilizando o filme X-OMAT.

3.5.1.3 Ensaios de UV cross-linking

As proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina foram incubadas com os oligonucleotídeos de RNA marcados com o radioisótopo [γ - 32 P] dATP (item 3.5.1.1), num volume final de 25 µL de reação contendo 20 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 60 mM KCl e 10% glicerol. Após incubação à temperatura ambiente por 30 minutos, os tubos de reação com a tampa aberta foram expostos à luz ultravioleta (254 nm) por cinco minutos, numa distância de 100 mm, utilizando o aparelho *UV Stratalinker 2400*. Os complexos

³⁶ tampão TBE: 1 M Tris base, 500 mM ácido bórico, 10 mM EDTA

RNA-proteína foram fracionados em gel de poliacrilamida a 12,5% (item 3.4.2) na presença de 5% de 2-mercaptoetanol, e visualizados após uma exposição de 2-18 horas em placa BAS-IP MS2325, utilizando o aparelho *Phosphorimager scan Bio-Imaging Analyzer* BAS-1800II.

3.5.2 Interação proteína-proteína *in vitro* (pull down)

As proteínas GST e GST-p53(1-393) foram imobilizadas em pérolas de *glutathione sepharose* e posteriormente incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente, com as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142). As pérolas foram lavadas com tampão PBS e centrifugadas a 14000 rpm em centrífuga de bancada *Eppendorf*, por três vezes seguidas, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se o tampão de amostra de SDS às pérolas de *glutathione sepharose*, e as amostras desnaturadas a 95 °C por 5 minutos foram aplicadas no gel de poliacrilamida a 12,5%.

3.5.3 Ensaios de ativação de gene repórter (mono-híbrido)

O plasmídeo p53BLUE (Tabela 3) contendo três seqüências repetidas do sítio de ligação da proteína humana p53 foi linearizado pela enzima de restrição *Apa* I e purificado por eletroforese em gel de agarose (item 3.2.6), antes da sua transformação com as leveduras *S. cerevisiae* linhagem W303 (item 3.1.3). As transformações das leveduras e as construções dos plasmídeos foram realizadas de acordo com os protocolos fornecidos pela Clontech (*MATCHMAKER One-Hybrid System - User Manual*).

Para a transformação de leveduras *S. cerevisiae* linhagem W303, várias colônias foram inoculadas em 10 mL de meio YPD, e incubadas a 30 °C, sob agitação constante a 200 rpm, por 16 horas. Quando o valor de densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) atingiu 1,5, as leveduras foram coletadas por centrifugação a 1000 rpm, a 25 °C, por 10 minutos, em centrífuga de bancada *Eppendorf*. As células foram lavadas com o tampão TE 1X, agitando-se em vórtex por 15 segundos, à temperatura ambiente, e novamente coletadas por centrifugação a 1000 rpm, por 10 minutos a 25 °C. Adicionou-se ao *pellet* de células 128 µL de PEG a 50% (MW 3350), 40 µL de acetato de lítio 1 M, 20 µL de tampão TE

10X³⁷, 20 µL de DTT 1 M, 8 µL de espermatozoides de salmão a 2 mg/mL (previamente desnaturado a 100 °C por 5-10 minutos e resfriado em gelo) e 2 µL (~1 µg) do plasmídeo p53BLUE linearizado com *Apa* I e purificado. Agitou-se em vórtex por 1 minuto, à temperatura ambiente, e as células foram incubadas em banho termostático a 45 °C por 1 hora e 30 minutos, para a integração do plasmídeo p53BLUE no genoma das leveduras *S. cerevisiae* linhagem W303. Após o tempo de incubação, as leveduras transformadas foram inoculadas em placas SD-U, e mantidas a 30 °C por 3 a 6 dias.

As leveduras W303 transformadas com o p53BLUE (W303mut) que cresceram em meio SD-U foram selecionadas para a transformação com o plasmídeo pGAD424-p53(1-393), de acordo com o protocolo de transformação de leveduras W303 descrito acima. Somente as leveduras transgênicas W303mut/pGAD424-p53 que cresceram em meio seletivo SD-UL foram isoladas para uma nova transformação com os plasmídeos pBTM116, pBTM116/HBx(1-154), pBTM116/mini-HBx(18-142) e pBTM116/mini-HBx(-Cys)(18-142). Cerca de 4 µL (~1,6 µg) de DNA plasmídeo foram utilizados em cada uma das transformações dos plasmídeos pBTM116 com as leveduras transgênicas W303mut/pGAD424-p53, e apenas as leveduras que cresceram em meio SD-ULW foram isoladas para serem utilizadas nos ensaios de ativação do gene repórter (beta-galactosidase) dependente da ativação do promotor alvo para a proteína humana p53, em sistema de mono-híbrido em levedura.

As leveduras transgênicas W303mut/pGAD424-p53 que foram transformadas com o plasmídeo pBTM116 vazio, ou contendo as três seqüências codificadoras para as proteínas HBx(1-154), mini-HBx(19-142) e mini-HBx(-Cys)(19-142), foram crescidas em meio seletivo SD-ULW a 30 °C, sob agitação a 200 rpm, por 16 horas. Depois de uma diluição 1:100 em meio SD-ULW fresco, o crescimento das leveduras foi monitorado pela densidade ótica (OD_{600nm}) que variou de 0,6 a 0,8.

Para os ensaios com o reagente ONPG foram utilizadas as leveduras provenientes de 0,5 mL de meio de cultura, que foram diluídas para atingirem um valor de OD_{600nm}= 0,25. As células coletadas por centrifugação a 14000 rpm à temperatura ambiente, em centrífuga de bancada *Eppendorf*, foram re-suspendidas com 0,5 mL da solução ONPG-

³⁷ tampão TE: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA

Z³⁸ e incubadas a 30 °C até o aparecimento da coloração amarela, ocasionado pela liberação do grupo o-nitrofenol. A reação foi encerrada com a adição de 200 µL de Na₂CO₃ 1 M. Para as análises quantitativas utilizou-se o espectrofotômetro *Ultrospec 3000*, com leitura de absorbância em 420 nm.

3.6 Ensaios espectroscópicos

3.6.1 Absorbância no UV-Visível

A concentração das proteínas de fusão dialisadas contra diferentes tampões foi determinada através da medida de absorbância das mesmas a 280 nm (Edelhock, 1967). Desta forma, as proteínas foram previamente desnaturadas em solução de 15 mM fosfato de sódio e 7,5 M guanidina-HCl pH 6,5. Os espectros de absorbância foram obtidos em um espectrofotômetro *JASCO V-530 UV/VIS*, com varredura de comprimento de onda de 350-190 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico.

Os espectros de absorbância das proteínas de fusão foram corrigidos com a subtração do espectro de absorbância do tampão correspondente (“branco”). A partir dos valores dos coeficientes de extinção molar (ϵ) obtidos através do programa *ProtParam* (<http://ca.expasy.org>) e dos valores de absorbância a 280 nm, determinou-se as concentrações molares das proteínas de fusão através da fórmula :

$$A_{280} = \epsilon \times b \times c$$

onde A_{280} é a absorbância medida a 280 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$), b é o caminho ótico em centímetros (cm) e c é a concentração molar da amostra de proteína (M). As amostras de proteína foram centrifugadas a 2000 x g antes de serem utilizadas nos ensaios espectroscópicos de dicroísmo circular, fluorescência e de ressonância magnética nuclear.

³⁸ solução ONPG-Z: 400 µL Z buffer (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 0,025% SDS; pH 7), 80 µL ONPG (4 mg/mL), 20 µL SDS a 0,1% e 30 µL de clorofórmio

3.6.2 Dicroísmo circular (CD)

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro *JASCO J-810* (JASCO), com a temperatura controlada através de um sistema interno de controle de temperatura (*Peltier type control system* PFD 425S). Os espectros de dicroísmo circular no UV distante (260-190 nm) foram adquiridos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico, com velocidade de varredura de 50 nm/minuto, tempo de resposta de 8 segundos e resolução de 0,5 nm. O espectro final foi obtido pela acumulação de 4-16 varreduras, e corrigido com a subtração do espectro de dicroísmo circular do tampão correspondente.

Os dados gerados com a subtração dos espectros foram convertidos em elipticidade molar residual $[\theta]$, que é dada pela equação :

$$[\theta] = \theta / 10 \times l \times c \times n$$

onde θ é a elipticidade observada (degrees), l é o caminho ótico em centímetros (cm), c é a concentração molar (M) e n é o número de aminoácidos da proteína. Os dados convertidos foram graficados utilizando-se o programa *ORIGIN 6.1*.

As proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) purificadas sob condições desnaturantes (uréia 8 M) foram renaturadas através de diálises diretas ou sequenciais contra diferentes tampões (Tabela 8), e utilizadas nos experimentos de dicroísmo circular. Para determinar a porcentagem de estrutura secundária para cada uma das três proteínas de fusão, utilizou-se o programa *CDNN deconvolution* (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>), e uma base de dados contendo 33 espectros de CD de diferentes proteínas. Os erros intrínsecos ao cálculo de porcentagem de estrutura secundária foram indicados em cada tabela.

3.6.3 Emissão intrínseca de fluorescência

Os estudos de emissão intrínseca de fluorescência foram realizados no espectrômetro de luminescência *AMINCO-Bowman Series 2*, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico. A temperatura das amostras foi estabilizada a 25 °C ou a 37 °C através de um banho termostatzado com água circulante.

O comprimento de onda da excitação foi de 295 nm para as proteínas de fusão dialisadas contra diferentes tampões, e os espectros de emissão foram coletados entre 300 e 430 nm, com velocidade de varredura de 1 nm/segundo e tempo de resposta automático. Para os experimentos com ANS, o comprimento de onda da excitação foi de 360 nm, e os espectros de emissão foram coletados entre 375 e 700 nm, na velocidade de 2 nm/segundo. Os espectros de emissão de fluorescência das amostras de proteína foram corrigidos com a subtração dos espectros de emissão dos tampões utilizados (“branco”) e graficados utilizando-se o programa *ORIGIN 6.1*. Os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão foram obtidos dos espectros de emissão de fluorescência.

3.6.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a proteína recombinante 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0, foram adquiridos espectros de ^1H RMN uni e bidimensionais (TOCSY e NOESY) no espectrômetro *Varian Inova 500* (campo magnético de 11,7 Telsa) operando à frequência de ^1H de 499,730 MHz. Cerca de 500 μL da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0, na concentração de $\sim 400 \mu\text{M}$, foi acrescida de 25 μL de D_2O (para uma concentração final de $\sim 5\%$) e de 10 μL de uma solução de NaCl 5 M (para uma concentração final de 100 mM).

Os experimentos unidimensionais de ^1H RMN foram realizados em diferentes temperaturas (10 °C, 20 °C, 25 °C e 37 °C). Os deslocamentos químicos (δ) dos prótons foram referenciados de acordo com o sinal da água ajustado para a temperatura de trabalho, conforme a equação :

$$\delta = 5,11 - (0,012 \times T)$$

onde δ é o deslocamento químico dos prótons (ppm) e T é o valor da temperatura de aquisição do espectro (°C). A supressão da água foi feita pelas técnicas de pré-saturação, e os dados coletados para os espectros unidimensionais de ^1H RMN foram processados utilizando-se o *software SpinWorks 2.0 beta*.

No caso dos experimentos bidimensionais (TOCSY e NOESY) de $\sim 400 \mu\text{M}$ da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0, os dados coletados foram

processados em estações *Silicon Graphics Octane 2* utilizando-se o *software* nmrPIPE/nmrVIEW.

Para a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em 20% TFE-*d*₃, os experimentos uni e bidimensionais de ¹H RMN foram realizados a 25 °C no espectrômetro *Varian Inova 600* operando à frequência de ¹H de 599,881 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) dos prótons foram referenciados de acordo com o sinal da água ajustado para 4,8 ppm, e a supressão da água foi feita pela técnica de pré-saturação. Cerca de 450 µL da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0, na concentração de 437,5 µM, foi acrescida de 30 µL de D₂O (para uma concentração final de 5%) e de 120 µL de uma solução de TFE-*d*₃ (para uma concentração final de 20%).

Os dados coletados foram processados em estações *Silicon Graphics Octane 2* utilizando-se o *software* nmrPIPE/nmrVIEW (espectro bidimensional) ou o *software SpinWorks 2.0 beta* (espectro unidimensional). Os espectros uni e bidimensionais de ¹H RMN da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) foram adquiridos em colaboração com a Dra. Thelma de Aguiar Pertinhez, do grupo de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do CEBIME/LNLS.

3.7 Modelagem molecular

A modelagem molecular de um fragmento da proteína mini-HBx(-Cys)(19-142) foi realizada em colaboração com o Dr. Sérgio Oyama Jr, um especialista em Modelagem e Dinâmica Molecular, do CEBIME/LNLS.

3.7.1 Predição de estrutura secundária

A sequência da proteína mini-HBx(-Cys)(19-142) foi submetida a uma predição de estrutura secundária pelo programa PSIPRED (Jones, 1999). O algoritmo baseia-se em técnicas de redes neurais, e é alimentado por bancos de dados contendo informações estruturais e de seqüências.

3.7.2 Busca de estruturas conhecidas e alinhamento

O programa BLASTp (Altschul *et al.*, 1990) foi utilizado na busca de seqüências similares à da proteína mini-HBx(-Cys)(19-142). A busca foi limitada ao banco de dados

PDB (*Protein Data Bank*) com o intuito de restringir o resultado às seqüências cujas estruturas tridimensionais foram determinadas experimentalmente.

O alinhamento preliminar obtido através do programa BLASTp foi manualmente refinado, levando-se em consideração as informações obtidas através da predição de estrutura secundária pelo programa PSIPRED. Desta forma, em conjunto com o alinhamento seqüencial, foi realizado um alinhamento estrutural com as possíveis proteínas a serem utilizadas como molde para a construção do modelo da proteína mini-HBx(-Cys)(19-142).

3.7.3 Construção e avaliação do modelo

O programa MODELLER (Sali & Blundell, 1993) foi utilizado na construção das coordenadas tridimensionais para o modelo de acordo com a estrutura-molde selecionada. Baseando-se em uma lista de restrições de distâncias obtidas do alinhamento das duas seqüências, o programa realiza várias etapas de dinâmica molecular, baseada na técnica de *simulated annealing*, de modo a gerar possíveis modelos que satisfaçam os requisitos estruturais impostos pelo alinhamento e pelas coordenadas da estrutura-molde.

Os modelos obtidos foram refinados através de vários passos de minimização de energia, e as estruturas finais minimizadas foram avaliadas quanto à sua qualidade estereoquímica através do pacote de programas PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). A visualização e a manipulação das estruturas foram realizadas através da interface gráfica gerada pelo programa InsightII (Accelrys Inc.), instalado em uma estação gráfica Octane2 (Silicon Graphics Inc.), ou pelo programa WebLab Viewer (Accelrys Inc.), rodando em ambiente Windows.

Tabela 9 - Plasmídeos gerados com as clonagens.

n°	Plasmídeo	Plasmídeo molde na reação de PCR	Oligonucleotídeo sense	Oligonucleotídeo antisense	HBx (aa)	Sítios de restrição
1	pBS-KS/HBx(5-154)	pCMV-A Δ /HBx	X-GST-S	X-GST-AS	5-154	Bam HI e Eco RI
2	WW-X-1(1-154)	pCMV-A Δ /HBx	XWV-S1	XPWW-A	1-154	Hind III e Xba I
3	pET-28a(+)/HBx(1-154)	pCMV-A Δ /HBx	pET-X-S	pET-X-AS	1-154	Nde I e Xba I
4	pET-28a(+)/mini-HBx(19-142)	pBS-KS/HBx(5-154)	X-Mut-S	X-Mut-AS	19-142	Nde I e Bam HI
5	pET-28a(+)/mini-HBx(19-142)	pET28a/C26S-C61S-C115S-C137S	C69-S	C69-AS	19-142	Nde I e Bam HI
6	pET-44a(+)/HBx(1-154)	pET-28a(+)/HBx	PIC-X-S	PIC-X-AS	1-154	Eco RI e Not I
7	pGEX-2TK/HBx(5-154)	pCMV-A Δ /HBx	X-GST-S	X-GST-AS	5-154	Bam HI e Eco RI
8	pGEX-2TK/HBx(5-78)	pCMV-A Δ /HBx	X-GST-S	XWV-AS3	5-78	Bam HI e Eco RI
9	pGEX-2TK/HBx(80-142)	pCMV-A Δ /HBx	X-GST-S2	XWV-AS2	80-142	Bam HI e Eco RI
10	pBSV-8His/HBx(1-142)	WW-X-1	XV-S	XWV-AS2	1-142	Pst I e Xba I
11	pPIC9K/His-HBx(1-154)	pET-28a(+)/HBx	PIC9-His-X-S	PIC-X-AS	1-154	Eco RI e Not I
12	pPIC9K/His-mini-HBx(19-142)	pET-28a(+)/HBx	PIC9-His-miniX-S	PIC9-His-miniX-AS	19-142	Eco RI e Not I
13	pBTM116/HBx(1-154)	pET-28a(+)/HBx	PIC-X-S	pBTM-HBx-AS	1-154	Eco RI e Pst I
14	pOPRSVLMCS-HBx(1-154)	WW-X-1	XV-S	XPWW-A	1-154	Pst I e Xba I

*Expressão de proteína em :

- *E. coli*: plasmídeos 3 a 9;
- células de inseto Sf9: plasmídeo 10;
- leveduras *Pichia pastoris*: plasmídeos 11 e 12;
- leveduras *S. cerevisiae*: plasmídeo 13.

4. RESULTADOS

4.1 Construção dos plasmídeos

O cDNA codificador para a proteína HBx completa (Figura 9) inserido no plasmídeo pCMV-Ad/HBx (subtipo *ayw*) foi amplificado por PCR na presença de pares de oligonucleotídeos de DNA *sense* e *antisense* (Tabela 4), originando várias deleções da proteína HBx que foram subclonadas em diferentes plasmídeos (Tabela 2). A confirmação da presença dos fragmentos de DNA foi feita através da digestão dos plasmídeos (Tabela 9) com as enzimas de restrição apropriadas, e através do seqüenciamento utilizando-se os pares de oligonucleotídeos apropriados (Tabela 6).

M	A	A	R	L	C	C	Q	L	D	
ATG	GCT	GCT	AGG	TTG	TGC	TGC	CAA	CTG	GAT	10
P	A	R	V	V	L	C	L	R	P	
CCT	GCG	CGG	GTC	GTC	CTT	TGT	TTA	CGT	CCC	20
V	G	A	E	S	C	G	R	P	F	
GTC	GGC	GCT	GAA	TCC	TGC	GGA	CGA	CCC	TTC	30
S	G	S	L	G	T	L	S	S	P	
TCG	GGG	TCG	CTT	GGG	ACT	CTC	TCG	TCC	CCT	40
S	P	S	A	V	P	T	D	H	G	
TCT	CCG	TCT	GCC	GTT	CCG	ACC	GAC	CAC	GGG	50
A	H	L	S	L	R	G	L	P	V	
GCG	CAC	CTC	TCT	TTA	CGC	GGA	CTC	CCC	GTC	60
C	A	F	S	S	A	G	P	C	A	
TGT	GCC	TTC	TCA	TCT	GCC	GGA	CCG	TGT	GCA	70
L	R	F	T	S	A	R	R	M	E	
CTT	CGC	TTC	ACC	TCT	GCA	CGT	CGC	ATG	GAG	80
T	T	V	N	A	H	R	M	L	P	
ACC	ACC	GTG	AAC	GCC	CAC	CGA	ATG	TTG	CCC	90
K	V	L	H	K	R	T	L	G	L	
AAG	GTC	TTA	CAT	AAG	AGG	ACT	CTT	GGA	CTC	100
S	A	M	S	T	T	D	L	E	A	
TCT	GCA	ATG	TCA	ACG	ACC	GAC	CTT	GAG	GCA	110
Y	F	K	D	C	L	F	K	D	W	
TAC	TTC	AAA	GAC	TGT	TTG	TTT	AAA	GAC	TGG	120
E	E	L	G	E	E	I	R	L	K	
GAG	GAG	TTG	GGG	GAG	GAG	ATT	AGA	TTA	AAG	130
V	F	V	L	G	G	C	R	H	K	
GTC	TTT	GTA	CTA	GGA	GGC	TGT	AGG	CAT	AAA	140
L	V	C	A	P	A	P	C	N	F	
TTG	GTC	TGC	GCA	CCA	GCA	CCA	TGC	AAC	TTT	150
F	T	S	A	Stop						
TTC	ACC	TCT	GCC	TAA						154

Figura 9 - Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína HBx completa (subtipo HBV *ayw*). A proteína HBx possui 154 resíduos de aminoácidos e peso molecular estimado de ~17 kDa (Galibert *et al.*, 1979).

A proteína HBx completa possui 10 resíduos de cisteína (Cys6, Cys7, Cys17, Cys26, Cys61, Cys69, Cys115, Cys137, Cys143, Cys148) em sua estrutura primária. Com a remoção dos 18 primeiros e os 12 últimos resíduos de aminoácidos da proteína completa, originou-se a deleção mini-HBx(19-142), que possui apenas 5 resíduos de cisteína (Cys26, Cys61, Cys69, Cys115 e Cys137) (Figura 10).

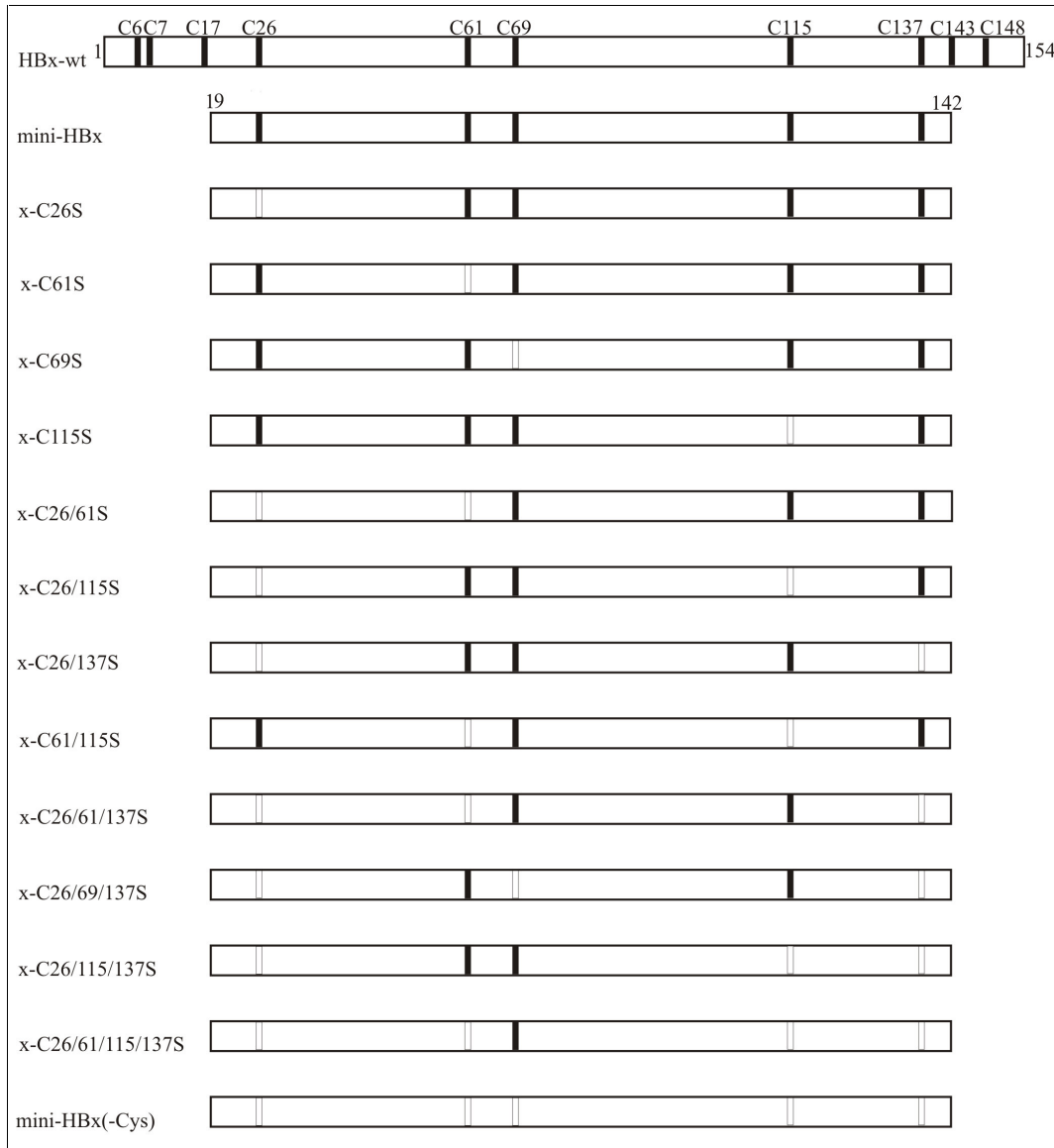


Figura 10 - Representação esquemática das proteínas HBx(1-154), mini-HBx(19-142) e dos 13 mutantes Cys/Ser mini-HBx(19-142). Os resíduos de cisteína estão marcados em caixas pretas e os resíduos de serina estão marcados em caixas vazadas.

Através de mutação sítio-dirigida, os cinco resíduos de cisteína da deleção mini-HBx(19-142) foram alterados para resíduos de serina, individualmente, em duplas ou em trios, gerando 13 mutantes Cys/Ser mini-HBx(19-142) (Figura 10). No caso do mutante mini-HBx(-Cys)(19-142), todos os 5 resíduos de cisteína foram alterados para resíduos de serina. Os genes codificadores para as 15 construções apresentadas na figura 10 foram subclonados no plasmídeo pET-28a(+) para a expressão das proteínas em *E. coli*.

Para a expressão de proteína HBx em células de inseto *Sf9*, através do sistema de Baculovírus, construiu-se o plasmídeo pBSV-8His/HBx(1-142) a partir do plasmídeo WW-X-1 (Tabela 9). No caso da expressão em *P. pastoris*, os plasmídeos pPIC9K contendo as seqüências codificadoras para as proteínas 6xHis-HBx(1-154) e 6xHis-mini-HBx(19-142) foram utilizados para a transformação das leveduras (linhagem KM71).

Para os ensaios de ativação de gene repórter, em sistema de mono-híbrido em levedura *S. cerevisiae* (linhagem W303), utilizou-se os plasmídeos pBTM116/HBx(1-154) (Tabela 9), pBTM116/mini-HBx(19-142) e pBTM116/mini-HBx(-Cys)(19-142). Estes dois últimos foram construídos através da subclonagem dos fragmentos de DNA oriundos dos plasmídeos pET-28a(+)/mini-HBx(19-142) e pET-28a(+)/mini-HBx(-Cys)(19-142) (Tabela 9) digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Bam* HI.

O plasmídeo pOPRSVI/MCS-HBx(1-154) (Tabela 9) foi digerido com as enzimas de restrição *Kpn* I e *Xba* I, e o fragmento de DNA foi subclonado no plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+), originando o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154). Este último foi utilizado para a transfecção de células humanas HeLa, para os estudos funcionais *in vivo* da proteína HBx.

4.2 Expressão, purificação e renaturação das proteínas HBx

As proteínas HBx foram expressas em *E. coli* linhagem BL21 (DE3), de acordo com o procedimento de indução descrito em material e métodos. Os plasmídeos pET-28a(+) e pET-44a(+) foram utilizados para a expressão de proteína em fusão com a cauda de poli-histidina (item 4.2.1), enquanto que o plasmídeo pGEX-2TK foi utilizado para a expressão de proteína em fusão com a proteína glutationa-S-transferase (GST) (item 4.2.2).

4.2.1 Proteínas em fusão com a cauda de poli-histidina

E. coli BL21 (DE3) transformadas com os plasmídeos pET-28a(+)/HBx(1-154), pET-28a(+)/mini-HBx(19-142) e pET-28a(+)/mini-HBx(-Cys)(19-142) (Tabela 9) foram induzidas com IPTG, em diferentes tempos e temperaturas (Tabela 10). As proteínas expressas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) contêm 20 resíduos de aminoácidos adicionais em fusão com as suas extremidades N-terminais, que incluem seis resíduos de histidina (6xHis) e um sítio de clivagem para trombina.

Tabela 10 - Condições de indução da expressão em *E. coli* das proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina.

Proteína de fusão	HBx (aa)	PM	Temperatura de indução	[IPTG]	Tempo de indução
6xHis-HBx (1-154)	1-154	~18 kDa	25 °C	0,1 mM	1-4 h
			37 °C	0,1 mM	1-4 h
			37 °C	1 mM	1-4 h
6xHis-mini-HBx (19-142)	19-142	~15,6 kDa	37 °C	0,1 mM	1-4 h
			37 °C	1 mM	1-4 h
6xHis-mini-HBx(-Cys) (19-142)	19-142	~15,5 kDa	37 °C	1 mM	1-4 h

A indução da expressão das proteínas de fusão foi acompanhada por SDS-PAGE, e observou-se que as proteínas 6xHis-HBx (~18 kDa), 6xHis-mini-HBx (~15,6 kDa) e 6xHis-mini-HBx(-Cys) (~15,5 kDa) foram expressas em maior quantidade a 37 °C, com 1 mM de IPTG, por um período de 4 horas. Entretanto, após a separação das frações solúveis e insolúveis do lisado bacteriano, as proteínas em fusão com a cauda de poli-histidina foram encontradas apenas na fração insolúvel, na forma de corpos de inclusão (Figura 11), independentemente das condições de indução testadas.

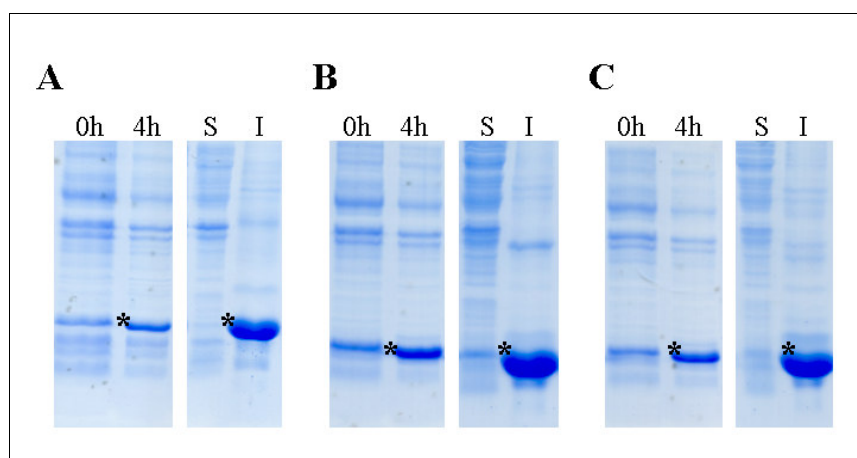


Figura 11 - Análise da expressão a 37 °C em *E. coli* das proteínas 6xHis-HBx(1-154) (A), 6xHis-mini-HBx(19-142) (B) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) (C) por SDS-PAGE 12,5%. Canaleta 0h, lisado de bactérias antes da indução; canaleta 4h, lisado de bactérias induzidas com 1 mM de IPTG por 4 horas; canaleta S, frações solúveis do lisado bacteriano; canaleta I, frações insolúveis do lisado bacteriano. As proteínas 6xHis-HBx (~18 kDa), 6xHis-mini-HBx (~15,6 kDa) e 6xHis-mini-HBx(-Cys) (~15,5 kDa) estão indicadas por asteriscos (*) na figura, e foram encontradas predominantemente na fração insolúvel do lisado bacteriano.

Após a lise bacteriana, os corpos de inclusão foram isolados e purificados, utilizando um protocolo desenvolvido neste trabalho (item 3.3.1.3), com o objetivo de aumentar a eficiência da purificação das proteínas HBx em fusão com a cauda de polihistidina, e evitar a co-purificação com outras proteínas de *E. coli*.

Desta forma, as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) foram extraídas dos corpos de inclusão purificados com uma solução contendo uréia 8 M, antes de serem purificadas por cromatografia de afinidade em *Ni-NTA* sob condições desnaturantes. A purificação prévia dos corpos de inclusão, seguida da purificação por cromatografia de afinidade forneceu proteína 6xHis-HBx(1-154) em maior grau de pureza, livre de contaminantes (Figura 12).

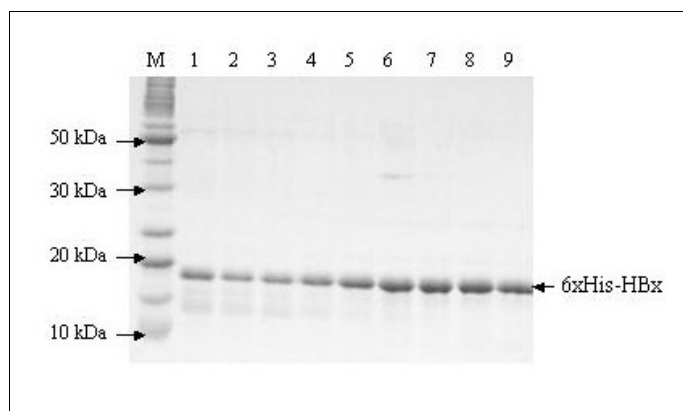


Figura 12 - Análise da expressão da proteína 6xHis-HBx(1-154) em *E. coli* por SDS-PAGE 12,5%. Após a purificação dos corpos de inclusão, a proteína 6xHis-HBx(1-154) foi extraída dos mesmos com uma solução contendo uréia 8 M e, em seguida, purificada por cromatografia de afinidade de *Ni-NTA* sob condições desnaturantes. Alíquotas de 10 μ L das frações da purificação foram dissolvidas em 10 μ L de tampão de amostra de SDS e aplicadas no gel. Canaleta M, marcador de peso molecular; canaletas 1 a 9, frações 1 a 9 da purificação da proteína 6xHis-HBx(1-154).

As proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina foram separadas em SDS-PAGE 12,5% e transferidas para membranas de PVDF, que foram incubadas com o anticorpo primário *anti*-penta-His ou com o *anti*-soro *anti*-HBx. O *Western blot anti*-His (Figura 13A) e *anti*-HBx (Figura 13B) das proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) mostrou que é possível detectar as três proteínas de fusão com o *anti*-soro *anti*-HBx produzido através da imunização de coelho com a proteína HBx expressa em *E. coli*.

Em seguida, as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) purificadas sob condições desnaturantes foram dialisadas contra diferentes tampões (Tabela 8). As três proteínas renaturadas em diferentes tampões foram utilizadas nos ensaios de interação proteína-RNA (item 4.3), interação proteína-proteína (item 4.4) e nos ensaios espectroscópicos de dicroísmo circular (item 4.9), emissão intrínseca de fluorescência (item 4.10) e de ressonância magnética nuclear (item 4.11).

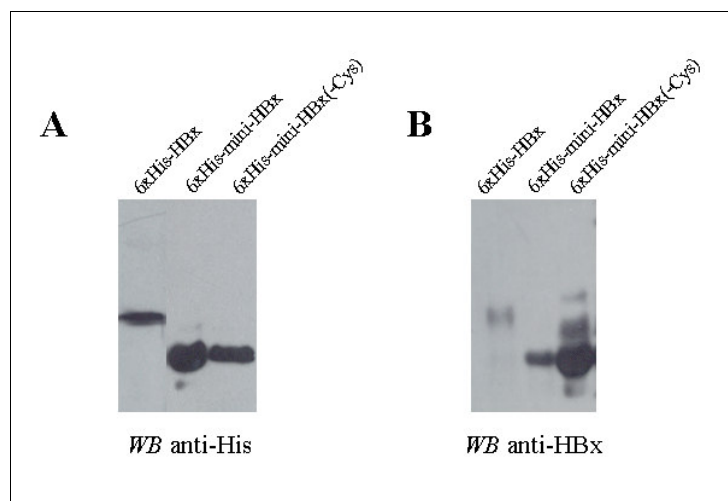


Figura 13 - *Western blot anti-His (A) e anti-HBx (B)* das proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142). Cerca de 2 µg das proteínas de fusão foram aplicados em SDS-PAGE 12,5%, e este foi transferido para as membranas de PVDF. Após a incubação das membranas com o anticorpo primário *anti-penta-His* ou com o *anti-soro anti-HBx*, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários e reveladas com o *Western Blotting Luminol Reagent*.

Os outros mutantes Cys/Ser mini-HBx(19-142) produzidos por mutagênese sítio-dirigida (Figura 10) também foram expressos na forma de corpos de inclusão em *E. coli* em fusão com a cauda de poli-histidina, e foram purificados por cromatografia de afinidade em *Ni-NTA* sob condições desnaturantes. As proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e as 13 proteínas mutantes Cys/Ser 6xHis-mini-HBx(19-142) purificadas foram visualizadas em SDS-PAGE na presença (Figura 14A) e na ausência (Figura 14B) de 2-mercaptoetanol.

Na presença de 2-mercaptoetanol (Figura 14A), todas as proteínas foram observadas na forma monomérica, enquanto que na ausência do meio redutor (Figura 14B) as proteínas apareceram como dímeros e/ou trímeros e/ou oligômeros, devido à formação de pontes de dissulfeto intermoleculares. Como era esperado, a proteína mutante 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) que não possui resíduos de cisteína, apresenta o mesmo padrão de migração eletroforético em SDS-PAGE na ausência (Figura 14B) e na presença de 2-mercaptoetanol (Figura 14A).

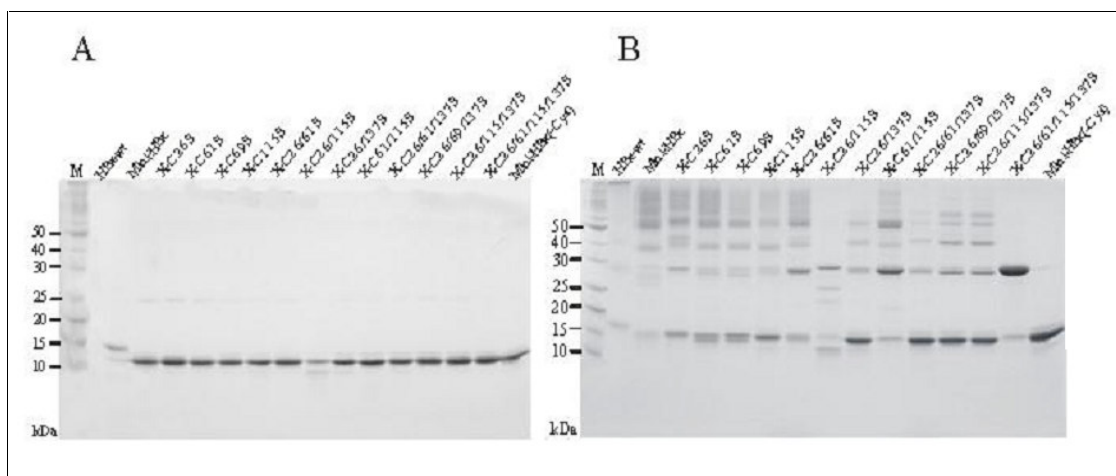


Figura 14 - Análise por SDS-PAGE das proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e mutantes Cys/Ser 6xHis-mini-HBx(19-142) sob condições redutoras (**A**) e não redutoras (**B**). As proteínas em fusão com a cauda de poli-histidina foram expressas em *E. coli* na forma de corpos de inclusão, e purificadas sob condições desnaturantes por cromatografia de afinidade em *Ni-NTA*. Alíquotas das proteínas purificadas foram dissolvidas em tampão de SDS contendo 5 % de 2-mercaptoetanol (**A**) ou não (**B**). Cerca de 1 µg de proteína foi carregado em cada canaleta do SDS-PAGE a 12,5%.

Na tentativa de aumentar a solubilidade da proteína HBx completa (1-154 aa), o seu cDNA foi subclonado no plasmídeo pET-44a(+), uma vez que este codifica para uma sequência de seis resíduos de histidina (6xHis) fusionada à proteína solúvel NusA (495 aa; 54,8 kDa). Dois clones foram selecionados para os testes de indução da expressão, uma vez que as digestões dos dois plasmídeos pET-44a(+)/HBx(1-154) com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I liberaram um fragmento de ~500 pb, coerente com o tamanho esperado (Tabela 9).

E. coli BL21 (DE3) transformadas com os plasmídeos pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 1 e pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 2 foram induzidas com 0,5 mM de IPTG, em diferentes temperaturas (20 °C, 25 °C, 30 °C e 37 °C), por 4 horas (Figura 15A). O SDS-PAGE da indução desses clones mostrou que somente o plasmídeo pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 1 induziu a proteína de fusão com o tamanho ao redor de ~85 kDa (Figura 15A), que corresponde ao peso molecular esperado para a proteína de fusão 6xHis-NusA-HBx(1-154) (bandas indicadas por asteriscos na figura). No caso do plasmídeo pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 2, que apresentou bandas de indução em torno de ~70 kDa,

houve a indução da proteína 6xHis-NusA sem a fusão com a proteína HBx, sugerindo que a quadro de leitura poderia estar fora de fase no sítio de fusão entre o gene de NusA e o de HBx.

Reduzindo a concentração de IPTG, e variando o tempo de indução de pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 1, observou-se que a proteína de fusão 6xHis-NusA-HBx(1-154) foi expressa em maior quantidade a 20 °C com 0,1 mM de IPTG por 6 horas, e com 0,5 mM de IPTG, por um período de 4 horas, independentemente da temperatura de indução (20 °C ou 25 °C) (Figura 15B).

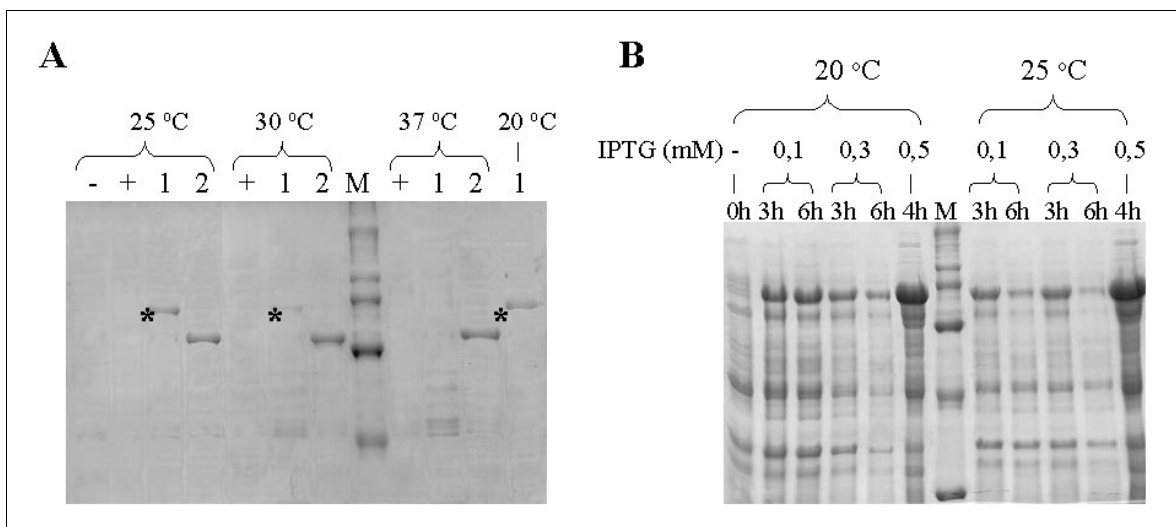


Figura 15 - Análise da indução da expressão da proteína 6xHis-NusA-HBx(1-154) em *E. coli* em diferentes temperaturas. **A)** SDS-PAGE 10% da indução de pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 1 e pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 2 com 0,5 mM de IPTG por 4 horas. Alíquotas de 1 mL da indução foram dissolvidas em 100 µL de tampão de amostra de SDS e apenas 4 µL foram aplicados em cada canaleta. Canaleta -, pET-44a(+) não induzido; canaleta +, pET-44a(+) induzido; canaleta 1, pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 1 induzido; canaleta 2, pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 2 induzido; M, marcador de peso molecular (45, 66, 97, 116 e 205 kDa). As diferentes temperaturas de indução estão indicadas na parte superior da figura. As bandas relativas à proteína 6xHis-NusA-HBx(1-154) induzida estão assinaladas por asteriscos (*). **B)** SDS-PAGE 10% da indução de pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 1 em diferentes tempos, concentração de IPTG e temperatura. Alíquotas de 1 mL da indução foram dissolvidas em 100 µL de tampão de amostra de SDS e apenas 4 µL foram aplicados em cada canaleta. Em cada canaleta está indicado o tempo de indução, enquanto que a concentração de IPTG e as diferentes temperaturas de indução estão indicadas na parte superior da figura. M, marcador de peso molecular (45, 66, 97, 116 e 205 kDa).

Após a lise das células, separação das frações solúveis e insolúveis da indução de pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 1 com 0,5 mM de IPTG por 4 horas, a proteína de fusão 6xHis-NusA-HBx(1-154) ainda foi encontrada predominantemente na fração insolúvel do lisado bacteriano, independentemente da temperatura de indução (Figura 16A). Em concordância, o *Western blot anti-His* (Figura 16B) e o *Western blot anti-HBx* (Figura 16C) das frações solúveis e insolúveis da indução a 25 °C com 0,5 mM de IPTG por 4 horas, também mostraram que a proteína 6xHis-NusA-HBx(1-154) encontrava-se na fração insolúvel.

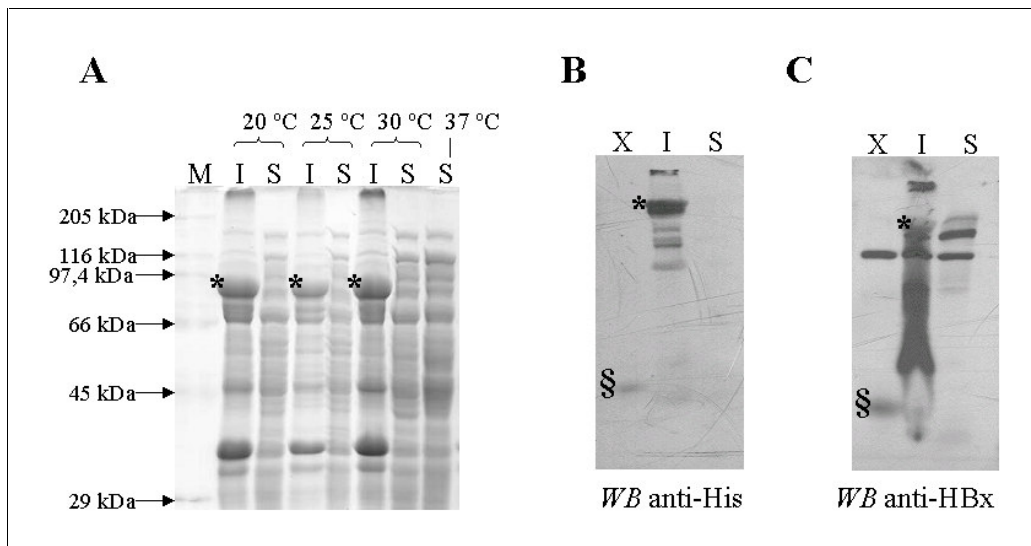


Figura 16 - Análise da expressão da proteína 6xHis-NusA-HBx(1-154) em *E. coli*. **A)** SDS-PAGE 10 % das frações insolúveis (I) e solúveis (S) da indução de pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 1 com 0,5 mM de IPTG por 4 horas, em diferentes temperaturas. M, marcador de peso molecular. Cerca de 8 µL foram aplicados em cada canaleta. As diferentes temperaturas de indução estão indicadas na parte superior da figura. A proteína de fusão 6xHis-NusA-HBx(1-154) possui ~85 kDa, é encontrada predominantemente na fração insolúvel do lisado bacteriano, e está indicada por asteriscos (*). *Western blot anti-His* (**B**) e *anti-HBx* (**C**) das frações insolúveis (I) e solúveis (S) da indução de pET-44a(+)/HBx(1-154) clone 1 a 25 °C, 0,5 mM de IPTG por 4 horas. Cerca de 8 µL foram aplicados em cada canaleta. Canaleta X, proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) (15,6 kDa) está indicada por §. A proteína 6xHis-NusA-HBx(1-154) (~85 kDa) está indicada por asteriscos (*).

4.2.2 Proteínas de fusão com a proteína GST

Com o intuito de obter proteína HBx na fração solúvel do lisado bacteriano, as deleções HBx(5-154), HBx(5-78) e HBx(80-142) foram fusionadas à proteína GST (~26 kDa) (Figura 17).

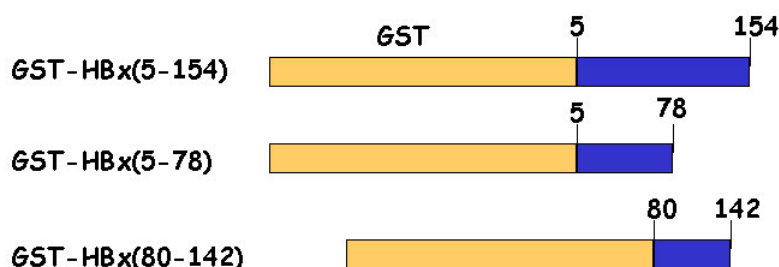


Figura 17 - Representação esquemática das proteínas de fusão GST-HBx(5-154), GST-HBx(5-78) e GST-HBx(80-142).

E. coli BL21 (DE3) transformadas com os plasmídeos pGEX-2TK, pGEX-2TK/HBx(5-154), pGEX-2TK/HBx(5-78) e pGEX-2TK/HBx(80-142) (Tabela 9) foram induzidas com IPTG em diferentes temperaturas (Tabela 11). Utilizou-se o plasmídeo pGEX-2TK como controle da indução. O SDS-PAGE da indução indicou que as três proteínas HBx em fusão com GST foram expressas em *E. coli* (Figura 18), assim como a proteína GST (dados não mostrados).

Tabela 11 - Condições de expressão em *E. coli* da proteína GST e das proteínas HBx fusionadas à proteína GST.

Proteína	HBx (aa)	PM	Temperatura	[IPTG]	Tempo de indução	Solubilidade
GST	-	25,7 kDa	37 °C	1 mM	3 h	solúvel
GST-HBx (5-154)	5-154	41,7 kDa	25 °C	0,1 mM	6-14 h	insolúvel
			25 °C	0,1 mM	1-4 h	solúvel
			37 °C	1 mM	1-4 h	insolúvel
GST-HBx (5-78)	5-78	33,2 kDa	25 °C	0,1 mM	1-4 h	solúvel
			25 °C	0,1 mM	6-14 h	solúvel
			37 °C	1 mM	1-4 h	solúvel
GST-HBx (80-142)	80-142	32,9kDa	25 °C	1 mM	1-4 h	solúvel
			37 °C	1 mM	1-4 h	solúvel

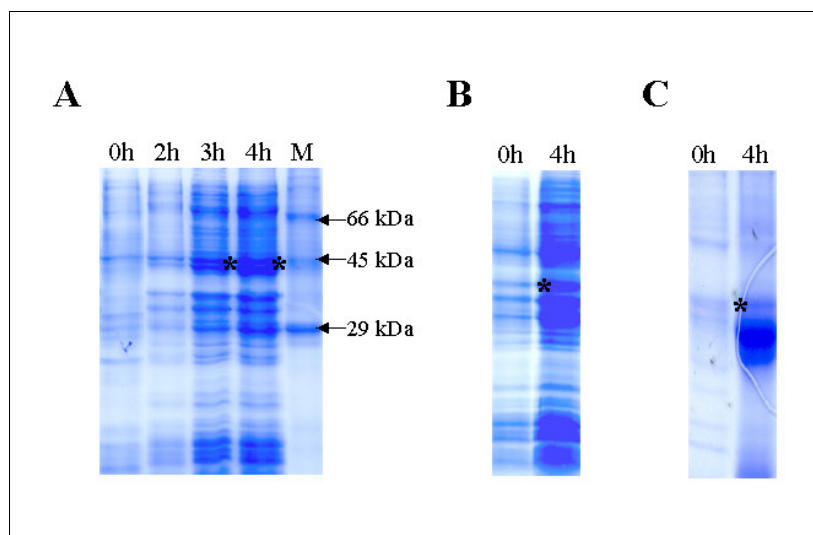


Figura 18 - Análise da expressão a 25 °C das proteínas de fusão GST-HBx(5-154) (A), GST-HBx(5-78) (B) e GST-HBx(80-142) (C) em *E. coli* através de SDS-PAGE 12,5%. Canaleta 0h, lisado de bactérias antes da indução; canaletas 2h, 3h e 4h, tempos de 2, 3 e 4 horas de indução; M, marcador de peso molecular. As bandas relativas às proteínas estão indicadas por asteriscos (*).

Depois da lise bacteriana pela técnica do congelamento e descongelamento rápido, as frações solúveis e insolúveis foram separadas, e observou-se que as proteínas GST, GST-HBx(5-78) e GST-HBx(80-142) foram expressas em grande quantidade na fração solúvel, independentemente das condições de indução (Tabela 11). No caso da proteína GST-HBx(5-154), somente com a redução da temperatura e do tempo de indução, associada a uma diminuição da concentração de IPTG, foi possível obter proteína na fração solúvel do lisado bacteriano, o que foi confirmado pelo *Western blot anti-GST* (Figura 19A). Outras condições de indução testadas não forneceram proteína GST-HBx(5-154) na fração solúvel (Tabela 11).

As frações solúveis do lisado bacteriano foram filtradas e purificadas em coluna de afinidade em *glutathione sepharose* 4B, como descrito em material e métodos. Aliquotas de 10 µL das proteínas purificadas GST, GST-HBx(5-78), GST-HBx(80-142) e GST-HBx(5-154) foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 19B) e o *Western blot anti-HBx* (Figura 19C) mostrou que o *anti-soro anti-HBx* é específico para a proteína HBx, pois não reconheceu a proteína GST (Figura 19C, canaleta 1). As proteínas purificadas

GST, GST-HBx(5-78), GST-HBx(80-142) e GST-HBx(5-154) foram utilizadas nos ensaios de interação com os oligonucleotídeos de RNA (item 4.3).

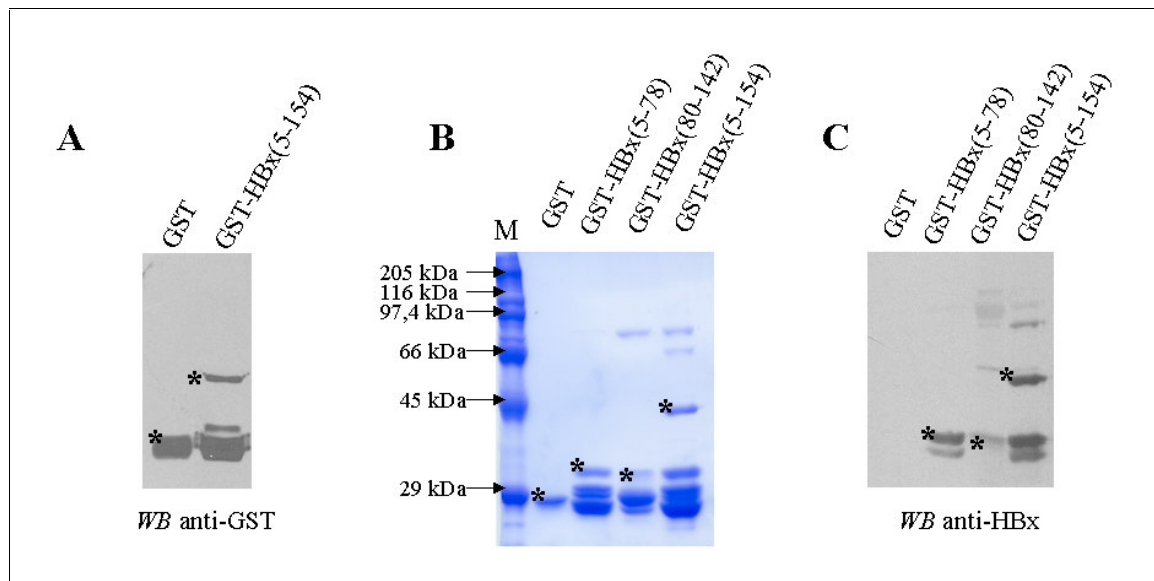


Figura 19 - Análise da expressão das proteínas GST e GST-HBx em *E. coli*. **A)** *Western blot anti-GST* da fração solúvel da expressão das proteínas GST e GST-HBx(5-154). As bandas relativas às proteínas estão indicadas por asteriscos (*). **B)** SDS-PAGE 10% das proteínas GST (25,7 kDa), GST-HBx(5-78) (33,2 kDa), GST-HBx(80-142) (32,9 kDa) e GST-HBx(5-154) (41,7 kDa) purificadas da fração solúvel por cromatografia de afinidade. As bandas relativas às proteínas purificadas estão indicadas por asteriscos (*). Observou-se a co-purificação das proteínas GST-HBx com a proteína GST em todas as canaletas. M, marcador de peso molecular. Cerca de 5 µL de proteína foram aplicados em cada canaleta. **C)** *Western blot anti-HBx* das proteínas GST, GST-HBx(5-78), GST-HBx(80-142) e GST-HBx(5-154) purificadas, mostrando que o *anti-soro anti-HBx* é específico para as proteínas GST-HBx. As bandas relativas às proteínas purificadas estão indicadas por asteriscos (*).

E. coli BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pGEX-p53(1-393) foram induzidas com 1 mM de IPTG a 37 °C por 3 horas (Figura 20A), e a proteína GST-p53(1-393) (~80 kDa) foi purificada da fração solúvel do lisado bacteriano por cromatografia de afinidade em *glutathione sepharose* 4B (Figura 20A, canaleta 3), como descrito em material e métodos.

O *Western blot anti-GST* da proteína GST-p53(1-393) purificada (Figura 20B, canaleta 3) mostrou que não ocorreu a co-purificação das proteínas GST (25,7 kDa) e

GST-p53(1-393) (~80 kDa), diferentemente do que foi observado para as proteínas HBx em fusão com GST (Figura 19B). As proteínas GST e GST-p53(1-393) foram utilizadas nos ensaios de interação proteína-proteína (item 4.4).

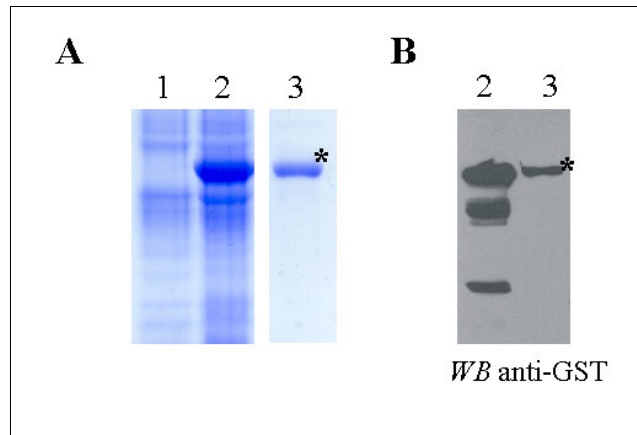


Figura 20 - Análise por SDS-PAGE 12,5% (A) e *Western blot anti-GST* (B) da expressão da proteína de fusão GST-p53(1-393) em *E. coli*. Canaleta 1, lisado de bactérias antes da indução; canaleta 2, lisado de bactérias induzidas com 1 mM IPTG por 3 horas a 37 °C; canaleta 3, proteína GST-p53(1-393) purificada da fração solúvel do lisado bacteriano por cromatografia de afinidade em *glutathione sepharose* 4B. A banda relativa à proteína GST-p53(1-393) (~80 kDa) está indicada por asteriscos (*).

4.3 Mapeamento da interação da proteína HBx com oligonucleotídeos de RNA

Para mapear a região de interação da proteína HBx com os diferentes oligonucleotídeos de RNA (Tabela 7), foram realizados experimentos de retardamento da mobilidade eletroforética (*EMSA*) e de *UV cross-linking* utilizando os oligonucleotídeos de RNA marcados com o radioisótopo ^{32}P . Nos experimentos de *EMSA*, quando ocorre uma interação entre a proteína HBx e o oligonucleotídeo de RNA marcado radioativamente (sonda radioativa), observa-se um retardamento da mobilidade eletroforética do complexo RNA-proteína HBx no gel não desnaturante, quando comparado com a sonda radioativa livre.

Com o intuito de verificar se a proteína de fusão GST-HBx(80-142) é capaz de interagir com os diferentes oligonucleotídeos de RNA (Tabela 7), e se existe alguma

especificidade de ligação da proteína com o oligonucleotídeo de RNA, foram realizados vários experimentos de *EMSA* que foram agrupados na figura 21.

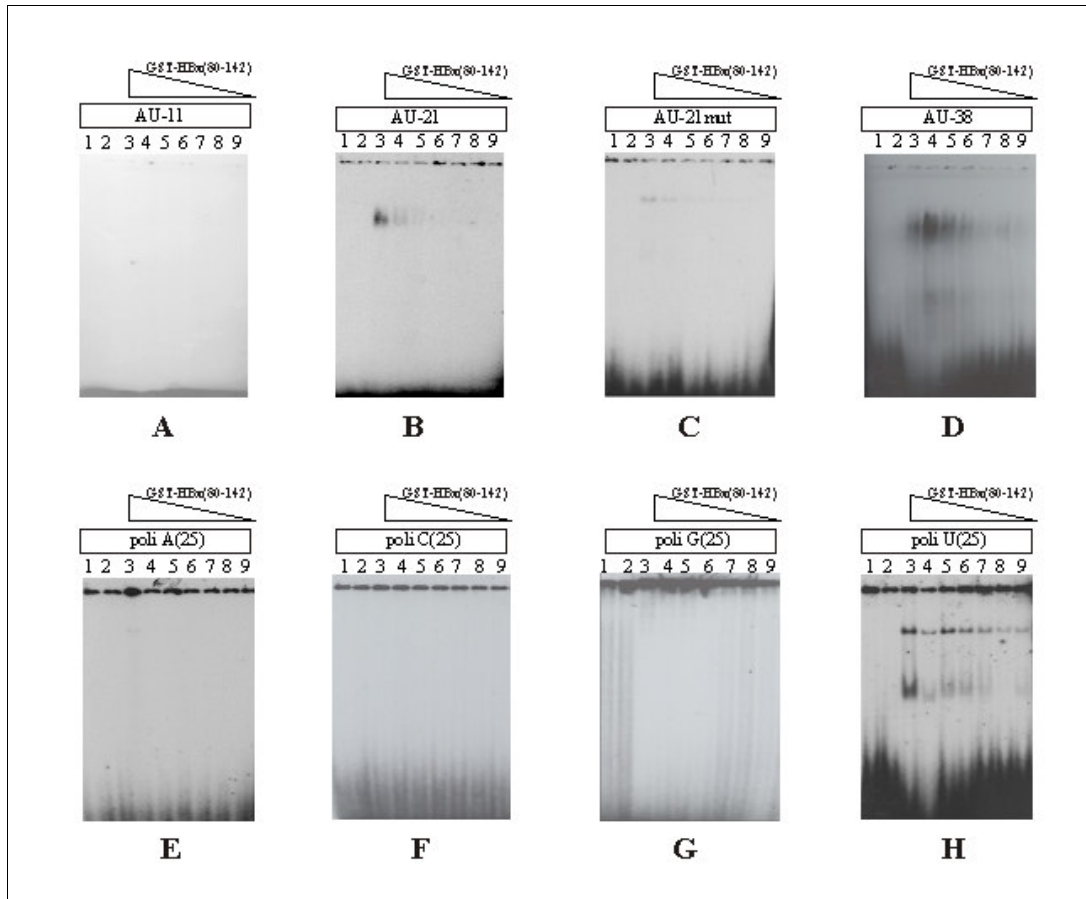


Figura 21 - Análise das interações entre a proteína GST-HBx(80-142) e os diferentes oligonucleotídeos de RNA através de *EMSA*. **A)** AU-11; **B)** AU-21; **C)** AU-21mut; **D)** AU-38; **E)** poli A(25); **F)** poli C(25); **G)** poli G(25); **H)** poli U(25). As proteínas GST e GST-HBx (80-142) foram incubadas com os oligonucleotídeos de RNA marcados com ^{32}P , e os complexos foram resolvidos em gel de TBE 6% acrilamida não desnaturante. Canaleta 1, sonda radioativa livre (30 fmol); canaleta 2, sonda radioativa (30 fmol) + proteína GST (1 μg ; 39 pmol); canaletas 3 a 9, sonda radioativa (30 fmol) + proteína GST-HBx(80-142) nas concentrações decrescentes : 0,5 μg ; 0,25 μg ; 125 ng; 62,5 ng; 50 ng; 25 ng (15; 7,5; 3,8; 1,9; 1,5; 0,8 pmol, respectivamente).

Nas figuras 21A, 21F e 21G não foram observadas bandas relativas à interação da proteína GST-HBx(80-142) com os oligonucleotídeos de RNA AU-11, poli C(25) e poli

G(25), respectivamente, mas os oligonucleotídeos de RNA AU-21 e AU-21mut formaram complexos com a proteína de fusão GST-HBx(80-142) (Figuras 21B e 21C). No entanto, os oligonucleotídeos de RNA AU-38 e poli U(25) formaram complexos com maior especificidade pela proteína GST-HBx(80-142), uma vez que foram observadas duas bandas em cada canaleta do gel. As bandas duplicadas poderiam ser o resultado da formação de um dímero da proteína GST-HBx(80-142) com os oligonucleotídeos de RNA AU-38 (Figura 21D) e poli U(25) (Figura 21H).

A diferença na especificidade de interação entre a proteína GST-HBx(80-142) e os oligonucleotídeos de RNA pareceu estar associada ao tamanho do oligonucleotídeo de RNA, uma vez que AU-11 não formou um complexo com a proteína (Figura 21A), enquanto que AU-21, AU-21mut, AU-38 e poli U(25) interagiram com a proteína GST-HBx(80-142) (Figuras 21B, 21C, 21D e 21H, respectivamente). Este resultado poderia sugerir que um tamanho mínimo de 21-*mer* é necessário para a formação do complexo RNA-GST-HBx(80-142).

Comparando as afinidades relativas entre AU-21 e AU-21mut (Figuras 21B e 21C), observou-se que existe uma maior especificidade da proteína GST-HBx(80-142) pelo AU-21 do que pelo AU-21mut, que possui três tríades centrais “UUU” alteradas para “UAU” (Tabela 7). Como a proteína GST-HBx(80-142) apresentou uma maior especificidade pelo oligonucleotídeo de RNA poli U(25) (Figura 21H) do que pelo poli A(25) (Figura 21E), concluiu-se que bases “U” poderiam interagir mais fortemente com a proteína GST-HBx(80-142) do que bases “A”.

No caso dos oligonucleotídeos de RNA poli C(25), poli G(25) (Figuras 21F e 21G), não foram observadas interações entre a proteína GST-HBx(80-142) e os mesmos, de modo que bases “C” e “G” não foram capazes de formar complexos RNA-GST-HBx(80-142). A proteína GST (Figura 19B) foi utilizada como controle negativo nos experimentos de *EMSA*, uma vez que não foi capaz de interagir com os diferentes oligonucleotídeos de RNA (Figura 21, canaleta 2).

Com o intuito de investigar se haveria alguma diferença na interação das proteínas de fusão GST-HBx(5-78), GST-HBx(80-142) e GST-HBx(5-154) com os diferentes oligonucleotídeos de RNA (Tabela 7), foram realizados experimentos de *EMSA* com as três proteínas (Figura 22).

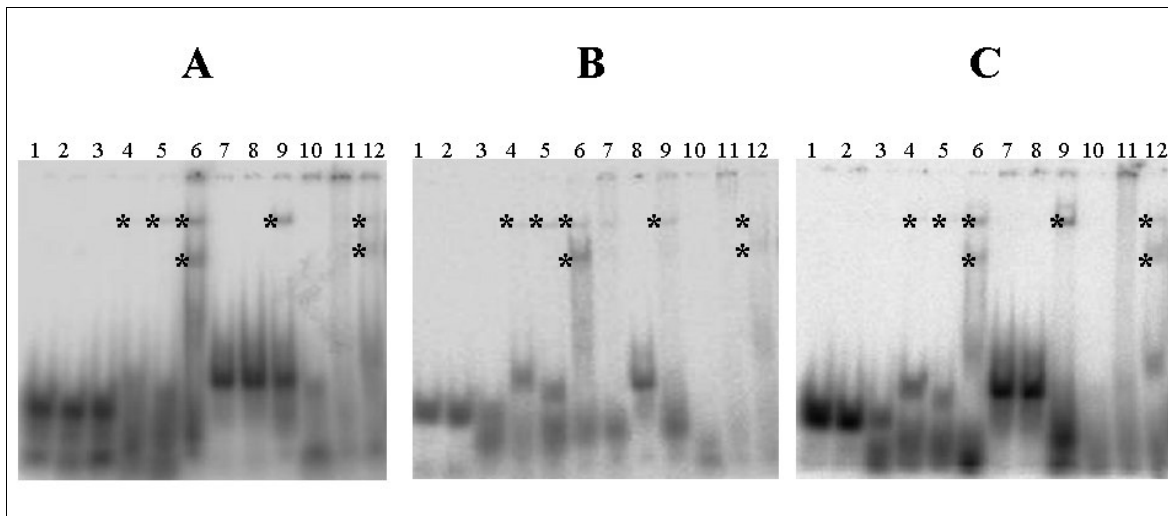


Figura 22 - Análise das interações entre as proteínas GST-HBx e os diferentes oligonucleotídeos de RNA através de *EMSA*. As proteínas GST-HBx(5-78) (**A**), GST-HBx(80-142) (**B**) e GST-HBx(5-154) (**C**) foram incubadas com os oligonucleotídeos de RNA marcados com ^{32}P , e os complexos foram resolvidos em gel de TBE 6% acrilamida não desnaturante. Proteínas (16,8 pmol por canaleta): canaletas 2 e 8, GST; canaletas 3 a 6 e 9 a 12, proteínas GST-HBx(5-78) (**A**), GST-HBx(80-142) (**B**) e GST-HBx(5-154) (**C**). Sondas radioativas (15 fmol por canaleta): canaletas 1 a 3, AU-11; canaleta 4, AU-21; canaleta 5, AU-21mut; canaleta 6, AU-38; canaletas 7 a 9, poli A(25); canaleta 10, poli C(25); canaleta 11, poli G(25); canaleta 12, poli U(25). Os complexos RNA-HBx estão indicados por asteriscos (*).

As três proteínas GST-HBx interagiram com os mesmos oligonucleotídeos de RNA ricos em bases “A”, “U” e “AU” : AU-21, AU-21mut, AU-38, poli A(25) e poli U(25) (Figura 22). Os complexos RNA-HBx estão indicados por asteriscos nas figuras 22A (GST-HBx(5-78)), 22B (GST-HBx(80-142)) e 22C (GST-HBx(5-154)). Duas bandas retardadas foram observadas apenas nos experimentos envolvendo os oligonucleotídeos de RNA AU-38 e poli U(25) (Figura 22, canaletas 6 e 12), de modo que um novo experimento de *EMSA* foi realizado para comparar a especificidade de ligação entre as proteínas GST-HBx com estes dois oligonucleotídeos de RNA (Figura 23).

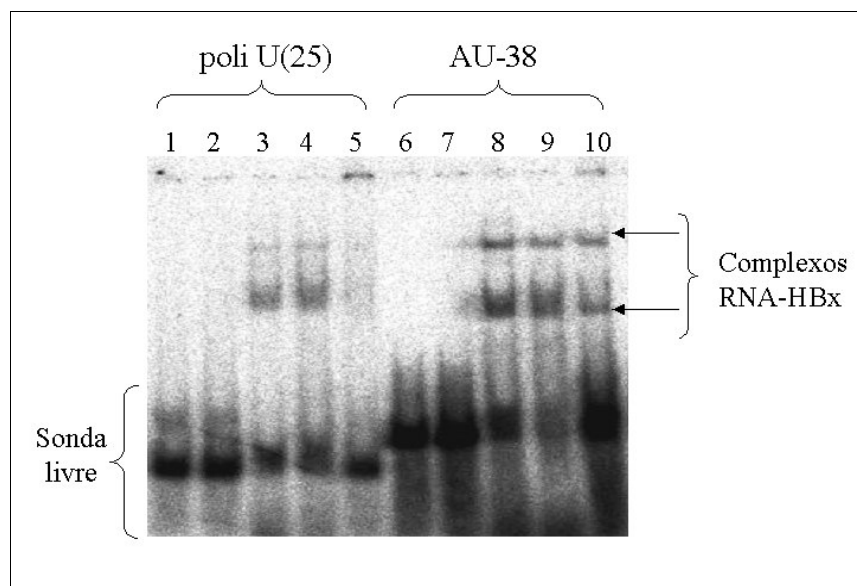


Figura 23 - Comparação da especificidade de ligação das proteínas GST-HBx aos oligonucleotídeos de RNA poli U(25) e AU-38 através de *EMSA*. As proteínas GST-HBx(5-78), GST-HBx(80-142) e GST-HBx(5-154) foram incubadas com os dois oligonucleotídeos de RNA marcados com ^{32}P e os complexos foram resolvidos em gel de TBE 6% acrilamida não desnaturante. Proteínas: canaletas 2 e 7, GST (18,2 pmol); canaletas 3 e 8, GST-HBx(5-78) (16,8 pmol); canaletas 4 e 9, GST-HBx(80-142) (16,8 pmol); canaletas 5 e 10, GST-HBx(5-154) (16,8 pmol). Sondas radioativas (15 fmol por canaleta): canaletas 1 a 5, poli U(25); canaletas 6 a 10, AU-38. Os complexos RNA-HBx estão indicados na figura, assim como a sonda livre.

Comparando-se os complexos RNA-HBx (Figura 23), observou-se que as três proteínas GST-HBx interagiram com os oligonucleotídeos de RNA poli U(25) e AU-38, mas as proteínas GST-HBx(5-78) e GST-HBx(80-142) apresentaram uma maior especificidade pelo oligonucleotídeo de RNA poli U(25) do que a proteína GST-HBx(5-154). Como as deleções N-terminal (GST-HBx(5-78)) e C-terminal (GST-HBx(80-142)) da proteína HBx (Figura 17) interagiram com os dois oligonucleotídeos, é possível que existam dois domínios de interação dos oligonucleotídeos poli U(25) e AU-38 com a proteína HBx.

Com o intuito de verificar a interação entre as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), com os diferentes oligonucleotídeos de RNA, experimentos de *UV cross-linking* foram realizados utilizando-se os oligonucleotídeos de RNA marcados com o radioisótopo ^{32}P . A técnica

de *UV cross-linking* é mais sensível e mais rápida do que os ensaios de *EMSA* realizados com as proteínas GST-HBx(5-78), GST-HBx(80-142) e GST-HBx(5-154) (Figura 22).

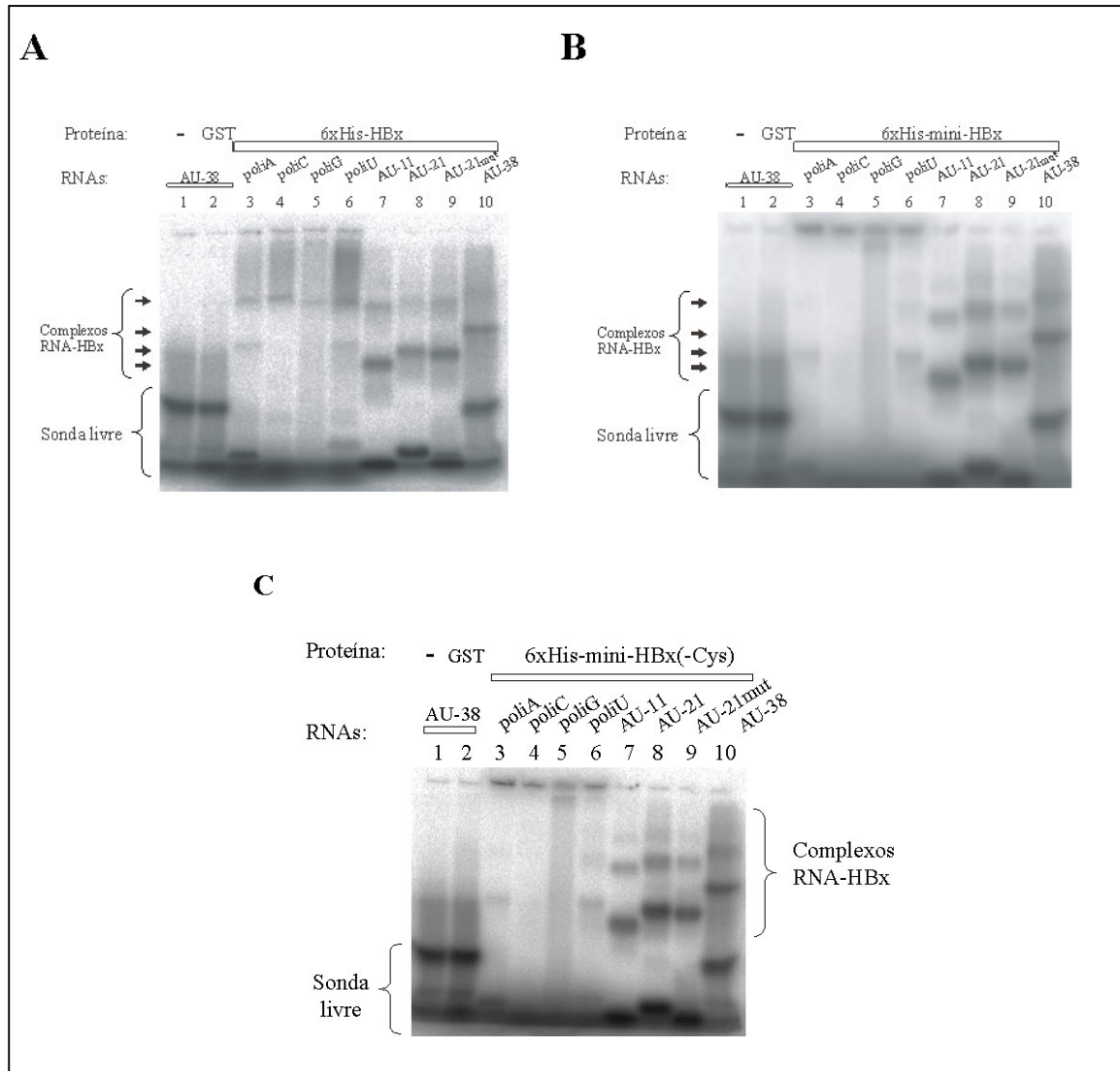


Figura 24 – Mapeamento da especificidade de ligação da proteína HBx aos oligonucleotídeos de RNA através de *UV cross-linking*. As proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154) (**A**), 6xHis-mini-HBx(19-142) (**B**) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) (**C**) foram incubadas com os diferentes oligonucleotídeos de RNA marcados com ^{32}P , e os complexos foram resolvidos em SDS-PAGE 12,5%. Proteínas : canaleta 2, GST (178 pmol); canaletas 3 a 10, 6xHis-HBx(1-154) (177 pmol por canaleta) (**A**); 6xHis-mini-HBx(19-142) (179 pmol por canaleta) (**B**); 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) (180 pmol por canaleta) (**C**). Sondas radioativas (24 fmol por canaleta): canaletas 1,2 e 10, AU-38; canaleta 3, poli A(25); canaleta 4, poli C(25); canaleta 5, poli G(25); canaleta 6, poli U(25); canaleta 7, AU-11; canaleta 8, AU-21; canaleta 9, AU-21mut. Os complexos RNA-HBx estão indicados nas figuras, assim como a sonda livre.

O experimento de *UV cross-linking* realizado com a proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) e os diferentes oligonucleotídeos de RNA mostrou que a proteína 6xHis-HBx(1-154) interagiu com todos os oligonucleotídeos de RNA (Figura 24A), enquanto que a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) interagiu com os oligonucleotídeos de RNA ricos em bases “AU” (AU-11, AU-21, AU-21mut e AU-38), e com os oligonucleotídeos poli A(25) e poli U(25) (Figura 24B).

No caso da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), observou-se que ocorreu uma interação com os oligonucleotídeos de RNA ricos em bases “A”, “U” e “AU” (Figura 24C), os mesmos que interagiram com a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) (Figura 24B). Este resultado poderia sugerir que os cinco resíduos de cisteína presentes na proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) não seriam importantes para a interação com os oligonucleotídeos poli A(25), poli U(25), AU-11, AU-21, AU-21mut e AU-38, uma vez que na proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) os cinco resíduos de cisteína foram alterados para resíduos de serina (Figura 10).

Para confirmar a hipótese de que os resíduos de cisteína da proteína HBx não seriam necessários para a sua interação com os oligonucleotídeos de RNA, um experimento de *UV cross-linking* foi realizado com o oligonucleotídeo de RNA AU-38 e as proteínas mutantes Cys/Ser 6xHis-mini-HBx(19-142) (Figura 25). As 12 proteínas mutantes Cys/Ser 6xHis-mini-HBx(19-142) foram expressas em *E. coli*, purificadas por cromatografia de afinidade em *Ni-NTA* sob condições desnaturantes (uréia 8 M), e renaturadas em tampão 10 mM Pipes pH 7,0 (tampão C, Tabela 8), como descrito para as outras proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina (item 4.2).

Na figura 25, observou-se que ocorreu a interação do oligonucleotídeo de RNA AU-38 com todas as proteínas HBx, independentemente da presença ou ausência dos resíduos de cisteína. Ocorreu a formação de bandas relativas aos complexos RNA-HBx em todas as canaletas do gel, exceto na canaleta contendo a proteína GST, que foi utilizada como um controle negativo do experimento de *UV cross-linking* (Figura 25, canaleta 2). Este resultado confirmou o fato de que os resíduos de cisteína da proteína HBx não foram necessários para a sua interação com o oligonucleotídeo de RNA AU-38.

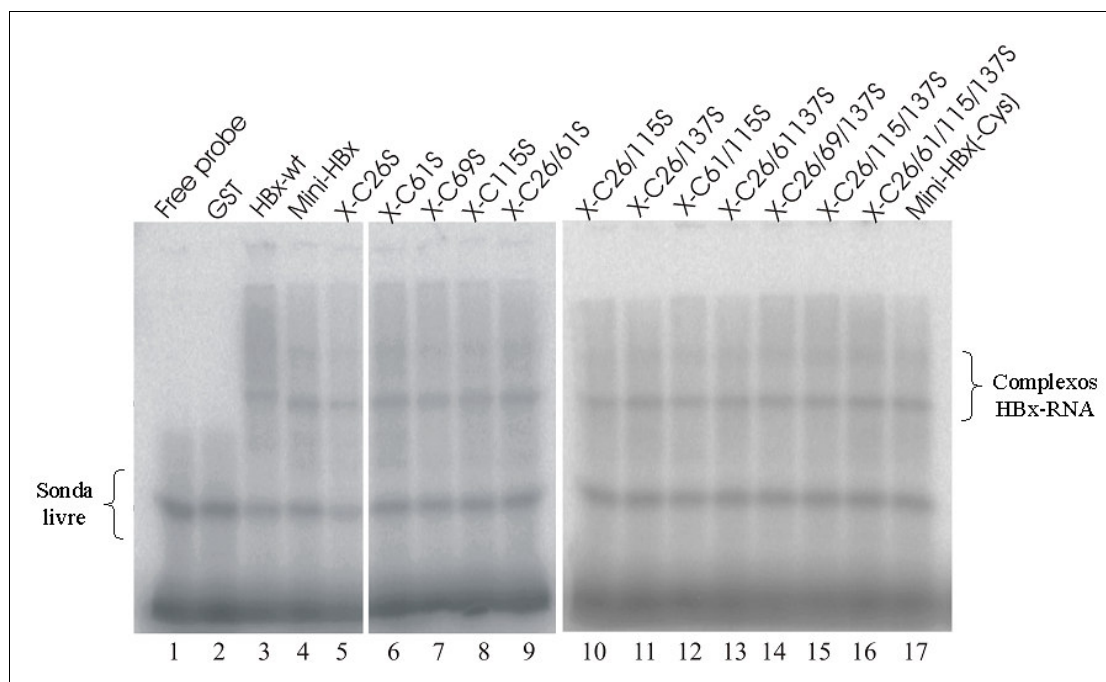


Figura 25 – Análise das interações entre as proteínas HBx em fusão com a cauda de polihistidina com o oligonucleotídeo de RNA AU-38 através de *UV cross-linking*. As proteínas GST, 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142), 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) e os 12 mutantes Cys/Ser 6xHis-mini-HBx(19-142) foram incubados com o oligonucleotídeo de RNA AU-38 marcado com ^{32}P , e os complexos foram analisados em SDS-PAGE 12,5% sob condições desnaturantes. Proteínas: canaleta 2, GST (0,76 nmol); canaleta 3, 6xHis-HBx(1-154) (0,35 nmol); canaletas 4 a 17, mutantes Cys/Ser 6xHis-mini-HBx(19-142) com as mutações indicadas na parte superior da figura (0,36 nmol por canaleta). Cerca de 120 fmol do oligonucleotídeo de RNA AU-38 foram aplicados em cada canaleta. Os complexos RNA-HBx estão indicados na figura, assim como a sonda livre.

4.4 Interação *in vitro* da proteína HBx com a proteína humana p53

Com o intuito de verificar se os resíduos de cisteína da proteína HBx seriam importantes para a sua ligação com a proteína humana p53, foram realizados experimentos de co-precipitação *in vitro* entre a proteína p53 com as proteínas HBx contendo 10, 5 ou nenhum resíduo de cisteína.

Para tal, as pérolas de *glutathione sepharose* imobilizadas com as proteínas GST ou GST-p53(1-393) foram incubadas com as três proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), antes de serem fracionadas

em SDS-PAGE (Figura 26). Observou-se que as três proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina interagiram com a proteína humana GST-p53(1-393) (Figura 26, canaletas 1, 4 e 7), mas não interagiram com a proteína GST utilizada como controle (Figura 26, canaletas 2, 5 e 8).

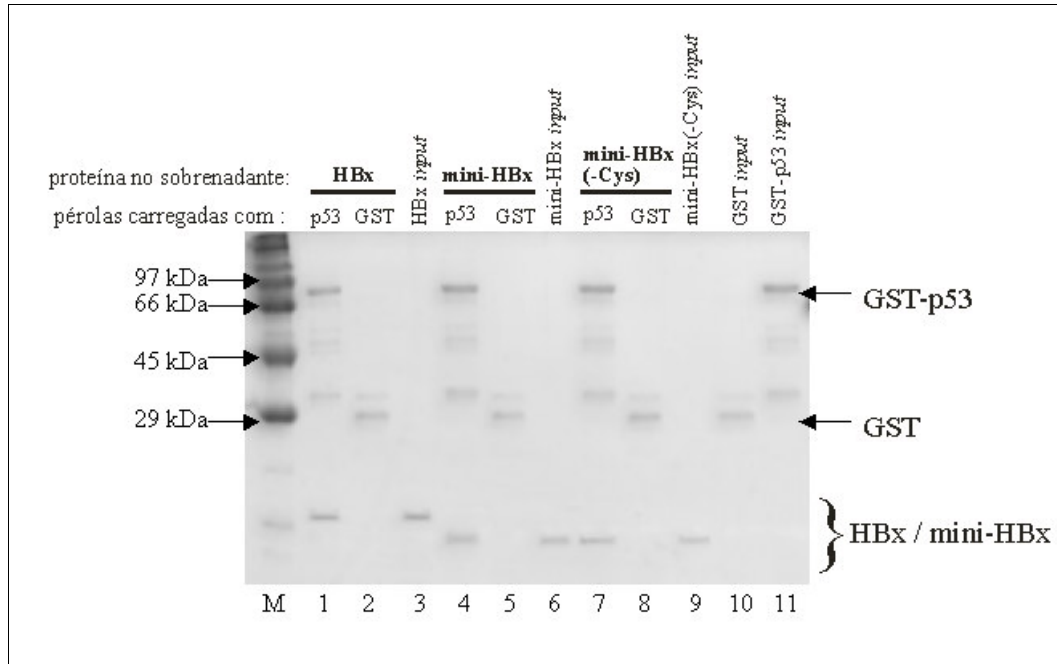


Figura 26 – Ensaio de interação *in vitro* (“pull down”) das proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina com a proteína GST-p53(1-393). As pérolas de *glutathione sepharose* foram incubadas com a proteína GST (controle) ou GST-p53(1-393), e depois incubadas com as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-miniHBx(19-142) ou 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), como indicado na parte superior da figura. Após sucessivas lavagens, as proteínas ligadas à resina foram analisadas em SDS-PAGE 12,5%. As quantidades de proteínas adicionadas às pérolas (*input*) estão indicadas na figura (canaletas 3, 6, 9, 10 e 11).

A interação *in vitro* específica que foi observada entre a proteína GST-p53(1-393) com as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), indicou que os resíduos de cisteína presentes na proteína HBx não foram necessários para a sua interação com a proteína humana p53 (Figura 26).

4.5 Ativação de gene repórter em sistema de mono-híbrido em levedura

O sistema de mono-híbrido é um ensaio realizado em levedura que pode ser usado para estudar proteínas que interagem com seqüências específicas de DNA. Neste trabalho, utilizou-se *Saccharomyces cerevisiae* linhagem W303 transformadas com o plasmídeo p53BLUE (W303mut), que possuem o gene *lacZ* (que codifica a enzima beta-galactosidase) sob o controle de uma região promotora alvo para a proteína humana p53. Quando ocorre a interação da proteína p53 com o promotor, o gene *lacZ* é transcrito, havendo a expressão da beta-galactosidase (Figura 27A).

Com o intuito de averiguar se a proteína HBx e/ou os seus resíduos de cisteína poderiam interferir na interação da proteína humana p53 com sua seqüência de DNA alvo (promotor), foram realizados ensaios de ativação da beta-galactosidase dependente da ativação do promotor alvo para p53. Dessa forma, as leveduras transgênicas W303mut foram co-transformadas com o plasmídeo pGAD424-p53(1-393) e com o plasmídeo pBTM116 vazio, ou com o plasmídeo pBTM116 contendo as seqüências que codificam para as proteínas HBx(1-154), mini-HBx(19-142) e mini-HBx(-Cys)(19-142) em fusão com o domínio de ligação ao DNA *LexA*. O plasmídeo pGAD424-p53(1-393) contém a seqüência que codifica para a proteína humana p53 fusionada ao domínio de ativação da transcrição *Gal4*.

Após a seleção das leveduras transgênicas W303mut/pGAD424-p53/pBTM116 e W303mut/pGAD424-p53/pBTM116-HBx em meio seletivo SD-ULW, foram realizados os ensaios de ativação do gene repórter (beta-galactosidase) dependente da ativação do promotor alvo para a proteína humana p53. Os ensaios enzimáticos da beta-galactosidase com o substrato ONPG foram realizados em triplicata, e as médias dos valores de OD₄₂₀ foram tabeladas (Figura 27B).

Na coluna 1 (Figura 27B), as leveduras W303mut foram testadas quanto à sua capacidade de ativar a transcrição da beta-galactosidase, mas não foi observada a auto-ativação. Contudo, após a transformação das leveduras W303mut com os plasmídeos pGAD424-p53 (coluna 2) e pBTM116 (coluna 3), ocorreu a ativação do gene repórter devido à ligação da proteína p53 ao promotor, com a conseqüente expressão da enzima beta-galactosidase, que teve a sua atividade medida pela clivagem do substrato ONPG.

Entretanto, na presença das proteínas HBx(1-154), mini-HBx(19-142) e mini-HBx(-Cys)(19-142) (Figura 27B, colunas 4, 5 e 6), observou-se um aumento maior do que 1,5 vezes na ativação do gene repórter dependente da ativação do promotor, quando comparada com a ativação observada na ausência de HBx (Figura 27B, coluna 3). O aumento da ativação observado poderia ser o resultado de uma maior interação da proteína p53 com o promotor, com a conseqüente estabilização desta interação mediada pela proteína HBx, ou através da estabilização do complexo de proteínas formado após o recrutamento da maquinaria de transcrição, também mediada pela proteína HBx.

Independentemente do modo de ação da proteína HBx no aumento da ativação do gene repórter, observou-se que a proteína mini-HBx(-Cys)(19-142) também foi capaz de ativar a expressão da beta-galactosidase como as proteínas HBx(1-154) e mini-HBx(19-142), que possuem 10 e 5 resíduos de cisteína, respectivamente (Figura 10). Os dados obtidos com o ensaio de ativação de gene repórter dependente da ativação do promotor alvo para p53, em sistema de mono-híbrido em levedura (Figura 27B), mostraram que os resíduos de cisteína da proteína HBx não influenciaram na ativação do gene repórter (beta-galactosidase), assim como tais resíduos de cisteína não foram necessários para a interação da proteína HBx com o oligonucleotídeo de RNA AU-38 e com a proteína humana p53.

4.6 Expressão em sistemas eucarióticos

Como a proteína HBx em fusão com a cauda de poli-histidina foi expressa predominantemente na fração insolúvel do lisado bacteriano, na forma de corpos de inclusão, resolveu-se testar a expressão da proteína HBx em sistemas eucarióticos com o intuito de obter proteína solúvel. Desta forma, o cDNA da proteína HBx foi clonado no plasmídeo pBSV-8His, para a expressão da proteína HBx em células de inseto *Sf9*, utilizando o sistema de Baculovírus, e no plasmídeo pPIC9K, para a expressão da proteína HBx em leveduras *Pichia pastoris* linhagem KM71.

A expressão de proteínas em células de inseto através do sistema de Baculovírus possui inúmeras vantagens quando comparada com a expressão em bactérias, uma vez que muitas modificações pós-traducionais podem ocorrer em Baculovírus como, por exemplo, fosforilação, glicosilação, clivagem proteolítica, entre outras. Além disto, as

proteínas recombinantes são superexpressas na sua forma enovelada, com a formação de ligações de dissulfeto e oligomerizações (O'Reilly, 1994).

O sistema de Baculovírus consiste na inserção do gene de interesse (cDNA da HBx) no DNA do baculovírus (família *Baculoviridae*), geralmente no lugar do gene que codifica a proteína polihedrina. Para a produção do vírus recombinante são necessárias duas etapas: a construção do plasmídeo (no caso, o pBSV-8His/HBx) e a produção do baculovírus recombinante. Em seguida, as células de inseto *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) são transfectadas com o vírus recombinante para a sua replicação nas células, uma vez que os insetos são os hospedeiros naturais dos baculovírus (Crossen & Gruenwald, 1998).

Neste trabalho, o plasmídeo pBSV-8His foi utilizado para a produção do vírus recombinante porque possui um promotor forte (*polihedrin*) e uma sequência que codifica o peptídeo sinal do fator humano H. O peptídeo sinal em fusão com a porção N terminal da HBx permite a secreção da proteína para o meio de cultura (Kühn & Zipfel, 1995).

Após a transfecção das células de inseto *Sf9* com o plasmídeo pBSV-8His/HBx(1-142) (Tabela 9), as células de inseto apresentaram alterações morfológicas indicativas de uma transfecção bem sucedida. Os vírus recombinantes diferem dos vírus selvagens porque aqueles não apresentam corpos de oclusão, de modo que os vírus recombinantes são coletados para a infecção de novas células de inseto *Sf9* em larga escala, com o intuito de expressar a proteína HBx recombinante.

Após quatro dias de infecção, as células de inseto *Sf9* transfectadas foram lisadas, e as frações solúveis e insolúveis foram analisadas por *Western blot anti-His* para verificar a presença da proteína 6xHis-HBx(1-142). No entanto, nenhuma banda relativa à proteína de fusão foi observada no WB (dados não mostrados). Provavelmente, a expressão da proteína 6xHis-HBx(1-142) em células de inseto *Sf9* tenha sido muito baixa, e uma quantidade maior de vírus recombinante seria necessária para infectar um maior número de células e, assim, obter uma quantidade de proteína HBx detectável.

O próximo passo foi escolher o sistema de expressão em *Pichia pastoris* com o intuito de obter proteína solúvel e em quantidade, uma vez que a expressão em *P. pastoris* é cerca de 10-100 vezes maior do que em *E. coli*. Outra vantagem do sistema de expressão em *P. pastoris* é a expressão da proteína em sua forma enovelada, com um

número reduzido de proteínas contaminantes (proteínas intrínsecas da levedura), uma vez que a indução da expressão é controlada pela adição de metanol. O plasmídeo pPIC9K foi escolhido para a expressão das proteínas HBx porque as proteínas são secretadas para o meio de cultura, facilitando a purificação das proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154) e 6xHis-mini-HBx(19-142) por cromatografia de afinidade.

Após a transformação das leveduras *Pichia pastoris* linhagem KM71 com os plasmídeos pPIC9K, pPIC9K/His-HBx(1-154) e pPIC9K/His-mini-HBx(19-142) (Tabela 9), cerca de 137 transformantes cresceram em placas MD e foram selecionados em placas YPD/G418. Os 57 clones selecionados em placas YPD/G418 foram repicados em placas MD e MM, e apenas quatro clones foram selecionados para os testes de indução: clone 14 (plasmídeo vazio pPIC9K), clones 40 e 41 (plasmídeo pPIC9K/6xHis-HBx(1-154)) e clone 48 (plasmídeo pPIC9K/6xHis-mini-HBx(19-142)). A linhagem KM71 foi utilizada como controle negativo, assim como o clone 14 (plasmídeo vazio pPIC9K).

Como o plasmídeo pPIC9K foi utilizado para a expressão secretada das proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154) e 6xHis-mini-HBx(19-142), o tampão BMGY/BMMY se mostrou mais adequado para os testes de indução da expressão das proteínas. O tampão BMGY/BMMY possui extrato de levedura e peptona em sua composição, o que ajuda a estabilizar as proteínas secretadas e diminui e/ou previne a proteólise destas.

Analizando o SDS-PAGE da indução por metanol dos plasmídeos pPIC9K/6xHis-HBx(1-154) (clones 40 e 41) e pPIC9K/6xHis-mini-HBx(19-142) (clone 48) em *P. pastoris*, observou-se que não houve indução de proteína HBx na fração solúvel do 2° ao 5° dia de indução (dados não mostrados). Uma mini-purificação da fração solúvel através de cromatografia de afinidade em *Ni-NTA* seguida de um *Western blot anti-His* e *anti-HBx* da mini-purificação não indicou a presença de sinais relativos às proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154) (~18 kDa) e 6xHis-mini-HBx(19-142) (15,6 kDa) na fração solúvel (dados não mostrados).

Como não foi observada a expressão de proteína HBx em células de inseto *Sf9* e em leveduras *P. pastoris*, resolveu-se testar outras condições de indução da expressão de proteína HBx em *E. coli* com o objetivo de obter proteína na fração solúvel do lisado bacteriano, através da fusão com a cauda de poli-histidina ou com a proteína GST.

4.7 Cinética da degradação de mRNAs em células HeLa

Com o intuito de investigar se a proteína HBx poderia interferir na estabilidade dos mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* *in vivo*, transfectou-se células HeLa com os plasmídeos pcDNA3.1/Hygro(+) e pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154), para os ensaios de cinética da taxa de degradação de mRNAs. Para a confirmação da transfecção, realizou-se um PCR de colônia com as células HeLa transfectadas (Figura 28).

As células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) vazio foram utilizadas como controle negativo, e o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) como controle positivo na reação de PCR para a amplificação do inserto HBx(1-154), na presença dos oligonucleotídeos XV-S e XPWW-A (Tabela 4). O gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 28) mostrou que a transfecção foi bem sucedida porque houve a amplificação do cDNA de HBx (510 pb) (Figura 28, canaleta 2), como no controle positivo (Figura 28, canaleta 3).

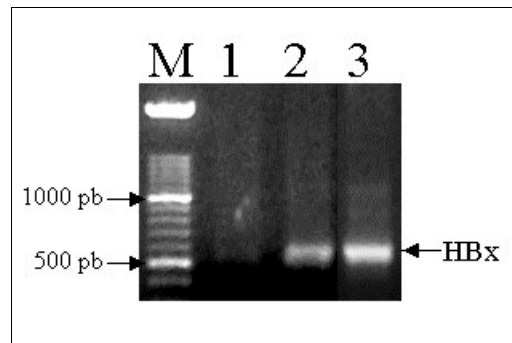


Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose do PCR de colônia das células HeLa transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1/Hygro(+) e pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154). Oligonucleotídeos de DNA específicos foram utilizados para amplificar o cDNA de HBx (510 pb). Canaleta M, marcador de peso molecular; canaleta 1, células HeLa transfectadas com pcDNA3.1/Hygro(+) (controle negativo); canaleta 2, células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154); canaleta 3, plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) (controle positivo).

As células HeLa transfectadas com o plasmídeo vazio pcDNA3.1/Hygro(+) ou com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) foram tratadas com actinomicina D em diferentes tempos (0, 3, 6, e 8 horas) antes da extração do RNA total. A actinomicina D inibe a RNA polimerase II nas células HeLa, interrompendo a transcrição de mRNAs. Desta forma, a estabilização ou a degradação dos mRNAs que foram produzidos nas

células HeLa, antes da adição de actinomicina D, podem ser acompanhadas através de *Northern blot*.

Após a extração do RNA total das células HeLa, procederam-se a eletroforese em gel de agarose e a sua transferência para as membranas de nitrocelulose, como descrito em material e métodos (item 3.2.3.1). Os RNAs presentes nas membranas de nitrocelulose foram hibridizados às sondas de DNA dos genes *c-fos* (431 pb), *c-myc* (345 pb) e da β -actina (~400 pb). A sonda de β -actina foi utilizada como um controle positivo do experimento de *Northern blot* (Figura 29).

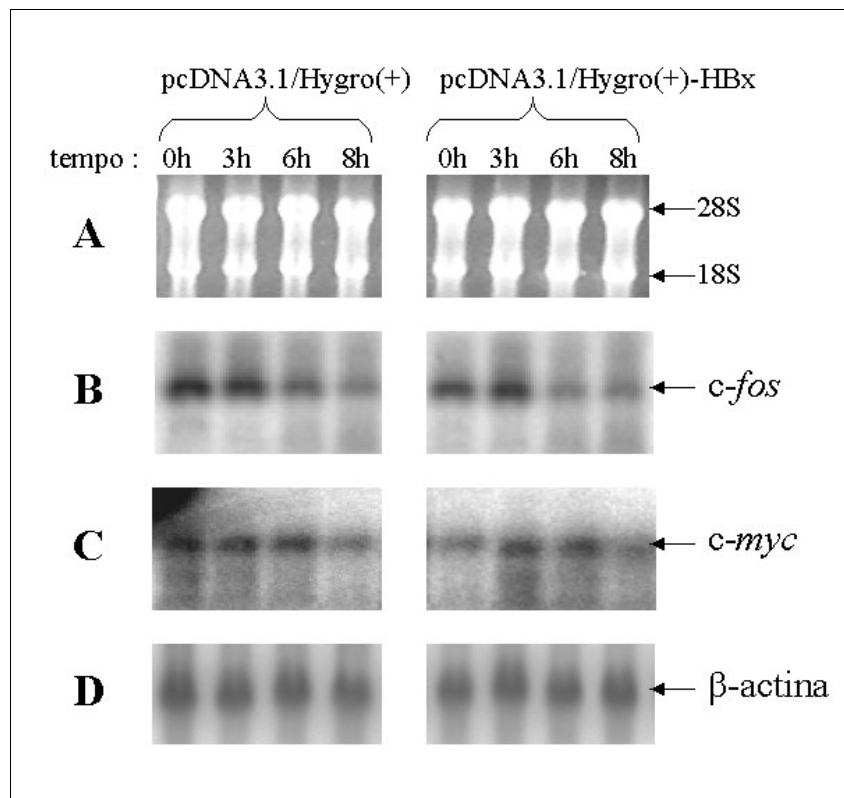


Figura 29 – Cinética da degradação dos mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* em células HeLa, na ausência e presença da proteína HBx, analisada através de *Northern blot*. As membranas de nitrocelulose contendo 20 µg do RNA total (A) extraído de células HeLa foram hibridizadas com os genes *c-fos* (B), *c-myc* (C) ou β -actina (D). As células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) ou com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) foram tratadas com actinomicina D por 0, 3, 6 e 8 horas, antes da extração do RNA total. Após a hibridização com os genes *c-fos*, *c-myc* e β -actina marcados com ^{32}P , as membranas de nitrocelulose foram visualizadas após exposição em placa BAS IP MS 2325 (Fujifilm) por 48 horas.

A auto-radiografia das membranas de nitrocelulose (Figura 29) indicou uma gradual diminuição da intensidade dos mRNAs transcritos dos genes *c-fos* (Figura 29B) e *c-myc* (Figura 29C) após o tratamento das células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) vazio com actinomicina D. Contudo, na presença de HBx, observou-se uma sutil estabilização destes mRNAs, como pode ser visto nos gráficos que foram gerados a partir dos dados de intensidade de luminescência foto-estimulada das membranas de nitrocelulose (Figura 30).

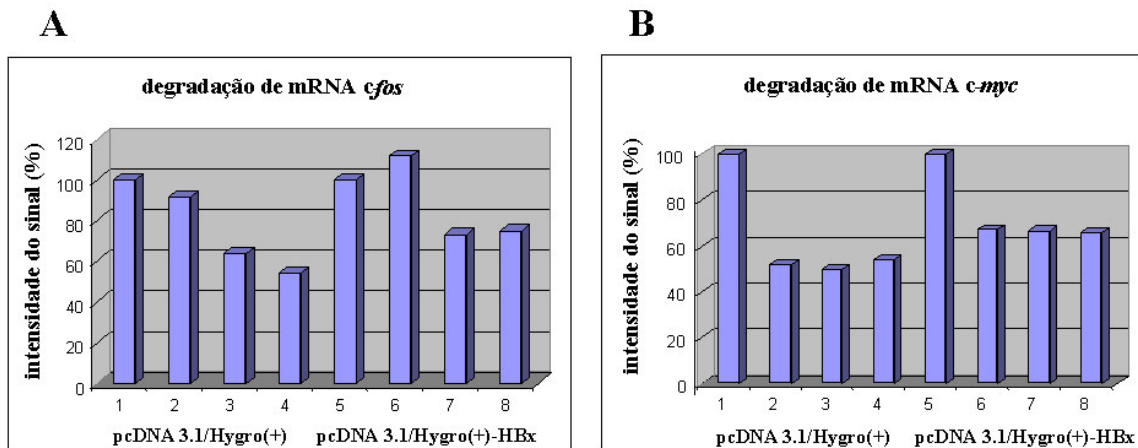


Figura 30 – Análise quantitativa da degradação dos mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* (A) e *c-myc* (B) das células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) (colunas 1 a 4) ou com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) (colunas 5 a 8). Utilizando o programa *Image Gauge* (Fujifilm), a intensidade de luminescência foto-estimulada detectada nas membranas de nitrocelulose (Figura 29) foi convertida em números que foram graficados. Colunas 1 e 5, sem tratamento com actinomicina D; colunas 2 e 6, 3 horas de tratamento; colunas 3 e 7, 6 horas de tratamento; colunas 4 e 8, 8 horas de tratamento com actinomicina D.

As células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) apresentaram um gradual decréscimo na porcentagem de mRNA do proto-oncogene *c-fos* após 3, 6 e 8 horas de tratamento com actinomicina D (Figura 30A, colunas 2, 3 e 4). Por outro lado, as células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) apresentaram um pequeno aumento na porcentagem de mRNA do *c-fos* após 3 horas de tratamento com actinomicina D (Figura 30A, coluna 6).

Contudo, as células HeLa que expressavam a proteína HBx, e que foram tratadas com actinomicina D por 6 horas (Figura 30A, coluna 7), apresentaram um decréscimo na

porcentagem de mRNA do gene *c-fos*, que foi mantido após 8 horas de tratamento com actinomicina D (coluna 8). A porcentagem de mRNA do proto-oncogene *c-fos* permaneceu inalterada nas colunas 7 e 8, e elevada quando comparada com a porcentagem de mRNA em células HeLa transfectadas com pcDNA3.1/Hygro(+) após 8 horas de tratamento com actinomicina D (Figura 30A, coluna 4). Estes resultados sugerem que houve uma leve estabilização da quantidade de mRNA do proto-oncogene *c-fos* em células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154).

Da mesma forma, mas em menor intensidade, observou-se uma sutil estabilização do mRNA do proto-oncogene *c-myc* nas células HeLa transfectadas com o pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154), em comparação com as células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+). Em diferentes tempos de tratamento das células HeLa com actinomicina D (Figura 30B; colunas 2, 3, 4 e 6, 7, 8), a porcentagem de mRNA do proto-oncogene *c-myc* é superior na presença de HBx (Figura 30B; colunas 6, 7 e 8) do que na sua ausência (Figura 30B; colunas 2, 3 e 4), o que poderia sugerir uma sutil estabilização do mRNA do proto-oncogene *c-myc* pela proteína HBx em células HeLa.

4.8 Aumento do crescimento das células HeLa na presença de HBx

Como foi mostrado, a proteína HBx causou uma leve estabilização nos níveis de mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* em cultura de células HeLa. Durante a realização dos ensaios de cinética da taxa de degradação de mRNAs com actinomicina D, observou-se que as células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) apresentavam um crescimento diferenciado das células HeLa transfectadas com o plasmídeo vazio pcDNA3.1/Hygro(+). Desta forma, resolveu-se investigar se a proteína HBx poderia interferir no crescimento e na viabilidade celular das células HeLa.

Cerca de 20×10^4 células humanas HeLa transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1/Hygro(+) e pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) foram mantidas em meio DME/SGH a 37 °C, em placas do tipo 6 poços, e coletadas a cada 24 horas, por 4 dias seguidos, para o monitoramento do crescimento celular. Os experimentos foram realizados em triplicata e a média do número total de células HeLa recuperadas foi graficada em função do tempo de incubação (Figura 31).

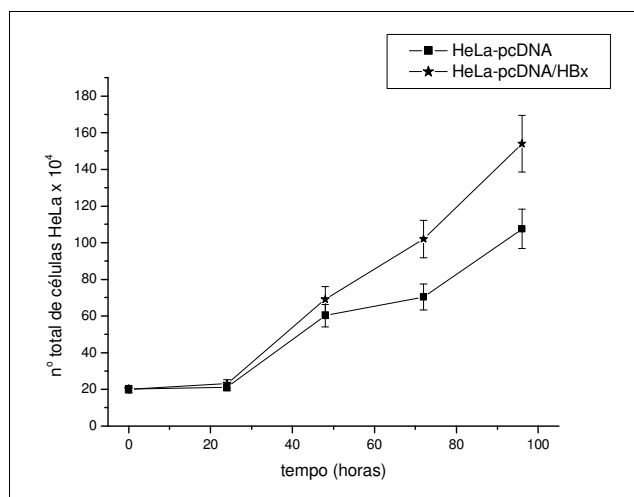


Figura 31 – Influência da proteína HBx no crescimento de células HeLa. As células HeLa foram transfectadas estavelmente com o plasmídeo pcDNA3.1/Hygro(+) vazio ou contendo o cDNA da proteína HBx(1-154), e semeadas em placas do tipo 6 poços a uma densidade de 10^4 células/poço em 2 mL de meio DME/SGH. As placas foram incubadas a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24, 48, 72 e 96 horas. A proliferação celular foi determinada através da contagem do número total de células em câmara de Neubauer. Os resultados obtidos são uma média de três experimentos independentes, em triplicata, e os desvios de 10% entre as medidas estão indicados na figura.

Observou-se que até 48 horas de incubação, o número total de células HeLa recuperadas foi quase o mesmo, independente do fato da linhagem celular expressar a proteína HBx ou não (Figura 31). Contudo, após 70 horas de incubação, a quantidade total de células HeLa recuperadas que expressavam a proteína HBx era 1,5 vezes maior do que a quantidade de células HeLa transfectadas com o plasmídeo vazio pcDNA3.1/Hygro(+) (Tabela 12).

Tabela 12 – Número total de células HeLa recuperadas em cada tempo de incubação (valores médios) e porcentagem de células viáveis para as duas linhagens celulares. Os erros são de 10% entre as medidas.

Tempo de incubação	HeLa-pcDNA		HeLa-pcDNA/HBx	
	nº total de células (x10 ⁴)	viabilidade celular (%)	nº total de células (x10 ⁴)	viabilidade celular (%)
24 h	21,2	76,4	23,0	85,1
48 h	60,2	84,2	69,2	86,1
72 h	70,4	84,1	102,0	87,7
96 h	107,5	87,4	154,0	90,9

Para determinar o número de células HeLa vivas e mortas, em cada tempo de coleta (24, 48, 72 e 96 horas), utilizou-se uma solução contendo *Trypan Blue* para a visualização das células mortas (azuladas), e diferenciá-las das células vivas (íntegras). As médias obtidas com a contagem das células vivas e mortas foram graficadas (Figura 32A), assim como a porcentagem de células viáveis (Figura 32B) calculada através da fórmula descrita em material e métodos (Tabela 12).

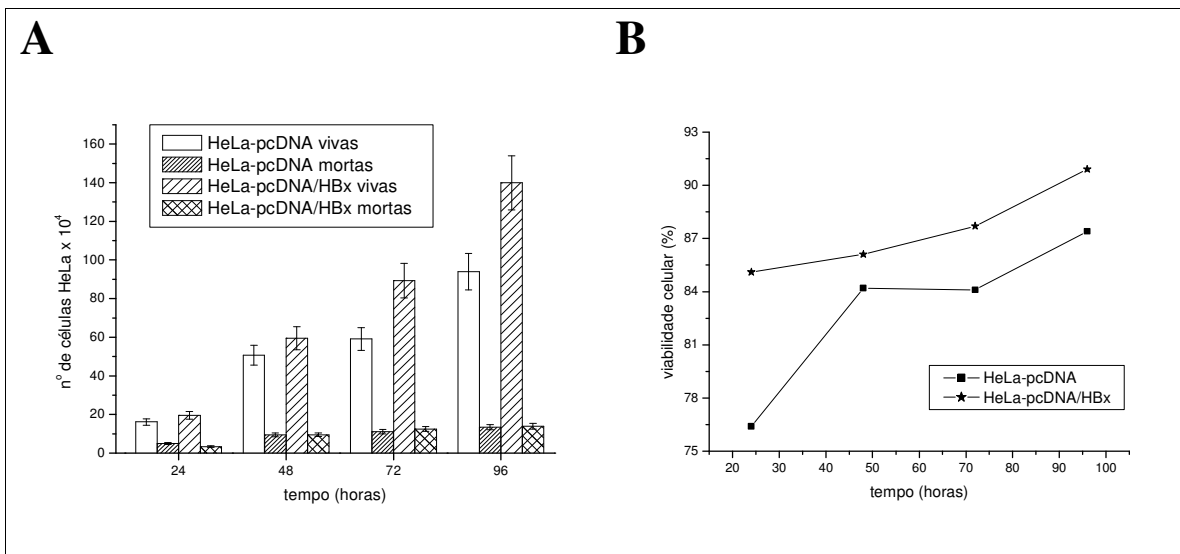


Figura 32 – Influência da proteína HBx na viabilidade de células HeLa. As células HeLa transfectadas com os plasmídeos pcDNA3.1/Hygro(+) ou com o pcDNA3.1/Hygro(+)-HBx(1-154) foram semeadas em placas do tipo 6 poços, a uma densidade de 10^4 células/poço em 2 mL de meio DME/SGH, em triplicata. Após incubação a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24, 48, 72 e 96 horas, as células foram coletadas por centrifugação e coradas com uma solução de *Trypan Blue* 0,4%. As células HeLa azuladas (células mortas) foram contadas em câmara de Neubauer (**A**) e a porcentagem de células viáveis (**B**) foi graficada em função do tempo.

Através da contagem do número de células vivas e mortas, foi possível observar que a linhagem de células HeLa que expressava a proteína HBx(1-154) apresentou uma maior viabilidade celular (Tabela 12), quando comparada com a linhagem de células HeLa transfectadas com o plasmídeo vazio pcDNA3.1/Hygro(+) (Figura 32B). Em suma, a proteína HBx influenciou o crescimento e a viabilidade celulares quando foi expressa em células HeLa.

4.9 Caracterização estrutural da proteína HBx por dicroísmo circular

As proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), oriundas da fração insolúvel do lisado bacteriano, foram purificadas sob condições desnaturantes (uréia 8 M), e dialisadas contra diferentes tampões (Tabela 8), de forma direta ou sequencial, para serem utilizadas nos ensaios espectroscópicos de dicroísmo circular.

Para uma análise comparativa entre as proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), foram agrupadas na tabela 13 as principais características de cada proteína de fusão, de acordo com os dados obtidos através do programa *ProtParam* (<http://ca.expasy.org>).

Tabela 13 – Dados característicos para as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) de acordo com o programa *ProtParam* (<http://ca.expasy.org>).

Características	6xHis-HBx	6xHis-mini-HBx	6xHis-mini-HBx(-Cys)
Nº de aminoácidos	174	145	145
PM (g/mol)	18.758,7	15.722,0	15.641,7
Ponto isoelétrico	9,05	9,40	10,33
$\epsilon_{280\text{ nm}}$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	7570	7210	6970
Nº de cisteínas	10	5	0

A proteína HBx(1-154) possui 10 resíduos de cisteína na sua sequência de aminoácidos, e pode apresentar regiões com estrutura secundária em alfa-hélice e folhas beta, e outras regiões com estrutura randômica, de acordo com o programa de predição de estrutura secundária (*PSIPRED*; <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Figura 33). Baseando-se nesta predição de estrutura secundária, estima-se que a proteína HBx(1-154) pode apresentar cerca de 17,5% de estrutura secundária do tipo alfa-hélice, 15% de folhas beta e 67,5% de estrutura randômica (*random coil*).

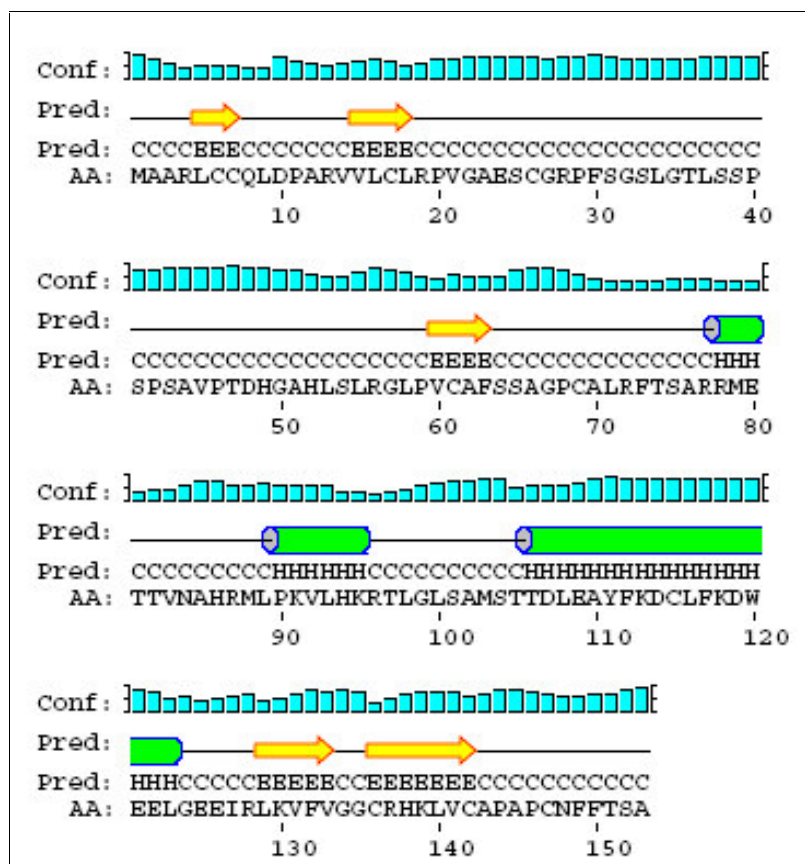


Figura 33 – Predição de estrutura secundária da proteína HBx(1-154) através do programa *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). As setas amarelas representam as prováveis regiões com estrutura secundária em fita beta (E) e, em verde, as regiões prováveis com estrutura secundária em alfa-hélice (H). As regiões sem estrutura definida (C), a sequência de aminoácidos da proteína HBx (AA) e a confiabilidade (Conf) da predição de estrutura secundária também estão indicadas na figura.

Com o intuito de verificar se haveria alguma variação nas estruturas secundárias das proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), foram realizados experimentos de dicroísmo circular em diferentes condições experimentais (variação no tampão de diálise, pH, temperatura, concentração salina, adição de uréia, co-solvente e detergente, etc). A estimativa da porcentagem de estrutura secundária de cada proteína de fusão foi calculada através do programa *CDNN deconvolution* (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>), utilizando uma base de dados contendo 33 espectros de CD de diferentes proteínas.

4.9.1 O tampão de diálise influenciou na estruturação da proteína HBx

A proteína 6xHis-HBx(1-154) foi renaturada através da diálise contra os tampões A, C e E, e os espectros de dicroísmo circular no UV distante foram adquiridos (Figura 34). Os espectros de CD mostraram pequenas diferenças no espectro de acordo com o tampão utilizado na diálise. No tampão A e E, os espectros apresentaram bandas negativas com valores do mínimo em torno de 202 nm, enquanto que no tampão C o mínimo deslocou-se para 204 nm (Figura 34). As estimativas do conteúdo de estrutura secundária da proteína 6xHis-HBx(1-154) nos diferentes tampões de diálise são apresentadas na tabela 14.

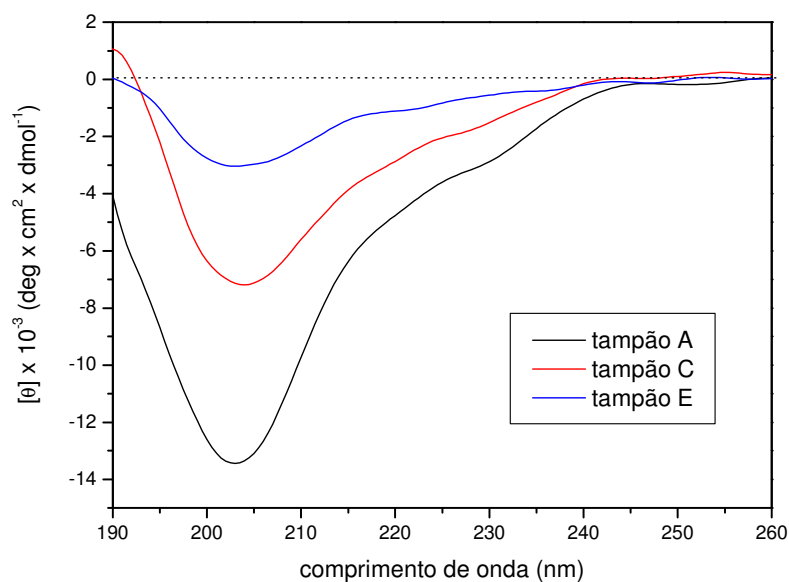


Figura 34 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra os tampões A, C e E. A proteína está na concentração de 5,2 µM no tampão A, 4 µM no tampão C e 5,7 µM no tampão E.

Tabela 14 – Variação na estrutura secundária da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra os tampões A, C e E. Os valores são dados em porcentagem (%) e o erro é de 5,57% para as medidas adquiridas de 190 a 260 nm.

Tampão de diálise	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
A	8,3	17,6	2,7	29,7	42,6
C	8,6	36,4	3,6	22,3	32,0
E	6,9	43,4	3,6	18,9	30,4

Os dados da tabela 14 mostraram que a proteína 6xHis-HBx(1-154) apresentou um grande conteúdo de estrutura não definida (*random coil*) nas três condições de diálise. Entretanto, o espectro de CD da proteína de fusão que foi dialisada contra o tampão J na presença de um sistema redox (GSSG:GSH), para favorecer a formação das pontes de dissulfeto (Yamada *et al.*, 2000), indicou que o conteúdo de estrutura não definida foi mantido em torno de 38% (dados não mostrados).

A proteína contendo apenas 5 resíduos de cisteína, 6xHis-mini-HBx(19-142) foi renaturada através de diálises diretas, ou sequenciais, contra todos os tampões de diálise listados na tabela 8. Os valores de concentração da proteína em cada um dos tampões de diálise foram calculados através dos valores de absorbância e as amostras foram diluídas para a obtenção de espectros de CD no UV distante (Tabela 15).

Tabela 15 – Valores de concentração da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra os diferentes tampões listados na tabela 8.

Tampão	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
[] μM	5,0	7,7	4,5	4,0	4,3	5,0	10,0	10,0	4,0	4,0	5,0

Quando a proteína foi renaturada nos tampões contendo Pipes (tampões B, C, D e E), observou-se que os espectros de CD apresentaram um mínimo em torno de 202,5-204,5 nm (Figura 35A, Tabela 16), enquanto que em tampão Tris-HCl (tampões F, G, H, I e J) o mínimo do espectro apresentou-se deslocado para 206-209,5 nm (Figura 35B, Tabela 16). Entretanto, em água pH 6,0 (tampão A), o mínimo do espectro de CD foi deslocado para 202,5 nm (Figura 35A, Tabela 16), assim como em tampão acetato pH 5,6 (tampão I), que apresentou um valor do mínimo do espectro de CD próximo a 203 nm (Figura 35B, Tabela 16).

Tabela 16 – Valores dos mínimos dos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) renaturada contra os diferentes tampões de diálise (Tabela 8).

Tampão	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
pH	6,0	6,0	7,0	7,0	6,0	8,0	8,5	8,5	8,0	8,0	5,6
mínimo (nm)	202,5	202,5	204,5	204,5	203	207 ~226	206,5	205,5	209,5	206	203

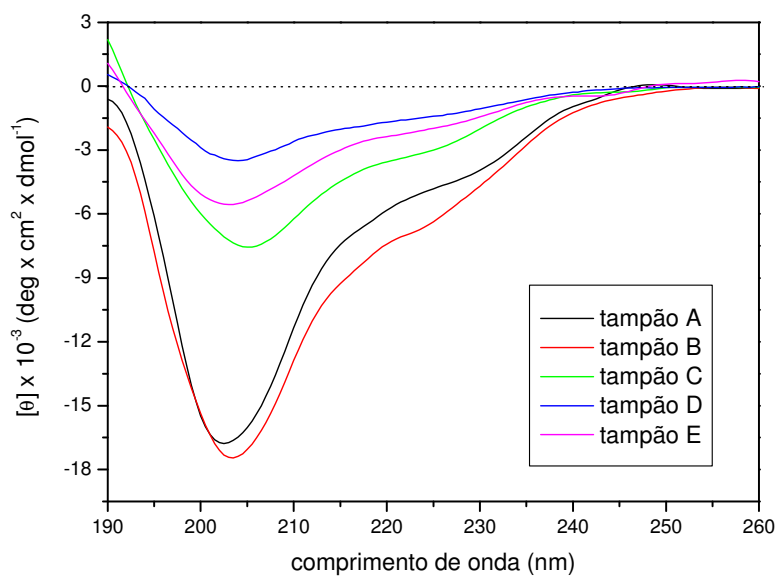
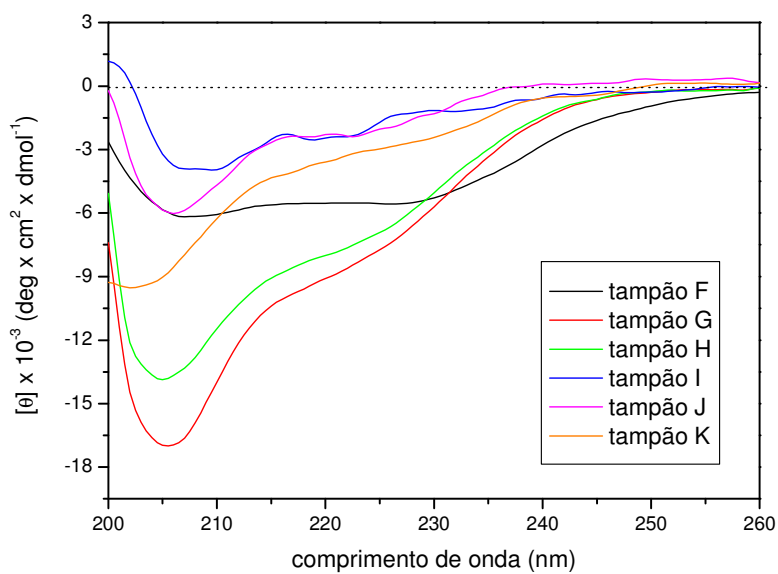
A**B**

Figura 35 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra os tampões A-E (**A**) e F-K (**B**) que estão listados na tabela 8. A concentração da proteína de fusão em cada tampão de diálise está indicada na tabela 15.

De acordo com os dados da tabela 16, os valores dos mínimos dos espectros de dicroísmo circular da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) apresentaram uma certa coerência de acordo com o valor de pH do tampão utilizado na diálise. Para os tampões de diálise A, B, E e K, cujos pHs estão em torno de 5,6 a 6,0 (meio levemente ácido), o mínimo das curvas dos espectros de CD da proteína de fusão foram observados em torno de 202,5-203 nm (Tabela 16). Contudo, para os tampões de diálise com pHs variando de 7,0 a 8,5 (meio neutro a levemente básico), os valores dos mínimos das curvas dos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) variaram entre 204,5-209,5 nm.

A estimativa de estrutura secundária para a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) nos diferentes tampões de diálise (Figura 35) foi determinada pelo programa *CDNN deconvolution*, e os dados estão organizados na tabela 17.

Tabela 17 – Variação na estrutura secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra os diferentes tampões listados na tabela 8. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,39% para as medidas adquiridas de 205 a 260 nm.

Tampão de diálise	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
A	13,6	19,2	5,2	27,0	35,0
B	17,8	15,7	5,3	26,4	33,9
C	8,2	29,2	5,3	22,7	35,4
D	13,1	21,6	5,4	24,0	34,9
E	6,1	34,5	5,3	21,5	35,3
F	3,9	43,3	5,2	18,6	34,5
G	22,6	13,1	5,3	25,1	32,7
H	19,1	16,3	5,4	23,9	33,8
I	6,5	33,2	5,3	22,4	35,7
J	5,8	35,7	5,3	20,5	35,0
K	8,0	29,0	5,3	23,2	35,4

Analisando a estimativa de porcentagem de estrutura randômica (Tabela 17), observou-se que este tipo de estrutura não variou muito com o tampão utilizado na renaturação da proteína de fusão. Contudo, as estimativas dos conteúdos de alfa-hélice e folha beta antiparalela variaram de acordo com o tampão de diálise contendo Pipes (tampões B, C, D e E) ou Tris (tampões F, G, H, I e J). Essa variação observada poderia ser uma consequência da formação aleatória das pontes de dissulfeto intramoleculares

durante o processo de renaturação da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142), com a co-existência de variadas populações de estruturas secundárias, uma vez que a proteína de fusão apresenta apenas 5 resíduos de cisteína (Tabela 13).

Para a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), que teve os cinco resíduos de cisteína alterados para resíduos de serina (Figura 10), os espectros de CD no UV distante a 25 °C apresentaram diferenças de acordo com o tampão utilizado na diálise (Figura 36).

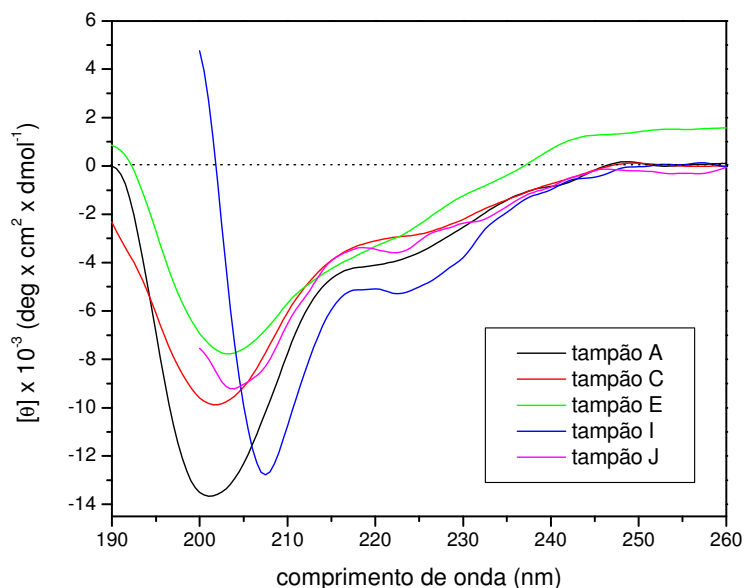


Figura 36 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra os tampões A, C, E, I e J, que estão listados na tabela 8. A proteína está na concentração de 5 µM nos tampões A, C e J, e na concentração de 4 µM nos tampões E e I.

Observou-se que os formatos dos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra os tampões A, C ou E eram semelhantes, com um mínimo em torno de 202 nm (Figura 36). Contudo, na presença de Tris (tampões I e J), os mínimos dos espectros de CD da proteína de fusão foram deslocados para 207,5 nm (tampão I) e 205 nm (tampão J). Através do programa *CDNN deconvolution* foi possível estimar a porcentagem de estrutura secundária da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) renaturada em cada um dos tampões de diálise (Tabela 18).

Tabela 18 – Variação na estrutura secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra os tampões A, C, E, I e J, listados na tabela 8. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,39% para as medidas adquiridas de 205 a 260 nm.

Tampão de diálise	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
A	9,2	25,7	5,3	25,4	35,6
C	7,3	30,2	5,3	23,3	35,5
E	8,9	28,1	5,4	22,5	35,4
I	13,1	21,2	5,3	24,7	35,0
J	8,1	28,7	5,3	23,5	35,4

Os dados da tabela 18 indicaram que a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada sequencialmente contra o tampão I, na presença de concentrações decrescentes de uréia, apresentou um maior conteúdo de estrutura secundária em alfa-hélice em relação à porcentagem estimada para a proteína dialisada diretamente contra os tampões A, C, E e J. Contudo, em todas as condições de diálise (Tabela 18), observou-se que os valores estimados para o conteúdo de estrutura não definida (*random coil*) da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) eram praticamente iguais (~35%), assim como foi estimado para a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra os mesmos tampões (Tabela 17).

4.9.2 A proteína HBx apresentou uma parcial estruturação secundária

As proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisadas contra água pH 6,0 (tampão A) foram desnaturadas pela adição de concentrações crescentes de uréia (de 1 a 6 M), e os espectros de CD foram coletados a 25 °C. Com o intuito de acompanhar a variação da porcentagem de estrutura secundária das proteínas de fusão durante o processo de desenovelamento, o valor de $[\theta]_{222}$ foi monitorado em função da concentração de uréia.

Os espectros de dicroísmo circular de 10 μ M da proteína 6xHis-HBx(1-154) na presença de concentrações crescentes de uréia estão organizados na figura 37.

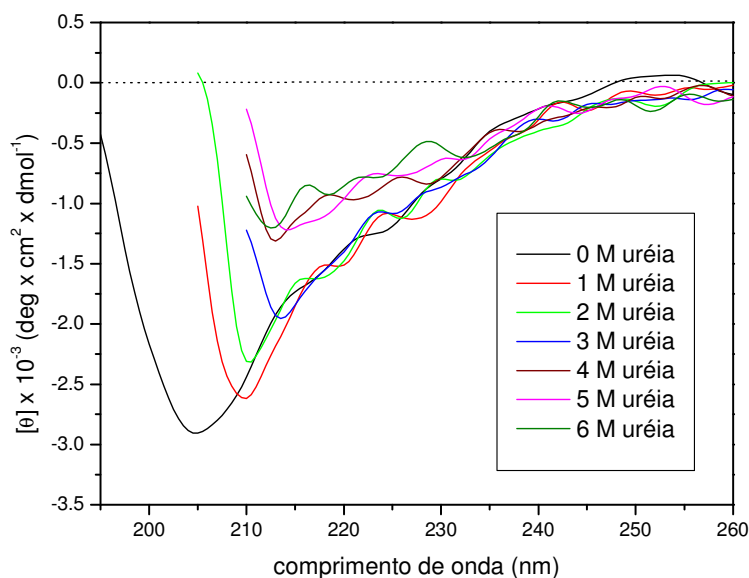
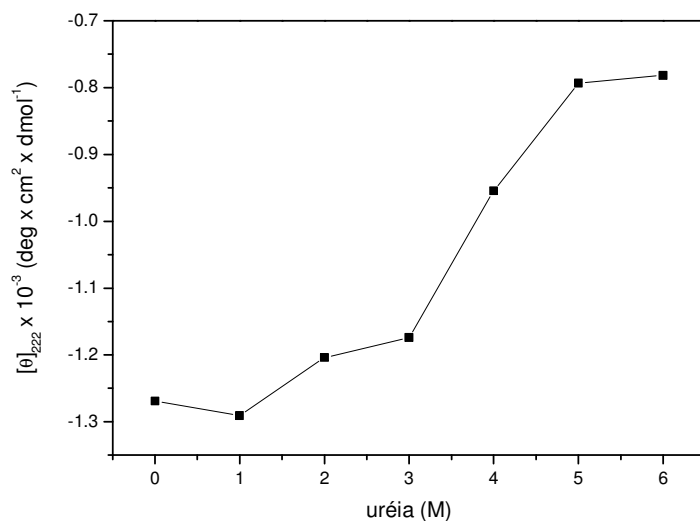
A**B**

Figura 37 – A) Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) na presença de concentrações crescentes de uréia. Cerca de 10 μ M da proteína dialisada contra água pH 6,0 foi diluída em diferentes concentrações de uréia e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C. **B)** Variação no valor de $[\theta]_{222}$ em função da concentração de uréia.

Observou-se uma variação nos espectros de CD da proteína 6xHis-HBx(1-154) na presença de concentrações crescentes de uréia, com o deslocamento do valor do mínimo do espectro de 205 nm (sem uréia; linha preta; Figura 37A) para 212,5 nm (uréia 6 M; linha verde escura; Figura 37A). O valor de $[\theta]_{222}$ monitorado durante o processo de desenovelamento da proteína 6xHis-HBx(1-154) (Figura 37B) indicou que ocorreu uma diminuição do conteúdo de estrutura secundária na presença de uréia 6 M. As estimativas de porcentagem de estrutura secundária foram calculadas através do programa *CDNN deconvolution* (Tabela 19).

Tabela 19 – Variação na estrutura secundária de 10 μ M da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de uréia. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,6% para as medidas adquiridas de 210 a 260 nm.

Adição de uréia	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 M	5,2	40,9	5,4	19,4	35,4
1 M	5,2	40,7	5,4	19,4	35,3
2 M	5,0	41,3	5,3	19,3	35,2
3 M	4,8	42,0	5,3	19,3	35,2
4 M	4,4	43,6	5,3	19,3	35,2
5 M	4,3	44,0	5,3	19,2	35,2
6 M	4,3	43,8	5,3	19,3	35,2

Os dados da tabela 19 mostraram que a estimativa de porcentagem de estrutura randômica (*random coil*) foi mantida em ~35% durante o processo de desenovelamento da proteína 6xHis-HBx(1-154) pela adição de concentrações crescentes de uréia. Entretanto, o formato dos espectros de CD e a variação no valor de $[\theta]_{222}$ indicaram que a proteína de fusão apresentava uma estruturação parcial em água pH 6,0 (Figura 37).

Para a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142), a desnaturação por uréia causou o deslocamento do valor do mínimo do espectro de CD de 202,5 nm (sem uréia; linha preta) para 213,5 nm (uréia 6 M; linha verde escura) (Figura 38A).

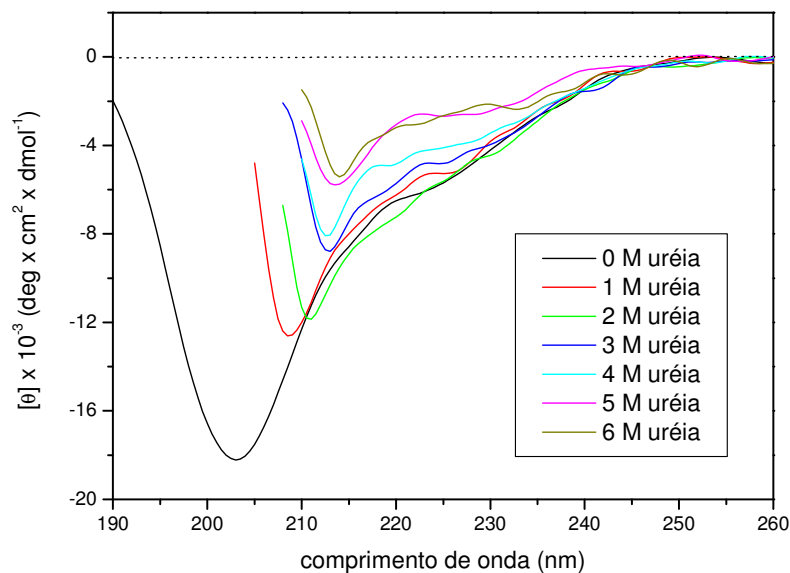
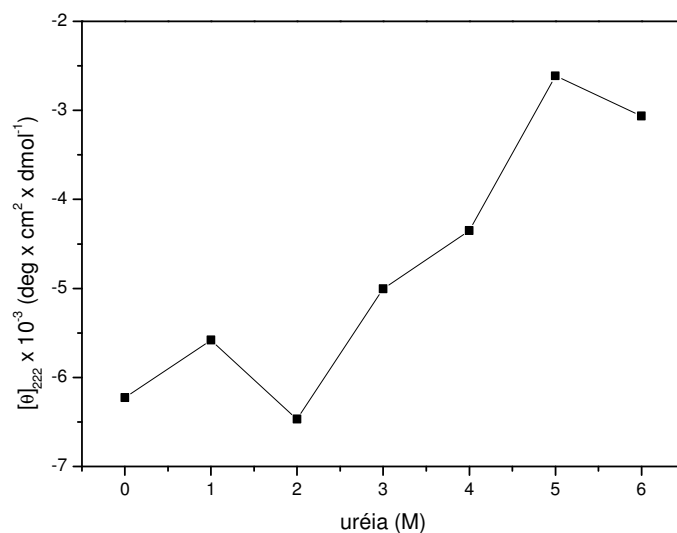
A**B**

Figura 38 – A) Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença de concentrações crescentes de uréia. Cerca de 5 μM da proteína dialisada contra água pH 6,0 foi diluída em diferentes concentrações de uréia e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C. **B)** Variação no valor de $[\theta]_{222}$ em função da concentração de uréia.

A deconvolução dos espectros de CD através do programa *CDNN deconvolution* forneceu valores estimados de porcentagem de estrutura secundária para a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) que foram agrupados na tabela 20.

Tabela 20 – Variação na estrutura secundária de 5 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de uréia. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,6% para as medidas adquiridas de 210 a 260 nm.

Adição de uréia	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 M	17,6	20,9	5,6	18,9	34,1
1 M	16,6	21,8	5,6	19,0	34,3
2 M	18,6	20,0	5,6	18,7	33,8
3 M	12,2	26,5	5,5	18,8	34,2
4 M	10,4	29,0	5,5	19,0	34,5
5 M	7,5	34,5	5,4	19,1	34,9
6 M	6,7	36,2	5,4	19,0	34,7

Como foi observada para a proteína 6xHis-HBx(1-154), a adição de uréia à proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) não alterou a porcentagem de estrutura secundária randômica, mas observou-se uma redução na estimativa de porcentagem de estrutura secundária em alfa-hélice (Tabela 20). Acompanhando a variação dos valores de $[\theta]_{222}$ versus concentração de uréia (Figura 38B), observou-se que ocorreu a desestruturação da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença de concentrações crescentes de uréia, sugerindo que a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) apresentava uma parcial estruturação secundária em água pH 6,0.

No caso da proteína sem resíduos de cisteína, 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) (Figura 39), a adição de concentrações crescentes de uréia causou um deslocamento do mínimo do espectro de CD de 200,5 nm (sem uréia; linha preta) para 213 nm (uréia 6 M; linha verde escura) (Figura 39A). Observou-se também a variação nos valores de $[\theta]_{222}$ (Figura 39B) em função da adição de uréia, em concordância com os dados obtidos para as proteínas 6xHis-HBx(1-154) (Figura 37, Tabela 19) e 6xHis-mini-HBx(19-142) (Figura 38, Tabela 20).

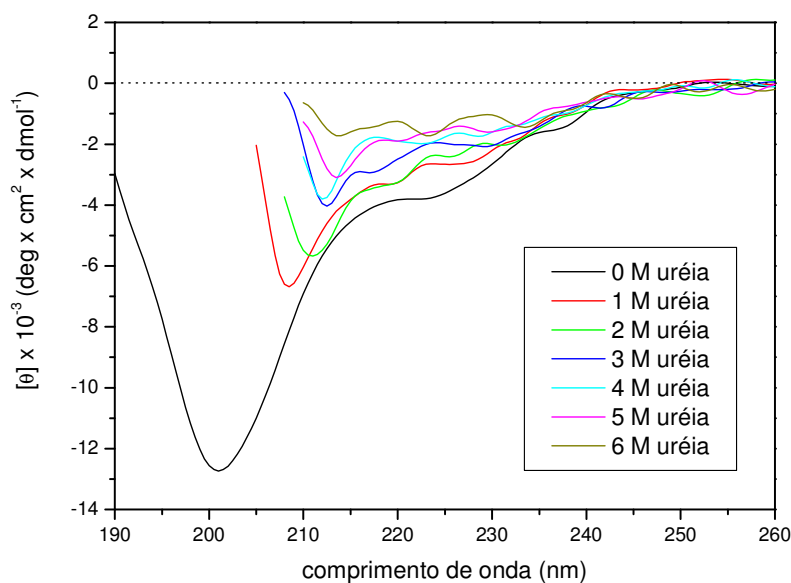
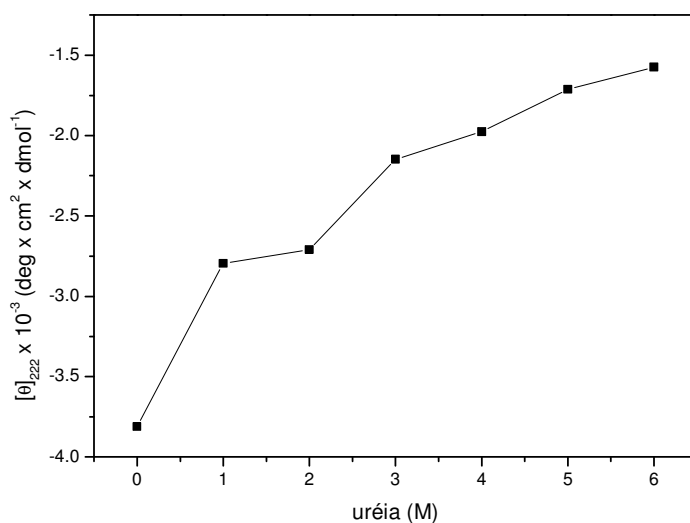
A**B**

Figura 39 – A) Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de uréia. Cerca de 5 μM da proteína dialisada contra água pH 6,0 foi diluída em diferentes concentrações de uréia e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C. **B)** Variação no valor de $[\theta]_{222}$ em função da concentração de uréia.

As estimativas de porcentagem de estrutura secundária calculadas através do programa *CDNN deconvolution* para a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de uréia foram agrupadas na tabela 21.

Tabela 21 – Variação na estrutura secundária de 5 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de uréia. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,6% para as medidas adquiridas de 210 a 260 nm.

Adição de uréia	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 M	9,5	30,7	5,5	19,3	35,0
1 M	8,1	33,3	5,5	19,3	35,2
2 M	7,7	33,9	5,4	19,3	35,0
3 M	6,2	37,7	5,4	19,2	35,0
4 M	5,8	38,8	5,4	19,3	35,1
5 M	5,3	40,4	5,3	19,2	35,0
6 M	4,7	42,4	5,3	19,2	35,0

Os dados da tabela 21 mostraram que a estimativa de porcentagem de estrutura secundária randômica da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) não foi alterada com a adição de concentrações crescentes de uréia. Entretanto, observou-se o aumento da porcentagem de estrutura em folha beta antiparalela, por causa de uma possível agregação da proteína de fusão durante a sua desestruturação na presença de uréia.

Os espectros de dicroísmo circular obtidos para as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) indicaram que as três proteínas apresentavam uma estruturação parcial em água pH 6,0 (tampão A), uma vez que na presença de uréia 6 M esta estruturação parcial foi perdida.

4.9.3 A proteína HBx apresentou uma relativa estabilidade térmica

Para uma análise da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) frente à variação de temperatura, a amostra de proteína dialisada contra água pH 6,0 foi utilizada nos ensaios de dicroísmo circular. Os espectros de CD no UV distante da proteína em diferentes temperaturas (Figura 40) apresentaram diferenças, havendo um deslocamento no valor do mínimo da banda negativa com o aquecimento de 4 °C para 90 °C (Figura 40A), seguido de resfriamento de 70 °C para 4 °C (Figura 40B).

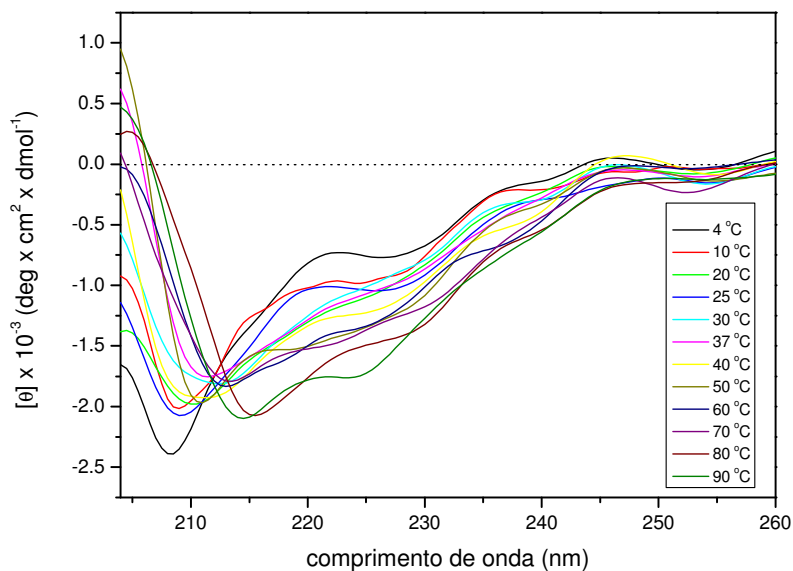
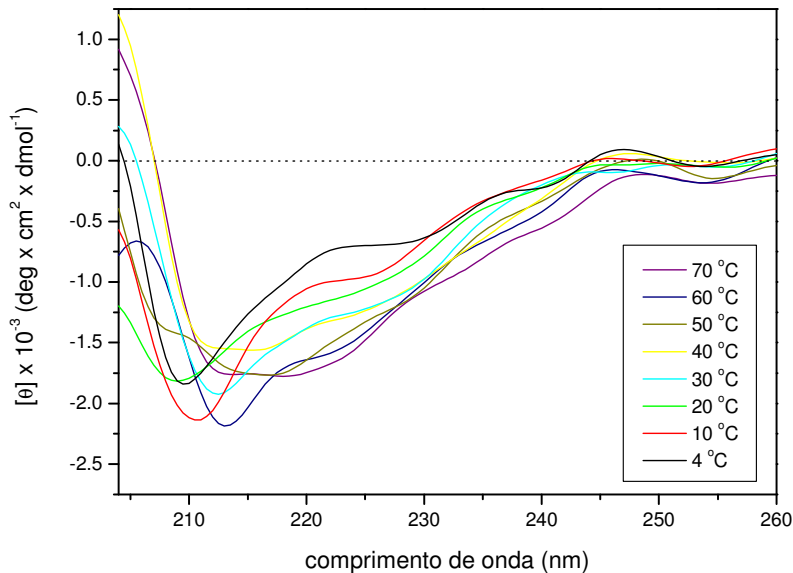
A**B**

Figura 40 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante de 10 μ M da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) em água pH 6,0, durante o aquecimento de 4 °C a 90 °C (**A**) seguido de resfriamento de 70 °C a 4 °C (**B**).

A 4 °C, o valor do mínimo do espectro de dicroísmo circular da proteína 6xHis-HBx(1-154) era de 208,5 nm (Figura 40A, linha preta). Com o aquecimento da proteína de fusão a 90 °C, essa banda do espectro de CD foi deslocada para 214,5 nm (Figura 40A, linha verde oliva), e o valor de elipticidade molar $[\theta]_{222}$ apresentou uma variação de 1.000 deg x cm² x dmol⁻¹.

Os formatos dos espectros de CD da proteína 6xHis-HBx(1-154) a 4 °C e a 90 °C evidenciam uma alteração na estrutura secundária da proteína de fusão (Figura 40A). Com o resfriamento da proteína de 70 °C a 4 °C (Figura 40B), o valor do mínimo do espectro de CD da proteína a 4 °C voltou a ser de 209,5 nm. As porcentagens estimadas de estrutura secundária da proteína 6xHis-HBx(1-154) com a variação da temperatura foram agrupadas na tabela 22.

Tabela 22 – Variação na estrutura secundária de 10 µM da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra água pH 6,0 em algumas temperaturas. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,39% para as medidas adquiridas de 205 a 260 nm.

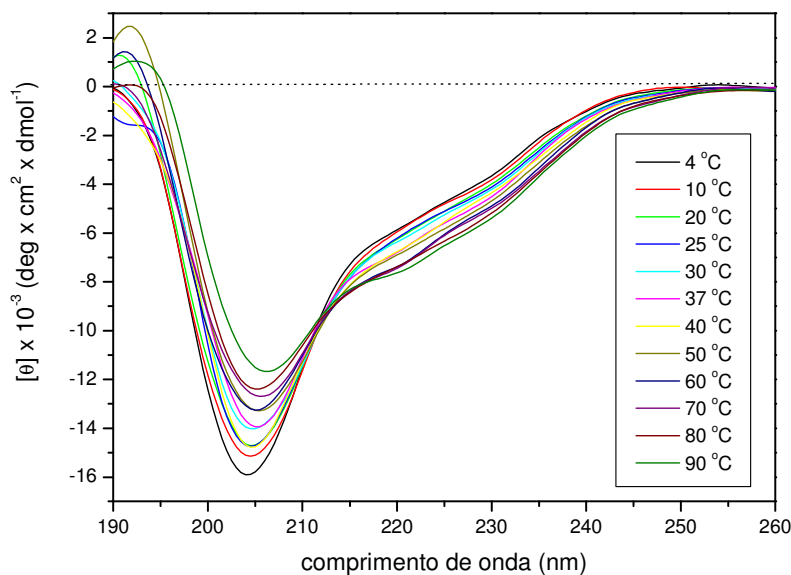
Temperatura	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
4 °C	4,4	40,5	5,3	20,1	35,1
25 °C	4,5	40,4	5,3	19,6	35,0
50 °C	5,0	40,3	5,4	18,4	34,9
90 °C	5,1	40,3	5,4	18,1	34,8
50 °C	4,9	40,0	5,3	19,1	35,0
20 °C	4,6	40,4	5,3	19,5	35,0
4 °C	4,4	41,4	5,3	19,2	35,0

Com o aumento da temperatura de 4 °C para 90 °C, e posterior redução da temperatura de 70 °C para 4 °C, a estimativa da porcentagem de estrutura secundária randômica não se alterou (Tabela 22). O conteúdo de estrutura secundária da proteína 6xHis-HBx(1-154) resfriada a 4 °C voltou a apresentar valores próximos aos valores iniciais, podendo indicar que a proteína retornou à sua conformação inicial.

No caso da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142), os experimentos de dicroísmo circular em diferentes temperaturas mostraram que a proteína de fusão apresentou uma estabilidade térmica diferenciada da proteína 6xHis-HBx(1-154) (Figura 40). Com o aquecimento de 4 °C para 90 °C, o mínimo do espectro de CD da proteína 6xHis-mini-

HBx(19-142) foi deslocado de 204 para 206 nm (Figura 41A) e, após o resfriamento de 90 °C para 4 °C, o mínimo se manteve em torno de 206,5 nm (Figura 41B).

A



B

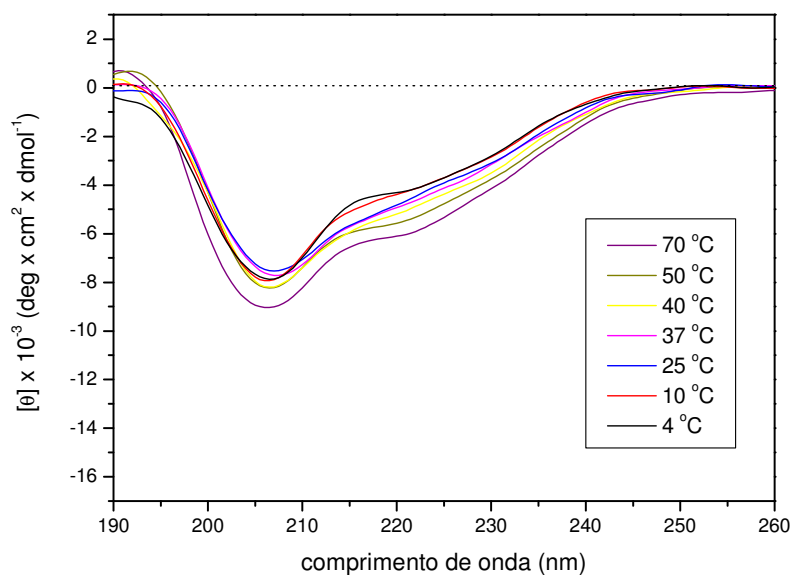


Figura 41 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante de 10 μM da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) em água pH 6,0, durante o aquecimento de 4 °C a 90 °C (**A**) seguido de resfriamento de 70 °C a 4 °C (**B**).

A deconvolução dos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) nas diferentes temperaturas mostrou uma pequena variação nos valores das porcentagens de estrutura secundária em alfa-hélice e folha beta antiparalela, sem haver uma alteração significativa no conteúdo de estrutura randômica (Tabela 23).

Tabela 23 – Variação na estrutura secundária de 10 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra água pH 6,0 em algumas temperaturas. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,39% para as medidas adquiridas de 205 a 260 nm.

Temperatura	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
4 °C	13,5	19,2	5,2	27,1	34,9
25 °C	14,3	18,9	5,3	25,9	34,6
50 °C	15,9	18,3	5,3	24,4	34,2
90 °C	17,2	18,2	5,4	22,6	33,8
50 °C	11,9	24,3	5,4	21,9	34,9
25 °C	10,4	26,2	5,4	22,0	35,1
4 °C	9,7	26,9	5,4	22,6	35,3

Com o aquecimento de 4 °C para 90 °C, o valor de $[\theta]_{222}$ variou cerca de 2.000 deg x cm² x dmol⁻¹, mas não retornou ao valor inicial após o resfriamento a 4 °C (Figura 41), como foi observado para a proteína 6xHis-HBx(1-154) (Figura 40). Além disso, o valor de $[\theta]_{\min}$ a 4 °C antes do aquecimento apresentou um valor de -15.900 deg x cm² x dmol⁻¹ (Figura 41A) enquanto que após o resfriamento passou a ser de -7.878 deg x cm² x dmol⁻¹, a metade do valor de $[\theta]_{\min}$ inicial (Figura 41B). Este dado poderia sugerir que a proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) alterou a sua estrutura secundária, agregando-se durante o processo de aquecimento e resfriamento, uma vez que a porcentagem de estrutura secundária do tipo folha beta antiparalela variou de 19,2% a 26,9% após o processo de aquecimento a 90 °C seguido de resfriamento a 4 °C (Tabela 23).

Para a proteína sem resíduos de cisteína, 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), o aquecimento de 4 °C a 90 °C seguido de resfriamento a 4 °C não causou uma variação no valor do mínimo dos espectros de CD (Figura 42). Durante o aquecimento da proteína de fusão, o valor de $[\theta]_{222}$ variou cerca de 1.000 deg x cm² x dmol⁻¹ (Figura 42A), mas retornou a um valor próximo ao inicial após o resfriamento a 4 °C (Figura 42B), como foi observado para a proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) (Figura 40).

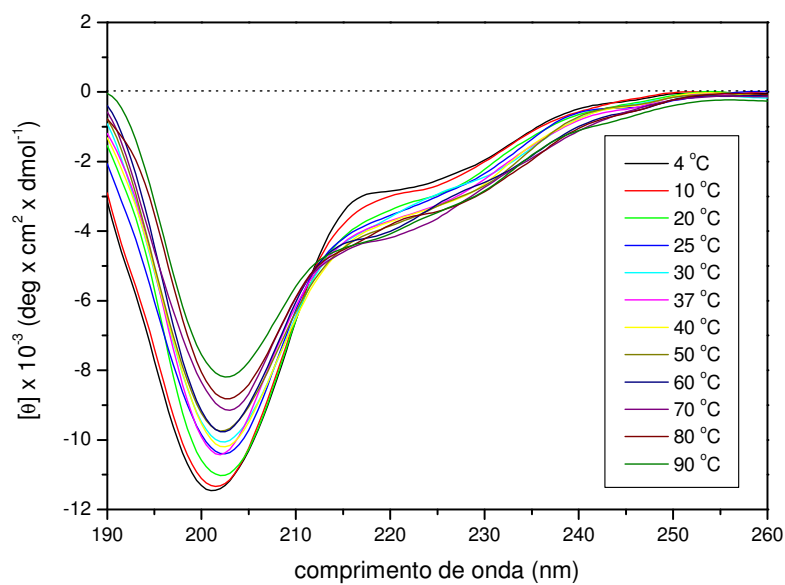
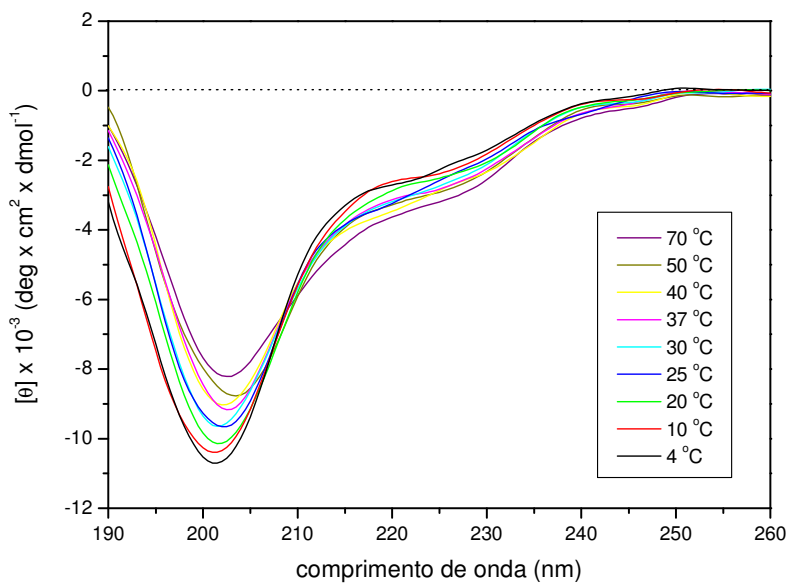
A**B**

Figura 42 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante de 10 μM da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0, durante o aquecimento de 4 °C a 90 °C (A) seguido de resfriamento de 70 °C a 4 °C (B).

O formato do espectro de CD sofreu uma alteração com o aquecimento da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), com o aparecimento de uma banda em torno de 225 nm (Figura 42A). Contudo, após o resfriamento de 70 °C a 4 °C, o formato do espectro de CD a 4 °C voltou a ser próximo ao espectro inicial, antes do aquecimento (Figura 42B). A deconvolução dos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) nas diferentes temperaturas mostrou que não houve uma alteração no conteúdo de estrutura secundária randômica (Tabela 24), assim como foi observado para as proteínas 6xHis-HBx (Tabela 22) e 6xHis-mini-HBx(19-142) (Tabela 23).

Tabela 24 – Variação na estrutura secundária de 10 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 em algumas temperaturas. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,39% para as medidas adquiridas de 205 a 260 nm.

Temperatura	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
4 °C	7,2	29,6	5,2	24,6	35,6
25 °C	7,9	28,8	5,3	24,2	35,5
50 °C	8,5	28,3	5,3	23,1	35,4
90 °C	8,3	29,2	5,3	22,0	35,1
50 °C	7,6	29,8	5,3	23,2	35,4
25 °C	7,2	30,6	5,3	23,3	35,5
4 °C	6,6	31,4	5,2	19,4	35,3

O experimento de estabilidade térmica realizado com a proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) (Figura 42) mostrou que as alterações na estrutura secundária da proteína foram reversíveis, sugerindo que a proteína parece ser relativamente estável à desnaturação térmica. No caso da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) (Figura 41), ocorreu uma “perda” da sua estrutura secundária (Tabela 23), diferentemente do que foi observado para as proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154) (Figura 40, Tabela 22) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) (Figura 42, Tabela 24).

4.9.4 A adição de TFE causou alterações estruturais na proteína HBx

As proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisadas contra água pH 6,0 apresentaram uma estruturação

parcial e uma relativa estabilidade térmica, como mostraram os ensaios de dicroísmo circular. Com o intuito de avaliar se haveria um “ganho” de estrutura secundária do tipo alfa-hélice, as proteínas de fusão foram tituladas com concentrações crescentes de TFE, e os espectros de dicroísmo circular foram coletados. O TFE é utilizado como um co-solvente para favorecer a formação de ligações de hidrogênio, causando alterações nas interações hidrofóbicas, e estabilizando as estruturas secundárias em alfa-hélice e beta-*turn* (Buck, 1998; Gast *et al.*, 1999).

No caso da proteína 6xHis-HBx(1-154), observou-se uma mudança na estrutura secundária da proteína com a adição de concentrações crescentes de TFE, uma vez que os espectros de CD antes (linha preta) e depois da adição de 40% de TFE (linha azul) são diferentes (Figura 43A). Na presença de 40% de TFE, o espectro de CD apresentou duas bandas com mínimos em torno de ~210 e ~225 nm, valores próximos aos valores característicos de uma proteína contendo estrutura secundária do tipo alfa-hélice (208 e 222 nm), enquanto que em água (0% TFE) observou-se apenas o mínimo em 210,5 nm. Além disso, o valor de $[\theta]_{222}$ variou cerca de ~4.500 deg x cm² x dmol⁻¹ na presença de 40% de TFE em relação ao valor de $[\theta]_{222}$ para a proteína em água (Figura 43B).

A deconvolução dos espectros de CD da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) na presença de TFE mostrou que ocorreu um aumento da porcentagem de estrutura secundária do tipo alfa-hélice, com concomitante diminuição da porcentagem de estrutura do tipo folha beta antiparalela (Tabela 25). Contudo, a porcentagem de estrutura não definida (*random coil*) não foi alterada com a adição de TFE.

Tabela 25 – Variação na estrutura secundária de 10 µM da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de TFE. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,39% para as medidas adquiridas de 205 a 260 nm.

Adição de TFE	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-<i>turn</i>	<i>Random coil</i>
0 %	5,2	38,4	5,3	19,5	34,9
10 %	6,6	35,2	5,4	19,3	34,9
20 %	9,2	30,4	5,5	19,1	34,9
40 %	14,1	24,7	5,6	18,4	34,5

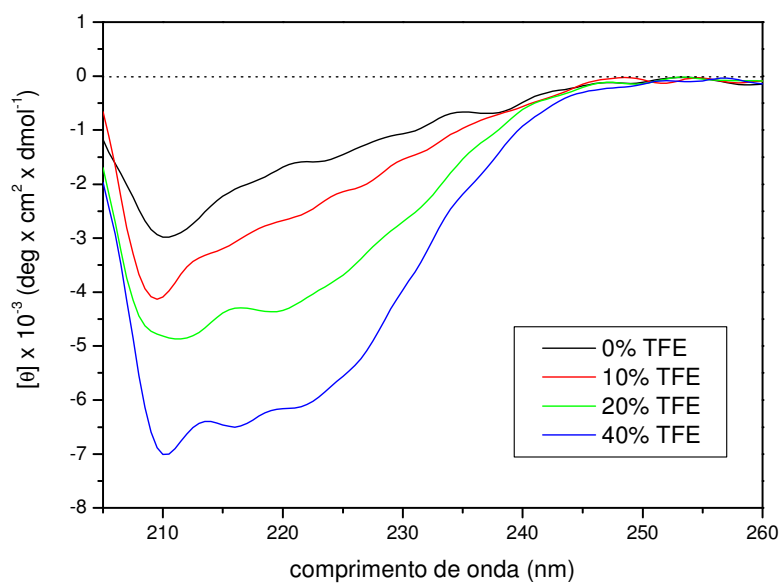
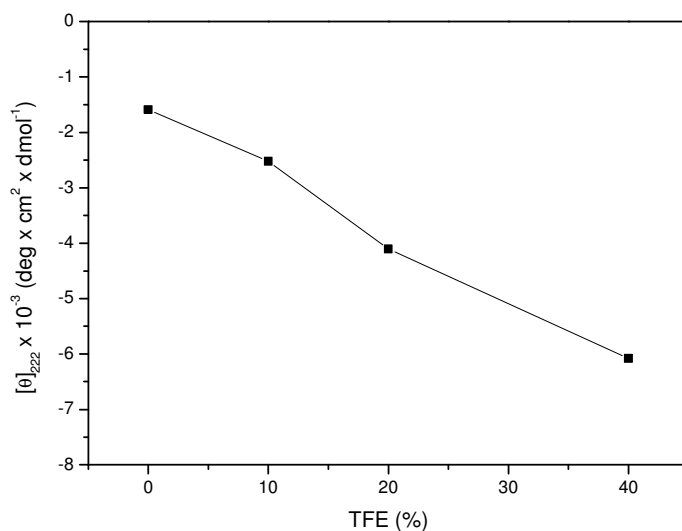
A**B**

Figura 43 – **A)** Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) na presença de concentrações crescentes de TFE. Cerca de 10 μM da proteína dialisada contra água pH 6,0 foi diluída em diferentes concentrações de TFE e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C. **B)** Variação no valor de $[\theta]_{222}$ em função da concentração de TFE.

A adição de TFE à proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) causou um “ganho” de estrutura secundária, com alteração dos formatos dos espectros de CD (Figura 44). Em água (0% TFE), o valor do mínimo do espectro de CD era de 202,5 nm (Figura 44A, linha preta), mas com a adição de TFE, dois mínimos apareceram em torno de 208 e 222 nm, além de um máximo em torno de ~195 nm, valores característicos de proteínas contendo estrutura secundária em alfa-hélice (Figura 44A).

O valor de $[\theta]_{222}$ variou de -6.258 deg x cm² x dmol⁻¹ (0% TFE) para -22.981 deg x cm² x dmol⁻¹ (40% TFE), evidenciando um aumento na estruturação secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) (Figura 44B). A variação na estrutura secundária da proteína de fusão na presença de concentrações crescentes de TFE foi estimada pelo programa *CDNN deconvolution*, e os dados foram agrupados na tabela 26.

Tabela 26 – Variação na estrutura secundária de 5 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de TFE. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,45% para as medidas adquiridas de 200 a 260 nm.

Adição de TFE	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 %	12,5	16,3	4,0	31,6	38,4
5 %	14,3	16,2	4,3	28,7	37,2
10 %	20,5	11,2	4,3	27,4	35,1
20 %	43,4	4,6	4,4	20,0	27,0
30 %	54,4	2,8	4,2	17,6	23,1
40 %	63,0	1,6	3,8	15,8	19,0
50 %	63,1	1,5	3,8	16,3	19,1
80 %	69,9	1,1	3,7	13,6	16,1

Os dados da tabela 26 mostraram que a adição de TFE à proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) promoveu uma maior estruturação da proteína, com o aumento da porcentagem de estrutura secundária em alfa-hélice, e concomitante diminuição das porcentagens de estrutura secundária em folha beta e não definida (*random coil*). Contudo, a partir da adição de 40% TFE não foram observadas alterações significativas nos espectros de CD (Figura 44).

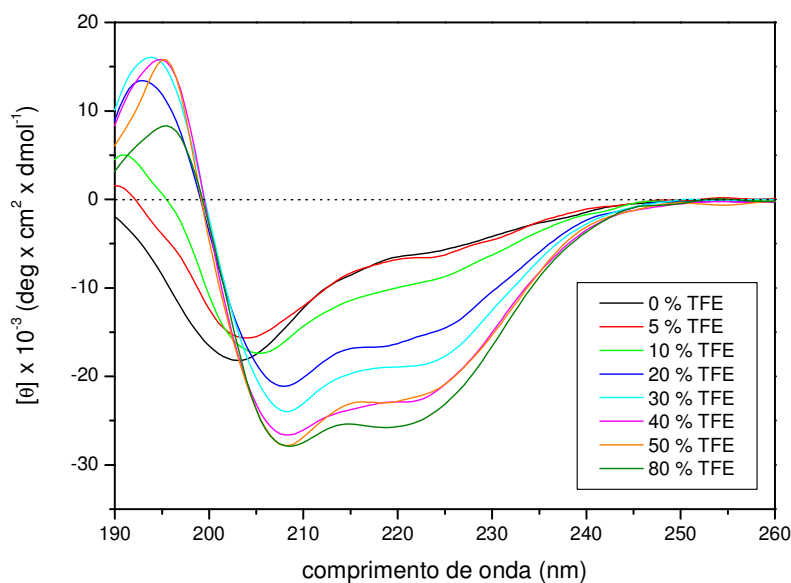
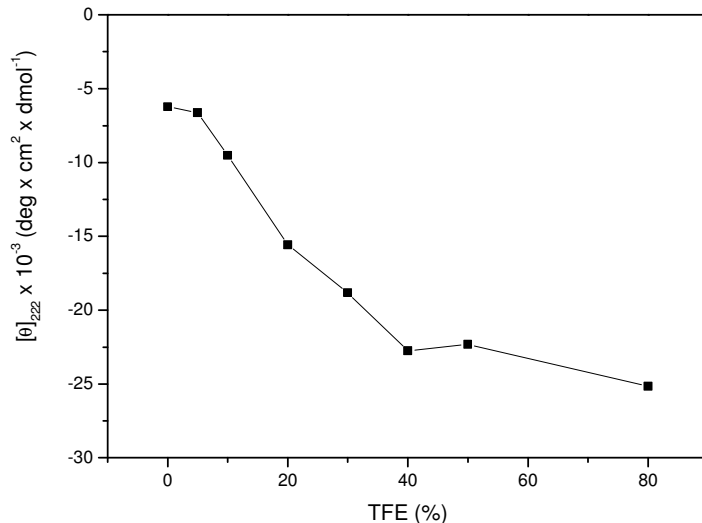
A**B**

Figura 44 – **A)** Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença de concentrações crescentes de TFE. Cerca de 5 μ M da proteína dialisada contra água pH 6,0 foi diluída em diferentes concentrações de TFE e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C. **B)** Variação no valor de $[\theta]_{222}$ em função da concentração de TFE.

O “ganho” de estrutura secundária também foi observado para a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de TFE. Com a adição de concentrações crescentes de TFE, os espectros de CD da proteína de fusão foram se modificando, com o deslocamento do mínimo de 200,5 nm (0% TFE) para 208 e 222 nm na presença de 10% TFE (Figura 45A). O valor de $[\theta]_{222}$ variou de -3.854 (0% TFE) para -14.110 deg x cm² x dmol⁻¹ na presença de 40% TFE (Figura 45B), evidenciando um aumento na estruturação em alfa-hélice da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142). As estimativas de porcentagem de estrutura secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de TFE estão agrupadas na tabela 27.

Tabela 27 – Variação na estrutura secundária de 5 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de TFE. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,2% para as medidas adquiridas de 195 a 260 nm.

Adição de TFE	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 %	8,9	23,6	3,9	26,9	38,2
5 %	10,2	25,6	4,4	24,6	36,3
10 %	17,0	16,3	4,7	24,9	36,5
20 %	38,8	6,2	5,6	19,9	30,6
30 %	45,9	4,0	5,4	18,8	28,7
40 %	39,8	6,1	5,6	19,7	30,0
50 %	41,0	5,3	5,4	19,9	30,6
80 %	35,3	6,3	5,3	20,3	34,2

Os dados da tabela 27 mostraram que a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) apresentou um “ganho” de estrutura secundária em alfa-hélice com a adição de concentrações crescentes de TFE. Contudo, a estimativa de porcentagem de estrutura secundária não definida (*random coil*) ainda contribuiu com mais de 30% para a estruturação da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), o que não foi observado para a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) (Tabela 26). A ausência de resíduos de cisteína na proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) poderia lhe conferir uma maior flexibilidade estrutural, favorecendo uma estruturação randômica (*random coil*), como foi observado nos espectros de CD da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra diferentes tampões (Figura 36).

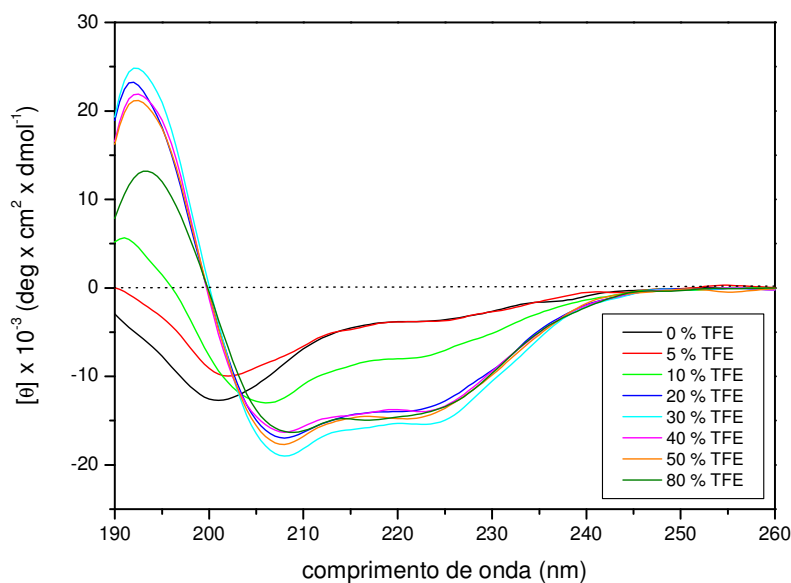
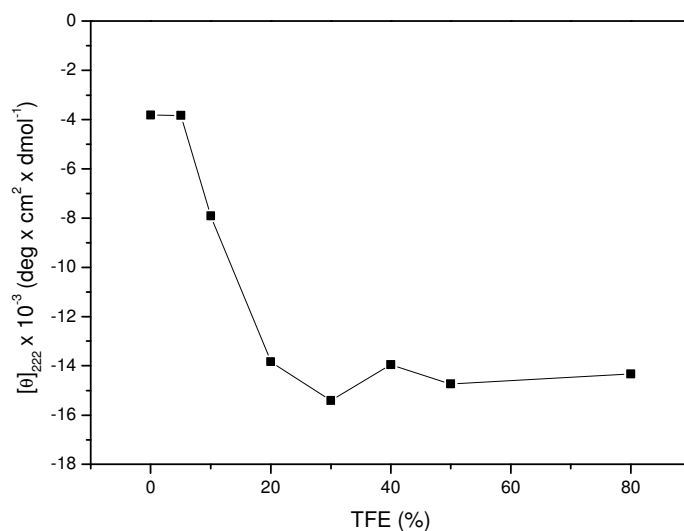
A**B**

Figura 45 – A) Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de TFE. Cerca de 5 μM da proteína dialisada contra água pH 6,0 foi diluída em diferentes concentrações de TFE e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C. **B)** Variação no valor de $[\theta]_{222}$ em função da concentração de TFE.

4.9.5 A adição de SDS alterou a estrutura secundária da proteína HBx

Com o intuito de averiguar se a adição de SDS poderia influenciar na estruturação secundária das proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), foram adquiridos espectros de CD no UV distante a 25 °C das três proteínas dialisadas contra água e na presença de concentrações crescentes de SDS.

Observou-se que a proteína 6xHis-HBx(1-154) alterou a sua estrutura secundária com a adição de SDS (Figura 46), uma vez que os espectros de CD foram se modificando com a adição do detergente, e o seu mínimo foi deslocado de 204,5 nm (sem SDS; linha preta) para 206 nm (na presença de 50 mM de SDS; linha lilás), e um máximo apareceu em torno de 195 nm.

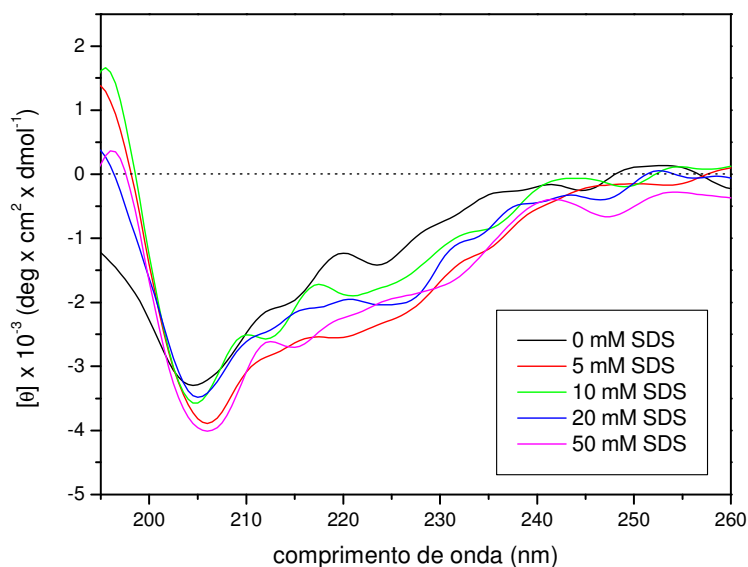


Figura 46 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) na presença de concentrações crescentes de SDS. Cerca de 5 µM da proteína dialisada contra água pH 6,0 foi diluída em diferentes concentrações de SDS e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C.

Utilizando-se o programa *CDNN deconvolution* foi possível estimar a porcentagem de estrutura secundária para cada um dos espectros de CD da proteína de fusão 6xHis-HBx(1-154) na presença de concentrações crescentes de SDS (Tabela 28).

Tabela 28 – Variação na estrutura secundária de 5 μ M da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de SDS. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,2% para as medidas adquiridas de 195 a 260 nm.

Adição de SDS	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 mM	8,3	37,0	5,1	20,0	33,5
5 mM	9,8	34,6	5,3	19,9	33,3
10 mM	9,4	36,5	5,4	19,7	32,6
20 mM	9,1	35,6	5,2	19,9	33,5
50 mM	9,4	35,1	5,4	20,8	36,3

Os dados da tabela 28 sugerem que ocorreu uma pequena alteração na estrutura secundária da proteína 6xHis-HBx(1-154) com a adição de SDS, pois não se observou uma diminuição da porcentagem de estrutura randômica (*random coil*). Comparando os valores das estimativas de porcentagem de estrutura secundária das tabelas 25 e 28, observou-se que a adição de TFE à proteína 6xHis-HBx(1-154) causou maiores alterações na porcentagem de estrutura secundária em alfa-hélice (Tabela 25) do que a adição de SDS (Tabela 28).

No caso da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142), a adição de SDS também causou uma sutil modificação na estrutura secundária da proteína de fusão. Com a adição de concentrações crescentes de SDS, ocorreu um aumento da intensidade do sinal dos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142), mas não houve um deslocamento do mínimo do espectro, que permaneceu em torno de 207,5-208 nm, tanto na ausência (0 mM SDS, linha preta) como na presença de SDS (Figura 47). No entanto, o valor de $[\theta]_{222}$ variou de -2.654 deg x cm² x dmol⁻¹ (sem SDS) para -5.316 deg x cm² x dmol⁻¹ na presença de 10 mM de SDS (Figura 47).

As estimativas de porcentagem de estrutura secundária da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença de concentrações crescentes de SDS foram agrupadas na tabela 29.

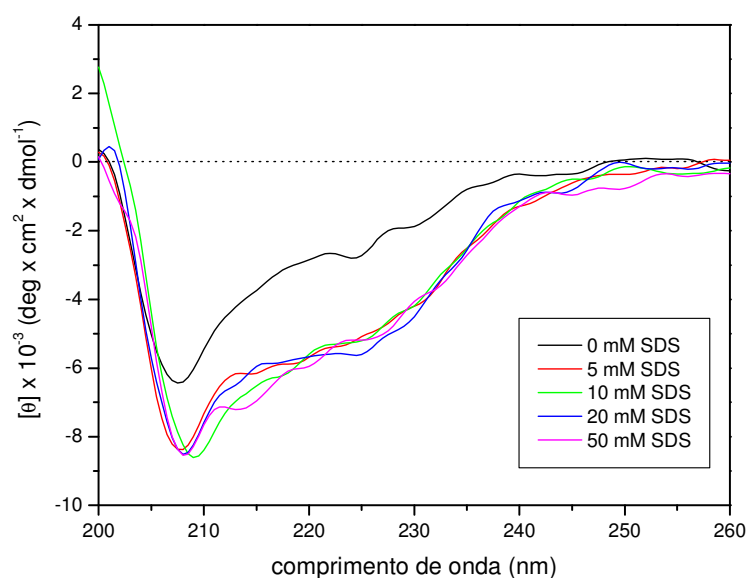


Figura 47 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença de concentrações crescentes de SDS. Cerca de 5 μM da proteína dialisada contra água pH 6,0 foi diluída em diferentes concentrações de SDS e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C.

Tabela 29 – Variação na estrutura secundária de 5 μM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de SDS. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,45% para as medidas adquiridas de 200 a 260 nm.

Adição de SDS	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 mM	11,5	29,8	5,6	19,4	35,1
5 mM	15,7	23,2	5,6	19,0	34,1
10 mM	16,8	23,5	5,8	17,6	33,3
20 mM	16,2	22,8	5,6	18,9	34,0
50 mM	15,2	24,0	5,6	18,7	34,0

Os dados da tabela 29 sugerem que ocorreu uma alteração na estrutura secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) com a adição de SDS, como foi observado pela variação no valor de $[\theta]_{222}$ na presença de SDS (Figura 47). Contudo, a estimativa da

porcentagem de estrutura secundária não definida (*random coil*) foi mantida em torno de ~34%, independentemente da adição de concentrações crescentes de SDS, o que não foi observado com a adição de TFE à proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) (Tabela 26).

A adição de concentrações crescentes de SDS à proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) causou uma estruturação da proteína, com o deslocamento do mínimo do espectro de CD (Figura 48) de ~201 nm (0 mM SDS, linha preta) para 207 nm (50 mM SDS, linha lilás). A variação dos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de SDS (Figura 48) foi semelhante à que foi observada na presença de concentrações crescentes de TFE (Figura 45A).

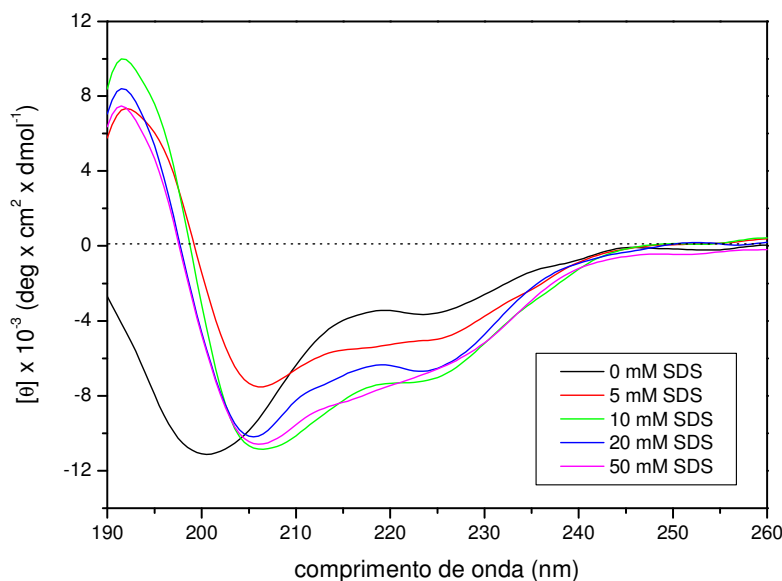


Figura 48 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de SDS. Cerca de 5 µM da proteína dialisada contra água pH 6,0 foi diluída em diferentes concentrações de SDS e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C.

Observou-se também uma alteração no valor de $[\theta]_{222}$ na presença de 10 mM de SDS, que variou de $-3.593 \text{ deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ (0 mM SDS) para $-7.297 \text{ deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ na presença de 10 mM de SDS (Figura 48). As estimativas de porcentagem de estrutura secundária para cada um dos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de SDS foram agrupadas na tabela 30.

Tabela 30 – Variação na estrutura secundária de 5 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de SDS. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,2% para as medidas adquiridas de 195 a 260 nm.

Adição de SDS	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 mM	8,6	24,7	3,9	26,2	38,4
5 mM	15,0	25,4	5,6	20,7	33,1
10 mM	19,4	18,3	5,5	22,0	33,5
20 mM	16,7	20,2	5,2	22,8	34,5
50 mM	17,1	18,8	5,1	22,6	34,9

Os dados da tabela 30 mostraram que a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) alterou a sua estrutura secundária na presença de concentrações crescentes de SDS, mas a porcentagem de estrutura randômica ainda contribuiu com mais de 33% para o conteúdo de estrutura secundária da proteína de fusão. No entanto, apesar da adição 10 mM de SDS ter aumentado a porcentagem de alfa-hélice, a adição de concentrações crescentes de TFE à proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) foi capaz de induzir uma maior estruturação secundária em alfa-hélice (Tabela 27).

4.9.6 A adição do oligonucleotídeo de RNA AU-38 alterou a estrutura secundária da proteína mini-HBx(19-142)

A proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) interagiu com diferentes oligonucleotídeos de RNA ricos em bases “AU” (Tabela 7) através de ensaios de *UV cross-linking* (Figura 24). Com o intuito de verificar se haveria alguma alteração na estrutura secundária da proteína na presença do oligonucleotídeo de RNA AU-38, foram coletados espectros de CD no UV distante a 25 °C da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) incubada com 0,5 pmol do oligonucleotídeo AU-38, em diferentes tempos (Figura 49). Observou-se uma variação nos espectros de CD da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra o tampão B (Tabela 8) na ausência do oligonucleotídeo AU-38 (0 min, linha preta, Figura 49) e na presença de AU-38 (linhas coloridas, Figura 49).

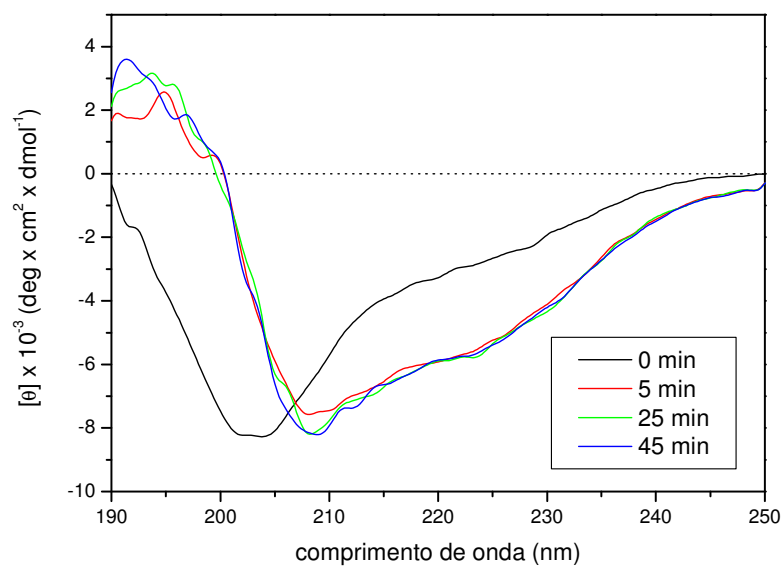


Figura 49 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença do oligonucleotídeo de RNA AU-38. Cerca de 15 μ M da proteína dialisada contra tampão B, foi incubada com de 0,5 pmol do oligonucleotídeo de RNA AU-38 e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 5, 25 e 45 minutos de incubação a 25 °C.

Com a adição do oligonucleotídeo de RNA AU-38, a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) alterou a sua estrutura secundária, com o deslocamento do mínimo da curva de 204 nm (sem AU-38) para 208 nm (após a adição de AU-38), e concomitante variação no valor de $[\theta]_{222}$ de -2920 (sem AU-38) para -5691 $\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ (Figura 49). As estimativas de porcentagem de estrutura secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) na presença de AU-38 foram agrupadas na tabela 31.

Tabela 31 – Variação na estrutura secundária de 15 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra o tampão B na presença de 0,5 pmol do oligonucleotídeo de RNA AU-38 em diferentes tempos de incubação. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,39% para as medidas adquiridas de 205 a 260 nm.

Tempo de incubação	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 min	7,5	30,4	5,3	22,9	35,5
5 min	12,8	24,1	5,5	20,5	34,5
25 min	13,2	23,6	5,5	20,6	34,5
45 min	13,1	23,4	5,5	20,9	34,5

Os dados da tabela 31 mostraram que ocorreu um aumento da porcentagem de estrutura secundária em alfa-hélice, com a incubação por 45 minutos da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) com o oligonucleotídeo de RNA AU-38. No entanto, a porcentagem de estrutura não definida (*random coil*) foi mantida em torno de 34-35%, como foi observado para a adição de concentrações crescentes de SDS à proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) (Tabela 29).

4.9.7 A adição de NaCl não alterou a estrutura secundária da proteína mini-HBx(-Cys)(19-142)

Com o intuito de averiguar se o aumento da força iônica poderia influenciar na estrutura secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), foram adquiridos espectros de CD no UV distante a 25 °C da proteína de fusão sem cisteínas na presença de concentrações crescentes de NaCl (Figura 50).

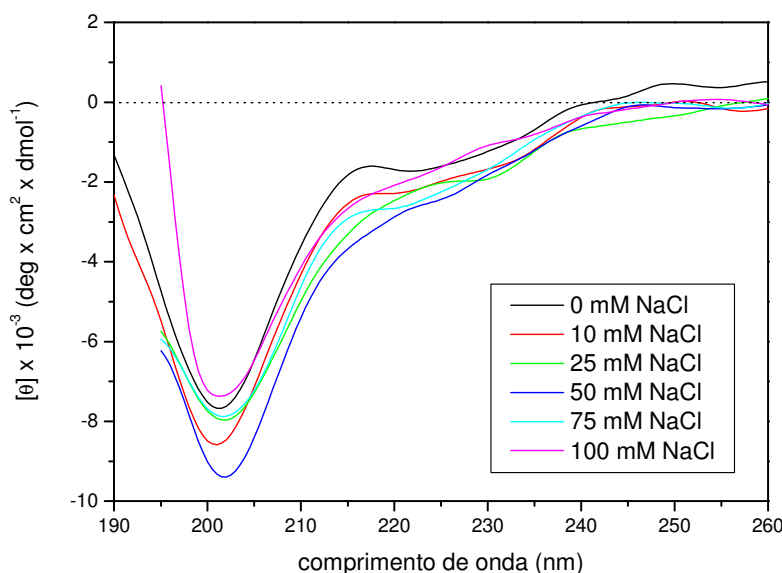


Figura 50 – Espectros de dicroísmo circular no UV distante a 25 °C da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de NaCl. Cerca de 5 μM da proteína dialisada contra água foi diluída em diferentes concentrações de NaCl e os espectros de dicroísmo circular foram coletados após 2 horas de incubação a 25 °C.

Observou-se que a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água não alterou a sua estrutura secundária com a adição de NaCl, pois os espectros de CD pouco se modificaram com a adição de sal, com o deslocamento do mínimo do espectro de 201,5 nm (sem NaCl, linha preta) para 203 nm (na presença de 100 mM de NaCl, linha lilás) (Figura 50). As porcentagens estimadas de estrutura secundária para cada um dos espectros de dicroísmo circular da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de concentrações crescentes de NaCl foram agrupadas na tabela 32.

Tabela 32 – Variação na estrutura secundária de 5 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 na presença de concentrações crescentes de NaCl. Os valores são dados em porcentagem (%), e o erro é de 6,2% para as medidas adquiridas de 195-260 nm.

Adição de NaCl	Alfa-hélice	Folha beta antiparalela	Folha beta paralela	Beta-turn	Random coil
0 mM	7,9	31,9	4,4	23,3	35,5
10 mM	8,0	30,3	4,3	23,8	36,1
25 mM	8,2	30,3	4,4	23,4	35,9
50 mM	8,5	28,3	4,2	24,4	36,4
75 mM	8,3	29,7	4,3	23,7	36,3
100 mM	9,1	32,5	4,8	22,5	33,7

Os dados da tabela 32 sugerem que não ocorreu uma alteração significativa na estrutura secundária da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) com a adição de concentrações crescentes de NaCl, uma vez que as porcentagens de alfa-hélice e de folha beta variaram muito pouco na presença de 100 mM NaCl, assim como a porcentagem de estrutura não definida (*random coil*) (Tabela 32).

4.10 Espectros de emissão de fluorescência

As proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) possuem um único resíduo de triptofano (Trp120) na sua estrutura primária. Este triptofano foi utilizado como uma sonda intrínseca de fluorescência, para acompanhar as variações nas estruturas terciárias das proteínas de fusão frente a diferentes condições experimentais (variação no tampão de diálise, pH, temperatura, concentração salina, adição de uréia, etc). Após a excitação do resíduo de triptofano a

295 nm, foram coletados os espectros de emissão de fluorescência a 25 °C das três proteínas dialisadas contra os diferentes tampões listados na tabela 8.

No caso da proteína 6xHis-HBx(1-154), os espectros de emissão de fluorescência mostraram que o resíduo de triptofano estava parcialmente “enterrado” no núcleo hidrofóbico da proteína dialisada contra o tampão I (Figura 51). Contudo, para a proteína dialisada contra os tampões A e C, o máximo de emissão de fluorescência do triptofano deslocou-se para 341 nm (Tabela 33). Este resultado poderia indicar que a diálise sequencial da proteína 6xHis-HBx(1-154) contra o tampão I possibilitou uma maior estruturação protéica, o que não foi observado para as diálises diretas da proteína de fusão contra os tampões A e C.

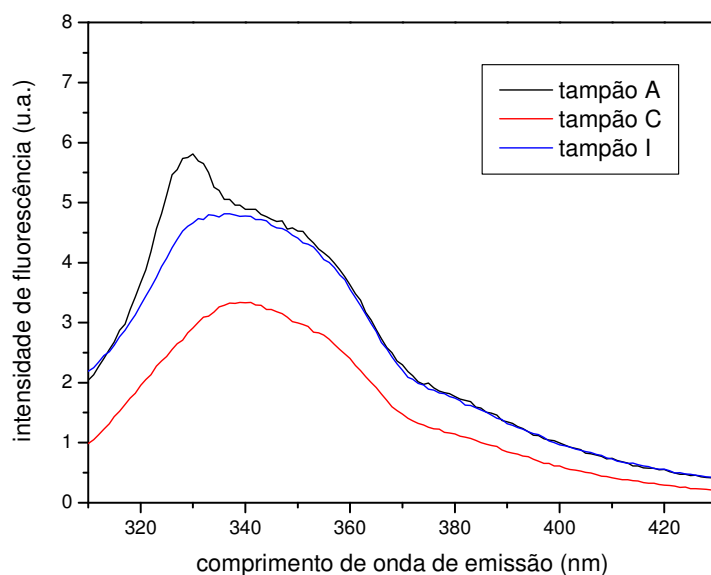


Figura 51 – Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra diferentes tampões.

Tabela 33 – Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM da proteína 6xHis-HBx(1-154) dialisada contra diferentes tampões.

tampão de diálise	$\lambda_{\text{máx}}$ emissão (nm)	intensidade (u.a.)
A	341	4,889
C	341	3,341
I	336	4,818

Para a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142), os espectros de fluorescência mostraram que o valor do máximo de emissão de fluorescência do triptofano foi praticamente o mesmo, independentemente do tampão utilizado na diálise (Figura 52 e Tabela 34).

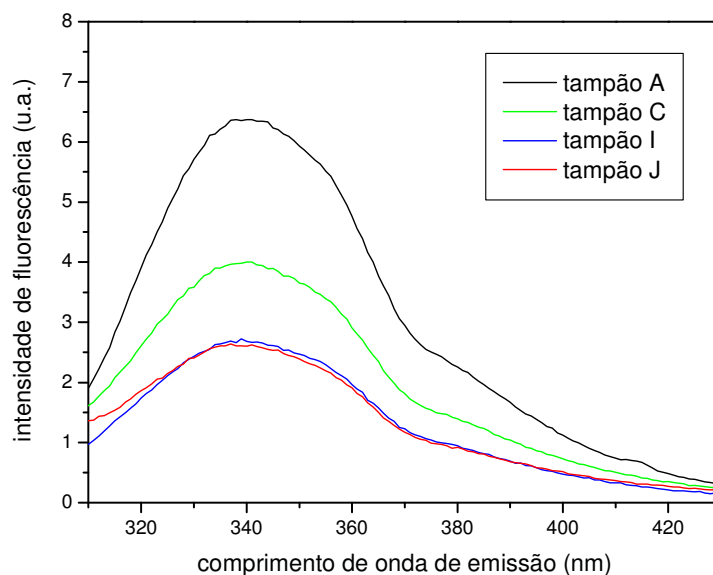


Figura 52 – Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra diferentes tampões.

Tabela 34 – Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra diferentes tampões.

tampão de diálise	$\lambda_{\text{máx}}$ emissão (nm)	intensidade (u.a.)
A	340	6,375
C	340	4,006
I	339	2,723
J	337	2,642

No caso dos espectros de fluorescência da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), o resíduo de triptofano apresentou-se mais exposto ao solvente, independentemente do tampão utilizado na renaturação da proteína (Figura 53 e Tabela 35).

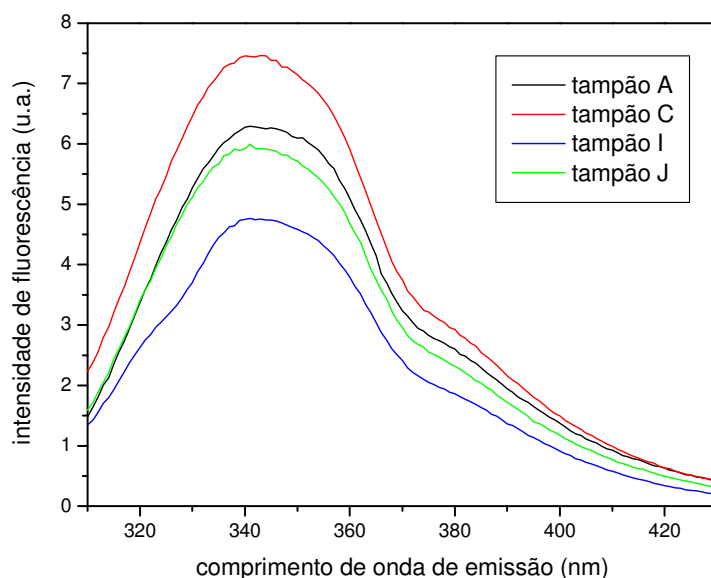


Figura 53 – Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra diferentes tampões.

Tabela 35 – Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra diferentes tampões.

tampão de diálise	$\lambda_{\text{máx}}$ emissão (nm)	intensidade (u.a.)
A	341	6,291
C	343	7,465
I	341	4,764
J	341	5,991

Após a excitação a 295 nm do único resíduo de triptofano das proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) que foram dialisadas contra água pH 6,0 (tampão A), os espectros de emissão de fluorescência de 2 μ M das proteínas foram coletados entre 310 e 430 nm (Figura 54). Em água, os valores do máximo de emissão de fluorescência das três proteínas indicaram que o resíduo de triptofano encontrava-se parcialmente “enterrado” no núcleo hidrofóbico das proteínas 6xHis-HBx(1-154) e 6xHis-mini-HBx(19-142), e mais exposto na proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) (Figura 54, linhas contínuas).

Com a adição de uréia 6 M, as proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) foram desenoveladas, causando uma maior exposição do resíduo de triptofano ao solvente (Figura 54, linhas pontilhadas). Como consequência ao desenovelamento protéico, o máximo de emissão de fluorescência do resíduo de triptofano foi deslocado para ~350 nm, havendo um aumento da intensidade de emissão de fluorescência (Tabela 36).

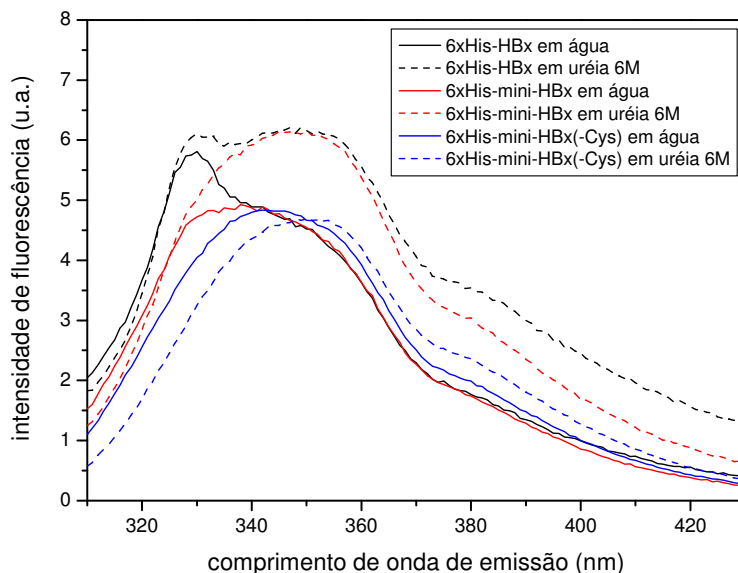


Figura 54 – Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 μ M das proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0, e na presença de uréia 6 M.

Tabela 36 – Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 μ M das proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisadas contra água pH 6,0 e na presença de uréia 6 M.

Proteína de fusão com 6xHis-	em água		em água + uréia 6 M	
	$\lambda_{\text{máx}}$ emissão (nm)	intensidade (u.a.)	$\lambda_{\text{máx}}$ emissão (nm)	intensidade (u.a.)
HBx(1-154)	338	4,985	349	6,211
mini-HBx(19-142)	338	4,926	350	6,147
mini-HBx(-Cys) (19-142)	342	4,834	348	4,694

Os dados da tabela 36 sugerem que as proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) apresentavam uma estruturação parcial em água uma vez que, após a adição de uréia 6 M, o máximo de emissão de fluorescência do resíduo de triptofano foi deslocado para maiores comprimentos de onda (“*red shift*”). Estes dados estão em concordância com os experimentos de CD realizados na ausência e presença de concentrações crescentes de uréia, onde foi observado que as três proteínas “perderam” a sua parcial estruturação secundária na presença de uréia 6 M (item 4.9.2).

Com o intuito de comprovar a parcial estruturação das proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), foram realizados experimentos de emissão de fluorescência com o corante ANS. O ANS é uma molécula apolar que interage com as regiões hidrofóbicas das proteínas quando estas regiões estão “protegidas” da água. Após a excitação do ANS a 360 nm, os espectros de emissão de fluorescência foram coletados para as três proteínas em água pH 6,0 (tampão A), e na presença de 24 μ M de ANS (Figura 55).

No caso da proteína 6xHis-HBx(1-154) (Figura 55A), observou-se um aumento de sete vezes na intensidade de fluorescência da emissão do ANS com a interação deste com a proteína de fusão, quando comparada com a emissão do ANS em água. O valor do máximo de emissão de fluorescência do ANS foi deslocado para menores comprimentos de onda (“*blue shift*”) na presença da proteína de fusão, passando de 520 nm para 482 nm (Tabela 37).

Contudo, a adição do corante ANS às proteínas 6xHis-mini-HBx(19-142) (Figura 55B) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) (Figura 55C) causou um aumento de ~3,3 vezes na intensidade de emissão de fluorescência do corante ANS devido à sua interação com as regiões hidrofóbicas das proteínas parcialmente estruturadas em água. O valor do máximo de emissão de fluorescência do ANS foi deslocado de 519 nm (em água) para 492 nm (na presença da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142)), e de 518 nm (em água) para 489 nm (na presença da proteína sem resíduos de cisteína, 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142)) (Tabela 37).

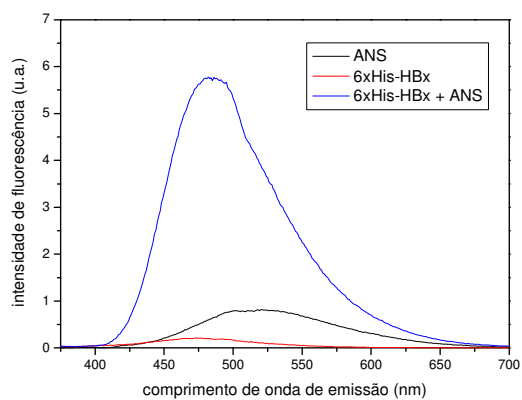
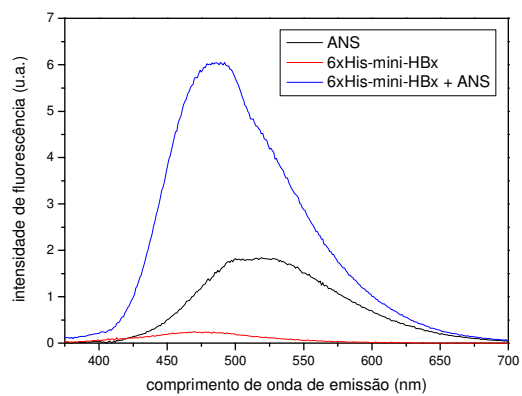
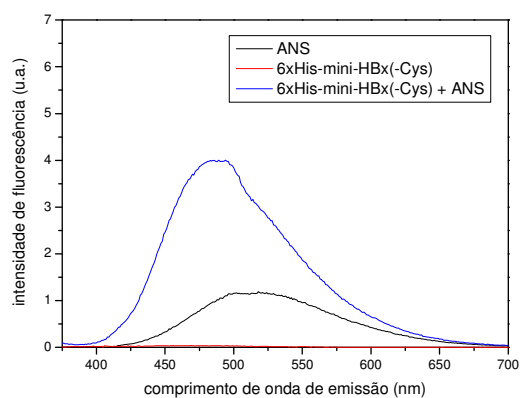
A**B****C**

Figura 55 – Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 μ M das proteínas de fusão 6xHis-HBx(1-154) (A), 6xHis-mini-HBx(19-142) (B) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) (C) dialisadas contra água pH 6,0, e na presença de 24 μ M de ANS.

Tabela 37 – Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 µM das proteínas 6xHis-HBx(1-154), 6xHis-mini-HBx(19-142) e 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisadas contra água pH 6,0 e na presença de 24 µM de ANS.

Proteína de fusão com 6xHis-	ANS em água		proteína em água		proteína + ANS	
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	intensidade (u.a.)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	intensidade (u.a.)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	intensidade (u.a.)
HBx (1-154)	520	0,817	473	0,213	482	5,777
mini-HBx (19-142)	519	1,840	480	0,243	492	6,051
mini-HBx (-Cys)(19-142)	518	1,187	456	0,042	489	4,008

Os resultados obtidos com os ensaios de fluorescência com o corante ANS sugerem que as três proteínas de fusão encontravam-se parcialmente estruturadas em água, em concordância com os experimentos de dicroísmo circular realizados. A interação do corante apolar ANS com as regiões hidrofóbicas das proteínas de fusão foi possível devido à estruturação parcial destas, uma vez que em estruturas nativas o núcleo hidrofóbico das proteínas fica inacessível ao corante, e não seriam observadas as emissões de fluorescência desta molécula.

Após a excitação a 280 nm, foi coletado o espectro de emissão de fluorescência da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra o tampão B, que apresentou um máximo de emissão em torno de ~340 nm (Figura 56). Na presença de uréia 8 M, a proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) foi desnaturada, causando uma maior exposição do resíduo de triptofano ao solvente, com o conseqüente aumento da sua intensidade de emissão de fluorescência (Figura 56).

Com a adição de concentrações crescentes de uréia à proteína 6xHis-mini-HBx(19-142), observou-se um aumento do máximo de intensidade dos espectros de emissão de fluorescência, com o deslocamento do comprimento de onda de emissão de 340 nm para ~350 nm na presença de uréia 8 M (Tabela 38).

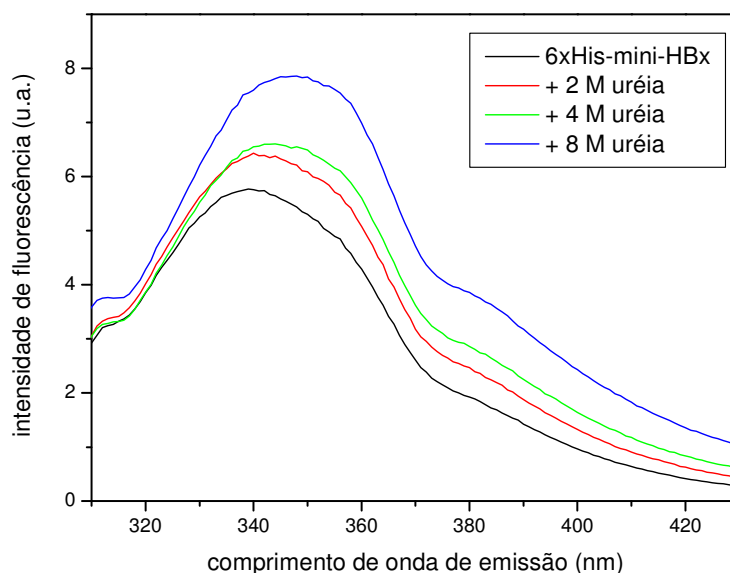


Figura 56 – Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra o tampão B e na presença de concentrações crescentes de uréia.

Tabela 38 – Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 2 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada contra o tampão B e na presença de concentrações crescentes de uréia.

concentração de uréia	$\lambda_{\text{máx}}$ emissão (nm)	intensidade (u.a.)
0 M	339	5,772
2 M	340	6,432
4 M	344	6,607
8 M	348	7,860

Os espectros de emissão de fluorescência da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada sequencialmente contra o tampão D mostraram que o resíduo de triptofano ficou menos exposto ao solvente aquoso, com a remoção da uréia durante as diálises sequenciais (Figura 57). Os dados obtidos com os espectros de fluorescência da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada sequencialmente contra o tampão D foram agrupados na tabela 39.

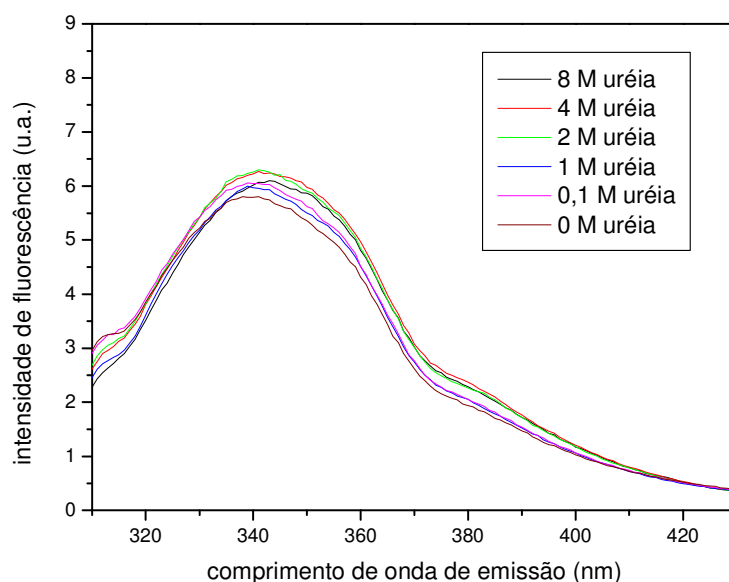


Figura 57 – Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C de 4 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada sequencialmente contra o tampão D contendo concentrações decrescentes de uréia.

Tabela 39 – Dados de emissão de fluorescência a 25 °C de 4 µM da proteína 6xHis-mini-HBx(19-142) dialisada sequencialmente contra o tampão D.

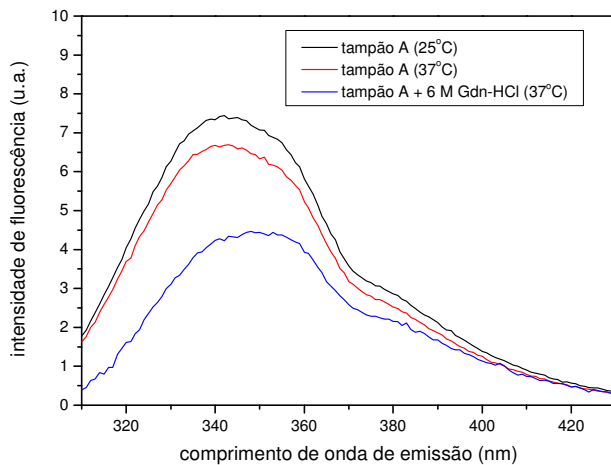
concentração de uréia	$\lambda_{\text{máx}}$ emissão (nm)	intensidade (u.a.)
8 M	343	6,100
4 M	341	6,274
2 M	341	6,298
1 M	339	5,998
0,1 M	339	6,058
0 M	338	5,801

Os dados da tabela 39 mostraram que a proteína adquiriu uma maior estruturação, durante o processo de diálise sequencial, de modo que o resíduo de triptofano ficou menos exposto ao solvente, com o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência de 343 nm (Figura 57, linha preta) para 338 nm (Figura 57, linha marrom).

No caso da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 (tampão A), os espectros de emissão intrínseca de fluorescência foram coletados a 25 °C

e a 37 °C, após a excitação a 295 nm do resíduo de triptofano (Figura 58A). A variação da temperatura não influenciou o valor do máximo de emissão de fluorescência, mas a adição de 6 M Gdn-HCl causou o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ de 343 para 348 nm (Tabela 40).

A



B

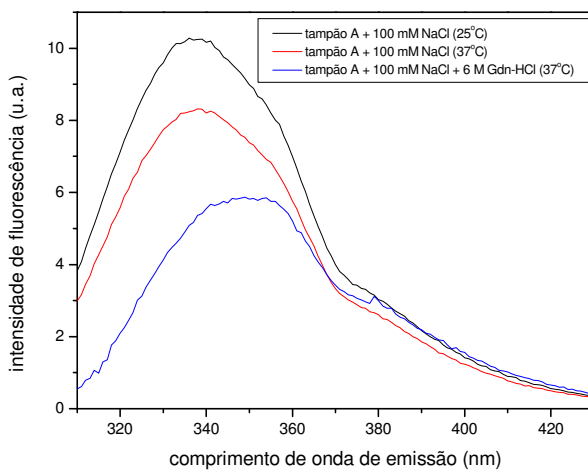


Figura 58 – Espectros de emissão de fluorescência a 25 °C e a 37 °C de 2 μ M da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 (**A**) e na presença de 100 mM NaCl (**B**).

Contudo, após a adição de 100 mM de NaCl à proteína de fusão, o resíduo de triptofano ficou mais “protegido” (Figura 58B), pois o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência variou cerca de 5-6 nm para menores comprimentos de onda (“*blue shift*”) em comparação com o espectro de emissão de fluorescência da proteína em água (Figura 58A).

A variação da temperatura nos experimentos não causou uma variação no valor do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência do triptofano como foi mostrado na figura 58. Os dados obtidos dos espectros de emissão de fluorescência da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0 (tampão A) na presença de 100 mM de NaCl e de 6 M Gdn-HCl foram organizados na tabela 40.

Tabela 40 – Dados de emissão de fluorescência a 25 °C e a 37 °C de 2 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) dialisada contra água pH 6,0, e na presença de 100 mM NaCl e de 6 M Gdn-HCl.

temperatura	condição da amostra	emissão de fluorescência	
		λ_{max} (nm)	intensidade (u.a.)
25 °C	água pH 6,0	342	7,440
	+ 100 mM NaCl	336	10,284
37 °C	água pH 6,0	343	6,689
	+ 100 mM NaCl	338	8,316
37 °C	+ 6 M Gdn-HCl	348	4,461
	+ 100 mM NaCl + 6 M Gdn-HCl	349	5,865

A adição de 6 M Gdn-HCl (Figura 58) causou a desnaturação da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) e a exposição do resíduo de triptofano ao solvente aquoso. Desta forma, o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de fluorescência a 37 °C variou de 343 a 348 nm em água pura (Figura 58A), e de 338 nm para 349 nm na presença de 100 mM de NaCl (Figura 58B). Os experimentos de dicroísmo circular e de emissão de fluorescência apresentaram uma certa coerência, e sugerem que a proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) encontrava-se parcialmente estruturada em solução aquosa.

4.11 Análise por Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de dicroísmo circular realizados com a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) mostraram que a proteína adquiriu uma maior conteúdo de estrutura secundária em alfa-hélice na presença de concentrações crescentes de TFE (Figura 45, Tabela 27). Verificou-se também através dos espectros de CD e de fluorescência que a proteína de fusão apresentava uma estruturação parcial em água, e uma relativa estabilidade térmica. Como a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) apresentou-se estável em solução aquosa e, devido à sua alta concentração (~400 μ M), foi considerada a possibilidade de se determinar a estrutura da proteína de fusão através de técnicas de RMN.

O espectro de ^1H RMN unidimensional da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em solução aquosa a 25 $^\circ\text{C}$ (Figura 59) indicou que a amostra estava pura, sem contaminantes. Por outro lado, os sinais relativos aos prótons aromáticos e os NHs da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos apareceram entre 6,8 e 7,5 ppm, isolados dos prótons ligados ao nitrogênio da ligação peptídica, que apareceram entre 7,8 e 8,6 ppm.

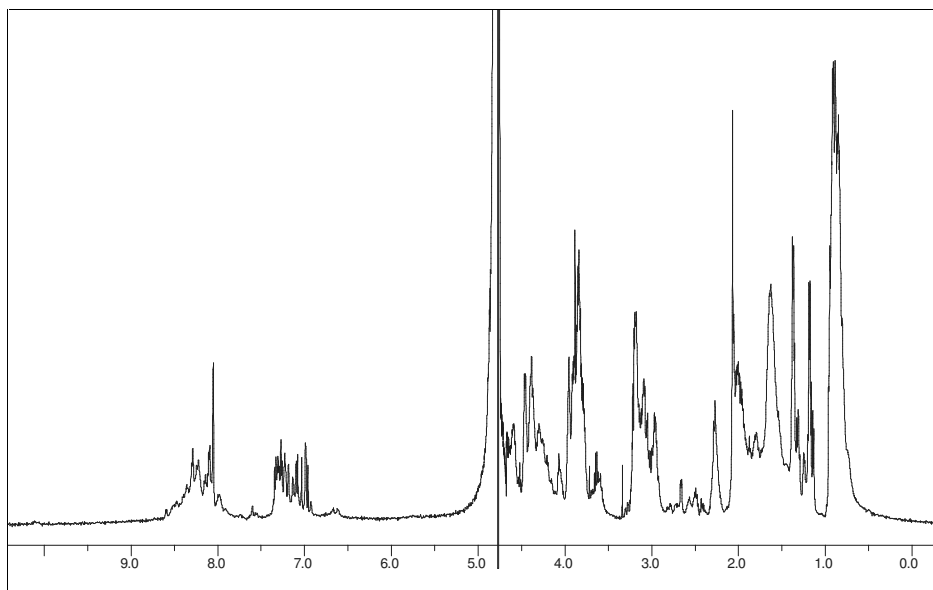


Figura 59 – Espectro de ^1H RMN unidimensional de ~400 μ M da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água / 5% D_2O , pH 6,0 a 25 $^\circ\text{C}$.

A ausência de uma maior dispersão entre os sinais relativos aos prótons aromáticos, os NHs da cadeia lateral e os NHs da ligação peptídica pode indicar que a proteína não apresenta uma estruturação uniforme. Além disso, não foram observados sinais na região abaixo de zero ppm que são indicativos de uma proteína estruturada. Estes dados se mostraram coerentes com as análises obtidas através de espectroscopia de dicroísmo circular, uma vez que se observou um alto conteúdo de estrutura randômica para a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água (Tabela 18).

Como a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) possui apenas um único resíduo de triptofano, observou-se um sinal em torno de 10 ppm relativo a este NH indólico. Ampliando-se o espectro de ^1H RMN nesta região (dados não mostrados), observou-se que o sinal relativo ao único NH indólico apresentava-se duplicado, sugerindo que existem pelo menos duas populações de estruturas para a amostra de proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0.

Como a adição de TFE à proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) promoveu um “ganho” de estrutura secundária em alfa-hélice (Tabela 27), de acordo com os experimentos de dicroísmo circular (Figura 45), resolveu-se adicionar 20% TFE-*d*3 à proteína em água para a aquisição de espectros de ^1H RMN uni e bidimensionais.

O espectro de ^1H RMN unidimensional da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de 20% TFE-*d*3 adquirido a 25 °C (Figura 60) indicou que a amostra estava pura. Entretanto, os sinais relativos aos prótons aromáticos e os NHs da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos apareceram entre 7,0 e 7,5 ppm, isolados dos prótons ligados ao nitrogênio da ligação peptídica, que apareceram entre 7,8 e 8,6 ppm, como foi observado no espectro de ^1H RMN unidimensional da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água (Figura 59).

Como não foi observada uma maior dispersão entre os sinais relativos aos prótons aromáticos, os NHs da cadeia lateral e os NHs da ligação peptídica, a proteína deve estar parcialmente estruturada, mesmo na presença de 20% TFE (Figura 60). A ausência de sinais abaixo de zero ppm, e a pequena dispersão dos prótons poderiam ser o resultado de uma agregação protéica, em virtude de sua alta concentração (~330 μM).

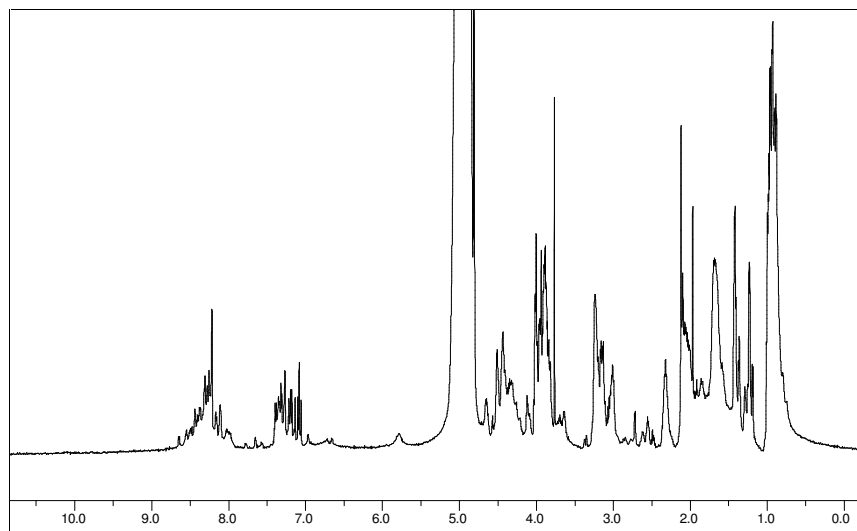


Figura 60 – Espectro de ^1H RMN unidimensional de $\sim 330\ \mu\text{M}$ da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em 20% TFE- d_3 / 5% D_2O , pH 6,0 a $25\ ^\circ\text{C}$.

Apesar dos espectros ^1H RMN unidimensionais adquiridos a $25\ ^\circ\text{C}$ para a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) terem mostrado que a proteína estava parcialmente estruturada em água (Figura 59) e na presença de 20% TFE (Figura 60), resolveu-se investigar se a variação da temperatura de aquisição do espectro e/ou a adição de sal (100 mM NaCl) à amostra de proteína poderia alterar a sua estruturação, como sugerem os experimentos de dicroísmo circular (Figura 50) e de emissão intrínseca de fluorescência (Figura 58). Desta forma, preparou-se uma amostra da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em solução aquosa contendo 100 mM de NaCl, e os espectros de ^1H RMN unidimensionais foram adquiridos variando-se a temperatura de $10\ ^\circ\text{C}$ até $37\ ^\circ\text{C}$ (Figura 61). O valor do deslocamento químico da água foi ajustado conforme a fórmula indicada em material e métodos (item 3.6.4).

A região dos espectros ^1H RMN compreendida entre 6-10 ppm foi ampliada para a comparação dos sinais dos prótons aromáticos e amídicos (NH) da ligação peptídica (Figura 61). Conforme a temperatura foi aumentando, ocorreu uma sutil aproximação dos sinais dos prótons amídicos (8-8,5 ppm) dos prótons aromáticos e NH da cadeia lateral (6,8-7,4 ppm), o que poderia indicar uma alteração da estruturação protéica, mas a razão

sinal/ruído aumentou e os sinais perderam resolução quando o espectro foi adquirido a 37 °C.

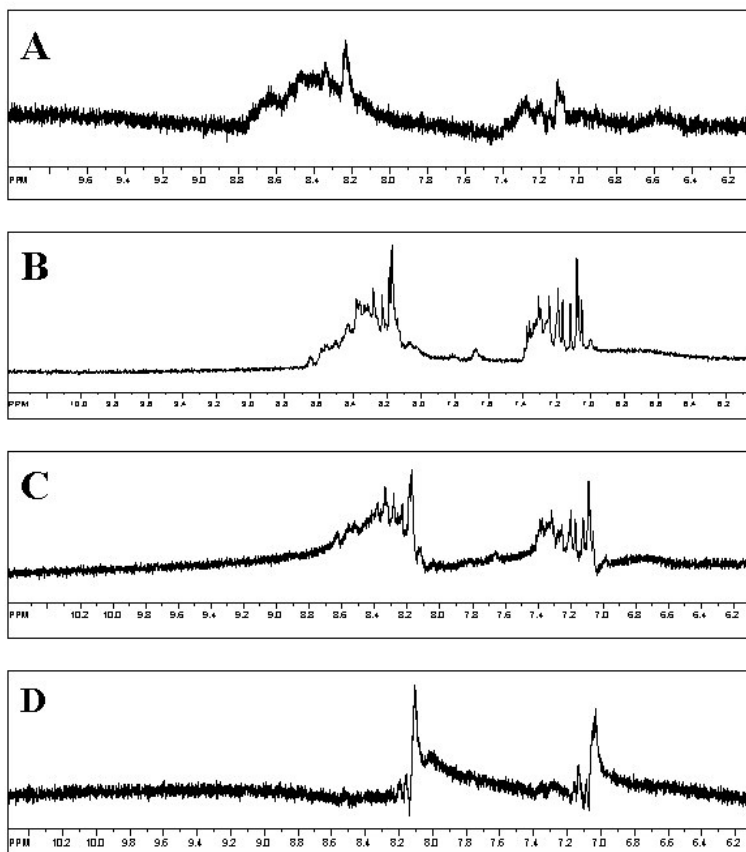


Figura 61 – Espectros de ^1H RMN unidimensionais a 10 °C (A), 20 °C (B), 25 °C (C) e 37 °C (D) de ~400 μM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água pH 6,0 contendo 100 mM NaCl. Os deslocamentos químicos dos prótons estão indicados em ppm e foram referenciados de acordo com o sinal da água ajustado para cada temperatura. A região entre 6-10 ppm foi ampliada para a visualização dos sinais dos prótons aromáticos e NH da cadeia lateral (6,8-7,4 ppm) e os prótons ligados ao nitrogênio da ligação peptídica (8-8,5 ppm).

Apesar dos espectros de ^1H RMN unidimensionais adquiridos a 25 °C em água (Figura 59), ou em 20% TFE (Figura 60), ou na presença de 100 mM de NaCl em diferentes temperaturas (Figura 61), não terem mostrado uma boa dispersão na região dos prótons aromáticos e NH da cadeia lateral e na região do NH da ligação peptídica, foram

realizados experimentos de ^1H RMN bidimensionais (TOCSY e NOESY). O TOCSY permite correlacionar os prótons que estão acoplados entre si, e separados por duas a três ligações covalentes, de modo que existem padrões únicos para determinados aminoácidos como a glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina e treonina (Wüthrich, 1986).

A região de impressão digital (que correlacionam os prótons NH- $\text{H}\alpha$) do espectro de ^1H -TOCSY da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água (Figura 62) mostrou uma aglomeração dos sinais relativos aos prótons. Como a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) possui 145 resíduos, esperaria-se observar cerca de 135 sinais nesta região de impressão digital, uma vez que não são observados o 1º aminoácido (por ser lábil) e os 9 resíduos de prolina (que não possui NH). Entretanto, pouco mais de 60 sinais são observados, o que não permite a atribuição dos prótons (Figura 62).

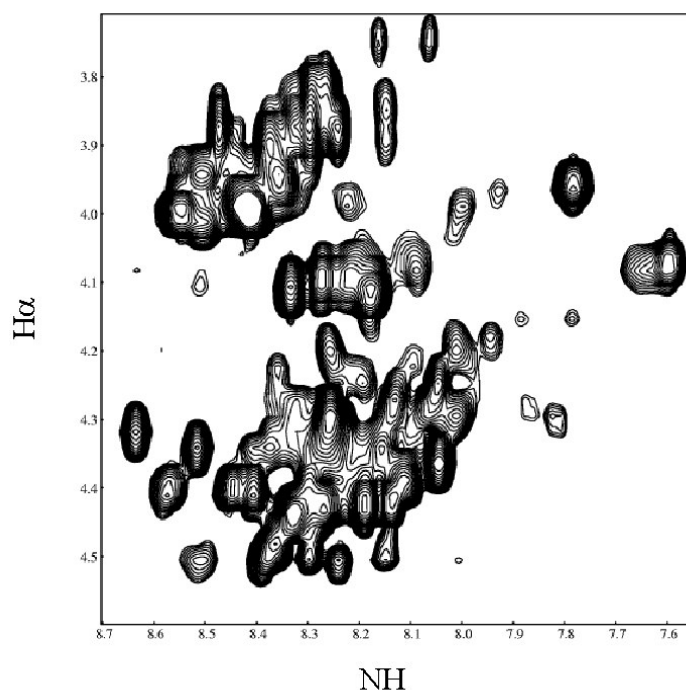


Figura 62 – Região de impressão digital (NH- $\text{H}\alpha$) do espectro de ^1H -TOCSY de ~400 μM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água / 5% D_2O , pH 6,0 a 25 °C.

O experimento ^1H RMN bidimensional NOESY foi realizado para a proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142), mas observou-se também uma grande aglomeração dos sinais relativos aos prótons, o que impede a atribuição dos sinais relativos a esse núcleo (Figura 63).

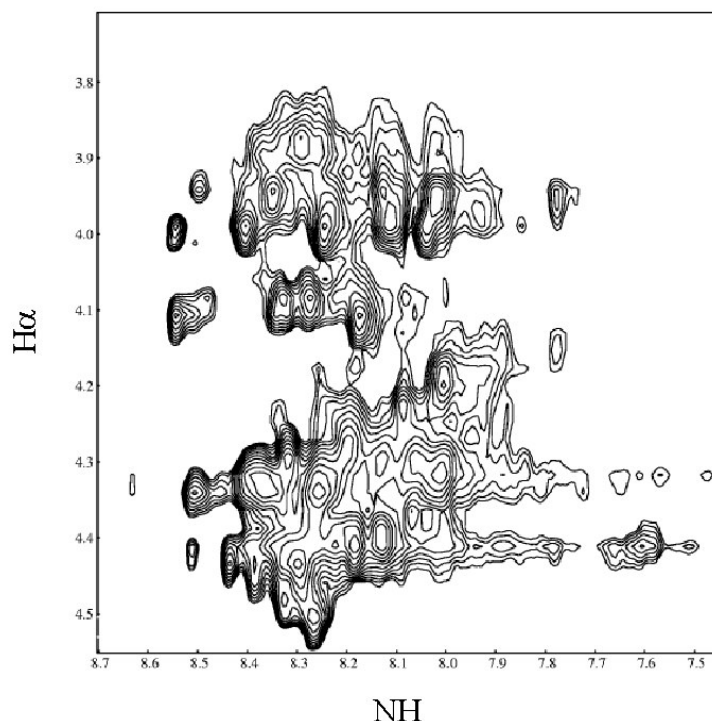


Figura 63 – Região de impressão digital (NH-H α) do espectro de ^1H -NOESY de ~330 μM da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em água / 5% D_2O , pH 6,0 a 25 $^\circ\text{C}$.

Apesar do espectro de ^1H RMN unidimensional da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em 20% TFE-*d*3 (Figura 60) não ter mostrado uma boa dispersão na região dos prótons aromáticos e NH da cadeia lateral e na região do NH da ligação peptídica, adquiriu-se um espectro de ^1H -NOESY (Figura 64). A região de impressão digital do espectro de ^1H -NOESY da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) na presença de 20% TFE-*d*3 (Figura 64) mostrou que existe uma grande aglomeração dos sinais relativos aos prótons, o que impede a atribuição dos mesmos, assim como foi observado nos espectros de ^1H -TOCSY (Figura 62) e de ^1H -NOESY (Figura 63) da proteína de fusão em água.

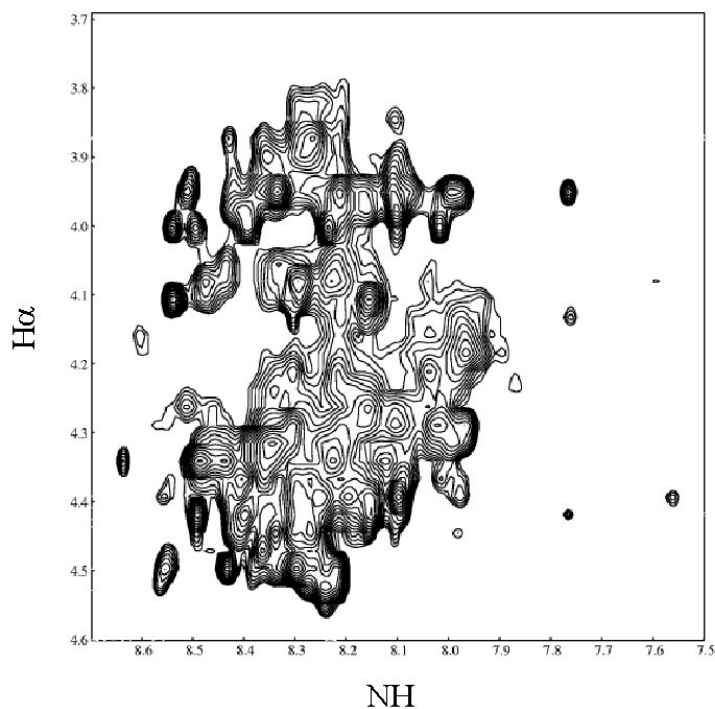


Figura 64 – Região de impressão digital (NH-H α) do espectro de ^1H -NOESY de $\sim 330\ \mu\text{M}$ da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) em 20% TFE- d_3 / 5% D_2O , pH 6,0 a 25 $^\circ\text{C}$.

Apesar da proteína 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) ser estável tanto em solução aquosa como na presença de 20% TFE, numa concentração favorável para a sua determinação estrutural através de técnicas de RMN, não foi possível adquirir espectros bidimensionais (TOCSY e/ou NOESY) que permitissem a atribuição dos prótons, uma vez os sinais relativos a esse núcleo estavam muito aglomerados.

A aglomeração dos sinais observada poderia ser uma consequência de uma parcial estruturação da proteína de fusão 6xHis-mini-HBx(-Cys)(19-142) nas condições experimentais, e/ou de uma agregação protéica em virtude de sua alta concentração (300-400 μM), concentração esta que é necessária para a aquisição dos espectros de RMN.

4.12 Modelagem molecular da proteína HBx por homologia

Através do programa *BLASTp* foi possível encontrar uma proteína com estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios-X, que apresentou 25% de identidade com o fragmento da proteína mini-HBx(-Cys)(7-91). A proteína lipoamida desidrogenase (LipDH) (código de acesso no PDB: 3lad) foi utilizada como “molde” para a construção do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91). A proteína LipDH pertence à família das dissulfeto oxidoreduases da qual também faz parte a enzima glutathione redutase, uma enzima ativa na forma dimérica que contém uma ponte de dissulfeto envolvida na catálise (Mattevi *et al.*, 1991).

O alinhamento da sequência primária e da predição de estrutura secundária do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) com a proteína “molde” LipDH foi manualmente refinado (Figura 65), e cinco modelos foram gerados utilizando-se o programa MODELLER. Os cinco modelos gerados para o fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) foram avaliados pelo pacote de programas PROCHECK, e apenas um modelo apresentou mais de 88% dos resíduos nas regiões mais favorecidas no gráfico de Ramachandran (Figura 66). Outros parâmetros foram avaliados pelo PROCHECK (Figura 67) e o modelo da proteína foi visualizado pelo programa InsightII (Figura 68).

```
Mini-HBx(-Cys): 7 SSGRPFSGSLGTLSSPSPSAVP-TDHGAHLSLRGLPVSAFSSAGPSALRF-TSARRMETTV 66
LipDH:388 ASGRAMAAN-DTAGFVKVIADAKTDVVLGVHVIQPSAELVQQGAIAMEFGTSAEDLGMMV 447

Mini-HBx(-Cys): 67 NAHRMLPKVLHKRTLGLSAMSTTDL 91
LipDH: 448 FAHPALSEALHEAALAVSGHAIHVA 472
```

Figura 65 - Alinhamento refinado manualmente das sequências primárias do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) e da proteína LipDH(388-472), indicando as regiões com estrutura secundária. Em vermelho estão representadas as regiões com estrutura secundária em alfa-hélice e, em azul, as regiões em folha beta. A identidade entre as sequências primárias é de 25% e a similaridade é de 36%.

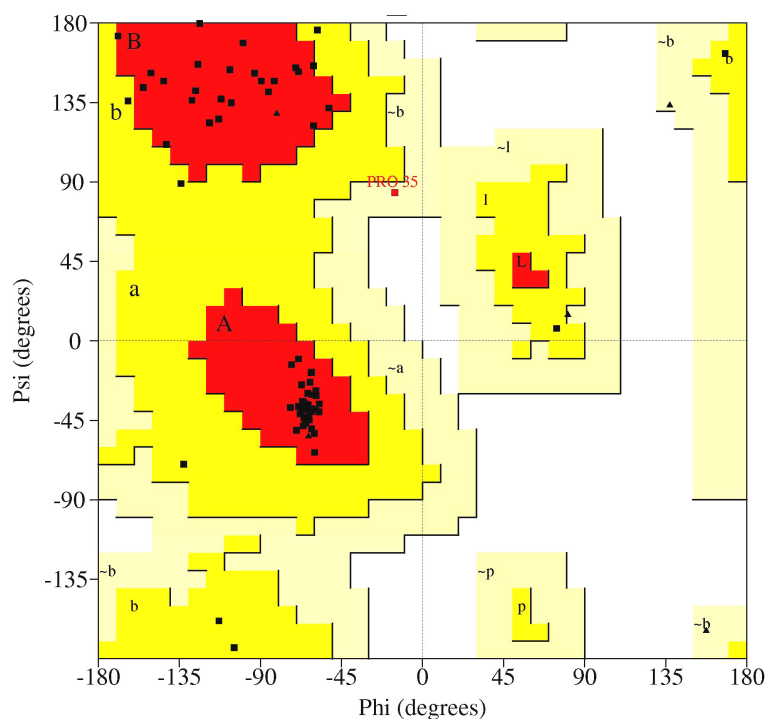


Figura 66 - Gráfico de Ramachandran que avalia a qualidade esteroquímica do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) gerado através do programa MODELLER. Cerca de 60 resíduos de aminoácidos (88,2%) estão nas regiões mais favorecidas, 8 resíduos (11,8%) estão nas regiões adicionais permitidas, e nenhum resíduo está nas regiões proibidas. O número total de resíduos de aminoácidos do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) é de 84.

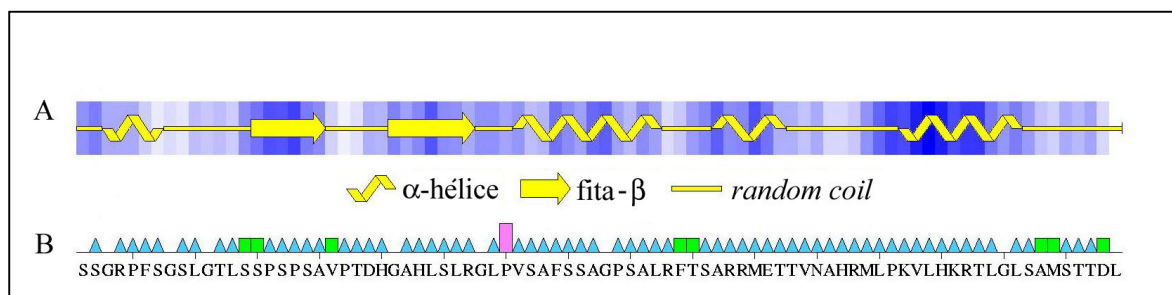


Figura 67 – Parâmetros das propriedades dos resíduos do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) gerado através do programa MODELLER e analisado pelo pacote de programas PROCHECK. **A)** Assinalamento da estrutura secundária do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91), indicando as regiões de maior acessibilidade ao solvente (regiões azuis mais claras) e as mais “escondidas” (regiões azuis mais escuras). **B)** Detalhamento do gráfico de Ramachandran, indicando os resíduos localizados nas regiões mais favorecidas (triângulos azuis), regiões permitidas (quadrados verdes) e generosamente permitidas (retângulo lilás).

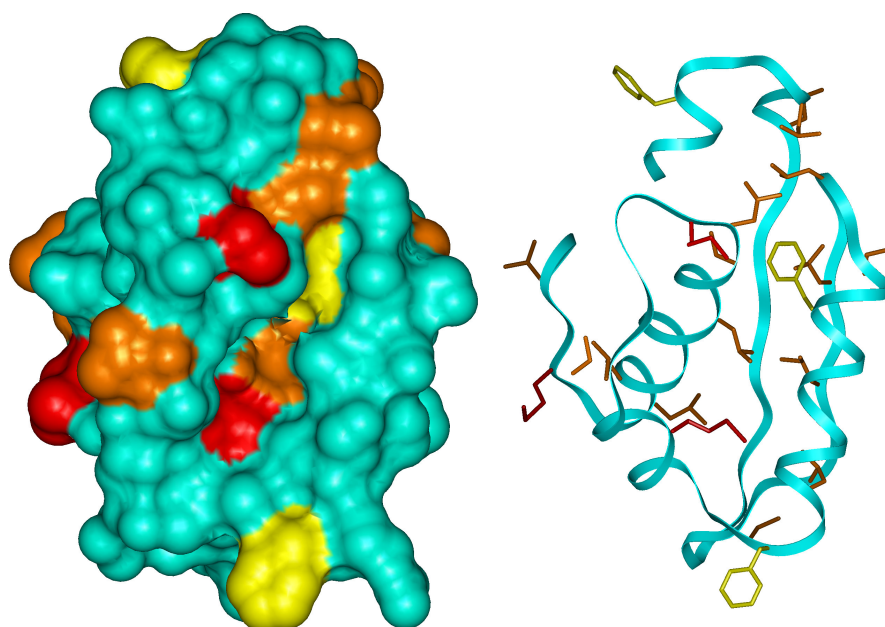
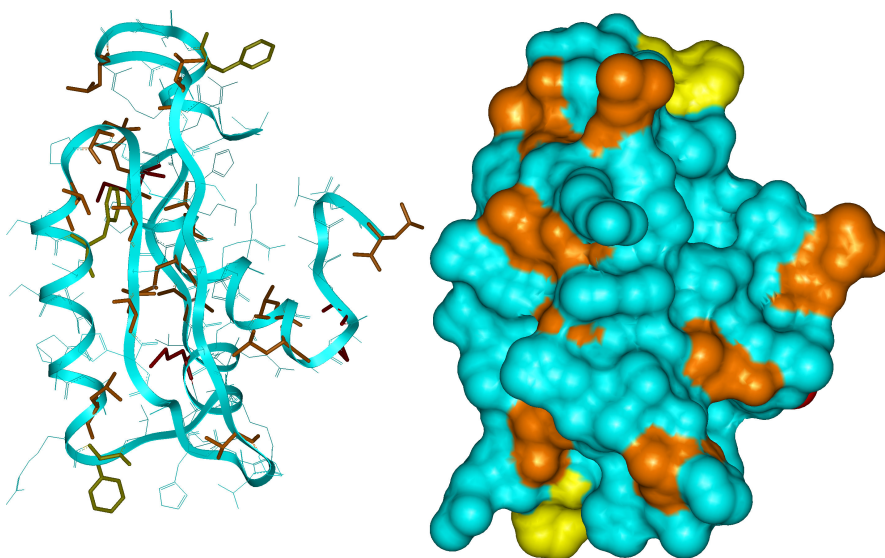
A**B**

Figura 68 – Superfície de acessibilidade ao solvente e representação em fita do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) gerado através do programa MODELLER e visualizado pelo programa InsightII. Em (A) está representado um lado da superfície acessível ao solvente, e em (B) a sua rotação em 180 graus no eixo y. Estão destacados os resíduos de fenilalanina (em amarelo), metionina (em vermelho), leucina e valina (em laranja).

A representação da superfície de contorno do modelo do fragmento da proteína mini-HBx(-Cys)(7-91) indicou que os resíduos das 3 fenilalaninas (em amarelo), das 11 leucinas e 4 valinas (em laranja) e das 3 metioninas (em vermelho) encontravam-se próximos, formando uma superfície com caráter hidrofóbico (Figura 68). Através do programa WebLab Viewer foi possível visualizar a superfície eletrostática do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91), e observou-se que as cargas positivas (em azul) estavam distanciadas das cargas negativas (em vermelho) (Figura 69).

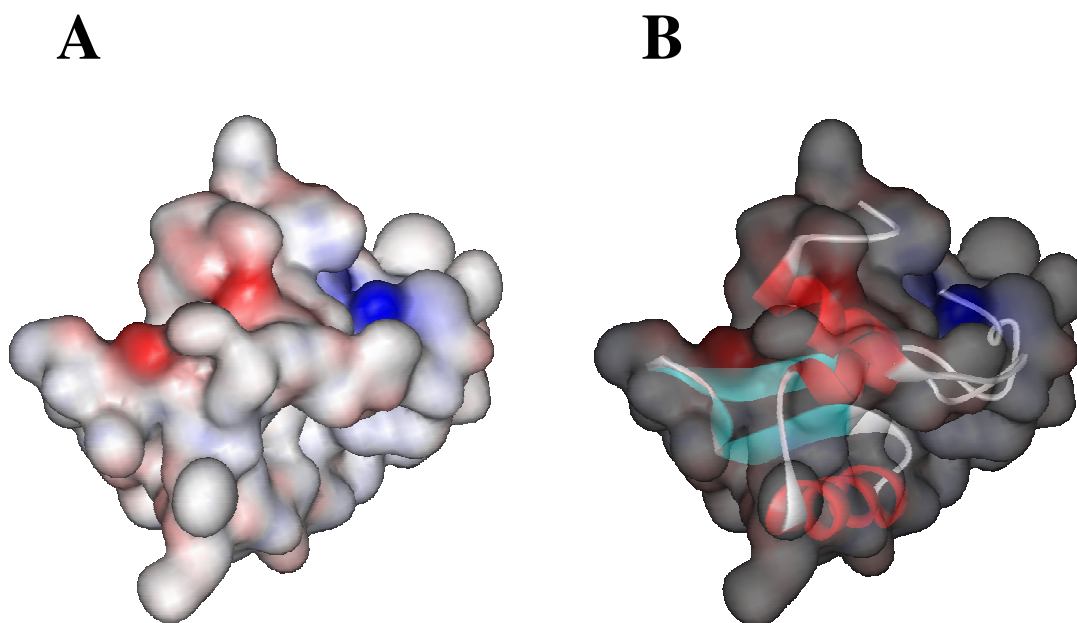


Figura 69 – Superfície eletrostática do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) gerado através do programa MODELLER e visualizado pelo programa WebLab Viewer. Em (A) está representada superfície eletrostática do modelo gerado, mostrando as cargas positivas (em azul) e negativas (em vermelho). Em (B) a representação em fita do modelo do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) inserido na superfície eletrostática.

Os resíduos Ser2, Ser37 e Ser45 presentes na sequência primária do fragmento mini-HBx(-Cys)(7-91) foram substituídos por resíduos de cisteína para gerar a sequência primária do fragmento mini-HBx(7-91), e esta sequência foi alinhada com a proteína LipDH(388-472). O alinhamento foi submetido ao programa MODELLER, que gerou

cinco modelos do fragmento mini-HBx(7-91) e, após avaliação pelo pacote de programas PROCHECK, apenas um modelo apresentou mais de 86% dos resíduos nas regiões mais favorecidas no gráfico de Ramachandran, e nenhum resíduo na região proibida (dados não mostrados). O modelo da proteína mini-HBx(7-91) foi visualizado pelo programa InsightII (Figura 70), e observou-se que os resíduos de fenilalanina, metionina, leucina e valina formam uma superfície hidrofóbica.

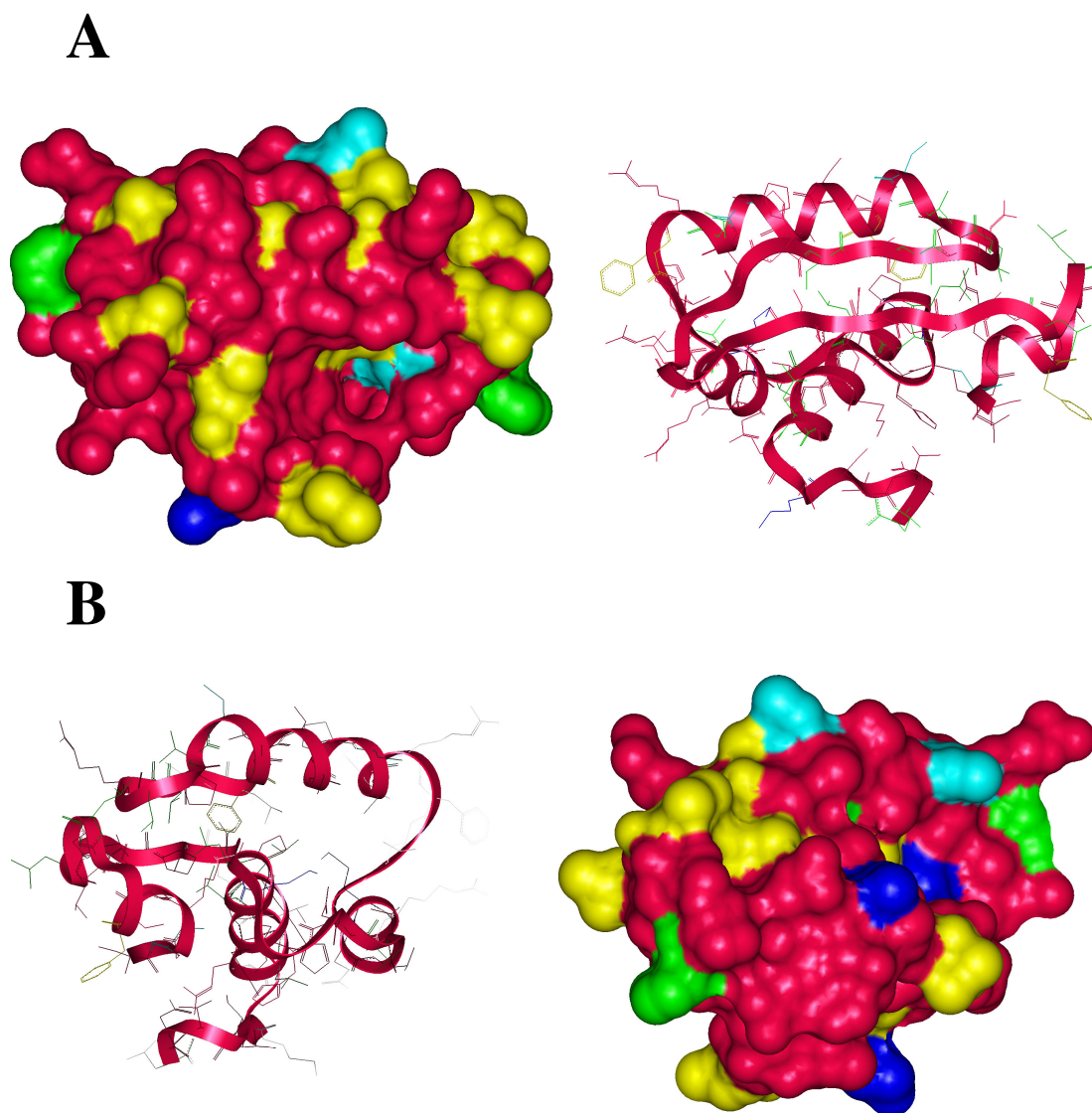


Figura 70 – Superfície de acessibilidade ao solvente e representação em fita do modelo do fragmento mini-HBx(7-91) gerado através do programa MODELLER e visualizado pelo programa InsightII. Em (A) está representado um lado da superfície acessível ao solvente e em (B) a sua rotação em 180 graus no eixo y. Estão destacadas as cisteínas (em

azul claro), fenilalaninas (em verde), metioninas (em azul royal), leucinas e valinas (em amarelo).

Entretanto, observou-se que no modelo do fragmento mini-HBx(7-91) (Figura 70) os resíduos de cisteína (Cys2, Cys37 e Cys45) estavam orientados para fora, de modo que os resíduos de cisteína Cys37 e Cys45 encontravam-se na região de alfa-hélice (Figura 70, em azul claro). Estes resíduos de cisteína poderiam formar pontes de dissulfeto com outros resíduos de cisteína presentes na outra parte da proteína HBx (que não está presente no modelo gerado), ou com outros resíduos de cisteína de outras proteínas, formando dímeros, trímeros ou oligômeros.

Os resíduos de cisteína Cys2, Cys37 e Cys45 presentes no fragmento mini-HBx(7-91) correspondem aos resíduos Cys26, Cys61 e Cys69 da proteína HBx(1-154) completa. É interessante notar que, além de estarem numa região do modelo que apresenta estrutura secundária em alfa-hélice, os resíduos Cys61 e Cys69 são conservados em várias proteínas HBx de vários hepadnavírus que infectam mamíferos (Gupta *et al.*, 1995).

Os fragmentos mini-HBx(-Cys)(7-91) e mini-HBx(7-91) que foram modelados a partir da proteína LipDH(388-472) compreendem os resíduos de aminoácidos 25 a 108 da proteína HBx(1-154) completa. Como estes resíduos estão contidos na região responsável pela atividade de trans-ativação da proteína HBx (Kumar *et al.*, 1996), sua localização topológica nos modelos gerados poderia fornecer um embasamento para o fato da proteína HBx interagir com uma grande variedade de proteínas celulares, seja através da formação de pontes de dissulfeto, ou através do contato com as variadas proteínas através de sua superfície hidrofóbica.

5. DISCUSSÃO

A proteína HBx possui 154 resíduos de aminoácidos, peso molecular de ~17 kDa, e é sintetizada na célula hepática durante o processo de infecção viral (Chen *et al.*, 1993; Zoulim *et al.*, 1994). Algumas evidências indicam que a HBx está relacionada com o desenvolvimento do câncer de fígado, uma vez que os camundongos transgênicos para HBx apresentam uma suscetibilidade extremamente alta para o desenvolvimento de tumores: cerca de 75% dos animais HBx-transgênicos desenvolvem o câncer de fígado (Kim *et al.*, 1991). Esta descoberta está de acordo com os dados epidemiológicos, confirmando a existência de uma forte relação entre a infecção pelo HBV e o aparecimento de tumores no fígado (Hohne *et al.*, 1990; Koike, 2002). Tais dados enfatizam uma função crucial da proteína HBx no estabelecimento do câncer hepático.

Apesar de não se conhecer o papel exato da proteína HBx no desenvolvimento do câncer de fígado, vários efeitos em diferentes níveis de ativação gênica têm sido propostos para o mecanismo de ação da proteína HBx, por diferentes pesquisadores. Das hipóteses descritas, incluem-se a ativação citoplasmática ligada às vias de sinalização celular: os pontos de controle (“*checkpoints*”) do ciclo celular (Benn & Schneider, 1995), a via do fator de transcrição AP-1 (Benn *et al.*, 1996), a via de sinalização de Ras, Raf, MAP quinases (Benn & Schneider, 1994) e Jak1-STAT (Lee & Yun, 1998), a transcrição por NF- κ B dependente (Chirilo *et al.*, 1996), os inibidores citoplasmáticos de proteínas relacionadas a Rel (Su & Schneider, 1996), a ativação de quinases de proteínas C (Kekulé *et al.*, 1993). Entretanto, os experimentos com transfecção transiente estabeleceram que a HBx pode trans-ativar os seguintes promotores e *enhancers* virais e celulares: AP-1, AP-2, ATF, c/EBP, sítios de ligação de NF- κ B, *c-fos*, *c-jun* e Il-8, as longas repetições terminais do HIV-1, o vírus do sarcoma de Rous e, finalmente, o próprio *enhancer* I do HBV (Yen, 1996; Murakami, 1999). Dessa forma, as interferências simultâneas em processos celulares provocadas pela proteína HBx sugerem que a sua expressão confere vantagens para a replicação do HBV e para a proliferação celular.

Vários estudos mostraram que a proteína HBx possui um caráter regulatório multifuncional, e pode ser encontrada tanto no citoplasma como no núcleo das células hepáticas (Henkler *et al.*, 2001). Devido à sua ampla distribuição celular, a proteína HBx pode afetar a replicação e proliferação virais, direta ou indiretamente (Hildt *et al.*, 1996),

interferir nos diversos processos de sinalização no citoplasma das células hepáticas (Noh *et al.*, 2004), e modular a transcrição no núcleo (Lin *et al.*, 1997; Wang & Johnson, 1997), o que poderia levar à apoptose (Papakyriakou *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2004) ou contribuir para a carcinogênese (Murakami, 1999; Koike *et al.*, 2004).

Como a proteína HBx não possui um domínio de ligação ao DNA de fita dupla, especula-se que as alterações celulares causadas pela HBx ocorram através de interações proteína-proteína (Murakami, 1999; Choi *et al.*, 2004). Contudo, foi mostrado que a proteína HBx é capaz de interagir *in vitro* com o DNA de fita simples (Qadri *et al.*, 1996) e com o RNA (Rui *et al.*, 2001) de uma maneira específica. Nossos estudos mostraram que a região C-terminal (80-142) da proteína HBx foi capaz de interagir mais fortemente com o oligonucleotídeo de RNA AU-38 do que a sua parte N-terminal (5-78) (Rui *et al.*, 2001). Com o intuito de mapear a especificidade de ligação da região C-terminal (80-142) da proteína HBx ao RNA, realizamos neste trabalho alguns ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética, e os resultados mostraram que a proteína HBx foi capaz de interagir com seqüências de RNA ricas em bases “A”, “U” e “AU”, com tamanho superior a 21-*mer*.

As seqüências ricas em bases “AU” são encontradas freqüentemente nas regiões 3’ não traduzidas de determinados mRNAs que codificam proto-oncogenes (*c-myc*, *c-fos*) e que são degradados rapidamente (Jones & Cole, 1987; Zhang *et al.*, 1993). Estudos *in vitro* mostraram que a ligação do fator celular AUF1 na região 3’ do mRNA é um sinal que inicia a degradação destes mRNAs, que são rapidamente reciclados (Brewer, 1991; Sirenko *et al.*, 1997; Moraes *et al.*, 2003). Nossos estudos *in vitro* mostraram que a proteína HBx foi capaz de se ligar com alta especificidade a um oligonucleotídeo de RNA rico em seqüências “AU”, e competiu com o fator celular AUF1 pela ligação ao oligonucleotídeo de RNA rico em AU (AU-38) (Rui *et al.*, 2001). Se a proteína HBx competiu com o fator celular AUF1 pela ligação ao RNA *in vitro*, especulamos se o mesmo poderia ocorrer *in vivo*, e realizamos ensaios de cinética da taxa de degradação de mRNAs em cultura de células HeLa.

Neste trabalho, a estabilização de mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* foi monitorada através de estudos cinéticos da taxa da degradação de mRNAs, na ausência e na presença da proteína HBx, através de *Northern blot*. Os resultados mostraram que

houve uma leve estabilização dos níveis de mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* na presença da proteína HBx. Em concordância com os resultados obtidos com os experimentos de competição de HBx com o fator celular AUF1 pelo sítio de ligação ao RNA, os experimentos de *Northern blot* poderiam sugerir que a proteína HBx causaria uma alteração nos níveis celulares dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc*, com a estabilização de seus mRNAs e, assim, poderia aumentar a probabilidade de uma transformação celular que levaria ao desenvolvimento do câncer de fígado. Em suma, a expressão da proteína HBx em células humanas poderia causar a ligação da proteína HBx a estes mRNAs ricos em seqüências “AU”, e a substituição do fator celular AUF1. Essa substituição poderia causar a estabilização indireta de determinados mRNAs de proto-oncogenes, contribuindo para o fenótipo transformador da proteína HBx.

Além de causar uma sutil estabilização nos níveis de mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* em cultura de células HeLa, observou-se que a proteína HBx interferiu no crescimento e na viabilidade celulares. Os ensaios de monitoramento do crescimento de células HeLa mostraram que na presença da proteína HBx houve um aumento de 1,5 vezes no crescimento celular após 70 horas, em comparação com as células HeLa que não expressavam a proteína HBx. Além disso, a proteína HBx interferiu na viabilidade celular, uma vez que a linhagem de células HeLa que expressava a proteína HBx apresentou uma maior porcentagem de células viáveis no decorrer do tempo. Um resultado semelhante foi obtido com células Chang transfectadas com o plasmídeo expressando a proteína HBx ou não, e observou-se um maior crescimento celular na linhagem de células Chang que expressava a proteína HBx (Wang *et al.*, 2004).

Com o intuito de obter proteína HBx(1-154) em grandes quantidades para os ensaios estruturais, foram feitas tentativas de expressão em sistemas eucarióticos (células de inseto *Sf9*, leveduras *P. pastoris*) e procarióticos (bactérias *E. coli*). Entretanto, os testes de expressão mostraram que a proteína HBx(1-154) foi expressa em grandes quantidades na forma de agregados insolúveis (corpos de inclusão) em *E. coli*, como descrito anteriormente por outros pesquisadores (Jameel *et al.*, 1990; Marczinovits *et al.*, 1997).

Na tentativa de aumentar a solubilidade da proteína HBx(1-154), alguns resíduos hidrofóbicos das porções N e C-terminal foram cortados, originando a deleção mini-

HBx(19-142), sem comprometer a função trans-ativadora da proteína HBx, que compreende os resíduos 58-140 (Kumar et al., 1996). Contudo, não foi observado um aumento da solubilidade da proteína truncada mini-HBx(19-142) que foi expressa em *E. coli*, talvez por causa da formação incorreta das pontes de dissulfeto intra e inter-moleculares (Rui et al., 2001; Moura et al., 2005). Com o intuito de evitar a formação de pontes de dissulfeto intra-moleculares e, assim, favorecer uma maior solubilidade da proteína HBx, os cinco resíduos de cisteína da proteína mini-HBx(19-142) foram substituídos por resíduos de serina, através de técnicas de mutagênese sítio-dirigida.

Contudo, as proteínas mutantes Cys/Ser mini-HBx(19-142) também foram expressas em *E. coli* na forma de corpos de inclusão. Após renaturação através de diálises consecutivas, as proteínas mutantes Cys/Ser mini-HBx(19-142) foram utilizadas nos ensaios de interação com o oligonucleotídeo de RNA AU-38 através de *UV cross-linking*. Os resultados mostraram que a ausência dos resíduos de cisteína da proteína HBx não interferiu na sua ligação com o RNA, e resolveu-se investigar se o mesmo poderia ocorrer na interação entre HBx e outras proteínas.

Para verificar se os resíduos de cisteína seriam importantes para a interação de HBx com outras proteínas, escolheu-se estudar a interação de HBx com a proteína supressora de tumor p53, uma vez que esta última possui um papel importante na regulação do ciclo celular, nos mecanismos de apoptose e reparo de DNA (Wang & Harris, 1996). Além disso, a interação entre HBx e p53 tem sido extensivamente estudada por vários pesquisadores, de modo que a proteína HBx pode causar efeitos inibitórios (Wang et al., 1994) e estimulatórios (Ahn et al., 2002) sobre a função de p53 e, assim, promover a transformação celular que levaria ao desenvolvimento do câncer de fígado (Takada et al., 1995; Wang et al., 1995).

Através de um ensaio de co-precipitação *in vitro* (*pull down*), observou-se que a ausência dos resíduos de cisteína na proteína HBx não interferiu na ligação desta com a proteína humana p53 (Moura et al., 2005). Além disso, a ausência dos resíduos de cisteína na proteína HBx também não interferiu na ativação do gene repórter dependente da ativação do promotor alvo para a proteína humana p53, em sistema de mono-híbrido em levedura (Moura et al., 2005). Em suma, os resíduos de cisteína da proteína HBx não

influenciaram na sua ligação com o RNA, nem tampouco na sua interação com a proteína humana p53.

Apesar de não ter uma função definida, estudos mostraram que a proteína HBx é um potente trans-ativador celular (Caselmann, 1996), e apresenta um domínio de regulação negativa (trans-repressão) na região N-terminal (Misra *et al.*, 2004) e um domínio de trans-ativação na região C-terminal (Chen & Oon, 1999). Entretanto, apesar de ser extensivamente estudada, a estrutura tridimensional da proteína HBx ainda não foi resolvida. Com o intuito de obter dados estruturais sobre a proteína HBx, várias técnicas espectroscópicas foram utilizadas neste trabalho, como o dicroísmo circular (CD), a emissão de fluorescência, e a ressonância magnética nuclear (RMN).

Os experimentos de CD realizados com a proteína HBx dialisada contra diferentes tampões mostraram que a composição do tampão interferiu na estruturação secundária da proteína HBx, uma vez que a estrutura de um polipeptídeo é determinada pelas interações locais entre os resíduos de aminoácidos e pela interação destes com as moléculas do solvente (Damaschun *et al.*, 1999). Dependendo das condições experimentais, diferentes conformações podem ser favorecidas, como no caso da proteína responsável pela doença do Príon, uma proteína que apresenta uma plasticidade estrutural e que pode adquirir uma estruturação em alfa-hélices ou folhas beta (Harrison *et al.*, 1997).

A análise por dicroísmo circular no UV distante mostrou que a proteína HBx estava parcialmente estruturada em solução aquosa, uma vez que esta estruturação parcial foi “perdida” na presença de uréia 6 M. Entretanto, a proteína HBx apresentou um grande conteúdo de estrutura randômica (*random coil*), independentemente das condições experimentais. Além disso, a proteína HBx apresentou uma relativa estabilidade térmica, e uma tendência à estruturação secundária em alfa-hélice na presença de concentrações crescentes de TFE e do oligonucleotídeo de RNA AU-38.

Contudo, apesar dos ensaios de CD terem mostrado que a proteína HBx poderia adquirir uma estruturação secundária em alfa-hélice na presença de 20% de TFE, os espectros de ^1H RMN uni e bidimensionais coletados na presença de TFE não se mostraram diferentes daqueles coletados para a amostra dialisada contra água. Nas duas condições, os espectros unidimensionais não apresentaram uma grande dispersão nos sinais relativos aos prótons amídicos, e os espectros bidimensionais de ^1H TOCSY e ^1H

NOESY mostraram uma grande aglomeração dos sinais relativos aos prótons, sugerindo que a proteína HBx encontrava-se pouco estruturada e/ou agregada nas condições experimentais.

Os espectros de emissão intrínseca de fluorescência da proteína HBx, em conjunto com os resultados de CD, mostraram que o resíduo de triptofano ficou mais exposto ao solvente na presença de uréia 6 M, sugerindo que a proteína HBx apresentava uma estruturação parcial em solução aquosa. Além disso, observou-se uma maior emissão de fluorescência do ANS na presença da proteína HBx, corroborando o fato de que a proteína HBx estava parcialmente estruturada em solução aquosa, uma vez que o ANS é um composto apolar que interage somente com as regiões hidrofóbicas das proteínas que se encontram parcialmente estruturadas em solução (Uversky, 2002).

Em suma, os experimentos de CD, fluorescência e RMN sugerem que a proteína HBx apresentava uma estruturação parcial em solução, mas apresentou uma alteração conformacional dependente das condições experimentais. Este fato poderia sugerir que a proteína HBx possui uma certa “plasticidade” estrutural, como a que é observada em várias proteínas intrinsecamente desestruturadas em solução que possuem importantes funções regulatórias (Dyson & Wright, 2005).

São muitos os exemplos de proteínas e domínios de proteínas que não possuem uma estrutura enovelada em condições fisiológicas, mas apresentam uma conformação altamente flexível e randômica que adquire uma estruturação rígida na presença de um ligante ou substrato (DNA, RNA, proteínas, etc), como no caso da proteína supressora de tumor p53 (Dyson & Wright, 2002; Tompa, 2002). O domínio de trans-ativação da proteína p53 é intrinsecamente desestruturado em solução, e adquire uma estruturação após a sua interação com a onco-proteína MDM2, com o enovelamento de uma estrutura randômica para uma estrutura helicoidal (Kussie *et al.*, 1996).

As proteínas intrinsecamente desestruturadas assemelham-se a proteínas globulares desnaturadas, e podem apresentar extensas regiões desestruturadas (30-40 resíduos de aminoácidos) ou serem totalmente desestruturadas (*natively unfolded*), com nenhuma ou alguma estrutura secundária (*molten globule*) (Fink, 2005). Em geral, a estrutura primária de uma proteína intrinsecamente desestruturada apresenta um número

reduzido de aminoácidos hidrofóbicos e uma grande proporção de aminoácidos carregados (Uversky, 2002; Dyson & Wright, 2005; Fink, 2005).

Analisando a sequência de aminoácidos da proteína HBx completa, observou-se a presença de 22 cargas localizadas em 72 resíduos da porção C-terminal da proteína HBx(1-154), e um pequeno número de aminoácidos hidrofóbicos. Uma alta concentração de cargas pode causar a repulsão das mesmas, e a ausência de resíduos hidrofóbicos impede o colapso hidrofóbico que levaria ao enovelamento protéico (Dyson & Wright, 2005), conferindo uma estrutura estendida à proteína HBx. Os experimentos de CD no UV distante corroboram com este fato, uma vez que um grande conteúdo de estrutura randômica foi observado para a proteína HBx, e a sua estabilidade térmica poderia ser uma consequência da sua flexibilidade estrutural em função da ausência de uma estrutura rígida e compacta. A flexibilidade estrutural interfere na dispersão dos sinais dos prótons amídicos nos espectros unidimensionais de ^1H RMN, como foi observado para a proteína HBx.

Apesar de apresentarem uma alta flexibilidade intra-molecular e um baixo conteúdo de estrutura secundária, as proteínas intrinsecamente desestruturadas apresentam uma certa organização nas suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, e esta organização pode ser correlacionada com as suas variadas funções. Mais de 30 funções regulatórias têm sido atribuídas às proteínas intrinsecamente desestruturadas, incluindo os processos de transcrição, tradução, transdução de sinal e regulação do ciclo celular (Tompa, 2002; Dyson & Wright, 2005; Fink, 2005).

A ausência de uma estrutura rígida nas proteínas pode lhes conferir vantagens funcionais, incluindo a habilidade de interagir com diferentes ligantes, uma vez que a estrutura estendida é preservada durante a formação do complexo protéico com um dos ligantes, permitindo o contato simultâneo com outros ligantes (Tompa, 2002). Contudo, a presença de regiões desestruturadas nas proteínas pode facilitar a sua rápida degradação, uma vez que a flexibilidade protéica pode causar a exposição dos sítios acessíveis à degradação proteolítica, que podem estar localizados nas regiões que apresentam uma conformação estendida (Fink, 2005). Por outro lado, as proteínas intrinsecamente desestruturadas podem ser reguladas *in vivo* através de sua degradação proteolítica, ou

moduladas através de fosforilação ou de outras modificações pós-traducionais (Wright & Dyson, 1999).

Após a interação de uma proteína intrinsecamente desestruturada com o seu ligante (proteína, ácido nucléico, membrana, etc), as regiões desestruturadas sofrem uma transição para estruturas mais ordenadas, ou se enovelam em estruturas secundárias e terciárias mais estáveis, havendo um acoplamento dos processos de ligação e enovelamento (Wright & Dyson, 1999; Dyson & Wright, 2002). Dessa forma, as proteínas intrinsecamente desestruturadas podem adotar diferentes conformações frente a diferentes estímulos ou ligantes, o que permite uma interação com vários alvos, e essa “promiscuidade” protéica possibilita um comportamento plástico em resposta às necessidades celulares (Wright & Dyson, 1999; Tompa, 2002).

Neste contexto, a proteína HBx poderia ser considerada uma proteína intrinsecamente desestruturada, levando-se em conta a presença de cargas na sua estrutura primária, a falta de uma estruturação secundária (observada através dos ensaios espectroscópicos), além da interação de HBx com diversas proteínas celulares e com ácidos nucléicos, e conseqüente modulação de vários processos celulares como a transcrição, transdução de sinal e regulação do ciclo celular. Além disso, os ensaios de CD mostraram que a proteína HBx alterou a sua estrutura secundária na presença do oligonucleotídeo de RNA rico em seqüências “AU” (AU-38), um provável ligante da proteína HBx *in vitro* e *in vivo*, como mostraram os ensaios de retardamento da mobilidade eletroforética e os ensaios de cinética da taxa de degradação de mRNAs em cultura de células HeLa.

Sabe-se que a proteína HBx é essencial nos estágios iniciais da infecção pelo HBV, assim como pelo rápido estabelecimento da infecção viral *in vivo* (Zoulim *et al.*, 1994), e a sua contínua expressão nos hepatócitos poderia ser responsável pela transformação celular que leva à cirrose, e ao desenvolvimento do câncer de fígado (Arbuthnot *et al.*, 2000; Murakami, 2001). Contudo, a proteína HBx é expressa em baixas concentrações nas células hepáticas, o que torna difícil a sua detecção no fígado que foi infectado pelo HBV (Urban *et al.*, 1997), provavelmente devido ao seu alto *turnover*, em conseqüência às suas regiões desestruturadas que podem interagir com a maquinaria de degradação do proteassomo (Hu *et al.*, 1999).

Como no caso de muitos processos de sinalização e de transcrição, as concentrações celulares das proteínas regulatórias e de suas proteínas-alvo são baixas, de modo que a interação entre ambas poderia ser afetada se a proteína regulatória possuísse uma estrutura rígida, com restrições conformacionais. Apesar de sua baixa concentração, a proteína regulatória, parcialmente ou totalmente desenovelada, poderia inicialmente interagir muito fracamente com o seu alvo e, num segundo momento, poderia se enovelar e interagir mais fortemente com a proteína-alvo, de acordo com o mecanismo do tipo “*fly casting*” proposto por Schoemaker e colaboradores (Schoemaker *et al.*, 2000).

Em suma, a flexibilidade estrutural inerente à proteína HBx favoreceria alterações globais ou locais na sua estrutura, em resposta a diferentes proteínas-alvo, o que poderia explicar a interação de HBx com várias proteínas celulares. A interação de HBx com diversas proteínas poderia causar interferências simultâneas em diversos processos celulares, desde a regulação da transcrição, processos de sinalização até os mecanismos de apoptose e de reparo de DNA, que podem levar ao desenvolvimento do câncer de fígado (Murakami, 1999; Anthony, 2001).

6. CONCLUSÕES

- As proteínas HBx em fusão com a cauda de poli-histidina foram expressas em corpos de inclusão, na fração insolúvel do lisado bacteriano (*E. coli*), independentemente das condições de indução, enquanto que as proteínas GST, GST-HBx e GST-p53 foram expressas e purificadas da fração solúvel do lisado bacteriano;
- Através de experimentos de *EMSA* e *UV cross-linking* verificou-se que as proteínas HBx interagiram com os oligonucleotídeos de RNA ricos em bases “A”, “U” e “AU”;
- Observou-se que os resíduos de cisteína da proteína HBx não foram necessários para a sua interação com o oligonucleotídeo de RNA AU-38, através de *UV cross-linking*;
- A proteína humana p53 interagiu com a proteína HBx contendo resíduos de cisteína ou não, num ensaio de co-precipitação *in vitro*;
- O ensaio de ativação de gene repórter dependente da ativação do promotor alvo para a proteína humana p53, em sistema de mono-híbrido em levedura, mostrou que a proteína HBx aumentou a ativação do gene repórter, independentemente da presença ou ausência dos resíduos de cisteína;
- Em cultura de células humanas HeLa, a proteína HBx causou um aumento no crescimento e viabilidade celulares, e uma sutil estabilização dos mRNAs dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* através de ensaios de cinética de degradação de mRNAs;
- Os espectros de dicroísmo circular, fluorescência e ressonância magnética nuclear mostraram que a proteína HBx apresentava uma estruturação parcial em solução aquosa;
- O modelo da proteína HBx construído por homologia com a proteína LipDH indicou que os resíduos hidrofóbicos estavam expostos ao solvente, formando uma superfície hidrofóbica capaz de interagir com diversas proteínas;
- A proteína HBx apresenta características de uma proteína intrinsecamente desestruturada, o que pode explicar em parte a sua capacidade de interagir com diversas proteínas e ácidos nucleicos de fita simples e, assim, modular os processos celulares que podem levar ao desenvolvimento do câncer de fígado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alter, M. (2003) Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J. Hepatol.*, **39**: S64-S69.
- Altschul, S.F. & Lipman, D.J. (1990) Protein database searches for multiple alignments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(14): 5509-5513.
- Anthony, P.P. (2001) Hepatocellular carcinoma: an overview. *Histopathology*, **39**: 109-118.
- Arbuthnot, P., Capovilla, A. & Kew, M. (2000) Putative role of the Hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **15**: 357-368.
- Arbuthnot, P. & Kew, M. (2001) Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Exp. Pathol.*, **82**: 77-100.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstone, R.E., Moore, D.D., Seidmen, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds) (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons.
- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotech.*, **10**: 411-421.
- Barnabas, S., Hai, T. & Andrisani, O.M. (1997) The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZIP transcription factors. *J. Biol. Chem.*, **272**: 20684-20690.
- Becker, S.A., Lee, T.H., Butel, J.S. & Slagle, B.L. (1998) Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J. Virol.*, **72**(1): 266-272.
- Benn, J. & Schneider, R. (1994) Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signalling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(22): 10350-10354.
- Benn, J. & Schneider, R. (1995) Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 11215-11219.
- Benn, J., Su, F., Doria, M. & Schneider, R. (1996) Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J. Virol.*, **70**: 4978-4985.
- Brewer, G. (1991) An A+U rich element RNA Binding factor regulates *c-myc* mRNA stability *in vitro*. *Mol. Cell Biol.*, **11**: 2460-2466.

- Buck, M. (1998) Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **31**(3): 297-355.
- Carey, J. (1991) Gel retardation. *Methods Enzymology*, **208**: 103-116.
- Caselmann, W.H. (1996) Trans-activation of cellular genes by hepatitis B virus proteins: a possible mechanism of hepatocarcinogenesis. *Adv. Virus Res.*, **47**: 253-302
- Chen, H.S., Kaneko, R., Girones, R.W., Anderson, W.E., Hornbuckle, B.C., Tennant, P.J., Cote, J.L., Gerin, R.H., Purcell, R.H. & Miller, R.H. (1993) The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J. Virol.*, **67**: 1218-1226.
- Chen, W.N. & Oon, C.J. (1999) Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. *FEBS Letters*, **453**: 237-242.
- Chirillo, P., Falco, M., Puri, P. L., Artini, M., Balsano, C., Levrero, M. & Natoli, G. (1996) Hepatitis B virus pX activates NF- κ B-dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J. Virol.*, **70**: 641-46.
- Choi Y.H., Kim H.I., Seong J.K., Yu D.Y., Cho H., Lee M.O., Lee J.M., Ahn Y.H., Kim S.J., Park J.H. (2004) Hepatitis B virus X protein modulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma through protein-protein interaction. *FEBS Lett.*, **557**: 73-80.
- Crossen, R. & Gruenwald, S. (1998) *Baculovirus Expression Vector System Manual*. 5th Edition, Pharmingen. San Diego, CA.
- Damaschun, G., Damaschun, H., Gast, K. & Zirwer, D. (1999) Proteins can adopt totally different folded conformations. *J. Mol. Biol.*, **291**: 715-725.
- De Bernardez Clark, E. (2001) Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotech.*, **12**: 202-207.
- Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2002) Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**(1): 54-60.
- Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Mol. Cell Biol.*, **6**: 197-208.
- Edelhock, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **6**: 1948-1954.
- Elmore, L.W., Hancock, A.R., Chang, S.F., Wang, X.W., Chang, S., Callahan, C.P., Geller, D.A., Will, H. & Harris, C.C. (1997) Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(26): 14707-14712.

- Fattovich, G. (2003) Natural history of hepatitis B. *J Hepatol.*, **39**: S50-S58.
- Feitelson, M.A., Zhu, M., Duan, L.X. & London, W.T. (1993) Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **8**: 1109-1117.
- Fink, A.L. (2005) Natively unfolded proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**(1): 35-41.
- Forgues, M., Marrogi A.J., Spillare E.A., Wu C.G., Yang Q., Yoshida M. & Wang X.W (2001) Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. *J Biol Chem*, **276**(25): 22797-803.
- Freshney, R.I. (1994) Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3rd ed. Wiley-Liss. New York.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., & Charnay, P. (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*, **281**: 646-650.
- Ganem, D. (1996) Hepadnaviridae and their replication. In: Fields Virology, Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., eds. 3rd edition, Philadelphia, Lippincott - Raven Publishers, 2703-37.
- Gast, K., Zirwer, D., Müller-Frohne, M. & Damaschun, G. (1999) Trifluoroethanol-induced conformational transitions of proteins: insights gained from the differences between α -lactalbumin and ribonuclease A. *Protein Science*, **8**: 625-634.
- Gottlob, K., Pagano, S., Levrero, M., & Graessmann, A. (1998) Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation. *Cancer Res.*, **58**: 3566-3570.
- Green, M., Oetjen, E. & Perini, G. (1999) The Hepatitis B pX protein promotes dimerization and binding to cellular basic region/leucine zipper proteins by targeting the conserved basic region. *J. Biol. Chem.*, **274**: 13970-13977.
- Groisman, I.J., Koshy, R., Henkler, F., Groopman, J.D. & Alaoui-Jamali, M.A. (1999) Downregulation of DNA excision repair by the hepatitis B virus-x protein occurs in p53-proficient and p53-deficient cells. *Carcinogenesis*, **20**(3): 479-483.
- Gupta, A., Jayasuryan, T.K.M.N. & Chauhan, V.S. (1995) Assignment of disulphide bonds in the X protein (HBx) of Hepatitis B virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **212**: 919-924.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**(4): 557-580.

- Harrison, P.M., Bamborough, P., Daggett, V., Prusiner, S.B. & Cohen, F.E. (1997) The prion folding problem. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**: 53-59.
- Henkler, F., Hoare, J., Waseem, N., Goldin, R.D., McGarvey, M.J., Koshy, R. & King, I.A. (2001) Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *Journal of General Virology*, **82**: 871-882.
- Hildt, E., Hofschneider, P.H. & Urban, S. (1996) The role of hepatitis B virus (HBV) in the development of hepatocellular carcinoma. *Seminars in Virology*, **7**: 333-347.
- Hohne, M., Schaefer, S., Seifer, M., Feitelson, M. A., Paul, D. & Gerlich, W. H. (1990) Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J.*, **9**: 1137-1145.
- Hollinger, F.B. (1996) Hepatitis B virus. In: Fields Virology, Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., eds., 3rd edition, Philadelphia, Lippincott - Raven Publishers, 2739-2807.
- Holmbeck, S.M., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (1998) DNA-induced conformational changes are the basis for cooperative dimerization by the DNA binding domain of the retinoid X receptor. *J. Mol. Biol.*, **284**(3): 533-539.
- Hu, Z., Zhang, Z., Doo, E., Coux, O., Goldberg, A.L. & Liang, T.J. (1999) Hepatitis B Virus X Protein Is both a Substrate and a Potential Inhibitor of the Proteasome Complex. *Journal of Virology*, **73**: 7231-7240.
- Jameel, S., Siddiqui, A., Maguire, H.F. & Rao, K.V. (1990) Hepatitis B Virus X Protein produced in *Escherichia coli* is Biologically Funcional. *J. Virol.* **64**: 3963-3966.
- Jones, D. T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* **292**, 195.
- Jones, T.R. & Cole, M.D. (1987) Rapid cytoplasmatic turnover of *c-myc* mRNA: requirement of 3'-untranslated sequences *Mol. Cell Biol.*, **7**: 4513-4521.
- Kekulé, A.S., Lauer, U., Weiss, L., Lubber, B. & Hofschneider, P.H. (1993) Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promotor signalling pathway. *Nature*, **361**: 742-745.
- Kidd-Ljunggren, K., Oberg, M. & Kidd, A.H. (1995) The hepatitis B virus X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences. *J. Gen. Virol.*, **76**(9): 2119-2130.
- Kim, H., Lee, H. & Yun, Y. (1998) X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J. Biol. Chem.*, **273**(1): 381-385.

- Kim, C.-M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T. & Jay, G. (1991) HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*, **351**: 317-320.
- Koike, K., Moriya, K., Iino, S., Yotsuyanagi, H., Endo, Y., Miyamura, T. & Kurakawa, K. (1994) High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology*, **19**: 810-819.
- Koike, K. (2002) Hepatocarcinogenesis in hepatitis viral infection: lessons from transgenic mouse studies. *J. Gastroenterol.*, **37**(13): 55-64.
- Kumar, V., Jayasuryan, N. & Kumar, R. (1996) A truncated mutant (residues 58-140) of the Hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 5647-5652.
- Kühn, S. & Zipfel, P.F. (1995). The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins. *Gene* **162**: 225-229.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J. & Pavletich, N.P. (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, **274**(5289): 948-953.
- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 283.
- Lee, Y.H. & Yun, Y. (1998) HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J. Biol. Chem.*, **273**(39): 25510-25515.
- Lee, Y.I., Kim, S.O., Kwon, H.J., Park, J.G., Sohn, M.J. & Jeong, S.S. (2001) Phosphorylation of purified recombinant hepatitis B virus-X protein by mitogen-activated protein kinase C *in vitro*. *J. Virol. Meth.*, **95**: 1-10.
- Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J.H., Dorjsuren, D., Iida, K. & Murakami S. (1997) Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor TFIIB and RNA polymerase subunit RPB5. *J. Biol. Chem.*, **272**: 7132-7139.
- Maguire, H.F., Hoeffler, J.P. & Siddiqui, A. (1991) HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science*, **252**(5007): 842-844.
- Marczinovits, I., Somogyi, C., Patthy, A., Nemeth, P. & Molnar, J. (1997) An Alternative Purification Protocol for Producing Hepatitis B Virus X Antigen on a Preparative Scale in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, **56**: 81-88.

- Mattevi, A., Schierbeek, A.J. & Hol, W.G. (1991) Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 Å resolution. A comparison with the structure of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.*, **220**: 975-994.
- Misra, K.P., Mukherji, A. & Kumar, V. (2004) The conserved amino-terminal region (amino acids 1-20) of the hepatitis B virus X protein shows a transrepression function. *Virus Res.* **105**(2): 157-65.
- Moraes, K.C.M., Quaresma, A.J.C., Maehnss, K. & Kobarg, J. (2003) Identification of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA destabilizing factor AUF1 (hnRNP D0). *Biological Chemistry*, **384**: 25-37.
- Moura, P., Rui, E., Gonçalves, K.A. & Kobarg, J. (2005) The cysteine residues of the hepatitis B virus onco-protein are not required for its interaction with RNA or with human p53. *Virus Res.*, **108**: 121-131.
- Murakami, S. (1999) Hepatitis B virus protein: structure, function and biology. *Intervirology* **42**: 81-89.
- Murakami, S. (2001) Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J. Gastroenterol.*, **36**(10): 651-660.
- Noh, E.J., Jung, H.J., Jeong, G., Choi, K.S., Park, H.J., Lee, C.H. & Lee, J.S. (2004) Subcellular localization and transcriptional repressor activity of HBx on p21(WAF1/Cip1) promoter is regulated by ERK-mediated phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* **319**(3):738-45.
- O'Reilly D.R., Miller L.K. & Luchow V.A. (1994). *Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual*. Oxford University Press. New York, NY.
- Papakyriakou, P., Tzardi, M., Valatas, V., Kanavaros, P., Karydi, E., Notas, G., Xidakis, C. & Louroumalis, E. (2002) Apoptosis and apoptosis related proteins in chronic viral liver disease. *Apoptosis*, **7**: 133-141.
- Qadri, I., Maguire, H.F. & Siddiqui, A. (1995) Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA- binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 1003-1007.
- Qadri, I., Ferrari, M.E. & Siddiqui, A. (1996) The Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, interacts with single-stranded DNA (ssDNA) *J. Biol. Chem.*, **271**: 15443-15450.
- Robinson, W.S. (1994) Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus associated hepatocellular carcinoma. *Review. Ann. Rev. Med.*, **45**: 297-323.
- Rudolph, R., Schwarz, E. & Lilie, H. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotech.*, **9**: 497-501.

- Rudolph, R., Schwarz, E. & De Bernardes Clark, E. (1999) Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein refolding. *Meth. Enzymol.*, **309**: 217-236.
- Rui, E., Moura, P. R. de & Kobarg, J. (2001) Expression of deletion mutants of the Hepatitis B virus protein HBx in *E. coli* and characterization of their RNA binding activities. *Virus Research*, **74**: 59-73.
- Sali, A. & Blundell, T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, **234**(3): 779-815.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**: 5463-5467.
- Seeger, V. & Mason, W.S. (2000) Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**(1): 51-68.
- Seifer M., Hohne M., Schaefer S. & Gerlich W.H. (1991) In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J Hepatol.* **13**: S61-5.
- Schneider, T. L. & Schepartz, A. (2001) Hepatitis B virus protein pX enhances the monomer assembly pathway of bZIP DNA complexes. *Biochemistry*, **40**: 2835-2843.
- Shaw, G. & Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, **46**: 659-667.
- Shoemaker, B.A., Portman, J.J. & Wolynes, P.G. (2000) Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(16): 8868-8873.
- Sirenko, O.I., Lofquist, A.K., DeMaria, C.T., Moris, J.S., Brewer, G. & Haskill, J.S. (1997) Adhesion –dependent regulation of an A+U-rich element-binding activity associated with AUF1. *Mol. Cell Biol.*, **17**: 3898-3906.
- Sitterlin, D., Lee, T.H., Prigent, S., Tiollais, P., Butel, J.S. & Transy, C. (1997) Interaction of the UV-damaged DNA-binding protein with hepatitis B virus X protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient X-insertion mutant. *J. Virol.*, **71**: 6194-6199.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**: 113-130.

- Su, F. & Schneider, R.J. (1996) Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF- κ B by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J. Virol.*, **70**: 4558-4566.
- Tanaka, Y., Kanai, F., Kawakami, T., Tateishi, K., Ijichi, H., Kawabe, T., Arakawa, Y., Kawakami, T., Nishimura, T., Shirakata, Y., Koike, K. & Omata, M. (2004) Interaction of the hepatitis B virus X protein (HBx) with heat shock protein 60 enhances HBx-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **318**(2):461-9.
- Takada, S., Tsuchida, N., Kobayashi, M. & Koike K. (1995) Disruption of the function of tumor-suppressor gene p53 by the hepatitis B virus X protein and hepatocarcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **121**: 593-601.
- Tompa, P. (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochem. Sci.*, **27**: 527-33.
- Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C. & Cromlish, J.A. (1995) Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J. Virol.*, **69**(3): 1851-1859.
- Twu, J.S., Wu, J.Y. & Robinson, W.S. (1990) Transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by hepatitis B virus X-protein requires de novo protein synthesis. *Virology*, **177**: 406-410.
- Twu, J.S., Lai, M.Y., Chen, D.S. & Robinson, W.S. (1993) Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology*, **192**(1): 346-350.
- Urban, S., Hildt, E., Eckerskorn, C., Sirma, H., Kekule, A. & Hofschneider, P.H. (1997) Isolation and molecular characterization of hepatitis B virus X-protein from a baculovirus expression system. *Hepatology*, **26**(4): 1045-53.
- Uversky, P. (2002) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Science*, **11**: 739-756.
- Valax, P. & Georgiou, G. (1999) Isolating inclusion bodies from bacteria. *Meth. Enzymol.*, **309**: 48-59.
- Wang, X.W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M.A., Gu, J.R. & Harris, C.C. (1994) Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 2230-2234.
- Wang, X.W., Gibson, M.K., Vermeulen, W., Yeh, H., Forrester, K., Sturzbecher, H.W., Hoeijmakers, J.H. & Harris, C.C. (1995) Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer research*, **55**(24): 6012-6016.
- Wang, X. W. & Harris, C. C. (1996) TP53 tumor supresor gene: clues to molecular carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Surveys*, **28**: 169-196.

- Wang, H.D., Trivedi, A. & Johnson, D.L. (1997) Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway. *Mol. Cell Biol.*, **17**(12): 6838-6846.
- Wang, J.C., Hsu, S.L. & Hwang, G.Y. (2004) Inhibition of tumorigenicity of the hepatitis B virus X gene in Chang liver cell line. *Virus Research*, **102**: 133-139.
- Waris, G. & Siddiqui, A. (2003) Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J. Biosci.*, **28**(3): 311-21.
- Williams, J.S. & Andrisani, O.M. (1995) The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 3819-23.
- Wilson, G.M. & Brewer, G. (1999) Identification and characterization of proteins binding A+U-rich elements. *Meth. Enzymol.*, **17**: 74-83.
- Wright, P.E. & Dyson, H.J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.*, **293**: 321-331.
- Wüthrich, K. (1986) NMR of proteins and nucleic acids. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Yamada, H., Futami, J., Tsushima, Y., Tada, H. & Seno, M. (2000) Convenient and efficient *in vitro* folding of disulfide-containing globular protein from crude bacterial inclusion bodies. *J. Biochem.*, **127**: 435-441.
- Yen, T.S.B. (1996) Hepadnaviral X protein: Review of recent progress. *J. Biomed. Sci.*, **3**: 20-30.
- Zhang, W., Wagner, B.J., Ehrenman, K., Schaefer, A.W., DeMaria, C.T., Crater, D., DeHaven, K. & Brewer, G.A (1993) Purification, characterization, and cDNA cloning of a an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol. Cell Biol.*, **13**: 7652-7665.
- Zoulim, F., Saputelli, J. & Seeger, C. (1994) Woodchuck hepatitis B virus X gene is important for viral infection *in vivo*; *J. Virol.*, **68**: 2026-2030.

ANEXOS

Anexo 8.1 - Lista de produtos e equipamentos

Produtos (ordem alfabética)

Actinomicina D
[α - 32 P] dATP
[γ - 32 P] dATP
BaculoGoldTM Transfection kit
colunas NAP-5
cubeta de eletroporação de 0,4 cm
DNA ligase
DNA Sequencing kit Big DyeTM Terminator
Cycle Sequencing Read Reaction
DOTAP
enzima *Klenow*
esperma de salmão a 2 mg/mL
filme X-OMAT
First Strand cDNA Synthesis Kit
glutathione reduzida
glutathione sepharose 4B
membrana de nitrocelulose *Hybond-N*
membrana de PVDF *ImmobilonTM-P*
Maxiprep Plasmid DNA kit
Midiprep Plasmid DNA kit
Miniprep Plasmid DNA kit
Ni-NTA (Nitrilo triacetato) Agarose Beads
QIAquick Gel Extraction Kit
QIAquick PCR purification kit
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit
Random Primed DNA Labeling Kit
Semi-Dry Blotting System
tampão de ligação 5X
T4 polinucleotídeo kinase
TRIzol
Western Blotting Luminol Reagent

Empresa

USB
Amersham Pharmacia Biotech
Amersham Pharmacia Biotech
Pharmingen
Amersham Pharmacia Biotech
BioRad
GIBCO-BRL

PE, Applied Biosystems
Roche
Roche
Sigma
Kodak, Rochester, NY
Amersham Pharmacia Biotech
Amersham Pharmacia Biotech
Amersham Pharmacia Biotech
Amersham Pharmacia Biotech
Millipore
QIAgen
QIAgen
QIAgen
QIAgen
QIAgen
QIAgen
Stratagene
Roche
W.E.P. Company
GIBCO-BRL
Amersham Pharmacia Biotech
GIBCO-BRL
Santa Cruz Biotechnology

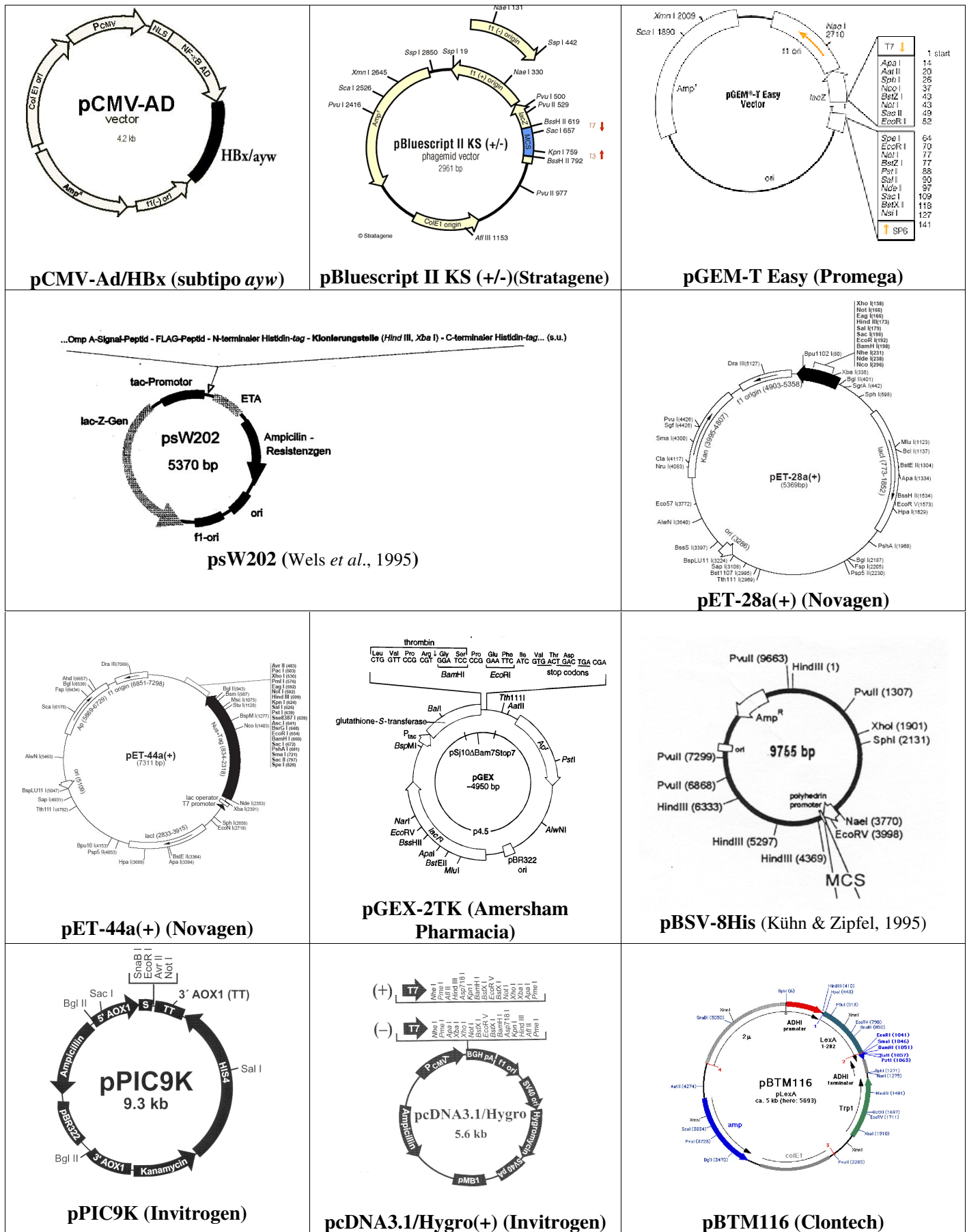
Equipamentos (ordem alfabética)

BioRad Gene Pulser
DNA ABI PRISM 377 Genetic Analyser
espectrofotômetro *Ultrospec 3000*
espectropolarímetro *JASCO J-810*
FPLC AKTA Purifier
Phosphorimager scan Bio-Imaging Analyzer BAS-1800II
placa BAS-IP MS2325
Sonifier 450
UV Stratalinker 2400

Empresa

BioRad
PE Applied Biosystems
Amersham Pharmacia Biotech
JASCO
Amersham Pharmacia Biotech
Fujifilm
Fujifilm
Branson
Stratagene

Anexo 8.2 - Mapas dos plasmídeos



Anexo 8.3 - Artigos publicados

Artigo 1

Rui E., **Moura P.R.**, Kobarg J. (2001) Expression of deletion mutants of the hepatitis B virus protein HBx in *E. coli* and characterization of their RNA binding activities. *Virus Res.*, **74**(1-2): 59-73.

Artigo 2

Moura P.R., Rui E., de Almeida Goncalves K., Kobarg J. (2005) The cysteine residues of the hepatitis B virus onco-protein HBx are not required for its interaction with RNA or with human p53. *Virus Res.*, **108**(1-2): 121-31.

Artigo 3

Rui E., **Moura P.R.**, Goncalves K.de A., Kobarg J. (2005) Expression and spectroscopic analysis of a mutant hepatitis B virus onco-protein HBx without cysteine residues. *J Virol Methods*, **126**(1-2): 65-74.

Expression of deletion mutants of the hepatitis B virus protein HBx in *E. coli* and characterization of their RNA binding activities

Edmilson Rui^a, Patrícia Ribeiro de Moura^{a,b}, Jörg Kobarg^{a,c,*}

^a Centro de Biologia Molecular Estrutural (CBME), Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS),

Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, C.P. 6192, 13084-971 Campinas-SP, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil

^c Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil

Received 8 September 2000; received in revised form 15 November 2000; accepted 15 November 2000

Abstract

The hepatitis B virus protein HBx has been implicated in the development of liver cancer. It has been shown that the HBx protein is able to bind to single-stranded DNA in a specific manner. This DNA binding activity might be relevant for HBx oncogene character. To study the HBx interaction with nucleic acids in more detail we expressed full-length HBx as well as several N- and C-terminally truncated HBx proteins as 6xHis and GST-fusions in *E. coli*. Using a gel shift assay, we were able to demonstrate that all of the truncated HBx proteins have the ability to bind to an AU-rich RNA. The affinity of GST-HBx #3 (residues 80–142) was an order of magnitude higher than that of GST-HBx #2 (residues 5–79), indicating that a high affinity RNA binding site is located in HBx C-terminal half. AUF1 is the protein ligand that binds to AU-rich RNA regions present in certain proto-oncogene mRNAs and causes their rapid degradation. By a competitive binding experiment of AUF1 and HBx to the AU-rich RNA oligonucleotide, we show that HBx is able to displace AUF1 from its binding site on the RNA oligonucleotide. This new aspect of HBx function is discussed in the context of cellular transformation. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Viral hepatitis; Hepatocellular carcinoma; Viral transactivator; Oncogene; mRNA stability

1. Introduction

Viral hepatitis, especially that caused by infection with hepatitis B virus (HBV), is a major worldwide public health problem (Hollinger,

1996). Worldwide over 250 million people are persistently infected with HBV. The prevalence of HBV-antigen is lowest (0.1–1%) in countries with the highest standards of living such as countries in Europe or the USA. Very high rates (5–20%) have been reported for China, Africa, the Middle East and South America including some parts of Brazil. Both epidemiological as well as experimental data indicate that chronic HBV infection is tightly associated with the liver cancer (hepatocel

* Corresponding author. Tel.: +55-19-3287-4520, ext.: 516; fax: +55-19-3287-7110.

E-mail address: jkobarg@lnls.br (J. Kobarg).

lular carcinoma, HCC) (Redeker, 1975; Robinson, 1994). The great majority of people that die from HCC have been infected with HBV in the past. HCC constitutes 90% of the primary malignant tumors of the liver and it is estimated that each year worldwide more than 500 000 people die from liver cancer (Hollinger, 1996).

HBV is a DNA virus with a small circular DNA genome of 3.2 kb length. It is phylogenetically related to the retroviruses in that it uses its own reverse transcriptase for DNA replication and belongs to the family of hepadnaviruses (for hepatotropic DNA viruses) (Ganem, 1996). The HBV genome has at least four open reading frames (ORF) which are named S, C, P, and X. The C region encodes a protein of the HBV virus nucleoprotein, while the ORFs pre-S and S encode the viral surface glycoprotein and the P gene the viral reverse transcriptase. The ORF X encodes for the regulatory protein HBx which can enhance the expression of heterologous and homologous genes in trans in transient cell culture assays (Ganem, 1996; Hollinger, 1996). The HBx protein consists of 154 amino acids, possesses a molecular weight of ~17 kDa and is translated in the course of the viral infection. HBx seems to have a central role in HBV mediated HCC (Lo et al., 1988; Hohne et al., 1990) since mice transgenic for HBx show an high susceptibility for the development of liver tumors: 75% of the HBx transgenic animals develop HCC (Kim et al., 1991). On the cellular and molecular levels, several functions have been attributed to the HBx protein, by different researchers. Some studies suggest that HBx might be involved in the induction of apoptosis (Chirillo et al., 1997; Su and Schneider, 1997). The most generally recognized function of HBx however is its ability to transactivate the transcription of a variety of cellular and viral promoters (Twu et al., 1990; Yen, 1996). Although HBx does not bind to double-stranded DNA directly it could be demonstrated that it binds in vitro to different transcription factors (Haviv et al., 1995; Maguire et al., 1991). It has recently been reported that HBx can interact with single-stranded DNA (ssDNA) in a sequence independent fashion (Qadri et al., 1996). Since the HBV DNA in the HBV virion consistently is partially

single-stranded, HBx might also in vivo bind to the viral ssDNA and function in the replication of the virus DNA like it was reported for several other viral ssDNA binding proteins (Challberg and Kelly, 1989; Hang et al., 1995). It was also shown that HBx activates the reverse transcription of the viral pregenomic mRNA into genomic DNA (Klein et al., 1999). These studies showed that HBx can interact with ssDNA and suggested that this interaction might be of biological importance for HBx functions in the context of the HBV's life cycle. Since HBx can bind to ssDNA (Qadri et al. 1996), we speculated that it might also be able to interact with RNA. We further reasoned that if HBx can interact with RNA it might be able to compete with cellular mRNA binding factors like AUF1 (Zhang et al., 1993). To test these hypotheses we expressed full-length HBx protein as well as of N- and C-terminally truncated HBx mutants in *E. coli*. As the RNA test oligonucleotide we chose the AU-rich sequence to which AUF1 binds and which represents the putative destabilizing element found in the 3'-region of rapidly degraded mRNAs like those of certain proto-oncogenes and cytokines (Jones and Cole, 1987). In this paper we show that HBx binds to this AU-rich RNA oligonucleotide in an inhibitable manner, characterize HBx RNA binding domains and demonstrate that HBx can displace the cellular AU-rich mRNA binding factor AUF1 from the RNA oligonucleotide. The possibility that HBx displacement of cellular factors from proto-oncogene mRNAs in vivo might contribute to HBx oncogene character is discussed.

2. Materials and methods

2.1. Construction of recombinant HBx-psW 202 plasmids

DNA fragments encoding the full length or N- or C-terminally truncated HBx protein were amplified by PCR methodology and directionally cloned into the bacterial expression vector psW202 (W. Wels, Freiburg, Germany) (Klimka et al., 1996; Wels et al., 1995) via *Hind*III (sense

oligonucleotides) and *Xba*I (anti-sense oligonucleotides) restriction sites. The vector psW202 has *Hind*III and *Xba*I restriction sites, which allow the directional insertion of a DNA sequence to be expressed under the control of a tac-promotor. An omp A signal peptide encoding sequence and a six-histidine tag encoding sequence are located upstream of the insertion site. While the omp A signal sequence directs the recombinant fusion protein to the periplasmic space of *E. coli* the 6xHis tag which will be located N-terminal of the recombinant protein partner allows the purification of the recombinant fusion protein via Ni-affinity chromatography. In all HBx construction sequences encoding a flexible linker region (GS-GSG) and an enteropeptidase cleavage site (DDDDK) have been introduced via the sense oligonucleotide sequences. For the different HBx constructions the following oligonucleotides were used: HBx (1–154): sense 1 [5' GCA CTG AAG CTT GGT TCT GGT TCT GGT GAC GAC GAT GAC AAG ATG GCT GCT AGG TTG TGC TGC 3'] and anti-sense 1 [5' A GTC TCT AGA TTA TTA GGC AGA GGT GAA AAA GTT GCA TGG 3']; HBx (1–142): sense 1 and anti-sense 2 [5' TG GAA TTC TCT AGA TTA TTA GAC CAA TTT ATG CCT ACA GCC 3']; HBx (1–77): sense 1 and anti-sense 3 [5' TG GAA TTC TCT AGA TTA TTA GCG ACG TGC AGA GGT GAA GCG 3']; HBx (48–154): sense 2 [5' GCA CTG AAG CTT GGT TCT GGT TCT GGT GAC GAC GAT GAC AAG GAC CAC GGG GCG CAC CTC TCT 3'] and anti-sense 1; HBx (79–154): sense 3 [5' GCA CTG AAG CTT GGT TCT GGT TCT GGT GAC GAC GAT GAC AAG GAG ACC ACC GTG AAC GCC CAC 3'] and anti-sense 1; HBx (48–142): sense 2 and anti-sense 2; HBx (79–142): sense 3 and anti-sense 2 (Fig. 4). Amino acid numbering refers to the 154 amino acid long full-length HBx protein of the *ayw* subtype (HBV genotype D, Gene bank accession no.: J02203) (Galibert et al., 1979). For the PCR amplification 30 cycles consisting of the following steps were used: 95°C (50 s), 50°C (1 min), 72°C (3 min, last cycle 8 min). HBx-DNA containing pCMV-Ad plasmid, kindly provided by Dr. R. Schneider, New York (New York University), served as the

template DNA in the PCR reaction. Amplified PCR products were then digested with *Hind*III and *Xba*I and ligated into vector psW202. DH5 α *E. coli* cells were transformed with the recombinant vectors. Recombinant plasmid DNA isolated from the DH5 α cells was subsequently transformed in *E. coli* BL-21 cells, for the expression of the HBx proteins.

2.2. Construction of recombinant HBx-pGEX-2TK plasmids

To express selected HBx proteins as fusion proteins with the Glutathione S-transferase (GST) their DNAs were inserted into the bacterial expression vector pGEX-2TK (Amersham Pharmacia). Using the full-length HBx DNA inserted into pCMV-Ad as a template we amplified the three HBx constructs with the following primer combinations: GST-HBx-complete (5–154): X-GST-sense [GC GGA TCC TTG AGC TGC CAA CTG GAT CCT GCG CGG] and X-GST-anti-sense [GC GAA TTC TTA GGC AGA GGT GAA AAA GTT GC]; GST-X # 2 (5–78): X-GST-sense and anti-sense 3; GST-X # 3 (80–142): X-GST-sense 2 [GC GGA TCC GAG ACC GTG AAC GCC CAC], and anti-sense 2 (Fig. 5). An internal *Bam*HI restriction site was deleted by introducing a silent mutation via the oligonucleotide X-GST-sense. To keep this oligonucleotide at a reasonable size the first nucleotides encoding the first four amino acids were spared. The PCR products were digested with *Eco*RI and *Bam*HI and inserted into the vector pGEX-2TK in frame with GST.

2.3. Expression of HBx proteins

E. coli strain BL-21, transformed with the HBx DNA containing psW202 or pGEX-2TK vectors, was grown in LB medium containing ampicillin (50 μ g/ml) to an OD₆₀₀ = 0.7, followed by addition of isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM and induced for the indicated times at 37°C. Cells were harvested by centrifugation and lysed by the addition of lysozyme (1 mg/ml), incubation for 20 min at room temperature (RT) and three subsequent

freeze-thaw cycles. Genomic DNA was digested by addition of DNase (1 µg/ml) and incubation for 20 min at 37°C. The bacterial lysate was separated in soluble and insoluble fractions by centrifugation at $13\,000 \times g$ for 15 min at 4°C. After dissolving the protein samples from both fractions in reducing SDS-gel loading buffer for 2 min at 95°C the presence of recombinant protein was analyzed in a 12% SDS-PAGE gel, stained with Coomassie blue.

2.4. Purification of HBx-6His fusion proteins

A bacterial pellet derived from a 1 l culture induced as described above was lysed by addition of 1 mg/ml lysozyme and three cycles of passage through the French press. After centrifugation, the pellet containing the HBx inclusion bodies was solubilized in 20 ml of a solution of 6 M guanidinium-HCl, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8. The resulting solution was applied to a Ni-NTA column (Qiagen). The subsequent washing and elution steps were all carried out with buffer A (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl) but at different pHs. The column was washed first with buffer A, pH 8 and then with buffer A, pH 6.3. Bound protein was eluted with a linear pH gradient between 6.3 and 4.5 in buffer A. The column eluate was collected in 2-ml fractions and 10 µl aliquots were analyzed by SDS-PAGE. Peak fractions were pooled and dialyzed against renaturing buffer 1 (50 mM Pipes, pH 6, 0.5 mM PMSF) at RT with several changes of the buffer. Dialyzed protein was cleared by centrifugation at $2000 \times g$ and used for the Electrophoretic mobility shift assays (EMSA).

2.5. Digestion with enteropeptidase

The full-length recombinant HBx-6xHis fusion protein from the peak fraction of the chromatography (in buffer A) was diluted with water to a final concentration of 3 M urea. Cleavage with enteropeptidase (Roche) was performed at a molar ratio of HBx-fusion to enteropeptidase of ~ 100:1 for the indicated periods of times at RT. Cleavage was analyzed by SDS-PAGE.

2.6. Purification of HBx-GST fusion proteins

The HBx-GST fusion proteins were prepared from the soluble protein fraction of the bacterial cell lysate. After cell disruption the bacterial lysate was centrifuged ($13\,000 \times g$, 15 min, 4°C) and the supernatant was applied to a Glutathione Sepharose® 4B column (0.5 ml/min) that had been equilibrated with PBS. The column was washed with PBS and the bound GST-HBx fusion protein was eluted with 10 mM glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Collected fractions were analyzed by SDS-PAGE in a 10% acrylamide gel. Concentrations of the recombinant proteins were determined by comparison of the Coomassie-staining of their bands to that of proteins of known concentration that were run in the same SDS-PAGE gel.

2.7. Electrophoretic mobility shift assay

An AU-rich RNA oligonucleotide (38-mer: GUGAUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAG) was labeled with [γ -³²P]dATP in the presence of T4 polynucleotide kinase. The radiolabeled probe was purified on a gel filtration column, and aliquots of 240 pg (~ 10 000 cpm) were used in the binding reactions with GST, or the HBx-6xHis or HBx-GST fusion proteins. The radiolabeled probe and the proteins were incubated in a final reaction volume of 25 µl, containing 50 mM potassium acetate, 5 mM Tris (pH 7.5), 5 mM magnesium acetate, 4% glycerol, 10 µg/ml BSA, at 4°C for 30 min. The RNA-protein complexes were run out on a non-denaturing 6% polyacrylamid gel in $0.5 \times$ TBE buffer at RT. Dried gels were exposed to X-ray films at – 80°C with an intensifying screen. For the competition EMSAs, the same amount of radioactive labeled RNA oligonucleotide as in the EMSA experiments above was used and different competing concentrations of homologous (AU-rich RNA oligonucleotide) or heterologous single-stranded DNA oligonucleotides (DNA oligo 1, GCA CTG AAG CTT GGT TCT GGT TCT GGT GAC GAC GAT GAC AAG ATG GCT GCT AGG TTG TGC TGC; DNA oligo 2, GCA CTG AAG CTT GGT TCT GGT TCT GGT GAC GAC

GAT GAC AAG ATG GCT GCT AGG TTG TGC TGC; oligo dT DNA, d[T]₁₈) were used at the molar excess indicated in the figure legends. Proteins were used at the concentration indicated in the figure legends. The recombinant purified 6His-AUF1 protein was a kind gift of Mrs. Karen C.M. de Moraes (CBME/LNLS, Campinas).

3. Results

3.1. Cloning and expression of full-length HBx fusion protein

In order to obtain sufficient quantities of recombinant HBx protein for functional and structural studies, we have used and developed an efficient expression system in *E. coli*. The full-length HBx protein was expressed in *E. coli* cells transformed with the plasmid psW202 that had the HBx gene of the *ayw* subtype (Lo et al., 1988) inserted in frame into its cloning site. This way the HBx protein was expressed as a fusion protein which contained N-terminal of the amino acids 1–154 of the HBx protein an omp-A signal peptide of 30 amino acids (MKKTA IAIIV ALAGF ATVAQ

ADYKD DDDKL), a 6xHis tag and immediately before the first methionine of HBx an enteropeptidase cleavage site (DDDDK). The expression of this HBx-6xHis fusion protein resulted in a protein of ~21 kDa that was exclusively found in the insoluble inclusion body fraction of the bacterial cell lysate (Fig. 1B). The production of the recombinant fusion protein was monitored with a time course experiment for the induction with IPTG. Although expression was already strong only after 30 min, it peaked at ~4 h of induction. At none of the time points the HBx fusion could be detected in the soluble fraction (Fig. 1A). Induction of the expression at lower temperatures (27 and 23°C) did not result in a detectable expression of the fusion protein in the soluble fraction (data not shown).

The fact that the recombinant HBx protein was exclusively found in the form of inclusion bodies might be based on the lack of chaperones that could be required for the proper folding or might be due to the formation of abnormal inter- or intramolecular disulfide bonds (Yasukawa et al., 1995). Therefore, we assumed that a simultaneous overexpression of either chaperones or bacterial thioredoxin might result in the production of a more soluble protein. We co-transformed the recombinant psW202-HBx containing *E. coli* BL21

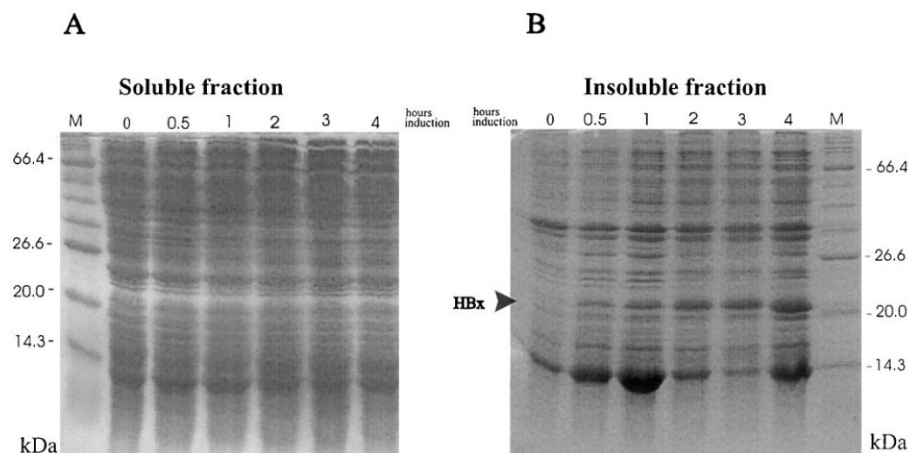


Fig. 1. Expression of the HBx-6xHis fusion protein. Time course of induction of the HBx protein expression in *E. coli*. Ten milliliters of bacterial culture in logarithmic growth phase were or were not induced for the times indicated at the top of the figure. Cells were harvested and lysed and the lysate was separated in soluble (A) and insoluble protein fraction (B) by centrifugation. Samples were dissolved in SDS-gel loading buffer and analyzed by SDS-PAGE. The molecular weights of the standard proteins are indicated and the HBx-fusion protein is marked with an arrow.

strain with plasmid pT-groE, encoding the chaperones GroEL and GroES, or pT-Trx containing the gene for thioredoxin (Yasukawa et al., 1995). After the co-induction of the HBx and either the chaperones or thioredoxin we found expression of both chaperon chains or the thioredoxin in the soluble fraction but still no expression of any soluble HBx protein (data not shown). Again, the expressed HBx was exclusively found in the insoluble lysate fraction, indicating that the lack of either chaperones or thioredoxin is not the cause for the accumulation of HBx in the inclusion bodies.

3.2. Purification of the HBx fusion proteins by Ni-NTA chromatography

Since the full-length HBx-6xHis fusion protein was only found in the inclusion bodies we solubilized them with 6 M guanidinium-HCl to purify the protein under denaturing conditions on a Ni-NTA column (Porath et al., 1975; Ljungquist et al., 1989). The column was washed and eluted in buffers containing 8 M urea and the collected fractions were analyzed by SDS-gel electrophoresis. The recombinant HBx-6xHis fusion protein elutes as a relatively broad peak (Fig. 2A). The analysis of the peak fractions by SDS-PAGE demonstrates the presence of two distinct protein species ~ 21 and ~ 20 kDa (Fig. 2B) that most likely represent the fusion protein with and without its N-terminal omp-A signal sequence. The fact that the majority of the protein is of the higher molecular weight, indicates that the cleavage of the leader sequence after translocation to the periplasmic space of *E. coli* is incomplete and that the majority of the recombinant protein ($\sim 90\%$) resides uncleaved (~ 21 kDa) in the cytoplasm of the bacteria. With the described expression and purification scheme we were able to obtain ~ 10 mg of purified HBx-6xHis fusion protein from 1 l of bacterial culture.

3.3. Digestion of the HBx fusion protein with enteropeptidase

Some of the downstream applications might require the removal of the N-terminal fusion part-

ner consisting mainly of the omp-A signal sequence and the 6xHis tag/enteropeptidase domain. To demonstrate that the enteropeptidase cleavage site we introduced between HBx and the N-terminal fusion part is functionally active, we performed a test digestion with enteropeptidase in the presence of 3M urea (Fig. 3). The time course of the digestion demonstrates the disappearance of the $\sim 21/\sim 20$ kDa fusion protein bands and the appearance of a cleavage intermediate (~ 18.5 kDa) and cleavage end products (~ 16.5 kDa; < 5 kDa). The accumulation of free HBx protein is maximal after 4 h. Afterwards a gradual unspecific degradation of the HBx protein by the enteropeptidase seems to occur. The incompleteness of the digestion and the presence of small molecular weight cleavage products require additional chromatographic steps in order to obtain pure free HBx protein.

3.4. Cloning and expression of N- and C-terminal HBx deletion mutants

For the functional dissection of different domains in the HBx protein and to test if it is possible to improve HBx poor solubility by cutting of hydrophobic parts that might not be necessary for its function, we constructed DNA truncation mutants that lack different parts encoding for the N- and C-terminal regions of HBx (Fig. 4A). All of the constructions were inserted into the same expression vector psW202 that was used for the expression of the full-length HBx-6xHis fusion. The HBx constructs # 4, 5, and 6 could be expressed at levels comparable with the full-length HBx, whereas the HBx construct # 3 showed only weak expression under comparable conditions and the construct # 2 did not express at all (Fig. 4B and data not shown). The constructs # 2 and # 3 were the two smallest constructs and their low or missing expression might be due to their small molecular weight. The degradation or lack of expression of small proteins is frequently reported in *E. coli*. Because these two constructs # 2 and # 3 are especially important since they represent the most drastic truncations and span the N- and C-terminal extremes of the HBx protein, we decided to express them and the

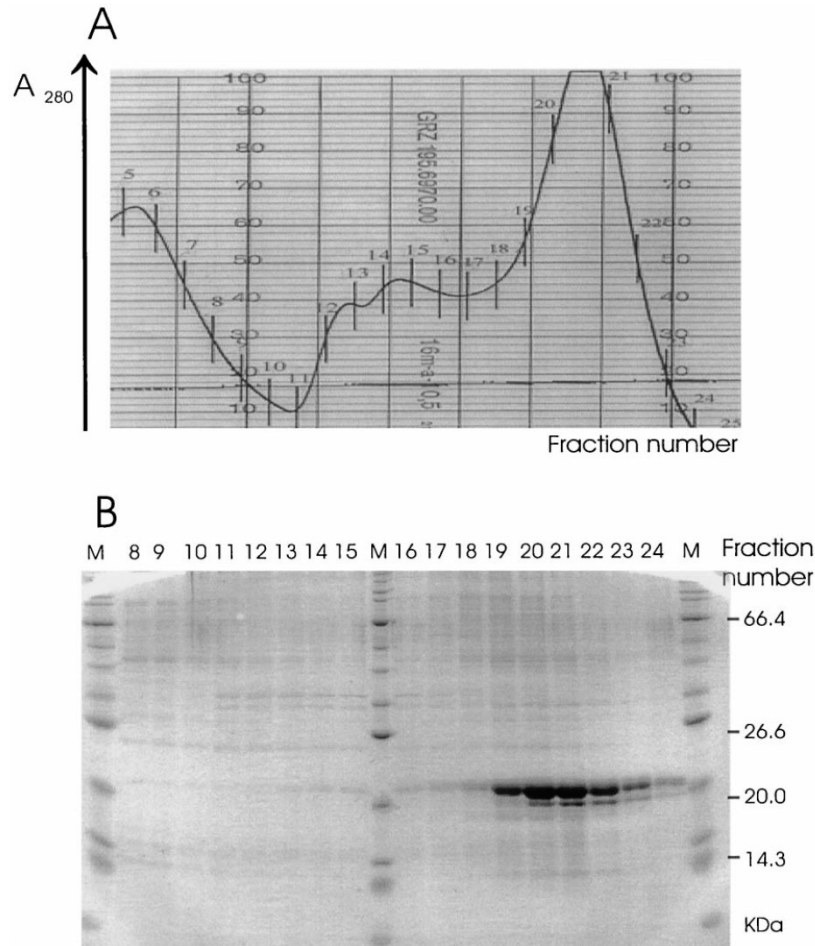


Fig. 2. Ni^{2+} -affinity chromatography of the recombinant HBx-6xHis fusion protein and analysis of the protein fractions by SDS-PAGE. Purification of the recombinant HBx-fusion protein from the insoluble fraction of *E. coli* by Ni-NTA affinity chromatography. One liter of bacterial culture was induced with 1 mM IPTG for 3 h at 25°C. Harvested cells were lysed and HBx-inclusion bodies were solubilized in 6 M guanidinium-HCl solution. The solubilise was applied to a Ni-NTA superflow column which had been equilibrated with buffer A (8 M urea, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris, pH 8.0). The column was subsequently washed with buffer B (like buffer A but pH 6.3) and proteins were eluted in one step with buffer C (like buffer A but pH 4.5). (A) Elution profile of proteins and their fractioning in 2 ml fractions. (B) Aliquots of 10 μl of each of the fractions of (A) were analyzed by SDS-PAGE.

full-length HBx also as GST-fusion proteins (Fig. 5A). All of the constructs were inserted into the commercial GST-fusion expression vector pGEX-2TK. The expression level of the three GST-HBx fusion constructs in *E. coli* was high, although GST-HBx #2 and #3 were predominantly and GST-HBx-complete was exclusively found in the insoluble inclusion body fraction of the bacterial

lysate (data not shown). Starting with 500 ml of bacterial culture induced with 1 mM IPTG for 4 h we were, however, able to purify > 1 mg of each of the GST-HBx #2 and #3 fusion proteins from the soluble fraction of the cell lysate (Fig. 5B). Together with GST-HBx #2 and #3 fusion proteins we co-purified small amounts of free GST (~ 26 kDa) that must be either a product of

proteolytic cleavage or of a prematurely terminated transcript (Fig. 5B). It was not possible to purify GST-HBx-complete from the soluble fraction of the bacterial lysate. These experiments showed that the co-expression of the highly soluble GST in the form of a fusion partner was able to improve HBx poor solubility.

3.5. Mapping of the HBx RNA binding site by electrophoretic mobility shift assay

We decided to employ HBx ability to bind to single-stranded DNA *in vitro* as described by Qadri and coworkers (Qadri et al., 1996) as a marker for one potential biological activity of HBx. The binding of HBx to single-stranded nucleic acids can be reproducibly tested by an EMSA. Instead of ssDNA we used a radioactively labeled RNA oligonucleotide as the probe in the EMSA and showed that HBx protein binds also to RNA (Fig. 6A). Not only the full-length HBx-6xHis fusion protein but also all of the other five HBx deletion constructs were able to bind to the RNA oligonucleotide and caused its retardation

in the non-denaturing gel. The complex formed between the AU-rich RNA oligonucleotide and the HBx-6xHis fusion proteins showed a greater shift than the complex formed between the RNA-oligonucleotide and the GST-HBx fusion proteins. The fact that both the GST-HBx #2 and #3 proteins bound to the RNA oligonucleotide indicated that the HBx protein might have two independent RNA binding sites which are located in its N-terminal (residues 5–78) and C-terminal (80–142) protein domains. Although four times more GST-HBx #2 protein was loaded on the gel, the observed band was significantly weaker than that observed with the GST-HBx #3 protein (Fig. 6a). This result suggested that the relative affinity of these two constructs might be different. Therefore, we compared the relative affinity of the GST-HBx constructs #2 and #3 in a separate experiment (Fig. 6b,c). Both proteins were gradually diluted and tested for their binding of the radioactively labeled RNA oligonucleotide. Whereas GST-HBx #2 upon dilution rapidly lost its ability to bind to the RNAoligonucleotide the GST-HBx #3 showed a

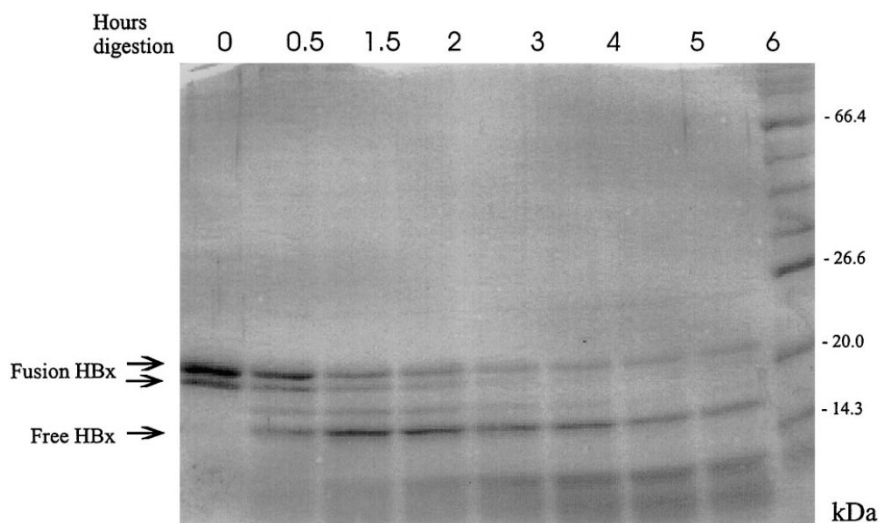


Fig. 3. Enteropeptidase digestion of the HBx-6xHis fusionprotein. Digestion of the HBx-fusion protein with bovine enteropeptidase. Recombinant HBx protein, purified under denaturing condition (in the presence of 8 M urea) by Ni-NTA metal affinity chromatography was digested with bovine enteropeptidase in the presence of 3 M urea for the times indicated at the top. The non-digested control and the digestion products were separated by SDS-PAGE. The molecular weights of the standard proteins are marked on the right side and the HBx-fusion protein and the free HBx are indicated with arrows on the left side.

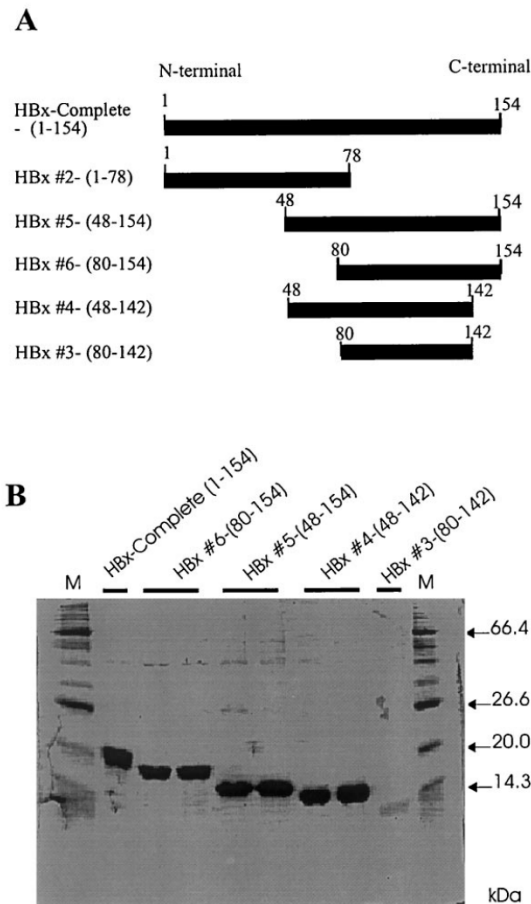


Fig. 4. Expression of the HBx-6xHis deletion constructs. (A) Schematic representation of the five HBx-6xHis deletion constructs. The DNA fragments encoding the depicted regions were amplified by PCR and cloned into the vector psW202. HBx constructs were expressed as 6xHis fusion proteins. The numbers indicate the residues of the 154 amino acid long HBx protein that are included in each deletion. (B) SDS-gel electrophoresis of the expressed and purified constructs. The constructs have been prepared and purified under denaturing conditions as described for the full-length HBx-6xHis fusion. Subsequently the peak fractions were pooled and an aliquot was run out on a SDS gel (12% acrylamide). The molecular weight of the marker proteins (M) are indicated and the according bands marked with arrows.

shift even at the highest dilutions tested. A faint shifted band could be observed for the GST-HBx #2 down to an amount of 1.5 μ g. An equally

intense band could be observed for GST-HBx #3 even at an amount of only 0.1 μ g. These results indicate that the affinity of GST-HBx #3 for RNA is at least an order of magnitude higher than that of GST-HBx #2. Another interesting observation was that the GST-HBx #3 protein causes the shift of two distinct species of bands (Fig. 6c). The second more retarded band was only observed with GST-HBx #3 and not with GST-

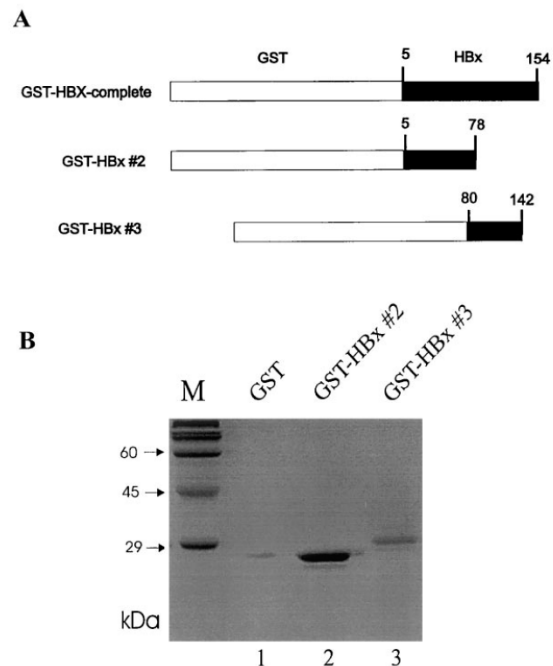


Fig. 5. Expression of the GST-HBx #2 and GST-HBx #3 deletion constructs. (A) Representation of the three different GST-HBx fusion constructs. (B) SDS-gel electrophoresis of the expressed and purified constructs. Bacteria were transformed with plasmids containing GST, GST-HBx #2 or #3 DNA constructs. Cells were induced for the expression of the GST fusion proteins, bacteria were lysed and the lysate was centrifuged at 13 000 $\times g$. The supernatant with the soluble proteins was applied to a glutathione sepharose column. Bound GST-HBx fusion proteins were eluted with glutathione. Peak fractions were pooled and analyzed by SDS-gel electrophoresis (10% acrylamide gel). The molecular weights of the marker proteins (M) are indicated with arrows.

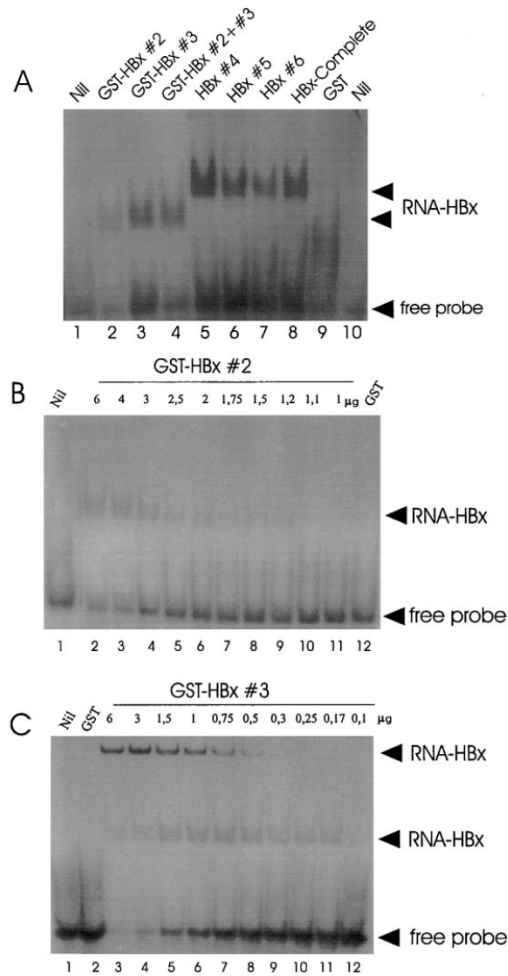


Fig. 6. EMSA of HBx-AU-rich RNA oligonucleotide interactions. (A) Analysis of the binding of the different GST-HBx fusion and HBx-6His fusion constructs to the AU-rich RNA oligonucleotide (240 pg per lane, all experiments). Lane 1, free oligo; lane 2, GST-HBx #2 (4 µg); lane 3, GST-HBx #3 (1 µg); lane 4, GST-HBx #2 (2 µg) and #3 (0.5 µg); lane 5, HBx-6xHis #4 (1 µg); lane 6 HBx-6xHis #5 (1 µg); lane 7, HBx-6xHis #6 (1 µg); lane 8, HBx-6xHis-complete (1 µg); lane 9, GST (1 µg); lane 10, free oligo. (B) Binding of GST-HBx #2 to the AU-rich RNA oligonucleotide. Lanes 1–12, radioactively labeled AU-rich RNA oligo; Proteins: lane 1, nil; lane 2–11 decreasing amounts of purified GST-HBx #2 protein as indicated on the top; lane 12, GST (2 µg). (C) Binding of GST-HBx #3 to the AU-rich RNA oligonucleotide. Lanes 1–12, radioactively labeled AU-rich RNA oligo; Proteins: lane 1, nil; lane 2, GST (2 µg), lanes 3–12, decreasing amounts of purified GST-HBx #3 protein as indicated on the top.

HBx #2 and might result from the formation of a GST-HBx #3 dimer on the AU-rich RNA oligonucleotide.

3.6. Competition experiments with unlabelled nucleic acids

Our finding that HBx binds an AU-rich RNA oligonucleotide prompted us to compare HBx binding to different single-stranded DNA substrates (Qadri et al., 1996). We tested the specificity of GST-HBx construct #3 to either the AU-rich RNA oligonucleotide or different unlabelled single-stranded DNA oligonucleotides by a competitive EMSA test (Fig. 7). This test revealed that a 10-fold molar excess of the unlabelled AU-rich RNA oligonucleotide competitor already completely abolished HBx binding to the radioactively labeled AU-rich RNA oligonucleotide. All three tested single-stranded DNA oligonucleotides (DNA oligo 1, DNA oligo 2 and oligo d[T]₁₈ DNA), however, showed no inhibition of HBx binding to the AU-rich RNA oligonucleotide when added in 10-fold or even 100-fold molar excess. These data indicate that GST-HBx #3 has a higher specificity for the AU-rich RNA oligonucleotide than for the two single-stranded DNA oligonucleotides of arbitrary sequence (DNA oligos 1 and 2, see Section 2 for sequences) or for the oligo d[T]₁₈ homopolymer.

3.7. Competitive binding experiments of GST-HBx #3 and AUF1 proteins to the AU-rich RNA oligonucleotide

The natural ligand of the AU-rich RNA oligonucleotide we used in our HBx-RNA binding studies is the protein AUF1 (Zhang et al., 1993). It had been shown that AUF1 binds specifically to the AU-rich domains present in the 3'-untranslated regions of many mRNAs with high turnover rates like those encoding certain proto-oncogene products (*c-myc*, *c-fos*) (Jones and Cole, 1987; Cleveland and Yen, 1989) and is involved in the rapid degradation of these mRNA species (Brewer, 1991). Since GST-HBx #3 bound with high specificity to the AU-rich RNA oligo that represents a natural substrate for the protein

AUF1 we were interested if the HBx protein would be able to displace AUF1 from its binding site on its RNA substrate. Descending amounts of AUF1 protein were incubated with the radioactively labeled AU-rich oligonucleotide in the presence of a constant amount of GST-HBx #3 protein (Fig. 8). When AUF1 protein alone is incubated with the AU-rich RNA oligonucleotide four distinct shifted bands could be observed (bands A–D, Fig. 8.). At very high amounts of added AUF1 protein (6–1.5 μ g) these bands persist even in the presence of GST-HBx #3 (800 ng) protein. In the presence of equal or higher amounts of the GST-HBx #3 protein, however, the appearance of the typical two HBx #3–RNA

bands (RNA-HBx 1 and 2, Fig. 8.) can be observed whereas the AUF1–RNA bands disappear in the order C/B $\rightarrow$ A $\rightarrow$ D. These results indicate that AUF1 and HBx #3 might occupy the same or overlapping binding sites on the AU-rich RNA oligonucleotide and that the HBx protein when present at equal or higher concentrations than AUF1 is able to displace AUF1 from its RNA binding site. The observation of an additional transient band neither observed with AUF1 nor with GST-HBx #3 alone seems to support this hypothesis (trimeric complex; Fig. 8). This band might represent some intermediate trimeric complex of the AU-rich RNA, AUF1 and GST-HBx #3.

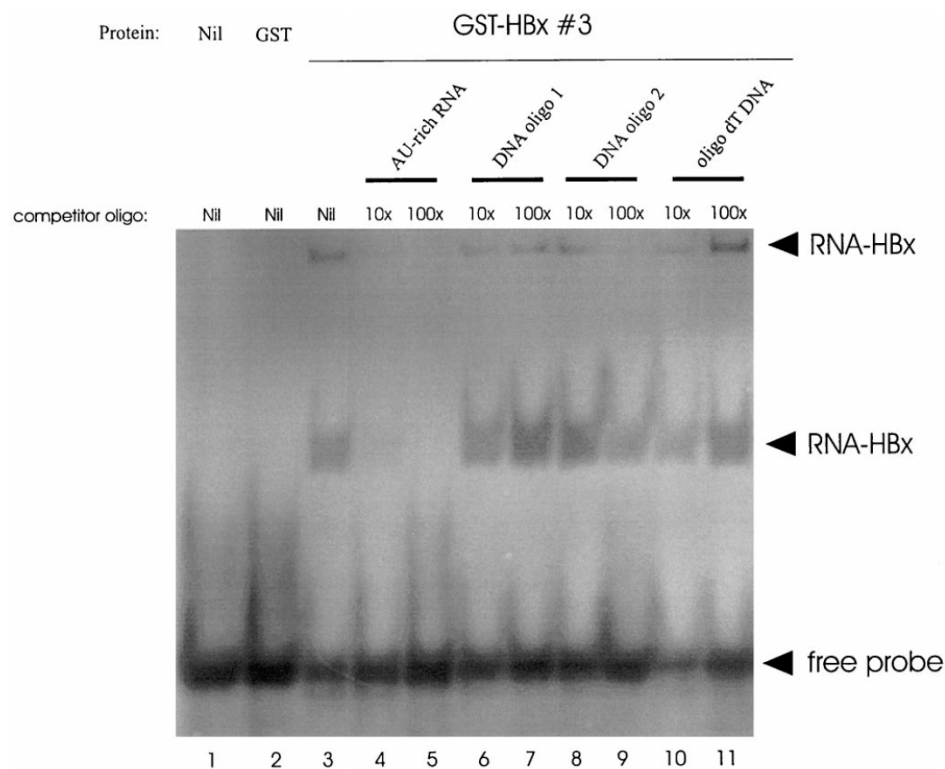


Fig. 7. EMSA of HBx #3–AU-RNA oligonucleotide interactions in the presence of oligonucleotide competitors. Analysis of the binding of GST-HBx #3 to the RNA oligonucleotide in the presence of $10 \times$ or $100 \times$ molar excess of unlabelled RNA or DNA oligonucleotides. Lanes 1–11, radioactively labeled AU-rich RNA oligonucleotide (240 pg per lane). Proteins: lane 1, nil; lane 2, GST (1 μ g); lanes 3–11 GST-HBx #3 (1 μ g). Competitors oligonucleotides: Lanes 1–3, no competitor; lane 4, $10 \times$ molar excess of AU-rich RNA oligonucleotide; lane 5, $100 \times$ AU-rich RNA oligo; lane 6, $10 \times$ DNA oligo 1; lane 7, $100 \times$ DNA oligo 1; lane 8, $10 \times$ DNA oligo 2; lane 9, $100 \times$ DNA oligo 2; lane 10, $10 \times$ oligo d(T)₁₈ DNA; lane 11, $100 \times$ oligo d(T)₁₈ DNA.

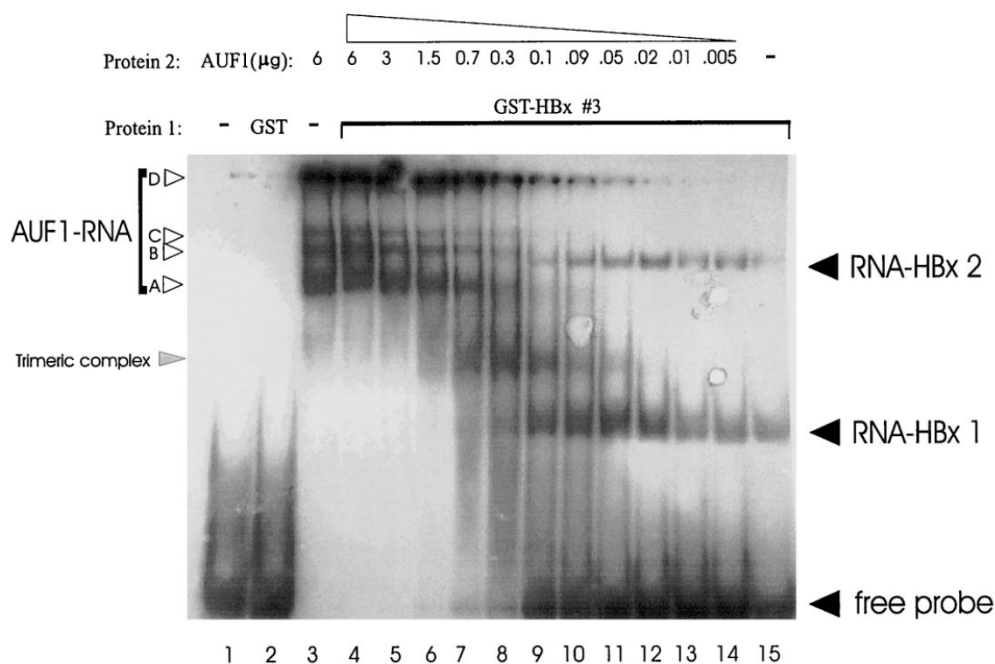


Fig. 8. Competitive binding of GST-HBx #3 and 6His-AUF1 fusion proteins to the AU-RNA oligonucleotide as analyzed by EMSA. Analysis of the binding of decreasing amounts of 6His-AUF1 protein to the AU-rich RNA oligonucleotide in the presence of GST-HBx #3 protein (800 ng per lane). Lanes 1–15, radioactively labeled AU-rich RNA oligo (240 pg per lane); Proteins: lane 1, nil; lane 2, GST (1 µg); lanes 4–15, GST-HBx #3 (800 ng per lane); lane 3, 6His-AUF1 protein (6 µg); lanes 5–15, decreasing amounts of purified 6His-AUF1 protein as indicated on the top.

4. Discussion

Although a subject of intense research the function of the HBV protein HBx is still very controversial (Yen, 1996). A structural analysis of the HBx protein by crystallographic or NMR techniques would be of great value for the better understanding of its functions. Here, we present data that show the expression of HBx in *E. coli* and its purification in mg amounts as full length protein as well as in truncated form.

We found that the HBx protein is expressed in an insoluble form in *E. coli* like it was described previously by others (Jameel et al., 1990; Gupta et al., 1995; Qadri et al., 1996; Marczinovits et al., 1997). To obtain larger amounts of soluble HBx we tried several different approaches. The first was to co-express the HBx protein with either the chaperones GroEL and GroES or with the bacterial thioredoxin. (Yasukawa et al., 1995). The

presence of these chaperones in increased concentration did however not result in any soluble HBx production. This might indicate that these specific chaperones are not involved in the folding pathway of the HBx protein. Likewise neither the co-expression of Trx also resulted in any detectable expression of soluble HBx, again indicating that additional factors are involved that contribute to the low solubility of the HBx protein.

The second approach to purify soluble HBx from *E. coli* was based on the presence of an N-terminal omp A signal sequence that directs the HBx protein to the bacterial periplasmic space, an oxidizing environment that might help in the correct formation of disulfide bonds. The properly processed HBx fusion protein without the omp A signal sequence (~20 kDa band), however, made up only ~10% of the total purified HBx fusion protein. Because our attempts to isolate soluble

HBx from the periplasmic space (Koshland and Botstein, 1980) were unsuccessful (data not shown), we concluded that the HBx protein might also form inclusion bodies in the periplasmic space.

The third approach to obtain soluble HBx protein expressed in *E. coli* was the systematic truncation of the N- and C-terminal regions of the protein. This approach was used with good success for other proteins expressed in *E. coli* or other expression systems. Two examples are the gp120 protein of HIV (Kwong et al., 1998) and the HIV integrase (Dyda et al., 1994). In both proteins both N- and C-terminal regions as well as internal extensive loop regions in the case of the gp120 were removed, since it had been shown in functional studies that these regions are not necessary. After these drastic modifications, both proteins were obtained in a more soluble form. Subsequently they could be crystallized and their structures were solved by X-ray crystallography (Dyda et al., 1994; Kwong et al., 1998). Using the expression vector psW202, we constructed five N- and C-terminal deletion mutants for the expression of truncated HBx-6xHis fusion proteins and two deletion mutants as well as full-length HBx for the expression as GST fusion proteins (Figs. 4 and 5). To assess the potential biological activity of both the full-length HBx-6xHis and the different deletion constructs, we next established a simple *in vitro* test system. It had been reported previously that HBx can bind to single-stranded DNA (ssDNA) (Qadri et al., 1996). We were interested to test if HBx can also bind to RNA and used an AU-rich RNA oligonucleotide as the test substrate in the EMSA.

We found that all of our HBx fusion constructs bound to the AU-rich RNA oligonucleotide, whereas the negative control GST was not able to cause the retardation of the oligonucleotide probe in the gel. Since the constructs GST-HBx #2 and #3 represent the N- and C-terminal halves of the HBx protein but both bound to the RNA oligonucleotide, we were interested to test their relative affinity to the RNA. According to Carey (Carey, 1991) the binding affinity can be estimated from the protein concentration required to bind half of the nucleic acid in the EMSA. From

the data shown in Fig. 6 and other similar experiments (data not shown), we estimated that the relative affinity of GST-HBx #3 to the RNA is ~10 times higher than that of GST-HBx #2 (Fig. 6). This demonstrates that a domain with high affinity for RNA must be located in the region between residues 80–142 of HBx. These data seem to correlate with some other data from the literature that also functionally dissect the N-terminal and C-terminal halves of the HBx molecule (Kumar et al., 1996; Gottlob et al., 1998; Kwee et al., 1992). Interestingly HBx transactivating capacity is also attributed to the C-terminal half of the molecule (Kumar et al., 1996; Wentz et al., 2000).

Next we tested if the binding specificity of HBx to our RNA oligonucleotide probe differs of that observed for HBx binding to single-stranded DNA (Qadri et al., 1996). We started to address this question by testing the GST-HBx #3 construct in a competition EMSA experiment where we added competing non-labeled oligonucleotides (Fig. 7). Different concentrations of homologous and heterologous single-stranded nucleic acids were used to try to inhibit the interaction. A 10 × molar excess of the unlabelled AU-rich oligonucleotide already showed complete inhibition of the binding whereas even a 100 × molar excess of none of the three tested DNA oligonucleotides showed inhibition of the binding (Fig. 7). These results indicate that the GST-HBx #3 protein might have a higher specificity for the AU-rich RNA than for single-stranded DNA substrates.

It is tempting to speculate for a possible physiologic meaning of this affine binding to the AU-rich RNA substrate in the light of HBx role as an oncogene product. We chose the sequence of the RNA-oligonucleotide because it encodes the so-called AU-rich motif which is frequently found in the 3'-end of several rapidly degraded mRNAs like those of certain proto-oncogenes and cytokines (Jones and Cole, 1987; Cleveland and Yen, 1989). Since the HBx protein is expressed in the cytoplasm of the host liver cell, it is possible that HBx also binds *in vivo* in the liver cell to mRNA substrates that contain AU-rich motifs. The binding of HBx might compete with the binding of factors like the protein AUF1 which is bound to

the AU-rich motif *in vivo* and is involved in the rapid degradation of the mRNAs of certain proto-oncogenes like *c-myc* or *c-fos* (Brewer, 1991; Zhang et al., 1993). Such a displacement of AUF1 by HBx might cause the stabilization of AU-rich proto-oncogene mRNAs and thereby contribute to the transforming phenotype (Lee et al., 1988). The efficiency of this displacement *in vivo* depends on several unknown parameters like the steady-state concentrations of the proteins (AUF1, HBx) and mRNAs involved. Although the expression level of the HBx *in vivo* might be low, the contribution to the transformation of the liver cell via the described mechanism can be significant because the development of HCC from a chronic HBV infection is a very slow process and can take several years if not decades. It is therefore quite possible that the constant presence of the HBx protein in the chronically infected liver cells leads to the enduring stabilization of proto-oncogene mRNAs with AU-rich regions and thereby contributes to the malignant transformation of the liver cells. In future *in vivo* experiments we want to over express HBx in human cell lines to address HBx role in this possible mechanism of cellular transformation.

Acknowledgements

We are indebted to Mrs. Karen C.M. de Moraes for providing purified recombinant 6His-AUF1 protein and Prof. Dr. Rogério Meneghini for critical review of the manuscript. We also thank Drs. Winfried Wels and Hilmar Lemke for providing us with the bacterial expression vector psW202, and Dr. R. J. Schneider for the HBx gene containing vector pCMV-Ad. The vectors pT-groE and pT-Trx for the co-expression of the chaperones or thioredoxin, respectively, were kindly provided by Drs. T. Yasukawa, C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto, and S. Ishii. This work is supported by the Fundação de Amparo à pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP, grant 98/05891-9 to J.K.) and the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

References

- Brewer, G., 1991. An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 11, 2460–2466.
- Carey, J., 1991. Gel retardation. *Meth. Enzymol.* 208, 103–116.
- Challberg, M.D., Kelly, T.J., 1989. Animal virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 671–717.
- Chirillo, P., Pagano, S., Natoli, G., Puri, P.L., Burgio, V.L., Balsano, C., Levrero, M., 1997. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8162–8167.
- Cleveland, D.W., Yen, T.J., 1989. Multiple determinants of eukaryotic mRNA stability. *New Biol.* 1, 121–126.
- Dyda, F., Hickman, A.B., Jenkins, T.M., Engelman, A., Craigie, R., Davies, D.R., 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* 266, 1981–1986.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P., 1979. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. *Nature* 281, 646–650.
- Ganem, D., 1996. Hepadnaviridae and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology*, 3rd Ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp. 2703–2737.
- Gottlob, K., Pagano, S., Levrero, M., Graessmann, A., 1998. Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation. *Cancer Res.* 58, 3566–3570.
- Gupta, A., Mal, T.K., Jayasuryan, N., Chauhan, V.S., 1995. Assignment of disulphide bonds in the X protein (HBx) of hepatitis B virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 919–924.
- Hang, X., Dong, W., Guarino, L.A., 1995. The lef-3 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus encodes a single-stranded DNA-binding protein. *J. Virol.* 69, 3924–3928.
- Haviv, I., Vaizel, D., Shaul, Y., 1995. The X protein of hepatitis B virus coactivates potent activation domains. *Mol. Cell Biol.* 15, 1079–1085.
- Hohne, M., Schaefer, S., Seifer, M., Feitelson, M.A., Paul, D., Gerlich, W.H., 1990. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *EMBO J.* 9, 1137–1145.
- Hollinger, F.B., 1996. Hepatitis B virus. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology*, 3rd Ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp. 2739–2807.
- Jameel, S., Siddiqui, A., Maguire, H.F., Rao, K.V., 1990. Hepatitis B virus X protein produced in *Escherichia coli* is biologically functional. *J. Virol.* 64, 3963–3966.
- Jones, T.R., Cole, M.D., 1987. Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences. *Mol. Cell Biol.* 7, 4513–4521.

- Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., Jay, G., 1991. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351, 317–320.
- Klein, N.P., Bouchard, M.J., Wang, L.H., Kobarg, C., Schneider, R.J., 1999. Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *EMBO J.* 18, 5019–5027.
- Klimka, A., Barth, S., Drillich, S., Wels, W., van Snick, J., Renauld, J.C., Tesch, H., Bohlen, H., Diehl, V., Engert, A., 1996. A deletion mutant of *Pseudomonas* exotoxin-A fused to recombinant human interleukin-9 (rhIL-9-ETA') shows specific cytotoxicity against IL-9- receptor-expressing cell lines. *Cytokines Mol. Ther.* 2, 139–146.
- Koshland, D., Botstein, D., 1980. Secretion of β -lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell* 20, 749–760.
- Kumar, V., Jayasuryan, N., Kumar, R., 1996. A truncated mutant (residues 58–140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5647–5652.
- Kwee, L., Lucito, R., Aufiero, B., Schneider, R.J., 1992. Alternate translation initiation on hepatitis B virus X mRNA produces multiple polypeptides that differentially transactivate class II and III promoters. *J. Virol.* 66, 4382–4389.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., Hendrickson, W.A., 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648–659.
- Lee, W.M., Lin, C., Curran, T., 1988. Activation of the transforming potential of the human fos proto-oncogene requires message stabilization and results in increased amounts of partially modified fos protein. *Mol. Cell Biol.* 8, 5521–5527.
- Ljungquist, C., Breitholtz, A., Brink-Nilsson, H., Moks, T., Uhlen, M., Nilsson, B., 1989. Immobilization and affinity purification of recombinant proteins using histidine peptide fusions. *Eur. J. Biochem.* 186, 563–569.
- Lo, S.J., Chien, M.L., Lee, Y.H., 1988. Characteristics of the X gene of hepatitis B virus. *Virology* 167, 289–292.
- Maguire, H.F., Hoeffler, J.P., Siddiqui, A., 1991. HBVX protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein–protein interactions. *Science* 252, 842–844.
- Marczinovits, I., Somogyi, C., Patthy, A., Nemeth, P., Molnar, J., 1997. An alternative purification protocol for producing hepatitis B virus X antigen on a preparative scale in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 56, 81–88.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598–599.
- Qadri, I., Ferrari, M.E., Siddiqui, A., 1996. The Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, interacts with single-stranded DNA 9 (ssDNA). Biochemical characterizations of the HBx-ssDNA interactions. *J. Biol. Chem.* 271, 15443–50.
- Redeker, A.G., 1975. Viral hepatitis: clinical aspects. *Am. J. Med. Sci.* 270, 9–16.
- Robinson, W.S., 1994. Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma. *Annu. Rev. Med.* 45, 297–323.
- Su, F., Schneider, R.J., 1997. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8744–8749.
- Twu, J.S., Wu, J.Y., Robinson, W.S., 1990. Transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by hepatitis B virus X-protein requires de novo protein synthesis. *Virology* 177, 406–410.
- Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B.M., Kornilova, E.S., Hekele, A., Mendelsohn, J., Groner, B., Hynes, N.E., 1995. EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int. J. Cancer* 60, 137–144.
- Wentz, M.J., Becker, S.A., Slagle, B.L., 2000. Dissociation of DDB1-binding and transactivation properties of the hepatitis B virus X protein. *Virus Res.* 68, 87–92.
- 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.
- Yen, T.S.B., 1996. Hepadnaviral X protein: Review of recent progress. *J. Biomed. Sci.* 3, 20–30.
- Zhang, W., Wagner, B.J., Ehrenman, K., Schaefer, A.W., DeMaria, C.T., Crater, D., DeHaven, K., Long, L., Brewer, G., 1993. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol. Cell Biol.* 13, 7652–7665.

The cysteine residues of the hepatitis B virus onco-protein HBx are not required for its interaction with RNA or with human p53

Patricia Ribeiro de Moura^{a,b,1}, Edmilson Rui^{a,b,1}, Kaliandra de Almeida Gonçalves^a,
Jörg Kobarg^{a,b,*}

^a Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, CP 6192, Campinas, SP, CEP 13084-971, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

Received 21 May 2004; received in revised form 23 August 2004; accepted 26 August 2004

Available online 22 October 2004

Abstract

The hepatitis B virus (HBV) protein HBx has been implicated to induce liver cancer in transgenic mice and transactivates a variety of viral and cellular promoters. The 17 kDa protein HBx consists of 154 amino acids, contains 10 cysteine residues and is translated during the viral infection. It has been shown previously that the HBx protein is able to bind to singlestranded DNA and RNA. This nucleic acid binding activity might be relevant for HBx oncogenic character. Furthermore, HBx has been reported to interact with a series of cellular proteins, especially with transcription factors, including the tumor suppressor protein p53. To evaluate the importance of the cysteine residues in HBx for its interaction with RNA and p53 we expressed full-length HBx-wt as well as several truncated mini-HBx(18–142) proteins with multiple cysteine to serine point mutations as 6xHis fusion proteins in *Escherichia coli*. Using UV cross-linking assays we demonstrate that all truncated mini-HBx proteins with cysteine/serine point mutations maintained the ability to bind to an AU-38 RNA oligonucleotide. Furthermore, we performed in vitro binding assays of selected HBx mutants with GST-p53, circular dichroism spectroscopic analysis of the mutant HBx protein secondary structure and a p53 based transcription activation assay in yeast cells. In summary, our data suggest that the cysteine residues in the HBx protein are of minor importance for its interaction with both RNA and the p53 protein.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Viral hepatitis; Hepatocellular carcinoma; Viral transactivator; Oncogene

1. Introduction

Infection with hepatitis B virus (HBV) has been associated with development of liver cancer (HCC), one of the most prevalent malignant diseases worldwide (Hollinger, 1996). Of the 2 billion people who have been infected with HBV, more than 400 million are chronic carriers of HBV and these people have a 100-fold increased risk of developing HCC than non-carriers. It is estimated that each year worldwide

more than 1 million people die from HCC. HBV is the smallest known DNA virus and it has a strict tissue tropism to the liver, causing acute or chronic hepatitis, leading to necrosis followed by multiple nodular hyperplasia and cirrhosis (Ganem, 1996). Although the induction of regenerative hyperplasia might be involved in the initiation of HCC, HBV may have a more direct role. The HBV genome is composed of a partially double stranded DNA of 3.2 kb that contains at least four open reading frames (ORF) which are named S, C, P, and X. The ORF X encodes a 17 kDa (154 amino acids) protein termed HBx, which is translated during viral infection. In animal models it has been suggested that HBx is essential for the viral replication in vivo (Zoulim et al., 1994; Chen et al., 1993). Aside this finding the HBx has been im-

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3287 4520x516; fax: +55 19 3287 7110.

E-mail address: jkobarg@lnls.br (J. Kobarg).

¹ Contributed equally to this work.

plicated in the development of HCC in transgenic mice (Kim et al., 1991). Due to its both cytoplasmatic and nuclear localization, HBx stimulates signal transduction pathways in the cytoplasm as well as interacts directly with transcription factors in the nucleus (Henkler et al., 2001). Moreover, it has been shown that HBx is a potent transactivator of several viral and cellular promoters (Twu et al., 1990; Yen, 1996). It has recently been reported that HBx can interact with singlestranded DNA (ssDNA) in a sequence independent but base specific fashion (Qadri et al., 1996), although it does not bind to dsDNA. Since HBx can bind to ssDNA (Qadri et al., 1996), we speculated that it might also be able to interact with RNA. Our previous studies (Rui et al., 2001) have shown that HBx can displace the human protein AUF1 from its binding site on the RNA oligonucleotide in a competitive binding experiment of AUF1 and HBx to an AU-rich oligonucleotide (AU-38). The displacement of cellular factors from proto-oncogene mRNAs in vivo by HBx might contribute to its oncogenic character.

On the other hand HBx has not only been shown to interact with singlestranded DNA and RNA but with several different cellular proteins (Murakami, 1999). The interacting proteins include proteins from different functional groups, such as: gene specific transcription factors, including among others p53 (Feitelson et al., 1993, 1997), bZIP family proteins such as ATF (Barnabas et al., 1997) and NF- κ B (Assogba et al., 2002), general transcription factors such as TBP (Wang et al., 1998) and TFIIB (Lin et al., 1997; Haviv et al., 1998), DNA repair proteins such as UVDDDB1 (Sitterlin et al., 1997; Wentz et al., 2000), proteasome subunits XAPC7 (Fischer et al., 1995; Huang et al., 1996), and finally several proteins that are not yet fully characterized functionally such as XAP2 (Kuzhanaivelu et al., 1996), XIP (Melegari et al., 1998), to mention only two of them.

P53 is an important regulatory protein involved in safeguarding the genomic integrity (Lane, 1992), sensing of DNA damage (Lee et al., 1995), monitoring of the G1 checkpoint of the cell cycle (Kastan et al., 1992) and activation of the cellular apoptosis program to kill cells with damaged genomes (Shaw et al., 1992). The inactivation of p53 function through mutations or by interaction with viral proteins is a common event in human carcinogenesis and the majority of human cancers show mutations in the *p53* gene (Hollstein et al., 1991). The *p53* gene is in fact inactivated in 30–55% of hepatocellular carcinomas (Sohn et al., 2000). P53 is a cellular protein target for a series of viral onco-proteins, that are involved in neoplastic transformation and include the SV40 T antigen, E1A and B of the adenovirus, E6 and E7 of the HPV virus (Wang and Harris, 1996) and HBx of the hepatitis B virus (Elmore et al., 1997; Feitelson et al., 1993; Takada et al., 1995). The direct interaction of HBx with p53 can interfere with p53 sequence specific DNA binding and gene transactivation.

In this study, we expressed the full-length 6xHis-HBx protein and truncated 6xHis-mini-HBx proteins containing single or multiple cysteine to serine substitutions in *Escherichia*

coli. We addressed the importance of Cysteines in the HBx protein for its binding to an AU-rich RNA oligonucleotide, for its interaction with the p53 protein and p53-dependent transactivation of a reporter gene. Using an UV cross-linking assay, we were able to demonstrate that all mini-HBx protein cysteine/serine point mutants have the ability to bind to the AU-rich oligonucleotide (AU-38). The mini-HBx protein without any cysteine 6xHis-mini-HBx(-Cys) was also able to interact with p53 protein in vitro just as full-length 6xHis-HBx with 10 Cys or 6xHis-mini-HBx with 5 Cys residues. CD spectroscopy studies demonstrated that the mini-HBx proteins with and without the Cysteines have almost identical secondary structure compositions thereby indicating that the Cysteines might not be relevant for HBx structure. Taken together, these results suggest that the Cys residues in the HBx protein are not important for its interaction with RNA nor with the p53 tumor suppressor protein.

2. Materials and methods

2.1. Construction of plasmids and yeast strains

The full-length HBx DNA (subtype *ayw*) (Galibert et al., 1979; Lo et al., 1988) inserted into pCMV-Ad (kindly provided by Dr. R. Schneider, New York) was used as a template DNA in the PCR reactions, in order to amplify the full-length HBx gene (510 bp) and a truncated mini HBx gene (372 bp). The full-length HBx gene was directionally cloned into the bacterial expression vector pET28a+ (Novagen) via *Nde*I (sense oligonucleotide: AC GAA TTC CAT ATG GCT GCT AGG TTG TGC TGC C) and *Xho*I (anti-sense oligonucleotide: GTT CTC GAG TTA GGC AGA GGT GAA AAA G) restriction sites, while the truncated mini-HBx gene was cloned into pET28a+ via *Nde*I (sense oligonucleotide: G GAA TTC CAT ATG CGT CCC GTC GGC GCT GAA TC) and *Bam*HI (anti-sense oligonucleotide: CG GGA TCC TTA GAC CAA TTT ATG CCT ACA GCC) restriction sites. pET28a+ encodes upstream of the insertion site a histidine tag (6xHis), which allows the purification of the recombinant fusion proteins via Ni-affinity chromatography. The recombinant plasmids HBx-pET28a+ and the mini-HBx-pET28a+ were transformed in *E. coli* BL-21 cells, for the expression of the 6xHis-HBx and the different 6xHis-mini-HBx proteins. The HBx(1–154), mini-HBx(18–142) and mini-HBx(18–142)-Cys (not coding any Cysteines) were amplified by PCR and subcloned in frame with the *lexA* DNA binding domain in the yeast expression vector pBTM116 via *Eco*RI and *Bam*HI restriction sites.

A pGEX plasmid containing the full-length human p53 in frame with GST was kindly provided by Dr. Gianni Del Sal (Laboratorio Nazionale CIB, Trieste, Italy). The gene coding human p53(1–393) protein was amplified from this vector with specific primers and inserted in frame with the Gal4 activation domain, via *Eco*RI and *Bam*HI sites, into the cloning site of the yeast expression vector pGAD424 (Clontech). The

correctness of all vector constructs was confirmed by DNA sequencing.

2.2. Site-directed mutagenesis

The 14 mini-HBx cysteine to serine point mutants were constructed through PCR methodology according to the *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis* kit (Stratagene). All mutants were confirmed by DNA sequencing.

2.3. Expression of proteins and purification of the p53-GST fusion protein

E. coli strain BL-21 was transformed with the either HBx, or mutant mini-HBx DNA containing pET28a+ vector, with human p53 containing pGEX-2TK or empty pGEX-2TK vector. Cells were grown in LB medium containing kanamycin (pET) or ampicillin (pGEX) to an $OD_{600} = 0.7$, followed by addition of isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM and induced for 3 h at 37 °C. Cells were harvested by centrifugation and HBx proteins were purified from inclusion bodies as described further.

GST and GST-p53 were expressed in a similar fashion but purified from the soluble protein fraction of the bacterial lysate using glutathione-sepharose 4B (Amersham) as described previously for other GST fusion proteins (Moraes et al., 2003).

2.4. Purification of 6xHis-HBx fusion proteins from inclusion bodies

A bacterial pellet derived from a 1 l culture was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF) containing lysozyme (1 mg/ml). After incubation on ice for 30 min, cells were lysed by three subsequent freeze-thaw cycles. Genomic DNA was digested by addition of DNase (1 μ g/ml) and incubation for 20 min at 37 °C. After incubation, the samples were sonicated and the pellet was separated by centrifugation at $18,600 \times g$ for 15 min at 4 °C. The pellet was resuspended in washing buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 3 M urea, 1% Triton X-100) and then centrifuged at $9500 \times g$ for 15 min at 4 °C for three times or until the supernatant was clear. The pellet containing the HBx inclusion bodies was solubilized in 20 ml of 50 mM Tris-HCl, (pH 8), 8 M urea and the solution was cleared by centrifugation at $14,000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The resulting solution was filtered and applied to a Ni-NTA column (QIAGEN). The subsequent washing and elution steps were all carried out with buffer A (8 M urea, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl) but at different pHs. The column was washed first with buffer A, pH 8 and then with buffer A, pH 6.3. Bound protein was eluted with a linear pH gradient between 6.3 and 4.5 in buffer A. The column eluate was collected in 2 ml fractions and 10 μ l aliquots were analyzed by SDS-PAGE. Peak fractions were pooled and dialyzed against renaturing buffer (10 mM Pipes, pH 7) at 4 °C with several

changes of the buffer. Dialyzed protein was cleared by centrifugation at $14,000 \times g$ and used for the UV cross-linking and in vitro p53 binding assays.

2.5. Circular dichroism analysis

The spectroscopic CD analysis of the HBx proteins was performed on a JASCO J-810 spectropolarimeter, coupled to a Peltier PFD 425S system for stable temperature at 20 °C. The far UV-CD spectra (260–190 nm) were collected using a quartz cuvet with an optical path of 1 mm. The final spectra were obtained from at least four independent scans and by subtraction of the solvent spectrum. The obtained data were converted into values of residual molar ellipticity θ , and processed by the program *CDNN deconvolution* (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>) to obtain the predicted relative percentage of secondary structure elements for each of the analyzed HBx proteins at the different buffer conditions.

2.6. UV cross-linking assay of HBx with RNA oligonucleotides

The purified 6xHis-HBx and 6xHis-mini-HBx proteins were incubated with an AU-rich [γ - 32 P]-RNA 38-mer oligonucleotide (GUGAUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUAUUUAUUUAUUUAUAG) (Rui et al., 2001) in a final volume of 25 μ l containing 20 mM Hepes, 10 mM $MgCl_2$, 60 mM KCl and 10% glycerol. After incubation on ice for 30 min, the opened reaction tubes were exposed to the ultraviolet light (254 nm) for 5 min in a distance of 100 mm (UV Stratalinker 2400). The complexes were resolved by SDS-PAGE under denaturing conditions and visualized after a 2–6 h exposition on a BAS-IP MS 2325 (Fujifilm) by phosphorimager scan (Bio-Imaging Analyzer BAS-1800II; Fujifilm).

2.7. Co-precipitation assay of GST-p53 with HBx

We used the expressed and purified proteins GST, GST-p53 and HBx in its various mutant forms to perform pull down assays in vitro. First, we immobilized GST-p53 protein or GST control protein on glutathione beads. The coupled beads were then incubated with wt-HBx(1–154), mini-HBx(18–142) or mini-HBx(-Cys) (Fig. 1). After incubation and extensive washings with PGDE buffer (25 mM Pipes, pH 6, 50 mM KCl, 80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 5% glycerol) the beads were collected and bound protein was analyzed by SDS-PAGE.

2.8. Yeast one-hybrid system based p53 transcriptional activation assay

The vector p53blue (Clontech) was generated by inserting three tandem copies of the consensus p53 binding site

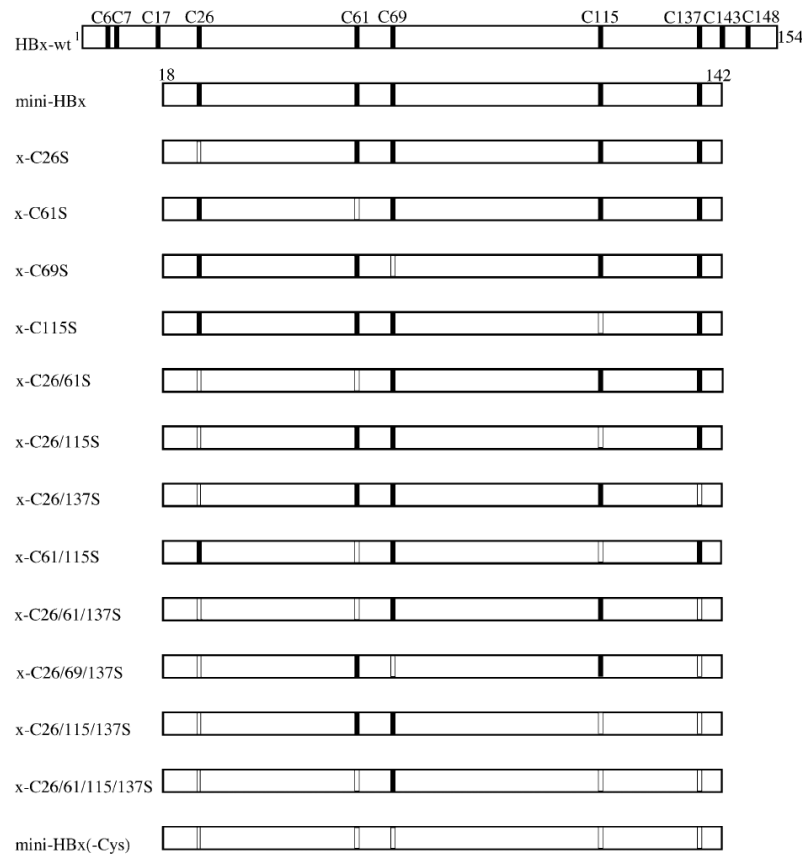


Fig. 1. Schematic representation of the different HBx protein variants indicating the introduced cysteine/serine mutations. The mini-HBx cysteine/serine point mutants were generated through site directed mutagenesis methodology and confirmed by sequencing analysis. The DNA fragments were cloned into the bacterial expression vector pET28a+ and the HBx constructs were expressed as 6xHis fusion proteins. The numbers indicate the amino acid residues present in the truncated HBx proteins. The cysteine residues are indicated in the HBx constructs and marked as full boxes while the serine residues are marked as empty boxes.

via *EcoRV* and *SalI* sites into the vector pLacZi (Clontech). This vector was linearized with *Apal* and transformed into yeast strain W303 (important features of its genotype: *ade2-1/ade2-1*; *ura3-1/ura3-1*; *his3-11,15/his311,15*; *trp1-1/trp1-1*; *leu2-3,112/leu2-3,112*) for integration into its genome and generation of the yeast reporter strain W303-p53blue which was used for the one-hybrid transcriptional activation assay described further. Next, W303-p53blue cells were or were not transformed with pGAD424 or pGAD424-p53(1–393) plasmids. In a second step these transformants were co-transfected with empty pBTM116, or pBTM116 encoding for *lexA* in fusion with: HBx(1–154), mini-HBx(18–142) or mini-HBx(-Cys).

The degree of activation of the p53 promoter *lacZ* reporter construct was then assessed by an ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) liquid assay (Clontech). Briefly, equal quantities of yeast cells were centrifuged and disrupted in Z-buffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl,

1 mM MgSO_4) by freeze–thawing. Twenty-five millimolar 2-mercaptoethanol and 10 mM ONPG (each dissolved in Z-buffer) were added to each reaction. After 1 h at 30 °C the reaction was stopped by adding 0.3 volumes of 1 M Na_2CO_3 . After mixing and centrifugation the OD of the supernatants was measured at 420 nm using a spectrophotometer. All experiments were done in triplicate and the average value was plotted as arbitrary units.

3. Results

3.1. Cloning and expression of HBx fusion proteins

The full-length 6xHis-HBx protein (wt) and the mini-HBx cysteine/serine point mutants (Fig. 1) were expressed in *E. coli* cells transformed with the plasmid pET28a+ that had the HBx gene of the *ayw* subtype inserted in frame into its cloning

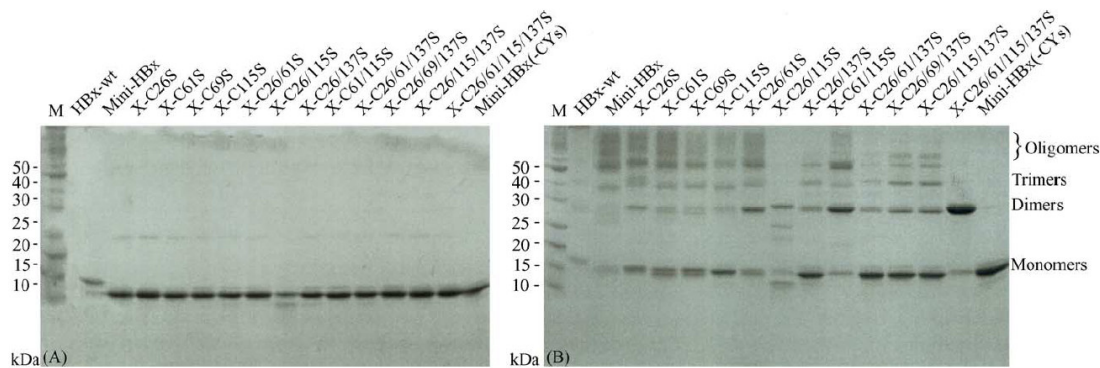


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of mini-HBx cysteine/serine point mutants under reducing (A) and non-reducing (B) conditions. One liter of bacterial culture was induced with 1 mM IPTG for 3 h at 37 °C. Harvested cells were lysed and HBx-inclusion bodies were solubilized in 8 M urea solution after previous purification. The solubilisate was applied to a Ni-NTA superflow column which had been equilibrated with buffer A (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8). The column was subsequently washed with buffer B (like buffer A, but pH 6.3) and proteins were eluted in one step with buffer C (like buffer A but pH 4.5). Aliquots of purified proteins were dissolved in SDS loading buffer containing 5% of 2-mercaptoethanol (A) or not (B). The 15% SDS-PAGE was stained with Coomassie blue. Approximately 1 µg of proteins were loaded in each lane. The molecular weights of the marker proteins (M) are indicated on the left side. The HBx protein point mutants are indicated on the top.

site. The expression of 6xHis-HBx and the 6xHis-mini-HBx fusion proteins resulted in proteins of 18 and ~15 kDa that were exclusively found in the insoluble inclusion body fraction of the bacterial cell lysate.

3.2. Site-directed mutagenesis

Our aim was to address the importance of Cysteines for the biological activity of HBx protein and we decided to produce several point mutants of mini-HBx applying a site-directed mutagenesis methodology. Another group had shown before that a truncated HBx protein, spanning amino acids 58–140 maintained its full trans-activation function (Kumar et al., 1996). In order to remove some Cysteines and hydrophobic amino acids from the N- and C-terminal regions of HBx we produced a 6xHis-mini-HBx(18–142) protein in *E. coli*. Next, we produced mutant 6xHis-mini-HBx(-Cys) proteins, where the remaining five Cysteines were substituted by serine residues individually or in different combinations, applying a site-directed mutagenesis methodology (Fig. 1). It has been shown previously that a Na, K-ATPase had its 23 Cysteines changed to serine residues and this mutant protein had kept its full functional and structural integrity (Hu et al., 2000). All generated mini-HBx cysteine/serine point mutants have 124 amino acids (residues 18–142) and lack 6–10 Cysteines in comparison to the full-length HBx-wt protein that contains 10 cysteine residues (Fig. 1). All mutations were confirmed by DNA sequencing.

3.3. Purification of the 6xHis-HBx fusion proteins by Ni-NTA chromatography

Since the full-length 6xHis-HBx and the 6xHis-mini-HBx fusion proteins were found in the inclusion bodies we solubilized them with 8 M urea to purify the protein under denatur-

ing conditions on a Ni-NTA column (Ljungquist et al., 1989; Porath et al., 1975; Rui et al., 2001). The column was washed and eluted in buffers containing 8 M urea and the collected fractions were analyzed by SDS gel electrophoresis. The recombinant 6xHis-HBx fusion proteins were dialyzed against 10 mM Pipes (pH 7) and used in the UV cross-linking and in vitro p53 binding assays.

All 6xHis-mini-HBx cysteine/serine point mutants were analyzed by SDS-PAGE under reducing (Fig. 2A) and non-reducing (Fig. 2B) conditions, in order to address if di- or multimerization of the mini-HBx proteins would occur. Under non-reducing conditions, it can be observed that the x-C26/61/115/137S point mutant is mostly found as a dimer while the mutant mini-HBx(-Cys) (x-C26/61/69/115/137S) is completely monomeric due to the lack of all five cysteine residues. The vast majority of point mutants was found in a di- and oligomeric forms due to the formation of inter-molecular disulphide bonds. Under reducing conditions, all inter-molecular disulphide bonds were reduced so that all the 6xHis-mini-HBx point mutants have the same electrophoretic mobilities and migrate as monomers (Fig. 2).

3.4. Circular dichroism spectroscopic analysis of HBx-wt, mini-HBx and mini-HBx(-Cys) proteins

Next, we wanted to address if the presence or absence of cysteine residues in the protein HBx influences its secondary structure content measured by far UV circular dichroism spectroscopy. We tested the different 6xHis-HBx protein variants using two different buffer conditions against which the samples had been repeatedly dialyzed: pure water (Fig. 3) and PGDE buffer (25 mM Pipes, pH 6, 50 mM KCl, 80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 5% glycerol) (Table 1).

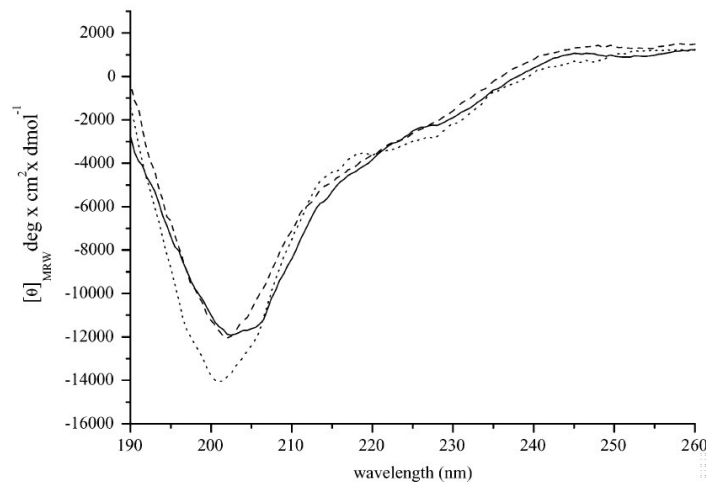


Fig. 3. Circular dichroism analysis of three HBx proteins. Far-UV CD spectra at 20 °C of the purified 6xHis-HBx (solid line), 6xHis-mini-HBx (dashed line), and 6xHis-mini-HBx(-Cys) (dotted line) in pure water at pH 6. The protein concentration was 5 μ M for each sample. Spectra were background corrected and the observed optical activity was expressed as the mean residue molar ellipticity $[\theta]_{MRW}$ ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$).

It is remarkable that the values of the secondary structure contents of the three different tested HBx protein variants in the same buffer condition are very similar (Table 1, Fig. 3). The values are very similar between 6xHis-HBx compared to 6xHis-mini-HBx, suggesting that their secondary structure contents are almost identical. 6xHis-mini-HBx(-Cys), which lacks all Cysteines, also shows comparable values for the different secondary structure elements. It is noteworthy that there was relatively little variation in the content of secondary structure comparing the three different protein versions of the HBx when tested in the same buffer (Table 1). 6xHis-HBx, 6xHis-mini-HBx and 6xHis-mini-HBx(-Cys) had for example very close values of β -sheet content in buffer PGDE (42, 42.6 and 43.7%, respectively). Comparing water and PGDE buffer, 6xHis-HBx for example showed a rather large decrease of its β sheet content from 45.9 to 42% respectively. In consequence of this, 6xHis-HBx random coil content increases from 23.3% in water to 29.5% in PGDE. In summary, these data suggest that the buffer conditions have a larger influence on the random coil content of the different HBx protein variants than the presence or absence of cysteine residues in the different protein variants, since HBx has ten

Cys residues, 6xHis-mini-HBx five and 6xHis-mini-HBx(-Cys) no cysteine residue.

3.5. HBx and mini-HBx lacking one to all Cysteines interact with AU-RNA oligonucleotides

We decided to employ the HBx ability to bind to singlestranded DNA in vitro as described by Qadri and co-workers (Qadri et al., 1996) as an assay for one potential biological activity of HBx. The binding of HBx to singlestranded nucleic acids can be tested by an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in which a radioactively labeled RNA oligonucleotide 38-mer was used (Rui et al., 2001) instead of the ssDNA probes described by Qadri et al. (1996). Here, we used an UV cross-linking assay instead of a conventional EMSA assay, since it is more sensitive. We found (Fig. 4), that not only the full-length 6xHis-HBx fusion protein but also all 6xHis-mini-HBx cysteine/serine point mutants proteins were able to bind to the RNA oligonucleotide (AU-38) and caused its retardation in the denaturing gel. Along with the 38-mer AU-rich oligonucleotide we also tested an AU-rich 21-mer oligonucleotide (data not shown) and found that

Table 1
Assessment of the relative secondary structure content of the complete and mutant 6xHis-HBx protein variants in different buffers as measured by CD spectroscopy analysis (see Section 2 for details and Fig. 3)

Secondary structure element	6xHis-HBx		6xHis-mini-HBx		6xHis-mini-HBx(-Cys)	
	Water	PGDE ^a	Water	PGDE ^a	Water	PGDE ^a
α -Helix	14.2	12.9	13.9	13.5	14.4	14.1
β -Sheet	45.9	42	45.6	42.6	42.3	43.7
β -Turn	16.6	15.6	16.4	15.9	16.4	16.4
Random coil	23.3	29.5	24.1	28	26.9	25.8

^a PGDE buffer: 25 mM Pipes, pH 6, 50 mM KCl, 80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100, 5% glycerol.

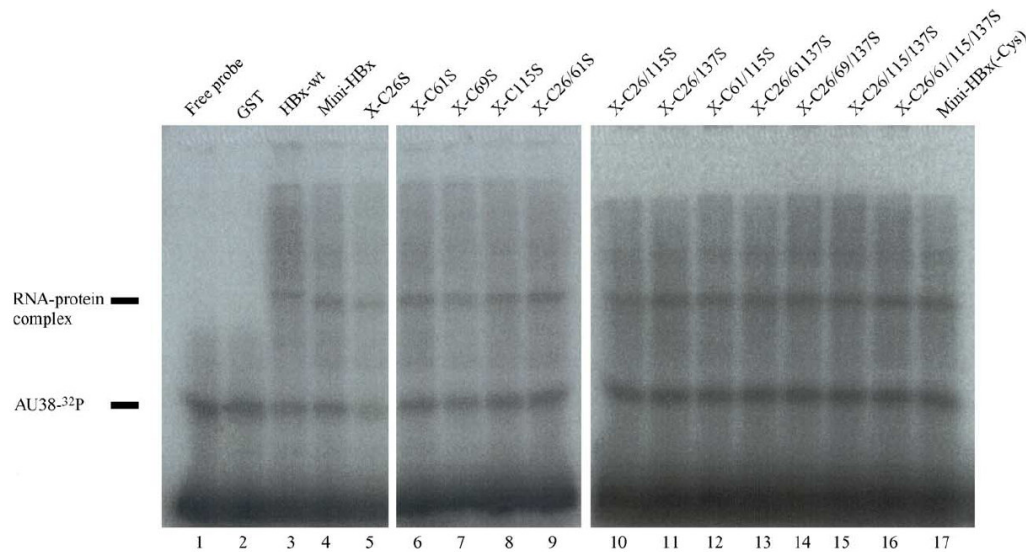


Fig. 4. The cysteine residues of the HBx protein are not important for its interaction with an AU-rich RNA oligonucleotide (AU-38). UV cross-linking assay with the HBx proteins and AU-38 mer oligonucleotide. After incubation on ice for 30 min, the protein–oligonucleotide complexes were exposed to the ultraviolet light (254 nm) and resolved by SDS–PAGE under denaturing conditions. The 12.5% SDS gel was visualized by phosphorimager scan. Lanes 1–17, radioactively labeled AU-rich RNA oligonucleotide AU-38 (120 fmol per lane). Proteins: lane 1, nil; lane 2, GST (0.76 nmol); lane 3, 6xHis-HBx-wt (0.35 nmol); lanes 4–17, 6xHis-mini-HBx with the indicated point mutations (0.36 nmol per lane). The complexes of RNA and protein and the free probe are indicated on the left side.

mini-HBx(-Cys) binds to these oligonucleotides just like mini-HBx and HBx-wt. In summary, these results indicate that the lack of the Cysteine in the 6xHis-mini-HBx point mutants do not alter its interaction with RNA.

3.6. Mini-HBx(-Cys) interacts with p53 protein as HBx or mini-HBx

HBx has not only been shown to interact with singlestranded DNA and RNA but also with many different cellular proteins. The large group of HBx interacting proteins contains members of diverse functional groups of proteins (Murakami, 1999), especially transcription factors, including p53. Based on the functional importance of p53 and its well documented interaction with HBx (Feitelson et al., 1993; Elmore et al., 1997), we decided to test our mutant HBx proteins ability to interact with human p53 protein in vitro. We found that 6xHis-mini-HBx(-Cys) is as capable of interacting with GST-p53 as is full-length 6xHis-HBx-wt and the 6xHis-mini-HBx (Fig. 5). This interaction is specific for p53 since the control glutathione sepharose beads containing only unfused GST control protein did not bind any of the HBx-wt or mutant proteins.

3.7. HBx, mini-HBx and mini-HBx(-Cys) increase the p53 dependent β -galactosidase reporter gene activity in a yeast one-hybrid transcription activation assay

It has been previously described that HBx binds to p53 (Feitelson et al., 1993) and is capable to increase the tran-

scription activity of p53 regulated promoters (Ahn et al., 2002), probably by stabilizing the p53-multimerization upon binding. Such a stabilization had been described for HBx upon binding to other transcription factors (Schneider and Schepartz, 2001). We wanted to test if HBx in its mutated forms is still capable of transactivating a p53 promoter in the presence of human p53. Therefore, we established a yeast one-hybrid system based transcription activation system. The strain W303 was transfected with a plasmid containing the *LacZ* gene (encoding β -galactosidase) under control of a p53 promoter region. Next, additional transfections of the yeast expression plasmids (pGAD424) encoding human p53 in fusion with the Gal4 activation domain on the one hand and of a second yeast expression plasmid (pBTM116) encoding full-length or the mutant mini-HBx proteins fused to the *lexA* DNA binding domain were performed. The co-transfected yeast clones were then tested for the activation of the p53 reporter gene encoding β -galactosidase (ONPG enzymatic assay of the β -galactosidase activity). As expected, the presence of only the p53 encoding plasmid caused a relatively strong activation of the reporter gene (Fig. 6, column 2) but remained on the same level when an empty pBTM116 had been co-transfected into the cells (column 3). The co-transfection of a pBTM116 plasmid containing the cDNA coding for full-length HBx-wt or the two mutant HBx proteins (mini-HBx or mini-HBx(-Cys), all caused an equally high increase in the level of β -galactosidase expression in these cells. Full-length HBx caused an increase of the transcriptional activation by factor 1.69, mini-HBx by factor 1.68 and mini-HBx(-Cys) by

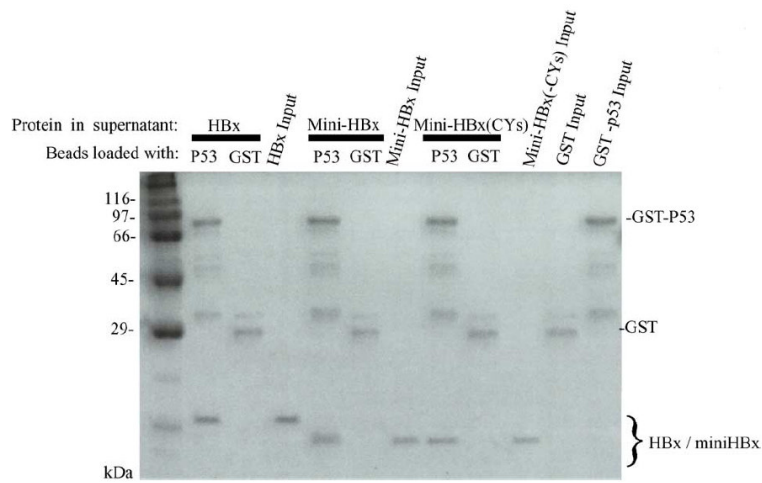


Fig. 5. HBx, mini-HBx and mini-HBx(-Cys) interact with human protein GST-p53. In vitro pull down assay with recombinant purified proteins. Briefly, glutathione sepharose beads were coupled with GST control protein or GST-p53 (denominated p53 above the figure) fusion protein. Next the loaded beads were incubated with wild type 6xHis-HBx, 6xHis-mini-HBx or 6xHis-mini-HBx(-Cys) proteins as indicated above the figure. After washing the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE. Input control lanes indicate the positions of the corresponding protein bands, which are pointed out on the left side of the figure.

factor 1.87. This strongly suggest that the mini-HBx as well as mini-HBx(-Cys), where all five Cys had been replaced by Ser, are fully capable to cause the increase of the p53 transcriptional activity. This increase of the transcriptional activation by p53 is however not mediated by the *lexA* protein fusion part in the expressed constructs, since the expression of *lexA* alone did not cause a significant increase in the transactivation of the reporter gene (1.1-fold increase only) (Fig. 6).

4. Discussion

Here, we wanted to test if the HBx cysteine residues are relevant to the structural and functional aspects of the HBx protein. It has been previously shown for other proteins, that replacement of Cys residues to Ser residues in intracellular proteins might still preserve the proteins functions. In the extreme and remarkable case of the Na, K-ATPase all

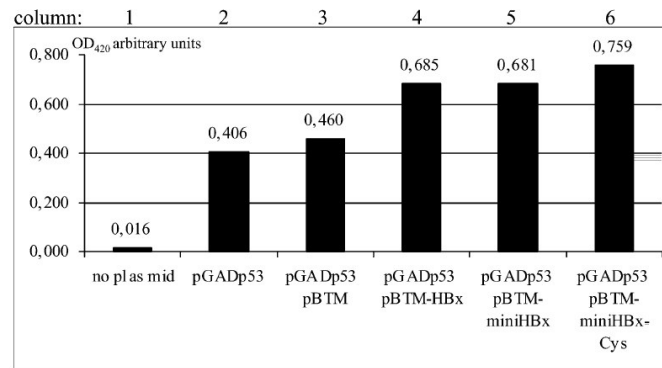


Fig. 6. HBx, mini-HBx and mini-HBx(-Cys) increase the p53 dependent β -galactosidase reporter gene activity in an yeast one-hybrid based transcription activation assay. W303-p53 blue yeast cells were transformed with no vector (column 1) or with pGAD424-p53 vector encoding full-length human p53 in fusion with the Gal4-activation domain (columns 2–6). These same strains were or were not (columns 1 and 2) co-transformed with: pBTM116 vector containing no insert DNA (column 3), pBTM116-HBx(1–154) (column 4), pBTM116-mini-HBx(18–142) (column 5), and pBTM116-mini-HBx(-Cys) (column 6). Freshly grown co-transformed colonies were then grown in liquid culture. After adjusting equal cell numbers the cells were pelleted, lysed and their cell lysates were submitted to a quantitative β -galactosidase assay based on the OPNG reaction (see Section 2 for details). Each point represents the average value of three independent experiments in arbitrary units.

23 Cysteines of the protein sequence have been changed to serine residues and the resulting mutant protein had kept its functional and structural integrity (Hu et al., 2000). We set out to construct by site-directed mutagenesis 14 6xHis-mini-HBx proteins containing one to five cysteine-to-serine point mutations. We found that all of our mini-HBx point mutant proteins can bind to the AU-rich oligonucleotide (AU-38). Furthermore, we tested the capacity of selected mutants to interact *in vitro* with the human p53 tumor suppressor protein (Feitelson et al., 1993) and to influence its transcription activation function (Takada et al., 1995; Ahn et al., 2002). We observed that the three proteins HBx-wt, mini-HBx with and mini-HBx without Cys residues all bound in a specific way *in vitro* to p53 and that all three proteins showed also a significant stimulating effect on p53 transcriptional activation. In summary, these data suggests that the Cys residues of HBx are of minor importance for its activity RNA and p53 binding and for its enhancement of p53 transcription activation.

In the literature the outcome of the interference of HBx with p53 is still a matter of debate since both inhibitory effects of HBx on p53 function (Wang et al., 1994) as well as stimulatory effects (Ahn et al., 2002) have been described. This could be due to variations based on the different cell types and/or promoter systems studied. Ahn and co-workers (Ahn et al., 2002) found that the activity of endogenous cellular p53 on a p53 responsive, p21-promoter controlling a luciferase reporter gene was activated by the presence of the HBx protein. These authors speculated that this increase in p53 activity by HBx could cause an increase in hepatocyte cell death rate, which is indeed frequently observed in severe chronic hepatitis (Papakyriakou et al., 2002). In case of the HBx protein seemingly contradictory functional consequences are not a novelty, since its main predicted functions range from the induction of apoptosis (Pollicino et al., 1998; Elmore et al., 1997) to participation in cellular transformation (Koike et al., 1994), oncogenesis and tumor survival (Henkler and Koshy, 1996; Shirakata et al., 1989). However, in the liver, which is chronically infected with HBV, probably both an increased tumor growth and a compensating increase in hepatocellular apoptosis or necrosis, leading to liver cirrhosis, may keep a balanced state for prolonged periods of time. Therefore it is tempting to speculate that HBx with its pleiotropic functions, which are mediated by many protein–protein interactions with diverse cellular proteins, could contribute to both cell growth and apoptosis at the same time, depending on the cellular state and on the phase of infection of the cell.

In conclusion, our finding that the cysteine residues of the HBx protein can be either deleted or substituted with serines without influencing HBx functional interactions with either RNA nor p53 protein might have far reaching consequences to our understanding of the functional mechanisms underlying HBx. In fact it could be assumed, that HBx is able to interact with such a multitude of different molecules, including singlestranded nucleic acids and a vast variety of cellular pro-

teins that include both transcriptional activators (Murakami, 1999) as well as many signaling proteins (Yen, 1996), because it is able to adapt different conformations upon binding to its target molecule. Further functional interaction studies of the mutated cysteine-free HBx with other important cellular protein partners are required in order to confirm whether our findings hold true for other interacting proteins, too. In the moment we are trying to express and purify mini-HBx(-Cys) in large scale for possible structural studies including crystallization trials and nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis. Such studies had been impossible in the past due to the fact that bacterially derived HBx protein has the strong tendency to form inter-molecular disulfide bridges and aggregate, therefore preventing any detailed structural characterization. However, structural data on the HBx protein would be of great value in order to understand how this intriguing viral protein achieves to adapt to so many different cellular protein targets and thereby mediate its manifold cellular functions.

Acknowledgements

We thank Dr. R.J. Schneider (NYU, New York) for the HBx gene containing vector pCMV-Ad and Dr. Gianni Del Sal (Laboratorio Nazionale CIB, Trieste, Italy) for providing the plasmid clone encoding full-length human p53 fused to GST (in vector pGEX). This work is supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP, grant 98/05891–9 to J.K., fellowships 01/00554–9 to P.R.M., and 01/6552–8 to E.R.). Further support was obtained from FAPESP projects SMOLBNet and CEPID. We also like to thank Dr. Carlos H. I. Ramos and Luciana R. Camillo for support with DNA sequencing and Eugenia R. Camargo for technical assistance.

References

- Ahn, J.Y., Jung, E.Y., Kwung, H.J., Lee, C.-W., Sung, Y.-C., Jang, K.L., 2002. Dual effect of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle depending on the status of cellular p53. *J. Gen. Virol.* 83, 2765–2772.
- Assogba, B.D., Choi, B.H., Rho, H.M., 2002. Transcriptional activation of the promoter of human cytomegalovirus immediate early gene (CMV-IE) by the hepatitis B viral x protein (HBx) through the NF- κ B site. *Virus Res.* 84, 171–179.
- Barnabas, S., Hai, T., Andrisani, O.M., 1997. The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZIP transcription factors. *J. Biol. Chem.* 272, 20684–20690.
- Chen, H.S., Kaneko, R., Girones, R.W., Anderson, W.E., Hornbuckle, B.C., Tennant, P.J., Cote, J.L., Gerin, R.H., Purcell, R.H., Miller, R.H., 1993. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J. Virol.* 67, 1218–1226.
- Elmore, L.W., Hancock, A.R., Chang, S.F., Wang, X.W., Chang, S., Callahan, C.P., Geller, D.A., Will, H., Harris, C.C., 1997. Hepatitis B virus

- X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14707–14712.
- Feitelson, M.A., Zhu, M., Duan, L.X., London, W.T., 1993. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 8, 1109–1117.
- Feitelson, M.A., Ranganathan, P.N., Clayton, M.M., Zhang, S.M., 1997. Partial characterization of the woodchuck tumor suppressor, p53, and its interaction with woodchuck hepatitis virus X antigen in hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 15, 327–336.
- Fischer, M., Runkel, L., Schaller, H., 1995. HBx protein of hepatitis B virus interacts with the C-terminal portion of a novel human proteasome alpha-subunit. *Virus Genes* 10, 99–102.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P., 1979. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281, 646–650.
- Ganem, D., 1996. Hepadnaviridae and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, p. 37f.
- Haviv, I., Shamay, M., Doitsh, G., Shaul, Y., 1998. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1562–1569.
- Henkler, F., Hoare, J., Waseem, N., Goldin, R.D., McGarvey, M.J., Koshy, R., King, I.A., 2001. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J. Gen. Virol.* 82, 871–882.
- Henkler, F.F., Koshy, R., 1996. Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis. *J. Viral Hepat.* 3, 109–121.
- Hollinger, F.B., 1996. Hepatitis B virus. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, pp. 2739–2807.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C., 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53.
- Hu, Y.K., Eisses, J.F., Kaplan, 2000. Expression of an active Na, K-ATPase with an alpha-subunit lacking all twenty-three native cysteine residues. *J. Biol. Chem.* 275, 30734–30739.
- Huang, J., Kwong, J., Sun, E.C., Liang, T.J., 1996. Proteasome complex as a potential cellular target of hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* 70, 5582–5591.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., Fornace Jr., A.J., 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587–597.
- Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., Jay, G., 1991. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351, 317–320.
- Koike, K., Moriya, K., Iino, S., Yotsuyanagi, H., Endo, Y., Miyamura, T., Kurakawa, K., 1994. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 19, 810–819.
- Kumar, V., Jayasuryan, N., Kumar, R., 1996. A truncated mutant (residues 58–140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5647–5652.
- Kuzhanaivelu, N., Cong, Y.S., Inouye, C., Yang, W.M., Seto, E., 1996. XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucl. Acids Res.* 24, 4741–4750.
- Lane, D.P., 1992. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.
- Lee, S., Elenbase, B., Levine, A., Griffith, J., 1995. p53 and its 14kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 81, 10130–11020.
- Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J.H., Dorjsuren, D., Iida, K., Murakami, S., 1997. Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor TFIIB and RNA polymerase subunit RPB5. *J. Biol. Chem.* 272, 7132–7139.
- Ljungquist, C., Breitholtz, A., Brink-Nilsson, H., Moks, T., Uhlen, M., Nilsson, B., 1989. Immobilization and affinity purification of recombinant proteins using histidine peptide fusions. *Eur. J. Biochem.* 186, 563–569.
- Lo, S.J., Chien, M.L., Lee, Y.H., 1988. Characteristics of the X gene of hepatitis B virus. *Virology* 167, 289–292.
- Melegari, M., Scaglioni, P.P., Wands, J.R., 1998. Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus binding protein that inhibits viral replication. *J. Virol.* 72, 1737–1743.
- Moraes, K.C.M., Quaresma, A.J.C., Machnss, K., Kobarg, J., 2003. Identification of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA destabilizing factor AUF1 (hnRNP D0). *Biol. Chem.* 384, 25–37.
- Murakami, S., 1999. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 42, 81–99.
- Papakyriakou, P., Tzardi, M., Valatas, V., Kanavaros, P., Karydi, E., Notas, G., Xidakis, C., Louroumalis, E., 2002. Apoptosis and apoptosis related proteins in chronic viral liver disease. *Apoptosis* 7, 133–141.
- Pollicino, T., Terradillos, O., Lecoecur, H., Gougeon, M.L., Buendia, M.A., 1998. Pro-apoptotic effect of the hepatitis B virus gene. *Biomed. Pharmacother.* 52, 363–368.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598–599.
- Qadri, I., Ferrari, M.E., Siddiqui, A., 1996. The hepatitis B virus transactivator protein, HBx, interacts with singlestranded DNA (ssDNA). Biochemical characterizations of the HBx-ssDNA interactions. *J. Biol. Chem.* 271, 15443–15450.
- Rui, E., Moura, P.R., Kobarg, J., 2001. Expression of deletion mutants of the hepatitis B virus protein HBx in *E. coli* and characterization of their RNA binding activities. *Virus Res.* 74, 59–73.
- Schneider, T.L., Schepartz, A., 2001. Hepatitis B virus protein pX enhances the monomer assembly pathway of bZIP DNA complexes. *Biochemistry* 40, 2835–2843.
- Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sali, R., Sordat, B., Costa, J., 1992. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4495–4499.
- Shirakata, Y., Kawada, M., Fujiki, Y., Sano, H., Oda, M., Yaginuma, K., Kobayashi, M., Koike, K., 1989. The X gene of hepatitis B virus induced growth stimulation and tumorigenic transformation of mouse NIH3T3 cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 617–621.
- Sitterlin, D., Lee, T.H., Prigent, S., Tiollais, P., Butel, J.S., Transy, C., 1997. Interaction of the UV-damaged DNA-binding protein with hepatitis B virus X protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient X-insertion mutant. *J. Virol.* 71, 6194–6199.
- Sohn, S., Jaitovitch-Groisman, I., Benlimame, N., Galipeau, J., Batist, G., Alaoui-Jamli, M.A., 2000. Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis. *Mutat. Res.* 460, 17–28.
- Takada, S., Tsuchida, N., Kobayashi, M., Koike, K., 1995. Disruption of the function of tumor-suppressor gene p53 by the hepatitis B virus X protein and hepatocarcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121, 593–601.
- Twu, J.S., Wu, J.Y., Robinson, W.S., 1990. Transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by hepatitis B virus X-protein requires de novo protein synthesis. *Virology* 177, 406–410.
- Wang, X.W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M.A., Gu, J.R., Harris, C.C., 1994. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2230–2234.
- Wang, H.D., Trivedi, A., Jonson, D.L., 1998. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7086–7094.

- Wang, X.W., Harris, C.C., 1996. TP53 tumor supresor gene: clues to molecular carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Surveys* 28, 169–196.
- Wentz, M.J., Becker, S.A., Slagle, B., 2000. Dissociation of DDB1-binding and transactivation properties of the hepatitis B virus X protein. *Virus Res.* 68, 87–92.
- Yen, T.S.B., 1996. Regulation of hepatitis B virus gene expression. *Semin. Virol.* 4, 33–42.
- Zoulim, F., Saputelli, J., Seeger, C., 1994. Woodchuck hepatitis B virus X gene is important for viral infection in vivo. *J. Virol.* 68, 2026–2030.

Expression and spectroscopic analysis of a mutant hepatitis B virus onco-protein HBx without cysteine residues

Edmilson Rui^{a, b, 1}, Patricia Ribeiro de Moura^{a, b, 1},
Kaliandra de Almeida Gonçalves^a, Jörg Kobarg^{a, b, *}

^a Centro de Biologia Molecular Estrutural, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10.000, CP 6192, Campinas, SP, CEP 13084-971, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

Received 9 August 2004; received in revised form 26 January 2005; accepted 26 January 2005
Available online 24 February 2005

Abstract

Chronic infection of the hepatitis B virus (HBV) is one of the causes leading to liver cancer. The 3.2 kb genome of HBV encodes four proteins: core antigen, surface antigen, a DNA polymerase and the X protein (HBx). The biological functions of HBx are not fully understood. It has been shown that HBx is a potent trans-activator, which activates transcription of many cellular and viral promoters indirectly via protein-protein interactions. These transactivating activities of HBx may contribute to the development of hepatocellular carcinoma. In this paper a truncated mini-HBx(-Cys) (18–142) protein, where the cysteines had been either deleted or substituted by serines, was constructed by site-directed mutagenesis and overexpressed as a 6xHis fusion protein in *Escherichia coli*. The 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein was isolated from inclusion bodies, purified by Ni-affinity chromatography under denaturing conditions and refolded by sequential dialysis. The structure of the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein was analyzed by circular dichroism, fluorescence and one-dimensional NMR spectroscopic assays. The data presented here suggest that HBx is unstructured but has a propensity to gain secondary structure under specific experimental conditions. Its conformational flexibility might partially explain its functional complexity, namely its capacity to interact with a wide array of signaling proteins, transcriptional regulators and nucleic acids.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Viral hepatitis; Hepatitis B virus X protein; Viral transactivator; Onco-protein; Circular dichroism; Fluorescence

1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the major malignant diseases in the world, ranking fifth as the most common cancer, and it is believed that chronic hepatitis B virus (HBV) infection is a major global cause of HCC (Arbutnot and Kew, 2001; Waris and Siddiqui, 2003). The 3.2 kb HBV partially double-stranded DNA genome is the smallest among mammalian viruses and predominantly infects human hepatocytes in the liver (Seeger and Mason, 2000). The compact HBV genome includes four ORFs that encode at least seven

translation products through the use of varying in frame initiation codons. These translation products include three surface antigens (HBsAg); the envelope glycoproteins preS1, preS2, and S; core (C) and e antigens (HBcAg and HBeAg); viral polymerase (P); and the X protein (HBx) (Lo et al., 1988; Caselmann, 1996).

Both the X gene and its product are well conserved among mammalian hepadnaviruses (Kidd-Ljunggren et al., 1995; Hildt et al., 1996; Murakami, 1999). HBx is a small, 17 kDa protein and produces antibodies in sera of infected humans and naturally infected animals. Although the specific function of HBx in natural infection remains elusive, its presence is necessary during viral replication and for the establishment of viral infection in vivo in animals (Chen et al., 1993; Zoulim et al., 1994). HBx has been shown to activate the transcrip-

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3512 1125; fax: +55 19 3512 1006.
E-mail address: jkobarg@lnls.br (J. Kobarg).

¹ They contributed equally to this work.

tion of a variety of viral and host cellular genes (Caselmann, 1996; Murakami, 2001). This indiscriminate or 'promiscuous' trans-activation activity appears to be via an indirect process, since HBx does not have any classical double-stranded DNA-binding domain. It appears rather to act indirectly on transcription and signaling, through protein–protein interactions (Maguire et al., 1991).

Due to its both nuclear and cytoplasmatic localization, HBx can interact with transcription factors, stimulating the transcriptional machinery in the nucleus as well as interfering with signal transduction pathways in the cytoplasm of the cell (Murakami, 1999; Henkler et al., 2001). It has been reported that HBx activates host genes such as the proto-oncogenes *c-myc* (Balsano et al., 1991), *c-fos* (Avantaggiati et al., 1993) and *c-jun* (Twu et al., 1993), and interacts with cellular proteins like TBP (TATA-binding protein) (Qadri et al., 1995; Wang et al., 1997) and the cAMP-responsive element binding protein (CREB) (Williams and Andrisani, 1995). HBx also activates transcription factors such as ATF-2 and NF- κ B (Maguire et al., 1991; Twu et al., 1989), as well as the Ras-Raf-Mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade (Benn and Schneider, 1994), and the JAK/STAT signal transduction pathways (Lee and Yun, 1998; Arbutnot et al., 2000). Besides, HBx has also been reported to interact both in vivo and in vitro with the tumour suppressor protein p53 (Feitelson et al., 1993; Wang et al., 1994; Truant et al., 1995; Elmore et al., 1997), what implicates an important role of the HBx protein in the regulation of cell cycle control (Benn and Schneider, 1995) and programmed cell death (Wang et al., 1995; Chirillo et al., 1997; Arbutnot et al., 2000).

Lastly, HBx may be responsible for hepatocarcinogenesis by modulating DNA repair in the host cell (Arbutnot et al., 2000), due to its interaction with tumour suppressor protein p53, thus affecting the p53-mediated repair pathway, and UVDDDB (UV-damaged DNA-binding protein) (Becker et al., 1998; Groisman et al., 1999). These results are consistent with a model in which HBx acts as a cofactor in hepatocarcinogenesis by preventing the cell from repairing damaged DNA, thus leading to an accumulation of DNA mutations and, eventually, cancer (Butel et al., 1996; Capovilla et al., 1997; Anthony, 2001).

Previous studies had also shown that the HBx protein is able to bind to single stranded DNA (Qadri et al., 1996) and an AU-rich RNA oligonucleotide in a gel shift assay (Rui et al., 2001). This nucleic acid binding activity might be relevant for HBx oncogenic character. It has been previously shown that HBx is able to displace the AUF1 protein from its binding site on the RNA oligonucleotide, which could cause the stabilization of AU-rich proto-oncogenes mRNAs and thereby contribute to the transforming phenotype (Rui et al., 2001).

A truncated protein mini-HBx(18–142) (-Cys), where the remaining five cysteines have been replaced by serine residues, was generated by applying a site-directed mutagenesis methodology. Expression in *Escherichia coli* BL-21 cells and protein purification by Ni-affinity chromatography

from inclusion bodies were optimized, yielding 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein in a high degree of purity. Far-UV CD and fluorescence spectroscopy were used to determine the overall secondary and tertiary structure of the refolded protein, and the percentage of secondary structure was calculated using the *CDNN deconvolution* program. A one-dimensional ^1H NMR spectrum was taken and collected data are in agreement with previous CD and fluorescence spectroscopy assays.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid construction by site-directed mutagenesis

The truncated mini-HBx gene (372 bp), coding for amino acids 18–142 of the HBx protein, was amplified by PCR using the full-length HBx DNA (subtype *ayw*) inserted into pCMV-Ad (kindly provided by Dr. R. Schneider, New York) as a template DNA. The mini-HBx gene was directionally cloned into the bacterial expression vector pET28a+ (Novagen) via *Nde*I and *Bam*HI restriction sites. The recombinant plasmid pET28a+/mini-HBx(18–142) was used as a template DNA in the following PCR reactions in order to generate a complete cysteine/serine point mutant using the "QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis" kit (Stratagene). The cysteine/serine point mutations were confirmed by DNA sequencing. The recombinant plasmid pET28a+/mini-HBx(-Cys) contains a 6-histidine tag (6xHis) encoding sequence that allows the purification of the recombinant fusion protein via Ni-affinity chromatography.

2.2. Expression and purification of 6xHis-mini-HBx(-Cys) fusion protein from inclusion bodies

E. coli strain BL-21, transformed with the mini-HBx(-Cys) DNA containing pET28a+ vector, was grown in LB medium containing kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) to an $\text{OD}_{600} = 0.7$. The culture was subsequently induced at 37 °C for 4 h with 1 mM IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside). Cells were harvested by centrifugation and the bacterial pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF) containing lysozyme (1 mg/ml). After incubation on ice for 30 min, cells were lysed by three subsequent freeze-thaw cycles. Genomic DNA was digested by addition of DNase (1 $\mu\text{g/ml}$), and after incubation for 20 min at 37 °C, the samples were sonicated and the pellet was separated by centrifugation ($18,600 \times g$ for 15 min at 4 °C). The pellet was resuspended in the washing buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 3 M Urea, 1% Triton X-100) and then centrifuged at $9,500 \times g$ for 15 min at 4 °C for three times or until the supernatant was clear.

The pellet containing the 6xHis-mini-HBx(-Cys) inclusion bodies was solubilized in 50 mM Tris-HCl (pH 8), 8 M urea and the solution was cleared by centrifugation at $13,700 \times g$ for 20 min at 4 °C. The resulting solution was filtered and applied to a Ni-NTA column (QIAGEN). The sub-

sequent washing and elution steps were all carried out with buffer A (8 M Urea, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl) but at different pHs. The column was washed first with buffer A, pH 8 and then with buffer A, pH 6.3. Bound protein was eluted with a linear pH gradient between 6.3 and 4.5 in buffer A. The column eluate was collected in 2 ml fractions and 10 μl aliquots were analyzed by SDS-PAGE. The proteins 6xHis-HBx(1–154) and 6xHis-mini-HBx(18–142) were expressed and purified according to the same protocol.

2.3. Refolding of purified protein

The denatured purified protein in eluted fractions was refolded by dialysis at 4 °C in 10 mM Pipes (pH7) with several changes of buffer. After this, the protein was again dialyzed against pure water. Dialyzed protein was cleared by centrifugation at 2000 $\times$ g and used in all spectroscopic assays. Protein concentration was measured by determining the absorption in a 1 cm path length cell using a JASCO UV/Vis spectrophotometer. For 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein, a molar extinction coefficient at 280 nm of $6970 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ was used.

2.4. Western blotting

Proteins were separated by SDS-PAGE using a 12.5% acrylamide gel and then transferred to the PVDF membrane (ImmobilonTM-P, Millipore) using a Semi-Dry Blotting System (W.E.P. Company). The membrane blocked in 5% BSA in TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.2) was probed with primary antibody (anti-4xHis at 1:3000) or antiserum anti-HBx (at 1:100). The produced antiserum is a polyclonal rabbit anti-6xHis-HBx(1–154) antibody that has been generated by six immunizations of rabbits with 1 mg of recombinant 6xHis-HBx(1–154) protein. Secondary antibodies (anti-mouse antibody and anti-rabbit antibody) conjugated with HRP were used at a dilution of 1:5000, and immunoreactive proteins were detected using the Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology).

2.5. UV cross-linking assay of HBx with an AU-rich RNA oligonucleotide

The purified 6xHis-HBx(1–154), 6xHis-mini-HBx(18–142) and 6xHis-mini-HBx(-Cys) proteins were incubated with a radiolabeled AU-rich [γ - ^{32}P]-RNA 38-mer oligonucleotide (GUGAUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAG) (Rui et al., 2001) in a final volume of 25 μl containing 20 mM Hepes, 10 mM MgCl_2 , 60 mM KCl and 10% glycerol. After incubation on ice for 30 min, the opened reaction tubes were exposed to the ultraviolet light (254 nm) for 5 min in a distance of 100 mm (UV Stratalinker 2400). The complexes were resolved by SDS-PAGE under denaturing conditions and visualized after a 2–6 h exposition on a BAS-IP MS 2325 (Fujifilm) by

phosphorimager scan (Bio-Imaging Analyzer BAS-1800II; Fujifilm).

2.6. CD spectroscopy

Circular dichroism (CD) experiments were performed at the indicated temperatures on a JASCO J-810 spectropolarimeter coupled to a Peltier PFD-425S system for temperature control. Measurements in the far-ultraviolet region (190–260 nm) were carried out with a 1 mm path length quartz cell (Hellma). The protein concentration was 5–15 μM in aqueous solution at pH 6. Four scans were averaged for each sample and the contribution of the buffer was always subtracted. The observed optical activity was expressed as the mean residue molar ellipticity $[\theta]_{\text{MRW}}$ (degree $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$). The secondary structure of the recombinant 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein was predicted by CDNN deconvolution software (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>).

2.7. Fluorescence spectroscopy

The intrinsic fluorescence emission spectra were measured by AMINCO-BOWMAN (Series 2) luminescence spectrometer, using a 10 mm path length quartz cell (Hellma). The excitation wavelength was set at 295 nm, and the emission spectra were collected over a range of 310–430 nm, and recorded at 25 °C or at 37 °C. The protein concentration was 2 μM in aqueous solution at pH6. NaCl was added to a final concentration of 100 mM, and Gdn-HCl to 6 M. Spectra were background corrected and values of λ_{max} were obtained from the emission spectra.

2.8. NMR spectroscopy

The one dimensional ^1H NMR experiment was carried out on a Varian INOVA 500AS spectrometer operating at 499.730 MHz for ^1H frequency, at a temperature of 25 °C. The proton chemical shifts were referenced to the water signal that was set at 4.8 ppm. Water suppression was achieved by low power continuous wave irradiation during the relaxation delay or using the WET pulse technique. An NMR sample of $\sim 400 \mu\text{M}$ of 6xHis-mini-HBx(-Cys) in aqueous solution containing 5% D_2O at pH 6 was used in the one-dimensional ^1H NMR assay.

3. Results

3.1. Cloning and expression of 6xHis-mini-HBx(-Cys) fusion protein

The 17 kDa protein HBx consists of 154 amino acids, contains 10 cysteine residues and is translated during the viral infection. The HBx protein has been involved in several important steps on the HCC development due to its ability to induce liver cancer in transgenic mice (Kim et al., 1991;

Koike, 2002) and to transactivate a variety of viral and cellular promoters (Twu et al., 1990; Yen, 1996; Caselmann, 1996). HBx has also been reported to stimulate the transcription machinery in the nucleus by indirect activation of transcription factors and cell signaling pathways, deregulating the cell cycle checkpoints that might lead to an uncontrolled cellular proliferation (Benn and Schneider, 1995; Kim et al., 1998). Nevertheless, the exact function of HBx is still unknown and its structural determination would be of great value in the study of HCC development mediated by HBx.

However, the detailed study of HBx functions has been complicated due to the difficulty in HBx isolation from HBV-infected liver tissues and from transfected cell lines because of its low expression level and its short half-life (Hildt et al., 1996; Urban et al., 1997). Besides, it has been shown previously that HBx protein is predominantly expressed in the insoluble inclusion body fraction of the bacterial cell lysate (Jameel et al., 1990; Marczinovits et al., 1997; Rui et al., 2001). It also tends to form intracellular aggregates when expressed in insect cells using a baculovirus expression system (Urban et al., 1997). Of the 14 liters of HBx transformed *E. coli* induction, only 0.05% of the recombinant HBx protein produced was isolated from the soluble fraction (Truant et al., 1995). In order to improve HBx poor solubility several investigators have tested a series of induction and expression conditions in *E. coli*, including the co-expression of thioredoxin or the chaperones GroEL and GroES (Rui et al., 2001), but none of this has shown any improvement on HBx solubility (Hildt et al., 1996). The reducing environment inside the *E. coli* and the lacking of specific chaperones, present in eukaryotic cells, that could be involved in the correct folding and formation of disulphide bonds, might contribute to the accumulation of the HBx protein in the inclusion body fraction of the bacterial cells.

Another group had shown before that a truncated HBx protein, spanning amino acids 58–140 maintained its full transactivation function (Kumar et al., 1996). In order to remove some cysteines and hydrophobic amino acids from the N- and C-terminal regions of HBx a 6xHis-mini-HBx(18–142) protein was produced in *E. coli*. Moura and co-workers demonstrated in a recent study, that the mini-HBx(18–142) protein retains its functional activity to bind to both the interacting

protein p53 and also to RNA (Moura et al., 2005). Furthermore, they showed that the circular dichroism spectra of the wt HBx and mini-HBx(18–142) are practically identical, suggesting that both proteins have similar conformations (Moura et al., 2005). Finally, when the mini-HBx(18–142) protein was used as a bait protein in a yeast two-hybrid screen, it was like wt HBx capable to interact with both new as well as previously identified proteins (Rui et al., unpublished observation), including RXR (Retinoid X receptor) and UVDB (UV-damaged DNA-binding protein) (Kong et al., 2000; Sitterlin et al., 1997). However, it was observed that the remaining five cysteine residues in this protein tend to result in the formation of incorrect intermolecular disulfide bridges, leading to the aggregation of the mini-HBx(18–142) protein in vitro. Therefore, it was decided to produce the mutant 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein, where the remaining five cysteines were substituted by serine residues, by applying a site-directed mutagenesis methodology. It has been shown previously that a Na, K-ATPase had its 23 cysteines changed to serine residues and this mutant protein had kept its full functional and structural integrity (Hu et al., 2000).

The full length HBx gene (*ayw* subtype) was used as a DNA template in PCR reactions in order to generate a truncated mini-HBx(-Cys) gene. The mini-HBx(-Cys) gene has 124 amino acids (residues 18–142) and lacks all 10 cysteine residues (Fig. 1). The cysteine/serine point mutations (Cys26Ser, Cys61Ser, Cys69Ser, Cys115Ser and Cys137Ser) were confirmed by DNA sequencing. Both amino acid sequences of the full length HBx (1–154) and the truncated mini-HBx(-Cys) contain a tryptophan residue that can be used as an intrinsic probe in fluorescence emission experiments.

3.2. Purification of the 6xHis-mini-HBx(-Cys) fusion protein by Ni-NTA chromatography

An induced protein band of ~15 kDa was observed in SDS-PAGE (Fig. 2A, lane 2) when pET28a/mini-HBx(-Cys) transformed BL-21 cells were induced with 1 mM IPTG. After lysing the cells, the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein remained in the insoluble fraction. The pellet containing inclusion bodies was purified first in order to eliminate cell debris

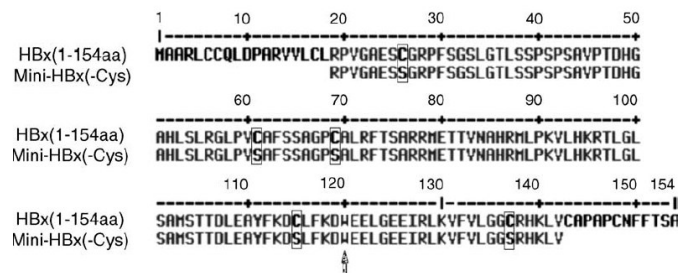


Fig. 1. Amino acid sequence alignment of full-length HBx(1–154) and mini-HBx(-Cys) proteins. All five remaining cysteine residues were mutated to serine residues and are indicated by boxes. An arrow indicates the tryptophan residue present in both amino acid sequences.

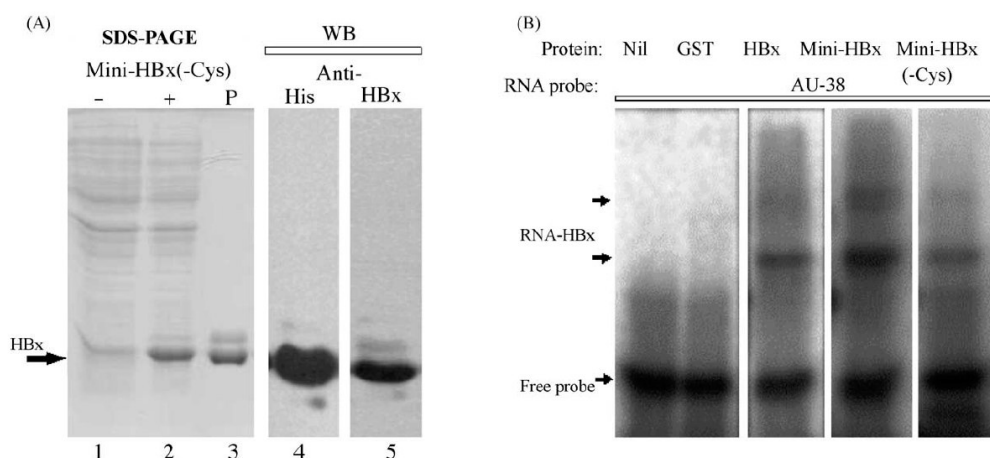


Fig. 2. SDS-PAGE, Western blot and test of biological activity of the expression and purification of 6xHis-mini-HBx(-Cys) from inclusion bodies. (A) Lane 1, cell lysate of transformed BL21 cells before induction; lane 2, lysate of transformed cells after 4 h IPTG induction at 37 °C; lane 3, purified protein after preparation of inclusion bodies and affinity purification using a Ni-NTA column under denaturing conditions (8 M urea); lane 4, immunoblot of purified protein developed with an anti-His monoclonal antibody; lane 5, immunoblot of purified protein using a rabbit antiserum against 6xHis-HBx(1–154) protein. The recombinant protein has a molecular weight of ~15.6 kDa and it is exclusively found in the insoluble inclusion body fraction of the bacterial cell lysate. (B) UV cross-linking assay with the three different HBx proteins and an AU-rich 38-mer RNA oligonucleotide. After incubation on ice for 30 min, the protein-oligonucleotide complexes were exposed to the ultraviolet light (254 nm) and resolved by SDS-PAGE under denaturing conditions. The 12.5% SDS gel was visualized by phosphorimager scan. All lanes: radioactively labeled AU-rich RNA oligonucleotide AU-38 (120 fmol per lane). Lane Nil: no protein; lane GST: GST control protein; lane HBx: 6xHis-HBx(1–154); lane Mini-HBx: 6xHis-mini-HBx(18–142); lane Mini-HBx(-Cys): 6xHis-mini-HBx(-Cys) (0.36 nmol of protein per lane). The complex of HBx and RNA and the free probe are indicated on the left side of the panel.

and other impurities. After extensive washing, the inclusion bodies were disrupted with 8 M urea for protein solubilization. The protein was purified via Ni-affinity chromatography under denaturing conditions (Ljungquist et al., 1989; Rui et al., 2001), yielding protein at high concentration (Fig. 2A, lane 3). The identity of the protein band was confirmed by immunoblotting with anti-His (Fig. 2A, lane 4) and anti-HBx rabbit antiserum (Fig. 2A, lane 5). To remove the urea, the protein was dialyzed against 10 mM Pipes at pH 7 and followed by another dialysis against pure water at pH 6. The concentration of the recombinant purified 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein in aqueous solution was determined and the purified protein was used in the spectroscopic assays (CD, fluorescence, NMR) and in the UV cross-linking assay.

3.3. The mutated protein 6xHis-mini-HBx(-Cys) interacts with RNA

The HBx ability to bind to single-stranded DNA *in vitro* was employed as described by Qadri and co-workers (Qadri et al., 1996) in an assay for one potential biological activity of HBx. The binding of HBx to single-stranded nucleic acids can be tested by an EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) in which a radioactively labeled RNA oligonucleotide 38-mer was used (Rui et al., 2001) instead of the ssDNA probes described by Qadri et al. (1996). Here, a UV cross-linking assay instead of a conventional EMSA assay was used, since it is more sensitive. It was found, that not only the full length

6xHis-HBx(1–154) fusion protein but also the 6xHis-mini-HBx(18–142) and 6xHis-mini-HBx(-Cys) mutant proteins were able to bind to the RNA oligonucleotide (AU-38) and caused its retardation in the denaturing gel (Fig. 2B). These results indicate that the lack of the cysteines in the 6xHis-mini-HBx(-Cys) mutant does not alter its activity to interact with RNA. This result is further corroborated by recent studies from our laboratory, which show that the mutant protein mini-HBx(-Cys) like wild type HBx, retains its full capacity to interact with the human tumor suppressor protein p53 *in vitro* and *in vivo* (Moura et al., 2005).

3.4. CD spectra and secondary structure analysis of 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein

The overall conformation of the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein was measured by far-UV CD analysis (Fig. 3). The CD spectra of the protein at different temperatures are depicted in the Fig. 3A. At 4 °C the far-UV CD spectrum shows a minimum at ~200 nm and a shoulder at 225–230 nm, indicative of a high content of non-ordered secondary structure. Raising the temperature, the minimum shifts to ~202 nm and the shoulder acquires a different shape. The assignment of the secondary structure elements according to the CDNN software indicates that there is an increase in the β -sheet (3.3%) and alpha helical (1.3%) contents upon raising the temperature, while the non-ordered secondary structure reduces from 39.4% to 37%. After cooling down the protein to 4 °C, the per-

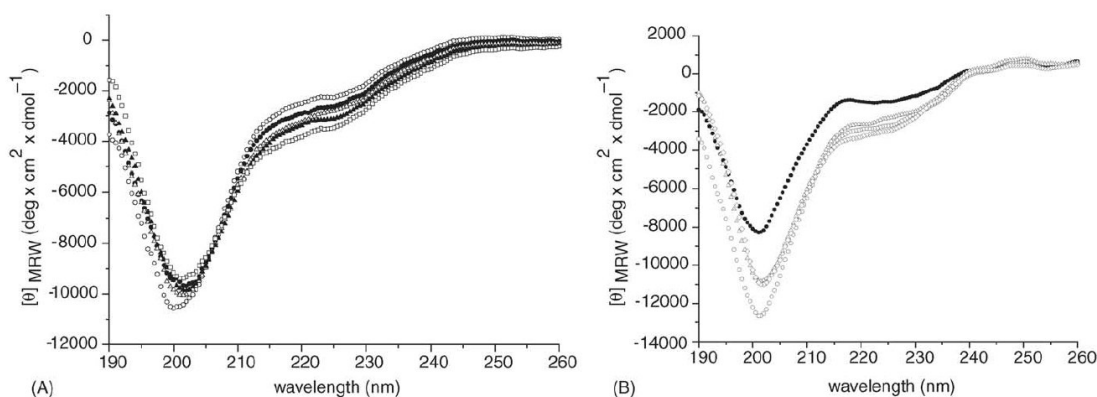


Fig. 3. Circular dichroism analysis of the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein. (A) Far-UV CD spectra of the purified 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein in pure water at pH 6. The protein concentration was 15 μ M (0.24 mg/ml) and the temperature was raised from 4 °C to 60 °C. Spectra were collected at five different temperatures: 4 °C (open circles), 20 °C (closed circles), 30 °C (open triangles), 40 °C (closed triangles), and 60 °C (open squares). (B) Far-UV CD spectra at 25 °C of the purified 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein in pure water at pH 6 with or without TFE. The protein concentration was 5 μ M (0.08 mg/ml) in the different experimental conditions: pure water (closed circles), 0.5% TFE/water (open circles), 1% TFE/water (open triangles), and 2% TFE/water (open diamonds). Spectra were background corrected and the observed optical activity was expressed as the mean residue molar ellipticity $[\theta]_{MRW}$ ($^{\circ}$ cm² dmol⁻¹).

centage of secondary structure elements of the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein at 4 °C according to the CDNN software returned to be identical to that of the protein, which had not been heated to 60 °C. This shows that the conformational changes observed are fully reversible and could indicate that the protein 6xHis-mini-HBx(-Cys) is relatively stable to heat denaturation.

The far-UV CD spectra of the protein 6xHis-mini-HBx(-Cys) upon NaCl addition show that the shape of six spectra is very similar (data not shown). However, the assignment of the secondary structure elements (Table 1) shows that the extended structure (β -sheet) contents have a higher contribution in the sample containing 100 mM NaCl (40.6%) than in the sample without NaCl (36.4%). Moreover, the α -helical content increases 1.2% upon 100 mM NaCl addition, changing from 7.8% to 9% of its contribution to the secondary structure. However, there is still a great contribution of the non-ordered structure, accounting for 32.9% of the secondary structure in the protein sample containing 100 mM NaCl.

On the other hand, the shape of CD spectra changed slightly upon TFE addition (Fig. 3B). The ellipticity values at 200 nm, -8.000° cm² dmol⁻¹ for 6xHis-mini-HBx(-Cys) in pure water and -13.000° cm² dmol⁻¹ in 0.5% TFE/water,

are indicative of a gain in α -helical content. The assignment of the secondary structure elements by CDNN software shows that the α -helical content increases from 6.7% to 8.5% upon TFE addition. Nevertheless, the extended structure (β -sheet) reduces by 4%, and the non-ordered structure changes from 35.6% to 36.3% of its contribution to the secondary structure of the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein.

3.5. Fluorescence spectra of refolded protein

Fluorescence emission spectra provide useful information about the protein tertiary structure organization. The recombinant 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein has one tryptophan residue and one tyrosine residue (Fig. 1). Upon excitation at 295 nm, only the tryptophan residue is excited and the fluorescence emission spectra are depicted in Fig. 4. The fluorescence data were collected at two different temperatures.

At 25 °C (Fig. 4A), the protein exhibits a maximum centered at 342 nm in aqueous solution, but after the addition of 100 mM NaCl the maximum is shifted to 336 nm, indicating that there is less exposition of the tryptophan residue to the solvent. Raising the temperature to 37 °C (Fig. 4B), the maximum of the intrinsic fluorescence emission does not

Table 1

Assessment of the relative secondary structural elements of the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein upon increasing NaCl addition as calculated from CD spectra (see Section 2 for details)

Addition to water at pH 6	α -Helix (%)	β -Sheet (%)	β -Turn (%)	Random coil (%)
None	7.8	36.4	23.6	35.5
10 mM NaCl	8	37.7	22.8	35.2
25 mM NaCl	8.1	37.8	22.3	35
50 mM NaCl	8.4	35.6	23.3	35.5
75 mM NaCl	8.2	37.1	22.6	35.4
100 mM NaCl	9	40.6	21.5	32.9

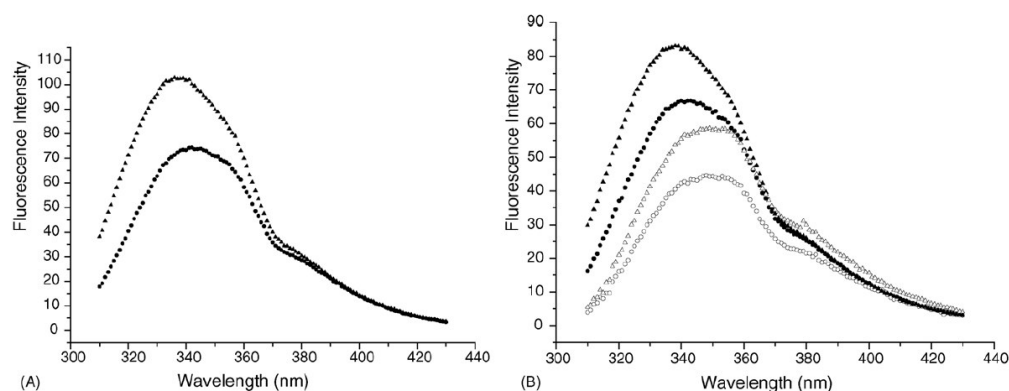


Fig. 4. Fluorescence emission spectra of purified 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein at 25 °C (A) and 37 °C (B). The protein concentration was 2 μ M (0.03 mg/ml) in the following different experimental conditions: pure water (closed circles), 100 mM NaCl (closed triangles), 6 M Gdn-HCl (open circles), and 100 mM NaCl + 6 M Gdn-HCl (open triangles). The excitation wavelength was 295 nm and spectra were background corrected.

change (343 nm in pure water), but in the 100 mM NaCl solution there is again a 'blue shift' to 338 nm of the tryptophan fluorescence emission due to its localization within the protein 'hydrophobic core'. Besides, under denaturing conditions (6 M Gdn-HCl), the maximum of fluorescence emission is shifted to 348 nm (pure water) or 349 nm (100 mM NaCl), indicating that the tryptophan residue is now more exposed to the solvent as a free tryptophan in aqueous solution. These data are in agreement with the CD spectra

that showed an increasing structural gain upon NaCl addition (Table 1).

3.6. NMR analysis

The one-dimensional ^1H NMR spectrum (Fig. 5) indicates that the recombinant 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein is only partially structured in aqueous solution at pH 6. The absence of proton signals under 0 ppm, as well as signal dispersion be-

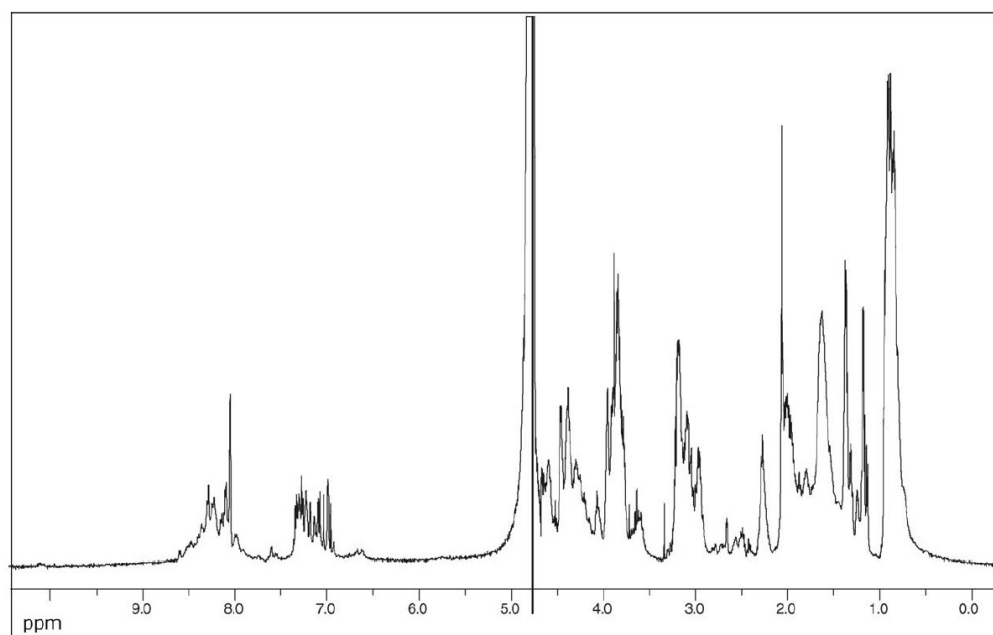


Fig. 5. One-dimensional ^1H NMR spectrum of 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein. The NMR sample contained $\sim 400 \mu\text{M}$ protein in 95% H_2O /5% D_2O at pH 6.

tween 7.0 ppm and 8.5 ppm are indicative of an unstructured polypeptide. This result is in agreement with previous spectroscopic assays, including far-UV CD (Fig. 3; Table 1) and fluorescence emission spectra (Fig. 4). Interestingly, there is a proton signal duplicated around 10 ppm that is assigned to the indolic NH which belongs to the tryptophan residue, leading us to speculate that there may be two different kinds of protein structure populations. However, it was not possible to assign the chemical shifts for the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein in a two-dimensional ^1H -TOCSY experiment (data not shown) due to a too crowded fingerprint region (NH-H α). In short, the NMR data confirmed that the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein is rather unstructured in aqueous solution at pH 6.

4. Discussion

Hepatitis B virus infection is one of the major causes of hepatocellular carcinoma and the X protein has been suspected to be one of the oncogenic viral proteins of HBV (Anthony, 2001; Murakami, 2001). Several studies have demonstrated that HBx is a 'promiscuous' multifunctional viral regulator that affects viral replication and viral proliferation, directly or indirectly (Hildt et al., 1996). HBx protein is further known to modulate transcription and interferes with diverse signaling pathways, thereby contributing either to carcinogenesis or causing apoptosis (Yen, 1996; Chirillo et al., 1997; Madden and Slagle, 2001). This modulation seems to occur mainly through protein-protein interactions because HBx does not possess any classical nucleic acid binding domains. Previous studies however demonstrated, that HBx binds to single stranded DNA and RNA in a specific fashion, although it cannot bind to double stranded DNA (Qadri et al., 1996; Rui et al., 2001). The exact function and structural features of HBx remain unclear.

A truncated mini-HBx(18–142) protein that had its cysteines mutated to serine residues was generated and expressed, utilizing a site directed mutagenesis methodology. The 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein was highly expressed in the *E. coli* insoluble fraction, and after its purification under denaturing conditions, was refolded by sequential dialysis and used in spectroscopic assays. It was shown that the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein was able to interact with an AU-rich RNA oligonucleotide (Fig. 2B) and with the human tumor suppressor protein p53 (Moura et al., 2005), confirming that the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein like the wild-type protein possesses biological activity after its renaturation upon refolding.

CD spectroscopic experiments showed that the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein is rather unstructured in aqueous solution but has a propensity to gain secondary structure upon NaCl or TFE addition. 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein maintained its secondary structure up to 60 °C, but upon NaCl or TFE addition there were structural changes in the CD spectra that could be followed using the CDNN deconvolu-

tion program. In both cases, there was an alpha-helical gain in the secondary structure elements of the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein, with a reduction of the non-ordered structure. In addition to that, the intrinsic emission fluorescence spectra showed that upon NaCl addition there was less exposition of the tryptophan residue to the solvent, suggesting that the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein can change its overall conformation under specific experimental conditions.

In agreement with our finding that HBx changes its structural features under specific experimental conditions, it has been shown previously that several proteins involved in regulatory functions are completely or partly unstructured in solution, and they become structured only upon binding to their target molecule (Dyson and Wright, 2002). For instance, the binding of the zinc finger domain of the nuclear receptor RXR to DNA results in an induced folding of the dimerization region, which is dynamically disordered in the free protein (Holmbeck et al., 1998). Moreover, upon binding to the cellular oncoprotein MDM2, the transactivation domain of p53 tumor suppressor protein undergoes a coil-to-helix folding transition (Kussie et al., 1996). In short, the intrinsic lack of structure may confer to HBx functional complexity, including the ability to bind to several different targets in different conformations, and the fine control over binding affinity.

Not surprisingly, the HBx protein does not contain any significant structural motifs nor sequence homologies with other known transactivating factors, which could indicate a possible mechanism of transcriptional activation mediated by HBx. Besides, it has been shown that HBx stimulates the transcriptional machinery in the nucleus through protein-protein interactions with several transcription factors, and interacts with cellular components of signal transduction pathways in the cytoplasm (Murakami, 1999). Given this highly "promiscuous" behavior, it is tempting to speculate that the intrinsically unstructured HBx protein may become folded upon binding to its target molecules.

It is known that HBx protein is essential in the early stages of the HBV infection, as well as for the establishment of the viral infection in vivo, and its continuous expression might be responsible for the cellular transformation leading to cirrhosis and HCC development (Arbuthnot et al., 2000; Murakami, 2001). Besides, it is very difficult to detect HBx protein in the HBV infected liver due to very low amounts of the protein in the hepatocytes (Urban et al., 1997). As in the case for many signaling and transcriptional processes, the low cellular concentration of a regulatory protein and its target might affect their efficient binding if the protein has a restricted conformational flexibility. On the other hand, despite its low concentration in the cell, the unfolded polypeptide can bind weakly to its target molecule, and could in a second step fold as it "reels" onto its target, according to the "fly casting" mechanism proposed by Shoemaker and co-workers (Shoemaker et al., 2000). In this context, the inherent flexibility of the HBx protein could allow changes in the local and global structure in response to different molecular targets, and might explain the interaction of HBx with multiple

cellular partners. The coupled folding and binding processes might play an important role in the function of many proteins, as well as in the transactivating activity mediated by HBx onco-protein.

In summary, our circular dichroism and fluorescence experiments showed that the 6xHis-mini-HBx(-Cys) protein is rather unstructured in aqueous solution. Its thermal stability might be related to its conformational flexibility, which could be an important key to understand the HBx protein. Moreover, its adaptability might allow HBx to interact with such an enormously wide array of cellular proteins and thereby interfere simultaneously in diverse cellular processes ranging from transcriptional regulation, apoptosis and DNA repair to signaling mechanisms in general.

Acknowledgements

We thank Dr. R.J. Schneider (NYU, New York) for the HBx gene containing vector pCMV-Ad. This work is supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP, Grant 98/05891-9 to J.K.; fellowships 01/00554-9 to P.R.M., 01/6552-8 to E.R. and 03/12272-3 to K.A.G.; the SMOLBNet and CEPID projects), the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are grateful to Drs. Thelma A. Pertinhez and Alberto Spisni as well as to Aline L. Oliveira and Rita C.R. Figueiredo from the NMR group at the LNLS for help with NMR data collection and interpretation. We also like to thank Dr. Carlos H.I. Ramos and Luciana R. Camillo at the LNLS for support with DNA sequencing, and Maria Eugenia R. Camargo for technical assistance.

References

- Anthony, P.P., 2001. Hepatocellular carcinoma: an overview. *Histopathology* 39, 109–118.
- Arbuthnot, P., Capovilla, A., Kew, M., 2000. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 357–368.
- Arbuthnot, P., Kew, M., 2001. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 77–100.
- Avantaggiati, M.L., Natoli, G., Balsano, C., Chirillo, P., Artini, M., De Marzio, E., Collepardo, D., Levvero, M., 1993. The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the *c-fos* promoter through multiple cis-acting elements. *Oncogene* 8, 1567–1574.
- Balsano, C., Avantaggiati, M.L., Natoli, G., De Marzio, E., Will, H., Pericaudet, M., Levvero, M., 1991. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the *cmyc* protooncogene at the transcriptional level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 985–992.
- Becker, S.A., Lee, T.H., Butel, J.S., Slagle, B.L., 1998. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J. Virol.* 72, 266–272.
- Benn, J., Schneider, R.J., 1994. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf MAP kinase signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10350–10354.
- Benn, J., Schneider, R.J., 1995. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11215–11219.
- Butel, J.S., Lee, T.H., Slagle, B.L., 1996. Is the DNA repair system involved in hepatitis-B-virus-mediated hepatocellular carcinogenesis? *Trends Microbiol.* 4, 119–124.
- Capovilla, A., Carmona, S., Arbuthnot, P., 1997. Hepatitis B virus X-protein binds damaged DNA and sensitizes liver cells to ultraviolet irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 255–260.
- Casemann, W.H., 1996. Transactivation of cellular genes by hepatitis B virus proteins: a possible mechanism of hepatocarcinogenesis. *Adv. Virus Res.* 47, 253–302.
- Chen, H.S., Kaneko, R., Girones, R.W., Anderson, W.E., Hornbuckle, B.C., Tennant, P.J., Cote, J.L., Gerin, R.H., Purcell, R.H., Miller, R.H., 1993. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J. Virol.* 67, 1218–1226.
- Chirillo, P., Pagano, S., Natoli, G., Puri, P.L., Burgio, V.L., Balsano, C., Levvero, M., 1997. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8162–8167.
- Dyson, H.J., Wright, P.E., 2002. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 54–60.
- Elmore, L.W., Hancock, A.R., Chang, S.F., Wang, X.W., Chang, S., Callahan, C.P., Geller, D.A., Will, H., Harris, C.C., 1997. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14707–14712.
- Feitelson, M.A., Zhu, M., Duan, L.X., London, W.T., 1993. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 8, 1109–1117.
- Groisman, I.J., Koshy, R., Henkler, F., Groopman, J.D., Alaoui-Jamali, M.A., 1999. Downregulation of DNA excision repair by the hepatitis B virus-x protein occurs in p53-proficient and p53-deficient cells. *Carcinogenesis* 20, 479–483.
- Henkler, F., Hoare, J., Waseem, N., Goldin, R.D., McGarvey, M.J., Koshy, R., King, I.A., 2001. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J. Gen. Virol.* 82, 871–882.
- Hildt, E., Hofschneider, P.H., Urban, S., 1996. The role of hepatitis B virus (HBV) in the development of hepatocellular carcinoma. *Semin. Virol.* 7, 333–347.
- Holmbeck, S.M., Dyson, H.J., Wright, P.E., 1998. DNA-induced conformational changes are the basis for cooperative dimerization by the DNA binding domain of the retinoid X receptor. *J. Mol. Biol.* 284, 533–539.
- Hu, Y.K., Eisses, J.F., Kaplan, J.H., 2000. Expression of an active Na K-ATPase with an alpha subunit lacking all twenty-three native cysteine residues. *J. Biol. Chem.* 275, 30734–30739.
- Jameel, S., Siddiqui, A., Maguire, H.F., Rao, K.V., 1990. Hepatitis B virus X protein produced in *Escherichia coli* is biologically functional. *J. Virol.* 64, 3963–3966.
- Kidd-Ljunggren, K., Oberg, M., Kidd, A.H., 1995. The hepatitis B virus X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences. *J. Gen. Virol.* 76, 2119–2130.
- Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., Jay, G., 1991. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351, 317–320.
- Kim, H., Lee, H., Yun, Y., 1998. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J. Biol. Chem.* 273, 381–385.
- Koike, K., 2002. Hepatocarcinogenesis in hepatitis viral infection: lessons from transgenic mouse studies. *J. Gastroenterol.* 37, 55–64.
- Kong, H.J., Hong, S.H., Lee, M.Y., Kim, H.D., Lee, J.W., Cheong, J.H., 2000. Direct binding of hepatitis B virus X protein and retinoic X receptor contributes to phosphoenol-pyruvate carboxykinase gene transactivation. *FEBS Lett.* 483, 114–118.
- Kumar, V., Jayasuryan, N., Kumar, R., 1996. A truncated mutant (residues 58–140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5647–5652.

- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., Pavletich, N.P., 1996. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274, 948–953.
- Lee, Y.H., Yun, Y., 1998. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 25510–25515.
- Ljungquist, C., Breitholtz, A., Brink-Nilsson, H., Moks, T., Uhlen, M., Nilsson, B., 1989. Immobilization and affinity purification of recombinant proteins using histidine peptide fusions. *Eur. J. Biochem.* 186, 563–569.
- Lo, S.J., Chien, M.L., Lee, Y.H., 1988. Characteristics of the X gene of hepatitis B virus. *Virology* 167, 289–292.
- Madden, C.R., Slagle, B.L., 2001. Stimulation of cellular proliferation by hepatitis B virus X protein. *Dis. Markers* 17, 153–157.
- Maguire, H.F., Hoeffler, J.P., Siddiqui, A., 1991. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 252, 842–844.
- Marczinovits, I., Somogyi, C., Pathy, A., Nemeth, P., Molnar, J., 1997. An alternative purification protocol for producing hepatitis B virus X antigen on a preparative scale in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 56, 81–88.
- Moura, P.R., Rui, E., Gonçalves, K.A., Kobarg, J., 2005. The cysteine residues of the hepatitis B virus onco-protein HBx are not required for its interaction with RNA or with human. *Virus Res.* 108, 121–131.
- Murakami, S., 1999. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 42, 81–99.
- Murakami, S., 2001. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J. Gastroenterol.* 36, 651–660.
- Qadri, I., Maguire, H.F., Siddiqui, A., 1995. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1003–1007.
- Qadri, I., Ferrari, M.E., Siddiqui, A., 1996. The hepatitis B virus transactivator protein, HBx, interacts with single-stranded DNA (ssDNA). Biochemical characterizations of the HBx-ssDNA interactions. *J. Biol. Chem.* 271, 15443–15450.
- Rui, E., Moura, P.R., Kobarg, J., 2001. Expression of deletion mutants of the hepatitis B virus protein HBx in *E. coli* and characterization of their RNA binding activities. *Virus Res.* 74, 59–73.
- Seeger, V., Mason, W.S., 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 51–68.
- Shoemaker, B.A., Portman, J.J., Wolynes, P.G., 2000. Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8868–8873.
- Sitterlin, D., Lee, T.H., Prigent, S., Tiollais, P., Butel, J., Transy, C., 1997. Interaction of the UV-Damaged DNA-binding protein with hepatitis B virus X protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient X-insertion mutants. *J. Virol.* 71, 6194–6199.
- Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C., Cromlish, J.A., 1995. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J. Virol.* 69, 1851–1859.
- Twu, J.S., Chu, K., Robinson, W.S., 1989. Hepatitis B virus X gene activates kappa B-like enhancer sequences in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5168–5172.
- Twu, J.S., Wu, J.Y., Robinson, W.S., 1990. Transcriptional activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by hepatitis B virus X-protein requires de novo protein synthesis. *Virology* 177, 406–410.
- Twu, J.S., Lai, M.Y., Chen, D.S., Robinson, W.S., 1993. Activation of protooncogene *c-jun* by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 192, 346–350.
- Urban, S., Hildt, E., Eckerskorn, C., Simma, H., Kekule, A., Hofschneider, P.H., 1997. Isolation and molecular characterization of hepatitis B virus X-protein from a baculovirus expression system. *Hepatology* 26, 1045–1053.
- Wang, X.W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M.A., Gu, J.R., Harris, C.C., 1994. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2230–2234.
- Wang, X.W., Gibson, M.K., Vermeulen, W., Yeh, H., Forrester, K., Sturzbecher, H.W., Hoeijmakers, J.H., Harris, C.C., 1995. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res.* 55, 6012–6016.
- Wang, H.D., Trivedi, A., Johnson, D.L., 1997. Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 17, 6838–6846.
- Waris, G., Siddiqui, A., 2003. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J. Biosci.* 28, 311–321.
- Williams, J.S., Andrisani, O.M., 1995. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3819–3823.
- Yen, T.S.B., 1996. Regulation of hepatitis B virus gene expression. *Semin. Virol.* 4, 33–42.
- Zoulim, F., Saputelli, J., Seeger, C., 1994. Woodchuck hepatitis B virus X gene is important for viral infection in vivo. *J. Virol.* 68, 2026–2030.

Anexo 8.4 - Súmula curricular

Nome: Patricia Ribeiro de Moura

Nascimento: 29/01/1973 - Newark, New Jersey/EUA

Formação Acadêmica

2001 - 2005 Doutorado em Biologia Funcional e Molecular (ênfase Bioquímica)
Instituto de Biologia, UNICAMP & LNLS - Campinas/SP

1994 - 1997 Mestrado em Química Orgânica
Instituto de Química, UNICAMP - Campinas/SP

1990 - 1993 Bacharelado em Química
Instituto de Química, UNICAMP - Campinas/SP

Experiência Profissional

1999 - 2001 Técnica de Desenvolvimento Especializado
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) - Campinas/SP

1997 Analista Química
Johnson & Johnson/Janssen-Cilag - São José dos Campos/SP

1991 - 1993 Iniciação Científica
Instituto de Química, UNICAMP - Campinas/SP

Produção Científica

- 4 trabalhos publicados em revistas internacionais
- 2 trabalhos em preparação
- 13 participações em congressos nacionais e 2 em congressos internacionais

Experiência Didática

2002 - 2004 Co-orientação de 2 alunos de Iniciação Científica - LNLS - Campinas/SP

1998 Plantonista de Química - Escola Barifaldi - São Paulo/SP

1993 Plantonista de Química, Física e Matemática - Colégio Rio Branco - Campinas/SP

1993 - 1994 Auxiliar Didático - Instituto de Química, UNICAMP - Campinas/SP

Experiência Laboratorial

- Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes
- Espectroscopia de macromoléculas e moléculas orgânicas
- Síntese e reatividade de compostos orgânicos
- Laboratório de Controle de Qualidade