

NOVEDOSAS INTERACCIONES DEL VIRUS DENGUE 2 MEDIADAS POR EL DOMINIO III DE LA PROTEÍNA DE LA ENVOLTURA CON PROTEÍNAS DEL PLASMA HUMANO

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

AUTORES PRINCIPALES: Vivian Huerta, Yassel Ramos, Alejandro M. Martin, Glay Chinaea

OTROS AUTORES: Mónica Sarría, Osmany Guirola, Alexis Yero, Dianne Pupo, Dayron Martín, Gabriel J. Márquez, Aniel Sánchez, Yasset Pérez-Riverol, Vladimir Besada, Patricia Toledo, Noralvis Fleitas, Jorge Sánchez, Luis J. González

COLABORADORES: Sebastien Gallien, Bruno Domon

OTRA ENTIDAD PARTICIPANTE: Laboratorio de Proteómica Clínica de Luxemburgo, Luxemburgo

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Vivian Huerta Galindo

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Avenida 31 e/ 186 y 190. Cubanacán. Playa

Teléfono: 7 271 6022, ext. 3150, 3140; FAX: 7 271 4764

Email: vivian.huerta@cigb.edu.cu

RESUMEN

Antecedentes: El virus dengue (VD) depende para multiplicarse de la red de interacciones que establece con las moléculas del hospedero. Siendo la sangre el tejido donde se llevan a cabo los primeros ciclos de multiplicación viral, las interacciones de las proteínas estructurales del VD con proteínas del plasma sanguíneo resultan decisivas para el curso de la infección y contribuyen a las marcadas diferencias observadas en el desarrollo de síntomas clínicos en las personas infectadas con el virus. Los viriones del VD contienen 3 proteínas estructurales: envoltura (E), membrana y cápsida. De estas, la proteína E es la más expuesta en la superficie de las partículas virales y juega un papel determinante en los eventos tempranos de la infección del virus a las células. El dominio III de la proteína E se ha identificado como una región de gran importancia funcional para el virus. El plegamiento tipo inmunoglobulina que presenta este dominio lo hace una región de potenciales interacciones con proteínas del plasma sanguíneo.

Problema que se ha resuelto de acuerdo con los objetivos del trabajo: En el trabajo se obtiene información sobre la red de factores de interacción virus-huésped en el plasma humano. Se identifican interacciones del VD con proteínas de origen humano que juegan papeles esenciales en procesos que se encuentran alterados en las personas que sufren las formas más severas de la enfermedad denominado en la actualidad Dengue Severo (DS). Se identifican proteínas como potenciales dianas novedosas en el

desarrollo de medicamentos y/o estrategias clínicas para modular el desarrollo de los síntomas en el DS, así como en la identificación de biomarcadores para el pronóstico del curso de la infección. Se definen regiones de importancia funcional en la superficie del dominio III de la proteína E del VD que pueden servir de base para trabajos de diseño basado en estructura de moléculas con potencial antiviral.

Resultados: El trabajo incluye el estudio de elementos estructurales del dominio III de la proteína E relevantes para la interacción con proteínas de la superficie de las células de mamíferos. Se presenta además un análisis de conservación de los aminoácidos de la superficie expuesta del dominio III y la relación con dos tipos de interacciones de gran importancia para el establecimiento de la infección en humanos: interacción con receptores celulares y reconocimiento de la respuesta de anticuerpos. Utilizando una proteína recombinante que comprende el dominio III de la proteína E del VD2 (DIII E2) se realizaron experimentos de cromatografía de afinidad con diferentes preparaciones de plasma humano que permitieron la identificación por espectrometría de masas de varias moléculas candidatas a establecer interacciones del virus durante la infección a las personas. El trabajo incluye la validación de varias de estas interacciones mediante ELISA y la caracterización más detallada de una de estas, específicamente la interacción con la alfa 2-macroglobulina., un conocimiento que puede ayudar a mejorar el tratamiento médico de los pacientes y el desarrollo de una terapia antiviral específica.

COMUNICACIÓN CORTA

Los cuatro virus que forman el complejo Dengue (VD1-4) se transmiten a los humanos por mosquitos del género *Aedes* y causan la enfermedad del mismo nombre. La incidencia anual de infecciones con los VD1-4 se ha estimado en alrededor de 390 millones de personas transcurriendo aproximadamente el 75 % de las mismas de forma asintomática. En las personas que enferman pueden presentarse un rango muy amplio de síntomas clínicos que abarcan desde una fiebre indiferenciada hasta síntomas más severos que pueden desembocar en un choque hipovolémico con manifestaciones hemorrágicas que implican peligro para la vida. A nivel molecular no existe una clara comprensión de las interacciones del virus con el hospedero que determinan el curso de la infección y de la evolución de la enfermedad.

Tanto las células como el plasma sanguíneo son elementos muy importantes en los primeros ciclos de multiplicación del VD en las personas infectadas. Por otra parte, la proteína de la envoltura (E) de los VD1-4 es la que recubre la superficie de los viriones y media la interacción con los receptores celulares y la fusión de las membranas del endosoma y el virión que libera el material genético del virus en el citoplasma celular. La proteína E está formada por tres dominios estructurales: I, II y III. De éstos, el dominio III tiene un plegamiento tipo inmunoglobulina con numerosas interacciones potenciales con proteínas plasmáticas. Se conoce que este dominio participa en la interacción con los receptores que median la entrada del virus a las células. La importancia funcional del dominio III se ha evidenciado con la potente actividad neutralizante de la infección viral de los anticuerpos dirigidos contra esta región. Los resultados de estudios previos indicaban que en el dominio III predominan los epitopos determinantes de reactividad serotipo-específica. Con el objetivo de lograr una mayor comprensión de las regiones funcionales del dominio III y sus potencialidades para mediar interacciones conservadas

en el complejo viral, se implementó un método para calcular un Índice de Conservación que describe el grado de variabilidad de cada residuo de aminoácido no solo entre serotipos sino incluyendo la posible variabilidad entre cepas de un mismo serotipo (Huerta et al., 2008). Se implementó además una representación en escala de colores que facilitaba la interpretación de los resultados. De esta manera se evidenció que la superficie del dominio III expuesta a interacciones está formada fundamentalmente por aminoácidos conservados en dos o tres serotipos virales. Los residuos de alta variabilidad entre serotipos aunque minoritarios, se encuentran distribuidos formando un anillo en la parte superior del dominio III que circunda el puente disulfuro formado entre las dos cisteínas del mismo. Para comparar la influencia de la reducción del puente disulfuro y la alquilación de las cisteínas en el reconocimiento del dominio por anticuerpos neutralizantes y la interacción con proteínas presentes en la fracción microsomal como potenciales receptores celulares del virus se utilizaron proteínas recombinantes que contenían el dominio III de la proteína E del VD2 fusionado a dos variantes de la dihidrolipoamida deshidrogenasa (EC 1.8.1.4) de *Neisseria meningitidis* (P64K): (1) la proteína PD5 que comprende la proteína P64K completa y con la que existían evidencias que se propicia una estabilización del plegamiento del dominio III aun en condiciones de la reducción del puente disulfuro y (2) la proteína PD2 que comprende solo el fragmento N-terminal de la P64K. Los resultados de ese trabajo evidenciaron una marcada diferencia en la susceptibilidad del reconocimiento de anticuerpos y la interacción con potenciales receptores celulares a la reducción del puente disulfuro del dominio III. Dado que esta observación se obtuvo aún para los anticuerpos presentes en la respuesta policlonal generada contra el virus, estos resultados dieron lugar a la definición de dos regiones independientes aunque con cierta superposición en la superficie del dominio III. Una de ellas caracterizada por interacciones serotipo-específicas, con epitopos dominantes en la respuesta de anticuerpos y otra región que media la interacción con los receptores celulares y caracterizada por una mayor reactividad cruzada entre los diferentes serotipos del virus. Estos resultados brindaban evidencias sobre la posibilidad de realizar trabajos de diseño de moléculas basado en la estructura del dominio III con potencial actividad antiviral contra los cuatro serotipos del virus.

Para estudiar las interacciones del VD2 con proteínas del plasma humano mediadas por el dominio III de la proteína E se obtuvo la proteína recombinante DIIIE2. En esta proteína, la región que comprende el dominio III se fusionó a una cola de seis histidinas con el fin de facilitar su purificación. Esta proteína se utilizó como ligando inmovilizado en experimentos de cromatografía de afinidad en los que las proteínas aisladas se identificaron por Espectrometría de masas y que se engloban en lo adelante en el término AC-MS. En los experimentos se utilizaron dos muestras diferentes de plasma humano, después de clarificación por centrifugación para eliminar las crioglobulinas (plasma total) y después de un fraccionamiento por métodos cromatográficos con el que se separaron las proteínas mayoritarias y que facilitaba el estudio de interacciones con proteínas de menor abundancia relativa pero de gran importancia funcional en procesos de interés para la patogénesis del VD. Tales son los casos de las cascadas del Complemento y de la Coagulación.

Los experimentos de AC-MS utilizando plasma total permitieron la identificación de dos interacciones novedosas del VD2, la interacción con la alfa 2-macroglobulina (α 2M, P01023) y con la proteína conocida como *Serum amyloid P component protein* (SAP, P02743) (Huerta et al., 2014). La interacción directa con la proteína DIIIE2 se validó

utilizando preparaciones purificadas de ambas proteínas humanas en un ensayo de formato tipo ELISA. En el caso de la $\alpha 2M^*$, se demostró una mayor reactividad de la variante activada para la interacción con el receptor celular denominado *Low density lipoprotein receptor related protein 1* ($\alpha 2M^*$) y se demostró la interacción con proteínas recombinantes que comprenden el dominio III de la proteína E de los serotipos 1, 3 y 4 del VD (DIIIE1, DIIIE3 y DIIIE4) fusionado igualmente a una cola de seis histidinas (Figura 1). Se determinó que la interacción monovalente de la $\alpha 2M^*$ con las proteínas DIIIE1-4 tiene una afinidad aparente en el orden micromolar y se puede categorizar en términos de fortaleza DIIIE4>DIIIE1~DIIIE2>DIIIE3. Sin embargo, la interacción con la proteína DIIIE2 puede llegar a una afinidad aparente 8×10^{-8} M por efectos de avididad. En el trabajo se demuestra también que la interacción directa de la $\alpha 2M^*$ con la partícula viral tiene una afinidad aparente de 2.9×10^{-8} M, indicando la existencia de una unión multipuntual. Los resultados indican que la interacción con la $\alpha 2M^*$ puede proteger al virus de la inactivación causada por incremento de temperatura.

Para obtener la fracción de plasma humano se utilizó una cromatografía de intercambio iónico en condiciones que permitieron la separación de la albúmina y las inmunoglobulinas en la fracción no unida. Las fracciones eluidas con incremento de la fuerza iónica y cambios de pH se caracterizaron en cuanto a sus proteínas componentes y la unión a la proteína DIIIE2 (Huerta et al., 2015). Los resultados mostraron un alto grado de superposición en la composición proteica de las mismas y un gran enriquecimiento de la actividad de unión a DIIIE2. Las fracciones de mayor actividad se unieron para conformar la muestra inicial del experimento de AC-MS. Experimentos de tiempo-de-adición con esta fracción de plasma mostraron la capacidad de las proteínas presentes de inhibir la infección en células de origen humano, con mayor potencia en condiciones de incubación con la preparación de VD2 previo a la infección. Estos resultados confirmaban la existencia de proteínas capaces de interactuar con la partícula viral implicando regiones de importancia funcional en el virus.

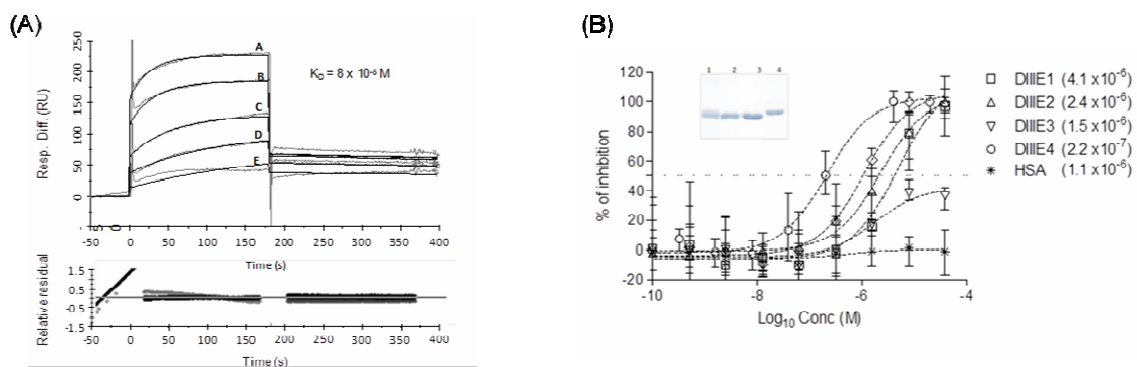


Figura 1. Experimentos de caracterización de la interacción de la $\alpha 2M^*$ con el dominio III de la proteína E del VD2. Resultados tomados de (Huerta et al., 2014). (A). Determinación de la afinidad de la interacción utilizando Resonancia de Plasmones de Superficie. Se utilizó la proteína DIIIE2 inmovilizada en un chip y se aplicaron diferentes concentraciones de la $\alpha 2M^*$. Para el cálculo de la constante de afinidad en el equilibrio se utilizó un ajuste global a un modelo de Langmuir 1:1. (B). Ensayo de competencia de los dominios III recombinantes utilizados en solución por la interacción con la $\alpha 2M^*$ unida a la placa. Se detecta la unión de la proteína DIIIE1 biotinilada. Inset: Análisis por SDS- PAGE de las preparaciones de las proteínas recombinantes utilizadas: 1. DIIIE1; 2. DIIIE2; 3. DIIIE3 y 4. DIIIE4.

Los experimentos de AC-MS utilizando la fracción de plasma humano condujeron a la identificación de 36 proteínas que participan en complejos funcionales que interactúan con el VD2 (Huerta et al., 2016). El análisis del enriquecimiento de términos dentro de las proteínas identificadas evidenció una representación significativa de complejos proteasa:serpina. Estos complejos son claves en la regulación de la hemostásis y de los procesos de la Coagulación y el Complemento. Por otra parte, destacó la presencia de varios motivos estructurales dentro de las proteínas del plasma unidoras del dominio III de la proteína E del VD2: residuos hidroxilados, ácido γ carboxi-glutámico y dominios estructurales tipo Factor de Crecimiento Epidérmico unidor de Ca^{2+} . En el orden práctico esta información resulta de gran interés para los proyectos de diseño de inhibidores de la infección basado en estructura.

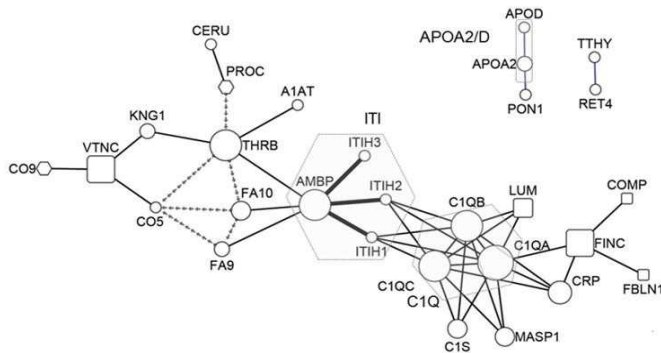


Figura 2. Red de interacciones formada por las proteínas identificadas en experimento de AC-MS utilizando la proteína DIIIIE2 como ligando inmobilizado. Las proteínas (nodos) están representadas por sus nombres de genes, según UniProtKB. Las líneas representan las interacciones entre dos proteínas. Se representan sólo interacciones confirmadas experimentalmente. Las líneas discontinuas representan interacciones tipo enzima: sustrato. La forma de los nodos indica la localización subcelular donde se encuentra fundamentalmente cada una de las proteínas: círculos, proteínas secretadas; cuadrados, matriz extracelular; hexágonos, membrana celular. El tamaño de los nodos representa el grado de conectividad de la proteína en la red. Los componentes de una estructura macromolecular están encerrados en formas geométricas sombreadas. ITI: complejos *Inter-alfa inhibitor*. El alto grado de conexión que se observa en la red confirma la estrecha relación funcional entre las proteínas. El análisis de los posibles complejos sugirió tres proteínas como potenciales contrapartes de interacción directa con DIIIIE2: C- reactive protein, la Trombina y los complejos *Inter alfa inhibitor*. Utilizando un formato tipo ELISA y preparaciones purificadas de estas tres proteínas, se confirmó la interacción directa de cada una de ellas con el dominio III de la proteína E del VD2. En conjunto, los resultados obtenidos contribuyen a un mejor conocimiento de la biología del VD, información que puede ayudar a mejorar el tratamiento médico de los pacientes y el desarrollo de una terapia antiviral específica.

REFERENCIAS

1. Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504–507.
2. Chin, J.F.L., Chu, J.J.H., and Ng, M.L. (2007). The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry. *Microbes Infect.* 9, 1–6.

3. Crill, W.D., and Roehrig, J.T. (2001). Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. *J. Virol.* *75*, 7769–7773.
4. Hung, J.-J., Hsieh, M.-T., Young, M.-J., Kao, C.-L., King, C.-C., and Chang, W. (2003). An External Loop Region of Domain III of Dengue Virus Type 2 Envelope Protein Is Involved in Serotype-Specific Binding to Mosquito but Not Mammalian Cells. *J. Virol.* *78*, 378–388.
5. Li, L. (2004). Molecular determinants of antigenicity of two subtypes of the tick-borne flavivirus Omsk haemorrhagic fever virus. *J. Gen. Virol.* *85*, 1619–1624.
6. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6986–6991.
7. Roehrig, J.T., Volpe, K.E., Squires, J., Hunt, A.R., Davis, B.S., and Chang, G.-J.J. (2004). Contribution of Disulfide Bridging to Epitope Expression of the Dengue Type 2 Virus Envelope Glycoprotein. *J. Virol.* *78*, 2648–2652.
8. Sukupolvi-Petty, S., Austin, S.K., Purtha, W.E., Oliphant, T., Nybakken, G.E., Schlesinger, J.J., Roehrig, J.T., Gromowski, G.D., Barrett, A.D., Fremont, D.H., et al. (2007). Type- and Subcomplex-Specific Neutralizing Antibodies against Domain III of Dengue Virus Type 2 Envelope Protein Recognize Adjacent Epitopes. *J. Virol.* *81*, 12816–12826.
9. Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., Rothman, A.L., Ennis, F.A., et al. (2000). Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. *J. Infect. Dis.* *181*, 2–9.