

Caracterización de la interacción de la proteasa de Chikungunya con los sitios de corte en la poliproteína viral

Barraza, J(1); Gonzalez, D(2); Rossi, R(1); Montes, M(1); Faraj, S(1); Filomatori, C(1).

(1) Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini" (IQUIFIB), Buenos Aires, Argentina; (2) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Odontología, Cátedra de Biofísica y Bioestadística, Buenos Aires, Argentina.
Contacto: jesusbarraza710@gmail.com

El chikungunya es un patógeno humano transmitido por la picadura de mosquitos del género *Aedes*. Posee un genoma de ARN de cadena simple de polaridad positiva de 11 kb que contiene dos marcos de lectura abiertos. El primero codifica para las proteínas no estructurales que son sintetizadas como una única poliproteína (nsP1234), la cual es clivada de manera secuencial por la proteasa viral nsP2. Hasta el momento se desconocen los requerimientos en los sitios de corte de nsP1234 necesarios para el clivaje y los que modulan el corte secuencial. Como primera aproximación, usamos el algoritmo AlphaFold para realizar predicciones de la interacción de nsP2 y un péptido conteniendo el sitio de clivaje nsP3/4, e identificamos posibles contactos. Curiosamente, encontramos que hacia el N-terminal del sitio de corte, existen aminoácidos próximos a residuos de carga opuesta en nsP2, lo que facilitaría el establecimiento de interacciones electrostáticas. Para estudiar la relevancia de estas posibles interacciones, desarrollamos y pusimos a punto un ensayo *in vitro* que utiliza la proteasa viral purificada. Como sustrato, diseñamos, expresamos y clonamos una construcción compuesta por la proteína fluorescente GFP y tiorredoxina unidas por secuencias de diferente longitud que contienen el sitio de corte biológico nsP3/4. Con estos sustratos realizamos ensayos de actividad enzimática. La actividad de nsP2 se evidenció por la aparición de especies de menor peso molecular en geles de poliacrilamida. Por densitometría, cuantificamos la fracción de sustrato proteolizado en cada caso. Al comparar el comportamiento de los distintos sustratos, observamos que aquellos con mayor número de aminoácidos hacia el N-terminal exhiben una actividad mucho mayor que los sustratos más cortos. Esto refuerza la idea que la hidrólisis del sustrato está favorecida por interacciones de tipo iónicas entre la enzima y el sitio de corte. Esto concuerda con resultados donde observamos que diferentes sustratos muestran su actividad óptima a concentraciones variables de NaCl. En conjunto, nuestros resultados indican que el clivaje de la poliproteína por la nsP2 requiere la formación de interacciones específicas en las cercanías del sitio de corte. Nuestros resultados muestran que las características del sustrato podrían afectar los ensayos de actividad utilizados para el *screening* de antivirales.