

ESTUDO DAS INTERAÇÕES DA PROTEÍNA NS5A DO VÍRUS DA HEPATITE C COM PROTEÍNAS DO HOSPEDEIRO HUMANO: ANÁLISE BASEADA EM REDE DE INTERAÇÃO

Data de submissão: 06/05/2023

Data de aceite: 03/07/2023

Manuel Bezerra de Meneses Neto

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – RJ
<https://lattes.cnpq.br/0488434579775030>

Luísa Hoffmann

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – RJ
<http://lattes.cnpq.br/2379740311109634>

Roberta Kuan Tchien de Mello Loh

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – RJ
<http://lattes.cnpq.br/2766620698228444>

Juliane Antonio Ramos

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro – RJ
<http://lattes.cnpq.br/9839743323007741>

inflamação persistente, que gera fibrose tecidual, podendo evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC). A proteína não estrutural NS5A do HCV é uma fosfoproteína com grande importância para a replicação, propagação e patogênese viral. O objetivo deste trabalho é realizar um estudo baseado em análise de rede das interações da proteína NS5A do HCV com proteínas humanas para melhor compreender o seu papel no desenvolvimento do CHC. Inicialmente foi realizado um levantamento bibliográfico das proteínas humanas que interagem com NS5A. Interações proteína-proteína (PPIs) da lista de proteínas obtidas pelo levantamento foram coletadas através da plataforma STRING, e, também, os dados de estatística de rede e enriquecimento funcional para vias da base de dados KEGG. Foi construída uma rede de interação de NS5A contendo interações entre proteínas virais e humanas e realizado uma análise topológica de rede através do programa Cytoscape 3.8.2. Foram encontradas 221 proteínas que interagem com NS5A. Com a análise topológica foram encontrados 22 gargalos para rede de interação de NS5A, sendo 16 já previamente descritos e 6 novos. Com a análise funcional, 104 vias

RESUMO: Estima-se que a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) acometa 58 milhões de pessoas em todo o mundo. Cerca de 80% dos infectados evolui para infecção crônica. Após a cronificação é observada uma progressão natural da doença caracterizada por um quadro de

de 21 diferentes categorias do KEGG foram enriquecidas para a rede de PPIs humanas. Foram encontrados vários gargalos da rede de interação de NS5A em vias de categorias do KEGG relacionadas ao câncer. A proteína GRB2 parece ser um gargalo proeminente de ser regulado por NS5A para o desenvolvimento do CHC.

PALAVRAS-CHAVE: HCV, NS5A, rede de interação, análise funcional de rede, carcinoma hepatocelular.

STUDY OF THE INTERACTIONS OF HEPATITIS C VIRUS NS5A PROTEIN WITH HUMAN HOST PROTEINS: INTERACTION NETWORK-BASED ANALYSIS

ABSTRACT: It is estimated that hepatitis C virus (HCV) infection affects 58 million people worldwide. About 80% of those infected progress to chronic infection. After chronification, it is observed a natural progression of the disease characterized by a persistent inflammation, which generates tissue fibrosis that can progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). The non-structural protein NS5A is a phosphoprotein that has great importance for the replication, propagation and pathogenesis of HCV. Several interactions of NS5A protein with human proteins have been described. The objective of this work is to carry out a study based on network analysis of the interactions of the HCV NS5A protein with human proteins to better understand its role in the development of HCC. Initially, a literature survey of human proteins that interact with NS5A was conducted. Protein-protein interactions (PPIs) of the list of proteins generated by the survey were collected through the STRING platform, as well as network statistics and functional enrichment data for KEGG pathways. An NS5A interaction network containing interactions between viral and human proteins was constructed and a network topological analysis was performed with Cytoscape 3.8.2 software. A total of 221 proteins that interact with NS5A were found. With the topological analysis, 22 bottlenecks were found for the NS5A interaction network, 16 of which were previously described and 6 were new. With the functional analysis, 104 KEGG pathways from 21 KEGG categories were enriched for the human PPI network. Several bottlenecks of the NS5A interaction network in the KEGG pathways present in cancer related categories were found. The GRB2 protein appears to be a prominent bottleneck that can be regulated by NS5A for the development of hepatocarcinoma.

KEYWORDS: HCV, NS5A, interaction network, functional network analysis, hepatocellular carcinoma.

1 | INTRODUÇÃO

Estima-se que a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) acometa 58 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo responsável por milhares de mortes todos os anos (WHO, 2022). Após a infecção aguda, 50-80% dos infectados pelo HCV evoluem para a infecção crônica (MANNIS, 2021). Após a cronificação da doença hepática é observado uma progressão da doença, caracterizada por um quadro de inflamação persistente que gera fibrose tecidual, podendo evoluir para a cirrose hepática e até mesmo para o carcinoma hepatocelular (CHC) com um risco anual de 1 à 5 % (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014).

O genoma viral é traduzido em uma poliproteína de cerca de 3000 aminoácidos que é clivada para a produção de três proteínas estruturais, e sete não estruturais (NS) (TABATA et al., 2019). A proteína NS5A, alvo deste estudo, é uma fosfoproteína de 447 aminoácidos que possui dois estados de fosforilação: uma forma fosforilada com 56 kDa e outra hiperfosforilada com 58 kDa (REYES, 2002). Esta proteína viral é composta por uma alfa-hélice anfipática N-terminal e três domínios estruturais. Os domínios II e III são intrinsecamente desdobrados e possuem uma certa flexibilidade estrutural, o que permite a interação com diversas proteínas humanas (BARTENSCHLAGER et al., 2013).

Interações proteína-proteína (PPIs) entre vírus-hospedeiro são essenciais para a propagação viral e estratégias virais de evasão do sistema imune para o estabelecimento da infecção crônica (GERMAIN, et al. 2014), além de desempenharem um papel importante na hepatocarcinogênese (HAN, et al. 2016). Desta forma, elucidar as interações patógeno-hospedeiro é de grande importância para uma melhor compreensão da patogênese viral e dos mecanismos moleculares pela qual um vírus causa comorbidades.

2 | OBJETIVO

Realizar um estudo baseado em análise de rede das interações da proteína NS5A do vírus da hepatite C com proteínas humanas para melhor compreender o seu papel no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular.

3 | METODOLOGIA

3.1 Estudo das interações de NS5A com proteínas do hospedeiro e análise de redundância

Foi realizado um levantamento bibliográfico de artigos científicos através da busca em resumos de artigos das palavras-chave combinadas: “HCV, NS5A, Interaction” na plataforma PubMed do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Todos os artigos foram analisados individualmente, e foi buscado em seu texto resultados que demonstrassem a interação física da proteína viral NS5A com alguma proteína humana. Para avaliar possíveis repetições de proteínas foram coletados os identificadores dos genes (GeneID) referentes a cada proteína na plataforma GENE do NCBI, juntamente com a sua descrição e nome oficial.

3.2 Rede de interação proteína-proteína e análise funcional

Interações físicas de alta confiança das proteínas humanas que interagem com NS5A foram recuperadas da plataforma STRING (STRING, 2021). Foram analisadas as proteínas encontradas no banco de dados da plataforma e selecionadas as opções de filtragem para interações físicas e pontuação mínima de interação igual a 0,700 para diminuir falsos

positivos em nossa análise. As interações físicas são recuperadas de banco de dados, mineração da literatura e experimentos, e a pontuação é obtida a partir da existência de interação nestes bancos de dados. Também foram coletados os dados de estatística da rede e enriquecimento funcional de vias da base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (KEGG, 2021) gerados pelo STRING. O enriquecimento funcional é estimado pelo Teste Exato de Fisher sendo o p-valor corrigido segundo o procedimento de Benjamini–Hochberg para obtenção do FDR (*False Discovery Rate*) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Posteriormente a rede de interação foi exportada para o Cytoscape 3.8.2 (CYTOSCAPE, 2021).

3.3 Análise topológica

Uma análise topológica da rede de interação de NS5A foi realizada através do *plugin* Cytoscape Network Analyzer do programa Cytoscape 3.8.2. Esta análise foi realizada sobre a rede de interação de proteínas humanas com as interações de NS5A. Foram coletados os dados de grau de interação (“Degree”) que refere-se à quantidade de conexões de um nó da rede, e Centralidade de intermediação (“Betweenness centrality”) que avalia o número de caminhos mínimos que passam por um nó, sendo caminhos mínimos definidos como a menor sequência de arestas que conectam dois vértices. Posteriormente foi feita uma tabela ranqueando as proteínas analisadas segundo a medida de Centralidade de intermediação.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Interações físicas da proteína NS5A do vírus da Hepatite C com proteínas humanas

Com o levantamento bibliográfico das interações físicas foram encontradas 221 proteínas humanas que interagem fisicamente com NS5A (Tabela 1). Recentemente, foram descritas um total de 132 proteínas que interagem fisicamente com NS5A por TRIPATHI et al., 2013, e 108 interações por HAN, et al., 2016. Nosso estudo descreve outras 81 interações. Foi mostrado que proteínas com domínios desdobrados atuam como centralizadores “hubs”, ao interagirem com várias outras proteínas (UVERSKY et al., 2008). Este grande número de interações físicas de NS5A com proteínas humanas pode ser explicado por esta proteína viral possuir dois domínios desdobrados, que possuem uma certa flexibilidade estrutural (BARTENSCHLAGER, 2013), o que permite a exposição de diferentes sítios de ligação que são reconhecidos por proteínas celulares distintas.

n	GENE ID	PROTEÍNAS	REFERÊNCIA
1	5610	PKR (EIF2AK2)	GALE et al., 1997
2	2885	GRB2	TAN et al., 1999
3	9218	hVAP-33 (VAP-A)	TU et al., 1999
4	983	Cdk1	ARIMA et al., 2001
5	7157	p53 (TP53)	LAN et al., 2002
6	335	ApoA1	SHI et al., 2002
7	6908	TBP	QADRI et al., 2002
8	7186	TRAF2	PARK et al., 2003
9	274	Amphiphysin II (BIN1)	ZECH et al., 2003
10	5291	PIK3R1	HE et al., 2002
11	581	Bax	CHUNG et al., 2003
12	7001	PTX1 (PRDX2)	GHOSH et al., 2003
13	4938	2,5OAS (OAS1)	TAGUCHI et al., 2004
14	3315	HSP27 (HSPB1)	CHOI et al., 2004
15	3055	Hck	MACDONALD et al., 2004
16	3932	Lck	MACDONALD et al., 2004
17	4067	Lyn	MACDONALD et al., 2004
18	2534	Fyn	MACDONALD et al., 2004
19	9217	VAP-B	HAMAMOTO et al., 2005
20	5894	Raf-1	BÜRCKTÜMMER et al., 2006
21	7046	TβR-I (TGFB1)	CHOI, HWANG., 2006
22	6772	STAT1	LAN et al., 2007
23	1452	CKI (CSNK1A1)	QUINTAVALLE et al., 2007
24	128637	TBC1D20	SKLAN et al., 2007
25	51495	hB-ind1 (PTPLAD1)	TAGUWA et al., 2008
26	6850	Syk	INUBUSHI et al., 2008
27	348	ApoE	JIANG, LUO, 2009
28	3303	HSP70 (HSPA1A)	GONZALEZ et al., 2009
29	10294	HSP40 (DNAJA2)	GONZALEZ et al., 2009
30	5007	OSBP	AMAKO et al., 2009
31	1499	β-catenina (CTNNB1)	MILWARD et al., 20010
32	5478	CypA (PPIA)	CHATTERJI et al., 2010
33	5297	PI4KIIIa (PI4Ka)	LIM, HWANG, 2011
34	5300	PIN1	LIM et al., 2011
35	91543	Viperin (RSAD2)	HELBIG., 2011
36	6927	HNF1α	MATSUI et al., 2012
37	47	ACLY	TRIPHAT et al., 2013

38	60	ACTB	TRIPHAT et al., 2013
39	79026	AHNAK	TRIPHAT et al., 2013
40	10598	AHSA1	TRIPHAT et al., 2013
41	207	AKT1	TRIPHAT et al., 2013
42	302	ANXA2	TRIPHAT et al., 2013
43	116985	ARAP1	TRIPHAT et al., 2013
44	27236	ARFIP1	TRIPHAT et al., 2013
45	23204	ARL6IP1	TRIPHAT et al., 2013
46	4508	ATP6 (MT-ATP6)	TRIPHAT et al., 2013
47	8312	AXIN1	TRIPHAT et al., 2013
48	222389	BEND7	TRIPHAT et al., 2013
49	89927	C16orf45	TRIPHAT et al., 2013
50	8618	CADPS	TRIPHAT et al., 2013
51	93664	CADPS2	TRIPHAT et al., 2013
52	79080	CCDC86	TRIPHAT et al., 2013
53	1021	CDK6	TRIPHAT et al., 2013
54	1060	CENPC1	TRIPHAT et al., 2013
55	153241	CEP120	TRIPHAT et al., 2013
56	11190	CEP250	TRIPHAT et al., 2013
57	9702	CEP57	TRIPHAT et al., 2013
58	80254	CEP63	TRIPHAT et al., 2013
59	1381	CRABP1	TRIPHAT et al., 2013
60	1445	CSK	TRIPHAT et al., 2013
61	1457	CSNK2A1	TRIPHAT et al., 2013
62	9093	DNAJA3	TRIPHAT et al., 2013
63	2202	EFEMP1	TRIPHAT et al., 2013
64	2051	EPHB6	TRIPHAT et al., 2013
65	54942	FAM206A	TRIPHAT et al., 2013
66	25827	FBXL2	TRIPHAT et al., 2013
67	2274	FHL2	TRIPHAT et al., 2013
68	23770	FKBP8	TRIPHAT et al., 2013
69	2316	FLNA	TRIPHAT et al., 2013
70	2495	FTH1	TRIPHAT et al., 2013
71	8880	FUBP1	TRIPHAT et al., 2013
72	11345	GABARAPL2	TRIPHAT et al., 2013
73	54826	GIN1	TRIPHAT et al., 2013
74	2801	GOLGA2	TRIPHAT et al., 2013
75	2874	GPS2	TRIPHAT et al., 2013

76	2931	GSK3A	TRIPHAT et al., 2013
77	2932	GSK3B	TRIPHAT et al., 2013
78	3320	HSP90AA1	TRIPHAT et al., 2013
79	3537	IGLC1	TRIPHAT et al., 2013
80	79711	IPO4	TRIPHAT et al., 2013
81	3843	IPO5	TRIPHAT et al., 2013
82	3683	ITGAL	TRIPHAT et al., 2013
83	6453	ITSN1	TRIPHAT et al., 2013
84	3716	JAK1	TRIPHAT et al., 2013
85	55679	LIMS2	TRIPHAT et al., 2013
86	9448	MAP4K4	TRIPHAT et al., 2013
87	6300	MAPK12	TRIPHAT et al., 2013
88	4155	MBP	TRIPHAT et al., 2013
89	4256	MGP	TRIPHAT et al., 2013
90	55233	MOB1A	TRIPHAT et al., 2013
91	4673	NAP1L1	TRIPHAT et al., 2013
92	4674	NAP1L2	TRIPHAT et al., 2013
93	10397	NDRG1	TRIPHAT et al., 2013
94	4778	NFE2	TRIPHAT et al., 2013
95	11188	NISCH	TRIPHAT et al., 2013
96	4924	NUCB1	TRIPHAT et al., 2013
97	64098	PARVG	TRIPHAT et al., 2013
98	5170	PDPK1	TRIPHAT et al., 2013
99	5291	PIK3CB	TRIPHAT et al., 2013
100	5307	PITX1	TRIPHAT et al., 2013
101	5347	PLK1	TRIPHAT et al., 2013
102	10654	PMVK	TRIPHAT et al., 2013
103	10848	PPP1R13L	TRIPHAT et al., 2013
104	5515	PPP2CA	TRIPHAT et al., 2013
105	5518	PPP2R1A	TRIPHAT et al., 2013
106	5698	PSMB9	TRIPHAT et al., 2013
107	5757	PTMA	TRIPHAT et al., 2013
108	6142	RPL18A	TRIPHAT et al., 2013
109	6167	RPL37	TRIPHAT et al., 2013
110	6238	RRBP1	TRIPHAT et al., 2013
111	6252	RTN1	TRIPHAT et al., 2013
112	10313	RTN3	TRIPHAT et al., 2013
113	6424	SFRP4	TRIPHAT et al., 2013

114	81858	SHARPIN	TRIPHAT et al., 2013
115	64754	SMYD3	TRIPHAT et al., 2013
116	8470	SORBS2	TRIPHAT et al., 2013
117	10174	SORBS3	TRIPHAT et al., 2013
118	6714	SRC	TRIPHAT et al., 2013
119	10847	SRCAP	TRIPHAT et al., 2013
120	6741	SSB	TRIPHAT et al., 2013
121	284297	SSC5D	TRIPHAT et al., 2013
122	25777	SUN2	TRIPHAT et al., 2013
123	4070	TACSTD2	TRIPHAT et al., 2013
124	6880	TAF9	TRIPHAT et al., 2013
125	7057	THBS1	TRIPHAT et al., 2013
126	374395	TMEM179B	TRIPHAT et al., 2013
127	7110	TMF1	TRIPHAT et al., 2013
128	7159	TP53BP2	TRIPHAT et al., 2013
129	11078	TRIOBP	TRIPHAT et al., 2013
130	51061	TXNDC11	TRIPHAT et al., 2013
131	53347	UBASH3A	TRIPHAT et al., 2013
132	10869	USP19	TRIPHAT et al., 2013
133	10493	VAT1	TRIPHAT et al., 2013
134	55737	VPS35	TRIPHAT et al., 2013
135	6293	VPS52	TRIPHAT et al., 2013
136	140612	ZFP28	TRIPHAT et al., 2013
137	9726	ZNF646	TRIPHAT et al., 2013
138	8694	DGAT1	CAMUS et al., 2013
139	22931	RAB18	SALLOUM et al., 2013
140	4296	MLK3 (MAP3K11)	AMAKO et al., 2013
141	10226	TIP47 (PLIN3)	PLOEN et al., 2013
142	3099	HK2	RAMIÈRE et al, 2014
143	55738	ARFGAP1	LI et al., 2014
144	192111	PGAM5	MEISTERMANN et al., 2014
145	64857	PKHG2 (PLEKHG2)	MEISTERMANN et al., 2014
146	23291	FBW1B	MEISTERMANN et al., 2014
147	9113	LATS1	MEISTERMANN et al., 2014
148	26524	LATS2	MEISTERMANN et al., 2014
149	3309	GRP78 (HSPA5)	JIANG et al., 2014
150	64746	ACBD3	HONG et al., 2014
151	1191	ApoJ (Clusterin)	LIN et al., 2014

152	1977	EIF4E	PANDA et al., 2014
153	3313	HSPA9	GERMAIN et al., 2014
154	55704	Girdin (CCDC88A)	GERMAIN et al., 2014
155	54583	EGLN1	GERMAIN et al., 2014
156	10075	HUWE1	GERMAIN et al., 2014
157	10916	MAGED2	GERMAIN et al., 2014
158	2773	GNAI3	GERMAIN et al., 2014
159	11218	DDX20	GERMAIN et al., 2014
160	440193	CCDC88C	GERMAIN et al., 2014
161	51365	PLA1A	GUO et al., 2015
162	56957	OTUD7B	SIANIPAR et al., 2015
163	1654	DDX3	WANG et al., 2015
164	4904	YB-1	WANG et al., 2015
165	8468	FKBP6	KASAI et al., 2015
166	6717	SRI	TRAN et al., 2015
167	23607	CMS (CD2AP)	IGLOI et al., 2015
168	10346	TRIM22	YANG et al., 2016
169	51280	GP73 (GOLM1)	ZHANG et al., 2016
170	27141	CIDEB	CAI et al., 2016
171	51246	SCOTIN (SHISA5)	KIM et al., 2016
172	5777	SHP1 (PTPN6)	CONTI et al., 2016
173	9830	TRIM14	WANG et al., 2016
174	84961	FBXL20	HAN et al., 2016
175	2549	GAB1	HAN et al., 2016
176	3543	IGLL1	HAN et al., 2016
177	8717	TRADD	HAN et al., 2016
178	4615	MYD88	HAN et al., 2016
179	5524	PPP2R4	HAN et al., 2016
180	1017	CDK2	HAN et al., 2016
181	338	APOB	HAN et al., 2016
182	27063	ANKRD1	THAN et al., 2016
183	10139	ARFRP1	LIM et al., 2016
184	1119	hCK α (CHKA)	WONG, CHEN et al., 2016
185	79626	TIPE2 (TNFAIP8L2)	WANG et al., 2016
186	27183	VPS4A	BAROUCH-BENTOV et al., 2016
187	9146	HRS (HGS)	BAROUCH-BENTOV et al., 2016
188	3429	ISG12a (IFI27)	XUE et al., 2016
189	5036	EBP1 (PA2G4)	MISHRA et al., 2017

190	27242	DR6 (TNFRSF21)	LUONG et al., 2017
191	55611	OTUB1	VLAICU et al., 2017
192	3093	UBE2K	VLAICU et al., 2017
193	23011	Rab21	VLAICU et al., 2017
194	25781	RAB3GAP2	VLAICU et al., 2017
195	123	PLIN2	VLAICU et al., 2017
196	255738	PCSK9	LI, LIU et al., 2018
197	4600	MxB (Mx2)	Yi et al., 2018
198	10635	RAD51AP1	NGUYEN et al., 2019
199	10128	LRPPRC	REFOLO et al., 2019
200	92597	MOB1B	REFOLO et al., 2019
201	9588	Peroxiredoxin 1 (PRDX6)	REFOLO et al., 2019
202	7429	Villin-1 (VIL1)	REFOLO et al., 2019
203	1627	Drebin-1 (DBN1)	REFOLO et al., 2019
204	4676	NAP1L4	REFOLO et al., 2019
205	1650	OST48 (DDOST)	REFOLO et al., 2019
206	6184	Ribophorin I (RPN1)	REFOLO et al., 2019
207	7184	HSP90B1	REFOLO et al., 2019
208	23344	FAM62A (ESYT1)	REFOLO et al., 2019
209	2222	Squalene synthase (FDFT1)	REFOLO et al., 2019
210	4430	Miosina - Ib (MYO1B)	REFOLO et al., 2019
211	2597	GAPDH	REFOLO et al., 2019
212	10399	Rack1	LEE et al., 2019
213	570	Baat	LEE et al., 2019
214	1508	CTSB	LEE et al., 2019
215	79763	ISOC2	LEE et al., 2019
216	27338	UBE2S	PHAM et al., 2019
217	282616	IL28A (IFNL2)	MA et al., 2020
218	11252	PACSIN2	NGUYEN et al., 2020a
219	2017	CTTN	NGUYEN et al., 2020b
220	3927	LASP-1	CHOI et al., 2020
221	10768	AHCYL1	LIN et al., 2021

Tabela 1– Interações da proteína NS5A do vírus da hepatite C com proteínas do hospedeiro humano descritas na literatura.

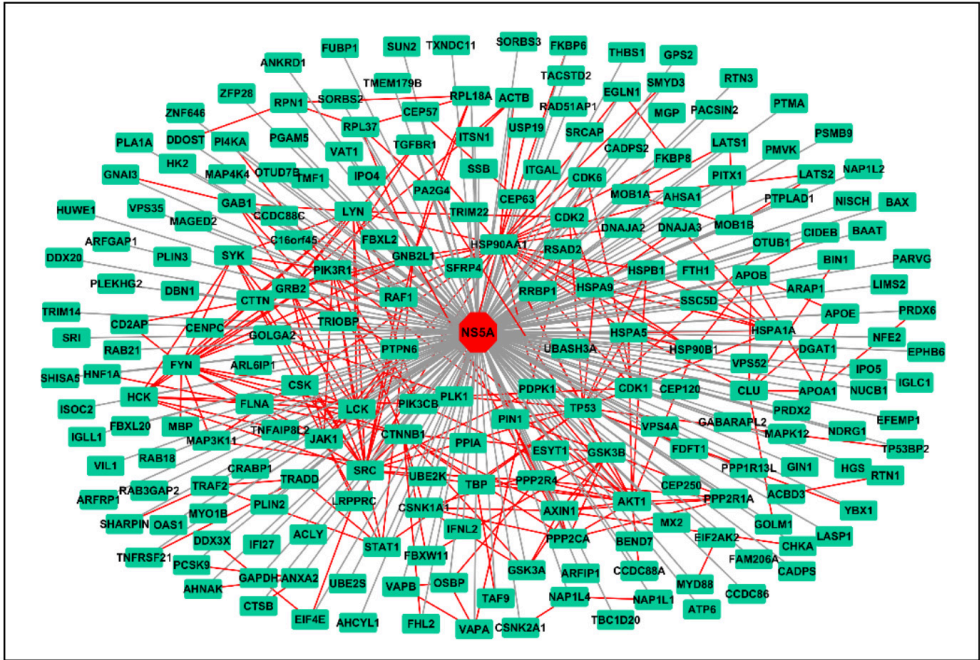
4.2 Redes de interação e análise topológica

Foram recuperadas 229 interações físicas de alta confiança entre as 220 proteínas do hospedeiro (99,55% das proteínas da nossa lista) pela plataforma STRING. Com a análise da estatística de rede gerada pela plataforma observamos que as proteínas que interagem com NS5A formam uma rede de interações físicas com 220 nós e 229 arestas que possui uma quantidade significativa de interações ($p < 1.0 \text{ e-}16$). Este dado indica que as proteínas estão conectadas, pelo menos parcialmente, como um grupo biológico. Também obtivemos outros dados da análise de rede de interação das proteínas humanas feita pela plataforma STRING que são mostrados na Tabela 2: a média de conexões das proteínas e a média do coeficiente de agrupamento local de cada proteína.

NOME	VALOR
Número de nós	220
Número de arestas	229
Média de conexões das proteínas	2,08
Média do coeficiente de agrupamento local de cada proteína	0,355
Número esperado de arestas	101
p-valor do enriquecimento de PPI	$< 1.0 \text{ e-}16$

Tabela 2 – Dados da análise da rede de interação da plataforma STRING.

Após recuperarmos as PPI das proteínas encontradas em nosso levantamento bibliográfico, construímos uma rede de PPI através do programa Cytoscape 3.8.2 com interações entre NS5A e proteínas do hospedeiro mais as interações físicas conhecidas entre proteínas humanas obtidas da plataforma STRING, contendo 222 nós e 450 arestas. Os 222 nós são as 221 proteínas do hospedeiro mais a proteína viral NS5A. As 450 arestas são as interações entre proteínas humanas mais as interações de NS5A com as proteínas do hospedeiro humano (Figura 1). Redes de PPIs vírus-hospedeiro construídas com PPIs humanas são representações gráficas que nos auxiliam na compreensão de mecanismos moleculares pela qual um vírus perturba as vias celulares do hospedeiro. Além disso, auxiliam no entendimento do papel das proteínas humanas na patogênese viral, como foi realizado por estudos de rede de interação da proteína NS5A (TRIPATHI et al., 2013) e estudos que englobavam mais proteínas do HCV (CHASSEY et al., 2008; GERMAIN, et al., 2014; HAN, et al., 2016).



Nós (em verde): proteínas humanas que interagem com NS5A. Nós (em vermelho): proteína NS5A do HCV. Arestas (em cinza): interações NS5A-hospedeiro. Arestas (em vermelho): interações conhecidas entre proteínas humanas.

Figura 1 – Rede de interação da proteína NS5A do vírus da hepatite C com proteínas humanas.

Fonte – O autor (2021).

Para identificar as principais proteínas na rede de interação de NS5A realizamos uma análise topológica que permitiu ranquear as proteínas segundo a sua medida de *betweenness*, e assim, definir gargalos em nossa rede de interação (Tabela 3). Alguns estudos demonstraram que o HCV interage preferencialmente com proteínas humanas com alto valor de *betweenness*, e estas proteínas podem atuar conectando os módulos celulares, sendo essenciais para a infecção (CHASSEY et al., 2008; GERMAIN, et al., 2014). No estudo realizado por TRIPATHI et al. (2013), foi descrito que proteínas com alto valor de *betweenness* possuem um papel crucial na infecção e patogênese do HCV, já que estas proteínas são centrais para uma rede de interação por possuírem uma grande quantidade de caminhos mínimos passando por elas. Assim, são mais proeminentes em controlar o fluxo da informação de uma rede. Neste mesmo estudo foram identificados 39 gargalos proteicos em uma rede de interação estendida que compreendia além de interações entre proteínas virais e do hospedeiro e as suas interações, várias outras proteínas do interatoma de proteínas humanas (HPI) que não interagem com NS5A. Vários destes gargalos foram igualmente descritos em nosso estudo, dentre eles CTNNB1 e PIK3R1, que são importantes proteínas que contribuem para o desenvolvimento de CHC.

Em nosso estudo foram encontrados 22 gargalos, 16 deles foram igualmente encontrados por TRIPATHI et al. (2013), enquanto 6 deles são novos, as proteínas: GNB2L1, CLU, PPP2R4, HSPA1A, APOB e HSPA5. Assim, encontramos 22 importantes proteínas proeminentes de serem centrais para a interação de NS5A com o hospedeiro humano.

NOME	DEGREE	BETWEENNESS
HSP90AA1	31	7,0965 E-3
TP53	18	2,1842 E-3
AKT1	18	1,9275 E-3
SRC	20	1,7002 E-3
FYN	17	1,1922E-3
CTNNB1	13	9,7627E-4
PIK3R1	14	7,2203E-4
GRB2	14	5,2793E-4
GSK3B	12	4,9842E-4
LYN	13	4,7790E-4
GNB2L1	10	4,3192E-4
AXIN1	11	3,7981E-4
JAK1	10	2,7839E-4
CLU	7	2,3995E-4
PPP2R4	8	2,2761E-4
STAT1	7	2,1024E-4
HSPA1A	8	1,7071E-4
LCK	12	1,6834E-4
APOB	6	1,3711E-4
HSPA5	7	1,3368E-4
PPP2CA	9	1,2477E-4
SYK	11	1,1859E-4

Tabela 3 – Proteínas da rede de interação da proteína NS5A elencadas do maior para o menor valor de *betweenness*.

4.3 Análise de enriquecimento funcional

Com a análise de enriquecimento funcional da rede de interação de NS5A realizada na plataforma STRING, foi obtido um total de 104 vias do KEGG significativamente enriquecidas com $FDR < 0,01$ (dados não mostrados). A análise de enriquecimento funcional de rede de interação para vias do KEGG é uma análise específica de vias celulares que vem sendo realizada por estudos de redes de interação para identificar como o HCV, através da proteína NS5A ou de outras proteínas, consegue perturbar as vias celulares humanas.

Em uma análise de rede de interação contendo todas as proteínas do HCV realizada por HAN et al. (2016) foi descoberto que a proteína NS5A promove a proliferação e metástase de células de CHC por meio da ativação da via AKT/GSK3B/ β -catenina. Esta mesma via de sinalização, descrita no KEGG como via de sinalização Wnt, está enriquecida em nosso estudo (FDR = 0,0096), assim como outras vias relacionadas com o câncer como as vias de sinalização: JAK/STAT3, PI3K-AKT, MAPK, p53, Fc epsilon RI. No estudo realizado por TRIPATHI et al. (2013) foram encontradas 79 vias enriquecidas (FDR <0,01) e identificados gargalos nas proteínas observadas destas vias. Nosso estudo encontrou 104 vias enriquecidas distribuídas em 21 diferentes categorias do KEGG. Isso é consistente com o grande número de interações da proteína NS5A e demonstra a sua importância na perturbação das vias celulares do hospedeiro, o que pode causar diversas comorbidades associadas a hepatite C, como o CHC e distúrbios metabólicos.

Para identificar as vias do KEGG enriquecidas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de CHC, que é uma comorbidade associada a pacientes que desenvolvem hepatite C crônica, foram selecionadas as categorias do KEGG: “Transdução de sinal”, “Câncer: visão geral”, e “Câncer: tipo específico” que apresentaram várias vias significativamente enriquecidas. Identificamos os gargalos da rede de interação de NS5A presentes em cada via e estas estão mostradas em vermelho na coluna de proteínas observadas da Tabela 4.

CATEGORIA	VIAS DO KEGG	PROTEÍNAS OBSERVADAS	NÚMERO DE GARGALOS
3.2 Transdução de sinal	Via de sinalização de esfingolipídeos	MAPK12, TRAF2, RAF1, TP53 , PIK3CB, BAX, PPP2R1A, TRADD, PDPK1, FYN , GNAI3, PPP2CA , PIK3R1 , AKT1	5
	Via de sinalização de Hippo	AXIN1 , FBXW11, PPP2R1A, GSK3B , TP53 , CTNNB1 , ACTB, TGFBR1, LATS2, MOB1A, MOB1B, PPP2CA , LATS1	5
	Via de sinalização FoxO	GABARAPL2, MAPK12, RAF1, CDK2, PIK3CB, PLK1, PDPK1, TGFBR1, GRB2 , PIK3R1 , AKT1	3
	Via de sinalização PI3K-Akt	RAF1, THBS1, CDK6, CDK2, TP53 , PIK3CB, HSP90B1, PPP2R1A, GSK3B , HSP90AA1 , JAK1 , PDPK1, SYK , GRB2 , PPP2CA , PIK3R1 , AKT1	9
	Via de sinalização ErbB	RAF1, GAB1, PIK3CB, GSK3B , SRC , GRB2 , PIK3R1 , AKT1	5
	Via de sinalização rap1	MAPK12, RAF1, THBS1, PIK3CB, CTNNB1 , ITGAL, ACTB, GNAI3, SRC , PIK3R1 , AKT1	4
	Via de sinalização JAK-STAT	RAF1, PIK3CB, IFNL2, JAK1 , STAT1 , GRB2 , PTPN6, PIK3R1 , AKT1	5
	Via de sinalização MAPK	MAPK12, TRAF2, HSPB1, RAF1, TP53 , MAP3K11, TRADD, FLNA, TGFBR1, GRB2 , MYD88, AKT1	3
	Via de sinalização NF-kappa B	CSNK2A1, TRAF2, LCK , TRADD, SYK , MYD88, LYN	3

3.2 Transdução de sinal	Via de sinalização da Fosfolipase D	RAF1, GAB1, PIK3CB, FYN, SYK, GRB2, PIK3R1, AKT1	5
	Via de sinalização de Hippo - várias espécies	LATS2, MOB1A, MOB1B, LATS1	0
	Via de sinalização TNF	MAPK12, TRAF2, PIK3CB, TRADD, PIK3R1, PGAM5, AKT1	2
	Via de sinalização HIF-1	GAPDH, PIK3CB, HK2, EGLN1, PIK3R1, AKT1	2
	Via de sinalização mTOR	RAF1, PIK3CB, GSK3B, PDPK1, GRB2, PIK3R1, AKT1	4
Via de sinalização Wnt	CSNK2A1, AXIN1, FBXW11, TP53, GSK3B, CTNNB1, SFRP4	4	
6.1 Câncer: visão geral	Carcinogênese viral	EIF2AK2, TRAF2, DNAJA3, CDK6, CDK2, TP53, PIK3CB, BAX, TRADD, JAK1, SRC, SYK, TBP, GRB2, CDK1, DDX3X, PIK3R1, LYN	7
	Expressão PD-L1 e Via de <i>checkpoint</i> PD-1 no câncer	MAPK12, CSNK2A1, RAF1, PIK3CB, LCK, JAK1, STAT1, PTPN6, MYD88, PIK3R1, AKT1	5
	Proteoglicanos no câncer	MAPK12, RAF1, THBS1, GAB1, TP53, PIK3CB, PDPK1, CTNNB1, ACTB, FLNA, SRC, GRB2, PTPN6, PIK3R1, AKT1	6
	Vias do câncer	TRAF2, RAF1, AXIN1, CDK6, CDK2, TP53, PIK3CB, BAX, HSP90B1, GSK3B, HSP90AA1, JAK1, CTNNB1, STAT1, EGLN1, GNAI3, TGFBR1, GRB2, PIK3R1, AKT1	10
	Metabolismo de colina no câncer	RAF1, CHKA, PIK3CB, PDPK1, GRB2, PIK3R1, AKT1	4
Metabolismo central de carbono no câncer	RAF1, TP53, PIK3CB, HK2, PIK3R1, AKT1	3	
6.2 Câncer: tipo específico	Câncer endometrial	RAF1, AXIN1, TP53, PIK3CB, BAX, GSK3B, PDPK1, CTNNB1, GRB2, PIK3R1, AKT1	7
	Câncer de próstata	RAF1, CDK2, TP53, PIK3CB, HSP90B1, GSK3B, HSP90AA1, PDPK1, CTNNB1, GRB2, PIK3R1, AKT1	7
	Câncer colorretal	RAF1, AXIN1, TP53, PIK3CB, BAX, GSK3B, CTNNB1, TGFBR1, GRB2, PIK3R1, AKT1	7
	Carcinoma hepatocelular	RAF1, AXIN1, GAB1, CDK6, TP53, PIK3CB, BAX, GSK3B, CTNNB1, ACTB, TGFBR1, GRB2, PIK3R1, AKT1	7
	Câncer gástrico	RAF1, AXIN1, GAB1, CDK2, TP53, PIK3CB, BAX, GSK3B, CTNNB1, TGFBR1, GRB2, PIK3R1, AKT1	7
	Câncer de pâncreas	RAF1, CDK6, TP53, PIK3CB, BAX, JAK1, STAT1, TGFBR1, PIK3R1, AKT1	5
	Câncer de pulmão de células não pequenas	RAF1, CDK6, TP53, PIK3CB, BAX, PDPK1, GRB2, PIK3R1, AKT1	4
Leucemia mielóide crônica	RAF1, CDK6, TP53, PIK3CB, BAX, TGFBR1, GRB2, PIK3R1, AKT1	4	

6.2 Câncer: tipo específico	Câncer de mama	RAF1, AXIN1 , CDK6, TP53 , PIK3CB, BAX, GSK3B , CTNNB1 , GRB2 , PIK3R1 , AKT1	7
	Glioma	RAF1, CDK6, TP53 , PIK3CB, BAX, GRB2 , PIK3R1 , AKT1	4
	Via de sinalização VEGF	MAPK12, HSPB1, RAF1, PIK3CB, SRC , PIK3R1 , AKT1	3
	Câncer de pulmão de células pequenas	TRAF2, CDK6, CDK2, TP53 , PIK3CB, BAX, PIK3R1 , AKT1	3
	Carcinoma de células renais	RAF1, GAB1, PIK3CB, EGLN1, GRB2 , PIK3R1 , AKT1	3
	Melanoma	RAF1, CDK6, TP53 , PIK3CB, BAX, PIK3R1 , AKT1	3
	Carcinoma basal celular	AXIN1 , TP53 , BAX, GSK3B , CTNNB1	4
	Leucemia mielóide aguda	RAF1, PIK3CB, GRB2 , PIK3R1 , AKT1	3
	Câncer de bexiga	RAF1, THBS1, TP53 , SRC	2

Tabela 4 – Gargalos da rede de interação de NS5A presentes nas vias do KEGG.

Fonte – O autor (2021).

Através da interação com proteínas importantes para vias de transdução de sinal, incluindo os gargalos da rede de interação, que são proteínas centrais para o HCV, a proteína NS5A pode interferir em variados processos celulares gerando uma maior sobrevivência e proliferação celular, o que contribui para o desenvolvimento do CHC. Estudos anteriores já apontaram a influência da proteína NS5A em várias vias de transdução de sinal que medeiam funções celulares importantes no processo de carcinogênese que foram enriquecidas em suas análises, como as vias de sinalização JAK/STAT3, MAPK e Wnt por HAN et al. (2016), e as vias de sinalização MAPK e PI3K-Akt por TRIPATHI et al. (2013), que foram igualmente enriquecidas em nosso estudo.

O enriquecimento funcional das vias celulares gerais e específicas para diferentes tipos de câncer, bem como a presença de gargalos da rede de interação de NS5A, demonstram que a proteína NS5A interage e possui alvos proteicos presentes em importantes vias celulares já descritas por participarem do processo de carcinogênese induzida por vírus e outras vias gerais da carcinogênese, como a via do CHC. E isto está de acordo com o que foi citado por TRIPATHI et al. (2013) que alguns vírus interagem preferencialmente com fatores do hospedeiro relacionados ao câncer. Além disso, quando analisamos as proteínas presentes nestas vias, observamos que várias delas são gargalos para a rede de interação de NS5A. Isto é condizente com o fato de que 50% dos gargalos da rede de interação de NS5A (HSP90AA1, TP53, AKT1, SRC, CTNNB1, PIK3R1, LYN, AXIN1, JAK1, LCK e SYK) participam da lista de genes relacionados ao câncer descritos na plataforma COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*).

Ao analisarmos individualmente a via do CHC do KEGG observamos 14 proteínas que interagem com NS5A, sendo Axin1, TP53, GSK3B, CTNNB1, GRB2, PIK3R1 e AKT1, gargalos para a rede de interação de NS5A. As proteínas PI3K (PIK3R1 é uma subunidade de PI3K) e AKT1 atuam na regulação da via de sinalização PI3K-AKT, e as proteínas Axin1, CTNNB1 (β -catenina) e GSK3B são importantes para a via de sinalização Wnt. Já foi demonstrado que a proteína NS5A pode interagir com estas vias gerando proliferação celular e inibição da apoptose, o que contribui para o CHC (IRSHAD, et al. 2017). Além disso, estas vias atuam na regulação do processo de fibrogênese hepática, que é um dos processos patológicos gerados com a infecção pelo HCV associados com o desenvolvimento de CHC (IRSHAD, et al. 2017).

A proteína p53 (TP53) é importante para a manutenção da integridade genômica, por ser um indutor de apoptose mediante dano ao DNA. Foi descrito por LAN, et al. (2002) que a proteína NS5A pode interagir com p53 inibindo a sua atividade de transativação transcricional, o que pode contribuir para o desenvolvimento de CHC na infecção crônica pelo HCV.

Um estudo recente demonstrou que a regulação da proteína GRB2 pode aumentar o crescimento e metástase do CHC (LV, et al. 2020), sendo já descrito anteriormente que esta é uma importante proteína para a proliferação celular que contribui para a tumorigênese e progressão do câncer (GIUBELLINO, et al 2008). Desta forma, a interação de NS5A com GRB2 pode ser uma importante via pela qual o HCV contribui para o desenvolvimento do CHC que ainda não é compreendida.

Sendo assim, estudar esta rede de interação pode fornecer informações importantes da história natural da infecção pelo HCV e sua evolução para complicações que aumentam sua morbidade/mortalidade.

5 | CONCLUSÃO

A proteína NS5A do HCV possui uma grande quantidade de interações com proteínas humanas, e isto pode ser explicado por esta proteína viral possuir dois domínios desdobrados, que possuem uma certa flexibilidade estrutural, o que permite o reconhecimento por diferentes proteínas celulares. Foram encontrados 22 gargalos para rede de interação de NS5A. Destes, as proteínas: GNB2L1, CLU, PPP2R4, HSPA1A, APOB e HSPA5 ainda não foram descritas na literatura como gargalos. Através da interação com estas proteínas centrais para a infecção viral, o HCV perturba várias vias celulares, incluindo vias relacionadas ao CHC. Ao analisar os 7 gargalos presentes na via do CHC observamos importantes proteínas já descritas por estarem associadas à hepatocarcinogênese induzida pelo HCV, as proteínas: AXIN1, TP53, GSK3B, CTNNB1, PIK3R1 e AKT1. Embora também contribua para a hepatocarcinogênese, ainda não foi descrito algum mecanismo pela qual a proteína NS5A possa induzir o CHC através da sua interação com a proteína GRB2.

Desta forma, a interação de NS5A com GRB2 pode ser um importante via pela qual o HCV contribui para o desenvolvimento do CHC que ainda não é compreendida.

REFERÊNCIAS

1. AMAKO, Y. et al. **Hepatitis C Virus NS5A Inhibits Mixed Lineage Kinase 3 to Block Apoptosis.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 34, p. 24753-24763, ago. 2013. doi:10.1074/jbc.M113.491985.
2. AMAKO, Y. et al. **Role of Oxysterol Binding Protein in Hepatitis C Virus infection.** *Journal of Virology*, v. 83, n. 18, p. 9237-9246, set. 2009. doi:10.1128/JVI.00958-09.
3. ARIMA, N. et al. **Modulation of Cell Growth by the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS5A.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 16, p.12675-12684, abr. 2001. doi:10.1074/jbc.m008329200.
4. BAROUCH-BENTOV, R. et al. **Hepatitis C Virus Proteins Interact with the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) Machinery via Ubiquitination To Facilitate Viral Envelopment.** *MBio*, v. 7, n. 6, nov. 2016. doi:10.1128/mbio.01456-16.
5. BARTENSCHLAGER, R. et al. **The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 7, p. 482-496, jul. 2013. doi:10.1038/nrmicro3046.
6. BENJAMINI, Y. HOCHBERG, Y. 1995. **Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.** *Journal of the Royal Statistical Society B*, v. 57, p. 289-300, nov. 1995.
7. BÜRCKSTÜMMER, T. et al. **Raf-1 kinase associates with Hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication.** *FEBS Letters*, v. 580, n. 2, p. 575-580, jan. 2006. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.071.
8. CAI, H; et al. **Cell-death-inducing DFFA-like Effector B Contributes to the Assembly of Hepatitis C Virus (HCV) Particles and Interacts with HCV NS5A.** *Scientific Reports*, v. 6, n. 27778, jun. 2016. doi:10.1038/srep27778.
9. CAMUS, G. et al. **Diacylglycerol Acyltransferase-1 Localizes Hepatitis C Virus NS5A Protein to Lipid Droplets and Enhances NS5A Interaction with the Viral Capsid Core.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 14, p. 9915-9923, abr. 2013. doi:10.1074/jbc.M112.434910.
10. CHASSEY, B. **Hepatitis C virus infection protein network.** *Molecular Systems Biology*, Lyon, v. 4, nov. 2008. doi:10.1038/msb.2008.66.
11. CHATTERJI, U; et al. **HCV resistance to cyclosporin A does not correlate with a resistance of the NS5A–cyclophilin A interaction to cyclophilin inhibitors,** *Journal of Hepatology*. v. 53, n. 1, p. 50-56, jul. 2010. doi:10.1016/j.jhep.2010.01.041.
12. CHOI, J. W. et al. **Nonstructural NS5A Protein Regulates LIM and SH3 Domain Protein 1 to Promote Hepatitis C Virus Propagation.** *Molecules and Cells*. v. 43, n. 5, p. 469-478, maio. 2020. doi:10.14348/molcells.2020.0018.
13. CHOI, S-H; HWANG, S. B. **Modulation of the Transforming Growth Factor- β Signal Transduction Pathway by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 11, p. 7468-7478, jan. 2006. doi:10.1074/jbc.m512438200.

14. CHOI, Y-W. et al. **Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 318, n. 2, p. 514-519, maio. 2004. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.052
15. CHUNG, Y-L. et al. **Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma.** *Int. J. Cancer*, v. 107, n.1, p. 65-73. out. 2003. doi:10.1002/ijc.11303.
16. CONTI, B. et al. **Small heterodimer partner 1 directly interacts with NS5A viral protein and has a key role in HCV related liver cell transformation.** *ONCOTARGET*, v. 7, n. 51, p. 84575-84586, dez. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.12144.
17. COSMIC. **Cancer Gene Census (CGC).** Disponível em: <<https://cancer.sanger.ac.uk/census>>. Acesso em: 03 de janeiro de 2022.
18. CYTOSCAPE 3.8.2. **Network Data Integration, Analysis, and Visualization in a Box.** Disponível em: <<https://cytoscape.org/download.html>> Acesso em: 15 de outubro de 2021.
19. GALE JR, M. J. et al. **Evidence That Hepatitis C Virus Resistance to Interferon Is Mediated through Repression of the PKR Protein Kinase by the Nonstructural 5A Protein.** *VIROLOGY*, v. 230 n. 2, p. 217-227, Jan. 1997.
20. GENEBA. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/hepatitis>>. Acesso em: 02 nov. 2022.
21. GERMAIN, M. A. et al. **Elucidating Novel Hepatitis C Virus-Host Interactions Using Combined Mass Spectrometry and Functional Genomics Approaches.** *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 13. n. 1, p.184-203, jan. 2014 doi:10.1074/mcp.M113.030155.
22. GHOSH, A. K. et al. **Modulation of interferon expression by hepatitis c virus ns5a protein and human homeodomain protein ptx1.** *Virology*, v. 306, n. 1, p. 51-59, fev. 2003 doi:10.1016/s0042-6822(02)00029-6.
23. GIUBELLINO, A. et al. **Grb2 Signaling in Cell Motility and Cancer.** *Expert Opin Ther Targets*. v. 12, n. 8, p. 1021-1033, ago. 2008. doi:10.1517/14728222.12.8.1021
24. GONZALEZ, O. et al. **The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production.** *HEPATOLOGY*, v. 50, n. 6, p. 1756-1764, dez. 2009. doi:10.1002/hep.23232.
25. GUO, M; et al. **Phosphatidylserine-Specific Phospholipase A1 Involved in Hepatitis C Virus Assembly through NS2 Complex Formation.** *Journal of Virology*, v. 89. N. 4, p. 2367–2377. fev. 2015. doi:10.1128/JVI.02982-14.
26. HAMAMOTO, I. et al. **Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B.** *Journal of Virology*, v. 79, n. 21, p. 13473-13482, nov. 2005. doi:10.1128/JVI.79.21.13473-13482.2005.
27. HAN, Y. et al. **Hepatitis C Virus Protein Interaction Network Analysis Based on Hepatocellular Carcinoma.** *PLOS ONE*, v. 11, n. 4, abr. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0153882.
28. He, Y. et al. **Subversion of Cell Signaling Pathways by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein via Interaction with Grb2 and P85 Phosphatidylinositol 3-Kinase.** *Journal of Virology*, v. 76, n. 18, p. 9207-9217, set. 2002. doi:10.1128/JVI.76.18.9207-9217.2002.

29. HELBIG, K. J. et al. **The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A.** *Hepatology*, v. 54, n. 5, p. 1506-1517, nov. 2011. doi:10.1002/hep.24542.
30. HONG, Z; et al. **Hepatitis C virus NS5A competes with PI4KB for binding to ACBD3 in a genotype-dependent manner.** *Antiviral Research*, v. 107, p. 50-55, Jul. 2014. doi:10.1016/j.antiviral.2014.04.012.
31. IGLOI, Z. et al. **The hepatitis C virus NS5A protein blocks EGFR degradation via a proline motif dependent interaction.** *Journal of General Virology*, v. 96, n. 8, p. 2133-2144, ago. 2015. doi:10.1099/vir.0.000145
32. INUBUSHI, S. et al. **Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein tyrosine kinase Syk.** *Journal of General Virology*, v. 89, n. 5, p. 1231-1242. Maio, 2008. doi:10.1099/vir.0.83510-0.
33. IRSHAD, M. **Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection.** *World J Hepatol.* V. 9, n. 36, p. 1305-1314, dez, 2017. doi:10.4254/wjh.v9.i36.1305.
34. JIANG, J.; LUO, G. **Apolipoprotein E but Not B Is Required for the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles.** *Journal of Virology*, v. 83, n. 24, p.12680-12691, dez. 2009. doi:10.1128/JVI.01476-09.
35. JIANG, X; et al. **Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Inhibits Thapsigargin-Induced Apoptosis.** *PLOS ONE*, v. 9, n. 11, nov. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0113499.
36. KASAI, H. et al. **Involvement of FKBP6 in hepatitis C virus replication.** *Scientific Reports*, v. 5, n. 16699. 2015. doi:10.1038/srep16699.
37. KIM, N; et al. **Interferon-inducible protein SCOTIN interferes with HCV replication through the autolysosomal degradation of NS5A.** *Nature Communications*, v. 7, n. 10631, fev. 2016. doi:10.1038/ncomms10631.
38. Lan, K. H. et al. **HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis.** *Nature*, p. 21, n. 31, p. 4801-4811, abr. 2022. doi:10.1038/sj.onc.1205589.
39. LAN, K. H. et al. **HCV NS5A inhibits interferon- α signaling through suppression of STAT1 phosphorylation in hepatocyte-derived cell lines.** *Journal of Hepatology*, v. 46, n. 5, p. 759-767, maio, 2007. doi:10.1016/j.jhep.2006.11.013.
40. LAN, K-H. et al. **HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis.** *Oncogene*. V. 21, p. 4801-4811, jul, 2002.
41. LEE, J. S. et al. **RACK1 mediates rewiring of intracellular networks induced by hepatitis C virus infection.** *PLOS Pathogens*, v. 15, n. 9, set, 2019. doi:10.1371/journal.ppat.1008021
42. Li, H. C. et al. **Hepatitis C Viral Replication Complex.** *Viruses*, v. 13, n. 3, p. 520, Mar. 2022. doi:10.3390/v13030520.
43. LI, H. et al. **Hepatitis C Virus NS5A Hijacks ARFGAP1 To Maintain a Phosphatidylinositol 4-Phosphate-Enriched Microenvironment.** *Journal of Virology*, v. 88, n. 11, p. 5956-5966, jun. 2014. doi:10.1128/JVI.03738-13.
44. LI, Z; LIU, Q. **Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibits hepatitis C virus replication through interacting with NS5A.** *Journal of General Virology*, v. 99, n. 1, p. 44-61, jan. 2018. doi:10.1099/jgv.0.000987

45. LIM, Y. S. et al. **ADP-ribosylation Factor-related Protein 1 Interacts with NS5A and Regulates Hepatitis C Virus Propagation.** *Scientific Reports*, v. 6, n. 31211, ago, 2016. doi:10.1038/srep31211.
46. LIM, Y.S. et al. **Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 Is a Cellular Factor Required for Hepatitis C Virus Propagation.** *Journal of Virology*, v. 85, n. 17, p. 8777–8788, set. 2011. doi:10.1128/JVI.02533-10.
47. LIM, Y.S.; HWANG, S. B. **Hepatitis C Virus NS5A Protein Interacts with Phosphatidylinositol 4-Kinase Type III and Regulates Viral Propagation.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 13, p. 11290-11298, abr. 2011. doi:10.1074/jbc.M110.194472.
48. LIN, C. C. et al. **Apolipoprotein J, a glucose-upregulated molecular chaperone, stabilizes core and NS5A to promote infectious hepatitis C virus virion production.** *Journal of Hepatology*, v. 61, n. 5, p. 984-993, nov. 2014. doi:10.1016/j.jhep.2014.06.026
49. LIN, Y. S. et al. **Adenosylhomocysteinase like 1 interacts with nonstructural 5A and regulates hepatitis C virus propagation.** *Journal of Microbiology*, v. 59, n. 1. p. 101-109, jan. 2021. doi: 10.1007/s12275-021-0470-8.
50. LUONG, T. T. D. et al. **Hepatitis C Virus Exploits Death Receptor 6-mediated Signaling Pathway to Facilitate Viral Propagation.** *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, jul. 2017. doi:10.1038/s41598-017-06740-9.
51. LV, J. et al. **Deubiquitinase PSMD14 enhances hepatocellular carcinoma growth and metastasis by stabilizing GRB2.** *CANCER LETTERS*. v. 469, p. 22-34, jan. 2020.
52. MA, Y. et al. **IL28A protein homotetramer structure is required for autolysosomal degradation of HCV-NS5A in vitro.** *Cell Death & Disease*, v. 11, n. 3, mar. 2020. doi:10.1038/s41419-020-2400-9.
53. MACDONALD, A. et al. **The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity.** *Journal of General Virology*, v. 85. n. 3, p. 721-729. mar. 2004 doi:10.1099/vir.0.19691-0.
54. MANNS, M. P. et al. **Hepatitis C virus infection.** *Nature Reviews Disease Primers*, Hannover, v. 3, p.17006-17025, mar. 2017. doi:10.1038/nrdp.2017.6.
55. MATSUI, C. et al. **Hepatitis C Virus Infection Suppresses GLUT2 Gene Expression via Downregulation of Hepatocyte Nuclear Factor 1.** *Journal of Virology*, v. 86, n. 23, p. 12903-12911, dez. 2012. doi:10.1128/JVI.01418-12.
56. MEISTERMANN, H. et al. **A Novel Immuno-Competitive Capture Mass Spectrometry Strategy for Protein–Protein Interaction Profiling Reveals That LATS Kinases Regulate HCV Replication Through NS5A Phosphorylation.** *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 13, n. 11, p. 3040-3048, nov. 2014. doi:10.1074/mcp.m113.028977.
57. MILWARD, A. et al. **Hepatitis C virus NS5A protein interacts with β -catenin and stimulates its transcriptional activity in a phosphoinositide-3 kinase-dependent fashion.** *Journal of Virology*, v. 91, n. 2. p. 373-381, fev. 2010. doi:10.1099/vir.0.015305-0.
58. MISHRA, P; et al. **Modulation of HCV replication and translation by ErbB3 binding protein1 isoforms.** *Virology*, v. 500, p. 35-49, jan. 2017. doi:10.1016/j.virol.2016.10.006
59. NGUYEN, L. P et al. **Cortactin Interacts with Hepatitis C Virus Core and NS5A Proteins: Implications for Virion Assembly.** *Journal of Virology*, v. 94, n. 19, set. 2020b. doi:10.1128/jvi.01306-20.

60. NGUYEN, L. P. et al. **PACSIN2 Interacts with Nonstructural Protein 5A and Regulates Hepatitis C Virus Assembly.** *Journal of Virology*, v. 94, n. 5, fev. 2020a. doi:10.1128/JVI.01531-19.
61. NGUYEN, T. T. et al. **Nonstructural 5A impairs DNA damage repair: Implication of hepatitis C virus-mediated hepatocarcinogenesis.** *Journal of Virology*, v. 92, n. 11, maio. 2018. doi:10.1128/JVI.00178-18
62. PANDA, S. et al. **A unique phosphorylation-dependent eIF4E assembly on 40S ribosomes co-ordinated by hepatitis C virus protein NS5A that activates internal ribosome entry site translation.** *Biochemical Journal*, v. 462, n. 2, p. 291-302, set. 2014. doi:10.1042/BJ20131530.
63. Park, K.-J. et al. **Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates c-Jun N-terminal Kinase through Interaction with Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 33, p. 30711-30718, jun. 2003. doi:10.1074/jbc.M209623200.
64. PHAM, H. T. et al. **Hepatitis C virus downregulates ubiquitin conjugating enzyme E2S expression to prevent proteasomal degradation of NS5A, leading to host cells more sensitive to DNA damage.** *Journal of Virology*, v. 93, n. 2, jan. 2019. doi:10.1128/JVI.01240-18.
65. PLOEN, D. et al. **TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus.** *Journal of Hepatology*, v. 58, n. 6, p. 1081-1088, jun. 2013. doi:10.1016/j.jhep.2013.01.022.
66. QADRI, I. et al. **Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3.** *Elsevier*, v. 1592, n. 2, 193-204, Jul. 2002. doi:10.1016/s0167-4889(02)00315-
67. QUINTAVALLE, M. et al. **Hepatitis C Virus NS5A Is a Direct Substrate of Casein Kinase I- α , a Cellular Kinase Identified by Inhibitor Affinity Chromatography Using Specific NS5A Hyperphosphorylation Inhibitors.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 8, p. 5536-5544, fev. 2007. DOI 10.1074/jbc.M610486200.
68. RAMIERE, C. et al. **Activity of Hexokinase Is Increased by Its Interaction with Hepatitis C Virus Protein NS5A.** *Journal of Virology*, v. 88, n. 6, p. 3246-3254, mar. 2014. doi:10.1128/jvi.02862-13.
69. REFOLO, G. et al. **Negative regulation of MAVS-mediated antiviral signaling by the mitochondrial protein LRPPRC during HCV infection.** *Hepatology*, v. 69, n. 1, p. 39-50, jan. 2019. doi:10.1002/hep.30149.
70. REYES, G R. **The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: An expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis.** *Journal Biomedical Science*. v. 9, n. 3, p 187-197. jun. 2002. doi:10.1007/bf02256065
71. ROUDOT-THORAVALL, F. et al. **Epidemiology of hepatitis C virus infection.** *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, v. 45, n. 3, p. 101596, maio. 2021. doi:10.1016/j.clinre.2020.101596.
72. SALLOUM, S. et al. **Rab18 Binds to Hepatitis C Virus NS5A and Promotes Interaction between Sites of Viral Replication and Lipid Droplets.** *PLOS Pathogens*, v. 9, n. 8. Ago. 2013. doi:10.1371/journal.ppat.1003513.
73. SHI, S. T. et al. **Hepatitis C Virus NS5A Colocalizes with the Core Protein on Lipid Droplets and Interacts with Apolipoproteins.** *Virology*, v. 292, n. 2, p. 198-210, jan, 2002. doi:10.1006/viro.2001.1225.

74. SIANIPAR, I. R. et al. **Physical and functional interaction between hepatitis C virus NS5A protein and ovarian tumor protein deubiquitinase 7B.** *Microbiology and Immunology*, v. 59, n. 8, p. 466-476, ago. 2015. doi:10.1111/1348-0421.12278.
75. SKLAN, E. H. et al. **TBC1D20 Is a Rab1 GTPase-activating Protein That Mediates Hepatitis C Virus Replication.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 50, p. 36354-36361, Jun. 2007. doi:10.1074/jbc.m705221200.
76. STRING. **Protein-Protein Interaction Networks Functional Enrichment Analysis.** Disponível em: <<https://string-db.org/>>. Acesso em: 04 de outubro de 2021.
77. TABATA, K. et al., **Hepatitis C Virus Replication.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, out. 2019. doi:10.1101/cshperspect.a037093
78. TAGUCHI, T. et al. **Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner.** *Journal of General Virology*, v. 85, n. 4, p. 959-969, abr. 2004. doi:10.1099/vir.0.19513-0.
79. TAGUWA, S. et al. **Human Butyrate-Induced Transcript 1 Interacts with Hepatitis C Virus NS5A and Regulates Viral Replication.** *Journal of Virology*, v. 82, n. 6, p. 2631-2641, mar. 2008. doi:10.1128/JVI.02153-07.
80. TAN, S. L. et al. **NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 10, p. 5533-5538, jan. 1999.
81. THAN, T. T. et al. **Ankyrin Repeat Domain 1 is Up-regulated During Hepatitis C Virus Infection and Regulates Hepatitis C Virus Entry.** *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, fev. 2016. doi:10.1038/srep20819.
82. TRAN, G. V. Q. et al. **Nonstructural 5A Protein of Hepatitis C Virus Regulates Soluble Resistance-related Calcium-binding Protein Activity for Viral Propagation.** *Journal of Virology*, v. 90, n. 6, p. 2794-805 dez. 2015. doi:10.1128/JVI.02493-15.
83. TRIPATHI, L. P. et al. **Understanding the Biological Context of NS5A–Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach.** *Journal of Proteome Research*, Osaka, v.12, n. 6, p. 2537-2551. maio. 2013. doi:10.1021/pr3011217.
84. TU, H. et al. **Hepatitis C Virus RNA Polymerase and NS5A Complex with a SNARE-like Protein.** *Virology*, v. 263, n. 1, p. 30–41, jun. 1999. doi:10.1006/viro.1999.9893.
85. UVERSKY, V N. et al. **Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases: Introducing the D² Concept.** *Annual Review of Biophysics*, v. 37, n 1, p 215-246. fev. 2008. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125924
86. VLAICU, O. et al. **Novel replicons and trans-encapsidation systems for Hepatitis C Virus proteins live imaging and virus-host interaction proteomics.** *Journal of Virological Methods*, v. 246, p. 42-50. ago. 2017. doi:10.1016/j.jviromet.2017.04.009
87. WANG, S. et al. **TRIM14 inhibits hepatitis C virus infection by SPRY domain-dependent targeted degradation of the viral NS5A protein.** *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, ago. 2016. doi:10.1038/srep32336.

88. WANG, W. T. et al. **YB-1 Stabilizes Hepatitis C Virus NS5A via Phosphorylation-Mediated Interaction with NS5A to Regulate Viral Propagation.** *Journal of Virology*, v. 89, n. 22, p.11584-602, nov. 2105. doi:10.1128/JVI.01513-15
89. WANG, Y. et al. **Hepatitis C virus promotes hepatocellular carcinogenesis by targeting TIPE2, a new regulator of DNA damage response.** *Tumor Biology*, v. 37, n. 11, p. 15265-15274, nov. 2016. doi:10.1007/s13277-016-5409-z
90. WESTBROOK, R. H.; Dusheiko, G. **Natural history of hepatitis C.** *Journal of Hepatology*, v. 61, n. 1, p. 58-68, fev. 2014. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.012.
91. WONG, M. T; CHEN, S. S. **Human Choline Kinase- α Promotes Hepatitis C Virus RNA Replication through Modulating Membranous Viral Replication Complex Formation.** *Journal of Virology*, v. 90, n. 20, p. 9075-9095, set. 2016. doi:10.1128/JVI.00960-16.
92. XUE, B. et al. **ISG12a restricts hepatitis C virus infection through ubiquitination-dependent degradation pathway.** *Journal of Virology*, v. 90, n. 15, p. 6832-6845, jul. 2016. doi:10.1128/JVI.00352-16.
93. YANG, C. et al. **Interferon alpha (IFN α)-induced TRIM22 interrupts HCV replication by ubiquitinating NS5A.** *Cellular and Molecular Immunology*, p. 1-9. jan. 2016. doi:10.1038/cmi.2014.131.
94. Yi, D; et al. **Human MxB inhibits the replication of HCV.** *Journal of Virology*, v. 93. n. 1, dez. 2018. doi:10.1128/JVI.01285-18.
95. ZECH B. et al. **Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein.** *Journal of General Virology*, v. 84, n. 3, p. 555-56, Mar. 2003. doi:10.1099/vir.0.18801-0.
96. ZHANG, X. et al. **Golgi protein 73 facilitates the interaction of hepatitis C virus NS5A with apolipoprotein E to promote viral particle secretion.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 479, n. 4, p. 683-689, set. 2016. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.152.