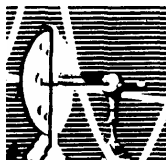


FRANCISCO JOSÉ ROCHA DE SOUSA

***“Determinação da estrutura tridimensional do
peptídeo de fusão e caracterização
termodinâmica da proteína capsídica do vírus da
dengue tipo 2”***

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR
EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Sousa, Francisco J. R.

Determinação da estrutura tridimensional do peptídeo de fusão e caracterização termodinâmica da proteína capsídica do vírus da dengue tipo 2

Rio de Janeiro, 2009

xxvii, 181 fls, 20 ils.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Biofísica)

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Orientador: Ronaldo da Silva Mohana Borges

Palavras-chave:

I – Dengue

II – vírus da dengue

III – fusão de membranas

IV – proteína capsídica

V – termodinâmica de proteínas

Determinação da estrutura tridimensional do peptídeo de fusão e caracterização termodinâmica da proteína capsídica do vírus da dengue Tipo 2

Francisco José Rocha de Sousa

Tese submetida a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) visando a obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Banca examinadora:

Dr. Cristian Follmer

Prof. Adjunto do Instituto de Química

Dr. Marcius Silva Almeida

Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica

Dr. Pedro Geraldo Pascutti

Prof. Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr. José Osvaldo Previato (suplente interno)

Prof. Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dra. Yraima Moura Lopes Cordeiro (suplente Externo)

Profa. Adjunta do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia

Dra. Eleonora Kurtenbach (revisor)

Profa. Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges (orientador)

Prof. Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural, pertencente ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. O trabalho foi orientado pelo Prof. Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Programas de Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB), pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Francisco José Rocha de Sousa recebeu bolsa de Doutorado do CNPq durante todo o desenvolvimento deste projeto.

Dedico...

Primeiramente, dedico esta tese à pessoa responsável por eu ter chegado ao final de um curso de doutorado, ao meu amigo, conselheiro, pai e orientador, Ronaldo Mohana Borges, pois para ele seria muito mais fácil dizer um simples “não”. Ao longo desses anos aumentou minha admiração e respeito não somente pela pessoa que ele é, mas pelo profissional que ele faz questão de ser em cada momento de orientação e de bronca que ele me deu durante estes anos todos, broncas estas que me fizeram crescer muito mais como pessoa. Muito obrigado por tudo;

Aos meus tios, Alfredo e Neide, por terem me dado o suporte necessário para chegar ao final desta jornada.

À mulher que eu mais amo neste mundo, minha namorada Fernanda Lande Rosa, pelo apoio incondicional ao longo dos anos, pelo amor dedicado a mim e pela compreensão nos momentos em que eu estava trabalhando até tarde ou nos fins de semana. Você é tudo pra mim e eu te amo demais;

Ao Sr. Luiz Felipe de Oliveira Rosa e à D. Vilma Lande Rosa, os melhores sogros que alguém poderia querer na vida, muito obrigado por me apoiar nestes longos seis anos de convívio. Os Srs. são os melhores pais que um filho poderia ter;

Agradeço...

Primeiramente, agradeço a Deus por me dar forças para superar os momentos mais difíceis da minha vida e também por me dar os melhores momentos da minha vida ao longo desta jornada de doze anos.

Abaixo estão relacionadas somente as pessoas que me apoiaram nos momentos difíceis e fáceis. Entretanto, gostaria de agradecer àqueles que duvidaram de mim, que me questionaram, que me julgaram, pois estas pessoas também influenciaram, de forma positiva, para que eu encerrasse este ciclo;

Aos meus três cunhados, Flávia Lande Rosa, Eldon Borba Vital e Luiz Felipe de Oliveira Rosa Jr, por me receberem tão bem em sua família há seis anos e me tratarem como um irmão;

Ao meu amigo e irmão, Dr. Reinaldo Martins, por ter compartilhado comigo momentos fáceis e difíceis quando dividimos apartamento;

Seria impossível defender esta tese sem agradecer aos meus amigos inseparáveis de turma de faculdade, Dr. Gustavo Vasconcellos, Dra. Flávia Proença Martins, Márcio Brás, Dr. Sérgio Augusto e Dra. Renata Soares;

Aos amigos Profs. Andréa Cheble Oliveira e André Marcos Oliveira do Instituto de Bioquímica médica, que me apoiaram muito enquanto estava no Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregório Weber (LTPEV). Este apoio foi fundamental está sendo retribuído sob a forma desta tese de doutorado. Muito obrigado por tudo e tudo de bom a vocês;

À Dra. Astria Dias Ferrão Gonzalez, por me ensinar tanta coisa de laboratório e de vida;

À minha amiga, Dra. Ana Cristina, que tanto conversou e me deu ótimos conselhos;

À minha amiga, Dra. Áurea Valéria, que mesmo de longe me apoiava e me dava puxões de orelha que me ensinaram e ainda ensinam muito. Tudo de bom a você e sua família e muito obrigado por tudo;

À Dra. Daniella Ishimaru, minha amiga que me fez amadurecer muito quando conversávamos sobre a vida e sobre ciência. Sem seu suporte em diversos momentos, esta estória não teria este fim;

Aos Profs. Débora Foguel e Jerson Lima Silva, que juntamente com o Ronaldo, são duas pessoas responsáveis por esta tese de doutorado. De uma certa forma, eu também retribuo o apoio dado a mim sob a forma desta tese e a dedico a vocês.

Aos Profs. José Osvaldo Previato e Lúcia Mendonça Previato, pelo apoio e carinho e por me aceitarem como parte de sua equipe. Desde já aproveito pra agradecer a todos os membros de sua equipe que sempre me receberam com muito carinho;

À minha amiga, Dra. Mônica dos Santos Freitas, pelo suporte incondicional nestes anos, pelas conversas, pelo carinho e pela confiança.

Ao Emerson Gonçalves, pela confiança, pelo carinho e pela amizade nestes anos todos

À minha amiga Dra. Sheila Maria Barbosa de Lima, nossa eterna mamãe do LTPEV que dava conselhos científicos aos alunos iniciantes e aos mais velhos também. Muito obrigado pelas conversas de apoio que me fizeram amadurecer muito. Obrigado pela torcida durante a seleção de mestrado;

Aos membros da banca por aceitarem dividir comigo esta etapa final de um ciclo;

Ao Prof. Robson Queiroz Monteiro, por estar sempre disponível para conversar sobre ciência e sobre música. Obrigado pela confiança e carinho;

À Sandra Brito, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, por ter sido sempre muito atenciosa comigo e também por me ajudar a resolver os problemas burocráticos da pós-graduação

À Theresa Lima, do Instituto de Bioquímica Médica por sempre me tratar com muito carinho e por ter me ajudado a resolver questões burocráticas da pós-graduação;

Ao Dr. Vitor Hugo Moreau, que assim como sua esposa, Astria, me apoiou, conversou, me deu bronca e me fez crescer como pessoa;

Ao Prof. Luis Maurício T. R. Lima, pelo apoio ao longo dos anos, pelas conversas sérias e divertidas e pelos ensinamentos;

Aos Profs. Sérgio Teixeira Ferreira e Fernanda de Felice, por me confiarem seus laboratórios e seus equipamentos e pelo apoio. Também aproveito pra agradecer a todos de sua equipe que sempre me trataram com muito carinho e respeito, Dr. Paulo Louzada, Dr. Adriano Sebollela, Marcelinho, dentre outros;

À minha amiga Samantha Martins, que sempre conversou muito comigo e me deu ótimos conselhos. Boa sorte em Macaé;

Ao meu grande amigo e companheiro, Leandro Oliveira, por ter me dado a oportunidade de participar dos simpósios internacionais de miosina e pelas conversas sempre produtivas;

Segue-se abaixo os agradecimentos a cada membro da laboratório de Genômica Estrutural. Caso tenha esquecido alguém, peço desculpas desde já e caso não ressaltado alguma qualidade de alguém, por favor, me perdoem. Entretanto, acho que todos sabem que, nestes quatro anos, vivi com vocês momentos intensos, de dúvidas, de tristeza e de muita alegria. E são estes momentos de alegria que passei com cada um de vocês que levarei comigo;

Ao Diego Allonso, nosso eterno churrasqueiro e garoto juvenil do laboratório de genômica estrutural, pelos momentos alegres de risadas intensas, pelos jogos de buraco e pelas conversas sérias de apoio ou de bronca. Desculpe por aquele dia durante o buraco (há 4 anos);

Ao José Eduardo, pelas brincadeiras dentro e fora do laboratório e pelas conversas sobre a vida, sobre dinheiro, e sobre namoradas.

Ao Emmerson Costa, meu companheiro de doutorado, pela confiança, pelas conversas de apoio nos momentos complicados e pelos momentos de diversão;

À Marcela Rosa, por aceitar minhas brincadeiras com tanta graça, pelas conversas de apoio em momentos difíceis e por organizar um pouco o laboratório junto comigo;

Aos novos integrantes, Jonas (Blodi) e Ana Carolina, pela confiança e pelos jogos de buraco no fim do dia;

À Dra. Emiliania Mandarano, a paulista mais carioca que eu já vi, pela confiança, pelo carinho, pelas conversas de incentivo e pelos momentos de risadas no laboratório e fora dele. Seja bem vinda à Família LabGenest;

Ao meu aluno Fabrício Belgrano, o eterno “menino especial”, pela seriedade durante os experimentos, pelos momentos de descontração e pela confiança.

Ao Gustavo Ventura, meu “blodi”, pela confiança, pelo respeito e pelas brincadeiras sempre saudáveis. Desculpe por aquele jogo de buraco, mas foi o Eduardo, tá?;

Á Estefani Aguilera, nossa Argentina/brasileña, pelas brincadeiras nos churrascos, pelas conversas de apoio e pelo carinho;

À minha aluna, Renata Morgado, pela confiança, pelo carinho, pelas brincadeiras, pelos jogos de buraco e pelo apoio. Boa sorte no mestrado;

Ao Sebastião Carvalho, que sempre me deu apoio para que eu fosse para seu laboratório, pelas conversas sérias e pelas conversas sobre futebol e sobre buraco;

À Iamara Andrade, pela confiança, pelo carinho e por ter aceito minhas brincadeiras sem se estressar;

Lista de Abreviaturas

ADN = ácido desoxirribonucleico

ARN = ácido ribonucleico

CM = centro de massa espectral

C-terminal = carboxi-terminal

CD = dicroísmo circular (do inglês: *circular dichroism*)

DEN2C = Proteína Capsídica do vírus da Dengue tipo 2 (do inglês Dengue Virus Type 2 Capsid Protein)

D₂O = água deuterada

D.O. = densidade óptica

EDTA = ácido etileno-diamino tetracético

HPLC = Cromatografo Líquido de alta performance (do inglês high performance liquid chromatograph)

IPTG = isopropil β-D-tiogalactosídeo

KUN = Vírus Kunjin (do inglês Kunjin Virus)

LB = meio de cultura Luria-Bertani

N-terminal = amino terminal

NOE = Efeito nuclear overhauser (do inglês Nuclear Overhauser Effect)

NOESY = Espectroscopia de Efeito nuclear overhauser (do inglês Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

NaCl = cloreto de sódio

NaOH = hidróxido de sódio

NaH₂PO₄ = Sulfato de Sódio monobásico

PMSF = *p-methyl sulphonyl fluoride*

RMN = ressonância magnética nuclear

WNV = Vírus Oeste do Nilo (do inglês West Nile Virus)

Xe = xenônio

YFV = Virus da Febre Amarela (do inglês Yellow Fever Virus)

TBE = Vírus da Encefalite causada pelo carrapato (do inglês Tick Borne Encephalitis Virus)

Tris = tris (hidroximetil) amino metano

DTT = 1, 4-Ditiotreitol

(NH₄)₂SO₄ = sulfato de amônio

HEPES = Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'- etanossulfônico

DPC = dodecilfosfocolina

SDS = dodecil sulfato de sódio

VLP = Partículas semelhantes à vírus (do inglês Virus-like Particles)

Resumo

A dengue é uma das principais arborivoses que acomete anualmente cerca de 100 milhões de pessoas em todo o planeta. Durante a sua infecção, duas proteínas são cruciais em duas etapas distintas: a primeira é a proteína de envelope (E) responsável pela interação do vírus com o receptor localizado na membrana da célula hospedeira, seguida pela formação do endossoma. A acidificação do pH endossomal para pH ~5,5 promove uma drástica alteração conformacional da proteína de envelope, que se dissocia em monômeros para, finalmente, se reassociar em trímeros e expor uma pequena região de 15 resíduos de sua sequência, denominada de peptídeo de fusão. Este peptídeo promove a fusão entre o envelope viral e a membrana endossoma. A segunda é a proteína capsídica, responsável pela formação do nucleocapsídeo e empacotamento do genoma viral. Estudos recentes com a proteína capsídica do vírus da febre amarela revelaram que certas mutações nesta proteína abole a formação de partículas virais infecciosas, provavelmente por interferir na oligomerização desta proteína. Em nosso trabalho comparamos a estabilidade termodinâmica da proteína capsídica selvagem (WT) e de uma mutante (I88N).

Primeiramente, observamos que, embora composto de apenas 15 aminoácidos, o peptídeo de fusão foi capaz de induzir a fusão de membranas lipídicas bem como de interagir com micelas de detergentes. Determinamos a sua estrutura tridimensional ligado a micelas de dodecilsulfocolina por RMN e observamos a formação de um tríade hidrofóbica formada pelos resíduos W101, L107 e F108 que parecem direcionar a fusão do envelope viral com a membrana endossomal. Ainda, a interação do peptídeo de fusão com vesículas de PG:PC foi mapeada por experimentos de transfer-NOE, nos quais a maioria dos picos de NOE foi oriunda desta tríade hidrofóbica, corroborando a estrutura do peptídeo ligado a micelas de DPC. Ao substituir o resíduo de Trp101 por uma alanina, observamos a abolição completamente da capacidade fusogênica do peptídeo de fusão, mostrando claramente o papel crucial do Trp no processo de fusão.

Em nosso segundo modelo, estudamos as propriedades termodinâmicas da proteína capsídica selvagem (WT) e do mutante (I88N). Observamos que as proteínas apresentaram um perfil de estrutura secundária do tipo α -hélice e apresentaram em uma conformação dimérica em solução. Ao compararmos a estabilidade termodinâmica destas proteínas utilizando-se a ureia como agente desnaturante, observamos que o mutante I88N foi menos estável do que a proteína

selvagem. Este dado foi confirmado pela diferença nos valores de $[U]_{1/2}$, que foi de 2,2 M para a WT e de 4,7 M para o mutante. Ainda, a diferença de valor de ΔG_u entre as duas proteínas (7,75 kcal/mol para a WT e 1,36 kcal/mol para o I88N) reflete claramente a diferença de estabilidade entre as proteínas. Este dado sugere que a mutação não alterou seu estado oligomérico, mas afetou sua estabilidade termodinâmica.

Abstract

Dengue is one of the most important arboviruses that infect about 100 million people per year around the planet. During the dengue infection, two proteins are crucial in two different steps: the first one is the envelope protein (E), which is responsible for virus-cell host membrane interaction. After virus-cell host membrane interaction, follows the endosome formation, environment acidification (pH ~5,5) and a drastic conformational change of the envelope protein, which dissociates into monomers and, finally, reassociates into trimers and exposes its 15-residue sequence, named fusion peptide. This fusion peptide promotes de fusion between the viral envelope and the endosomal membrane. The second protein is the capsid protein, which is responsible for the nucleocapsid formation and the viral genome packaging. Recent studies with yellow fever capsid protein showed that mutations in the protein abolished the infectious viral particle, probably by interfering in protein oligomerization. In this work, we studied the effect of mutation in capsid protein stability.

Our aim is to understand the role of these two proteins in these two crucial steps in dengue virus type 2 infection.

First, we studied the fusion peptide and we observed that this small peptide was able to induce fusion with lipid membranes as well as with detergent micelles. The solution structure of fusion peptide bound to DPC micelles showed a hydrophobic triad formed by residues W101, L107 and F108 that might drive the fusion between viral envelope and the endosomal membrane. In addition, the interaction of DV fusion peptide with PG:PC vesicles was mapped by transfer-NOE experiments, in which the majority of the NOE cross peaks were from the hydrophobic triad, corroborating the DPC-bound structure. Substitution of the residue W101 by an alanine residue completely abolished fusion mediated by the peptide and its NOE cross peaks, suggesting the role of this residue on driving the fusion process.

In our second model, we studied thermodynamic properties of wild type (WT) and mutant (I88N) capsid protein. We observed that both proteins are dimers in solution with a CD spectra characteristic of high amount of α -helical secondary structure. We compared the thermodynamic stability by urea, and observed that the mutant I88N was less stable than the wild type protein. This data was confirmed by calculating the $[U]_{1/2}$, which was about 2,2 M for I88N and 4,7 M for Wild type protein. In addition, the ΔG_u obtained for between these proteins reflects de difference

in stability between them (7,75 kcal/mol WT and 1,36 kcal/mol for I88N This data suggest that this mutation did not change its oligomeric state, but affected its thermodynamic stability.

Altogether, these data are the basis to understand how the fusion of dengue virus with the endosome membrane occurs as well as the viral genome packaging. We believe that these informations can be used for rational drug design that impairs dengue virus infection by these two steps.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Aspectos gerais da infecção viral.....	2
1.2. O vírus da dengue	3
1.3. A Estrutura dos Flavivírus.....	6
1.3.1 Ciclo de replicação dos flavivirus.....	6
1.4. Fusão de membranas	10
1.5. Glicoproteínas Virais.....	12
1.6 Modelo de Estudo I: Proteína E e seu peptídeo de fusão.....	20
1.7 Modelo de Estudo II: Proteína capsídica do vírus da dengue tipo 2 (DEN2C).....	25
1.8 Efeito da pressão hidrostática em proteínas.....	30
1.9. Fundamentos de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	31
1.9.1 Deslocamento químico.....	34
1.9.2 TOCSY	35
1.9.3. Efeito Overhauser Nuclear (NOE)	36
1.9.4. Noesy.....	37
2. Objetivos	38
3. Material e métodos	42
3.1. Modelo de Estudo I: Peptídeo de Fusão	
3.1.1. Reagentes.....	43
3.1.2. Preparação das vesículas e ensaios de fusão.....	43
3.1.3. Medidas de Fluorescência.....	44
3.1.4. Espectroscopia de RMN.....	44

3.2. Modelo de Estudo II: Proteínas Capsídica (DEN2C)	
3.2.1. Clonagem da proteína capsídica 1-100 Wt e I88N	45
3.2.2. Expressão e purificação da proteína Capsídica	47
3.2.3. Cromatografia em gel-filtração das proteínas DEN2C WT e I88N.....	49
3.2.4. Dicroísmo Circular	49
3.2.5. Medidas de fluorescência	50
3.2.6. Funcionamento dos sistema de alta pressão	52
4. Resultados	54
4.1. Parte I: Apresentação do Artigo “ <i>Interaction of the Dengue virus fusion peptide with membranes by NMR: the essential role of W101 of E protein for membrane fusion</i> ”	56
4.2. Parte II: Apresentação dos resultados da proteína capsídica do vírus da dengue tipo 2 (DEN2C)	93
4.2.1. Análise de pureza e do estado oligomérico da proteína DEN2C.....	95
4.2.2. Análise da estrutura secundária da proteína DEN2C WT e I88N por CD	97
4.2.3. Desnaturação por uréia das proteínas DEN2C WT e I88N	100
4.2.4. Efeito da pressão na DEN2C WT	101
5. Discussão	105
5.1. Caracterização do estado oligomérico da proteína DEN2C.....	110
5.2. Efeito da uréia sobre a estabilidade da proteína DEN2C.....	111
5.3. Efeito da alta pressão no enovelamento da DEN2C.....	112
6. Conclusões e Perspectivas	115

7. Referências bibliográficas	119
8. Anexo I.....	139
9. Anexo II.....	151
10. Anexo III	158
11. Anexo iv.....	175

Índice de figuras e tabelas

Figura 1. Representação esquemática do curso temporal de aparecimento dos sintomas e sinais clínicos da dengue.....	5
Figura 2. Representação esquemática da estrutura do vírus da dengue e do genoma viral.....	7
Figura 3. Ciclo de replicação do vírus da dengue.....	9
Figura 4... Mecanismos de entrada dos vírus envelopados nas células hospedeiras..	12
Figura 5... Representação esquemática das estruturas das proteínas de fusão de classes I, II e III no estado conformacional pós-fusogênico.....	14
Tabela I. Comparação entre as proteínas de fusão de classes I e II	16
Figura 6.. Mecanismos propostos para o processo de fusão catalisado pelas glicoproteínas virais.....	18
Figura 7. Estrutura cristalográfica da proteína E do vírus da dengue	22
Figura 8. Rearranjo dos domínios da proteína E durante a transição para trímero	23
Figura 9. Alinhamento da região do peptídeo de fusão da glicoproteína E de alguns flavivírus.....	23
Figura 10. Mecanismo proposto para a interação do peptídeo de fusão com vesículas lipídicas.....	25
Figura 11. Alinhamento de sequência da proteína C de alguns flavivírus	28
Figura 12. Estrutura da DEN2C (resíduos 21-100) em solução por RMN.....	29
Figura 13. Representação esquemática da rotação da magnetização M do sistema de coordenadas cartesianas na frequência de operação dos instrumentos de RMN.....	34
Figura 14. Representação esquemática das correlações observadas em um espectro de TOCSY bidimensional	36

Figura 15A. Esquema da bomba de alta pressão hidrostática	53
Figura 15B. Esquema do gerador de pressão.....	53
Figura 16. Análise da purificação das proteínas DEN2C WT e do mutante I88N por gel de SDS-PAGE a 18%	96
Figura 17. Análise do estado oligomérico das proteínas DEN2C WT e I88N por Filtração em gel.....	98
Figura 18. Análise da Estrutura secundária das proteínas DEN2C WT e I88N por CD	99
Figura 19. Desnaturação das proteínas DEN2C WT e I88N por uréia	103
Figura 20. Efeito da pressão hidrostática na dissociação das proteínas DEN2C WT e I88N	104

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da infecção viral

Os vírus são os menores organismos que podem se replicar e são classicamente conhecidos pela sua habilidade de atravessar filtros que retêm até as menores bactérias. Na sua forma mais básica, as partículas virais são compostas por um material genético, que é revestido por um capsídeo proteico. Em alguns casos, a partícula viral pode ainda ser envolvida por uma membrana lipídica, conhecida como envelope, que contém as glicoproteínas virais. Apesar desta simplicidade, os vírus apresentam grande variação quanto ao tamanho, forma e composição e podem infectar uma gama de organismos na natureza (Eckert e Kim, 2001)

A infecção da célula hospedeira é essencial para a replicação viral, já que os vírus não possuem metabolismo próprio e dependem da maquinaria enzimática celular para este processo. Em uma primeira etapa da infecção viral, os vírus aderem às células por meio de regiões específicas das proteínas de sua superfície e interagem com moléculas receptoras, que podem ser proteínas, carboidratos ou lipídeos, presentes na superfície celular. Estas moléculas podem ser proteínas, carboidratos ou lipídeos. Após aderirem à superfície celular, os vírus iniciam sua entrada nas células utilizando diferentes mecanismos, levando à liberação do genoma viral no citoplasma ou no núcleo da célula hospedeira. (Eckert e Kim, 2001).

O genoma viral pode ser liberado no citoplasma tanto como moléculas de ácido nucleico livre, como acontece para alguns vírus RNA, quanto como complexos de ácido nucleico e proteínas. Coincidindo com, ou imediatamente após a entrada na célula, começa um processo de desmontagem dos componentes virais, levando à replicação do genoma viral, com a formação de novas partículas virais (Eckert e Kim, 2001).

A liberação destas partículas recém-formadas da célula hospedeira pode ocorrer de diferentes formas. Os vírus envelopados podem sair da célula por brotamento através da membrana plasmática ou pela fusão de vesículas secretoras contendo partículas virais com a membrana plasmática. Os vírus não envelopados são geralmente liberados por lise da membrana celular.

1.2 O vírus da dengue

O vírus da dengue é um membro da família *Flaviviridae*, na qual também se incluem os vírus da febre amarela, Saint Louis, Oeste do Nilo, Rio Bravo e outros vírus responsáveis por encefalites (Burke e Monath, 2001). Quatro sorotipos geneticamente

distintos do vírus da dengue são conhecidos: DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4, sendo DEN2 o de maior prevalência.

A infecção por esse vírus possui um espectro de apresentação que varia desde a forma assintomática até quadros de hemorragia e choque, podendo evoluir, inclusive para o óbito (fig. 1) (Who, 1997; Figueiredo e Fonseca, 2002; Guzman e Kouri, 2002; Whitehead *et al.*, 2007). A dengue é uma doença febril aguda, com duração de 5 a 7 dias. A dengue clássica apresenta quadro clínico muito variável, geralmente com cefaleia, mialgia (dores no corpo), seguido de febre alta (39 a 40 °C) de início abrupto, acompanhada de prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retro-orbitária, náuseas, vômitos e rash cutâneo. Associada à síndrome febril, em alguns casos pode ocorrer hepatomegalia dolorosa e, principalmente, nas crianças, dor abdominal generalizada. Com o desaparecimento da febre, há regressão dos sinais e sintomas, podendo ainda persistir a fadiga (Figueiredo e Fonseca, 2002; Guzman e Kouri, 2002). Já nos casos da dengue hemorrágica, apesar dos sintomas iniciais serem semelhantes aos da dengue clássica, ocorre um rápido aparecimento de manifestações hemorrágicas, como petéquias, equimoses, epistaxe, gengivorragia, sangramento gastrintestinal, hematúria e metrorragia. Os casos típicos da dengue hemorrágica são caracterizados por febre alta, fenômenos hemorrágicos e hepatomegalia. Nos casos graves, conhecidos como síndrome do choque hemorrágico da dengue, ocorre insuficiência circulatória (choque) imediatamente após o desaparecimento da febre. Sua duração é curta, podendo levar ao óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida após terapia apropriada. Um achado laboratorial importante da dengue hemorrágica é a trombocitopenia com hemoconcentração concomitante. A gravidade deste quadro está relacionada à efusão do plasma, caracterizada por valores crescentes do hematócrito (Figueiredo e Fonseca, 2002; Guzman e Kouri, 2002).

O vírus da dengue é transmitido em um ciclo envolvendo humanos e mosquitos, sendo a espécie *Aedes aegypti* o vetor mais importante. Este se encontra principalmente em áreas temperadas e tropicais, em geral durante o verão (Wilder-Smith e Schwartz, 2005). Cerca de dois terços da população mundial vive em áreas onde a dengue é endêmica ou epidêmica, sendo estimado que cerca de 50-100 milhões de pessoas sejam infectadas com o vírus todo o ano, 250-500 mil desenvolvam dengue hemorrágica e 12 mil morram em decorrência desta infecção (Rigau-Perez *et al.*, 1998; Gubler, 2002).

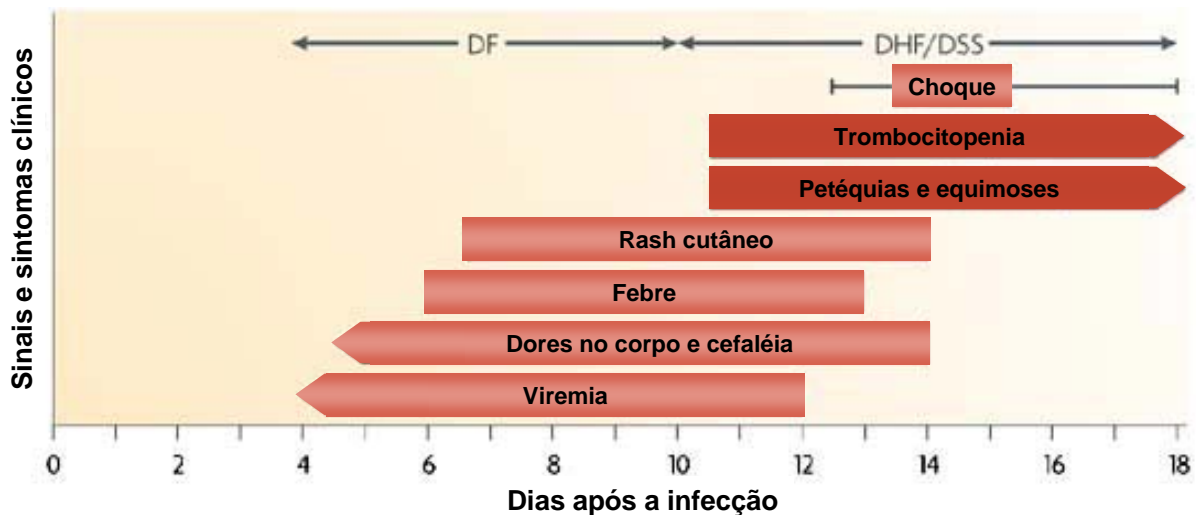


Figura 1: Representação esquemática do curso temporal de aparecimento dos sintomas e sinais clínicos da dengue. DF - dengue clássica, DHF - dengue hemorrágica, DSS - síndrome do choque da dengue hemorrágica. Adaptado de Whitehead *et al.* (2007).

No Brasil, a dengue encontra-se hoje presente em todos os 27 estados da federação, sendo responsável por cerca de 60-70% das notificações nas Américas (Siqueira *et al.*, 2005; Camara *et al.*, 2007). Em 1981, os sorotipos DEN1 e DEN4 foram os primeiros a serem isolados em uma epidemia de dengue ocorrida em Boa Vista, Estado de Roraima (Osana *et al.*, 1983). Após um silêncio epidemiológico, o sorotipo DEN1 invadiu o sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e o nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia) nos anos de 1986 e 1987 (Schatzmayer *et al.*, 1986), espalhando-se pelo país desde então, com as entradas dos sorotipos DEN2 no período de 1990-1991 (Nogueira *et al.*, 1991), e o DEN3 em 2001-2002 (Nogueira *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2005).

Dois fatores estão diretamente relacionados com a incidência de dengue no Brasil e no mundo: distribuição ampla do vetor e taxa de transmissão rápida do vírus (Pinheiro e Corber, 1997; Figueroa e Ramos, 2000; Guzman e Kouri, 2002). O controle do vetor, que a princípio parecia ser a melhor solução, mostrou-se ineficiente no Brasil nos últimos anos, tanto pela interrupção dos programas de combate ao mosquito, quanto pelo aparecimento de mosquitos e larvas resistentes a diversos inseticidas e larvicidas. Além disso, tais programas para serem efetivos exigem financiamento contínuo ao longo dos anos, principalmente em um país de dimensões como a do Brasil (Teixeira *et al.*, 2005).

Sendo assim, a formulação de uma vacina tetravalente que seja eficaz contra os quatro sorotipos e produza uma imunidade duradoura é extremamente necessária (Whitehead *et al.*, 2007).

1.3. A estrutura dos flavivírus

Os flavivírus são partículas esféricas de aproximadamente 50 nm de diâmetro, formados por um capsídeo icosaédrico envolto por uma membrana lipídica. O nucleocapsídeo é composto pelo genoma viral, uma fita simples de RNA, polaridade positiva, fortemente associado à proteína C (capsídica). Envolvendo este conjunto temos o envelope lipídico, que contém duas proteínas: a glicoproteína E (de envelope) e a proteína M (de membrana) (fig. 2) (Lindenbach e Rice, 2001; Kuhn *et al.*, 2002).

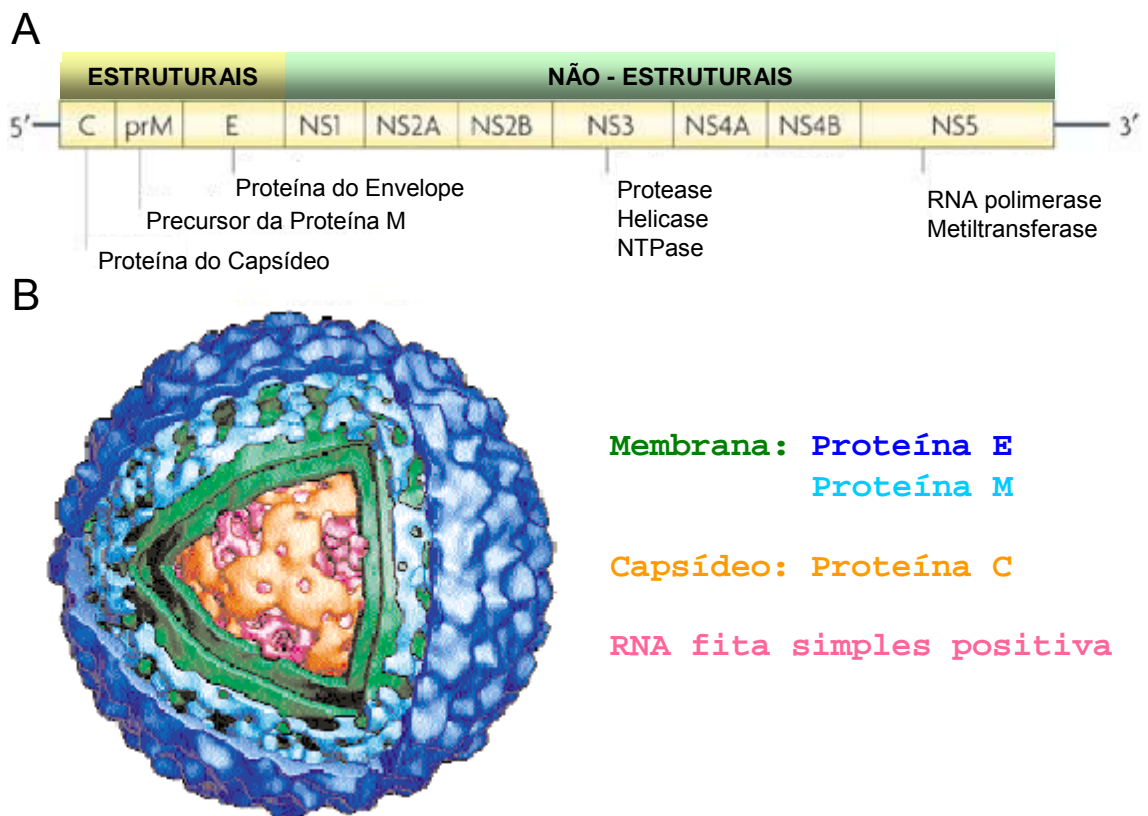


Figura 2: Representação esquemática da estrutura do vírus da dengue e do seu genoma viral. (A) Organização do genoma do vírus da dengue. (B) Estrutura da partícula viral obtida por criomicroscopia eletrônica. Podem ser observadas duas camadas proteicas mais externas (azuis claro e escuro), compostas pelas proteínas E e M, uma bicamada lipídica (verde), um nucleocapsídeo (laranja), composto pela proteína C, e finalmente, o RNA genômico (vermelho) empacotado no centro do vírus. Adaptado de Kuhn et al. (2002); Smith (2002) e Whitehead et al. (2007).

1.3.1 Ciclo de replicação dos flavivírus

Para que ocorra uma replicação viral bem sucedida, os flavivírus precisam liberar seu RNA no citoplasma (fig. 3). Para isso, o vírus da dengue se liga à moléculas receptoras presentes na superfície celular através da proteína E. Existem estudos que sugerem o envolvimento direto do heparan sulfato (HS), um glicosaminoglicano (GAG) carregado negativamente, na ligação do vírus à membrana alvo (Chen et al., 1997; Hung et al., 1999; Hilgard e Stockert, 2000; Germi et al., 2002). No entanto, outros autores acreditam que o HS é apenas um fator presente na superfície celular que agrega as partículas virais, facilitando sua interação com receptores proteicos (Martinez-Barragan e Del Angel, 2001; Thepparit e Smith, 2004). Além disso, dependendo do tipo celular estudado, o HS não é necessário para infecção pelo vírus da dengue (Bielefeldt-Ohmann et al., 2001). Na realidade, não se conhece o seu verdadeiro receptor e várias outras moléculas candidatas já foram sugeridas até o presente momento, como as “proteínas de choque térmico” 90 e 70 (Reyes-Del Valle et al., 2005), GRP78/BiP (glucose-regulating protein 78) (Jindadamrongwech et al., 2004), CD-14 (Chen et al., 1999), receptor de laminina (Thepparit e Smith, 2004) e, mais recentemente, o DC-SIGN (dendritic-cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) (Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneetrithep et al., 2003; Lozach et al., 2005; Pokidysheva et al., 2006).

Após a ligação ao receptor específico, ocorre a endocitose da partícula viral (Mukhopadhyay et al., 2005). A acidificação do compartimento endossomal ocasiona a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando o capsídeo no citoplasma. A proteína do capsídeo se dissocia, iniciando o processo de tradução e replicação do genoma viral. O genoma do vírus da dengue (figs. 2A e 3) codifica uma poliproteína processada pela combinação de serino-protease viral e enzimas celulares. Como resultado desta clivagem, são obtidas três proteínas estruturais (C, prM, e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) (Lindenbach e Rice, 2001; Lindenbach e Rice, 2003). Assim são formadas as proteínas virais necessárias para a montagem viral.

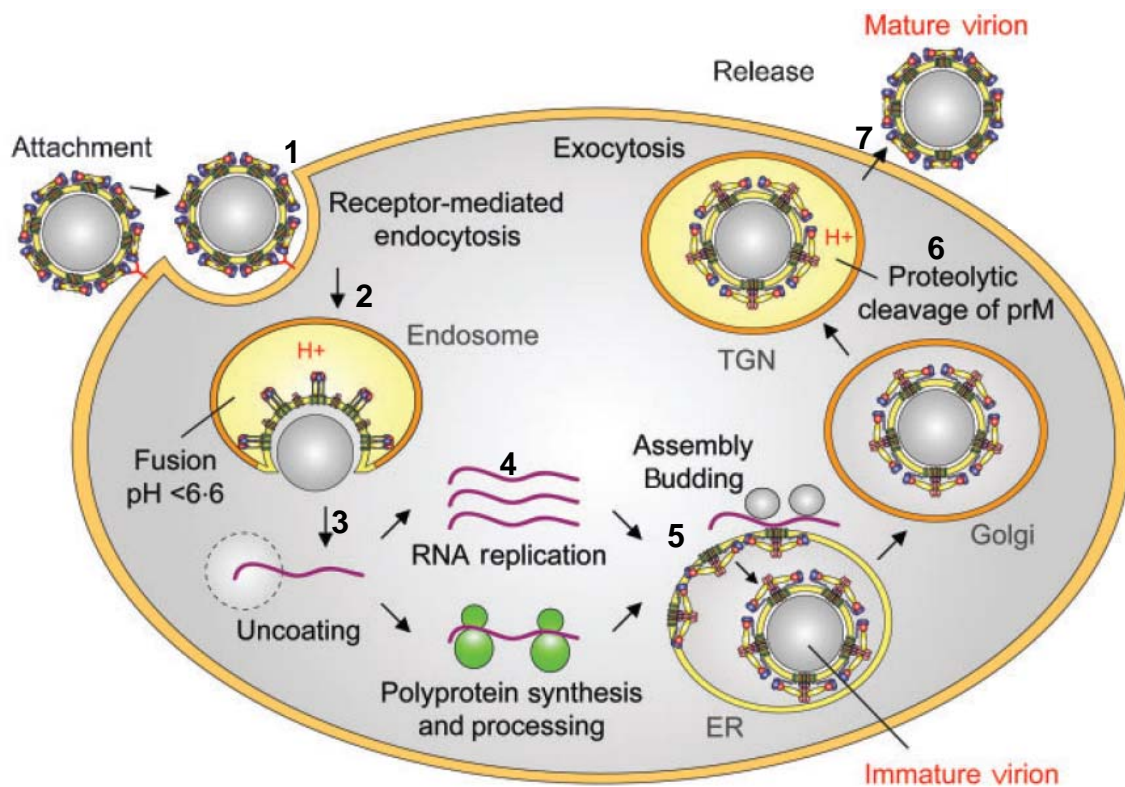


Figura 3: Ciclo de replicação do vírus da dengue. Estão representadas as principais etapas do ciclo de replicação: (1) ligação do vírus à membrana celular através da ligação da proteína E do vírus com os receptores da superfície celular; (2) endocitose das partículas virais mediada pelo receptor da célula do hospedeiro; acidificação do

meio endossomal induzindo mudança conformacional irreversível da proteína do envelope viral e promovendo a fusão com a membrana endossomal; (3) liberação do capsídeo no citoplasma da célula; (4) tradução do RNA genômico e processamento da poliproteína, replicação do genoma viral originando fitas de RNA intermediárias negativas; (5 e 6) morfogênese dos virions em vesículas intracelulares; transporte dos virions e maturação da glicoproteína do envelope; (7) fusão da vesícula contendo os virions com a membrana da célula e liberação destes no meio extracelular. Retirado de Stiasny e Heinz (2006). ER (retículo endoplasmático); TGN (trans –Golgi network);

O processo de montagem dos vírus acontece inicialmente no lúmen do retículo endoplasmático, onde primeiro são gerados vírus imaturos, compostos de nucleocapsídeo, envelope e proteínas E e pré-M formando um estável complexo de heterodímeros, que não é capaz de induzir fusão de membranas (Fig 3) (Guirakhoo *et al.*, 1991). Acredita-se que a proteína pré-M protege a proteína E de adquirir precocemente uma conformação fusogênica durante o processo de secreção e também funcione como uma chaperona para a organização desta proteína (Heinz e Allison, 2003). Após a clivagem da proteína pré-M pela furina celular no complexo de Golgi, as partículas virais se tornam maduras e infecciosas (Fig. 3) (Stadler *et al.*, 1997; Elshuber *et al.*, 2003). Os vírus formados são liberados da célula infectada por exocitose (I Mei Yu *et al.*, 2008; Long Li *et al.*, 2008).

1.4 Fusão de membranas

Tanto os vírus envelopados quanto os não envelopados compartilham as principais etapas do processo de entrada nas células hospedeiras, que se inicia pela ligação na célula hospedeira e termina com a liberação do material genético viral no citoplasma (Dimitrov, 2004). A principal diferença está na etapa de penetração do nucleocapsídeo no citoplasma: para os vírus envelopados, ocorre a fusão de membranas, enquanto que para os não envelopados, ocorre a formação de poros ou lise de membranas (Fig. 4) (Marsh e Helenius, 2006).

A fusão de membranas, um processo celular essencial para a fagocitose, a pinocitose e o tráfego de vesículas, é o mecanismo básico de entrada dos vírus envelopados nas células hospedeiras. É um método “elegante e efetivo” para liberar o

genoma viral no citoplasma e iniciar a infecção (Smith e Helenius, 2004). A reação de fusão do envelope viral pode ser direta com a membrana plasmática da célula ou com a membrana do compartimento endossomal após a internalização da partícula viral por endocitose mediada por receptor (Earp et al., 2005; Harrison, 2005; Kielian e Rey, 2006) (Fig. 4). As vias de endocitose utilizadas podem ser dependente de clatrina (mais comum), dependente de caveolina ou independente de clatrina e caveolina (Sieczkarski e Whittaker, 2002; Marsh e Helenius, 2006). Dentre os vírus que são capazes de fundir-se diretamente com a membrana plasmática podemos citar como exemplo os paramixovírus, os retrovírus e os herpesvírus. Já os alfavírus, os flavivírus, os rabdovírus, e o vírus influenza são exemplos de vírus que penetram na célula hospedeira através de endocitose mediada por receptor, seguida pela fusão da membrana viral com a endossomal (Dimitrov, 2004).

A fusão de membranas induzida pelos vírus envelopados é mediada pelas proteínas de superfície (Kielian e Rey, 2006), que sofrem uma dramática mudança conformacional desencadeada pela interação com o receptor na membrana alvo em pH neutro ou pela exposição ao pH ácido do meio endossomal (Earp et al., 2005; Sieczkarski e Whittaker, 2005). Outras formas de ativação do processo de fusão têm sido propostas, como a combinação de interação da glicoproteína viral com seu receptor associada à exposição ao pH ácido (Mothes et al., 2000; Matsuyama et al., 2004) e a clivagem proteolítica dessas glicoproteínas por proteases do endossoma ativadas pelo pH ácido (Chandran et al., 2005).

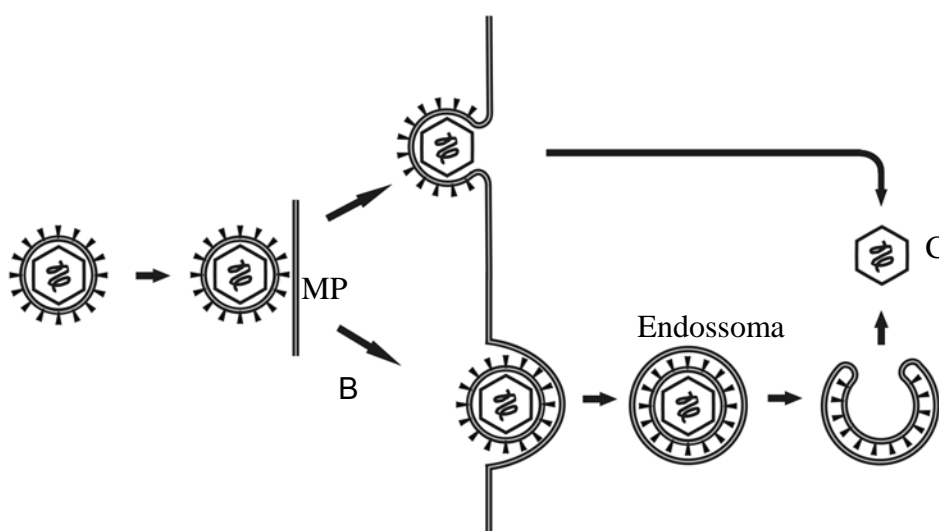


Figura 4:

Mecanismos de entrada dos vírus envelopados nas células hospedeiras: (A) fusão direta das membranas viral e plasmática (MP); (B) endocitose mediada por receptor,

com posterior acidificação do endossoma e fusão de membranas e (C) liberação do material genético. Adaptado de Da Poian et al. (2005).

1.5. Glicoproteínas virais

As glicoproteínas dos vírus envelopados, tipicamente proteínas integrais de membrana, são codificadas pelo material genético viral e sintetizadas utilizando-se a maquinaria de síntese proteica da célula infectada. Após o processamento destas proteínas, elas são ancoradas na membrana da célula hospedeira e incorporadas às partículas virais durante a montagem e brotamento dos novos vírus. Na superfície viral, estas proteínas formam oligômeros altamente organizados e glicosilados (Eckert e Kim, 2001).

A fusão de membranas, etapa essencial para infecção dos vírus envelopados, é mediada por estas proteínas transmembranares (Kielian e Rey, 2006), que são denominadas proteínas de fusão. Elas contêm em sua sequência primária uma região contendo um grande número de resíduos hidrofóbicos e de glicinas, capaz de interagir com a membrana alvo, conhecida como peptídeo de fusão (Eckert e Kim, 2001). São sintetizadas numa conformação metaestável de alta energia na superfície viral, na qual seu peptídeo de fusão encontra-se “escondido” no interior do oligômero formado pelas glicoproteínas (Hernandez et al., 1996). No entanto, é proposto que a ligação ao receptor ou a exposição ao pH ácido acarretaria na transição da glicoproteína viral para a conformação fusogênica de baixa energia, expondo o peptídeo de fusão e liberando a energia necessária para o processo de fusão (Carr et al., 1997; Epand, 2003; Dimitrov, 2004).

As características comuns entre as proteínas de fusão são: (a) a maior parte de sua massa é composta da porção externa à membrana viral, (b) o N-terminal está sempre localizado no domínio externo, (c) os domínios transmembranares e o C-terminal são relativamente pequenos, (d) contêm carboidratos N-ligados, (e) formam oligômeros denominados de espículas, e (e) estão presentes em alta densidade na membrana viral (Eckert e Kim, 2001).

Embora possuam estas semelhanças, com base em critérios estruturais, principalmente no estado conformacional pós-fusão, foram definidas até o momento três classes de proteínas de fusão (classes I, II e III) (fig. 5) (Heinz e Allison, 2001;

Lescar et al., 2001; Da Poian et al., 2005; Heldwein et al., 2006; Roche et al., 2006; Weissenhorn et al., 2007).

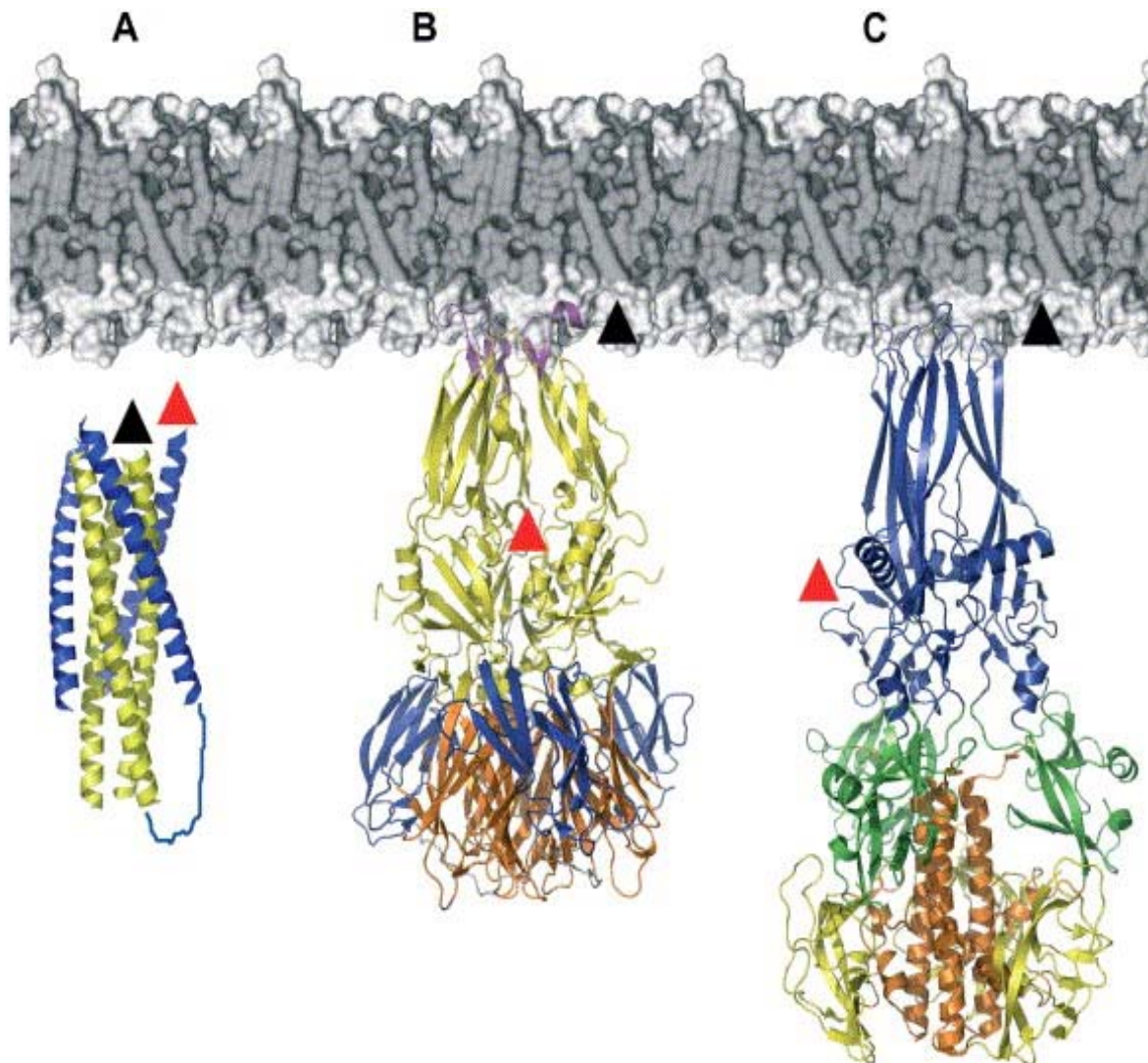


Figura 5: Representação esquemática das estruturas das proteínas de fusão de classes I, II e III no estado conformacional pós-fusogênico. (A) Proteína gp41 do HIV-1 (classe I); (B) Proteína E dos flavivírus (classe II); (C) Glicoproteína G do VSV (classe III). As posições da porção transmembrana (triângulo vermelha) e do peptídeo de fusão (triângulo preto) estão indicadas. Os elementos estruturais que levam às alterações do estado de pré-fusão para o estado de pós-fusão estão representados por diferentes cores nas figuras B e C. As alterações estruturais da proteína gp41 do estado pré-fusão para o estado pós-fusão ainda é desconhecido. Retirado de Weissenhorn et al., 2007.

As proteínas de classe I são exemplificadas pelas proteínas de fusão dos ortomixovírus (Wilson et al., 1981; Bullough et al., 1994), retrovírus (Fass et al., 1996), coronavírus (Xu et al., 2004a; Xu et al., 2004b), filovírus (Weissenhorn et al., 1998), e paramixovírus (Chen et al., 2001; Yin et al., 2005; Yin et al., 2006). Elas formam espículas triméricas no envelope viral, com estrutura predominantemente em α -hélices. São sintetizadas como uma proteína precursora, que após clivagem proteolítica gera duas subunidades que permanecem ligadas entre si, seja por pontes dissulfeto ou ligações não covalentes. Uma das subunidades é responsável pela interação inicial com a molécula receptora na membrana alvo. Já a outra, que se encontra ancorada no envelope viral, contém na extremidade N-terminal uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos, que está diretamente relacionada com a fusão de membranas. Após a ligação ao receptor celular ou a exposição ao baixo pH, a proteína de fusão muda parcialmente de conformação, mantendo-se em trímeros, e o peptídeo de fusão é então inserido na membrana alvo, catalisando a reação de fusão. A conformação pós-fusão apresenta uma estrutura bastante típica, conhecida como hairpin, ou grampo de cabelo (fig. 5A).

As proteínas de fusão de classe II são encontradas nos alfavírus (Lescar et al., 2001; Gibbons et al., 2004) e flavivírus (Rey et al., 1995; Modis et al., 2003; Modis et al., 2004). Elas possuem três domínios, que estão principalmente organizados em folhas- β , que também formam hairpins. Estas proteínas formam homo ou heterodímeros, que se encontram paralelos ao envelope viral. O peptídeo de fusão está localizado em um loop entre duas fitas β , que se localiza na interface interna do dímero. Ao contrário das proteínas de classe I, as proteínas de classe II não sofrem clivagem proteolítica durante sua maturação. No entanto, é necessária a clivagem de proteínas de membrana que se encontram associadas a estas proteínas de fusão. Após a exposição ao pH ácido, a proteína se reorganiza em trímeros perpendiculares à membrana viral, expondo o peptídeo de fusão, catalisando a fusão de membranas (Fig. 5B, lilás).

As principais características dessas duas classes de proteínas de fusão estão listadas na tabela 1.

Tabela 1: Comparação entre as proteínas de fusão de classes I e II

Característica	Classe I	Classe II
Maturação para a conformação pré-fusão	Clivagem proteolítica da proteína de fusão	Clivagem proteolítica da proteína acessória
Estrutura secundária predominante	Alfa hélice	Folha beta
Mudança conformacional durante a fusão	Formação de trímeros estáveis	Dissociação do dímero em monômero e reassociação destes em trímeros estáveis
Estrutura pós-fusão	Trímero de hairpins com uma região central em alfa hélice	Trímeros de hairpins compostos de estrutura beta
Localização do peptídeo de fusão (pré-fusão)	Peptídeo localizado na porção N-terminal no interior do trímero	Loop hidrofóbico no interior do dímero

As proteínas de classe III também apresentam trímeros de hairpins, mas combinam elementos estruturais de ambas das proteínas de fusão de classes I e II. Semelhante às proteínas de classe I, apresentam uma região central em α -hélice. No entanto, cada domínio de fusão está localizado na ponta de folhas- β alongadas, característica marcante das proteínas de classe II. Além disso, a glicoproteína dos rabdovírus não sofre clivagem proteolítica e nem é sintetizada associada a alguma outra proteína durante seu processo de maturação, características presentes nas proteínas de classes I e II, respectivamente. Por último, as mudanças conformacionais induzidas por baixo pH nesta proteína são reversíveis, enquanto que nas demais proteínas de fusão são irreversíveis.

Apesar das proteínas de fusão de classes I e II apresentarem importantes diferenças estruturais, os mecanismos de fusão propostos são bastante similares (fig. 5C) (Weissenhorn et al., 1999; Skehel e Wiley, 2000; Bressanelli et al., 2004; Modis et al., 2004; Weissenhorn et al., 2007) e as mudanças conformacionais induzidas durante a ativação da forma não fusogênica para a forma fusogênica são irreversíveis (Carr et al., 1997; Lescar et al., 2001; Stiasny et al., 2001).

A reação de fusão induzida pelas proteínas de classe I (fig. 6A) é iniciada pela ligação do vírus ao seu receptor específico na membrana alvo ou pela exposição ao pH ácido no meio endossomal, sendo desencadeadas mudanças conformacionais que resultam na projeção e inserção do peptídeo de fusão na membrana alvo. Assim, a proteína de fusão fica ancorada na membrana celular, aproximando-se da membrana viral (Fig. 6Ab). Subsequentemente, ocorre uma reestruturação da proteína, que se “dobra” (Fig. 6Ad), forçando a aproximação da porção N-terminal, que contém o

peptídeo de fusão inserido na membrana alvo, com a porção C-terminal transmembrana, que está ancorada no envelope viral, acarretando a aproximação dessas duas membranas e posterior fusão das mesmas (Fig. 6Af) (Harrison, 2005).

Já o processo de fusão induzido pelas proteínas de fusão de classe II (fig. 6B) inicia-se com a reorganização da proteína em trímeros desencadeada pela exposição ao pH ácido do meio endossomal. Durante este processo, ocorre um rearranjo da orientação relativa dos domínios II e III da glicoproteína, que acarreta na exposição do peptídeo de fusão, que se insere na membrana alvo, com o ancoramento da proteína na membrana celular, como já havia sido descrito para as proteínas de classe I. Posteriormente, ocorre uma reestruturação do domínio III, que leva o peptídeo de fusão e o domínio transmembrana C-terminal para posições justapostas, ocasionando a aproximação das membranas viral e celular (Harrison, 2005).

A desestabilização da membrana alvo pelo peptídeo de fusão e a aproximação com o envelope viral são os processos essenciais para formação da haste de hemifusão (intermediário do processo de fusão, onde as monocamadas externas encontram-se fusionadas, enquanto que as internas não) (Jahn et al., 2003). Este intermediário se forma durante a aproximação das membranas viral e celular. No final da reestruturação das proteínas de fusão de classes I e II, ocorre a formação do poro de fusão que permite a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma (Harrison, 2005).



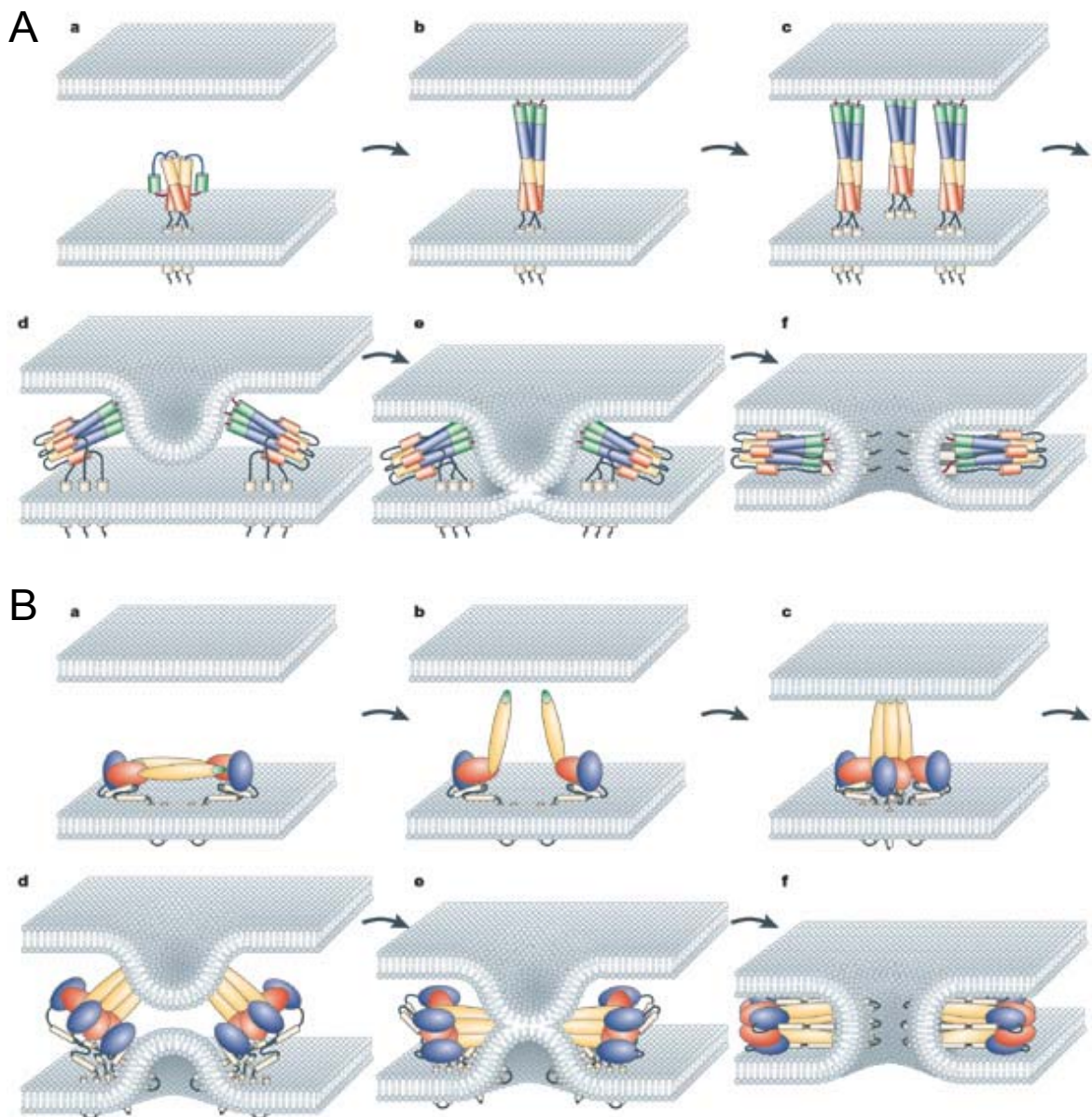


Figura 6: Mecanismos propostos para o processo de fusão catalisado pelas glicoproteínas virais. (A) Proteína de classe I. (a) O trímero da proteína de fusão na sua forma metaestável é representado ancorado no envelope viral, com seu peptídeo de fusão mostrado pelo círculo rosa escuro. (b) Após a ligação ao receptor celular ou exposição ao pH ácido do meio endossomal, a proteína de fusão adquire uma conformação estendida e o peptídeo de fusão é inserido na membrana alvo. (c) Vários trímeros estão envolvidos no processo. (d) A reestruturação da proteína continua, com o “dobramento” da molécula, que aproxima as membranas viral e celular. (e) É formada a haste de hemifusão e finalmente o poro de fusão (f) após o total rearranjo da proteína de fusão, que adquiriu sua conformação mais estável, onde o peptídeo de fusão e o domínio transmembrana se encontram justapostos. **(B) Proteína de classe II.** (a) O dímero é representado na superfície viral, com o seu peptídeo de fusão interno em verde, domínio I em vermelho, II em amarelo e III em azul. (b) Após exposição ao pH ácido do meio endossomal, os dímeros se dissociam em monômeros e ocorre um

rearranjo na orientação relativa dos domínios II e III, expondo o peptídeo de fusão (círculo verde), permitindo a formação de trímeros e a inserção do peptídeo de fusão na membrana alvo. (c) Reassociação dos monômeros formando trímeros. (D) A reestruturação da proteína continua, com o “dobramento” do domínio III, que aproxima as membranas viral e endossomal. (e) É formada a haste de hemifusão e finalmente o poro de fusão (f) rearranjo trimérico da proteína de fusão, onde o peptídeo de fusão e a porção transmembrana se encontram próximos. Extraído de Mukhopadhyay et al. (2005).

1.6. Modelo de Estudo I: Proteína E e seu peptídeo de fusão

A proteína E é a maior proteína estrutural do vírus da dengue (75 kDa), sendo responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira e pela fusão de membranas, etapa essencial para entrada do vírus na célula hospedeira (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Clyde *et al.*, 2006). Esta glicoproteína é composta de três “barris de folhas- β ” (fig. 7A): o domínio I contém a extremidade N-terminal; o domínio II contém uma região de dimerização e o peptídeo de fusão em sua extremidade distal; e o domínio III contém os sítios de ligação ao receptor celular (Modis *et al.*, 2003). A proteína E encontra-se na forma de homodímeros dispostos paralelamente à superfície viral em pH neutro, com seu peptídeo de fusão inacessível ao meio externo (fig. 7A) (Modis *et al.*, 2003).

A proteína E é classificada como uma proteína de fusão de classe II, devido a sua estrutura ser formada principalmente por folhas- β e de seu peptídeo de fusão estar localizado no meio da sequência da proteína (Modis *et al.*, 2004).

A reorganização estrutural necessária para aquisição da conformação fusogênica é desencadeada pela exposição da proteína E ao pH ácido e se inicia pelo rearranjo das orientações relativas dos domínios da proteína E (figs. 8A e 8B) (Modis *et al.*, 2004). O domínio II gira aproximadamente 30° em relação ao domínio I. Já o domínio III sofre um maior deslocamento na transição de dímero para trímero, pois gira cerca de 70° e desloca seu centro de massa 36 \AA à frente do domínio II, fazendo com que ele não se encontre mais estendido linearmente junto com os domínios I e II. Estas reorientações são responsáveis pela formação dos trímeros, exposição do peptídeo de fusão e formação da haste de hemifusão (explicada anteriormente). O processo continua com a reestruturação do domínio III, que aproxima o peptídeo de fusão e a porção transmembrana, ou seja, as membranas viral e endossomal. Com isso é

formado o poro de fusão, permitindo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Resumidamente, quando o pH é acidificado, ocorre a conversão irreversível dos homodímeros para homotrímeros (Allison *et al.*, 1995; Stiasny *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 2002), com exposição do peptídeo de fusão no topo do trímero e consequente início da reação de fusão (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). O peptídeo de fusão durante toda a reestruturação da proteína E se mantém com a mesma conformação (Modis *et al.*, 2004).

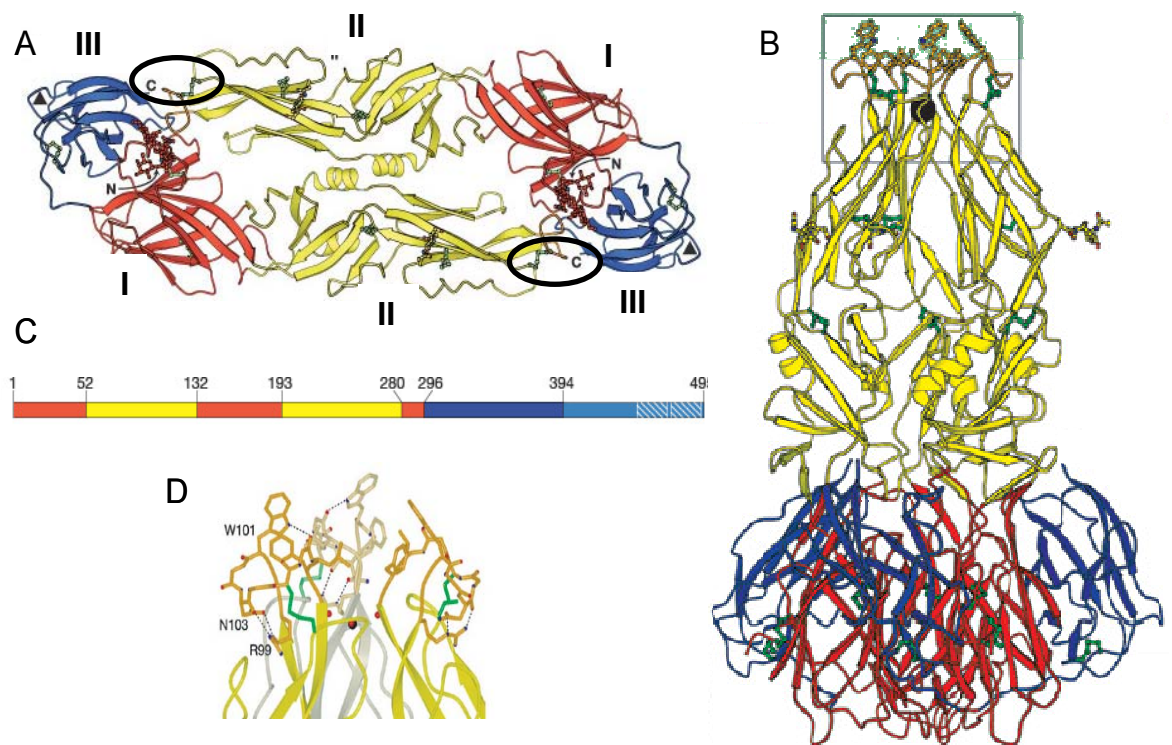


Figura 7: Estrutura cristalográfica da proteína E do vírus da dengue. (A) Conformação pré-fusogênica - Visão do homodímero. **(B)** Conformação pós fusogênica - Visão do trímero. **(C)** Diagrama linear mostrando os resíduos de aminoácidos correspondentes a cada domínio. **(D)** Maior detalhe da ponta do trímero, onde está localizado o *loop* de fusão, mostrando a presença dos aminoácidos hidrofóbicos.

Domínio I em vermelho, domínio II em amarelo e domínio III em azul. O peptídeo de fusão (aa 98-110) está circulado e marcado pela letra C. A letra N marca o sítio de glicosilação. O triângulo marca o *loop* de ligação ao receptor celular. Adaptado de Modis *et al.* (2004).

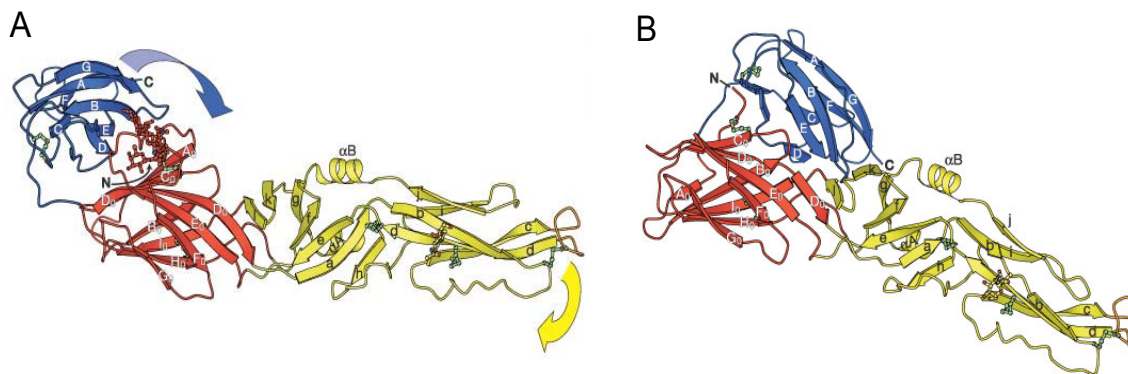


Figura 8: Rearranjo dos domínios da proteína E durante a transição para a formação do trímero. (A) Estrutura do monômero na conformação pré-fusogênica, encontrada nos dímeros de proteína E em pH neutro. **(B)** Estrutura do monômero na conformação pós-fusogênica, encontrada nos trímeros após exposição ao pH ácido. Ocorre um rearranjo dos domínios II e III (demonstrado pelas setas em A), que mudam sua orientação relativa, fazendo com que o C-terminal se aproxime do peptídeo de fusão, ficando 39 Å mais perto. O peptídeo de fusão permanece essencialmente com a mesma conformação antes e depois da fusão. Adaptado de Modis *et al.* (2004).

Observa-se no alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas E uma homologia de 62 a 77% entre os quatro sorotipos de vírus da dengue e de 40 a 45% entre os diferentes flavivírus. A região entre os resíduos 98 e 110 é idêntica em todos os flavivírus, exceto por uma única substituição no vírus *tick-borne encephalitis* (TBE) (fig. 9). Esta região é considerada o peptídeo de fusão, visto que possui grande homologia entre os flavivírus e encontra-se exposta nos homotrímeros de proteína E (figs. 7B e 7D). Além disso, substituições de aminoácidos nesta região foram capazes de abolir a fusão de membranas mediada pela proteína E (Allison *et al.*, 2001).

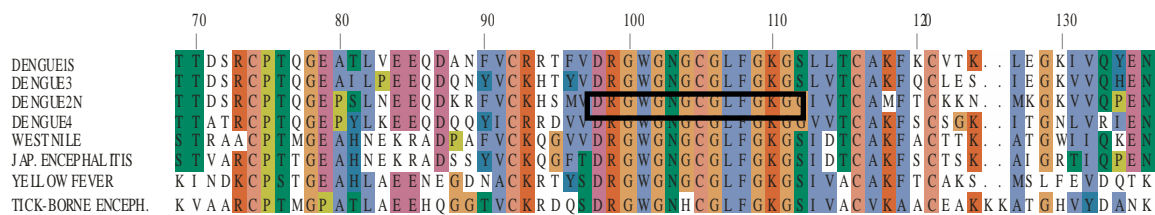


Figura 9: Alinhamento da região do peptídeo de fusão da glicoproteína E de alguns flavivírus. Dengue tipo 1 (cepa Singapura S275/90); dengue tipo 3; dengue tipo 2 (Nova Guiné C); dengue tipo 4; vírus do Nilo do Oeste; encefalite japonesa (cepa Nakayama); febre amarela (cepa 17D) e encefalite transmitida por carrapato (cepa Neudoerfl). A sequência do peptídeo de fusão (D98 A G112) está representada pela caixa preta.

Como mencionado anteriormente o peptídeo de fusão do vírus da dengue compreende uma sequência de 15 resíduos localizada na interface dos domínios II e III do dímero da glicoproteína E (Fig. 7A). Recentemente, Stauffer *et al* (2008) utilizaram diversas técnicas espectroscópicas para avaliar a interação do peptídeo de fusão com membranas miméticas. Usando um peptídeo sintético com uma sequência de 36 resíduos (K88 a K123), estes autores observaram que este peptídeo interage com membranas modelos, independentemente da composição destas membranas. Entretanto, quando colocado na presença de vesículas aniônicas, os autores observaram um maior grau de interação peptídeo:lipídeo e ainda um processo de oligomerização deste peptídeo na camada externa da membrana (Fig 10) (Stauffer *et al*, 2008, anexo I). Ainda, esta oligomerização depende da razão peptídeo:lipídeo na amostra, sugerindo que se esta razão for elevada, há a oligomerização.

Nesta tese, utilizamos a sequência do peptídeo de fusão de 15 resíduos (D98 ao G112) (Fig. 10), correspondente a sequência exata do peptídeo responsável pela fusão do envelope viral com a membrana endossomal. Utilizando diversas técnicas espectroscópicas, tais como a ressonância magnética nuclear e a espectroscopia de fluorescência temos como objetivos determinar a estrutura tridimensional deste peptídeo ligado a membranas miméticas bem como entender o processo de fusão dos flavivirus.

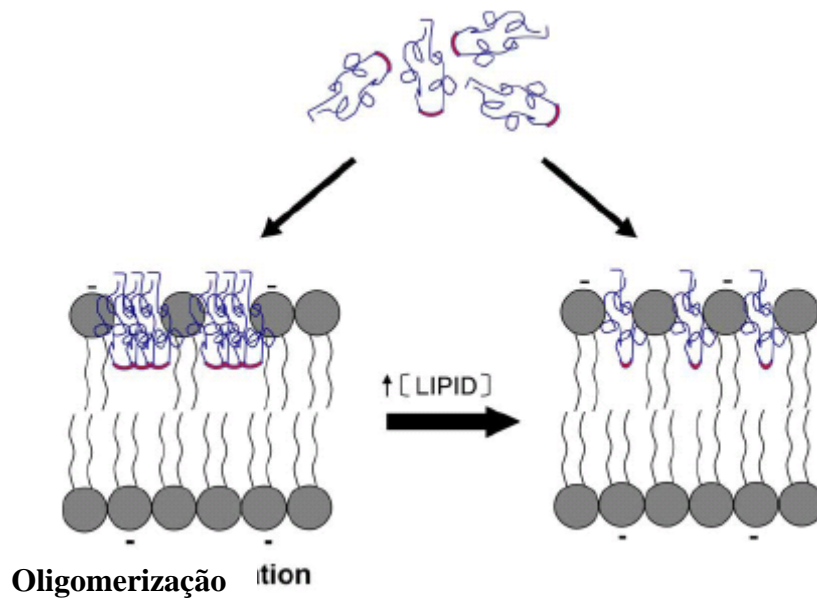


Figura 10: Mecanismo proposto para a interação do peptídeo de fusão com vesículas lipídicas. O peptídeo de fusão interage mais extensivamente com vesículas lipídicas aniônicas. O mecanismo da interação depende da razão peptídeo:lipídeo na amostra. Em uma elevada razão, a oligomerização ocorre devido à uma aglomeração quase completa do peptídeo na metade externa da camada lipídica, levando a uma conformação mais compacta. Em maiores concentrações de lipídeo o peptídeo sofre uma alteração conformacional pequena, que leva a uma supressão de fluorescência do resíduo de Trp101 sem alterar sua localização na membrana. (Retirado de Stauffer *et al*, 2008).

1.7. Modelo de Estudo II: Proteína capsídica do vírus da Dengue Tipo 2 (DEN2C)

A estrutura do vírus da dengue, recentemente resolvida por crio-microscopia eletrônica e por reconstrução tridimensional elucidou a organização molecular da via de montagem dos flavivírus (Kuhn *et al*, 2002; Rushika e Kuhn, 2008). Esta organização mostra que o nucleocapsídeo apresenta metade da densidade observada na parte mais externa da partícula, sugerindo uma desordem ou uma movimentação do nucleocapsídeo (Kuhn *et al*, 2002; Jones *et al*, 2003). Ainda, a organização do nucleocapsídeo dentro da partícula viral indica que a proteína C está em contato direto com o RNA genômico.

Um fenômeno comum durante a infecção dos flavivírus é a produção e liberação para o meio extracelular de partículas semelhantes ao vírus maduro (VLPs) (Mandl,

2004). O nucleocapsídeo não encontra-se presente nestas VLPs, tornando-os não-infecciosos. Entretanto, relatos na literatura mostram que há a produção de nucleocapsídeos vazios na presença da proteínas prM e E somente (Ferlenghi *et al*, 2001; Jones *et al*, 2003; Mandl, 2008). Desta forma, a capacidade da proteína E, na presença da prM, de formar uma cápsula proteica esférica é uma propriedade intrínseca destas duas proteínas e é independente da formação do nucleocapsídeo. Entretanto, a produção de partículas infecciosas necessita da formação do nucleocapsídeo, o que sugere que um estágio primário da montagem viral envolve a interação da proteína C com o RNA genômico (Khromykh *et al*, 1996, Jones *et al*, 2003, Mandl, 2004).

A forma madura da proteína C do vírus da dengue tipo 2 (DEN2C) é uma proteína altamente básica com massa molecular de 12 kDa e que apresenta baixa conservação de aminoácidos entre os flavivírus. Os 20 resíduos hidrofóbicos do C-terminal do precursor da proteína C ancora esta proteína ao lado citoplasmático das membranas do retículo endoplasmático (RE) e funciona como uma sequência sinal para a translocação da proteína prM para o lúmen do RE (Jones *et al.*, 2003). A proteína C encontrada nos vírions não possui esta sequência sinal devido à uma clivagem proteolítica pela protease viral NS2B-NS3 (Amberg *et al.*, 1994). A forma madura da proteína C permanece associada às membranas intracelulares via uma sequência hidrofóbica interna (IHS) que é conservada entre os flavivírus (Markoff *et al.*, 1997). Apesar da baixa identidade de sequência da proteína C entre os flavivírus, algumas características são bem conservadas em todos todos eles (fig. 11). Primeiramente, a referida proteína é altamente básica, refletindo sua função na ligação e no encapsulamento do RNA viral. Segundo, a proteína C possui, uma sequência que varia de 12 a 22 aminoácidos hidrofóbicos ao longo das diferentes espécies de flavivírus (IHS). Um outro fato importante é que estado dimérico da proteína C é aparentemente conservado, uma vez que em casos como do DEN2C, do WNV, do KUN, do vírus da febre amarela e do TBE, a proteína é dimérica em solução (Jones *et al.*; 2003, Kiermayer *et al.*; 2004; Ma *et al.*, 2004, Patkar *et al.*, 2007).

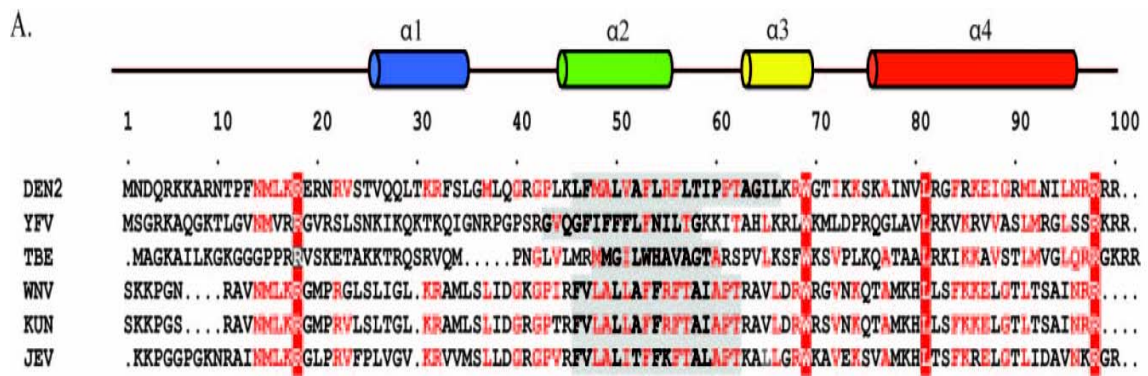


Figura 11: Alinhamento de sequência da proteína C de alguns flavivírus. Os resíduos com alta similaridade estão mostrados em vermelho e os mais conservados estão indicados pela barra vermelha sólida. O IHS está mostrado em cinza. A estrutura secundária da DEN2C está indicada no topo e mostra as regiões com estrutura em alfa hélice (1-4) (retirado de Patkar *et al.*, 2007). Seu único resíduo de Trp está localizado na posição 68 da hélice 3.

A estrutura da proteína C do vírus da dengue tipo 2 (DEN2C) expressa em *Escherichia coli* foi determinada recentemente por ressonância magnética nuclear e mostrou que a proteína é um dímero em solução e cada subunidade é composta de quatro α -hélices (α 1 até α 4) (Ma *et al.*, 2004) (fig. 12). Neste trabalho, os 20 resíduos do domínio N-terminal estão desestruturados em solução. As primeiras três hélices formam uma *right-handle bundle* que compreende o a região mais compacta do monômero da DEN2C, e a α 4, a mais longa hélice, estende-se ao longo desta região (Ma *et al.*, 2004). Ainda, a α 4 de cada monômero mostra uma elevada densidade de resíduos básicos na superfície acessível ao solvente (figs. 12. B, C e D).

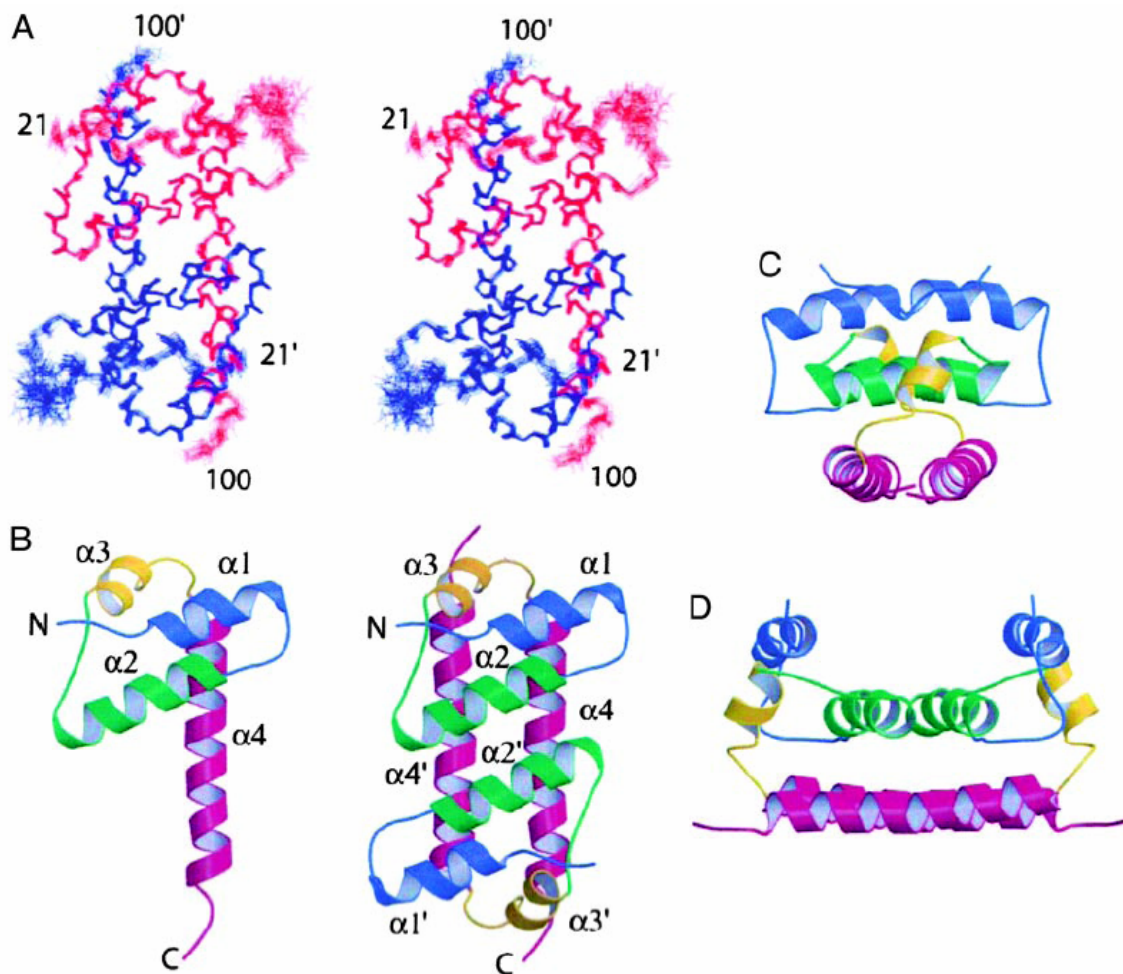


Figura 12: Estrutura da DEN2C (resíduos 21-100) em solução por RMN. Hélice [1 (azul), 2 (verde), 3 (amarelo) e 4 (magenta)]. A, visão estéreo da cadeia de 20 estruturas obtidas em solução. B, diagrama de tiras monômero (à esquerda) e do dímero de DEN2C (à direita). C, rotação de 90° de B sobre um eixo horizontal. D, Assim como na C, rotação a 90° sobre um eixo vertical. (Adaptado de Ma *et al.*, 2004).

A estrutura da proteína C mostra que a α -4 do C-terminal contribui de forma significativa para mantê-la no estado dimérico e ainda possui características do tipo *coiled-coil* (Ma *et al.*, 2004) (fig. 12). Recentemente, Patkar *et al.* (2007) observaram que mutações pontuais feitas nos resíduos L81 e V88 da proteína C do vírus da febre amarela desestabilizam a interface do dímero $\alpha 4$ - $\alpha 4'$ mas não interferem significativamente na montagem viral. Entretanto, o duplo mutante L81N-V88N leva à produção de partículas virais não infecciosas, sugerindo que a estabilidade do dímero desta proteína é importante para o processo de montagem do vírus (Patkar *et al.*, 2007).

Desta forma, esta segunda parte do nosso trabalho tem como objetivo estudar as características termodinâmicas das proteínas capsídica do vírus da dengue tipo 2 (DEN2C) com o intuito de obter informações estruturais que servirão de base para um melhor entendimento do processo de montagem do nucleocapsídeo bem como da montagem da partícula viral. Assim, utilizamos técnicas, tais como espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular e alta pressão hidrostática objetivando comparar a estabilidade termodinâmica da proteína do vírus a dengue tipo 2 íntegra (WT) e do mutante I88N, equivalente ao V88N utilizado nos estudos de Patker et al (2007) para a febre amarela.

1.8. Efeito da pressão hidrostática em proteínas

Nas últimas décadas, a utilização da alta pressão hidrostática tem-se revelado uma poderosa ferramenta nos estudos de desnaturação e dissociação de proteínas (Silva e Weber, 1993; Silva *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002). A perturbação causada por este agente físico desloca o equilíbrio entre as suas formas nativa (N) e desnaturada (D) na direção desta última (Royer e Weber, 1986). Sua aplicação afeta exclusivamente interações internas, pela mudança nas distâncias (nos volumes) dos componentes, enquanto a energia total do sistema permanece quase constante (Weber e Drickamer, 1983; Silva e Weber, 1993). Isto faz da pressão uma variável termodinâmica muito interessante para os estudos de montagem proteica, principalmente se comparada à temperatura, que afeta tanto o volume quanto a energia interna do sistema (Mozhaev *et al.*, 1994; Silva e Weber, 1993).

O comportamento de macromoléculas sob alta pressão é governado pelo princípio de Le Chatelier, que prediz que a aplicação de pressão desloca o equilíbrio em direção ao estado que ocupa um menor volume, e acelera processos nos quais o estado de transição tem um volume menor que o estado fundamental. Em outras palavras, ela favorece processos que são acompanhados por mudanças negativas de volume (Mozhaev *et al.*, 1996; Gross e Jaenicke, 1994; Silva e Weber, 1993).

1.9. Fundamentos de Espectroscopia de RMN

A ressonância magnética nuclear é um fenômeno que ocorre quando o núcleo de certos átomos é exposto a um campo magnético estático. Alguns núcleos

experimentam este fenômeno, e outros não, dependendo se eles possuem uma propriedade chamada spin. O momento angular do núcleo pode ser descrito em termos do “número quântico de spin” (I), que varia de forma, e pode assumir os valores de 0, 1/2, 1, 3/2, etc. (James, 1995).

Vários núcleos possuem um número de spin (I) de 1/2 (^1H , ^3H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F) e, portanto, uma distribuição de carga esférica e uniforme. Desta forma, estes núcleos assumem duas orientações diferentes quando colocados em um campo magnético uniforme, possuindo $2I + 1$ estados de magnetização (+1/2 e -1/2). Dentre estes núcleos, os mais utilizados na análise de proteínas, são o ^1H (abundância natural de 99,88%), o ^{13}C (abundância natural de 1,11%), e o ^{15}N (abundância natural de 0,36%), pois são capazes de gerar um sinal plausível de ser identificado por RMN. É importante observar que os isótopos mais comuns do carbono e oxigênio (^{12}C e ^{16}O) não são afetados pelo campo magnético (número de spin = 0) (James, 1995).

Sob ação de um campo magnético (B_0), os spins nucleares 1/2 podem assumir duas orientações, chamadas de α e β , de menor ou maior energia, respectivamente. A diferença de energia (ΔE) das duas orientações é descrita pela Eq. 5 e a diferença de população obedece a distribuição de Boltzmann (Eq. 6). (Wüthrich, 1986). A ΔE dos campos magnéticos atuais está na faixa de radiofrequência. Para se promover transições entre estes estados de energia, pulsos de radiofrequência são aplicados.

$$\Delta E = \gamma h B_0 / 2\pi \quad (\text{Eq. 1})$$

onde h é a constante de Planck. A razão giromagnética γ é uma constante para um tipo particular de núcleo. Por exemplo, um campo magnético B_0 de 14,1 T, a frequência de Larmor para ^1H é 600 MHz, para o ^{13}C é 151 MHz e para o ^{15}N é 60,8 MHz.

A distribuição dos núcleos em diferentes estados de energia (orientações dos spins) sob condições onde o sistema de spin não é perturbado pela aplicação de uma energia de radiofrequência é dada pela equação de Boltzmann:

$$N_a / N_b = \exp^{-\Delta E/kT} = \exp^{-h\nu/kT} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde N_a e N_b representa o número de núcleos no estado de maior e menor energia, respectivamente, k é constante de Boltzmann e T é temperatura absoluta. No caso do

hidrogênio, por exemplo, em um campo magnético de 18,8 T ($\nu_0 = 800$ MHz) no equilíbrio térmico, esta relação é de 0,999872. Isto significa que para cada 1.000.000 de núcleos que estão no estado de maior energia existem 1.000.128 núcleos no estado de menor energia e, portanto, a RMN é uma técnica pouco sensível. Sem este pequeno excesso de núcleos no estado de menor energia não poderíamos ter RMN. Este excesso pode ser representado pelo vetor magnetização resultante M (Fig. 13) (James, 1995).

A condição de Bohr $\Delta E = h\nu$ permite que a ν_0 (frequência de Larmor) da transição nuclear seja escrita como:

$$\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi \quad (\text{Eq. 3})$$

Esta equação é referida como a equação de Larmor.

O vetor M pode ser orientado (excitado) através de pulsos de radiofrequência com o vetor perpendicular ao vetor B_0 e na mesma frequência que a frequência de Larmor (Eq. 7). Após pulso, detecta-se o sinal de ressonância de cada núcleo e determina-se a frequência de precessão do vetor M de cada núcleo. Este fenômeno representa o sinal observado por RMN e é denominado Free Induction Decay (FID), que é representado por uma onda no domínio temporal. Este sinal é processado utilizando-se o formalismo da transformada de Fourier, e o resultado é um espectro no domínio das frequências.

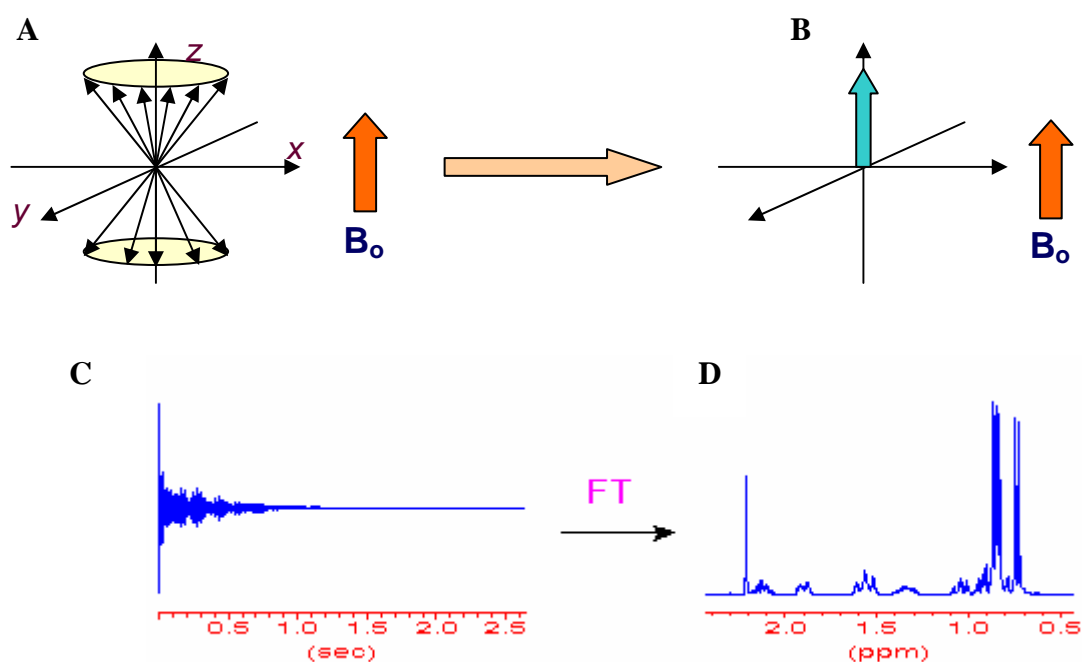


Figura 13: Representação esquemática da rotação da magnetização M do sistema de coordenadas cartesianas na frequência de operação dos instrumentos de RMN. (A) Inicialmente os núcleos atômicos apresentam vetor de campo magnético (μ) sem orientação preferencial, pois os níveis de energia estão degenerados. (B) Os vetores μ orientados através de um campo magnético B_0 , passando a precessar em torno deste campo. Esta orientação no vetor magnetização M (em azul). (C) Detecção do sinal de ressonância de cada núcleo (FID). (D) Obtenção do espectro final de RMN através do formalismo da transformada de Fourier (FT).

1.9.1. Deslocamento químico

Na equação de Larmor podemos observar que o núcleos de diferentes elementos possuem diferentes razões giromagnéticas que gerarão sinais com diferentes frequências em um determinado campo magnético. Além disso, os núcleos encontram-se blindados pelas nuvens eletrônicas que os cercam, cuja densidade varia com o ambiente químico que é dependente da posição relativa do átomo na molécula, ou porque estão ligados a outros átomos ou porque estão espacialmente próximos (no caso de conformação de proteínas) entre si. Esta variação dá origem à absorção em posições diferentes em um espectro de RMN, que chamamos de deslocamento químico, que é definido como uma linha ou um pico ao longo do eixo de frequência. O deslocamento químico é normalmente expresso em ppm (partes por milhão), que é uma forma de normalizar todos os espectros em função da intensidade do campo magnético, e é medido relativamente a um composto de referência (para amostras solúveis em água, utiliza-se geralmente o 3-trimetilsililpropionato).

Na espectroscopia de RMN de ^1H para proteínas podemos distinguir diversos grupos de átomos de hidrogênio pelo deslocamento químico destes e assim é possível interpretar um espectro de RMN através da identificação destes sinais e fazer uma correlação entre o núcleo estudado e o ambiente químico onde ele se encontra. As faixas de valores de deslocamento químico típicos para os sinais derivados de amostras bioquímicas são ^1H , 15 ppm; ^{13}C , 200 ppm; ^{15}N , 40 ppm e ^{31}P , 35 ppm.

1.9.2. TOCSY

O experimento de TOCSY (*Total Correlated Spectroscopy*) consiste em uma sequência de pulsos que induzem a transferência da magnetização de prótons via acoplamento escalar. O TOCSY de proteínas evidencia a interação de prótons de cada aminoácido isoladamente, pois a transferência da magnetização via este acoplamento ocorre através das ligações de cada aminoácido. Nesta representação esquemática de um espectro TOCSY (fig. 14), cada pico (denominado de pico de correlação) observado representa a interação entre dois prótons via acoplamento escalar. O conjunto dos sinais de intercorrelação dos prótons de um aminoácido é denominado de sistema de spins.

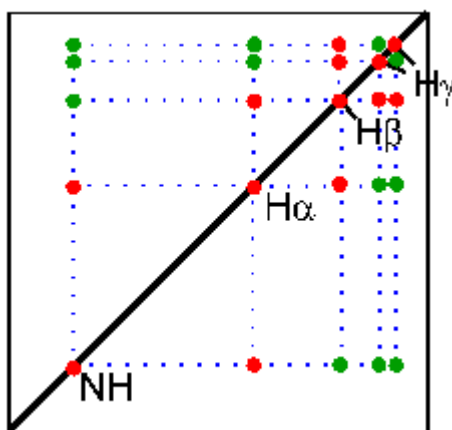


Figura 14: Representação esquemática das correlações observadas em um espectro de TOCSY bidimensional (2D). Os picos de correlação dos prótons, via acoplamento escalar, observados neste experimento são mostrados pelos pontos coloridos. Neste experimento, são observados picos de correlação via três ligações químicas (pontos vermelhos) como também via mais de três ligações químicas (pontos verdes). Tal perfil representa um sistema de spin.

1.9.3. Efeito Overhauser Nuclear (NOE)

O NOE é um parâmetro muito utilizado como uma ferramenta primária na determinação da estrutura tridimensional de macromoléculas. Este efeito acontece quando dois núcleos estão suficientemente próximos espacialmente ($<5 \text{ \AA}$), podendo ocorrer uma transferência de magnetização entre os dois momentos dipolos acoplados, que é chamada de acoplamento dipolar (via espaço).

É possível medir o NOE de espectros bi e tridimensionais (pode-se medir em espectros unidimensionais para moléculas pequenas). A intensidade dos picos no espectro de RMN depende, entre outros fatores, da distância entre os núcleos que estão interagindo, e fornece uma importante informação estrutural. Esta intensidade é proporcional ao inverso da sexta potência da distância entre os átomos, sendo que este tipo de interação é normalmente detectado entre átomos distantes entre si em até 5 Å (Wüthrich, 1986).

1.9.4. NOESY

O NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) é um dos espectros cruciais na determinação de estrutura de proteínas. Este experimento consiste em transferir a magnetização, através de uma sequência de pulsos específica, entre os núcleos dos átomos que estão distantes em até 5 Å, ou seja, que estão próximos espacialmente. O sinal de NOE resultante representa dois núcleos que estão a menos de 5 Å.

Desta forma, é possível identificar a interação entre prótons que estão distantes na estrutura primária, porém próximos na estrutura terciária. O NOE é uma importante ferramenta, pois a partir dela é que obtemos informações dos contatos terciários de uma proteína e conseqüentemente de seu enovelamento tridimensional.

2. Objetivos

Durante a infecção pelo vírus da dengue duas etapas são cruciais para formação da partícula viral madura: a primeira delas é a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, mediado pela glicoproteína E e seu peptídeo de fusão. A segunda etapa também importante é a formação do nucleocapsídeo e empacotamento do genoma viral. Este segundo processo é mediado pela proteína capsídica (DEN2C). Desta forma, nosso trabalho tem como objetivo geral entender com mais detalhes estes dois processos tão importantes para a formação do vírus maduro, o que poderá servir de base para o desenho racional de drogas que visem inibir uma destas ou até mesmo as duas, resultando na inativação da partícula viral.

Já os objetivos específicos desta tese são:

2.1. Modelo de estudo I: Peptídeo de fusão do vírus da dengue.

O processo de fusão de membranas de flavivírus é mediado pela glicoproteína E, uma proteína homodimérica localizada no envelope viral. A acidificação do endossoma gera uma alteração conformacional nesta proteína, resultando na sua trimerização e subsequente exposição de um pequeno *loop* de cerca de 15 resíduos, denominado peptídeo de fusão. Este peptídeo é o responsável pela fusão do envelope viral com a membrana endossomal e subsequente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma.

A estrutura cristalográfica do ectodomínio da glicoproteína E pós-fusão revela o modelo do pequeno peptídeo de fusão inserido na membrana. Entretanto, ainda não há relatos na literatura da estrutura tridimensional do peptídeo de fusão ligado à membranas na condição fusogênica. Desta forma, este trabalho tem como objetivo geral, utilizar as técnicas de espectroscopia de fluorescência e ressonância magnética nuclear para caracterizar funcional e estruturalmente o peptídeo de fusão do vírus da dengue do tipo 2, bem como sua interação com membranas miméticas. Assim, nossos objetivos específicos são:

1. Estudar a interação do peptídeo de fusão do vírus da dengue tipo 2 com membranas miméticas por espectroscopia de fluorescência;
2. Determinar a sua estrutura tridimensional ligado a micelas de detergente por RMN;
3. Avaliar a participação do resíduo de Trp na interação do peptídeo de fusão com vesículas de fosfolípidos na condição fusogênica.

2.2. Modelo de estudo II: Proteína Capsídica do vírus da dengue.

O papel da proteína C na formação da partícula viral madura é crítico, uma vez que esta proteína assegura o empacotamento do genoma viral bem como sua proteção no interior do capsídeo. Diversos estudos mostram que a ausência desta proteína desestabiliza a partícula viral que é formada sem capacidade infecciosa (Ferlenghi *et al.*, 2001). O mecanismo do encapsulamento do genoma viral não somente do vírus da dengue como também de outros vírus ainda não está bem compreendido (Kummerer e Rice, 2002). Além disso, ainda não há muitos relatos na literatura que relacionem a estabilidade termodinâmica destas proteínas com sua função biológica. Desta forma, nosso segundo objetivo é estudar os aspectos termodinâmicos da proteína capsídica do vírus da dengue tipo 2 (DEN2C) e correlacioná-los com sua função. Para tal, utilizamos as proteínas selvagem (WT) e mutante I88N. Este mutante é equivalente ao mutante V88N estudado por Patkar e colaboradores (2007) para a proteína capsídica do vírus da febre amarela.

Assim, temos como objetivos específicos para este segundo modelo de estudo:

1. Purificar em larga escala a proteína capsídica selvagem e o mutante I88N;
2. Avaliar o perfil de estrutura secundária das proteínas por dicroísmo circular;
3. Avaliar e comparar a estabilidade termodinâmica das proteínas através da desnaturação por ureia;
4. Comparar o efeito da alta pressão hidrostática na proteína capsídica selvagem e no mutante I88N;

3. Material e Métodos

3.1. Modelo de Estudo I: Peptídeo de Fusão

Reagentes

As vesículas compostas de fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) de cérebro bovino foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). As vesículas marcadas com sondas fluorescentes N-(sulfonil rodamina Lissamina B) fosfatidiletanolamina Rh-PE), N-(7-benzoexadiazol-4-il) e fosfatidiletanolamina (NBD-PE) foram adquiridas da Molecular Probes Inc. (OR, EUA). O DPC deuterado (d_{38} -DPC) e o SDS deuterado (d_{25} -SDS) foram adquiridos da CIL (Boston, EUA). O peptídeo de fusão sintético compreendendo a sequência D98 a G112 (DRGWGNGCGLFGKGG) e o mutante W101A foram adquiridos da Genemed Synthesis, Inc (Califórnia, EUA).

3.1.2. Preparação das vesículas e ensaios de fusão

As vesículas com 100 nm de diâmetro foram preparadas através do método de extrusão rápida de suspensão de fosfolídeos previamente submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento conforme descrito (Mayer *et al*, 1986). As vesículas foram preparadas em tampão composto de 20 mM MES, 30 mM Tris.HCl, pH 5,5 para os ensaios de fusão ou em tampão composto de 20 mM NaH_2PO_4 , pH 5,5 para as medidas de RMN. Para os ensaios de fusão, quantidades equimolares de vesículas não marcadas e de vesículas marcadas com Rh-PE e NBD-PE a uma concentração final de fosfolídeo de 10 μM foram misturadas e a reação foi iniciada através da adição do peptídeo na concentração final de 18 μM . A fusão foi monitorada através dos ensaios de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) (Struck *et al*, 1981). A intensidade de fluorescência foi monitorada com $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$, correspondente à absorção do NBD e $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$, correspondente a emissão do Rh. Medidas na ausência do peptídeo de fusão, com o objetivo de determinar alguma possível fusão espontânea ou na presença de 0,2% Triton para a determinação da fusão total, foram realizadas em todos os casos.

3.1.3. Medidas de Fluorescência

As medidas de fluorescência intrínseca foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500. A fluorescência intrínseca foi medida excitando-se as amostras a 280 nm e a varredura foi feita de 300 a 420 nm com uma fenda de 8 nm. Após a adição do peptídeo, o sistema foi equilibrado por 5 min antes do início de cada medida.

3.1.4. Espectroscopia de RMN

As medidas de RMN foram realizadas em um espectrômetro Bruker Avance DRX600 (Rheinstetten, Alemanha) e em um espectrômetro Varian Inova AS600 (Palo Alto, EUA), ambos operando a 600 MHz. As amostras foram preparadas com 2 mM de peptídeo de fusão e 100 mM d38-DPC (Cil, Cambridge) em tampão 20 mM NaH₂PO₄, pH 5,5, 10 mM DTT deuterado, 10% D₂O e 0,01% NaN₃. Os espectros de TOCSY ¹H 2D (com spin-lock de 100 ms) e de NOESY ¹H 2D (com spin-lock de 100 ms) foram coletados com 4096 e 512 pontos nas dimensões direta e indireta, respectivamente, com 16 transientes. Os dados de RMN foram então processados através do NMRPipe (Delaglio *et al*, 1995) e os assinalamentos dos deslocamentos químicos foram obtidos usando o programa NMRView (versão 5.0) (Johnson, 2004). A estrutura do peptídeo de fusão ligado a micelas de DPC foi calculada através do programa CNS 1.0. A qualidade da estrutura obtida em solução foi avaliada pelo programa procheck (Laskowski *et al*, 1996). As figuras foram preparadas no programa MOLMOL (Koradi *et al*, 1996).

3.2. Modelo de Estudo II: Proteína Capsídica (DEN2C)

Os tampões utilizados nos experimentos foram de alto grau analítico, sendo preparados com H₂O MilliQ e devidamente filtrados em membranas Milipore 0,22 µm de diâmetro e congelados até o momento de seu uso. O tampão utilizado para estocar a proteína possui a seguinte composição: 50 mM NaH₂PO₄.5H₂O, 0,2 M NaCl, pH 6. Para os experimentos realizados em pH 7,2, a proteína foi diluída neste tampão. Já para os experimentos em diversas condições de pH, utilizou-se um tampão composto de 30 mM ácido cítrico/Hepes, 200 mM NaCl, 5% glicerol, que foi de pH 2,5 até 7,2. A ureia foi adquirida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) foi preparada em seu respectivo tampão e diluída a partir de uma solução pré-existente de concentração determinada pelo seu índice de refração.

3.2.2. Clonagem da proteína DEN2C WT e do mutante I88N

Para a obtenção do mutante I88N, determinamos os códons referentes aos aminoácidos a serem mutados (I88N). O plasmídeo foi metilado através da célula XL1Blue

(pET21a DEN2C metilado). Primers complementares contendo as mutações foram desenhados e seqüenciados (DEN2C I88N F e DEN2C I88N R). Através de uma reação de PCR, as fitas mutantes foram amplificadas com a ajuda da enzima Platinum® Pfx DNA Polymerase. Fizemos a digestão das fitas metiladas com a enzima de restrição DpnI (2h a 37 °C), resultando em apenas fitas contendo a mutação. Foi feita uma precipitação com N-butanol. Para a obtenção do plasmídeo, foi feita uma eletroporação em células DH5 α . Utilizou-se o kit GFX para fazer a mini prep e as amostras foram sequenciadas. Foi feita então uma transformação por choque térmico em células Códon Plus.

Os genes das proteínas DEN2C WT e do mutante I88N foram amplificados por PCR utilizando-se como molde um plasmídeo que contém todo o genoma do vírus da dengue tipo 2 (Nova Guiné). Após purificados através de kit GFX (GE Healthcare), os genes foram digeridos com enzimas de restrição Nde I e Hind III, cujos sítios foram respectivamente adicionados às extremidades 5' e 3' dos primers usados no PCR. Em seguida, eles foram ligados ao vetor pET21a (Novagen, EUA), previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição, usando-se T4 DNA ligase (NEB, EUA). A ligação foi precipitada com 500 μ L de n-butanol e ressuspensa em 10 μ L de água milliQ. A eletroporação para a transformação dos plasmídeos DEN2C WT e do mutante I88N em células bacterianas DH5 α eletrocompetentes foi realizada nas seguintes condições: 2,5 kV, 200 Ohm e 25 μ F. Imediatamente após o pulso, 1 mL de LB foi adicionado à cubeta e toda a suspensão foi então para um novo tubo estéril que foi incubado a 37 °C por 1 h sob agitação. As células foram plaqueadas na presença de ampicilina, uma vez que o vetor de clonagem pET21a tem resistência a esse antibiótico, e a placa foi incubada na estufa por 16h a 37 °C.

Várias colônias foram testadas para a presença dos genes DEN2C WT e do mutante I88N usando-se PCR de colônias. As colônias positivas foram isoladas e crescidas em 10 mL de meio LB líquido contendo 100 μ L de ampicilina (100 μ g/mL final) durante a noite. O DNA plasmidial foi obtido utilizando-se kit de purificação de Miniprep SV spin (Promega, EUA). Os plasmídeos foram então sequenciados na plataforma de sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ usando-se os primers T7 terminator e T7 promoter.

3.2.3. Expressão e purificação da proteína Capsídica (DEN2C)

Segundo protocolo de purificação da DEN2C de Jones e colaboradores (2003), as proteínas WT e mutante I88N foram superexpressas em *E. coli* (cepa BL21(λ DE3)),

contendo o plasmídeo pET21a no qual o gene das proteínas DEN2C WT e I88N foi clonado. As células foram crescidas 37 °C sob agitação (200 rpm) em meio LB contendo Amp (100 µg/mL) e cloranfenicol (0,034 µg/mL) até uma absorbância a 600 nm (DO_{600}) de 0,8-1,0. Após este período 1 mM de IPTG foi adicionado à cultura e a solução agitada a 30°C (200 rpm) por 4 horas. As células foram centrifugadas a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C na Sorvall (rotor GSA).

Os precipitados foram ressuspensos com 70 mL de tampão A (25 mM HEPES, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol). 10 µL de inibidores de protease (PMSF, pepstatina, leupeptina, E64, aprotonina e bestatina) foram adicionados para uma concentração final de 5 µg/µL. A lise das células foi feita com aproximadamente 20 ciclos alternados de N₂ líquido e 42 °C. A amostra foi sonicada com 30 ciclos de 30 segundos cada. A potência usada foi de 60%. A amostra foi então centrifugada na Sorvall a 16000 rpm, 4 °C por 30 minutos (rotor SS34). Em seguida, procederam-se precipitações com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) a 30% e 60%. As amostras foram centrifugadas na Sorval por 30 minutos, 16000 rpm, 4°C (rotor SS34).

Após constatar a presença das proteínas no precipitado de 60% ((NH₄)₂SO₄) por gel de SDS-PAGE 18%, este foi ressuspenso em tampão composto de 25 mM HEPES, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glicerol e a amostra foi aplicada em uma coluna de troca iônica (SP-Sepharose FF, GE, EUA). As proteínas foram separadas em gradiente linear de 200 a 4 M de NaCl. A eluição destas proteínas se dá na concentração de 2,5 M NaCl e sua presença foi confirmada eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE) 18%.

Utilizou-se o sistema de Slide-A-Lyzer de 12mL de cut-off de 3500 Da de para a retirada do sal. Diálises com 1 L de fosfato de sódio 50 mM (NaH₂PO₄), 1 M NaCl, pH 6,0 foram realizadas a 4°C durante dois dias, trocando-se o tampão três vezes utilizando concentrações decrescentes de NaCl (0,5 e 0,2 M). Após a diálise, a amostra foi concentrada usando-se um Centriprep (Millipore, EUA) de 3000 Da de cut-off na centrifuga Eppendorf a uma velocidade de 3000 g a 4°C até cerca de 3 mL de amostra. A concentração final de proteína (3,9 mg/mL para a DEN2C WT e 3,5 mg/mL para o I88N) foi determinada por espectrofotometria usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A preparação de proteína DEN2C (WT e I88N) foi mantida em freezer -86 °C até o momento de sua utilização.

3.2.4 – Cromatografia em gel-filtração das proteínas DEN2C WT e I88N

Para a verificação do estado oligomérico das proteínas purificadas, utilizou-se a coluna TSK-gel G3000SW_{XL} (Tosoh, Tokyo, Japão) acoplada a um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Akta Purifier, GE Healthcare) com absorbância fixa em 280 nm ou 220 nm. O sistema foi equilibrado com tampão 50 mM (NaH₂PO₄), 0,2 M NaCl, pH 6,0 com uma razão de fluxo de 1 mL/min. As corridas foram feitas usando-se as mesmas condições. 50 μ L de cada amostra foram injetadas em cada corrida. As proteínas utilizadas como padrão de peso molecular foram ribonuclease A (15 kDa), quimotripsinogênio A (25 kDa), LexA (45 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa) e β -galactosidase (120 kDa).

3.2.5– Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de CD das proteínas obtidos em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corp, Tokio, Japão) a 25 °C, varridos entre 190 e 260 nm. Utilizamos uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,2 cm. Os espectros foram a média de duas acumulações obtidas a uma velocidade de 20 nm/min. Cada espectro foi subtraído de seu respectivo branco. As proteínas (WT e I88N) a uma concentração final de 10 μ M foram diluídas no tampão composto de 50 mM (NaH₂PO₄), 0,2 M NaCl, pH 6,0 previamente a cada medida. A ureia utilizada nos experimentos foi previamente preparada a uma concentração de 10 M neste mesmo tampão e filtrada. As proteínas a 10 μ M foram diluídas em solução de uréia 8 M final.

3.2.6. Medidas de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro automatizado ISS PC1 (ISS Inc., Champaign, IL), com uma lâmpada de Xe de 300 W, utilizando-se fendas de 2 mm na excitação e 1 mm na emissão. O comprimento de onda de excitação nos experimentos de alta pressão hidrostática foi mantido em 278 nm e a emissão de fluorescência intrínseca da proteína medida de 300 a 420 nm.

Através da espectroscopia de fluorescência é possível estudar as alterações conformacionais na estrutura de proteínas. Quando presentes na sequência de aminoácidos, os resíduos aromáticos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) servem como sondas fluorescentes intrínsecas muito utilizadas em medidas espectroscópicas. O meio no qual estes resíduos se encontram é um fator limitante de sua

capacidade de emissão de fluorescência. Deste modo, é possível monitorar os processos de dissociação/desnaturação proteico através de alterações no espectro de emissão de fluorescência destes resíduos. Em geral, conforme uma proteína é desnaturada, verificamos o deslocamento do espectro de fluorescência para região do vermelho, indicando uma maior exposição do fluoróforo ao solvente. Esta mudança pode ser seguida pelo desvio do centro de massa do espectro. O centro de massa é um parâmetro que traduz o centro de energia do espectro de emissão de fluorescência dos resíduos citados acima e, portanto, sua exposição ao meio aquoso (Macgregor e Weber, 1986; Weber, 1983). O centro de massa do espectro é calculado conforme a expressão abaixo:

$$\langle v \rangle = \frac{\sum v_i F_i}{\sum F_i} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde F_i é a intensidade de fluorescência emitida em um número de onda v_i e o somatório é feito na região onde os valores de F_i são adquiridos. O grau de dissociação a uma pressão P (α_P) está relacionado ao centro de massa pela seguinte expressão:

$$\alpha_P = [1 + Q \cdot (\langle v_P \rangle - \langle v_F \rangle) / (\langle v_i \rangle - \langle v_P \rangle)]^{-1} \quad (\text{Eq. 5})$$

onde Q é a razão entre os rendimentos quânticos das formas desnaturada e nativa, e $\langle v_F \rangle$ e $\langle v_i \rangle$ são os valores do centro de massa das formas final (desnaturada) e inicial (nativa), respectivamente (Paladini e Weber, 1981; Weber e Drickamer, 1983).

Os espectros de emissão de fluorescência nos experimentos na presença ureia foram obtidos em um espectrofluorímetro automatizado Hitachi F-4500 (Tokio, Japão), utilizando-se fendas de 5 nm na excitação e 5 nm na emissão. O comprimento de onda de excitação foi mantido em 278 nm e o da emissão de 300 a 400 nm. As amostras de DEN2C foram incubadas em diferentes concentrações do desnaturante em tampão estoque por 2 h. A mudança de energia livre pôde ser empiricamente correlacionada utilizando-se a seguinte equação (Pace, 1986)

$$\Delta G_u = \Delta G_d - m \cdot [\text{Ureia}] \quad (\text{Eq. 6})$$

onde ΔG_u corresponde à energia livre do processo de desnaturação para cada concentração de ureia, ΔG_d é a energia livre na ausência do agentes desnaturante e m

é a constante de proporcionalidade. A energia livre da dissociação foi calculada usando-se a equação de Gibbs ($\Delta G = -RT \ln K$) e a constante de dissociação para cada concentração de ureia (K_u) foi determinada a partir de valores de α_u (Weber, 1992). A expressão integrada é dada por:

3.2.7. Funcionamento do sistema de alta pressão

Em experimentos de dissociação/desnaturação por alta pressão hidrostática foram utilizados os tampões descritos anteriormente na seção 3.1. Nestes casos, a proteína foi diluída para a concentração desejada e deixada cerca de 5 minutos incubando até equilibrar a temperatura (25 °C).

A bomba de alta pressão consiste de um compartimento de aço inoxidável onde se encontram três janelas de safira: uma para que a luz de excitação atinja a amostra e as outras duas (a um ângulo de 90° em relação à janela de excitação) para que a luz emitida pela amostra passe, sendo detectada por fotomultiplicadoras. A amostra selada dentro de uma garrafa de quartzo é colocada no interior da bomba e preenchida completamente com etanol. Hermeticamente fechada, ela é então acoplada a um gerador de pressão por meio de uma conexão flexível, preenchidos também com etanol, que permite variações de pressão de 1 bar até 3,5 kbar (Figuras 15A e 15B; Paladini e Weber, 1981).

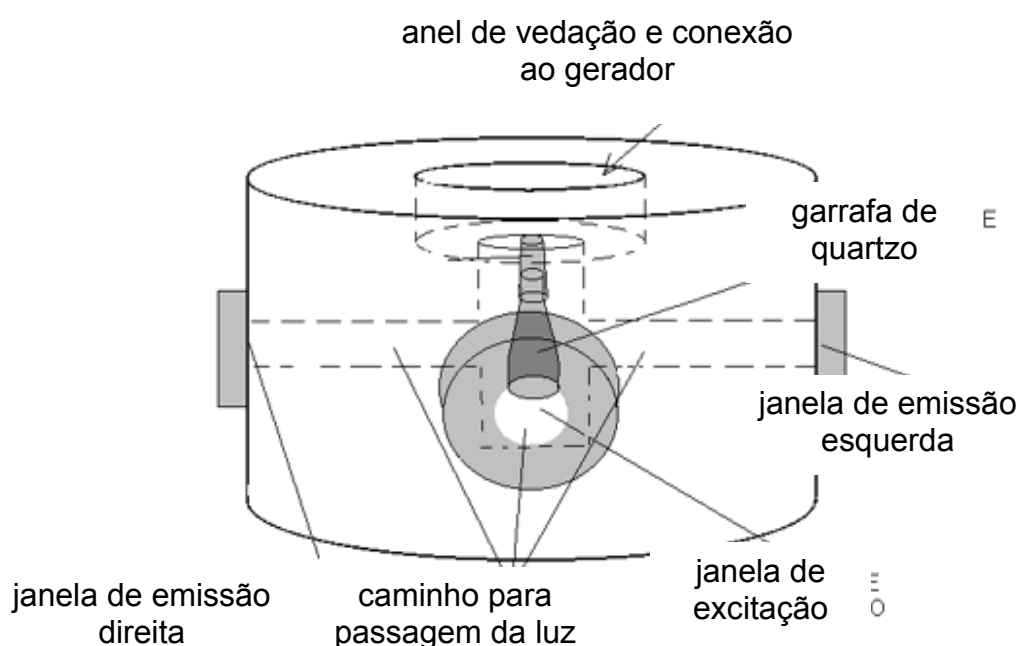


Figura 15A. Esquema da bomba de alta pressão hidrostática.

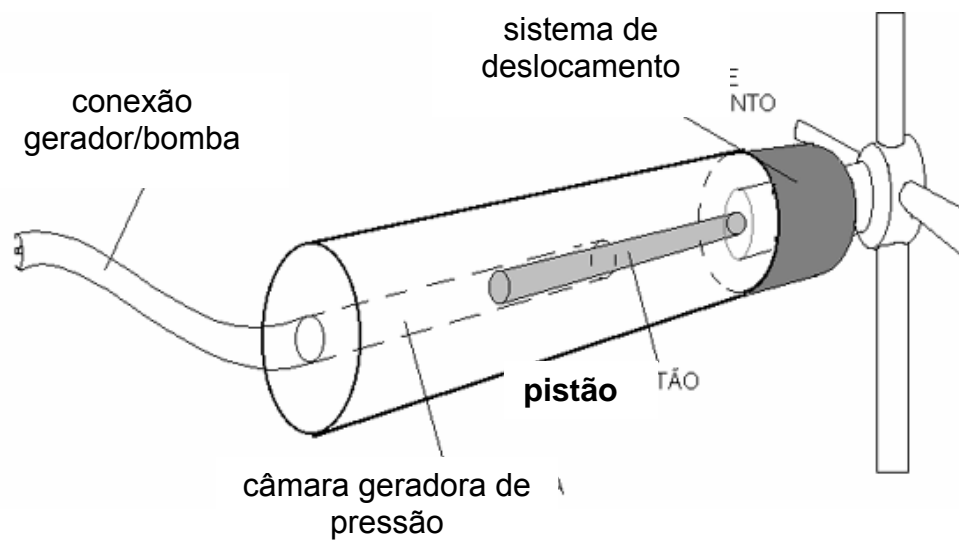


Figura 15B. Esquema do gerador de pressão.

**PARTE I: APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS
REFERENTES AO PEPTÍDEO DE FUSÃO SOB A FORMA DO
MANUSCRITO INTITULADO: “INTERACTION OF THE
DENGUE VIRUS FUSION PEPTIDE WITH MEMBRANES BY
NMR: THE ESSENTIAL ROLE OF THE ENVELOPE PROTEIN
TRP101 FOR MEMBRANE FUSION”**

INTERACTION OF THE DENGUE VIRUS FUSION PEPTIDE WITH MEMBRANES BY NMR: THE ESSENTIAL ROLE OF THE ENVELOPE PROTEIN TRP101 FOR MEMBRANE FUSION

Manuel Nuno Melo^{1,2,3}, Francisco J. R. Sousa¹, Fabiana A. Carneiro², Miguel A. R. B. Castanho³, Ana Paula Valente^{2,4}, Fabio C. L. Almeida^{2,4}, Andrea T. Da Poian², and Ronaldo Mohana-Borges^{1,4}

¹Laboratorio de Genomica Estrutural, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, ²Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil, ³Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Av. Prof. Egas Moniz, Ed. Egas Moniz, 1649-028 Lisbon, Portugal, and ⁴Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Macromoléculas, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil.

Running title: the role of the E protein Trp101 for flavivirus membrane fusion

Address correspondence to: Ronaldo Mohana-Borges, Ph.D., Laboratorio de Genomica Estrutural

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ), Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco C sala 30 sub-solo, Av. Carlos Chagas Filho, s/n -Cidade Universitaria, Ilha do Fundão,

CEP: 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil Tel: 55-21-2562-6538; Fax: 55-21-2280-8193

E-mail: mohana@biof.ufri.br

SUMMARY

Dengue virus (DV) infection depends on a step of membrane fusion, which occurs at the acidic environment of the endosome. This process is mediated by virus surface envelope glycoprotein, in which the loop between residues D98-G112 is considered to be crucial, acting as a fusion peptide. Here, we have characterized functionally and structurally the interaction between the DV fusion peptide and different model membranes by fluorescence and NMR. Its interaction was strongest in dodecylphosphocholine (DPC) micelles and anionic PC:PG vesicles, the only that was fused by DV fusion peptide. Three-dimensional structure of DV fusion peptide bound to DPC micelles has been solved by solution homonuclear NMR with an r.m.s.d. of 0.98Å. The most striking result obtained from the solution structure was the hydrophobic triad formed by residues W101, L107 and F108, pointing toward to the same direction, keeping the segment between G102 and G106 in a loop conformation. The interaction of DV fusion peptide with PG:PC vesicles was also mapped by transfer-NOE experiments, in which the majority of the NOE cross peaks were from the hydrophobic triad, corroborating the DPC-bound structure. Substitution of the residue W101 by an alanine residue completely abolished fusion mediated by the peptide and its NOE cross peaks. In conclusion, 15-residue DV fusion peptide has intrinsic ability to promote membrane fusion, most likely due to the hydrophobic interaction among the residues W101, L107 and F108, which maintains its loop in the correct spatial conformation.

Keywords: dengue virus; fusion peptide; membrane fusion; NMR; transfer-NOE

INTRODUCTION

Despite a century of scientific advances, infectious diseases are still one of the main causes of death worldwide.^{1,2} Among mosquito-transmitted diseases, those caused by the dengue virus (DV) pose the most serious public health hazard. The classical form of the disease caused by DV is an acute fever of moderate severity, dengue fever (DF), frequently accompanied by intense pains in muscles, bones and joints. The more severe forms, dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS), can be lethal, and include hemorrhage, thrombocytopenia, and hemoconcentration,^{3,4} whose molecular mechanisms are far from being fully understood.

DV is a member of the *Flaviviridae* family, a group of enveloped viruses containing a positive sense single-stranded RNA genome, which is translated into a polyprotein that is processed in three viral structural proteins [Capsid (C), Membrane (M) and Envelope (E)] and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5).⁵ As for other enveloped viruses, DV infection depends on a step of membrane fusion, which is mediated by the virus surface E glycoprotein. DV is internalized by receptor-mediated endocytosis and fusion occurs between the viral and the endosome membranes at the acidic environment of this compartment. Insights into this protein-mediated process have been achieved by the determination of the pre- and post-fusion structures of the flavivirus E glycoproteins.⁶⁻¹⁰ Exposure to low pH triggers the dissociation of E dimers that lie flat on virion's surface, and promotes a change in their conformation, causing E protein trimers to form and protrude from the envelope.¹¹ The segment between residues 98 and 112 forms a loop in domain II of E glycoprotein⁸

and has been considered to be the fusion peptide of the flaviviruses because: i) it presents almost 100% homology among all the members of the *Flaviviridae* family (it is identical in all of them, except for a single residue in the TBE virus); ii) site-directed mutagenesis in that region prevents the virus fusion¹¹; iii) it is located at the tip of the trimeric fusogenic structure of the protein.⁸ It is suggested that the rearrangement caused by exposure of E protein to low pH starts the fusion process by causing the fusion peptide to become exposed and bind to the target membrane.

X-ray crystallography has been undoubtedly unique in solving the three-dimensional structures of viral proteins at pre- and post-fusion states, providing substantial information concerning the mechanism of interaction between viral glycoproteins and cellular membranes during the fusion process. This has unraveled new potential target molecules for rational drug design,¹² as demonstrated in the development of a peptide inhibitor of HIV-1 fusion,^{13,14} a new class of anti-HIV drugs.^{15,16} However, the mechanism of membrane interaction is indirectly inferred since the structure of viral proteins is not determined in the moment they are bound to membranes. To fulfill this gap, several groups have solved by solution NMR the three-dimensional structure of micelle-bound fusion peptides, such as those from influenza hemagglutinin¹⁷ and HIV gp41,¹⁸ which belong to the class I-type of viral fusion glycoproteins. However, no solution structure is available yet for class II-type fusion peptides in which flavivirus and alphavirus glycoproteins are included.

In a previous study, we have characterized by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy the interaction between a DV E glycoprotein fragment of 36 amino acids containing the fusion loop and phospholipid bilayers.¹⁹ We showed that, despite being a small fragment of the 394-amino acids long E glycoprotein, the peptide was fusogenic by itself. In addition, we found evidence for oligomerization of this

fragment in the membrane, which might reflect the *in vivo* trimerization of the E glycoprotein. In the present work, we have extended this study with a fragment that exactly comprises the conserved fusion peptide, aiming to characterize both structurally and functionally its interaction with membrane models as a means to better understand the role of the fusion loop in the process of the DV infection. It is worth mentioning that, despite the DV E glycoprotein structure at pre- and post-fusion states have been solved by X-ray crystallography, none of them was solved interacting with phospholipids or mimetic membranes. Therefore, using NMR techniques, we determined the structure of the peptide interacting with DPC micelles and mapped the residues that interact with phospholipid vesicles in fusogenic conditions, which revealed a crucial role of the W101.

RESULTS AND DISCUSSION

Kinetics of vesicle fusion induced by wild-type DV fusion peptide

Before solving the three-dimensional structure of the DV fusion peptide, the fusogenic ability of this very short peptide was assessed using a FRET-based assay of lipid mixing (Figure 1A). The result clearly demonstrated that the DV fusion peptide was able to induce vesicle fusion when the LUVs were composed of the anionic phospholipid PG, but not of PC, PE or PS. The requirement of PG for fusogenic activity may be related to specific features of this phospholipid, such as the headgroup itself, rather than a charge effect since no fusion was observed for vesicles containing PS, another negatively-charged phospholipid.

Although the fusogenic capability of the E glycoprotein depends on an intact fusion loop,¹¹ it persists even after stripping the protein down to the loop itself, suggesting that the fusion-active structure is present in that small segment. This

hypothesis has been reinforced by the recent structure solution of prM-E complex, which showed that the M protein binds exactly on the fusion peptide region, blocking premature fusion.²⁰

Fluorescence analysis of the fusion peptide-lipid interaction

The flavivirus E glycoproteins have a tryptophan residue in the fusion peptide sequence that is fully conserved among the members of this family. Tryptophan is known to be an excellent intrinsic fluorescence probe, because its fluorescence spectrum shifts drastically according to the partition degree between the solution milieu and the hydrophobic environment of a membrane, as well as its fluorescence quantum yield.^{21,22} The spectroscopic properties of W101 present in the DV fusion peptide were used to monitor its interaction with LUVs. Fluorescence intensity increased at different degrees depending on the LUV composition, with PC:PG LUVs showing the largest increase (Figure 2A). Knowing that the fusion peptide is in fast equilibrium exchange between its free state in solution and bound to the LUVs (see next), it is plausible to conclude that PG favors a stronger interaction with the fusion peptide, thus enhancing the membrane fusion observed in Figure 1A. Nonetheless, although the fusion peptide binds to PS-containing LUVs, it is not capable of promoting membrane fusion in such a condition. This result clearly indicates that the fusogenic capability of DV fusion peptide, which is positively charged, is specific to the type of LUV component rather than its electrostatic feature only.

Albeit LUVs mimic more realistically the cellular environment encountered by DV during infection, their large correlation time hampers their use in the structure determination of proteins/peptides at high atomic resolution by NMR spectroscopy, since the proton signals of the bound peptide are broadened out. To overcome the peak

broadening, surfactants are used instead vesicles, since they can form micelles of suitable sizes for the NMR technique. The ability of the DV fusion peptide to interact with surfactants was clear from the tryptophan fluorescence change upon addition of either DPC or SDS micelles (Figure 2B). The spectral blue-shift indicated the position of the tryptophan indole side-chain in a less polar environment. Nonetheless, although both surfactants have promoted a blue-shift in the W101 fluorescence spectra (Figure 2B, inset), the increase of its fluorescence intensity in DPC was twice larger than in SDS, what is indicative of a more extensive partition to DPC and/or more hydrophobic local microenvironment for the tryptophan residue. It is worth mentioning that micellar systems mimic quite well biological membranes, in a sense that it provides a non-continuous environment with a water-aliphatic chain interface. However, the combination of the fast dynamic and high curvature of micellar systems makes the aliphatic hydrophobic chains much more available to interact with peptides, meaning that the micelles stabilize the bound conformational state, what is favorable for NMR structural determination. On the other hand, the interaction of the peptide with LUVs is much more sensitive to the chemical characteristic of the phospholipids and thus much more informative about the peptide specificity toward different membranes.²³

Interactions of DV fusion peptide with detergent micelles followed by 1D ¹H NMR

NMR spectroscopy is an excellent technique to map interactions between macromolecules because the nuclei chemical shifts, especially ¹H nuclei, are very sensitive to any change around their environment. More importantly, this technique can identify which nuclei are involved in such interactions. Differences in the ¹H chemical shifts of the peptide upon addition of micelles were an indication of interaction, and also showed that the signal from the micelle-bound peptide protons could be measurable, a

necessary condition for the determination of the interacting peptide structure. In order to determine the best [detergent]/[peptide] ratio to be used for solving the three-dimensional structure of the DV fusion peptide, titrations of 2 mM peptide with increasing concentrations of d₂₅-SDS or d₃₈-DPC were carried out. In the titration with d₂₅-SDS, there were significant ¹H chemical shift changes when 15 mM of this detergent was added but no more change was observed above this concentration. Conversely, in the titration with d₃₈-DPC, large changes in the ¹H chemical shifts of the DV fusion peptide were detected as the detergent concentration was increased from 0 to 64 mM. We observed higher chemical shift dispersion that is suggestive of gain of structure. The increase of d₃₈-DPC to 100 mM did not change chemical shift dispersion, but led to sharp lines, indicating decrease in conformational exchange that usually is interpreted as the stabilization of the bound state of the peptide. No further significant changes were observed above this detergent concentration. Based not only on these titrations experiments but also on the fluorescence experiment, we concluded that the interaction between the DV fusion peptide and d₃₈-DPC would mimic more realistically its interaction with vesicles, and thus with cellular membranes, what led us to choose DPC micelles to perform structure determination. To guarantee that all peptide molecules would be bound to the micelles, 100 mM d₃₈-DPC was chosen in order to obtain a [detergent]/[peptide] ratio of 50:1.

Structure determination of DV fusion peptide in d₃₈-DPC micelles by NMR

The structure of the DV fusion peptide in d₃₈-DPC micelles was solved by 2D homonuclear NMR spectroscopy. There is a good overlap of the backbone of the 20 lowest energy structures after simulated annealing, despite some divergence of the last two residues from both N- and C-termini, due to lack of restrains involving these

residues (Figures 3A and B). From a total of 221 assigned NOE cross-peaks, 114 non-redundant upper-limit constraints were obtained for DV fusion peptide at fusogenic condition (Table I). The average structure of the 20 lowest energy conformers in DPC micelles at pH 5.5 obtained from the initial 200 calculated structures is shown in Figure 3B. They did not violate NOEs and dihedral angle constraints. The overall energy of the selected structures was 42.21 ± 0.87 kcal/mol. The r.m.s.d. among all peptide residues was 1.16 Å for the backbone, whereas 0.19 Å if the residues 2-13 are taken into account. Moreover, the Ramachandran plot analysis showed that 96.5% of the residues are in favored or allowed regions and no residue is in disallowed region (Table I).

The most striking result obtained from the solution structure of DV fusion peptide is the formation of a hydrophobic triad among the residues W101 (red), L107 (black) and F108 (green) all pointing toward the same direction, correlating remarkably well to those of the full-length E glycoprotein fusion loop in either pre- or post-fusion state solved by X-ray crystallography (Figure 5).^{7,8} The loop conformation formed by the segment 101-108 (Figure 3, magenta residues) was maintained, as well as the spatial confluence of the W101 and F108 residues. The interactions among those hydrophobic residues are based on long-range cross-peak NOEs existent between W101 and L107 protons, namely HN-HN, H α -H α , and H β -H β NOEs. A long-range interaction was also observed between H α of W101 and H α of G106. Additionally, the protons of the residues L107 and F108 make several *i, i+1* contacts such as H α -H α , HN-HN, H α -H α , and H β -H β . However, no cross-peak NOE was assigned between W101 and F107 side chains, although they are very close to each other according to the solution structure (Table II). One explanation for this result is possibly the large number of peak overlapping in the NOESY spectrum and/or intrinsic flexibility of the side chain. Furthermore, the segments W101-G102 and G106-L107 are establishing the majority of

the longer-range NOE interactions, which are in agreement with the hydrogen bond formed between the Trp101 H α 1 and the Gly106 carbonyl observed in the X-ray structure; it was also observed that the loop in the 103-105 residues, present in both NMR and X-ray structures, is formed due to the interactions between flanking residues 101-102 and 106-107, despite not being involved in many long range interactions itself. According to the electrostatic surface potential of the DV fusion peptide bound to DPC micelles at fusogenic condition (Figures 4A-D), there is a hydrophobic patch formed by the loop residues W101-F108, which might be responsible for the E glycoprotein penetration into the cellular membrane during the fusion process, as already hypothesized by Modis and co-workers.⁸ Furthermore, the hydrophobic path is surrounded by positive charged residues, characteristic of membrane-interacting peptides.²³

Nonetheless, there are major differences when the structure of the fusion loop segment (W101-F108) of the pre- and post-fusion conformations of the full-length E glycoprotein,^{7,8} which are very similar to each other (Figure 5B), is compared to the structure of the same region bound to DPC micelles (Figures 5A-C). The major prominent difference is the L107 orientation relative to the other hydrophobic residues: its side chain is facing to an opposite direction in relation to the aromatic ring of W101 in the pre- and post-fusion states (respectively, 11.9 and 11.2 Å apart) whereas the side chains of these residues are very close to each other in the DPC-bound state (about 2.4 Å apart) as shown in Figure 4B and in the Table II. This difference in the orientation of the residue L107 among the three structures might be a consequence of the milieu surrounding the fusion peptide since it is surrounded by water molecules in the conditions used to crystallize the pre- and post-fusion states of the full-length glycoprotein, whereas it is surrounded by long hydrophobic chains of the DPC detergent

molecules in the structure determination in solution by NMR. Probably, the detergent side chains might drive thermodynamically the clustering of the hydrophobic triad W101, L107 and F108 present in the DV fusion peptide. We speculate that this driving force might exist *in vivo* as well, since the 15-residue peptide was able to keep its fusogenic activity as shown in Figure 1.

Altogether, these results show that, despite being a 15-amino acid fragment, DV fusion peptide adopts a structure with several similar features to those of the fusion loop in the full-length E glycoprotein when interacting with micelles or bilayers. Moreover, this structural similarity indicates that the local conformation adopted by the segment W101-F108 upon membrane binding is dependent only on interactions established by the fusion loop itself: the remaining domains of the E glycoprotein – namely, the adjacent domain II – play only an adjuvant role in defining the structure of the loop; this might probably explain the loop's fusogenic activity being independent of the presence of those domains, and makes the self-assembling region W101-F108 a putative structural motif responsible for membrane fusion.

Interaction of DV fusion peptide with LUVs monitored by transfer-NOE experiments

As mentioned previously, the large rotational correlation time of the vesicle-bound DV peptide hampers the use of NMR to solve its structure at high resolution. Alternatively, exchange transfer-NOESY (et-NOESY) is a convenient method to obtain structural information on small molecules in association with high molecular weight receptors such as proteins or biomolecular assemblies like phospholipids vesicles.²⁴ This technique permits the detailed structural analysis of high molecular weight complexes that are not feasible by common NMR methods due to fast relaxation processes that ultimately result in broad lines. The method is particularly useful for

structural analysis of proton-rich, flexible ligands that usually have rotational correlation time (ρ_c) near the value for the NOE null condition ($\rho_c = 1.12$, where ρ is the Larmor's frequency) or shorter, which corresponds to a molecular weight of ~ 5 kDa.²⁴ et-NOESY can be applied to systems in fast exchange on the chemical shift timescale, that is, in which the dissociation rate, k_{off} , is larger than the chemical shift difference between the free and the bound forms of the ligand,²⁴ so that ligand protons show a single resonance peak averaged over free and bound states. The build-up of the transferred NOEs requires fast exchange between bound and free states of the ligand, corresponding to a $K_D > 10^{-6}$ M for the complex. Therefore, this strategy is particularly useful for low affinity complexes (micromolar to millimolar range).^{23,25-27}

In this context, 1D ^1H spectra of 400 μM DV fusion peptide were recorded upon addition of increasing concentrations of either PC or PC:PG LUVs, so that peptide spectra were acquired in buffer solution, in 6 and 15 mM PC, and in 6 and 15 mM PC:PG LUVs (data not shown). Clearly, changes and broadening in the proton chemical shifts of the DV fusion peptide were more pronounced when it was incubated with 15 mM PC:PG LUVs, that is, it interacts preferentially with this type of vesicle although some binding also seemed to occur with PC LUVs. This result is in agreement with the observed vesicle fusion behavior shown in Figure 1A and with reported partition extents for the longer DV fusion peptide K88-K123 towards these membranes.¹⁹ Some new peaks appear, especially in the case of PC:PG addition, which indicates that in this situation a measurable amount of peptide is able to exchange quickly between the bound and free states, a necessary condition for the observation of et-NOE signals.²⁴

Several et-NOEs were observed in the 2D ^1H NOESY spectra of the DV fusion peptide in the presence of 15 mM PC:PG LUVs (Figure 6B), but not in buffer solution (Figure 6A), clearly indicating a transient interaction with this vesicle as well as the

adoption of an ordered structure upon binding. Although a structure has not been calculated from the NOE data of the fusion peptide in the lipid vesicles yet, structural information could be obtained from both the TOCSY and NOESY spectra. The changes in the DV fusion peptide chemical shifts observed by ^1H TOCSY spectra upon its binding to the vesicles were used to map the regions of the peptide that interact most with the bilayer (Figure 7A). This result agrees with the number of inter-residue NOEs per proton per residue (Figures 7B and C) because the segments of the peptide that became the most structured upon binding are those that underwent the largest chemical shift change. There is an excellent agreement between the profiles of the number of NOEs per residue upon LUV and micelle interactions. While a structure in LUV was not calculated, the NOE data do validate the use of DPC micelles to mimic the peptide-bilayer interaction since the interaction pattern is the same in both cases.

Mutation of W101 present in the DV fusion peptide abrogates membrane fusion

The NOE information used to calculate the DV fusion structure by NMR shows that the W101 makes important contacts with several residues in the peptide, mainly with L107 and F108. The interaction/proximity of this triad of hydrophobic amino acids keeps the residues between G102 and G106 in the fusion loop conformation.⁸ The essential role of the interaction among the three hydrophobic amino acids in peptide fusogenic activity was confirmed by the complete inhibition of the peptide-induced fusion when W101 was mutated to alanine (Figure 1B). Moreover, no ^1H peak broadening was observed when the W101A peptide was incubated with either PC only or PC:PG LUVs, strongly suggesting that the substitution of the W101 to alanine abrogates the fusion peptide-membrane interaction. This result was further confirmed by the absence

of et-NOEs when 1 mM mutant peptide was incubated with 15 mM PC:PG LUVs (Figure 6B).

Concluding remarks on the structure and function of the DV fusion peptide

The activity observed in DV fusion peptide is remarkable, taking into account its size both in absolute terms (15 residues long), and relatively to the whole protein (~3.8%). The fact that it does display less activity than the longer peptide comprising K88-K123¹⁹ is not surprising: our work shows that there are membrane interacting residues almost up to the termini (Figure 3); the removal of the 10/11 residues flanking the fusion loop in the longer fusion peptide will perturb these interacting residues, both because of the observed increase in flexibility (Figure 3A) as well as the introduction of the terminal NH₃⁺ and COO⁻ charges in a region usually occupied by apolar residues in the full-length E glycoproteins. Nonetheless, our results enable us to propose a putative self-assembling fusion motif in flavivirus fusion peptide, making its interaction with membrane models a very attractive target in the development antiviral inhibitors.

Although several authors have shown that single-point mutations in the fusion peptide sequence (98-112) of flavivirus E glycoproteins can abolish virus entry¹¹, to our knowledge, the importance of W101 residue to the fusion process has never been directly demonstrated as shown here. Among the 15 residues of the peptide, 12 are polar and 3 are hydrophobic (W, F, L). Three residues have membrane-anchoring properties (W, R, K) due to their ability to locate at membrane interfaces.²⁸ However, tryptophan is the residue that most has the tendency to locate at the membrane interface,²⁹ near the carbonyl groups.³⁰ The combined effect of size, rigidity and aromaticity is the main reason for this positioning.²⁸ These properties of tryptophan residues make them adequate to stabilize the interaction of integral membrane proteins

with lipid bilayers;³¹ in some cases an “aromatic belt” is present.²⁸ They may also have crucial contributions to the conformational stability of peptides and proteins,³² making them key players in protein/peptide-membrane interaction. Tryptophan residues serve as anchors at interfaces and have a significant effect on conformation, which in turn is crucial in the adaptation and stabilization of peptides and transmembrane protein segments present in lipid bilayers.

Some membrane-active sequences of viral proteins are Trp-rich.^{33,34} Here we showed that tryptophan mutation leads to a destabilization of the adsorbed conformations of DV fusion peptide, which hampers its subsequent intercalation abrogating fusion. The idea that conformational freedom of membrane-active sequences play a role in fusion has been largely overlooked but is supported by data from other viruses, such as SARS-CoV for instance.³⁵

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals

Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE), and Phosphatidylserine (PS) from bovine brain were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, USA. N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl) phosphatidylethanolamine (Rh-PE), N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) phosphatidylethanolamine (NBD-PE) were purchased from Molecular Probes Inc., OR, USA. d₂₅-SDS and d₃₈-DPC were purchased from CIL (Boston, USA). A 15-amino acid fragment corresponding to the conserved region of the E protein comprising residues 98 to 112 (DV fusion peptide, sequence DRGWGNGCGLFGKGG) and a mutant of tryptophan 101 (W101A) were

used in this study. The peptides were purchased from Genemed Synthesis, Inc (California, USA).

Vesicle preparation and fusion assays

Large unilamellar vesicles (LUVs) with typical 100-nm diameter were prepared by a rapid extrusion method of phospholipid suspensions previously subjected to freeze/thawing cycles as described elsewhere.³⁶ Extrusions were carried out through a 0.1- μ m pore diameter Whatman Nuclepore polycarbonate Track-Etch membrane (Newton, MA, USA) using an Avanti Mini-Extruder (Alabaster, AL, USA). Vesicles were prepared in 20 mM MES, 30 mM Tris.HCl buffer, pH 5.5, for the fusion assays, or in phosphate buffer 20 mM, pH 5.5 for the NMR measurements. For fusion assays, equal amounts of unlabeled vesicles and vesicles labeled with 20 μ M Rh-PE and 20 μ M NBD-PE each (1 mol% lipid composition) at a final phospholipid concentration of 100 μ M were mixed and the reaction was initiated by addition of the peptide final concentration of 18 μ M. Fusion was followed by the resonance energy transfer assay as described elsewhere.³⁷ Fluorescence intensity was followed with $\lambda_{exc} = 470$ nm (NBD absorption) and $\lambda_{em} = 530$ nm (Rh emission). Control measurements in the absence of peptide – for determination of spontaneous background fusion – or with 0.2% Triton X-100 (Sigma Chemical, USA) – for determination of total fusion – were carried out in all cases.

Fluorescence Measurements

Intrinsic fluorescence measurements were recorded using a Hitachi F-4500 Fluorescence Spectrophotometer. Intrinsic fluorescence was measured exciting samples at 280 nm and scanning emission between 300 and 420 nm using a bandwidth

of 8 nm. After addition of the peptide, the system was equilibrated for ~ 5 min before fluorescence was measured.

NMR spectroscopy

NMR measurements were performed in a Bruker (Rheinstetten, Germany) Avance DRX600 or in a Varian (Palo Alto, CA, USA) Inova AS600, both operating at 600 MHz. For the studies in micelles, the sample temperature was maintained at 5 °C. The samples were prepared with 2 mM DV fusion peptide and 100 mM D₃₈-DPC (CIL, Cambridge) detergent in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 5.5, 10 mM deuterated DTT, 10 % D₂O and 0.01% NaN₃. ¹H 2D TOCSY spectra (spin-lock time of 100 ms) were acquired using the MLEV-17 pulse sequence.³⁸ ¹H 2D NOESY spectra were acquired using a 150-ms mixing time.^{39,40} Water suppression was achieved using the WATERGATE technique;⁴⁰ the spectra were collected with 4096 and 512 data points in the direct and indirect dimensions, respectively, with 16 transients. For the studies in LUVs, the sample temperature was maintained at 25 °C. ¹H 2D TOCSY spectra (spin-lock time of 100 ms) were acquired using the MLEV-17 pulse sequence. ¹H 2D NOESY spectra were acquired using a mixing time of 140 ms. The NMR data were processed with NMRPipe.⁴¹ Resolution enhancement was achieved by apodization of the free induction decays with cosine bell multiplication and zero filling. The chemical shift assignments were carried out using the nmrview program version 5.0⁴² and the DV fusion peptide structure bound to DPC micelles was calculated by CNS solve program 1.0. The solution structure quality was evaluated from procheck program (nmr version).⁴³ The figures were prepared using the MOLMOL program.⁴⁴

Reference List

1. Thomas, S. J., Strickman, D. & Vaughn, D. W. (2003). Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv. Virus Res.* **61**, 235-289.
2. Mackenzie, J. S., Gubler, D. J. & Petersen, L. R. (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* **10**, S98-109.
3. Lei, H. Y., Yeh, T. M., Liu, H. S., Lin, Y. S., Chen, S. H. & Liu, C. C. (2001). Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J. Biomed. Sci.* **8**, 377-388.
4. Pang, T., Cardosa, M. J. & Guzman, M. G. (2007). Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol. Cell Biol* **85**, 43-45.
5. Lindenbach, B. D. & Thiel, H.-J. R. C. M. (2007). Flaviviridae: The viruses and their replication. In *Virology (Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M., eds)*, pp. 1101-1152, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
6. Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**, 291-298.
7. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. & Harrison, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *PNAS* **100**, 6986-6991.
8. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**, 313-319.
9. Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F. X. & Rey, F. A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J* **23**, 728-738.
10. Kanai, R., Kar, K., Anthony, K., Gould, L. H., Ledizet, M., Fikrig, E., Marasco, W. A., Koski, R. A. & Modis, Y. (2006). Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. *J Virol.* **80**, 11000-11008.
11. Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W. & Heinz, F. X. (2001). Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J. Virol.* **75**, 4268-4275.
12. Li, Z., Khaliq, M., Zhou, Z., Post, C. B., Kuhn, R. J. & Cushman, M. (2008). Design, synthesis, and biological evaluation of antiviral agents targeting flavivirus envelope proteins. *J Med. Chem* **51**, 4660-4671.
13. Michael, N. L. & Moore, J. P. (1999). HIV-1 entry inhibitors: evading the issue. *Nat. Med.* **5**, 740-742.
14. Perera, R., Khaliq, M. & Kuhn, R. J. (2008). Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res.* **80**, 11-22.
15. Chan, D. C. & Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684.
16. Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M. R., Nowak, M. A., Shaw, G. M. & Saag, M. S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* **4**, 1302-1307.
17. Han, X., Bushweller, J. H., Cafiso, D. S. & Tamm, L. K. (2001). Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 715-720.

18. Li, Y. & Tamm, L. K. (2007). Structure and plasticity of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain in lipid micelles and bilayers. *Biophys. J* **93**, 876-885.
19. Stauffer, F., Melo, M. N., Carneiro, F. A., Sousa, F. J., Juliano, M. A., Juliano, L., Mohana-Borges, R., Da Poian, A. T. & Castanho, M. A. (2008). Interaction between dengue virus fusion peptide and lipid bilayers depends on peptide clustering. *Mol. Membr. Biol.* **25**, 128-138.
20. Li, L., Lok, S. M., Yu, I. M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J. & Rossmann, M. G. (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science* **319**, 1830-1834.
21. Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Plenum Press, New York NY.
22. Santos, N. C., Prieto, M. & Castanho, M. A. (2003). Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim. Biophys. Acta* **1612**, 123-135.
23. Cruzeiro-Silva, C., Gomes-Neto, F., Tinoco, L. W., Cilli, E. M., Barros, P. V., Lapido-Loureiro, P. A., Bisch, P. M., Almeida, F. C. & Valente, A. P. (2007). Structural biology of membrane-acting peptides: Conformational plasticity of anticoccidial peptide PW2 probed by solution NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 3182-3192.
24. Post, C. B. (2003). Exchange-transferred NOE spectroscopy and bound ligand structure determination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 581-588.
25. Vaynberg, J. & Qin, J. (2006). Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends Biotechnol.* **24**, 22-27.
26. Da Poian, A. T., Almeida, F. C. L., Valente, A. P., Mohana-Borges, R. & Neto, F. G. (2008). NMR to access the transient interactions between viral fusion peptides and their target membranes. In *Structure and function of membrane-active peptides* (Castanho, M., ed) IUL Publishers, La Jolla, CA, USA.
27. Valente, A. P., Miyamoto, C. A. & Almeida, F. C. (2006). Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds. *Curr. Med. Chem.* **13**, 3697-3703.
28. Killian, J. A. & von, H. G. (2000). How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 429-434.
29. Wimley, W. C. & White, S. H. (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 842-848.
30. de Planque, M. R., Bonev, B. B., Demmers, J. A., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., Separovic, F., Watts, A. & Killian, J. A. (2003). Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions. *Biochemistry* **42**, 5341-5348.
31. Liu, W. & Caffrey, M. (2006). Interactions of tryptophan, tryptophan peptides, and tryptophan alkyl esters at curved membrane interfaces. *Biochemistry* **45**, 11713-11726.
32. Nemeč, K. N., Pande, A. H., Qin, S., Bieber Urbauer, R. J., Tan, S., Moe, D. & Tatulian, S. A. (2006). Structural and functional effects of tryptophans inserted into the membrane-binding and substrate-binding sites of human group IIA phospholipase A2. *Biochemistry* **45**, 12448-12460.
33. Giannecchini, S., Bonci, F., Pistello, M., Matteucci, D., Sichi, O., Rovero, P. & Bendinelli, M. (2004). The membrane-proximal tryptophan-rich region in the

- transmembrane glycoprotein ectodomain of feline immunodeficiency virus is important for cell entry. Virology* **320**, 156-166.
34. Lu, Y., Neo, T. L., Liu, D. X. & Tam, J. P. (2008). Importance of SARS-CoV spike protein Trp-rich region in viral infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**, 356-360.
 35. Guillen, J., Perez-Berna, A. J., Moreno, M. R. & Villalain, J. (2008). A second SARS-CoV S2 glycoprotein internal membrane-active peptide. *Biophysical characterization and membrane interaction. Biochemistry* **47**, 8214-8224.
 36. Mayer, L. D., Hope, M. J. & Cullis, P. R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta* **858**, 161-168.
 37. Struck, D. K., Hoekstra, D. & Pagano, R. E. (1981). Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**, 4093-4099.
 38. Bax, A. & Davis, D. G. (1985). MLEV-17 based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360.
 39. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenár, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661-665.
 40. Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R. & Saudek, V. (1993). Gradient-tailored water suppression for ^1H - ^{15}N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. *J. Magn. Reson.* **102**, 241-245.
 41. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Guang, Z., Pfeifer, J. & Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**, 277-293.
 42. Johnson, B. A. (2004). Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol. Biol* **278**, 313-352.
 43. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**, 477-486.
 44. Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **14**, 51-55.

FOOTNOTE

We thank Ana Carolina Zeri and Mauricio Sforça of the National Laboratory of Synchrotron Light (LNLS) for helping in the experiment acquisitions on Varian spectrometer. We also thank Jerson Lima Silva from Medical Biochemistry Institute (UFRJ) and Roberto De Guzman from University of Kansas for helpful insights in this project. This work was supported by the following funding agencies: WHO/TDR, CNPq, FAPERJ, TWAS, IMBEBB and PRONEX-FAPERJ. The authors acknowledge a grant from FCT (Portugal) to M. N. Melo and funding from CAPES/GRICES (Brazil, Portugal)

and FCT project PTDC/QUI/69937/2006. F. J. R. Sousa is funded by Ph.D. fellowship from CNPq (Brazil).

“The atomic coordinates for the solution structure of the DV fusion peptide bound to d₃₈-DPC micelles are available in the Biological Magnetic Resonance Databank under BMRB # 20047”.

The abbreviations used are: DV, dengue virus; DF, dengue fever; DHF, dengue hemorrhagic fever; dengue shock syndrome (DSS); E; envelope glycoprotein; TBE, tick-borne encephalitis; NMR, nuclear magnetic resonance; DPC, dodecylphosphocholine; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; Rh-PE, N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl) phosphatidylethanolamine; NBD-PE, N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) phosphatidylethanolamine; LUV, large unilamellar vesicle; TOCSY, total correlation spectroscopy; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; FRET, fluorescence resonance energy transfer; SDS, sodium dodecylsulfate; et-NOESY, exchange-transfer-NOESY.

FIGURE LEGENDS

Figure 1- Kinetics of membrane fusion induced by DV fusion peptide. A) Comparison of peptide-induced fusion of vesicles of different composition: (4:1) PC:PG (dark gray curve), PC (black curve), (4:1) PC:PE (dotted black curve) or (4:1) PC:PS (gray curve)

LUV. **B)** Comparison of the membrane fusion kinetics between the wild type (dark gray curve) and W101A mutant (black curve) DV fusion peptide in (4:1) PC:PG LUVs.

Figure 2- *Interaction of DV fusion peptide with different membrane composition monitored by fluorescence spectroscopy.* **A)** Trp fluorescence emission spectra of the DV fusion peptide in 20 mM MES, 30 mM Tris buffer, pH 5.5, in the absence (continuous trace) and in the presence of LUVs composed of PC (large dashed trace), (4:1) PC:PS (small dashed trace), (4:1) PC:PE (dotted trace), and (4:1) PC:PG (dotted-dashed-dotted trace) LUVs. **B)** Trp fluorescence emission spectra of the DV fusion peptide in buffer (continuous trace) and in the presence of SDS (dashed trace) or DPC (dotted trace) micelles. Inset: normalized spectra.

Figure 3- *Solution structure of the DV fusion peptide bound to d_{38} - DPC micelles at fusogenic pH.* The 20 lowest energy structures showing all atoms are represented in **A** and the average structure showing only the heavy atoms in **B**. The structures are colored as follows: D98-G100 and G109-G112 in blue, W101 in red, L107 in black, F108 in green, and the loop formed by residues G102-G106 in magenta. The acquisition experiments of the NMR spectra were carried out at 5 °C.

Figure 4- *Electrostatic surface potential of the DV fusion peptide bound to d_{38} - DPC micelles at fusogenic pH.* Four views of the surface potential of the average structure shown in Figure 3B: **A)** front view; **B)** rotated 90° along x axis; **C)** rotated 180° along x axis; and **D)** rotated 90° along z axis. Surfaces in red, blue and white represent respectively negatively charged, positively charged and neutral residues.

Figure 5- *Three-dimensional conformation of the DV fusion peptide segment W101-F108 of the full-length E protein at different fusogenic conditions.* In **A** and **C** are represented the DV fusion peptide at pre- and post-fusogenic states, respectively, solved by X-ray crystallography,^{7,8} and in **B** when it is bound to DPC micelles at fusogenic state solved by NMR. The residues colors were the same used in Figure 3. The distances among the hydrophobic residues were measured and presented in Table II.

Figure 6- *Transfer-NOE experiments of wild-type and W101A DV fusion peptide.* Amidic and aromatic proton regions of the NOESY spectra of 1 mM wild-type (spectra **A** and **B**) and W101A (spectra **C** and **D**) DV fusion peptides, in phosphate buffer (spectra **A** and **C**) or in 15 mM (4:1) PC:PG LUVs (spectra **B** and **D**).

Figure 7- A) *Chemical shift deviation of DV fusion peptide upon membrane binding.* Absolute chemical shift change from ¹H TOCSY spectra (not shown) of wild-type DV fusion peptide upon (4:1) PC:PG vesicle addition averaged per residue proton. **B** and **C** are shown the average number of NOE signals per residue proton, differentiated according to NOE range, upon interaction with (4:1) PC:PG LUVs (**B**) or DPC micelles (**C**).

LEGENDS OF THE SUPPLEMENTAL FIGURES

S1- ^1H 1D NMR spectra of 2 mM peptide upon titration with increasing concentrations of either $\text{d}_{25}\text{-SDS}$ (left column) or $\text{d}_{38}\text{-DPC}$ (right column) micelles. The experiment was carried out at 25 $^{\circ}\text{C}$.

S2- Schematic representation of the unambiguously assigned inter-residue NOEs. The thicker bars correspond to stronger NOEs.

S3- ^1H NOESY spectrum regions showing the some major long-range NOEs cross peaks between (A) W101 HN and L107 HN, (B) W101 H ζ 2 and L107 H δ 22, and (C) G105 HN and K110 H δ 1 as well as G105 HN and K110 H β #.

S4- ^1H NMR spectra of 400 μM wild-type (spectra A-E) and W101A (spectra F-J) DV fusion peptides upon titration with either PC or (4:1) PC:PG LUVs. Spectra A and F were obtained in phosphate buffer without LUVs; B and G in 6 mM PC LUVs; C and H in 15 mM PC LUVs; D and I in 6 mM (4:1) PC:PG LUVs; and E and J in 15 mM (4:1) PC:PG LUVs. The experiments were carried out at 25 $^{\circ}\text{C}$.

Figure 1

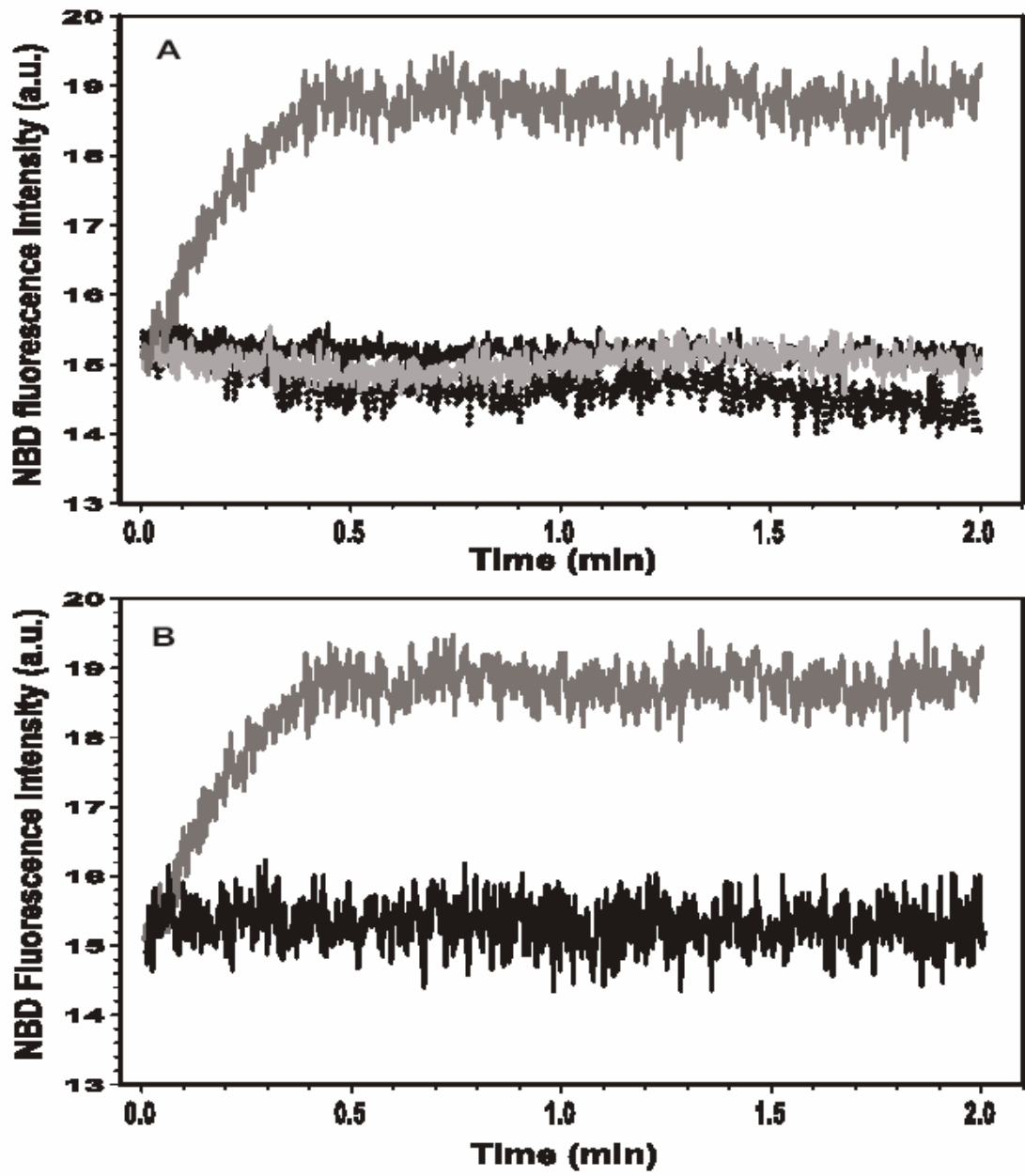


Figure 2

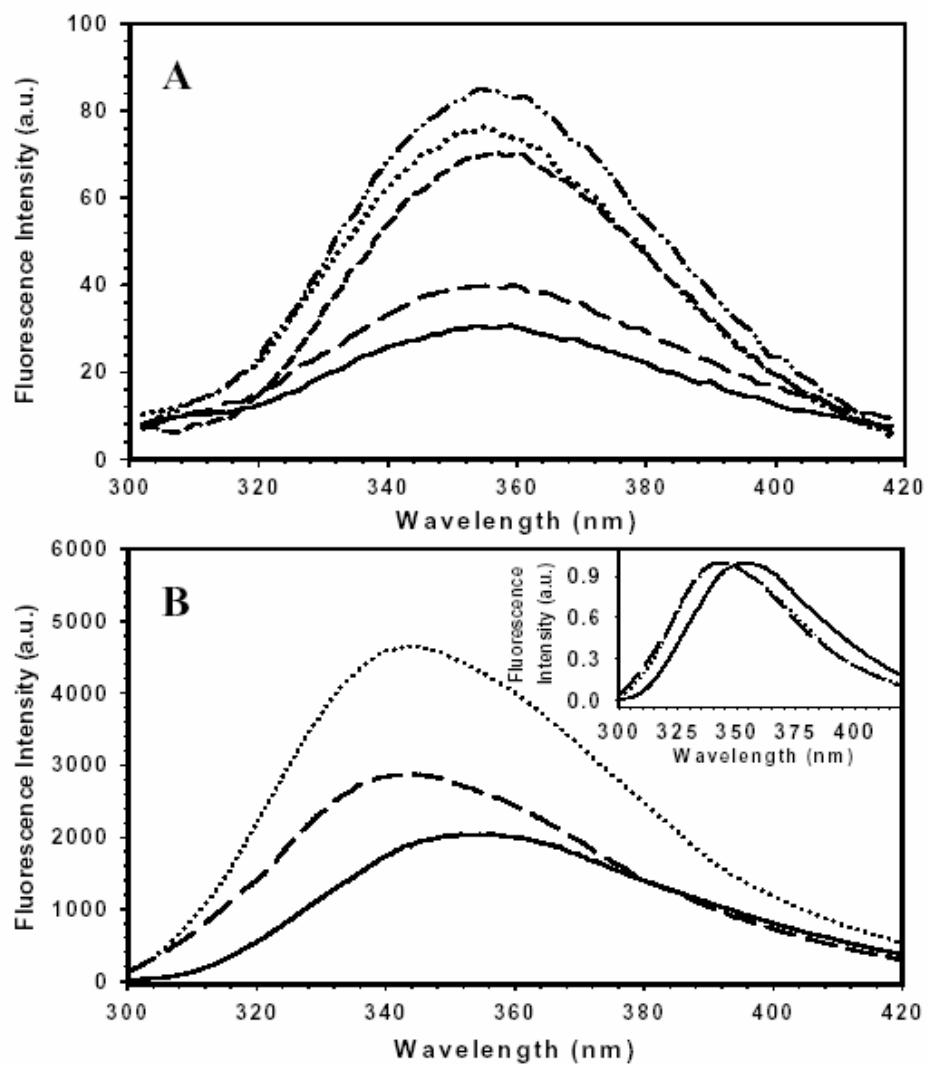


Figure 3

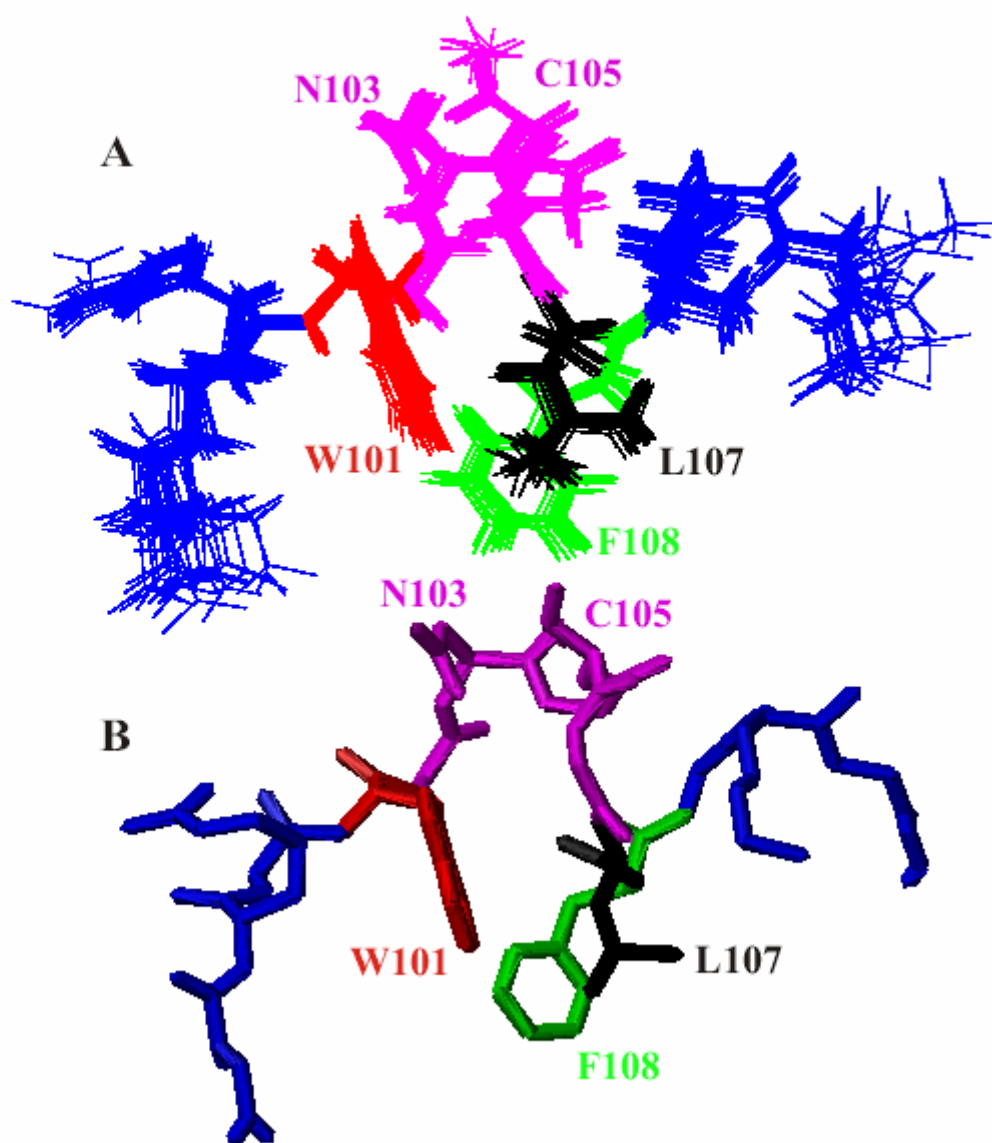


Figure 6

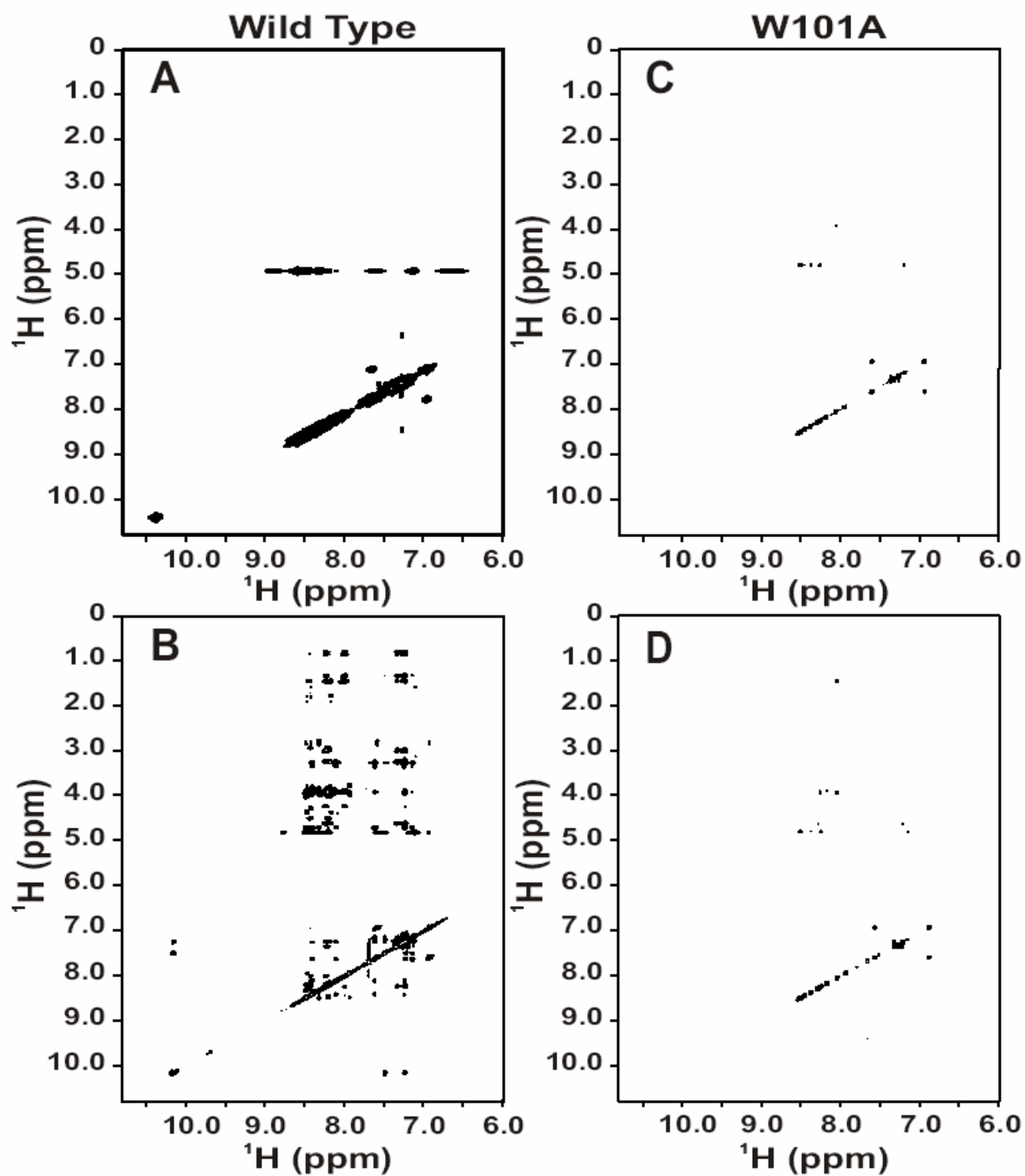
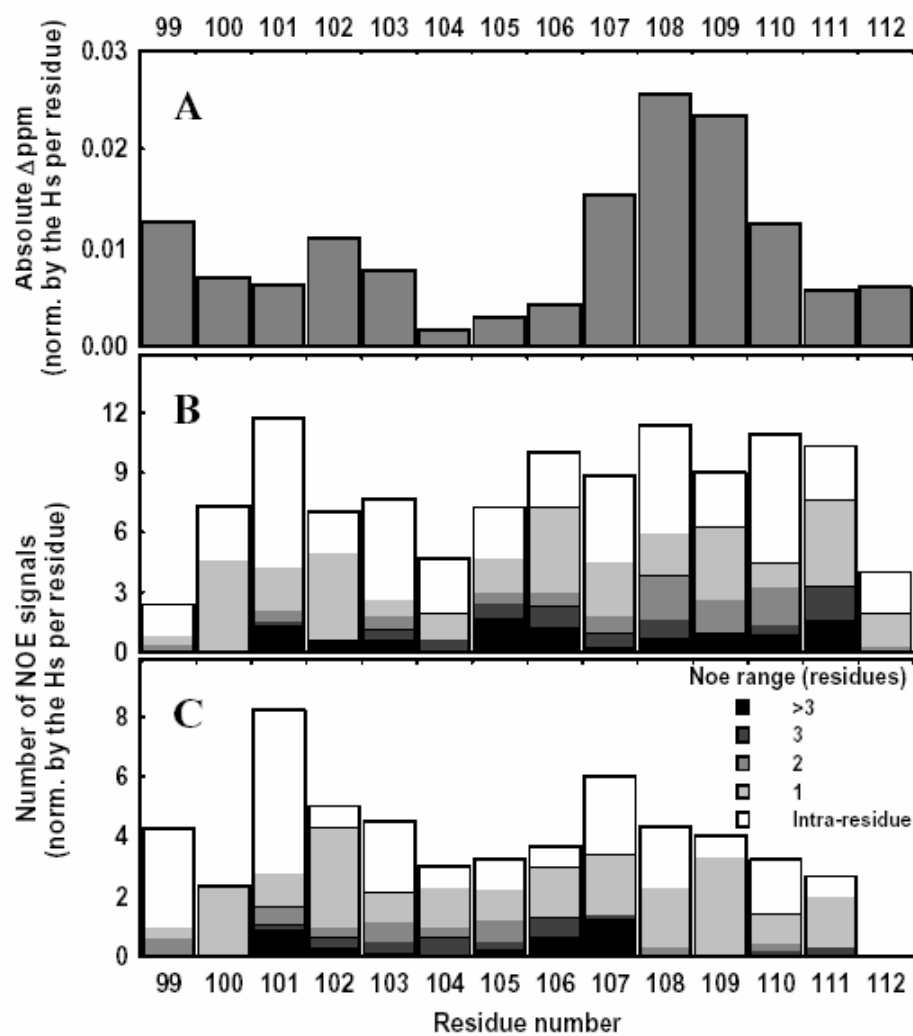
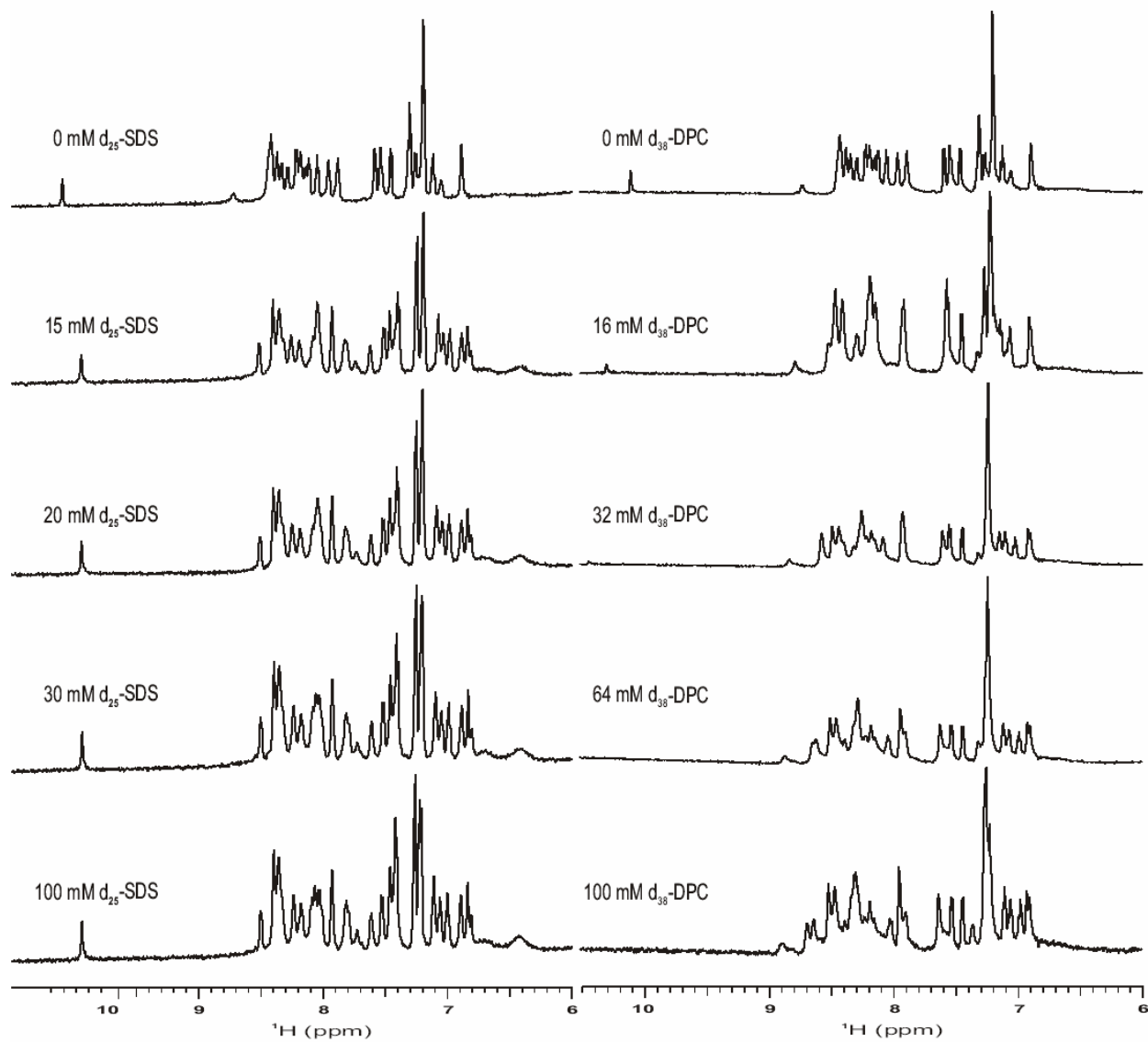


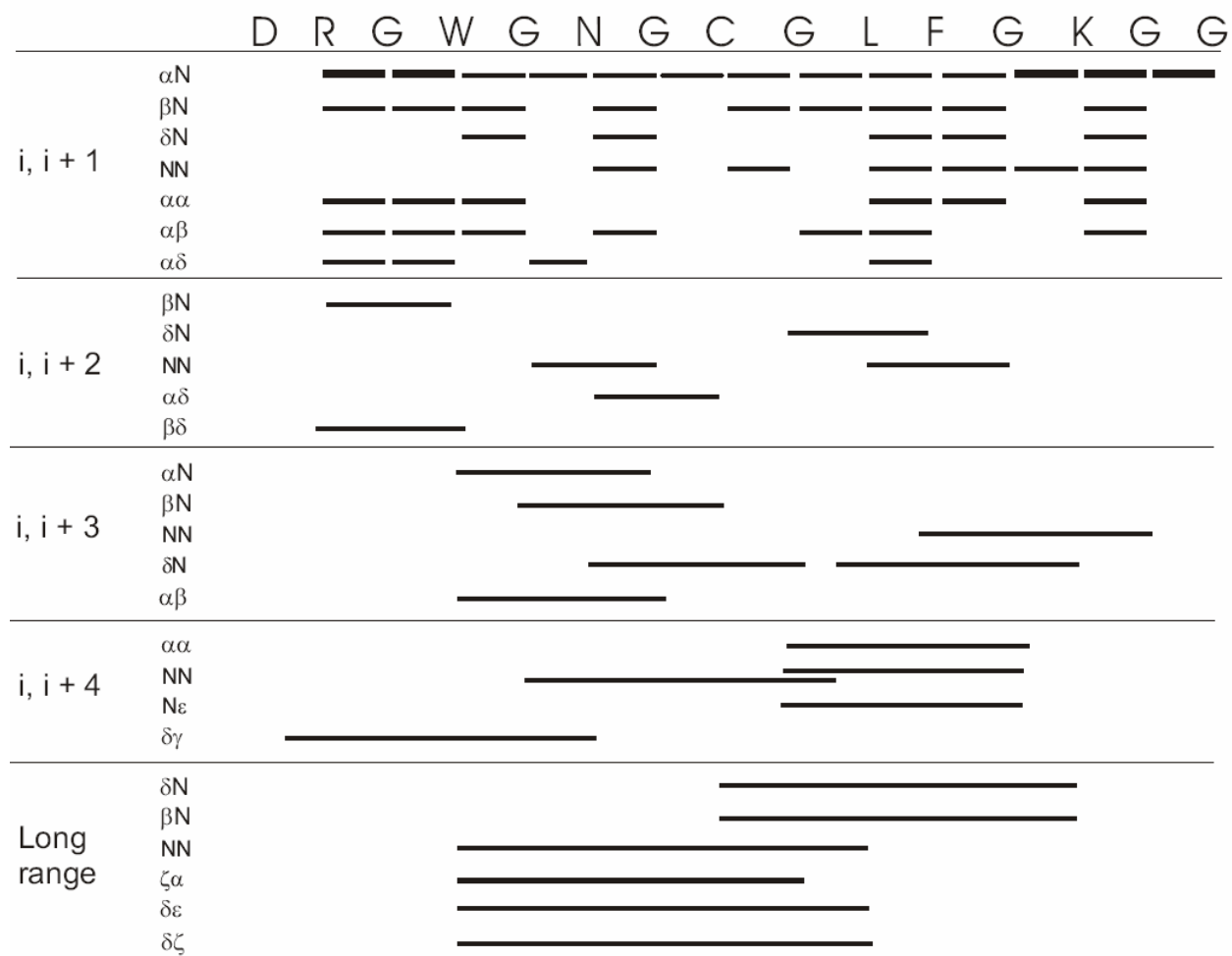
Figure 7



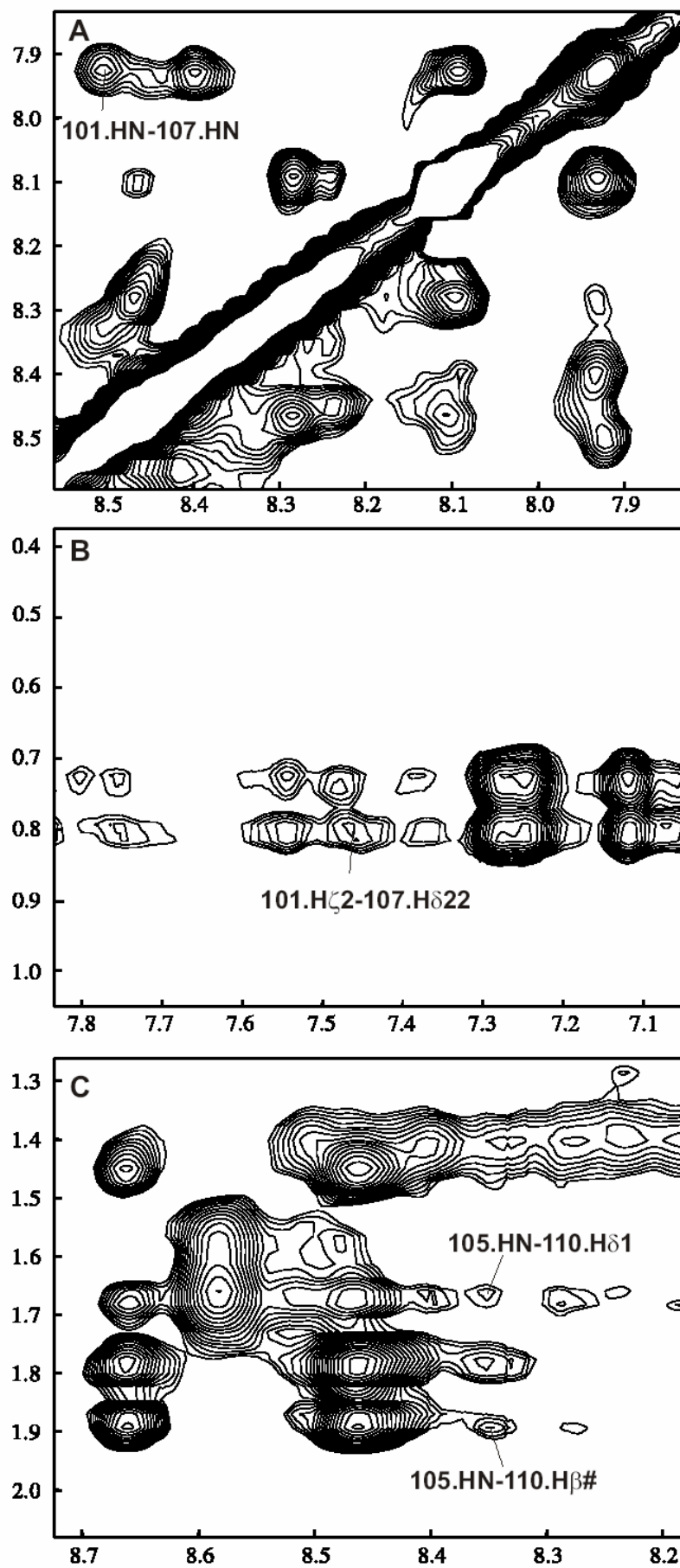
Supplemental Figure S1



Supplemental Figure S2



Supplemental Figure S3



Supplemental Figure S4

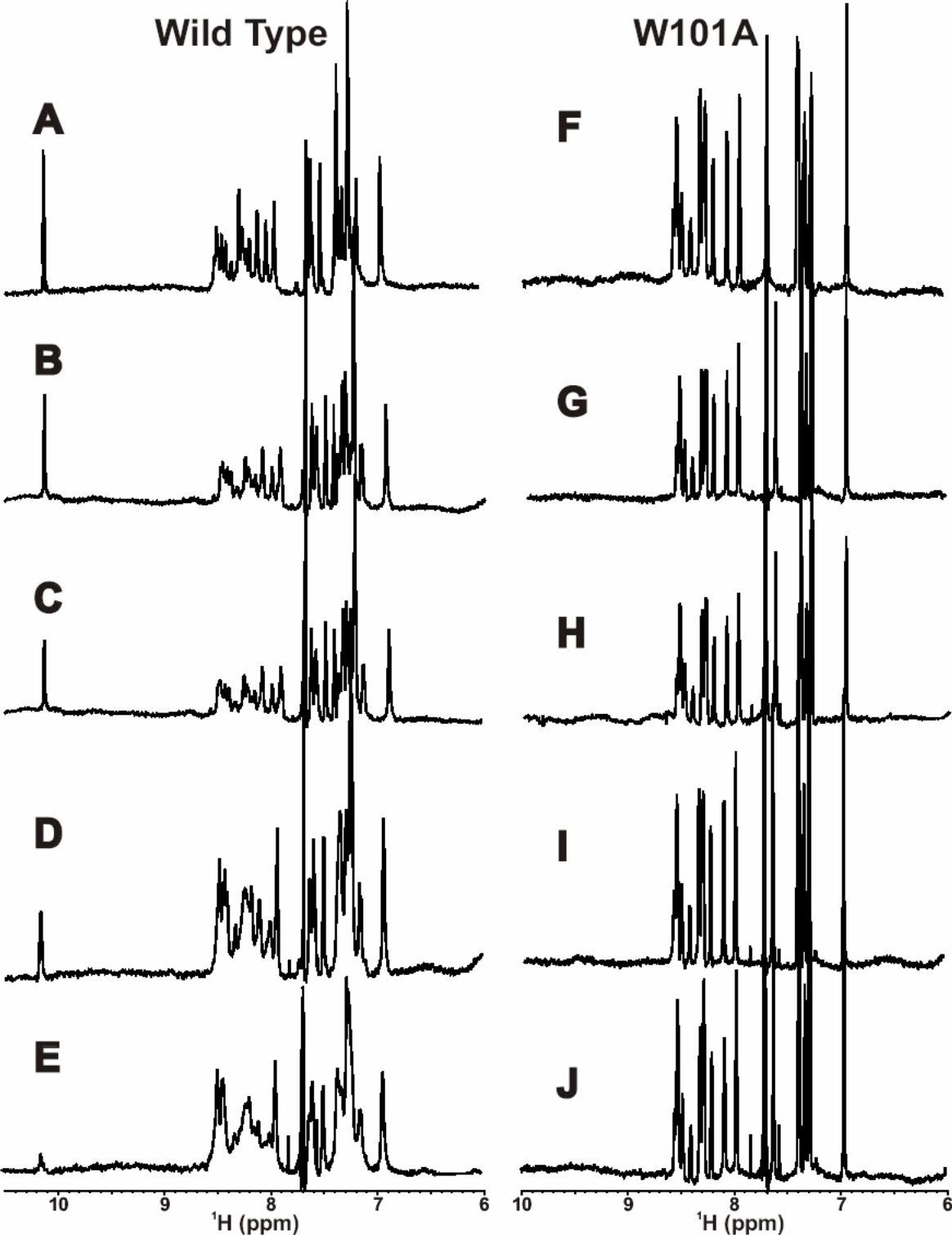


TABLE I
Summary of structural statistics of the DV
fusion peptide at pH 5.5 in DPC micelles

Total NOE distance constraints	224
NOE inter-residue constraints	114
Energies (kcal/mol)	
Overall	42.21 ± 0.87
Bond	3.22 ± 0.05
Angle	18.51 ± 0.12
Improper	1.87 ± 0.05
VDW (LJ)	8.24 ± 0.96
NOE	6.80 ± 0.13
Backbone pairwise r.m.s.d. (Å)^a	
Residues 1–15	0.98
Residues 2–13	0.11
Heavy pairwise r.m.s.d. (Å)^a	
Residues 1–15	1.16
Residues 2–13	0.19
% of residues in:	
most favored regions ^b	33.6%
additional allowed regions ^b	62.9%
generously allowed regions ^b	3.6%
disallowed regions ^b	0%

^a r.m.s.d. values are from MOLMOL.

^b Data from PROCHECK-NMR.

TABLE II

Distances among the side chain protons of hydrophobic triad residues W101, L107 and F108 of the dengue fusion peptide in pre-fusion, post-fusion and micelle-bound states

	Pre-fusion state (Å)	Post-fusion state (Å)	Micelle-bound state (Å)
H ζ 3 (W101)-H δ 21 (L107)	11.9	11.2	2.4
H ζ 3 (W101)-H ϵ 2 (F108)	5.7	4.0	1.8
H δ 21 (L107)-H ϵ 2 (F108)	7.9	8.6	3.4

**PARTE II: Apresentação dos Resultados da Proteína Capsídica (DEN2C) do
Vírus da Dengue Tipo 2**

O ciclo de infecção do vírus da dengue envolve sua interação com um receptor ainda não identificado localizado na membrana da célula hospedeira. Após a ligação a este receptor, ocorre endocitose da partícula viral (Mukhopadhyay *et al*, 2005). A acidificação do compartimento endossomal ocasiona a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando o capsídeo no citoplasma. A proteína do capsídeo se dissocia, iniciando o processo de tradução e replicação do genoma viral, que, por sua vez, codifica uma poliproteína processada pela combinação de serino-proteases e enzimas celulares. Como resultado desta clivagem, são obtidas três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Lindenbach e Rice, 2001; Lindenbach e Rice, 2003). Desta forma, são formadas as proteínas virais necessárias para a montagem viral.

A proteína DEN2C é essencial para a montagem viral e assegura o encapsulamento específico do material genômico. O mecanismo do encapsulamento do genoma viral ainda não está bem compreendido mas pode necessitar da participação de proteínas não-estruturais assim como da proteína DEN2C (Kummerer e Rice, 2002). Estudos recentes sugerem que mutações pontuais nesta proteína de diversos membros da família *Flaviviridae* afetam esse processo de empacotamento, levando à formação de partículas virais não infecciosas (Koepler *et al*, 2002; Patker *et al*, 2007). No caso do vírus da febre amarela, Patkar e colaboradores sugeriram que estas mutações afetariam a oligomerização da proteína C e, conseqüentemente, levando à formação de partículas virais não infecciosas (Patkar *et al*, 2007). Para avaliar se a hipótese

destes pesquisadores era válida, construímos um mutante (I88N) da proteína DEN2C equivalente ao mutante V88N da proteína C do vírus da febre amarela, e comparamos as propriedades estruturais e termodinâmicas da proteína DEN2C selvagem (WT) com as do mutante I88N. Esperamos que os nossos resultados possam servir para compreender melhor sobre da proteína C na montagem do vírus da dengue.

4.2.1. Análise de pureza e do estado oligomérico da proteína DEN2C.

As proteínas DEN2C WT e mutante I88N foram superexpressas e purificadas conforme descrito na seção 3.2.2 de Material e Métodos. Com o objetivo de determinar o seu grau de pureza, as proteínas foram analisadas em um gel de SDS-PAGE a 18%. Conforme mostrado na Figura 16, ambas as proteínas apareceram como uma única banda principal de 12 kDa (monômero) no gel. Além disso foi possível detectar a presença de uma banda maior de aproximadamente 24 kDa correspondente a formação de dímeros não sendo observadas bandas de menor massa molecular, mostrando ausência de proteólise. A identidade das proteínas foi confirmada através da técnica de *Western Blotting* utilizando anticorpo contra a proteína capsídica (resultado não mostrado). Devido ao seu alto pI, a proteína DEN2C migra anomolamente no gel de SDS-PAGE como se fosse uma proteína de PM maior do que ela realmente é.

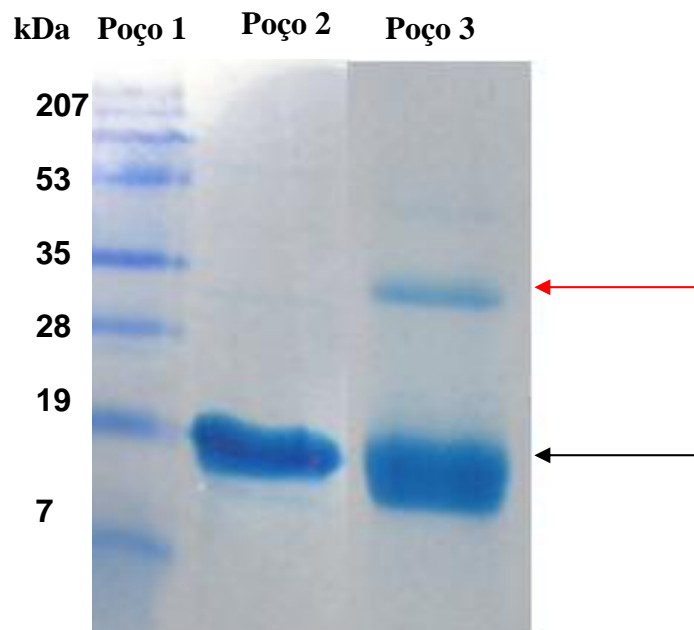


Figura 16: Análise do grau de pureza da DEN2C WT e do mutante I88N por Gel de SDS-PAGE a 18%. O poço 1 representa o padrão de Peso Molecular (Bio-Rad); O poço 2 indica o mutante I88N e o poço 3 a proteína C WT. Neste gel aplicaram-se 5 μ L do padrão de peso molecular (Bio-Rad) e 10 μ L de cada proteína a 76 μ M e após corrida de 1h a 30 mA e 100 V, corou-se com corante coomassie. A seta preta indica a presença do monômero de cada proteína e a seta vermelha o dímero da DEN2C WT.

A estrutura tridimensional da proteína DEN2C foi resolvida por RMN (Ma *et al*, 2004). Neste trabalho, os autores demonstraram que a proteína se encontra em uma conformação dimérica em solução, onde os monômeros são compostos exclusivamente por estrutura secundária do tipo α -hélices. Assim, objetivando determinar o volume molecular das proteínas DEN2C purificadas em nosso laboratório, utilizamos uma cromatografia de filtração em gel. Esta metodologia nos

permite avaliar o grau de pureza da proteína de interesse bem como sua massa molecular, comparando-a com proteínas cujas massas moleculares são conhecidas. Desta forma, as proteínas DEN2C WT e I88N foram aplicadas em uma coluna de filtração em gel TSK3000_{SW} acoplada a um cromatógrafo líquido de alta resolução (Akta Purifier, GE). Conforme mostra na figura 17, o tempo de eluição de ambas as proteínas DEN2C indica claramente que elas estão em uma conformação dimérica de massa molecular cerca de 24 kDa, quando comparadas às proteínas utilizadas como padrões de massa molecular. Elas eluíram com um tempo de eluição um pouco menor que a proteína quimotripsinogênio A, que possui PM de 22 kDa. Observamos ainda uma pequena diferença de tempo de eluição de cerca de ~0,2 min entre as proteínas WT e I88N, indicando que, de alguma forma, esta mutação alterou a conformação estrutural da proteína, mas não seu estado oligomérico global. Ainda, observamos que elas apresentaram um elevado grau de pureza já que não se detectou o aparecimento de picos contaminantes em ambas as proteínas.

4.2.2. Análise da estrutura secundária das proteínas DEN2C WT e I88N por CD

O CD é uma técnica espectroscópica bastante utilizada na identificação dos principais tipos de estrutura secundária de proteínas e das possíveis alterações provocadas nestas estruturas por agentes caotrópicos. Conforme mostrado na

figura 18 e proposto por Ma *et al.* (2004), ambas as proteínas apresentaram espectros característicos de α -hélice com um pico em 222 nm e outro em 208 nm, sendo de menor intensidade para a proteína DEN2C I88N (vermelho contínuo). A diferença de intensidade de sinal entre as proteínas pode ser explicado pela perda parcial de estrutura secundária do DEN2C I88N. Observamos ainda que as proteínas perderam completamente sua estrutura secundária na presença de 8 M de ureia (Fig 18).

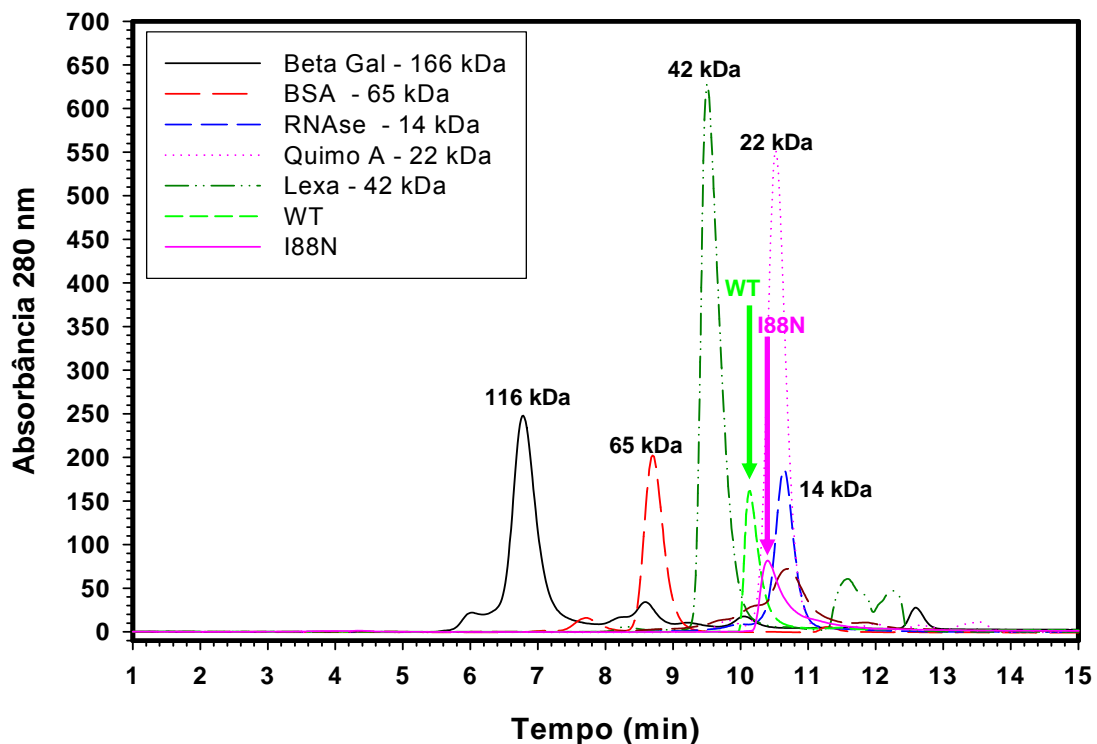


Figura 17: Análise do estado oligomérico das proteínas DEN2C WT e I88N por filtração em gel. Utilizou-se a coluna TSK3000sw acoplada a um cromatógrafo líquido de alta resolução. Os padrões utilizados foram: β -galactosidase (120 kDa, preto sólido); albumina de soro bovino (66 kDa, vermelho tracejado); LexA (45 kDa, verde tracejado e pontilhado); quimotripsinogênio A (20 kDa, rosa pontilhado);

ribonuclease A (15 kDa, azul tracejado). O tampão utilizado para equilibrar a coluna TSK3000_{SW} e durante a corrida foi composto de 50 mM NaH₂PO₄, pH 6, 200 mM NaCl com um fluxo de 1 mL/min. As corridas foram realizadas a 25°C. As concentrações das amostras utilizadas no experimento foram de 163 μM para a DEN2C WT (verde claro) e de 149 μM para o mutante I88N (rosa sólido).

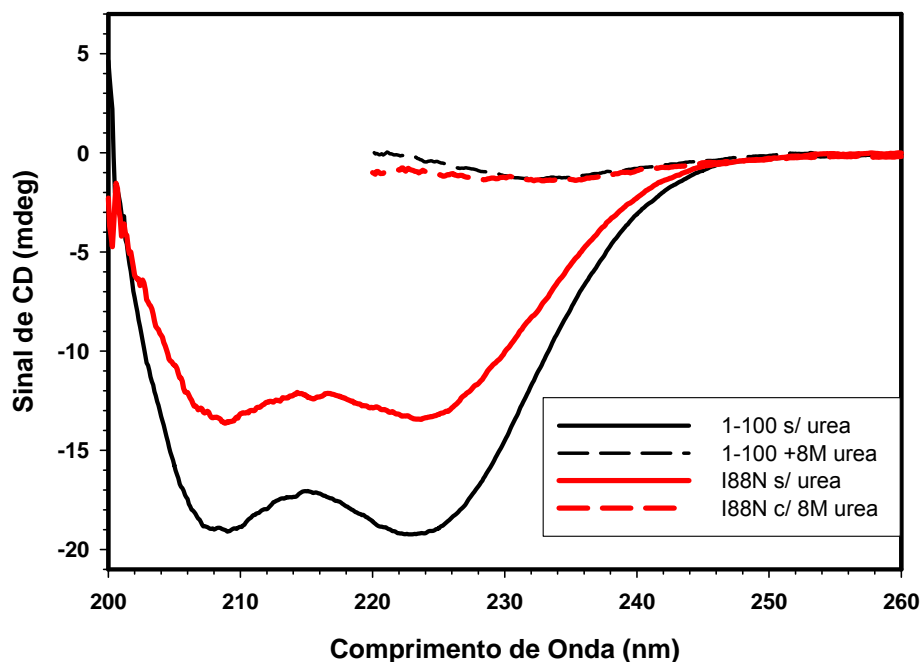


Figura 18: Análise da estrutura secundária das proteínas DEN2C WT e I88N por CD. Dez micromolar de DEN2C WT e do mutante I88N foram analisados por CD na ausência e na presença de agente desnaturante. As proteínas na ausência de ureia estão representadas pelas linhas sólidas em preto (WT) e em vermelho (I88N). Já as amostras na presença de 8 M de ureia estão representadas pelas linhas pontilhadas em preto (WT) e em vermelho (I88N). As análises foram realizadas utilizando-se o tampão composto de 50 mM NaH₂PO₄, pH 6, e 200 mM

NaCl. A ureia estoque (10 M) foi preparada neste mesmo tampão e previamente filtrada. As medidas foram realizadas a 25°C.

4.2.3. Desnaturação por ureia das proteínas DEN2C WT e I88N

O estado de enovelamento das proteínas de interesse foi avaliado através da espectroscopia de fluorescência. Esta metodologia é baseada na fluorescência intrínseca dos resíduos de Trp, Tyr e Phe presentes nas proteínas. Assim, estes resíduos funcionam como sondas fluorescentes, uma vez que o sinal fluorescente pode ser alterado dependendo do ambiente químico em que elas se encontram. Ao monitorar a fluorescência intrínseca das proteínas DEN2C WT e I88N, observamos que o espectro de intensidade de fluorescência deslocou-se para valores de maiores comprimentos de onda com a adição de agente desnaturante ureia, variando de 340,2 nm para 351 nm (figura 19A). Este deslocamento reflete uma maior exposição do Trp ao solvente, com consequente perda de energia para o mesmo. Os espectros de intensidade de fluorescência utilizando diferentes concentrações de ureia foram convertidos para valores de centro de massa espectral (CM) (figura 19B) através da equação 4 descrita anteriormente (Material e Métodos). Os valores de CM foram convertidos em grau de dissociação/desnaturação (α) (equação 5) que reflete o grau de extensão da reação. Assim, os resultados apresentados mostram que a concentração de ureia onde 50% da proteína encontra-se dissociada/desnaturada foi de 4,9 M para a proteína selvagem

e de 2,26 M para o mutante I88N, refletindo uma maior estabilidade da proteína nativa frente à ureia (figura 19C). A partir destes resultados, calculamos a energia livre de dissociação/desnaturação (equação 6), que reflete melhor a estabilidade de cada proteína frente ao agente desnaturante. O valor de ΔG_u obtido para a DEN2C WT foi de 7,75 kcal/mol e de 1,36 kcal/mol para o mutante I88N, mostrando claramente que o mutante é menos estável que a DEN2C WT.

4.2.4. Efeito da pressão na DEN2C WT.

A alta pressão hidrostática é uma ferramenta muito útil para acompanhar processos de dissociação e de desnaturação de proteínas (Silva e Weber, 1993; Silva *et al.*, 2001), ao agir sobre interações não-covalentes. Isto a torna uma variável branda capaz de perturbar o equilíbrio sem alterar significativamente a energia total do sistema, em contraposição a outras formas de desnaturação física (p.ex., a temperatura). A pressão também é muito útil para acompanhar a estabilidade de complexos macromoleculares tais os formados de proteína-ADN, proteína-RNA, proteína-proteína, entre outros. Logo, a pressão hidrostática foi utilizada para estudar a estabilidade das proteínas DEN2C WT e I88N. Observamos que a pressão não foi capaz de promover alterações significativas na estrutura da DEN2C WT, de acordo com a pequena variação de CM (300 cm^{-1}) (figura 20). Quando comparada com a curva de desnaturação por ureia (figura 19C), observamos que a pressão de 45 kpsi (ou 3,5 kbar) só promoveu 25% do total da desnaturação.

Relatos na literatura revelam que diversas proteínas diméricas encontram-se dissociadas/desnaturadas a esta pressão, como por exemplo, o repressor LexA de *E. coli* e a proteína E2 de papilomavirus (Lima *et al*, 1998; Mohana-Borges *et al*, 2000). Interessantemente, observamos que o mutante I88N foi mais suscetível à pressão quando comparado com a proteína WT. Quando submetemos 10 μM deste mutante à pressões crescentes, a variação total de centro de massa foi correspondente àquela obtida para a curva de dissociação/desnaturação por ureia, isto é, de cerca de 1100 cm^{-1} (figura 20A). Ainda, quando 50 μM de I88N foram submetidos a altas pressões, observou-se uma dependência de concentração durante a dissociação desta proteína (Figura 20B). Este interessante dado mostra claramente como a mutação afetou a estabilidade da DEN2C sem afetar suas características de oligômero.

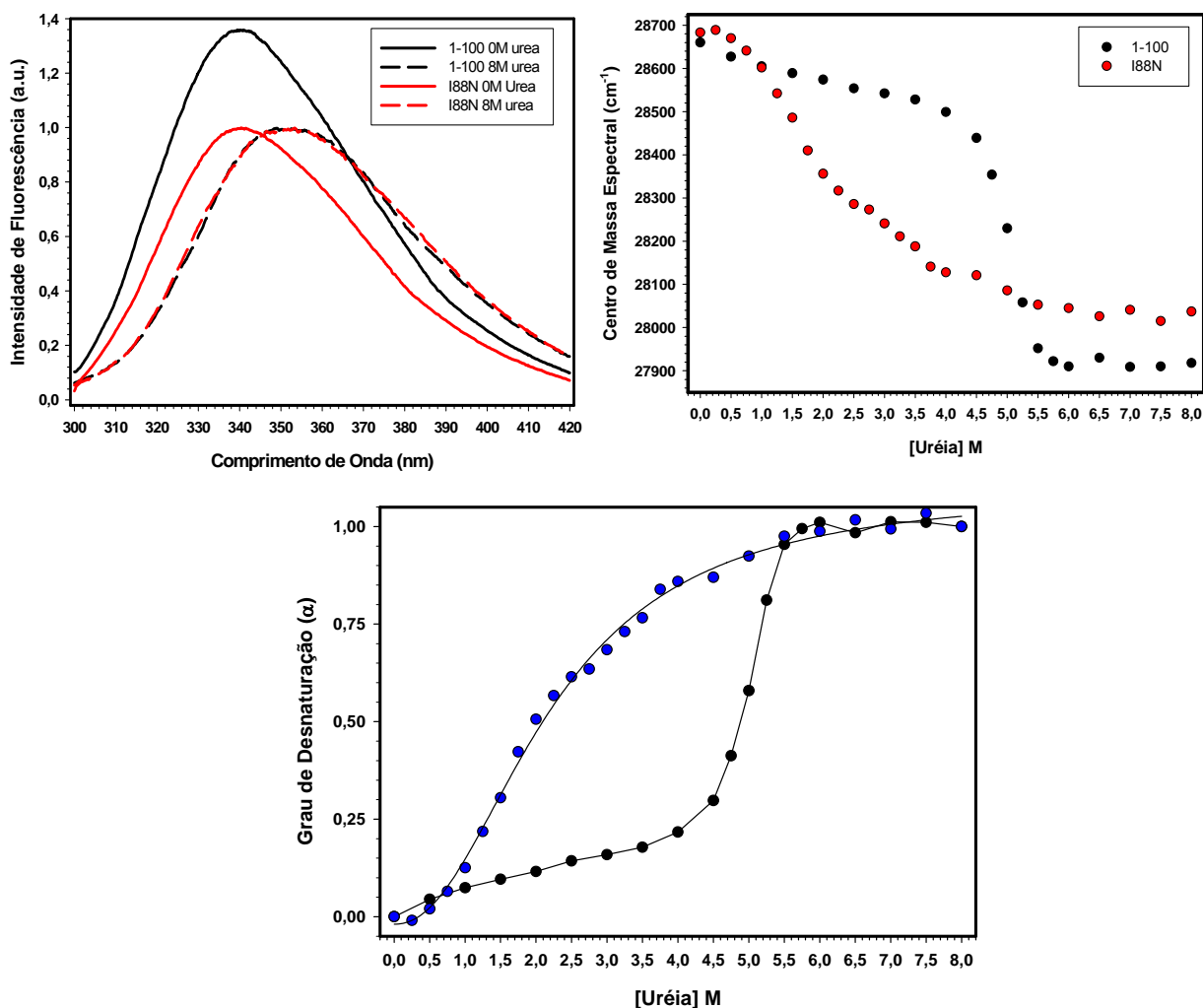


Figura 19. Desnaturação das proteínas DEN2C WT e I88N por ureia. Em 19A, está mostrado os espectros de intensidade de fluorescência das proteínas DEN2C WT e I88N na ausência de ureia (preto sólido e vermelho sólido, respectivamente) e na presença de 8M de ureia (preto pontilhado e vermelho pontilhado, respectivamente). As análises foram realizadas utilizando-se o tampão composto de 50 mM NaH₂PO₄, pH 6, 200 mM NaCl. A ureia estoque 10 M foi preparada neste mesmo tampão e previamente filtrada. As medidas foram realizadas a 25 °C. A concentração de ambas as proteínas foi de 5 μM. Os valores de CM das duas proteínas em função da concentração de uréia é mostrada na figura 19B e o grau de dissociação/desnaturação na figura 19C.

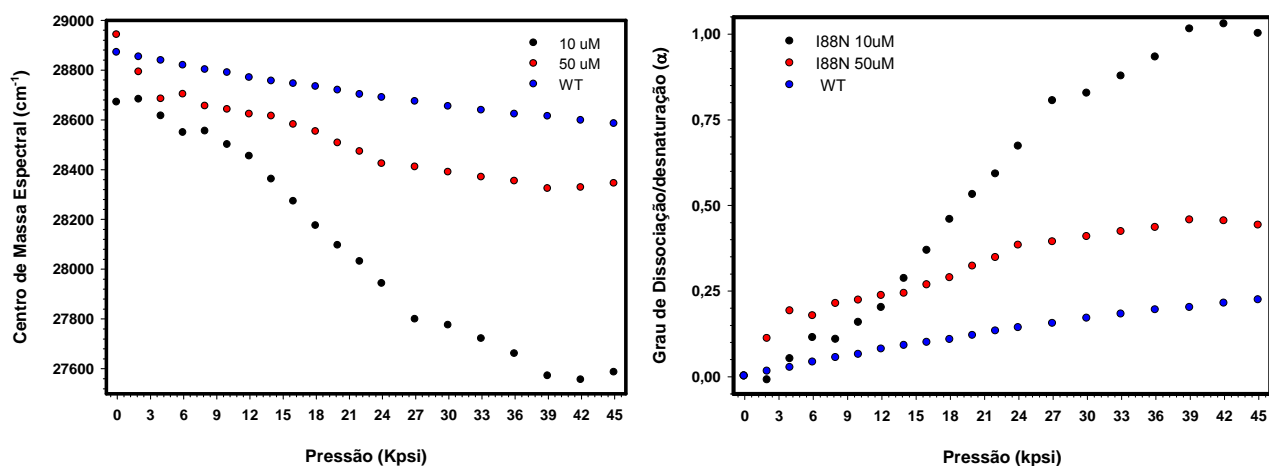


Figura 20. Efeito da pressão hidrostática na dissociação das proteínas DEN2C WT e I88N. Em A, o efeito da pressão foi acompanhado pela variação de CM de 10 μM da DEN2C WT (círculo azul) e do mutante I88N em concentrações de 10 e 50 μM (círculos preto e vermelho, respectivamente). Em B, os valores de CM foram convertidos em grau de dissociação (de acordo com a equação 5). O tampão utilizado foi composto de 50 mM NaH_2PO_4 , pH 6, 200 mM NaCl. As amostras foram incubadas em cada valor de pressão por 5 min e as medidas foram feitas a 25°C.

5. Discussão

Uma das características mais marcantes de um organismo vivo é a sua capacidade de formar grandes complexos macromoleculares funcionais a partir de moléculas muito pequenas. A compreensão de como esse processo de montagem ocorre revela não somente os mecanismos de tais transições, como também a maneira pela qual as moléculas biológicas desenvolveram seus atuais níveis de sofisticação, através do processo evolucionário de seleção (Dobson, 2004). O exemplo biológico mais importante desta montagem molecular é o enovelamento proteico, isto é, o processo pelo qual uma cadeia polipeptídica desordenada é convertida em uma estrutura proteica empacotada capaz de exercer suas funções biológicas (Dobson, 2003). Estas funções incluem essencialmente o controle e a regulação de quase todos os processos dos quais a vida depende. Dada a magnitude de suas funções, não é surpreendente que as proteínas sejam as moléculas mais abundantes encontradas em qualquer organismo vivo.

Para o melhor entendimento da maneira pela qual o processo de enovelamento ocorre na escala atômica, uma importante abordagem tem sido a investigação dos passos elementares da conversão das interações aleatórias em elementos organizados de estrutura. Além da complexidade do processo de enovelamento, as etapas fundamentais muitas vezes são rápidas. Os principais avanços na investigação de tais etapas têm resultado do desenvolvimento e aplicação de uma variedade de métodos químicos baseados em reações rápidas (Dobson, 2004). Através de estudos utilizando soluções misturadas rapidamente,

como por exemplo, através da transferência de uma proteína desnaturada/desenovelada para uma solução capaz de reenovelá-la ou uma proteína nativa submetida a condições desnaturantes; e a perturbação rápida das condições da solução, como por exemplo, através da alteração da temperatura ou pressão têm sido fornecido muitas informações dos processos de enovelamento e de desenovelamento. Além disso, estes estudos fornecem as bases para a compreensão das etapas iniciais desses processos bem como na identificação e caracterização de intermediários formados ao longo dos mesmos. Assim, o principal objetivo destes estudos é relacionar os acontecimentos moleculares do enovelamento *in vitro* com os que ocorrem *in vivo*.

A contribuição dos estudos de enovelamento das interações proteínas-ácido nucleico na montagem viral têm sido de grande importância para a compreensão do processo de montagem viral (Oliveira *et al*, 1999; Oliveira *et al*, 2000; Silva *et al*, 2002). Um exemplo típico é o vírus mosaico de cowpea (CPMV), cuja energia livre de ligação da proteína capsídica ao genoma viral foi avaliada comparando-se a estabilidade termodinâmica dos capsídeos vazios com a de partículas ribonucleoproteicas (Da Poian *et al.*, 1994). Os autores destes estudos observaram que os capsídeos vazios eram mais instáveis do que as partículas ribonucleoproteicas quando submetidos a elevadas pressões, sugerindo a importância das proteínas capsídicas na estabilidade da partícula viral.

Dentro desse contexto, estudamos os aspectos físico-químicos do enovelamento/desenovelamento da proteína DEN2C, uma proteína com cerca de

24 kDa (12 kDa por monômero) responsável pelo encapsulamento do RNA viral. Embora a organização da DEN2C na partícula viral ainda seja desconhecida, parece que ela interage com o RNA e a membrana do retículo endoplasmático. Em 2004, a sua estrutura tridimensional foi resolvida por RMN (Ma *et al*, 2004). Neste trabalho, os autores ressaltam que em comparação com as proteínas capsídicas de outros vírus, a DEN2C se assemelha mais com a proteína do domínio C-terminal de retrovírus. Ambas pertencem as proteínas da classe α composta de quatro alfa hélices ($\alpha 2$ - $\alpha 2'$ e $\alpha 4$ - $\alpha 4'$). Entretanto, a DEN2C apresenta uma baixa constante de dissociação ($K_d = <10$ nM), conforme mostrado por Jones *et al* (2003) por ultracentrifugação analítica, o que explica a energética preferencial que a proteína possui para formar dímeros.

Talvez a característica mais marcante da proteína DEN2C seja sua distribuição não uniforme de cargas (Ma *et al*, 2004). Seu elevado *pI* de 12,10 é explicado pelo número de aminoácidos básicos (26 aminoácidos básicos e apenas três resíduos ácidos por cada 100 resíduos de cada subunidade). Baseando-se nesta distribuição, Ma e colaboradores propuseram que a região $\alpha 4$ - $\alpha 4'$, que é rica em aminoácidos básicos, interagiria com o RNA enquanto que a região $\alpha 2$ - $\alpha 2'$, hidrofóbica, interagiria com a membrana viral. Entretanto, o mecanismo pelo qual a proteína DEN2C promove o encapsulamento do RNA e a montagem do nucleocapsídeo viral ainda precisa ser melhor compreendido.

O efeito de mutações e deleções de aminoácidos na proteína capsídica e na formação de partículas virais infecciosas tem sido alvo de estudos para diversos membros da família *Flaviviridae*. Koefler e colaboradores descreveram que uma série de resíduos de aminoácidos alterados da proteína capsídica do vírus TBE modulava a produção de partículas infecciosas (Koefler *et al* 2002). Assim, mutações de até dezesseis resíduos correspondentes à região hidrofóbica da proteína impediam a formação de partículas virais infecciosas, mas permitiam a secreção de partículas subvirais não infecciosas. Entretanto, quando mais de dezesseis resíduos eram alterados, as partículas virais formadas recuperavam sua infecciosidade e eram altamente atenuadas e imunogênicas quando injetadas em camundongos (Koefler *et al*, 2002).

Recentemente, ao estudar a proteína capsídica do vírus da febre amarela. Patkar e colaboradores (2007) observaram que mutações pontuais na hélice 4 da proteína C deste vírus alteravam a produção de partículas virais infecciosas. Ainda, estes autores especularam sobre a influência destas mutações na oligomerização da proteína capsídica. Desta forma, baseado nestes estudos, decidimos avaliar se estas mesmas mutações teriam efeito semelhante na oligomerização da proteína DEN2C. Para isso, produzimos o mutante I88N desta proteína e o comparamos com a proteína DEN2C (WT).

5.1 Caracterização do estado oligomérico da proteína DEN2C

Após expressão em bactéria e purificação das proteínas DEN2C nativa (WT) e mutante I88N em nosso laboratório, iniciamos os estudos físico-químicos objetivando entender melhor o processo de enovelamento destas proteínas e, conseqüentemente, suas funções na partícula viral. Jones *et al* (2003) mostraram por ultracentrifugação analítica que tanto a proteína capsídica do vírus da dengue (DEN2C) quanto a do vírus da febre amarela (YFC) se encontravam em uma conformação dimérica em solução e que estes dímeros eram compostos exclusivamente por α -hélices. Estes autores também demonstraram que os valores de massa molecular para as duas proteínas eram muito próximos: 22,96 kDa para a YFC e 21,9 kDa para a DEN2C, além de uma razoável identidade de sequência primária entre as proteínas C destes dois membros da família *Flaviviridae* (22,5%) (Jones *et al*, 2003).

Assim, primeiramente avaliamos o estado oligomérico das proteínas purificadas em nosso laboratório. Observamos que ambas as proteínas DEN2C WT e I88N eluíram em coluna de gel filtração com tempo de retenção equivalente às conformações diméricas quando comparadas com os padrões de peso molecular utilizados (figura 17). Através de experimentos de CD, observamos que as proteínas, WT e mutante são compostas exclusivamente por α -hélices comprovando os resultados obtidos anteriormente por RMN e por CD para a DEN2C e para a YFC (Jones *et al* 2003; Ma *et al*, 2004). Nossos resultados

reforçam a ideia de que algumas características estruturais são conservadas na proteína capsídica e que estas características não se restringem somente ao vírus de dengue, mas existem em outros membros da família *Flaviviridae*, conforme proposto por Jones *et al* (2003).

5.1 Efeito da ureia sobre a estabilidade da proteína DEN2C

Duas propriedades aparentemente opostas estabilizam a partícula viral: (1) esta estabilidade precisa ser grande o suficiente para manter a partícula intacta enquanto está fora da célula hospedeira e (2) o vírus tem que ser capaz de se desmontar dentro da célula hospedeira. Assim, diversos estudos utilizando partículas virais que codificam proteínas capsídicas mutantes têm sido realizados com o objetivo de entender o seu papel no empacotamento do genoma viral bem como na montagem desta partícula (Cheble *et al*, 2000; Silva *et al*, 2002).

Cheble e colaboradores estudaram este papel da proteína capsídica no flock house vírus (FHV), um vírus não envelopado composto por 180 cópias de uma proteína que encapsula o RNA viral (Cheble *et al.*, 2000). Nestes estudos, eles compararam a partícula viral selvagem (SFHVwt) com o vírus que codificava a proteína capsídica mutante (D75N). Foi observado que esta mutação previne a clivagem da proteína capsídica, mantendo o vírus na forma de um pró-vírus (Cheble *et al.*, 2000). Ainda, este pró-vírus D75N foi dissociado em proteínas capsídicas, não estando o desenovelamento acoplado ao processo de dissociação.

Por outro, a partícula selvagem madura dissocia e desenovela de uma forma concertada (Cheble *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002).

Neste contexto, avaliamos o efeito de agentes perturbadores no enovelamento/desenovelamento da DEN2C WT e do mutante I88N, utilizando primeiramente a ureia como um agente desnaturante químico comumente usado no estudo de desnaturação de proteínas. Observamos uma diferença de estabilidade entre as proteínas, sendo a DEN2C WT bem mais estável do que o mutante I88N. No caso da proteína selvagem, acreditamos que os monômeros estão mais fortemente associados, levando a uma compactação acentuada da molécula. Isto deve diminuir a exposição de regiões hidrofóbicas, principais alvos de interação com a ureia. Já no caso do I88N, esta alteração de uma isoleucina por uma asparagina alterou significativamente a estabilidade termodinâmica da proteína. Acreditamos que a hélice α_4 , a maior delas, desempenhe um papel importante na estabilização da estrutura da DEN2C bem como em sua oligomerização, conforme hipotetizado por Patkar e colaboradores (2007).

5.3. Efeito da alta pressão no enovelamento da proteína DEN2C

Os vírus são formados de macromoléculas que exercem sua função biológica em um ciclo sequencial: (1) primeiro, há a montagem da partícula no interior da célula; (2) com conseqüente libração para o ambiente; (3) interação desta partícula com novas células hospedeiras; (4) desmontagem da partícula e liberação do

genoma no citoplasma e, finalmente, (5) replicação do genoma e transcrição de novas partículas virais (Silva *et al.*, 2002). Dentre estas cinco etapas, a desmontagem do capsídeo e desempacotamento do ácido nucleico é a menos entendida até o momento. Para tentar preencher esta lacuna, o pH no interior das vesículas endocíticas é acidificado, mas em muitos casos o vírus não é desmontado nesta condição (Cheble *et al.*, 1999). Alternativamente, a utilização da alta pressão hidrostática tem sido uma ferramenta importante na compreensão do desempacotamento do genoma de diversos vírus animais (Silva *et al.*, 2002). Em geral, tem sido observado que as proteínas capsídicas (dímeros ou monômeros) são mais suscetíveis à pressão do que as partículas montadas (Silva *et al.*, 1996). Ainda, substituições de um único resíduo no núcleo hidrofóbico da proteína capsídica de diversos vírus animais produzem uma queda na estabilidade destas proteínas quando submetidas a pressões elevadas ou a agentes químicos. Os resultados dos estudos do efeito da pressão na proteína capsídica destes vírus e no empacotamento do genoma podem ser utilizados como alvos de drogas antivirais, uma vez que estas proteínas se encontram parcialmente enoveladas quando submetidas a pressões elevadas (Cheble *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002).

Estudamos o efeito da pressão hidrostática sobre o enovelamento das proteínas DEN2C WT e mutante I88N e observamos que o primeiro não sofreu o efeito deste agente perturbador. Em contrapartida, o mutante I88N foi dissociado em pressões elevadas e ainda apresentou dependência de concentração, processo característico de oligômeros perfeitos (Silva e Weber, 1993). Este resultado,

juntamente com a sua dissociação/desnaturação por ureia, mostra que a função biológica da DEN2C de empacotar e proteger o genoma viral pode estar relacionada com sua estabilidade.

Desta forma, nossos resultados trazem informações sobre a natureza do enovelamento/desenovelamento dímero da proteína DEN2C, que parece ser regida pela integridade de sua $\alpha 4$. Assim, a substituição de um resíduo nesta região compromete sua estabilidade termodinâmica bem como sua funcionalidade. Estes estudos iniciais são promissores para o entendimento da função da DEN2C na formação da partícula viral e juntamente com outros estudos, poder-se-á planejar drogas que ajam nesta etapa da infecção viral de forma a inibi-la.

6. Conclusões e Perspectivas

O principal objetivo desta tese foi tentar entender duas etapas importantes da infecção do vírus da dengue: a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e o empacotamento do genoma viral. Para tal, utilizamos como modelos de estudos, respectivamente, o peptídeo de fusão presente na glicoproteína E e a proteína capsídica deste vírus.

Em nosso primeiro estudo, determinamos a estrutura tridimensional do peptídeo de fusão do vírus da dengue tipo 2 ligado a micelas de detergentes. Nossa estrutura mostra que este peptídeo apresenta uma conformação estrutural regida pelos resíduos aromáticos W101, L108 e F108. Comparamos a estrutura obtida por nós com a obtida por cristalografia para a proteína E e observamos uma diferença na disposição espacial destes resíduos, sugerindo algum tipo de direcionamento termodinâmico. Ainda, nossos resultados mostraram que este peptídeo se encontra estruturado quando ligado a vesículas aniônicas. Um aspecto importante desse primeiro estudo foi observado quando o resíduo W101 foi alterado por uma Alanina (W101A). Este peptídeo mutante perdeu totalmente sua capacidade de induzir a fusão de membranas miméticas, sugerindo que o resíduo W101 possui um papel importante no direcionamento da fusão do envelope viral com a membrana endossomal.

Objetivando entender melhor este processo de fusão e comparar com nossos resultados até aqui obtidos, pretendemos estudar a interação da proteína E íntegra com membranas miméticas em condições fusogênicas. Ainda, pretendemos utilizar a proteína E íntegra com uma mutação no resíduo W101 e

comparar sua capacidade fusogênica com a proteína selvagem, o que permitirá uma melhor compreensão do papel deste resíduo no processo de fusão do vírus da dengue. Acreditamos que estes resultados poderão ser úteis no desenho racional de drogas que visem a agir sobre esta primeira etapa da infecção deste vírus.

Os resultados de nosso segundo estudo sugerem que houve alterações estruturais entre as proteínas DEN2C WT e I88N, sendo a primeira muito mais estável a agentes perturbadores do que a segunda. Apesar de ainda não existir resultados similares com proteínas capsídicas de outros flavivírus que reforcem nossa hipótese, sugerimos que a sua função biológica esteja relacionada com esta altíssima estabilidade. A própria estrutura da DEN2C mostra que a compactação de de sua estrutura terciária pode ser um fator estabilizador da proteína.

Patkar e colaboradores (2007) observaram para a proteína C do vírus da febre amarela que o mutante L81N levava a pouca produção de partículas infecciosas e que o duplo-mutante L81N/V88N era letal para a produção de tais partículas. Neste contexto, como perspectivas futuras, pretendemos realizar experimentos com os mutantes L81N e com o duplo-mutante I88N/L81N para compará-los com os resultados já obtidos para as proteínas que aqui estudamos. Ainda, pretendemos clonar, expressar e purificar a proteína C do vírus da febre amarela e realizar ensaios termodinâmicos para compará-los com os já obtidos com a DEN2C. Também pretendemos realizar estudos com cultura de células

objetivando mimetizar os estudos feitos por Patkar e colaboradores (2007) e avaliar o papel destas mutações na DEN2C *in vivo*.

7. Referências

Allison, S. L., J. Schalich, *et al.* **Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH.** *J Virol*, v.69, n.2, Fev, p.695-700. 1995.

Allison, S. L., J. Schalich, *et al.* **Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E.** *J Virol*, v.75, n.9, Maio, p.4268-75. 2001.

Amberg, S. M. *et al.* **NS2B-3 proteinase-mediated in yellow fever virus structural region: *in vitro* and *in vivo* studies.** *J. Virol.*, v.68, p.3794-3802. 1994.

Bielefeldt-Ohmann, H., M. Meyer, *et al.* **Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains.** *Virus Res*, v.73, n.1, Jan, p.81-9. 2001.

Bressanelli, S., K. Stiasny, *et al.* **Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation.** *Embo J*, v.23, n.4, Fev 25, p.728-38. 2004.

Bullough, P. A., F. M. Hughson, *et al.* **Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion.** *Nature*, v.371, n.6492, Set 1, p.37-43. 1994

Burke, D. S. e T. P. Monath. Flaviviruses. In: D. M. Knipe e P. M. Howley (Ed.). *In Fields virology*. Philadelphia: Lippincott/The Williams & Wilkins Co., 2001. Flaviviruses, p.1043-1125

Camara, F. P., R. L. Theophilo, *et al.* **[Regional and dynamics characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study]**. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.40, n.2, Mar-Abr, p.192-6. 2007.

Carr, C. M., C. Chaudhry, *et al.* **Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation**. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.94, n.26, Dez 23, p.14306-13. 1997.

Chandran, K., N. J. Sullivan, *et al.* **Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection**. *Science*, v.308, n.5728, Jun 10, p.1643-5. 2005.

Chen, Y., T. Maguire, *et al.* **Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate**. *Nat Med*, v.3, n.8, Ago, p.866-71. 1997.

Chen, Y. C., S. Y. Wang, *et al.* **Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of**

virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol*, v.73, n.4, Abr, p.2650-7. 1999.

Chen, L., J. J. Gorman, *et al.* **The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion.** *Structure*, v.9, n.3, Mar 7, p.255-66. 2001.

Clyde, K., J. L. Kyle, *et al.* **Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis.** *J Virol*, v.80, n.23, Dez, p.11418-31. 2006.

Da Poian, A. T., Johnson, J. E., *et al.* **Differences in pressure stability of the three components of Cowpea Mosaic Virus: Implications for virus assembly and disassembly.** *Biochemistry*, v.33, p.8339-46. 1994

Da Poian, A. T., F. A. Carneiro, *et al.* **Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins?** *Braz J Med Biol Res*, v.38, n.6, Jun, p.813-23. 2005

Dimitrov, D. S. **Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications.** *Nat Rev Microbiol*, v.2, n.2, Fev, p.109-22. 2004.

Dobson, C. M. **Protein folding and misfolding.** *Nature*, v.426, Dez, p.884-890. 2003.

Dobson, C. M. **Experimental investigation of Protein folding and misfolding.** *Methods*, v.34, p.4-14. 2004.

Dockland, T. M. *et al.* **West nile core protein: tetramer structure and ribbon formation.** *Structure*. v.12, p.1157-1163. 2004.

Earp, L. J., S. E. Delos, *et al.* **The many mechanisms of viral membrane fusion proteins.** *Curr Top Microbiol Immunol*, v.285, p.25-66. 2005.

Eckert, D. M. e P. S. Kim. **Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition.** *Annu Rev Biochem*, v.70, p.777-810. 2001.

Elshuber, S., S. L. Allison, *et al.* **Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus.** *J Gen Virol*, v.84, n.Pt 1, Jan, p.183-91. 2003.

Epand, R. M. **Fusion peptides and the mechanism of viral fusion.** *Biochim Biophys Acta*, v.1614, n.1, Jul 11, p.116-21. 2003.

Fass, D., S. C. Harrison, *et al.* **Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution.** *Nat Struct Biol*, v.3, n.5, Maio, p.465-9. 1996.

Ferlenghi, I. *et al.* **Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis.** *Mol. Cell*, v.7, p.593-602. 2001.

Figuerola, R. e C. Ramos. **Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America.** *Arch Med Res*, v.31, n.4, Jul-Ago, p.429-30. 2000.

Figueiredo, L. T. M. e B. A. L. Fonseca. **Dengue.** In: R. Veronesi e R. Focaccia (Ed.). *In Tratado de Infectologia*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. Dengue, p.204-217

Germi, R., J. M. Crance, *et al.* **Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus.** *Virology*, v.292, n.1, Jan 5, p.162-8. 2002.

Gibbons, D. L., M. C. Vaney, *et al.* **Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus.** *Nature*, v.427, n.6972, Jan 22, p.320-5. 2004.

Gross, M. e Jaenicke, R. **Proteins under pressure: The influence of high hydrostatic pressure, function and assembly of proteins and protein complexes.** *Eur. J. Biochem.* 221: 617-630. 1994

Gubler, D. J. **Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century.** *Trends Microbiol*, v.10, n.2, Fev, p.100-3. 2002.

Guzman, M. G. e G. Kouri. **Dengue: an update.** *Lancet Infect Dis*, v.2, n.1, Jan, p.33-42. 2002

Guirakhoo, F., F. X. Heinz, *et al.* **Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions.** *J Gen Virol*, v.72 (Pt 6), Jun, p.1323-9. 1991.

Harrison, S. C. **Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins.** *Adv Virus Res*, v.64, p.231-61. 2005

Heinz, F. X. e S. L. Allison. **The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes.** *Curr Opin Microbiol*, v.4, n.4, Ago, p.450-5. 2001.

Heldwein, E. E., H. Lou, *et al.* **Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1.** *Science*, v.313, n.5784, Jul 14, p.217-20. 2006

Hernandez, L. D., L. R. Hoffman, *et al.* **Virus-cell and cell-cell fusion.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.12, p.627-61. 1996.

Hilgard, P. e R. Stockert. **Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes.** *Hepatology*, v.32, n.5, Nov, p.1069-77. 2000.

Hung, S. L., P. L. Lee, *et al.* **Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells.** *Virology*, v.257, n.1, Abr 25, p.156-67. 1999.

Jahn, R., T. Lang, *et al.* **Membrane fusion.** *Cell*, v.112, n.4, Fev 21, p.519-33. 2003.

James, TL. **Nuclear magnetic Ressonance and Nucleic Acids.** *In Methods in Enzymology.* Academic Press, New York. pp. 644. 1995.

Jindadamrongwech, S., C. Thepparit, *et al.* **Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2.** *Arch Virol*, v.149, n.5, Maio, p.915-27. 2004

Jones, C. L. T. *et al.* **Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein.** *J. Virol.*, v.81, n.12, Junho, p.6471-6481. 2003.

Khromykh, A. A. e Westaway, E. G. **RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin.** *Arch. Virol.*, v.141, p.685-699. 1996

Kielian, M. e F. A. Rey. **Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin.** *Nat Rev Microbiol*, v.4, n.1, Jan, p.67-76. 2006.

Kiermayr, S. *et al.* **Isolation of capsid protein dimmers from the tick-borne encephalitis virus and in vitro assembly of capsid-like particles.** *J. Virol.*, v.78, p.8078-8084. 2004.

Kofler, R. S. *et al.* **Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence.** *J. Virol.*, v.76, p.3534-3543. 2002.

Kuhn, R. J., W. Zhang, *et al.* **Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion.** *Cell*, v.108, n.5, Mar 8, p.717-25. 2002.

Kummerer, B. M. e C. M. Rice. **Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles.** *J. Virol*, v.76, p.4773-84. 2002.

Lescar, J., A. Roussel, *et al.* **The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH.** *Cell*, v.105, n.1, Abr 6, p.137-48. 2001.

Lindenbach, B. D. e C. M. Rice. **Molecular biology of flaviviruses.** *Adv Virus Res*, v.59, p.23-61. 2003

Lindenbach, B. D. e C. M. Rice. **Flaviviridae: the viruses and their replication.** In: D. M. Knipe e P. M. Howley (Ed.). *In Fields virology*. Philadelphia: Lippincott/The Williams & Wilkins Co., 2001. Flaviviridae: the viruses and their replication, p.991-1042

Lozach, P. Y., L. Burleigh, *et al.* **Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals.** *J Biol Chem*, v.280, n.25, Jun 24, p.23698-708. 2005

Ma, L. *et al.* **Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.10, Março, p.3414-3419. 2004.

Mandl, C. W. **Flavivirus immunization with capsid-deletions mutants: basics, benefits, and barriers.** *Vir. Immun.*, v.17, n.4, p.461-472. 2004

Markoff, L. *et al.* **A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue capsid protein.** *Virology*, v.233, p.105-117. 1997.

Martinez-Barragan, J. J. e R. M. Del Angel. **Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection.** *J Virol*, v.75, n.17, Set, p.7818-27. 2001.

Marsh, M. e A. Helenius. **Virus entry: open sesame.** *Cell*, v.124, n.4, Fev 24, p.729-40. 2006

Matsuyama, S., S. E. Delos, *et al.* **Sequential roles of receptor binding and low pH in forming prehairpin and hairpin conformations of a retroviral envelope glycoprotein.** *J Virol*, v.78, n.15, Ago, p.8201-9. 2004

Modis, Y., S. Ogata, *et al.* **A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.12, Jun 10, p.6986-91. 2003.

Modis, Y., S. Ogata, *et al.* **Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion.** *Nature*, v.427, n.6972, Jan 22, p.313-9. 2004.

Mothes, W., A. L. Boerger, *et al.* **Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein.** *Cell*, v.103, n.4, Nov 10, p.679-89. 2000.

Mozhaev, V.V., Heremans, K., H., Frank, J., Masson, P. e Balny, C. **Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications.** *TIBTECH* 124:494-501. 1994

Mozhaev, V.V., Heremans, K.H., Frank, J., Masson, P. e Balny, C. **High pressure effects on protein structure.** *Prot. Struct. Func. Gen.* 24: 81-91. 1996

Mukhopadhyay, S., R. J. Kuhn, *et al.* **A structural perspective of the flavivirus life cycle.** *Nat Rev Microbiol*, v.3, n.1, Jan, p.13-22. 2005.

Navarro-Sanchez, E., R. Altmeyer, *et al.* **Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses.** *EMBO Rep*, v.4, n.7, Jul, p.723-8. 2003.

Nogueira, R. M., S. M. Zagner, *et al.* **Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.86, n.2, Abr-Jun, p.269. 1991.

Nogueira, R. M., M. P. Miagostovich, *et al.* **Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96, n.7, Out, p.925-6. 2001.

Nogueira, R. M., H. G. Schatzmayr, *et al.* **Dengue virus type 3, Brazil, 2002.** *Emerg Infect Dis*, v.11, n.9, Set, p.1376-81. 2005.

Oliveira, A. C., Ishimaru, D., *et al.* **Low temperature stability of picornaviruses: implications for virus uncoating.** *Biophys. J.*, v.76, p.11270-79. 1999.

Oliveira, A. C., Gomes, A., *et al.* **Virus maturation targets the protein capsid to concerted disassembly and unfolding.** *J. Biol. Chem.*, v.275, n.21, p.16037-43. 2000.

Osanai, C. H., A. P. Travassos Da Rosa, *et al.* [**Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report**]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.25, n.1, Jan-Fev, p.53-4. 1983.

Pace, C.N. **Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves.** *In: Methods in Enzymology* 131: 265-280. 1986.

Paladini, A. A. e Weber, G. **Pressure-induced reversible dissociation of enolase.** *Biochemistry* 20:2587-2593. 1981.

Patkar, C. G. *et al.* **Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein.** *J. Virol.*, v.81, n.12, p.6471-6481. 2007.

Pinheiro, F. P. e S. J. Corber. **Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas.** *World Health Stat Q*, v.50, n.3-4, p.161-9. 1997.

Pokidysheva, E., Y. Zhang, *et al.* **Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN.** *Cell*, v.124, n.3, Fev 10, p.485-93. 2006.

Rey, F. A., F. X. Heinz, *et al.* **The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution.** *Nature*, v.375, n.6529, Maio 25, p.291-8. 1995.

Reyes-Del Valle, J., S. Chavez-Salinas, *et al.* **Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells.** *J Virol*, v.79, n.8, Abr, p.4557-67. 2005.

Rigau-Perez, J. G., G. G. Clark, *et al.* **Dengue and dengue haemorrhagic fever.** *Lancet*, v.352, n.9132, Set 19, p.971-7. 1998.

Roche, S., S. Bressanelli, *et al.* **Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G.** *Science*, v.313, n.5784, Jul 14, p.187-91. 2006.

Schatzmayr, H. G., R. M. Nogueira, *et al.* **An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.81, n.2, Abr-Jun, p.245-6. 1986.

Sieczkarski, S. B. e G. R. Whittaker. **Dissecting virus entry via endocytosis.** *J Gen Virol*, v.83, n.Pt 7, Jul, p.1535-45. 2002.

Silva, J.L., Foguel, D. e Royer, C.A. **Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure.** *Trends. Biochem. Sci.* 26:612-618. 2001.

Silva, J.L.; Oliveira, A.C.; Gomes, A., M.O.; Lima, L. M.T.R.; Mohana-Borges, R.; Pacheco, A.B. e Foguel, D. **Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1595:250-265. 2002.

Silva, J.L. e Weber, G. **Pressure stability of proteins.** *Annu. Rev. Phys Chem.* 44: 89-113. 1993

Siqueira, J. B., Jr., C. M. Martelli, *et al.* **Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002.** *Emerg Infect Dis*, v.11, n.1, Jan, p.48-53. 2005.

Skehel, J. J. e D. C. Wiley. **Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin.** *Annu Rev Biochem*, v.69, p.531-69. 2000.

Smith, T. Picture story. **Does Dengue virus fuse using beta-barrels?** *Nat Struct Biol*, v.9, n.4, Abr, p.244. 2002

Smith, A. E. e A. Helenius. **How viruses enter animal cells.** *Science*, v.304, n.5668, Abr 9, p.237-42. 2004.

Stadler, K., S. L. Allison, *et al.* **Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin.** *J Virol*, v.71, n.11, Nov, p.8475-81. 1997.

Stiasny, K., S. L. Allison, *et al.* **Role of metastability and acidic pH in membrane fusion by tick-borne encephalitis virus.** *J Virol*, v.75, n.16, Ago, p.7392-8. 2001.

Stiasny, K. e Heinz, F. X. **Flavivirus membrane fusion.** *J. Gen. Virol.* V87, Jul., p. 2755-2766.

Tassaneetrithep, B., T. H. Burgess, *et al.* **DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells.** *J Exp Med*, v.197, n.7, Abr 7, p.823-9. 2003

Teixeira, M. G., M. C. Costa, *et al.* **Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?** *Cad Saude Publica*, v.21, n.5, Set-Out, p.1307-15. 2005.

Thepparit, C. e D. R. Smith. **Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor.** *J Virol*, v.78, n.22, Nov, p.12647-56. 2004.

Weber, G. *In Protein interactions*. 1992, pp

Weber, G. e Drickamer, H.G. **The effects of high pressure upon protein and other molecules.** *J. Phys. Chem.* 97:7108-7115. 1983.

Weissenhorn, W., A. Carfi, *et al.* **Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain.** *Mol Cell*, v.2, n.5, Nov, p.605-16. 1998.

Weissenhorn, W., A. Dessen, *et al.* **Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses.** *Mol Membr Biol*, v.16, n.1, Jan-Mar, p.3-9. 1999.

Weissenhorn, W., A. Hinz, *et al.* **Virus membrane fusion.** *FEBS Lett*, v.581, n.11, Maio 22, p.2150-5. 2007

Whitehead, S. S., J. E. Blaney, *et al.* **Prospects for a dengue virus vaccine.** *Nat Rev Microbiol*, v.5, n.7, Jul, p.518-28. 2007.

Wilson, I. A., J. J. Skehel, *et al.* **Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.** *Nature*, v.289, n.5796, Jan 29, p.366-73. 1981.

Wilder-Smith, A. e E. Schwartz. **Dengue in travelers.** *N Engl J Med*, v.353, n.9, Set 1, p.924-32. 2005.

Who. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment prevention and control.** *WHO*. Geneva, 1997. p.

Wuthrich, K **NMR of proteins and nucleic acids.** *John Wiley & Sons incorporated*, 1st Ed, pp. 13-203. 1986

Xu, Y., Y. Liu, *et al.* **Structural basis for coronavirus-mediated membrane fusion. Crystal structure of mouse hepatitis virus spike protein fusion core.** *J Biol Chem*, v.279, n.29, Jul 16, p.30514-22. 2004.

Xu, Y., Z. Lou, *et al.* **Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core.** *J Biol Chem*, v.279, n.47, Nov 19, p.49414-9. 2004.

Yin, H. S., R. G. Paterson, *et al.* **Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.102, n.26, Jun 28, p.9288-93. 2005

Yin, H. S., X. Wen, *et al.* **Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation.** *Nature*, v.439, n.7072, Jan 5, p.38-44. 2006.

Yu, I-Mei., Zhang, W. *et al.* Structure of the immature dengue at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, v.319, Mar., p. 1834-1837. 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)