

**Aspectos estruturais, dinâmicos e termodinâmicos envolvidos na montagem *in vitro* do capsídeo do Vírus da Hepatite C e na inibição da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP, revelados por análises espectroscópicas e calorimétricas**

**Theo Luiz Ferraz de Souza**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Medica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Orientação: Andréa Cheble de Oliveira

Co-orientação: Jerson Lima da Silva

Rio de Janeiro

\*Julho/2010\*

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Aspectos estruturais, dinâmicos e termodinâmicos envolvidos na montagem *in vitro* do capsídeo do Vírus da Hepatite C e na inibição da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP, revelados por análises espectroscópicas e calorimétricas

**Theo Luiz Ferraz de Souza**

Orientação: Andréa Cheble de Oliveira

Co-orientação: Jerson Lima da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química Biológica.

Banca Examinadora:

.....  
Prof. Dra. Ana Paula Canedo Valente  
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

.....  
Prof. Dr. Jose Daniel Figueroa Villar  
Professor Associado do Instituto Militar de Engenharia - IME

.....  
Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro  
Professor Associado da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

.....  
Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida  
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ  
(Revisor e Suplente interno)

.....  
Prof. Dr. Paulo Mascarello Bisch  
Professor Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ  
(Suplente externo)

.....  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Cheble de Oliveira  
Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ  
(Orientadora)

.....  
Prof. Dr. Jerson Lima Silva  
Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ  
(Co-orientador)

Rio de Janeiro

\*Julho/2010\*

## Ficha Catalográfica

Souza, Theo Luiz Ferraz de

Aspectos estruturais, dinâmicos e termodinâmicos envolvidos na montagem *in vitro* do capsídeo do Vírus da Hepatite C e na inibição da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP, revelados por análises espectroscópicas e calorimétricas

Theo Luiz Ferraz de Souza - Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM, 2010.

xxxiii, 226 f., Ilustr.

Orientador: Andréa Cheble de Oliveira

Co-Orientador: Jerson Lima Silva

Tese (Doutorado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, 2010.

Referências Bibliográficas: f. 203-225

1. Hepatite C; 2. Proteína Capsídica; 3. Montagem do capsídeo viral; 4. Relação estrutura-função de proteínas; 5. Interação Proteínas-Ligantes; 6. Estabilidade Protéica; 7. Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs); 8. Smac/DIABLO; 9. Apoptose; 10. Dinâmica Molecular; 11. Espectroscopia; 12. Calorimetria; 13. Termodinâmica. I. Oliveira, Andréa Cheble de. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica. III. Título

---

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregorio Weber, Programa de Biologia Estrutural, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Andréa Cheble de Oliveira e co-orientação do professor Jerson Lima Silva, e sob a vigência dos auxílios do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Excelência (PRONEX), Financiadora de Estudos e projetos (FINEP), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB), Instituto Milênio de Biologia Estrutural em Biomedicina e Biotecnologia (IMBEB), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

---

*“A amizade torna a prosperidade mais brilhante  
e ilumina a adversidade, por dividi-la  
e compartilhá-la” (Cícero)*

Dedico esta tese...

*- À minha mãe amada, por todo incentivo, apoio, preocupação, compreensão e Amor. Está sempre pronta para ajudar, apoiar, dar conselhos, conversar. Torce muito por nossa felicidade! Obrigado por sua companhia nos momentos felizes e mil desculpas por te passar minhas preocupações, em meus desabafos. Nosso último fim de ano foi de extrema preocupação..., momento que vi tudo perder o sentido. Mas, hoje me encontro feliz por fazer planos de dividirmos muitos momentos felizes juntos!!! Desculpe-me o tempo distante. Muito obrigado pela grande torcida sincera pela nossa felicidade, pelo suporte fundamental e pelo Amor incondicional. Muita saúde e paz! Te amo incondicionalmente!*

*- Ao meu pai amado, por todo incentivo, apoio, preocupação, compreensão e Amor. Está sempre preocupado com nossa felicidade e nossa saúde, além de estar sempre pronto para ajudar, dar conselhos,... Uma pessoa boa demais, e de um coração sem tamanho! Obrigado por dividir minhas alegrias e minhas conquistas, além de minhas preocupações, e escutar meus desabafos. Desculpe-me o tempo distante. Bom, muito obrigado pela grande torcida sincera pela nossa felicidade, pelo suporte fundamental e te desejo muita saúde e paz por muitos e muitos anos ao nosso lado!!! Te amo incondicionalmente!*

## ***Agradecimentos***

### ***Agradecimentos Parte 1 – Família***

- Aos meus pais Teófilo e Sonia, por simplesmente fazerem parte da minha vida. Por serem meu chão, a base de todo meu empenho e dedicação. Exemplos de humildade, confiança, dedicação, amor e compreensão. Espero poder proporcioná-los muitos momentos especiais juntos. Amo vocês demais! Obrigado por tudo!

- À minha amada irmã Juzza, por todo carinho, preocupação, ajuda e amor. Obrigado também pela sua companhia em minhas idas a JF, por torcer por mim e por sempre nos lembrar de coisas que vivemos esquecendo rsrs. Te Amo!

- À minha amada irmã Luciana, por todo carinho, preocupação e amor. Minha companhia por toda esta etapa, sempre dando conselhos, se preocupando, torcendo por mim, sendo minha companhia em caminhadas, passeios, lanches, nos almoços regados a macarrão (alho e óleo) que só ela sabe fazer... rs Te Amo!

- À minha amada afilhada Juliana, pelo carinho, amor, e por trazer mais alegria com seu jeito especial à nossa família. Obrigado por nos fazer companhia e alegrar nossos passeios, nas idas ao cinema, shopping, etc. Te Amo!

- Ao figurinha do meu afilhado Gabriel, por sempre trazer muitas alegrias à nossa família. Muito carinhoso e adora uma bagunça... rsrs.. Sdds! Sempre quer conversar comigo (trocar umas ideias) quando ligo para casa. Te Amo!

- Aos meus avôs Jarbas, Araci, José e Tereza, pelo carinho e amor e que, apesar de já terem partido para junto de Deus, me proporcionaram felizes momentos com muito carinho. Agradeço-lhes pelo exemplo de vida que me proporcionaram.

- A todos de minha família que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese. Muito obrigado!

## ***Agradecimentos Parte 2***

- A Deus, pela força, tranquilidade e saúde para que eu pudesse terminar mais esta etapa de minha caminhada. Agradeço também pela felicidade e saúde de minha família e por ter conquistado grandes amigos nesta etapa.

- À minha querida orientadora Andréa, por ter me aceito no laboratório como aluno, me dando a oportunidade da realização desta etapa. Obrigado também pela dedicação, pelo apoio, pelo incentivo, pela confiança e pela orientação valiosa. Exemplo de ser humano, humildade e simplicidade! Quando cheguei ao laboratório, ela me acolheu, e como estava perto da seleção de Mestrado, me inseriu em dois projetos distintos me permitindo apreender um pouco mais em pouco tempo, o que foi crucial para o início desta etapa. Serei eternamente grato pela sua generosidade! Obrigado por entender o meu jeito, os meus defeitos, e por confiar em mim e acreditar na minha boa vontade e capacidade, me abrindo novamente as portas para a realização de um pós-doutoramento. Todas estas etapas foram e estão sendo muito importantes para o meu aprendizado pessoal/profissional. Obrigado pela revisão cuidadosa, mesmo que corrida, desta tese, a qual te tomou um grande tempo num momento tão especial de suas vidas! Sempre arruma tempo para ajudar seus alunos nos momentos imprescindíveis. Sempre achei a Andréa uma orientadora especial, mas com o passar dos anos e amadurecimento vi o quanto é diferenciada em inúmeros aspectos, pessoais e profissionais. Torço pela sua felicidade e que sua vida seja regada de alegrias, saúde, paz e amor nesta nova experiência de vida que está por vir! Obrigado por tudo!

- À minha querida (ex) aluna Vanessa, por estar sempre disposta a ajudar, sendo peça importante desta tese. Uma pessoa muito dedicada, esforçada e interessada pelas coisas que faz. Obrigado pela extrema ajuda na bancada e pelas trocas de ideias. Chegou toda envergonhada no laboratório, com medo de apresentar artigos, etc.. e hoje já ganhou até prêmio em apresentação em congresso internacional. Com seu jeitinho particular, conquistou todos. Tenho orgulho do seu crescimento, acredito em sua capacidade e torço muito por você! Espero que suas coisas andem muito bem nesta nova etapa, o Mestrado, no qual pretendo te ajudar no que puder. Somos uma equipe e conte comigo no que precisar! Muito obrigado por sua participação crucial para esta tese!

- Ao Prof. e co-orientador Jerson, que apesar de toda sua ocupação sempre consegue dar uma atenção a todos nos momentos imprescindíveis, além de todo o suporte ao laboratório e às linhas de pesquisa. Obrigado pela co-orientação e pelo exemplo de vida a nível pessoal e profissional.

- Ao Prof. e amigo Andre, por todas suas explicações, sugestões, correções, e críticas durante toda esta etapa, as quais foram fundamentais para o enriquecimento deste trabalho. Obrigado também pela oportunidade da utilização do FCS, pela sua essencial ajuda para execução dos experimentos, assim como para interpretação dos resultados. Obrigado também pelas brincadeiras e pelos momentos de descontração do dia-a-dia!

- Ao Daniel, pelas conversas, pela amizade, pela ajuda, pelos conselhos, pelas brincadeiras, pelas companhias em viagens para congressos e pelos momentos de descontração do dia-a-dia. Um cara que admiro por correr atrás de suas coisas, pensando sempre no futuro de seu filho (a cara do pai, mas é bonito... rs), de sua família. Obrigado também pela ajuda nos experimentos de fluorescência e nas análises de estruturas do PDB na parte do trabalho com o BIR3... Torço por você e conte comigo no que precisar!

- À grande amiga Ygara, por toda ajuda em qualquer momento que eu precisasse, pelas conversas, pelas brincadeiras, pelos almoços no bandejão, pela troca de ideias, pelo incentivo e por ser um grande amiga. Por ter lido grande parte desta tese, ajudando a deixar mais correta, o que mostra sua preocupação e sua boa vontade em ajudar sempre. Obrigado por torcer por mim! Já estamos até com planos de aula de inglês. Torço muito por você, que as coisas se estabilizem rápido e conte comigo no que precisar!

- Ao grande amigo Ivan, por toda importante ajuda nesta etapa, pelas conversas, pelos almoços no bandejão, pelos congressos, passeios, pela troca de ideias e por ser um grande amigo. Obrigado por todos os momentos, além de dividir as preocupações e angústias. Torço para que as coisas se ajeitem rápido pra você e conte comigo para o que precisar! Obrigado por sua preocupação comigo e por torcer por mim. Também não posso esquecer os momentos de descontração e das brincadeiras com sua grande participação com imitações, etc. Esse é o cara!

- À Nathália, por sua amizade, por todas as conversas, pela companhia sempre adorável nos congressos, companheira em “corridas”, pelos momentos na aula de dança, pela troca de experiências e por ser uma companheira nos estudos sobre o HCV. Uma grande amiga, dedicada, de um ótimo coração e que merece o melhor na sua vida. Sempre disposta a ajudar, me ajudou muito em muitos momentos. Espero que possamos contribuir muito ainda no entendimento do HCV com nossos estudos e conte comigo no que precisar. Obrigado por tudo, Nathy!

- À Prof<sup>ta</sup>. e amiga Bianconi, pela grande ajuda, colaboração e apoio na realização e interpretação dos experimentos de calorimetria. Obrigado também pelo carinho, pela dedicação, pela amizade, por todo incentivo e por torcer por mim, além de sempre me dar mais oportunidades de aprendizado, como no convite para auxiliá-la a ministrar um curso para Pós-Graduação em Recife. Acredita na minha simplicidade, dedicação, boa vontade e que sei que posso contar muito ainda com você. Muito obrigado!!!

- À Prof<sup>ta</sup>. Débora, pela sua simplicidade, objetividade, simpatia, amizade e humildade. Uma mulher exemplo de competência, dedicação, comprometimento e de um ótimo coração! Obrigado pelo empenho ao IBqM e aos laboratórios.

- Ao grande amigo Rafael, pela amizade, pelo apoio de sempre, pela ajuda, pelos almoços no bandeirão, pelas brincadeiras que sempre deram mais vida ao laboratório, pelas conversas. Obrigado também pela sua orientação no início de tudo, desde a torcida pela seleção de mestrado (a qual me lembro bem, foi comigo pra ligar para meus pais), como pelo apoio e ajuda de sempre. Obrigado por torcer por mim e me querer o bem! Conte comigo sempre! Valeu Rafa!

- À minha amiga Sheilinha, que me ajudou muito no início desta caminhada. Aprendi bastante com sua experiência, com as conversas, com as explicações... Obrigado também pelo seu apoio fiel de todas as formas e por torcer por mim. Saudades de você! Obrigado por tudo, Sheilinha!!! Espelho-me em você também!

- Ao Carlos, um cara bonito (rs.), gente boa, dedicado, de uma capacidade enorme e muito merecedor de suas conquistas. Conte comigo no que precisar! Obrigado pela sua

*amizade, pelas conversas, pela troca de ideias, pela ajuda, pelas brincadeiras, pelos croissants (rs), etc.!*

*- Ao Guilherme, pelas conversas, pela ajuda e amizade, pela troca de ideias, pelas brincadeiras e passeios, pelas partidas de vôlei, pelas companhias em overnights, etc. Por dividir a responsabilidade do HPLC e do AKTA, que alivia bastante. Um cara sempre disposto a ajudar, muito dedicado, comprometido e merecedor de suas conquistas! Conte comigo no que precisar!*

*- A minha querida companheira Sâmara (minha princesa), por todo carinho, ajuda, apoio, e por torcer por mim e minha felicidade. Pouco tempo juntos, mas já dividimos nossas vidas, e muitos momentos. Obrigado por ser uma pessoa amiga, carinhosa, querida, e que quero perto de mim sempre. Que nossos planos...*

*- À Shana, pelas conversas, pela amizade, pelas brincadeiras, por ajudar a manter as coisas em ordem, por organizar o caixinha, por fazer companhia em overnights, pelas brincadeiras, pelas “corridas”, pelos momentos na aula de dança, etc.*

*- À Cris, pelas conversas, pela amizade, pelas brincadeiras (desculpe algumas delas, rs), pelo carinho, pela ajuda, pela companhia em congressos, pelas “corridas”, pelos momentos na aula de dança, etc. Conte comigo no que precisar! Muito obrigado também por torcer bastante por mim!*

*- À Ana Paula, pelas conversas, pelas brincadeiras, por fazer companhia (juntamente do seu marido Pablo, o qual já deu uma caprichada no meu computador. Obrigado, cara! rs) em vários fins de semana no fundão. Admiro muito sua competência e dedicação, e torço muito por suas conquistas, as quais sempre serão muito merecidas. Obrigado por torcer por mim! Desculpe-me as brincadeiras... rs*

*- À Catarina, pelas conversas, pela amizade, pelos passeios e pelas brincadeiras. Parabéns pelo curso de Biologia Molecular, fez muito sucesso! Muitas felicidades nesta nova etapa de sua vida!*

- Ao Prof. Fabio Almeida, pela ajuda na realização dos experimentos de RMN e na interpretação dos resultados. Por sua empolgação ao ver os resultados saindo. E obrigado por ser o revisor deste trabalho durante três anos.

- Ao Samir, pelas conversas, pelas brincadeiras, pelas viagens para congressos... um cara super-educado (sacana, às vezes), família e de um potencial enorme que merece tudo de bom.

- À Mariana D'Andrea, pelas conversas, pela amizade, pelo carinho, e por estar sempre disposta a ajudar. Obrigado por ceder muitas vezes os calorímetros para que eu pudesse concluir esta etapa!

- À Karla, pelo seu jeito todo especial e por estar sempre disposta a dar um jeitinho para me ajudar, ou limpar os calorímetros, etc. além de sempre me apoiar nas marcações dos calorímetros, dando um jeitinho que para me arrumar um tempo de aparelho pra mim.

- À Carol Cruzeiro, que sempre esteve disposta a me ajudar com os programas para análises dos dados de RMN e pelo carinho.

- Ao Chico, pelas conversas, pelas brincadeiras, por estar sempre disposto a ajudar. Um cara super-bacana, que pode contar comigo sempre. Abraço!

- À Tuane, pelas conversas, pelas brincadeiras, pelas ajudas para preparação de documentos e projetos.

- Ao Daniel Rey, pelas conversas, partidas de futebol e por estar sempre disposto a ajudar.

- Ao Rodrigo, pelas conversas, pela ajuda e pela companhia. Um cara gente fina!

- Ao Lucas, pelas “conversas”, pela ajuda e pela companhia. Espero que esteja bem!

- À Mariana Pierre, pelas conversas, pelas brincadeiras, pelo carinho, pela ajuda nas compras de oligos!
  
- À Pati, pelas conversas, pelas corridas, pelas brincadeiras, pela organização de festinhas e eventos, momentos muito especiais para os amigos.
  
- À Dani, pelas conversas e por dividir as preocupações e informações sobre o livro *Aspectos Moleculares...*
  
- À Amanda, pelas conversas e por ser uma menina adorável, que faz muito bem à sua orientadora.
  
- À Waleska, pelas conversas e brincadeiras. É uma pessoa muito querida! Desculpe as brincadeiras... rs
  
- À Karinne, uma amiga (desculpe-me a distância, vou normalizar minha vida com os amigos depois disso tudo), uma mineirinha muito especial e que merece muitas felicidades.
  
- À Luciana, Clara e Milena, pela conversas e pelas brincadeiras.
  
- À Carol, pelas conversas, por toda ajuda, pela troca de experiências com o HPLC.
  
- À Priscila, pelas conversas, pelas corridas, pelas brincadeiras, por manter a ordem na marcação de equipamentos, e por ser dedicada às coisas do LAPA, para manter materiais e reagentes, etc.
  
- Ao Fernando, pelas conversas e pelas partidas de futebol. Desculpe-me as brincadeiras com o Flamengo/Vasco, é só para descontrair... Sou consciente da situação do Flamengo... rs
  
- Ao Emerson, pelas conversas e brincadeiras, pelo cafezinho do dia a dia, pelos almoços no bandeirão, além do importante e essencial apoio técnico e ajuda para manter a ordem no laboratório.

- À dona Sílvia, pela sua simpatia e dedicação em manter tudo no seu devido lugar, limpo por mais que seja difícil.
- Ao corpo burocrático do laboratório, Roberta, Roseany e Sr. Áureo, pela ajuda nas compras e outros assuntos burocráticos.
- A todos meus verdadeiros amigos, pelos momentos de descontração, pelas conversas, pelo incentivo, pelas brincadeiras e pela contribuição no meu crescimento pessoal.
- À minha ex-professora Silvana, por toda ajuda, pela passagem de conhecimento (uma professora exemplar, que tem consideração de todos da turma), pelas conversas, amizade e pelas orientações que foram essenciais para o início desta importante etapa. Nunca me esquecerei de sua boa vontade comigo! Muito obrigado!
- À Tereza (secretária do IBqM) (e também à Patrícia e ao Leandro), pela competência, e pela firmeza de manter tudo em ordem no seu gabinete, evitando problemas para os alunos.
- Aos professores Ana Paula, Jose Daniel Figueroa, Marcelo Santoro, Paulo Bisch, que gentilmente aceitaram fazer parte da banca avaliadora desta tese.
- Ao Prof. Davis Ferreira, pela obtenção das imagens de microscopia eletrônica e discussão dos resultados.
- Ao Prof. Pascutti e ao Samuel, pelas simulações de dinâmica molecular.
- À Flavia, por ter ajudado na realização de gel shift com P<sup>32</sup>.
- A todos os companheiros do laboratório LTPV/LAPA por toda ajuda, todas as conversas, brincadeiras, companheirismo...
- A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para que esta tese fosse realizada.... O meu muito obrigado!

## ABREVIACÕES E SIGLAS

3D – Tridimensional

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Humana

ALT – Alanina Aminotransferase

Apaf-1 – Fator Apoptótico por Ativação de Protease

ARPF – Tetrapeptídeo constituído por Alanina, Valina, Prolina e Fenilalanina

ARPI – Tetrapeptídeo constituído por Alanina, Arginina, Prolina e Isoleucina

ATPF – Tetrapeptídeo constituído por Alanina, Treonina, Prolina e Isoleucina

AVPF – Tetrapeptídeo constituído por Alanina, Valina, Prolina e Fenilalanina

AVAF – Tetrapeptídeo constituído por Alanina, Valina, Alanina e Fenilalanina

AVP – Tripeptídeo constituído por Alanina, Valina e Prolina

AVPI – Tetrapeptídeo constituído por Alanina, Valina, Prolina e Isoleucina

Bcl-2 – Família de Proteínas Reguladoras de Apoptose

BIR – Repetições de IAP em Baculovírus

Bis-ANS – bis-8-anilinaftaleno-1-sulfonato

BRUCE – Enzima Conjugada à Ubiquitina contendo Repetições de BIR

CARD – Domínio Recrutador de Caspases

Caspase – Cisteíno-Protease Aspartato Específica

CD – Células Dendríticas

CD – Dicroísmo Circular

cDNA – DNA complementar

CR – Complexo Replicativo

CRS – índice de Risco à Cirrose

C-terminal – Região próxima ao aminoácido com o grupamento carboxila livre

CTL – Linfócito T Citotóxico

D.O. – Densidade Óptica

dATP – Desoxiadenosina Trifosfato

DIABLO – Proteína de Baixo pI de Ligação Direta à IAP

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DNase – Desoxirribonuclease

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

DTT – Ditioneitol

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

EMSA – Ensaio de Desvio da Mobilidade Eletroforética

EUA – Estados Unidos da América

FADD – Domínio de Morte Associado a FAS

FCS – Espectroscopia de Correlação de Fluorescência

FDA – Administração de Alimentos e Fármacos

$G_{1/2}$  – Concentração de Guanidina capaz de induzir metade do processo de Desnaturação

GFP – Proteína Fluorescente Verde

GST – Glutathione S-Transferase

GTP – Guanosina Trifosfato

GVPI – Tetrapeptídeo constituído por Glicina, Valina, Prolina e Isoleucina

HBV - Vírus da Hepatite B

HCC - Hepatocarcinoma Celular

HCV – Vírus da Hepatite C

HCV124 – Proteína Capsídica do HCV Truncada (contendo 124 aminoácidos)

HCV124GFP – Proteína Capsídica do HCV Truncada e Fusionada a GFP

HCVcc – Cultura de Célula para o HCV

HCVpp – Pseudo Partículas de HCV

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Resolução

HSQC – Correlação Heteronuclear de um Único Campo

IAP – Proteínas Inibidoras de Apoptose

IFN – Interferon

IMP - Inosina Monofosfato

IMPDH - Inosina-Monofosfato Desidrogenase

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPTG – Isopropil beta galactosidase

IRF9 - Fator Regulatório de Interferon 9

ISG - Gen Estimulado por Interferon

ISREs – Elementos Responsivos Estimulados por Interferon

ITC – Calorimetria de Titulação Isotérmica

IUP – Proteína Intrinsecamente Desenovelada

LB – Luria-Bertani

LD – Gotículas Lipídicas

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LVP - Lipoviropartículas

MOMP – Permeabilização da Membrana Externa Mitocondrial

MTP – Proteína de Transporte de Triglicerídeo Microsomal

NAIP – Proteína Inibidora de Apoptose Neuronal

NK – células *Natural Killer*

NLPs - Partículas Semelhantes ao Capsídeo Viral

NOE - Efeito Nuclear *Overhauser*

NS - Não Estrutural

N-terminal – Região próxima ao aminoácido com o grupamento amina livre

NTPase – Hidrolase Nucleosídeo Trifosfato Ativa

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – Região Livre para Leitura

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PCH – Histograma de Contagem de Fótons

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDB – Banco de Dados de Proteínas

PMSF – Fenilmetilsulfonilfluorido

RBV – Ribavirina

RDP - Ribavirina Difosfato

RE - Retículo Endoplasmático

RIBA – Imunoensaio Recombinante

RING – Novos Genes de Interesse

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMP – Ribavirina Monofosfato

RMSD - Desvio da Raiz Média Quadrática

RMSF – Flutuação da Raiz Média Quadrática

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro

RTP - Ribavirina Trifosfato

SAS – Superfície Acessível ao Solvente

SAR – Relação Estrutura-Atividade

SDM – Simulação por Dinâmica Molecular

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

Smac – Segundo Ativador de Caspase derivado da Mitocôndria

SPP - Peptidase Peptídeo Sinal

SR-BI – Receptor de Retirada da Classe B Tipo1

STAT - Proteína Transdutora de Sinal Citoplasmática e Ativadora de Transcrição

TBE – Tris/Borato/EDTA

TFE – Trifluoretanol

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TPEN – N,N,N',N'-Tetra-(2-piridilmetil)etilenodiamina

TRAILR – Receptor 1 para Ligante Indutor de Apoptose

Tris – Tris (hidroximetil) amino-metano

Trp – Triptofano

TTR - Transtirretina

$U_{1/2}$  – Concentração de ureia capaz de induzir metade do processo de desnaturação

UTRs – Regiões não traduzidas

UV – Luz Ultravioleta

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

VLP – Partículas semelhantes a partículas virais

XIAP – IAP ligada ao X

## RESUMO - Parte 1

Souza, Theo Luiz Ferraz de. Aspectos estruturais, dinâmicos e termodinâmicos envolvidos na montagem *in vitro* do capsídeo do Vírus da Hepatite C e na inibição da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A Hepatite C é um problema de saúde pública mundial. Aproximadamente 3% da população mundial encontra-se atualmente infectada pelo Vírus da Hepatite C (HCV). A região N-terminal da proteína capsídica do Vírus da Hepatite C (HCV124) tem sido descrita como uma proteína intrinsecamente desestruturada. Além de sua função estrutural, esta proteína é responsável por vários processos virais e celulares, desempenhando um papel crítico na patogênese da hepatite C, porém tais mecanismos não são bem compreendidos. Este trabalho visa uma melhor compreensão da montagem do HCV *in vitro* e da relação estrutura-função da HCV124. Aqui, nós utilizamos espectrofotometria, espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, microscopia eletrônica e calorimetria para investigar a relação estrutura-função desta proteína em uma forma truncada com 124 aminoácidos (HCV124), e assim acrescentar alguns aspectos termodinâmicos. Mostramos que esta proteína monomérica truncada pode adotar estruturas intermediárias em diferentes condições, tais como na presença da sonda bis-8-anilinaftaleno-1-sulfonato (bis-ANS), trifluoretanol (TFE), dodecil sulfato de sódio (SDS) ou alta concentração de sal. Estes ligantes e condições físicas podem mimetizar ambientes fisiológicos em que a proteína capsídica do HCV é capaz de se ligar a diferentes alvos e desempenhar diferentes funções. Por outro lado, quando submetemos a proteína capsídica do HCV a pH próximo do ponto isoelétrico, verificamos a formação de partículas semelhantes ao nucleocapsídeo (NLPs) por microscopia eletrônica. Esse resultado mostra claramente, pela primeira vez, que a neutralização de resíduos básicos é o principal fator que impulsiona o processo de multimerização da proteína em solução. Mostramos também que a montagem de NLPs desencadeada por sequências de DNA ou RNA curtas é inespecífica e entalpicamente dirigida, como verificado por calorimetria de titulação isotérmica. A HCV124 fusionada à Proteína Fluorescente Verde (GFP) também foi utilizada e todos os resultados foram semelhantes, indicando que a GFP não inibe o processo e que esta forma fusionada pode ser utilizada em ensaios em células. Ensaios de *gel shift* e dados de polarização de fluorescência e espectroscopia de correlação de fluorescência indicam que a montagem é altamente cooperativa, visto que não foi possível detectar intermediários estáveis em equilíbrio em solução. Em resumo, estes resultados podem revelar a termodinâmica e a base estrutural das diferentes funções da proteína capsídica do HCV, que é um alvo promissor contra a replicação viral.

## ABSTRACT - Part 1

Souza, Theo Luiz Ferraz de. Aspectos estruturais, dinâmicos e termodinâmicos envolvidos na montagem *in vitro* do capsídeo do Vírus da Hepatite C e na inibição da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Hepatitis C is a worldwide public health problem. Approximately 3% of the World population is infected with Hepatitis C Virus (HCV). The N-terminal of HCV core protein (HCV124) has been described as an intrinsically disordered protein. In addition to its structural function, HCV core protein is responsible for several viral and cellular processes, playing a critical role in HCV pathogenesis, but these mechanisms are not well understood. This work aims a better understanding of the viral capsid assembly *in vitro* and of the structure-function relationship of the HCV124. Here, we utilized spectrophotometry, fluorescence spectroscopy, circular dichroism, electron microscopy and calorimetry to investigate the structure-function relationship of HCV core protein in a truncated form and to add some thermodynamic aspects. We show that the truncated and monomeric HCV124 can adopt intermediate structures in different conditions, such as in the presence of the probe bis-8-anilinonaphthalene-1-sulfonate (bis-ANS), trifluoroethanol (TFE), sodium dodecil sulphate (SDS) or high salt concentrations. These ligands and physical conditions can mimic the physiological environment where the HCV core protein is able to bind to different targets and play different functions. On the other hand, when we submitted the HCV core protein to pH values close to the isoelectric point, we verified the formation of nucleocapsid-like particles (NLPs) by electron microscopy and light scattering. This result shows clearly, for the first time, that the neutralization of basic residues is the main factor that drives the multimerization process *in vitro*. We also showed that the NLPs assembly triggered by short unspecific DNA or RNA is enthalpically driven, as verified by isothermal titration calorimetry. HCV124 fused to GFP was also utilized and all results were similar, indicating that the GFP does not inhibit the process and that this fused form can be used for studies in cells. Gel shift assays, fluorescence polarization and fluorescence correlation spectroscopy data indicate that the assembly is a highly cooperative process since no stable intermediate was detected. Overall, these results can shed light on the thermodynamics and structural basis of the different functions of the HCV core protein, which is a promising target to oppose the viral replication.

## RESUMO - Parte 2

Souza, Theo Luiz Ferraz de. Aspectos estruturais, dinâmicos e termodinâmicos envolvidos na montagem *in vitro* do capsídeo do Vírus da Hepatite C e na inibição da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A Proteína Inibidora de Apoptose XIAP é o mais potente membro da família de Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs), pois inibe as caspases, bloqueando a cascata apoptótica. Antagonistas de IAPs têm atraído muita atenção nos últimos anos devido a suas potenciais aplicações terapêuticas por induzir apoptose em células cancerosas. O tetrapeptídeo AVPI, presente na proteína proapoptótica Smac/DIABLO, liga-se ao domínio XIAP-BIR3, permitindo que as células cancerosas morram. Este trabalho visa um melhor entendimento da natureza da inibição do domínio XIAP-BIR3. Nós caracterizamos os parâmetros de ligação do AVPI ao XIAP-BIR3 e analisamos seus efeitos sobre a estabilidade termodinâmica deste domínio. O XIAP-BIR3 foi excepcionalmente estável a tratamentos físicos e químicos e se tornou ainda mais estável pela interação com AVPI. Experimentos de ressonância magnética nuclear mostraram que a interação do AVPI com XIAP-BIR3 leva a uma seleção conformacional. Simulações de dinâmica molecular corroboram que a flexibilidade do XIAP-BIR3 é significativamente reduzida quando o complexo é formado. A entropia positiva da interação associada à perda de entropia conformacional indica que as interações hidrofóbicas têm um papel importante na interação e estabilização do domínio. O mecanismo de estabilização do XIAP-BIR3 e suas implicações para a otimização da afinidade de fármacos foram discutidos. Além disso, caracterizamos os parâmetros de ligação de sete diferentes tetrapeptídeos antagonistas, e verificamos os seus efeitos sobre a estrutura e estabilidade do XIAP-BIR3 por dicróismo circular (CD), calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e calorimetria de varredura diferencial (DSC). Nossos dados de ITC mostraram diferentes combinações de componentes de entalpia e entropia de ligação de todos os tetrapeptídeos ao XIAP-BIR3 e análises de afinidade-estrutura foram possíveis. Os dados de DSC mostraram que a estabilidade do domínio correlaciona-se com a afinidade dos peptídeos. Dados de CD mostraram que as diferentes afinidades e as alterações na estabilidade estão estritamente associadas às mudanças estruturais. Além disso, os dados de CD e análises do PDB indicam um aumento de estrutura em  $\alpha$ -hélice na presença de alguns ligantes. Nossos dados fornecem importantes abordagens sobre as forças moleculares que controlam a afinidade ao XIAP-BIR3 e podem ser considerados no planejamento de fármacos. XIAP-BIR3 contém um íon de zinco tetracoordenado por três resíduos de cisteína e um de histidina. Recentemente foi verificado que a quelação de zinco induz a rápida degradação da XIAP e sensibiliza as células cancerosas a apoptose. Desta forma, o zinco da XIAP também tem sido sugerido como um alvo para o desenho de fármacos e a caracterização do papel do zinco na estrutura XIAP-BIR3, estabilidade termodinâmica e função torna-se essencial. Nossos dados de fluorescência e CD indicam que a depleção de zinco não tem efeitos significativos na estrutura do domínio XIAP-BIR3, no entanto, há uma grande desestabilização do XIAP-BIR3 contra a desnaturação por ureia, guanidina e altas temperaturas. Apesar da desestabilização do domínio, resultados de espectroscopia e calorimetria mostram que a depleção de zinco não inibe a sua capacidade de interagir com AVPI e ATPF, que simulam os seus alvos fisiológicos. Nossos resultados também indicam que agentes quelantes de zinco possam ser utilizados para sensibilizar as células malignas a agentes citotóxicos, através da desestabilização da estrutura do XIAP-BIR3, mas não pela inibição de sua função.

## ABSTRACT - Part 2

Souza, Theo Luiz Ferraz de. Aspectos estruturais, dinâmicos e termodinâmicos envolvidos na montagem *in vitro* do capsídeo do Vírus da Hepatite C e na inibição da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) is the most potent member of the Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) family of endogenous caspase inhibitors blocking the apoptotic cascade. The IAP antagonists have attracted a lot of attention in the recent past because of their potential therapeutic applications to induce apoptosis of cancer cells. The tetrapeptide AVPI, from the proapoptotic protein Smac/DIABLO, binds to the XIAP-BIR3 domain, allowing the cancer cells to die. This work aims a better understanding of the nature of XIAP-BIR3 domain inhibition. We characterize the binding parameters of AVPI to XIAP-BIR3 and analyze its effects on the thermodynamic stability of this domain. XIAP-BIR3 was exceptionally stable to physical and chemical treatments and became even more stable by interaction with AVPI. Nuclear magnetic resonance experiments demonstrated that conformational selection is taking place upon AVPI interaction to XIAP-BIR3. Molecular dynamics simulations corroborate that the flexibility of XIAP-BIR3 is significantly reduced. The positive binding entropy associated to loss of conformational entropy involved in the binding indicate that hydrophobic interactions play an important role in the interaction and domain stabilization. The mechanism of XIAP-BIR3 stabilization and its implications for drug affinity optimization were discussed. In addition, we characterized the binding parameters of seven different tetrapeptides antagonists, and verified their effects on the XIAP-BIR3 structure and stability by circular dichroism (CD), isothermal titration calorimetry (ITC) and differential scanning calorimetry (DSC). Our ITC data showed different combinations of enthalpy and entropy components of the binding of all tetrapeptides on XIAP-BIR3 and analyses of structure-affinity could be performed. DSC data showed that BIR3 domain stability correlate with the affinity of the peptides. CD data showed that the different affinities and the changes on stability were strictly associated to the structural changes. CD data and PDB analyses indicate increase in the  $\alpha$ -helix content with some ligands. Our data provide important insights into the molecular forces that control the XIAP-BIR3 binding affinity that can be considered in drug design. XIAP-BIR3 contains a zinc ion tetra-coordinated by three cysteine residues and a histidine. Recently was verified that zinc chelation induces rapid depletion of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and sensitizes prostate cancer cells to TRAIL mediated apoptosis. Consequently, the XIAP zinc binding site has also been suggested as a possible target for drug discovery. Thus, the characterization of the role of the zinc in the XIAP-BIR3 structure, thermodynamic stability and function become essential. Our fluorescence and CD data indicate that the zinc depletion does not show great effects on the structure of the XIAP-BIR3 domain. However, the zinc depletion highly destabilizes the XIAP-BIR3 against urea, guanidine and temperature denaturation. In spite of the domain destabilization, spectroscopy and calorimetry results show that the zinc depletion does not inhibit its capacity to interact with the tetrapeptides, AVPI and ATPF, that simulate its physiological targets. Our findings also indicate that zinc-chelating agents may be used to sensitize malignant cells to established cytotoxic agents via XIAP-BIR3 structure destabilization, but not by inhibition of its function.

# Índice

## 1. Parte 1

<b>1.1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Hepatite C.....</b>	<b>2</b>
1.1.1.1. Histórico .....	2
1.1.1.2. Epidemiologia.....	3
1.1.1.3. Evolução da Hepatite C – um problema de saúde pública .....	6
1.1.1.4. Fisiopatologia.....	9
1.1.1.5. Sintomas .....	10
1.1.1.6. Transmissão .....	11
1.1.1.7. Diagnóstico.....	12
1.1.1.8. Tratamento.....	15
1.1.1.9. Hepatite C e co-infecção com Hepatite B .....	20
1.1.1.10. Hepatite C e co-infecção com HIV .....	21
<b>1.1.2. A Família <i>Flaviviridae</i> .....</b>	<b>22</b>
1.1.2.1. O Gênero <i>Hepacivírus</i> .....	23
1.1.2.1.1. O Vírus da Hepatite C (HCV) .....	23
1.1.2.1.1.1. A Proteína Capsídica do HCV .....	33
1.1.2.1.1.2. Montagem do nucleocapsídeo viral.....	36
<b>1.1.3. Relação estrutura-função de proteínas .....</b>	<b>44</b>
1.1.3.1. Proteínas intrinsecamente desestruturadas .....	46
<b>1.2. Objetivos .....</b>	<b>51</b>
<b>1.3. Material e Métodos .....</b>	<b>53</b>
1.3.1. Reagentes .....	53
1.3.2. Ácidos nucleicos .....	53
1.3.3. Obtenção de Células Competentes .....	53
1.3.4. Transformação das Células Competentes por Eletroporação .....	54
1.3.5. Expressão e purificação das proteínas capsídicas do HCV (HCV124 e HCV124GFP) - cromatografia de troca iônica e de afinidade (ou fase reversa) .....	55

1.3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	57
1.3.7. Análise das NLPs por espectrofotometria .....	57
1.3.8. Ensaio de interação proteína-DNA por Ensaio do Desvio da Mobilidade Eletroforética (EMSA ou <i>gel shift</i> ) .....	58
1.3.9. Análise por Microscopia Eletrônica de transmissão de capsídeos <i>in vitro</i> formados pela ligação da proteína HCV124 a sequências inespecíficas de DNA .....	59
1.3.10. Medidas espectroscópicas .....	60
1.3.10.1. Espectroscopia de fluorescência .....	60
1.3.10.2. Polarização de fluorescência .....	63
1.3.10.3. Dicroísmo Circular .....	64
1.3.10.4. Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS) .....	67
1.3.11. Espalhamento de Luz .....	70
1.3.12. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) .....	71
1.3.13. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) .....	71
<b>1.4. Resultados .....</b>	<b>76</b>
1.4.1. Apresentação do Manuscrito 1 (Anexo 1) .....	76
1.4.2. Análise da formação em solução de partículas semelhantes a capsídeos do HCV .....	77
1.4.3. Interação proteína-ácido nucléico analisada por Ensaio de desvio de mobilidade eletroforética (EMSA ou <i>gel shift</i> ) .....	79
1.4.4. Análise das partículas semelhantes a capsídeo por polarização de fluorescência .....	81
1.4.5. Análise da interação proteína-DNA por Espectroscopia de Correlação de Fluorescência .....	82
1.4.6. Cinética de Formação das NLPs em solução .....	85
<b>1.5. Discussão .....</b>	<b>88</b>
1.5.1. Relação estrutura-função da proteína capsídica do HCV .....	88
1.5.2. Análise da formação de partículas semelhantes a capsídeos do Vírus da Hepatite C .....	95
<b>1.6. Conclusões .....</b>	<b>100</b>

## **2. Parte 2**

<b>2.1. Introdução</b>	<b>101</b>
<b>2.1.1. Apoptose</b>	<b>103</b>
2.1.1.1. Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs)	109
2.1.1.2. A Proteína Smac/DIABLO	112
2.1.1.3. Apoptose como alvo para terapia contra o câncer	116
<b>2.1.2. Enovelamento protéico e estabilidade de proteínas</b>	<b>119</b>
<b>2.1.3. O uso de agentes desnaturantes nos estudos de estabilidade de proteínas</b>	<b>123</b>
<b>2.1.4. Dinâmica de proteínas</b>	<b>126</b>
<b>2.1.5. Importância do zinco em algumas estruturas protéicas e em funções biológicas</b>	<b>132</b>
<b>2.1.6. Termodinâmica de interação proteína-ligante e calorimetria aplicada à otimização do desenho racional de fármacos</b>	<b>136</b>
<b>2.2. Objetivos</b>	<b>143</b>
<b>2.3. Material e Métodos</b>	<b>146</b>
2.3.1 – Reagentes	146
2.3.2 - Peptídeos	146
2.3.3 – Transformação das Células Competentes por Eletroporação	146
2.3.4 – Expressão e Purificação do Domínio BIR3 da Proteína XIAP	147
2.3.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	150
2.3.6 – Agentes desnaturantes químicos	150
2.3.7 – Pressão Hidrostática e Termodinâmica	151
2.3.8 – Medidas Espectroscópicas	153
2.3.8.1 – Espectroscopia de Fluorescência	153
2.3.8.2 – Dicroísmo Circular	154
2.3.9 – Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)	155
2.3.10 – Calorimetria	155
2.3.10.1 – Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	155
2.3.10.2 – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	156
2.3.11 - Simulação de Dinâmica Molecular	159
2.3.11.1 - Métodos de Análise utilizados	159

2.3.12 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	162
<b>2.4. Resultados</b> .....	164
2.4.1. Apresentação do Manuscrito 2 (Anexo 2) .....	164
2.4.2. Um estudo estrutural e termodinâmico da interação de peptídeos antagonistas da XIAP - Manuscrito 3 (Anexo 3) .....	166
2.4.3. Investigando o papel de íons Zinco na estrutura, estabilidade e função do domínio BIR3 .....	177
<b>2.5. Discussão</b> .....	186
2.5.1. Caracterização estrutural, termodinâmica e dinâmica da interação de XIAP-BIR3 e AVPI .....	187
2.5.2. Novas abordagens para auxiliar no planejamento de antagonistas de IAPs: um estudo estrutural e termodinâmico .....	193
2.5.3. Papel do zinco na estrutura, estabilidade termodinâmica e função do domínio XIAP-BIR3 .....	198
<b>2.6. Conclusões</b> .....	202
<b>3. Referências Bibliográficas</b> .....	203
<b>4. Anexos</b> .....	226

# Índice de Tabelas

## Parte 1

**Tabela 1.1: Fatores de risco para o contágio da Hepatite C .....12**

## Parte 2

**Tabela 2.1: Parâmetros de ligação para interação entre os peptídeos e o domínio BIR3 estimados a partir de dados de calorimetria isotérmica de titulação (ITC).....168**

**Tabela 2.2: Parâmetros de desnaturação térmica do domínio XIAP-BIR3 livre e complexado com diferentes peptídeos .....176**

**Tabela 2.3: Parâmetros termodinâmicos que mostram a diferença de estabilidade do domínio XIAP-BIR3 promovida pela retirada do zinco .....183**

**Tabela 2.4: Análise da variação de SAS hidrofílico e hidrofóbico promovida pela remoção do zinco da estrutura do XIAP-BIR3 .....184**

# Índice de Figuras

## Parte 1

Figura 1.1: Evolução dos estudos sobre o HCV .....	3
Figura 1.2: Prevalência estimada da infecção pelo HCV por região .....	4
Figura 1.3: Distribuição dos genótipos do HCV no Mundo .....	5
Figura 1.4: Distribuição dos genótipos do HCV em diferentes regiões do Brasil .....	6
Figura 1.5: História natural da Hepatite C .....	8
Figura 1.6: Fluxograma de investigação laboratorial da Hepatite C .....	14
Figura 1.7: Mecanismos de ação do IFN e da Ribavirina .....	17
Figura 1.8: Gêneros da família <i>Flaviviridae</i> .....	22
Figura 1.9: Modelo da estrutura da partícula do HCV .....	24
Figura 1.10: Árvore filogenética do Vírus da Hepatite C (HCV) .....	26
Figura 1.11: A) Organização genética e processamento da poliproteína do Vírus da Hepatite C (HCV) .....	28
B) Estrutura e associação de membrana das proteínas do HCV .....	28
Figura 1.12: Ciclo replicativo do Vírus da Hepatite C .....	30
Figura 1.13: Análises da sequência primária da Proteína Capsídica do Vírus da Hepatite C .....	35
Figura 1.14: Associação das proteínas estruturais do HCV na membrana e o modelo para a morfogênese do HCV.....	37
Figura 1.15: Modelo para a montagem do HCV .....	42
Figura 1.16: Peculiaridades das sequências de aminoácidos de proteínas intrinsecamente desestruturadas .....	48
Figura 1.17: Avaliação do grau de pureza da HCV124 e HCV124GFP .....	56
Figura 1.18: Diagrama de Jablonski para fluorescência com relaxação do solvente .....	61
Figura 1.19: Espectros de fluorescência de resíduos aromáticos .....	62
Figura 1.20: Origem do efeito do Dicroísmo Circular (CD) .....	65
Figura 1.21: Diagrama de um peptídeo mostrando a orientação dos dipolos (indicados em setas) das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ .....	66
Figura 1.22: O espectro de CD no UV (ultravioleta) distante está associado com vários tipos de estrutura secundária .....	67
Figura 1.23: Excitação por dois fótons .....	68
Figura 1.24: Esquema de uma análise de FCS .....	69
Figura 1.25: Determinação de interações moleculares .....	70

Figura 1.26: Representação esquemática da compensação de potência no calorímetro de titulação isotérmica .....	72
Figura 1.27: Experimento representativo da interação de um ligante a uma proteína .....	74
Figura 1.28: Ensaio de montagem de partículas semelhantes ao capsídeo viral do HCV monitorado por espectrofotometria .....	79
Figura 1.29: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de partículas semelhantes ao capsídeo viral formadas a partir da proteína HCV124 em diferentes concentrações .....	79
Figura 1.30: Interação da proteína capsídica do HCV com DNA poli(GC) .....	80
Figura 1.31: Análise do empacotamento de DNA pela proteína HCV124 por polarização de fluorescência .....	82
Figura 1.32: Análise da interação HCV124-DNA poli(GC) por Espectroscopia de Correlação de Fluorescência .....	83
Figura 1.33: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de partículas semelhantes ao capsídeo viral formadas a partir da proteína HCV124 fusionada à GFP (HCV124GFP) <i>in vitro</i> .....	84
Figura 1.34: Ensaio de montagem de partículas semelhantes a capsídeo viral a partir da proteína HCV124 fusionada a GFP monitorado por espectrofotometria .....	85
Figura 1.35: Dependência de concentração de DNA verificada em ensaio de montagem de partículas semelhantes ao capsídeo viral a partir de HCV124GFP por espectrofotometria .....	86
Figura 1.36: Análises do empacotamento de DNA p53 e DNA poli(GC) pela proteína HCV124 fusionada a GFP por EMSA ( <i>gel shift</i> ) .....	87

## Parte 2

Figura 2.1: As etapas da carcinogênese .....	101
Figure 2.2: Capacidades adquiridas no câncer .....	102
Figura 2.3: Vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas .....	105
Figura 2.4: Diagrama esquemático dos mecanismos de ativação e inibição de caspases .....	108
Figura 2.5: Esquema da estrutura de um dos mais importantes membros da família IAP .....	111
Figura 2.6: Estrutura do domínio XIAP-BIR3 .....	111
Figura 2.7: Estrutura da Smac/DIABLO e do complexo formado na ligação do Tetrapeptídeo AVPI da Smac/DIABLO ao domínio XIAP-BIR3 das IAPs .....	114

Figura 2.8: Visão esquemática do enovelamento protéico, mostrando os dois modelos clássicos extremos de enovelamento protéico: o modelo do colapso hidrofóbico e do “ <i>framework</i> ” .....	120
Figura 2.9: A termodinâmica do enovelamento protéico ilustrada como um funil de enovelamento .....	122
Figure 2.10: Forças estabilizantes e desestabilizantes no enovelamento de uma proteína .....	123
Figura 2.11: O panorama energético define a amplitude e a escala de tempo dos movimentos de proteína .....	128
Figura 2.12: A escala de tempo de processos dinâmicos em proteínas e os métodos experimentais que podem detectar as flutuações de cada determinada escala de tempo .....	129
Figure 2.13: Dois modelos para explicar interação: <i>fit</i> induzido e o modelo incluindo estados conformacionais pré-existentes .....	131
Figura 2.14: Interações entre proteínas e zinco .....	134
Figure 2.15: Principais fatores termodinâmicos relacionados à interação proteína-ligante .....	137
Figura 2.16: Otimização termodinâmica de fármacos .....	139
Figura 2.17: A assinatura termodinâmica de inibidores da protease de HIV-1 aprovados pelo FDA .....	140
Figura 2.18: Etapas da purificação do domínio BIR3 analisadas por SDS-PAGE .....	148
Figura 2.19: Retirada da cauda GST pós-clivagem verificada por absorvância a 280 nm .....	148
Figura 2.20: Verificação da pureza do domínio XIAP-BIR3 após gel-filtração em HPLC .....	149
Figura 2.21: Sistema de alta pressão hidrostática .....	151
Figura 2.22: Representação esquemática de um típico instrumento de Calorimetria Diferencial de Varredura .....	157
Figura 2.23: Experimento típico de calorimetria diferencial de varredura .....	158
Figura 2.24: Dados normalizados retirados de um experimento típico de DSC ...	158
Figura 2.25: Titulação calorimétrica de XIAP-BIR3 com os diferentes peptídeos .....	167
Figura 2.26: Curvas construídas a partir dos experimentos de calorimetria de titulação isotérmica, de maneira a representar o grau de variação de entalpia (A) e de afinidade (B) entre os peptídeos .....	169
Figura 2.27: Análises termodinâmicas dos peptídeos .....	170
Figura 2.28: Correlação da afinidade com a variação de entalpia na ligação de diferentes ligantes ao domínio BIR3. Compensação entálpico-entrópica na ligação de diferentes peptídeos ao domínio XIAP-BIR3 .....	171
Figura 2.29: Gráfico demonstrando as diferenças da constante de dissociação dos diferentes peptídeos .....	172

<b>Figura 2.30: Análise da estrutura secundária do XIAP-BIR3 na presença dos peptídeos .....</b>	<b>174</b>
<b>Figura 2.31: Diferenças do conteúdo de estrutura secundária do domínio XIAP-BIR3 isolado e na presença de ligantes de dados extraídos do PDB ("Protein Data Bank") .....</b>	<b>175</b>
<b>Figure 2.32: Análises do efeito da retirada de zinco sobre a estrutura secundária e terciária do domínio XIAP-BIR3 .....</b>	<b>178</b>
<b>Figura 2.33: Importância do zinco para a estabilidade conformacional do domínio XIAP-BIR3 frente ao cloridrato de guanidina .....</b>	<b>180</b>
<b>Figura 2.34: Estabilidade conformacional do domínio XIAP-BIR3 frente à uréia .....</b>	<b>181</b>
<b>Figura 2.35: Estabilidade conformacional do domínio XIAP-BIR3 frente a agentes desnaturantes físicos .....</b>	<b>182</b>
<b>Figure 2.36: Simulação de dinâmica molecular do domínio XIAP-BIR3 na presença e ausência de zinco .....</b>	<b>184</b>
<b>Figura 2.37: Ensaio por espectroscopia de fluorescência para verificar a capacidade funcional do domínio XIAP-BIR3 na ausência de zinco .....</b>	<b>185</b>

# 1. Parte 1

## 1.1. Introdução

Hepatite (*hepato*, do grego fígado, e *ite*, sufixo usual das inflamações) é toda e qualquer inflamação do fígado e que pode resultar desde em uma simples alteração laboratorial (portador crônico que descobre por acaso a sorologia positiva), até em doença fulminante e fatal (mais frequente nas formas agudas). Existem várias causas de hepatite, sendo as mais conhecidas as causadas por vírus (vírus das hepatites A, B, C, D, E, F, G, citomegalovírus, etc). Além de vírus, podemos destacar outras causas, como: drogas (antiinflamatórios, anticonvulsivantes, sulfas, derivados imidazólicos, hormônios tireoidianos, anticoncepcionais, etc) e distúrbios metabólicos (doença de Wilson, politransfundidos, hemossiderose, hemocromatose, etc).

Em comum, todas as hepatites têm algum grau de destruição das células hepáticas. A grande maioria das hepatites agudas são assintomáticas ou levam a sintomas não característicos como febre, mal estar, desânimo e dores musculares. Hepatites mais severas podem levar a sintomas mais específicos, sendo o sinal mais chamativo a icterícia, conhecida popularmente no Brasil por "trisa" ou "amarelão", e que caracteriza-se pela coloração amarelo-dourada da pele e conjuntivas. Hepatites mais graves podem gerar insuficiência hepática e encefalopatia hepática decorrente, levando ao óbito. Hepatites crônicas (com duração superior a 6 meses), geralmente são assintomáticas e podem progredir para cirrose e hepatocarcinoma. As hepatites virais são consideradas a maior pandemia mundial da atualidade. Neste trabalho, iremos abordar aspectos relacionados à Hepatite C e, mais especificamente, estudos biofísicos da proteína capsídica e da montagem do capsídeo do vírus da Hepatite C (HCV, do inglês *Hepatitis C virus*).

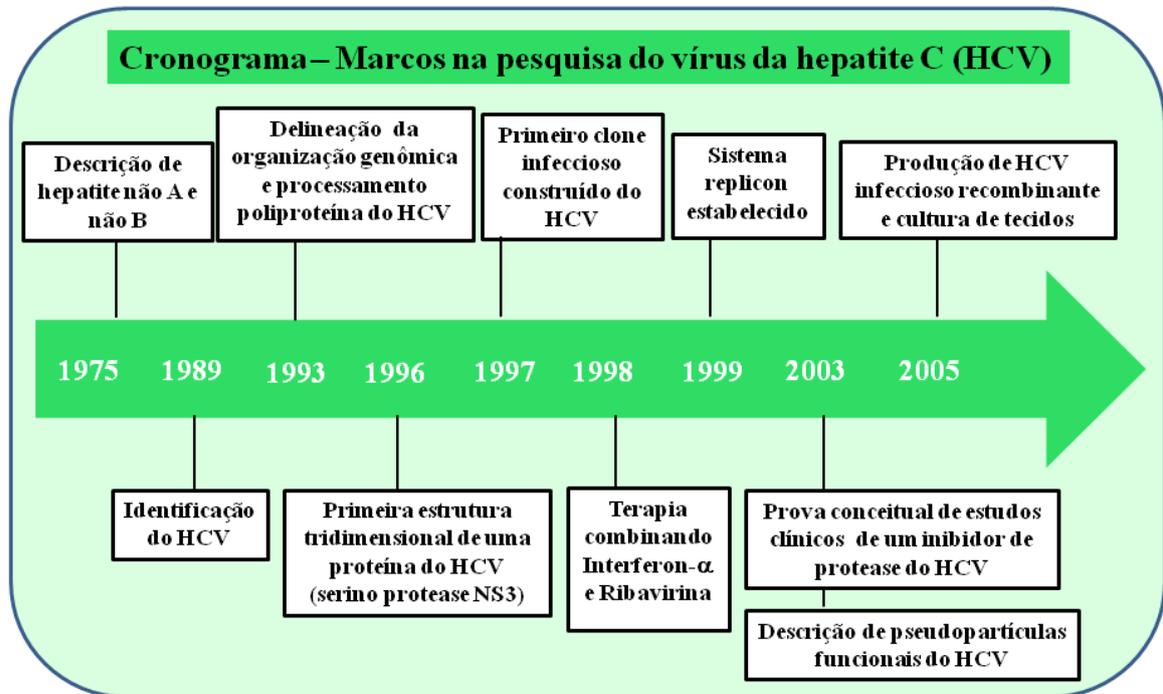
## 1.1.1. Hepatite C

### 1.1.1.1. Histórico

A possibilidade da existência de um terceiro agente viral hepático foi levantada em 1974, quando um estudo mostrou que a maior parte das hepatites pós-transfusionais não estavam relacionadas ao vírus da Hepatite B (HBV), tendo os autores denominado este agente como HCV, embora, na época, não dispusessem de dados mais concretos sobre a existência deste novo agente (PRINCE e cols., 1974). Em 1975, ficou claro que poderia haver a existência de mais de um agente relacionado a hepatites não-B, sendo então a terminologia de hepatite não-A e não-B usada para estes casos (FEINSTONE e cols., 1975; SEEFF e cols., 1975).

Somente em 1989 o HCV foi identificado, por *immunoscreening* em uma biblioteca de expressão do soro de um paciente, como hepatite pós-transfusional não-A, não-B (CHOO e cols., 1989). Este mesmo grupo introduziu, simultaneamente, a disponibilidade de testes sorológicos que permitissem a identificação de indivíduos contaminados através da detecção de anticorpos específicos (KUO e cols., 1989). No entanto, o vírus não foi conclusivamente visualizado, pois o baixo título viral no soro e a bioquímica do tecido hepático impediam a caracterização das partículas. O mais importante é que não foi possível realizar cultura eficiente do HCV *in vitro*, dificultando a elucidação do ciclo viral e do desenvolvimento de certos agentes antivirais e vacinas preventivas (MORADPOUR e cols., 2007). Apesar destes obstáculos, foram feitos importantes estudos sobre o HCV nos últimos 18 anos, utilizando sistemas de expressão heteróloga, clones de cDNA que são infecciosos *in vivo* em chimpanzés, sistemas de replicon, pseudopartículas (engenharia retroviral de partículas funcionais do HCV contendo proteínas do envelope) que permitem o estudo da entrada viral em condições convenientemente reprodutíveis e mensuráveis, e, mais recentemente, sistemas completos de cultura de células (MORADPOUR e cols.,

2007). Os maiores avanços durante as pesquisas sobre o HCV estão resumidos e mostrados na linha do tempo (Figura 1.1).

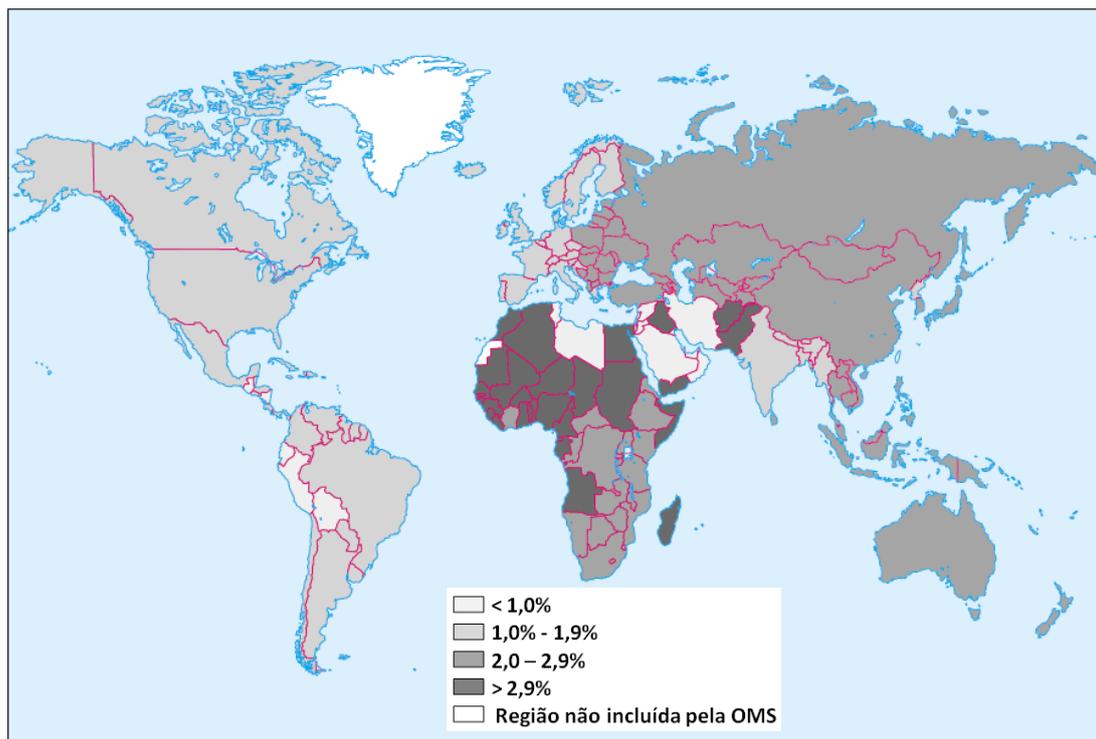


**Figura 1.1:** Evolução dos estudos sobre o HCV (Adaptado de MORADPOUR e cols., 2007).

### 1.1.1.2. Epidemiologia

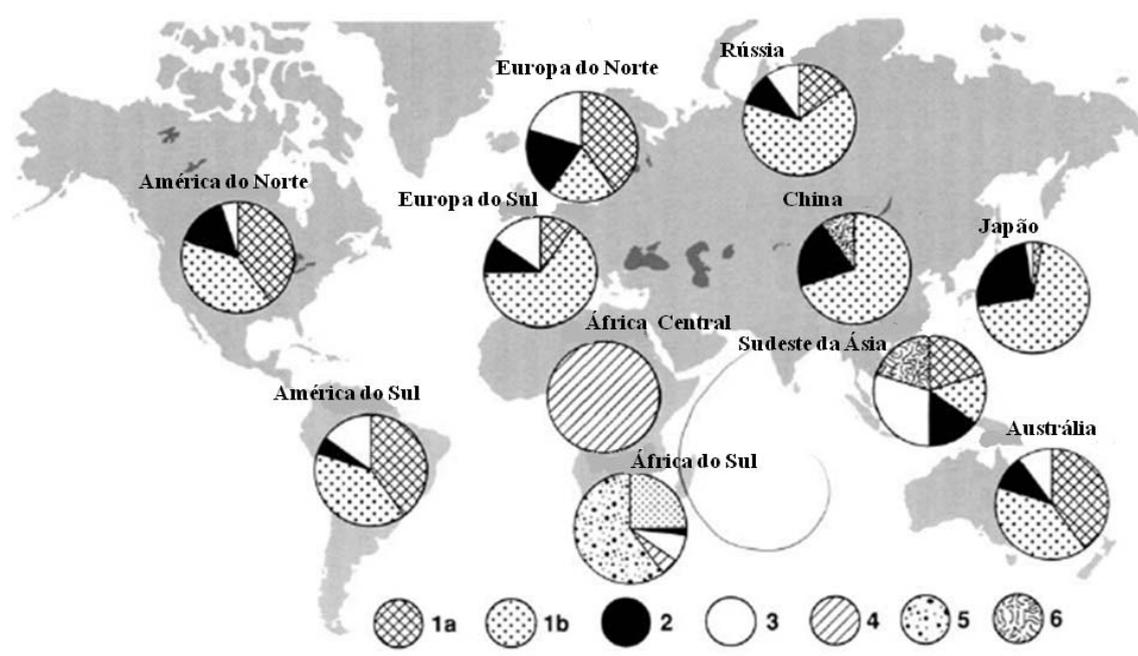
Desde sua descoberta em 1989, o Vírus da Hepatite C tem sido reconhecido como o maior causador de doença hepática crônica do mundo. A mais recente estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) da prevalência da infecção por HCV é de 3%, representando cerca de 170 milhões de pessoas (PERZ e cols., 2004). A maioria das descrições da epidemiologia global para HCV baseiam-se em estudos de soroprevalência de HCV. Estes estudos são tipicamente transversais e feitos em populações selecionadas, como, por exemplo, em doadores de sangue ou em pacientes com doença hepática crônica, os quais são pouco representativos da comunidade ou da região em que residem.

A OMS, em 2001, apresentou dados sobre a prevalência mundial da infecção pelo HCV, com base em estudos publicados e dados apresentados. Embora o HCV seja endêmico em todo o mundo, podemos notar um grande grau de variabilidade em sua distribuição geográfica (**Figura 1.2**). Os países com maiores taxas de prevalência reportadas são localizados na África e na Ásia; e áreas com menor prevalência incluem os países industrializados da América do Norte, Europa Ocidental e a Austrália. Nações populosas do mundo desenvolvido com taxas relativamente baixas de soroprevalência de HCV são a Alemanha (0,6%), Canadá (0,8%), França (1,1%) e Austrália (1,1%), enquanto que as taxas de soroprevalência são ligeiramente superiores nos E.U.A. (1,8%), Japão (1,5-2,3%) e Itália (2,2%) (SHEPARD e cols., 2005).



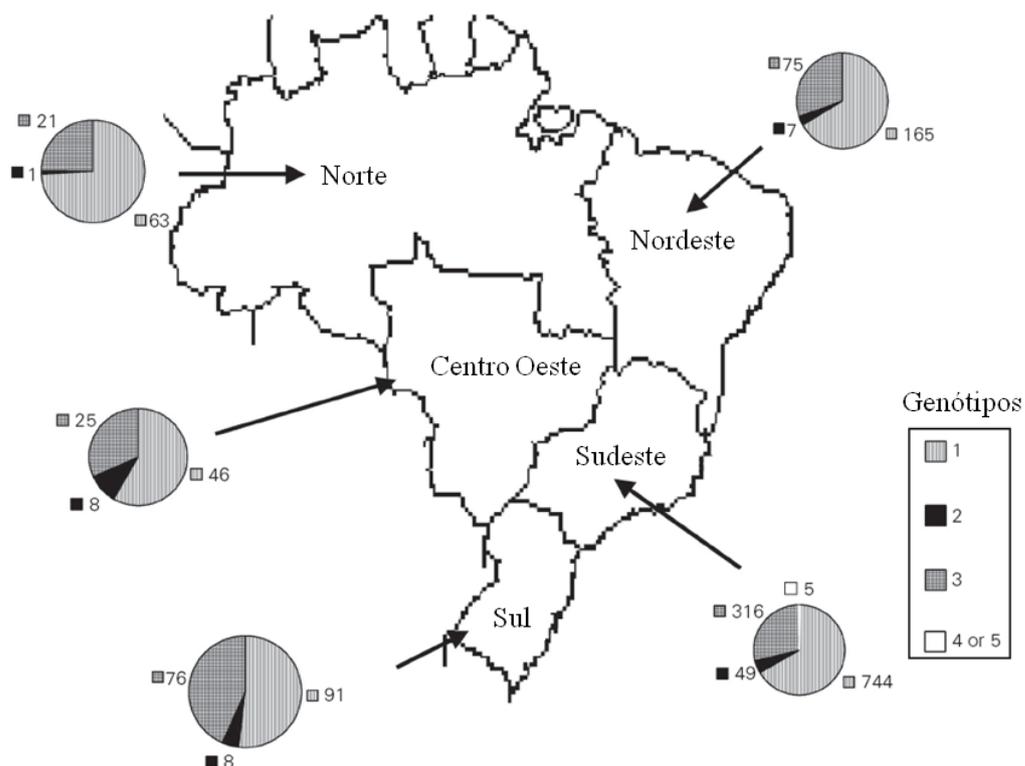
**Figura 1.2: Prevalência estimada da infecção pelo HCV por região.** Estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Extraído de PERZ e cols., 2004).

O HCV pode ser classificado em seis genótipos, assim como em numerosos subtipos (os quais são designados a, b, c, e assim por diante) (MORADPOUR e cols., 2007). O genótipo 1 compreende os subtipos 1a, que apresenta distribuição mundial, e 1b, que também apresenta distribuição mundial, mas é predominante na Europa e na América do Norte. Já o genótipo 2 é predominante em pessoas idosas das regiões do Mediterrâneo e da Ásia; o genótipo 3 é particularmente prevalente na Europa, estando associado ao uso de drogas injetáveis; o genótipo 4 é distribuído no Oriente Médio; o genótipo 5 é comum apenas na África do Sul; e o genótipo 6, no Sudoeste da Ásia (LINDENBACH e cols., 2007). A distribuição mundial dos genótipos do HCV pode ser visualizada na **Figura 1.3** (FORNS e BUKH, 1999).



**Figura 1.3 - Distribuição dos genótipos do HCV no Mundo** (Adaptada de FORNS e BUKH, 1999).

Os genótipos de maior frequência no Brasil são os genótipos 1 (64,9%) e 3 (30,2%), e apenas o genótipo 6 não foi detectado (CAMPIOTTO e cols., 2005). O estudo mais recente da distribuição dos genótipos no Brasil foi realizado por Campiotto e colaboradores (2005) e está representado na **Figura 1.4**.



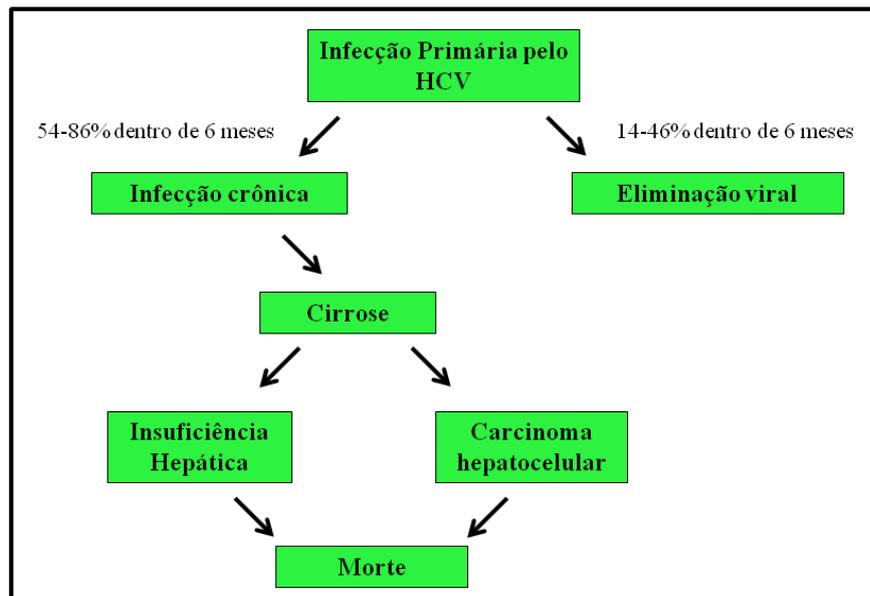
**Figura 1.4: Distribuição dos genótipos do HCV em diferentes regiões do Brasil.** O número absoluto de casos de cada genótipo encontrado em cada região está mostrado nos gráficos. A maior detecção dos genótipos neste estudo foi na Região Sudeste, mais especificamente no estado de São Paulo (Adaptado de CAMPIOTTO e cols., 2005).

### 1.1.1.3. Evolução da Hepatite C – um problema de saúde pública

A Hepatite C é causada pela infecção pelo Vírus da Hepatite C (HCV), que é um vírus de RNA de fita simples envelopado, pertencente ao gênero *Flavivírus* e da família *Flaviviridae* (BRADLEY, 1992), que causa doença hepática crônica, incluindo hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma (PENIN e cols., 2004).

A história natural precisa da Hepatite C é difícil de ser avaliada pela falta de dados prospectivos e dificuldade de definir a data da transmissão e associações com outros fatores que alteram o curso da doença, como co-infecções e uso de álcool.

A gravidade da contaminação por HCV reside no fato do paciente apresentar, na grande maioria das vezes, um quadro completamente assintomático, como uma doença silenciosa, o que dificulta o diagnóstico. Aproximadamente 15% das pessoas infectadas podem se curar naturalmente, como em qualquer outra infecção, mas o restante (~85%) evoluirá para uma forma crônica de hepatite, de maior ou menor gravidade. Dos que evoluem para a cronicidade, aproximadamente 20% atingirão, após 15 a 20 anos de infecção, formas mais graves de doença hepática, como a cirrose (**Figura 1.5**). Os que atingem o estágio de cirrose passam a ter problemas consequentes, como insuficiência hepática, hipertensão portal e risco aumentado de tumor maligno. Estes quadros mais graves levam à necessidade de transplante hepático e muitas vezes à morte, sendo, por isso, considerado um problema de saúde pública e um problema econômico mundial (TEIXEIRA e cols., 2004; LINDENBACH e cols., 2007). A presença de outros fatores, como sexo masculino, hemocromatose, consumo de álcool, co-infecções pelo HBV ou HIV, imunossupressão (após transplante) e, possivelmente, a esteatose hepática não alcoólica, acelera a progressão da doença.



**Figura 1.5: História natural da Hepatite C.** Seguindo a infecção primária, a maioria dos indivíduos desenvolve infecção crônica associada à neuroinflamação do fígado. A infecção crônica pelo HCV pode levar a fibrose progressiva e a cirrose, a qual pode resultar em insuficiência hepática, carcinoma hepatocelular e morte.

A doença hepática em estágio avançado, secundária à infecção crônica pelo vírus da Hepatite C, é a principal razão para transplante hepático do Brasil. O processo de erradicação viral é difícil, pois o vírus possui mecanismos de evasão à resposta imune do hospedeiro, além de sofrer mutações, o que facilita o desenvolvimento da forma crônica da doença (PURCELL, 1997; LARGE e cols., 1999).

Em decorrência da evolução da doença, a Hepatite C leva a aproximadamente 50.000 mortes por ano no mundo, e estima-se que, entre 2010 e 2020, ocorrerão cerca de 165.900 mortes relacionadas à Hepatite C crônica, sendo 27.200 por hepatocarcinoma celular. No Brasil, no período de 1996 a 2006, foram confirmados mais de 70 mil casos da doença, e o número de óbitos foi de aproximadamente 10 mil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

#### **1.1.1.4. Fisiopatologia**

Os hepatócitos são os principais alvos destes vírus, que chegam ao fígado através dos capilares sinusoidais, que são capazes de expressar tanto fatores não específicos de ligação como os três principais receptores celulares para o HCV (Reynolds e cols., 2008). Por conseguinte, o HCV leva a um processo inflamatório do fígado, caracterizando a Hepatite. O HCV também pode infectar células B, células dendríticas, macrófagos, dentre outras (MORADPOUR e cols., 2007).

Estudos têm mostrado que o HCV não é um vírus citopático, o que é evidenciado principalmente pela falta de correlação entre a quantidade viral e a gravidade da doença (CARVALHO e SOUZA, 2010). O dano celular na Hepatite C crônica é principalmente representado por infiltração linfóide portal, necrose e lesões lobulares degenerativas. Estas lesões são principalmente devidas à resposta imune local, a qual é amplificada pelo acúmulo de células T específicas, principalmente CD8<sup>+</sup>, que são recrutadas por moléculas de adesão e expressão de quimiocinas (PAWLOTSKY, 2004; CARVALHO e SOUZA, 2010).

Cerca de 20% dos pacientes diagnosticados com HCV desenvolvem cirrose, podendo desencadear o desenvolvimento de hepatocarcinoma celular (HCC) (GOLDBERG-BITTMAN e cols., 2009). A progressão para fibrose é resultado da ativação das células estreladas hepáticas, o que é desencadeada em resposta à inflamação e à injúria celular provocada por este vírus. O HCC é a terceira causa mais comum de morte associada ao câncer no mundo, sendo a Hepatite C um dos três maiores fatores de risco. Cerca de 2% dos pacientes diagnosticados com HCV apresentam a doença (BUT e cols., 2008). O desenvolvimento de hepatocarcinoma é favorecido por efeitos indiretos, como pelos ciclos de necrose do hepatócito e regeneração decorrente do processo inflamatório, pelo aumento de divisão celular, o que aumenta a taxa de mutações, assim como pelo

aumento do estresse oxidativo. Dentre outros fatores específicos, os efeitos diretos incluem a desestabilização genômica pela proteína não estrutural NS3, além da proteína capsídica funcionar como um regulador gênico, inibindo genes supressores de tumor como a p53 (MICHELSEN e cols., 2005; TANG e GRISÉ, 2009; CARVALHO e SOUZA, 2010).

A quantidade de HCV no sangue infectado é menor que a de HBV na Hepatite B. Também não se observa antígenos no sangue, ao contrário da Hepatite B. O principal mecanismo de destruição de células do fígado é desencadeado pelo sistema imunológico do próprio hospedeiro. Além das patologias citadas anteriormente, na biópsia hepática de portadores de Hepatite C, observa-se esteatose micro ou macrovesicular (50%), dano em ductos biliares (60%) e agregados ou folículos linfóides (60%).

#### **1.1.1.5. Sintomas**

Diferentemente das Hepatites A e B, a maioria das pessoas que adquirem a Hepatite C desenvolvem doença crônica e lenta, sendo que a maioria é assintomática ou apresenta sintomas muito inespecíficos, como letargia, dores musculares e articulares, cansaço, náuseas ou desconforto no hipocôndrio direito. Assim, o diagnóstico só costuma ser realizado através de exames para doação de sangue, exame de rotina ou quando sintomas de doença hepática surgem já na fase avançada de cirrose.

Outros sintomas podem surgir quando a infecção se associa com o sistema nervoso (fadiga, encefalomielite progressiva, neuropatia crônica, síndrome de Guillain-Barré, neuropatia periférica, entre outras). Além desses, há também casos de manifestação dermatológica (vasculite, urticária, entre outras) e de manifestações extra-hepáticas, como linfoma de células B, glomerulonefrite, artrite, mialgia, entre outras (SZABO e cols., 2003).

#### **1.1.1.6. Transmissão**

As principais vias de transmissão da doença, até a descoberta do vírus em 1989 (CHOO e cols., 1989), eram através de transfusões sanguíneas, uso compartilhado de seringas contaminadas, transplantes, contato sexual, hemodiálise, exposições percutâneas e contaminação da conjuntiva. Porém, após a descoberta do vírus e posterior execução de testes sorológicos (CARDOSO e cols., 1998; ROTH e cols., 1999), iniciados em 1992 para identificar os portadores, as principais formas de contágio passaram a ser por contato sexual (18%), compartilhamento de seringas infectadas (68%) e por acidentes entre os funcionários da saúde, havendo, portanto uma queda considerável no número de indivíduos infectados por transfusão sanguínea (McHUTCHISON, 2004).

A transmissão da Hepatite C ocorre após o contato com sangue contaminado, entretanto, o vírus da Hepatite C pode sobreviver de 16 horas a 4 dias em ambientes externos. Outros fatores de risco menor incluem o uso de cocaína intranasal, *piercing* e tatuagens. E apesar de relatos recentes mostrando a presença do vírus em outras secreções (leite, saliva, urina e esperma), a quantidade do vírus parece ser pequena demais para causar infecção e não há dados que sugiram transmissão por essas vias. De qualquer forma, mesmo excluídos todos os fatores de risco anteriores, a transmissão esporádica, ou sem modo conhecido, é responsável por pelo menos 12% dos casos. Os fatores de risco de transmissão estão citados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.1: Fatores de risco para o contágio da Hepatite C.**

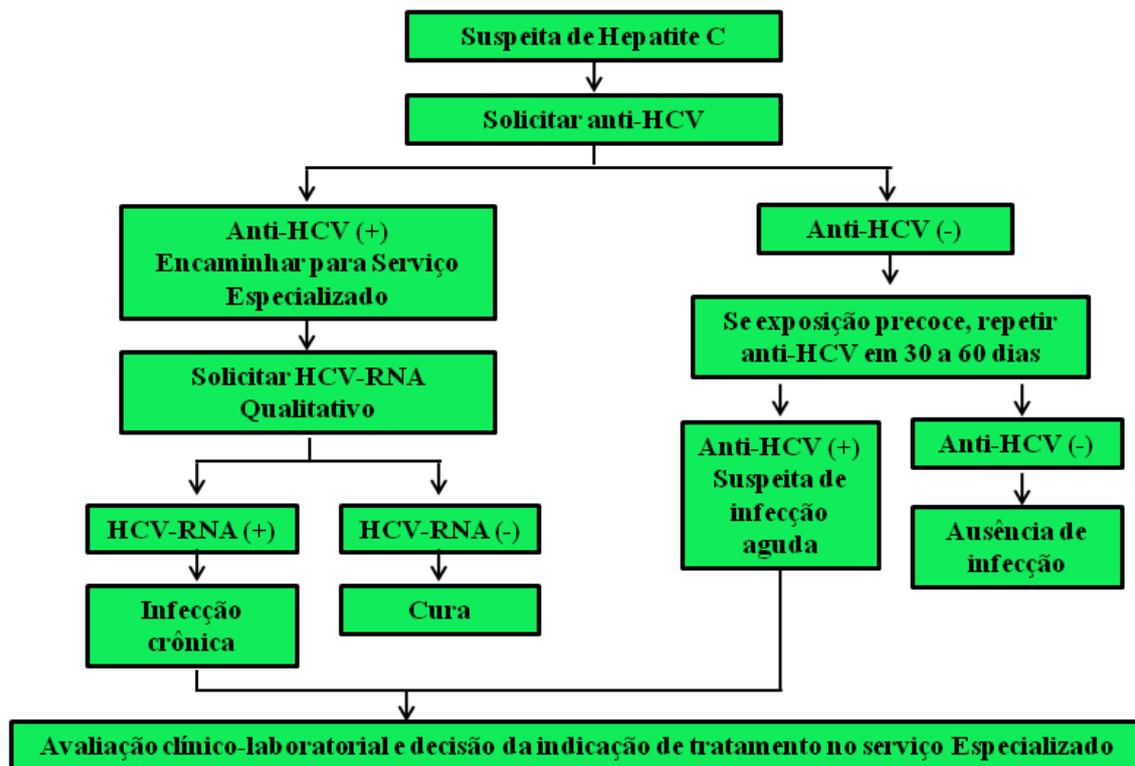
<b>Fatores de risco para o contágio da Hepatite C</b>
➤ Transfusão de sangue ou derivados
➤ Uso de drogas ilícitas
➤ Hemodiálise
➤ Exposição a sangue por profissionais da área de saúde
➤ Receptores de órgãos ou tecidos transplantados
➤ Recém-nascidos de mães portadoras
➤ Contatos sexuais promíscuos ou com parceiros sabidamente portadores
➤ Exposição a sangue por material cortante ou perfurante de uso coletivo sem esterilização adequada: procedimentos médico-odontológicos, tatuagem, acupuntura, manicure/pedicure, <i>piercing</i> , contato social ou familiar com material de uso pessoal (barbeadores, escovas dentais, etc), "medicina" folclórica (incluindo "cirurgias espirituais"), barbeiros e cabeleireiros

#### **1.1.1.7. Diagnóstico**

O tempo de incubação (entre o contato com o vírus até o desenvolvimento da hepatite aguda) é de 15 a 60 dias (média de 45 a 55 dias), mas a pessoa já pode transmitir a doença mesmo antes disso. Os sintomas mais comuns são icterícia, fadiga, febre, náusea, vômitos e desconforto no hipocôndrio direito, geralmente 2-12 semanas após a exposição. O diagnóstico da fase aguda requer a realização de PCR, uma vez que infecções agudas podem originar resultados falsos negativos.

O principal método para o diagnóstico da Hepatite C continua sendo a sorologia para avaliar a presença de anticorpo anti-HCV em soro pelo método ELISA, sendo que a terceira geração deste exame, o ELISA III, tem sensibilidade e especificidades superiores a 95% (com valor preditivo positivo superior a 95%). Sua presença não significa sempre que o vírus permanece no organismo, pois anticorpos anti-HCV podem apenas corresponder a uma hepatite antiga e curada. Após a infecção, o exame torna-se positivo entre 20 e 150

dias (média de 50 dias). Pela alta confiança do exame, o uso de sorologia por outro método (RIBA) só deve ser utilizado em suspeitas de ELISA falso positivo (pessoas sem nenhum fator de risco). O resultado falso positivo é mais comum em portadores de doenças autoimunes com autoanticorpos circulantes, além de indivíduos que tiveram Hepatite C aguda, que curaram espontaneamente, mas que mantêm a sorologia positiva por várias semanas. O teste de RIBA, apesar de menos sensível, é mais específico, pois detecta RNA por PCR em plasma, o que permite identificar a presença do HCV no sangue (tal fato só ocorre após o vírus ter se multiplicado nos hepatócitos). Outra análise importante a ser realizada é a genotipagem para determinar qual o genótipo está infectando o indivíduo. Todas essas análises são importantes para um diagnóstico correto. Contudo, para avaliar a gravidade da doença, a forma mais eficaz é a realização de uma biópsia, embora já estejam em utilização métodos não invasivos para fazer esta avaliação da gravidade da doença. (<http://www.fleury.com.br/Servicos/Pages/infectologia.aspx?gclid=CJSsxM2mzZgCFQO5Ggod5wXi0Q>, acessado em 08/02/2009). Por outro lado, o exame também pode ser falso negativo em pacientes com sistema imunológico comprometido. O fluxograma de investigação laboratorial do HCV preconizado pela OMS está mostrado na **Figura 1.6**.



**Figura 1.6: Fluxograma de investigação laboratorial da Hepatite C** (Adaptado de “Hepatites virais: o Brasil está atento”/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O segundo método de escolha é a detecção do RNA do vírus no sangue, que já é encontrado de 7 a 21 dias após a infecção. Há vários métodos, sendo que o PCR qualitativo é o mais sensível (detecta até quantidades mínimas como 50 cópias/mL) e o PCR quantitativo é menos sensível (apenas acima de 1.000 cópias/mL), mas informa uma estimativa da quantidade do vírus circulante. Pelas definições da Organização Mundial de Saúde, pessoas com mais de 800.000 UI/mL (cópias/mL) são consideradas como portadoras de título alto e, as com menos, portadores de título baixo.

O genótipo é desnecessário para o diagnóstico da infecção, mas é extremamente importante na tomada de decisões quanto ao tratamento. Para os genótipos 2 e 3, por exemplo, a dose da medicação e o tempo de tratamento são menores do que os recomendados para o genótipo 1. A incidência do genótipo 1 no Brasil é 70%, enquanto dos genótipos 2 e 3 é de 2,5% e 28%, respectivamente.

A análise dos níveis de transaminases não é necessária para o diagnóstico. Até 30% dos pacientes mantêm dosagem de ALT normal, mas mesmo assim 50% apresentam na biópsia hepática alterações significativas. Como a severidade da doença não pode ser determinada com precisão por métodos menos agressivos, a biópsia continua sendo necessária para confirmar o diagnóstico clínico, avaliar o grau de inflamação e fibrose (formação de cicatrizes) e avaliar a presença de outras doenças concomitantes. O consenso mundial é de que a biópsia é necessária em todos os pacientes antes do início do tratamento, pois ajuda a definir a melhor opção terapêutica.

#### **1.1.1.8. Tratamento**

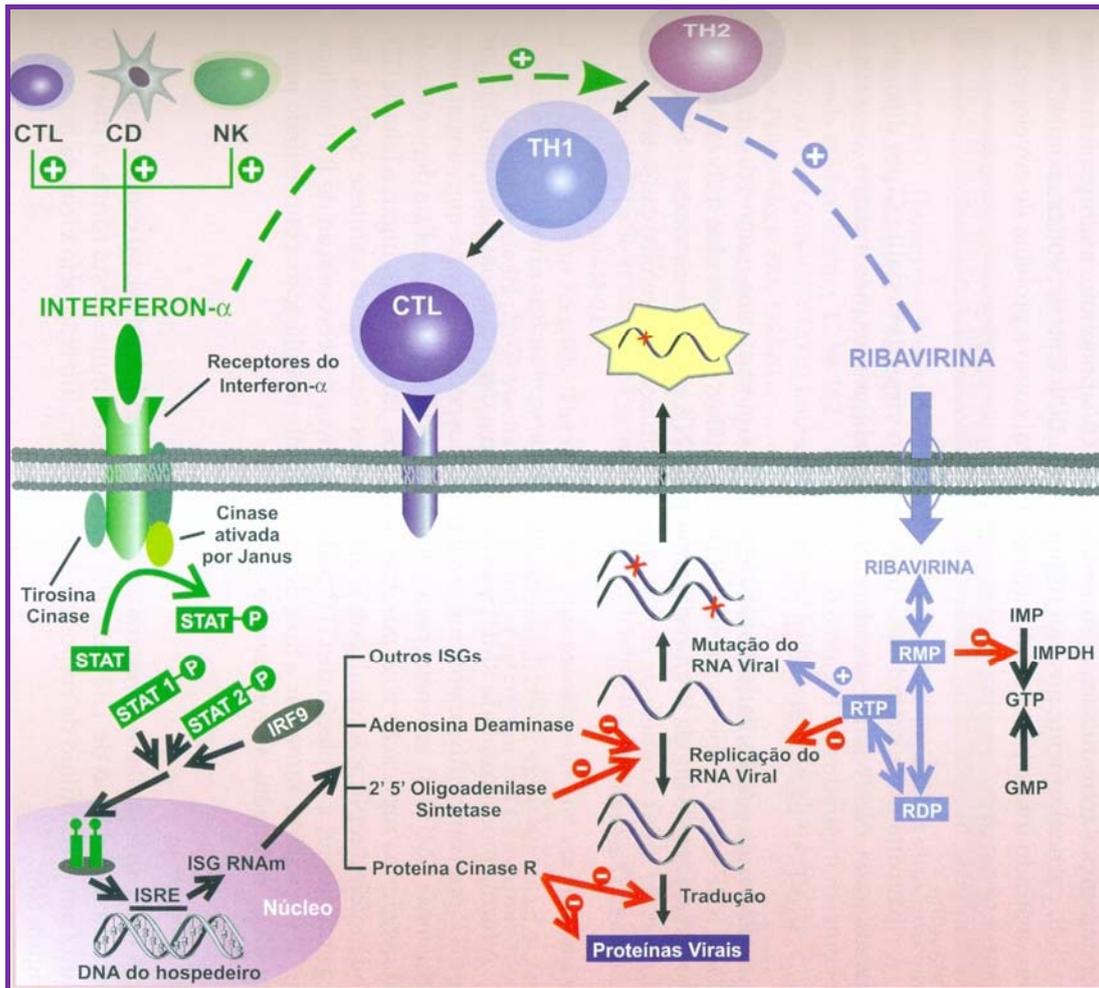
Até alguns anos atrás, o tratamento da Hepatite C era feito somente com Interferon alfa, mas o mesmo não possuía eficácia sobre a maioria dos pacientes, e os seus efeitos colaterais são graves, o que levou ao abandono do tratamento (PAWLOWSKA e cols., 2007). Após este quadro, passou-se a utilizar a Ribavirina, um nucleosídeo análogo da guanósina. A dose de Ribavirina utilizada e o tempo de tratamento variam de acordo com o genótipo, sendo maior para o genótipo 1. A Ribavirina possui elevado potencial terapêutico não só para o HCV, mas também para outros vírus de RNA e DNA, como: vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus Influenza, vírus Herpes Simples, entre outros. Porém, assim como o Interferon, a monoterapia com Ribavirina apresentou limitada eficácia antiviral. Atualmente, utiliza-se a combinação de Interferon peguilado e Ribavirina. Essa combinação melhorou bastante a eficácia no tratamento contra o vírus. Interferon peguilado possui meia-vida maior que o Interferon não peguilado, sendo por esse motivo administrado uma vez por semana. A Ribavirina é normalmente administrada duas vezes por dia.

### *Interferon alfa e Ribavirina*

Interferons (IFN) são glicoproteínas produzidas por células infectadas por vírus. Até agora foram identificados três tipos: o alfa, produzido por linfócitos B e monócitos, o beta, por fibroblastos, e o gama, por linfócitos T-helper e células *Natural Killer* (NK). Há dois tipos de IFN-alfa, o IFN-alfa-2a e IFN-alfa-2b, aparentemente com eficácias semelhantes.

A Ribavirina é um análogo sintético da guanosina que tem ação direta contra alguns vírus de RNA e DNA, pela inibição da DNA polimerase viral. A combinação do IFN-alfa com a Ribavirina melhora a resposta virológica sustentada para 38-43%, com correspondente melhora na análise histológica (biópsia) e, possivelmente, nas complicações a longo prazo da hepatite (mas para esse último faltam estudos prospectivos a longo prazo).

O mecanismo de ação do Interferon-alfa envolve a inibição da produção viral em hepatócitos infectados e por imunomodulação (**Figura 1.7**). O IFN-alfa ativa tirosinas cinases e tirosinas ativadas por janus, promovendo a fosforilação de STAT (*cytoplasmic signal transducers and activators of transcription proteins*). Após ativação, STAT1 e STAT2 se dimerizam e se ligam ao IRF9 (*interferon regulatory factor 9*), criando um complexo que se desloca para o núcleo e se liga aos ISREs (*interferon-stimulated response elements*) sobre o DNA. Assim, múltiplos RNAm saem do núcleo e codificam proteínas que alteram o metabolismo celular e que interferem na replicação viral, na síntese de proteínas e na montagem viral. IFN-alfa também promove a proliferação de linfócitos T de memória, a ativação de células NK, a maturação de células dendríticas e a inibição da apoptose em células T. Além disso, aumenta a resposta Th1 desencadeando a ativação de linfócitos T citotóxicos (FELD e HOOFNAGLE, 2005) (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7: Mecanismos de ação do IFN e da Ribavirina.** STAT: Proteína transdutora de sinal citoplasmático e ativadora de transcrição; IRF9: Fator regulatório de interferon 9; ISREs: Elementos responsivos estimulados por interferon; ISG: Gen estimulado por interferon; RMP, RDP e RTP: Ribavirina mono-, di- e trifosfato, respectivamente; IMPDH: Inosina-monofosfato desidrogenase; GTP: Guanosina trifosfato; IMP: Inosina monofosfato; CTL: Linfócito T citotóxico; CD: Células dendríticas; NK: Células *Natural Killers* (Extraído de CARVALHO e SOUZA, 2010).

A Ribavirina pode prejudicar a infecção pelo vírus da Hepatite C por inibição direta da replicação viral. Na sua forma trifosfatada (RTP), a ribavirina é incorporada dentro das fitas de RNA replicantes por RNA polimerases virais, resultando na terminação da cadeia (CARVALHO e SOUZA, 2010) (**Figura 1.7**). Já a forma monofosfatada pode causar uma depleção nos níveis intracelulares de GTP por inibir competitivamente a enzima hospedeira inosina-monofosfato desidrogenase (IMPDH), essencial para a síntese de GTP

(**Figura 1.7**). Assim, a depleção de GTP pode inibir a replicação viral por ser necessário para a síntese de RNA, e pode promover a incorporação de RTP no lugar de GTP, aumentando a taxa de erro durante a replicação, o que contribui para a atividade mutagênica da Ribavirina (DIXIT e PERELSON, 2006). Além destes mecanismos, a Ribavirina induz o desvio de Th2 para Th1 na resposta imune (**Figura 1.7**) (FELD e HOOFNAGLE, 2005).

Infelizmente, os melhores resultados do tratamento são naqueles pacientes com doença que naturalmente seria mais benigna: genótipo do vírus que não seja o 1, baixa viremia (quantidade de vírus no sangue) e ausência de fibrose ou cirrose ao início do tratamento. Assim, são considerados fatores de menor resposta ao tratamento: genótipo 1; alta viremia (> 800.000 UI/mL); fibrose avançada ou cirrose compensada (a descompensada contra-indica o tratamento); obesidade; raça negra; uso descontinuado ou redução na dose da medicação (sendo o primeiro pior que o segundo); idade avançada; consumo de bebida alcoólica, acúmulo de ferro no fígado.

Os efeitos colaterais do tratamento na Hepatite C são intensos, dos quais podem ser incluídos: leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, anemia hemolítica, fadiga, depressão e outros transtornos psiquiátricos, sintomas "gripais" (febre e dores musculares), sintomas gastrointestinais (náuseas e perda do apetite), sintomas respiratórios (tosse e falta de ar), dificuldade no controle de diabetes e disfunção na tireóide (hiper ou hipotireoidismo), sintomas dermatológicos (descamações (*rash*) e perda de cabelos).

São consideradas contraindicações ao tratamento com Interferon e Ribavirina: anemia, leucopenia, plaquetopenia hepáticas (transaminases normais; cirrose descompensada), cardiovascular (coronariopatia), endocrinológica (diabetes descompensado), doenças autoimunes, neuropsiquiátricas (vertigens; doença psiquiátrica severa), gestação ou incapacidade de anticoncepção.

Até o momento não existe uma vacina contra o HCV, cujo desenvolvimento tem sido dificultado por limitações nos estudos do vírus, já que modelos de cultura de células para uma eficiente propagação em laboratório foram estabelecidos recentemente, além do único modelo susceptível ao vírus ser o chimpanzé (*Pan troglodytes*) (PURCELL, 1997; MORADPOUR e cols., 2007).

Desta forma, o tratamento para a Hepatite C ainda não atingiu o ideal, ou seja, o uso de um medicamento que seja administrado com facilidade (via oral), por curto período, sem efeitos colaterais, plenamente eficazes e a baixo custo. A associação destas duas drogas, IFN + RBV, veio melhorar o resultado final do tratamento, porém a eficiência não chega a atingir 50% dos pacientes tratados, o que leva os pesquisadores de todo o mundo a um grande desafio, que é a produção de uma vacina anti-HCV ou de terapias alternativas.

As novas terapias anti-HCV propostas por laboratórios farmacêuticos têm sido direcionadas à inibição de proteínas específicas do vírus como a serino protease. Alguns candidatos a fármacos já estão na fase de testes clínicos e visam a aumentar a eficácia da terapia e a aumentar a aderência do tratamento ao buscar a administração oral (MELNIKOVA, 2008). Diversos inibidores específicos das proteínas não estruturais envolvidas na replicação viral estão em desenvolvimento (THOMPSON e McHUTCHISON, 2009). Além das proteínas virais, também são alvos das indústrias farmacêuticas, moduladores da resposta imune (MELNIKOVA, 2008), RNAs de interferência e inibidores da tradução, dentre outros.

### *Transplante Hepático*

O transplante de fígado é o tratamento de escolha para a Hepatite C aguda fulminante (embora rara), crônica em fase de cirrose avançada (com encefalopatia hepática, ascite refratária, hemorragia digestiva de difícil controle por varizes e/ou episódio

de peritonite bacteriana espontânea) ou na presença de hepatocarcinoma. Cerca de 50% dos transplantes realizados atualmente no ocidente são relacionados à infecção por HCV (McHUTCHISON, 2004). A Hepatite C é a maior causa de transplante de fígado no Brasil.

A principal preocupação no transplante hepático para o portador de Hepatite C é a recidiva da infecção no novo fígado. De fato, a recidiva ocorre em virtualmente todos os transplantados, geralmente em duas semanas após a cirurgia, com níveis rapidamente crescentes do vírus no sangue, até que em um ano estes níveis estão 10 a 20 vezes maiores do que antes do transplante. Do mesmo modo, a doença no fígado é mais rapidamente progressiva, com 30% dos transplantados desenvolvendo cirrose após 5 anos, com óbito ou necessidade de novo transplante em 10% das pessoas ao final dos 5 anos.

A estratégia de consenso para evitar essas complicações é o tratamento com Interferon peguilado associado à Ribavirina em todos os pacientes que desenvolvem atividade histológica da doença e fibrose significativa. Novas medicações em estudo, no entanto, com ação específica no vírus, poderão se mostrar mais eficazes na prevenção da recidiva, assim como já ocorre em relação à Hepatite B.

#### **1.1.1.9. Hepatite C e co-infecção com Hepatite B**

Como as vias de infecção por HCV e HBV são compartilhadas, a co-infecção HCV-HBV é comum, principalmente nas áreas endêmicas. A prevalência da co-infecção ainda não é conhecida devido à falta de estudos na população co-infectada. Indivíduos co-infectados com HCV-HBV tendem a desenvolver uma doença mais severa no fígado, com elevada probabilidade de cirrose e hepatocarcinoma.

Antes de escolher o tratamento a ser administrado nos indivíduos infectados, deve-se certificar a carga viral de cada vírus que está infectando o paciente. Logo, se há uma predominância do HCV, a melhor terapia será interferon peguilado e ribavirina. A doença

também pode ser tratada com interferon e Lamiduvina. A monoterapia com interferon não é recomendada no caso de hepatite fulminante, onde estes pacientes devem ser submetidos a transplantes (CHU e cols., 2008; CACCIOLA e cols., 1999).

Sempre se soube que alguns indivíduos, sem outros fatores de risco aparentes, como a co-infecção com vírus da Hepatite B ou HIV ou uso de álcool, estão mais predispostos a desenvolver cirrose do que outros, mesmo que o vírus seja da mesma genotipagem. Recentemente, foi descrito que um conjunto de 7 genes estaria associado a um risco maior de desenvolvimento de cirrose. A pesquisa destes 7 genes originou o desenvolvimento de um cálculo de um índice denominado "CRS" (*cirrhosis risk score*), que poderia prever que pacientes teriam maior risco de desenvolver cirrose e, portanto, teriam indicação de tratamento mais agressivo. No entanto, ainda faltam estudos para validar este método.

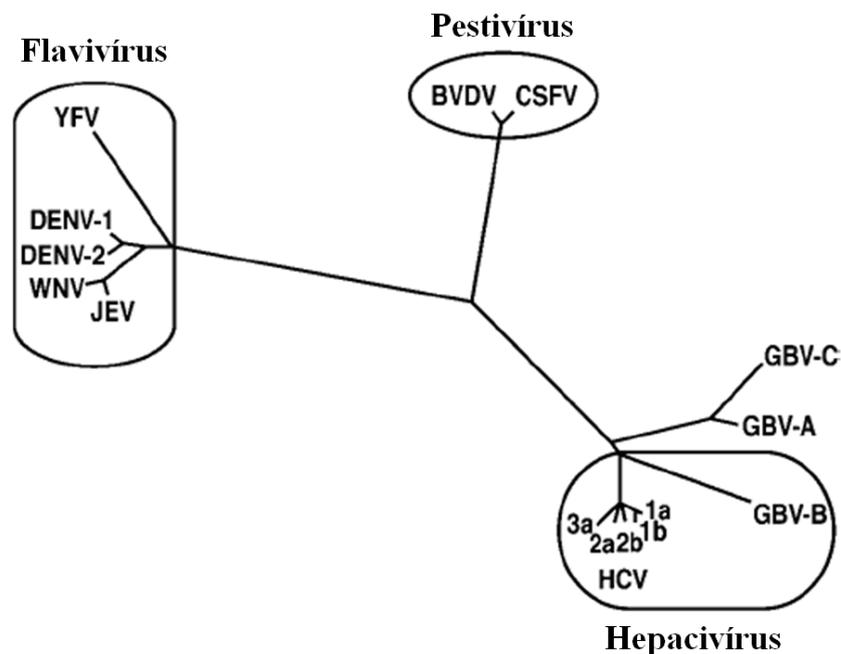
#### **1.1.1.10. Hepatite C e co-infecção com HIV**

Assim como a co-infecção HCV-HBV, a co-infecção HCV-HIV também é comum, já que ambas também compartilham as mesmas vias de transmissão. Os pacientes com co-infecção HCV-HIV possuem uma alta taxa de progressão da fibrose, resultando em cirrose, hepatocarcinoma e doença em estágio terminal do fígado.

O tratamento é semelhante ao da monoinfecção (interferon peguilado e ribavirina), porém a resposta ao tratamento é inferior no caso da co-infecção, uma vez que as drogas antirretrovirais podem comprometer a ação da ribavirina (SORIANO e cols., 2010; SIGNAL e cols., 2009).

### 1.1.2. A Família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae*, anteriormente classificada como *Togaviridae*, é composta por três gêneros, classificados com base nas relações evolucionárias de suas RNA polimerases dependentes de RNA: *Flavivirus* (vírus da Febre Amarela, Dengue, dentre outros), *Pestivirus* (vírus das encefalites bovinas, dentre outros) e *Hepacivirus* (vírus da Hepatite C e GBV-B). Também fazem parte desta família dois outros vírus que não pertencem a um gênero específico: o GBV-A e o GBV-C (Figura 1.8) (Lindenbach e cols., 2007).



**Figura 1.8:** Gêneros da família *Flaviviridae* (Adaptado de LINDENBACH e cols., 2007).

Os vírus desta família possuem muitas semelhanças em sua morfologia, organização do genoma e estratégias de replicação, porém possuem diferentes propriedades biológicas (LINDENBACH e cols., 2007). Os flavivírus são vírus envelopados compostos por uma bicamada lipídica com duas ou mais glicoproteínas de envelope rodeando o nucleocapsídeo viral, que consiste de uma fita simples de RNA

polaridade positiva complexada a múltiplas cópias da proteína capsídica (LINDENBACH e cols., 2007).

#### **1.1.2.1. O Gênero *Hepacivírus***

O gênero *Hepacivírus* é composto pelo vírus da Hepatite C e pelo GBV-B. Os *Hepacivírus* possuem muitas características em comum com os *Pestivírus*, incluindo a organização do genoma, o mecanismo do controle de tradução, dentre outras.

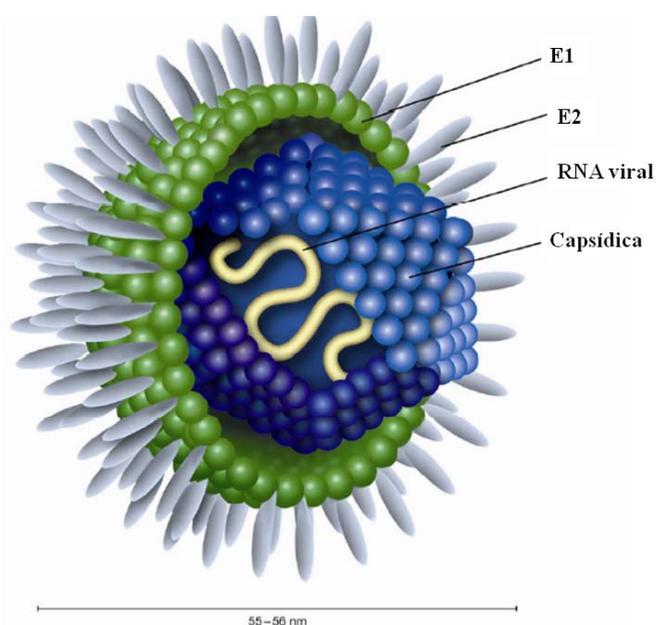
O GBV-B, apesar de possuir algumas semelhanças com o HCV, é geneticamente distinto e nunca foi detectado no soro de pacientes infectados por hepatite tipo C, embora alguns casos em humanos mostrassem reatividade ao vírus. O GBV-B foi inserido na família *Flaviviridae* por possuir a estrutura do seu genoma semelhante a dos demais vírus desta família. A distribuição na natureza do GBV-B é desconhecida, uma vez que a única fonte para este vírus foi a passagem realizada do soro contendo o vírus em micos. O GBV-B pode infectar e causar hepatite em macacos do Novo Mundo, como micos, saguis e macacos-coruja, porém não é capaz de infectar chimpanzés (LINDENBACH e cols., 2007). As características do outro vírus pertencente a este gênero, o HCV, serão abordadas posteriormente com mais detalhes.

##### **1.1.2.1.1. O Vírus da Hepatite C (HCV)**

O Vírus da Hepatite C (HCV) foi descoberto em 1989 através da expressão de um DNAc derivado de agente infeccioso de hepatites não-A e não-B (CHOO e cols., 1989), e pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivírus* (LINDENBACH e cols., 2007). O HCV ficou conhecido como a maior causa de hepatite adquirida através de transfusão. A identificação do HCV levou ao desenvolvimento de testes para diagnósticos do vírus, o que

diminuiu a incidência de hepatite por transfusão. O HCV causa uma infecção típica nos hepatócitos, mas sua replicação também ocorre em tecidos extra-hepáticos, como linfócitos periféricos do sangue, células do epitélio intestinal e células do sistema nervoso central.

O HCV é um vírus envelopado (KUNKEL e cols., 2001) com o genoma constituído por RNA fita simples, pela proteína capsídica, e pelas proteínas de envelope E1 e E2 (Figura 1.9).



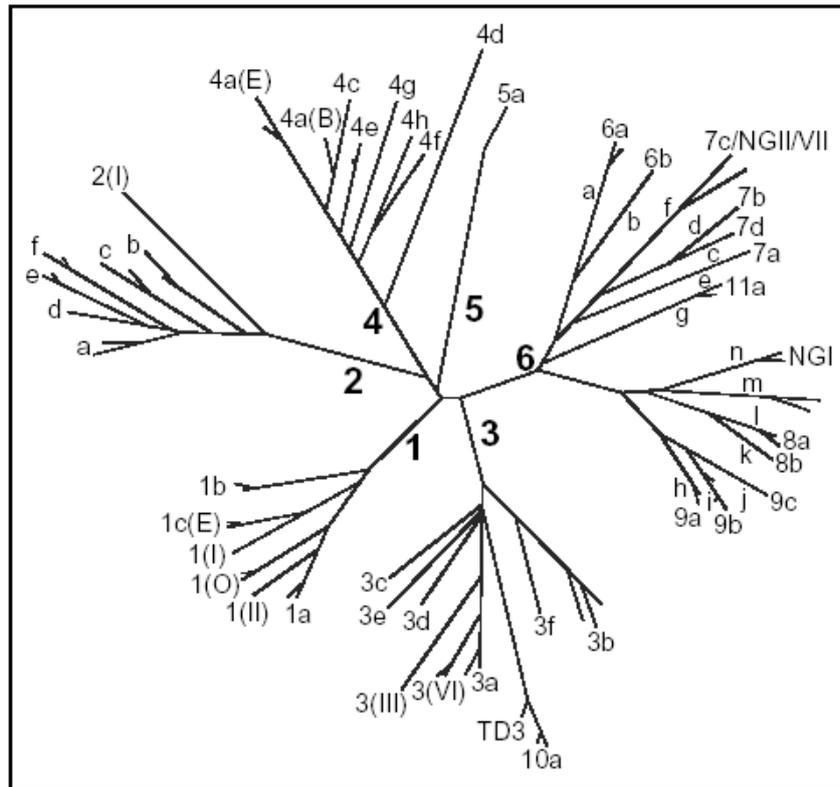
**Figura 1.9: Modelo da estrutura da partícula do HCV** (Adaptado de KREKULOVA e cols., 2006).

Como citado anteriormente, baseado em análises filogenéticas, o HCV pode ser classificado em seis genótipos, os quais diferem um do outro em mais de 30% em suas sequências de nucleotídeos, assim como em numerosos subtipos (que são designados a, b, c, e assim por diante) (MORADPOUR e cols., 2007). Os genótipos possuem diferenças em sua distribuição no mundo, transmissão e progressão da doença, sendo o genótipo 1 o mais comum e também o mais agressivo, e por isso, o mais difícil de tratar com as atuais

terapias. Além dos seis genótipos, tem-se descrito a recombinação intergenótipos e intersubtipos (LINDENBACH e cols., 2007).

A análise filogenética das sequências genômicas permitiu a caracterização de seis genótipos (1 a 6), que são subdivididos em grupos a, b, c etc. Dentro de um mesmo genótipo e subtipos ocorrem ainda variações do HCV, que são denominadas “quasiespécies” (**Figura 1.10**). Isto ocorre devido à replicação imperfeita do vírus, com o surgimento de pequenas e constantes mutações. Estudos experimentais demonstram que a diversidade das “quasiespécies” nas 16 primeiras semanas da infecção pelo HCV é capaz de prever sua evolução para resolução ou cronificação (FARCI e cols., 2000). Esta característica viral é um dos empecilhos para o desenvolvimento de uma vacina contra o HCV.

Atualmente são descritos seis principais genótipos (1a, 1b, 2a, 2b, 3a e 3b) do HCV, com uma distribuição universal e prevalências variáveis em todo o mundo (ZEIN, 2000).



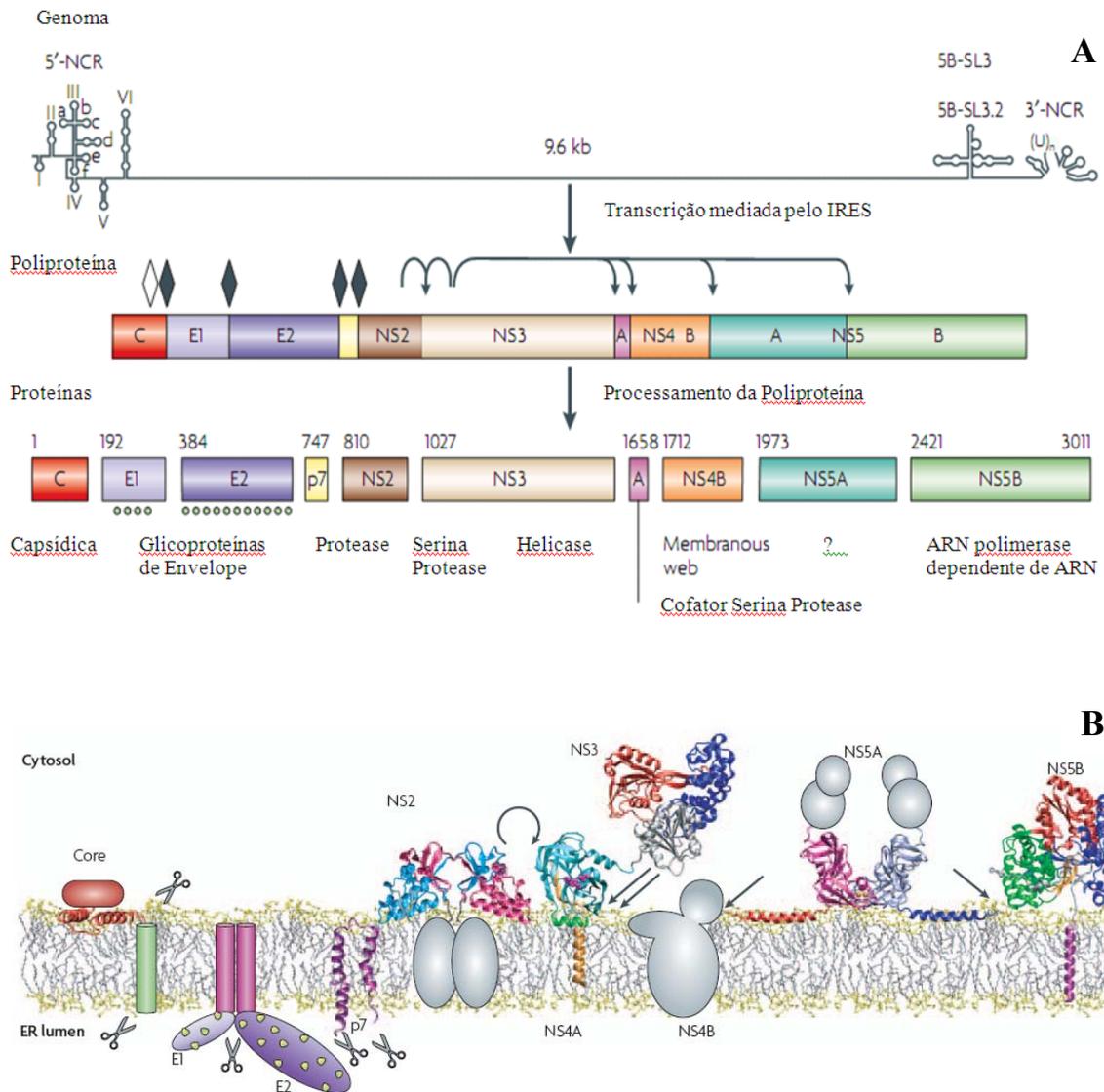
**Figura 1.10 – Árvore filogenética do vírus da Hepatite C (HCV).** O vírus HCV está dividido em 6 genótipos diferentes, numerados de 1 a 6, apresentando subtipos a, b e c e grupos 7, 8, 9, 11, classificados com genótipo 6a, e o grupo 10 com genótipo 3a (Extraído de FOCCACIA, 2003).

Por mais de 25 anos buscou-se um modelo de cultura de células que propagasse o vírus da Hepatite C, para tanto, utilizou-se linhagens de células B, células T, hepatócitos primários de humanos e de chimpanzés. Todos esses modelos foram capazes de sustentar a replicação do vírus após a infecção com amostras clínicas ou após o isolamento de células primárias de pacientes com infecção crônica, contudo, esses sistemas de cultura não propagaram com eficácia o HCV, mas permitiram sua classificação viral, bioquímica, e/ou genética do ciclo viral (LINDENBACH e cols., 2007).

O primeiro sistema de cultura de células eficiente para a replicação do RNA do HCV foi desenvolvido em 1999 por Lohmann e colaboradores (LOHMANN e cols., 1999). A replicação eficiente do RNA foi limitada às células Huh-7 (hepatocarcinoma humano),

mas posteriores replicons de subgenoma foram desenvolvidos para os genótipos 1a e 2a, tornando a replicação possível também em células HeLa, HepG2 e hepatoma de camundongos. Esses sistemas de replicação, conhecidos por HCVcc, são importantes, pois fornecem dados cruciais para entender o ciclo do HCV (LINDENBACH e cols., 2005; 2007).

O HCV apresenta um RNA fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 9,6 kb, e contém uma região de leitura aberta (ORF) flanqueada pelas regiões não traduzidas (UTRs) nas extremidades 5' e 3' (KUNKEL e cols., 2001). Esta ORF codifica uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos (KIM e cols., 2006) que, após a tradução, é clivada por proteases virais e do hospedeiro, originando as proteínas virais. A região amino-terminal codifica os componentes estruturais do vírus: a proteína capsídica (C) e as glicoproteínas de membrana E1 e E2. Seguindo esta região, está uma pequena proteína integral de membrana, a p7. O restante do genoma codifica as proteínas não estruturais (NS), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (**Figura 1.11**).



**Figura 1.11: A) Organização genética e processamento da poliproteína do vírus da Hepatite C (HCV).** Os losangos sólidos indicam os sítios de clivagem do precursor da poliproteína pela peptidase sinal do retículo endoplasmático (RE). Os diamantes abertos indicam o local de processamento da proteína capsídica em sua região C-terminal pela peptidase peptídeo sinal. As setas indicam os sítios de clivagem pelas proteases NS2-3 e NS3-4A. Os pontos em E1 e E2 indicam os sítios de glicosilação das proteínas de envelope. **B) Estrutura e associação de membrana das proteínas do HCV.** As tesouras indicam a clivagem pela peptidase sinal do retículo endoplasmático, exceto no lado citoplasmático, onde indica o processamento da proteína capsídica pela peptídeo-peptidase sinal. As setas indicam outros locais de processamento em proteínas não estruturais (Adaptado de MORADPOUR e cols., 2007).

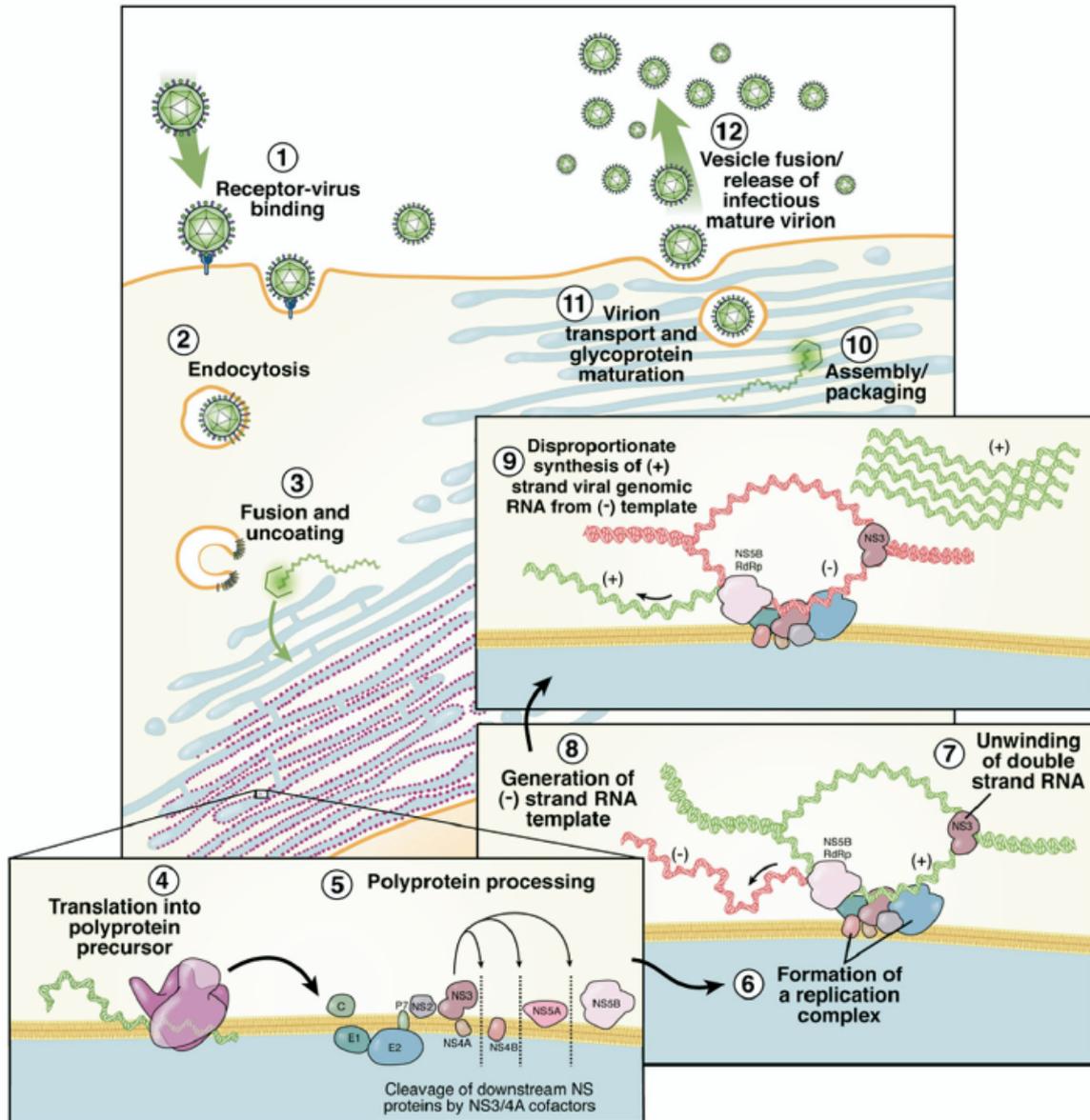
### *Ciclo replicativo do HCV*

Acredita-se que a entrada dos vírus na célula, por endocitose, ocorra graças a receptores na superfície do envelope viral e que o pH ácido do endossoma induz a exposição do peptídeo de fusão, promovendo a fusão do envelope do vírus com as membranas celulares. Essa fusão acontece graças ao peptídeo de fusão presente nessa família. Esse peptídeo já é bem descrito para os *Flavivírus*, no qual a proteína E apresenta-se como um dímero e, com a acidificação do pH, ocorre sua trimerização devido ao rearranjo rotacional que sofre, resultando na fusão com a célula hospedeira. Posteriormente, ocorre o desnudamento do nucleocapsídeo e, então, o RNA é liberado para o citoplasma, iniciando-se o processo replicativo (LINDENBACH e cols., 2007).

A entrada do vírus na célula ocorre através de um complexo de receptores ou de diversos co-receptores que incluem uma ou mais moléculas específicas do fígado, ainda não identificados. Um importante componente do receptor é um membro da família da Tetraspanina, o CD81, o qual se liga fortemente à glicoproteína E2 através de resíduos no *loop* extracelular do CD81 (KUO e cols., 2000;) e é também essencial para a infecção celular com HCVpp (CORMIER e cols., 2004; ZHANG e cols., 2004) e HCVcc (CAI e cols., 2005; LINDENBACH e cols., 2005; WAKITA e cols., 2005). Existem evidências de que o receptor *Scavenger* classe B tipo I (SR-BI), o qual é altamente expresso nos hepatócitos, também está envolvido na entrada do vírus (SCARSELLI e cols., 2002). Outras moléculas de superfície celular envolvidas na ligação do HCV à célula são: lectinas do tipo C, glicosaminoglicanos e receptor de LDL (COCQUEREL e cols., 2006).

A replicação dos vírus ocorre através de um complexo de replicação citoplasmático, formado pelas proteínas NS, que se encontra associado com membranas perinucleares e também através de uma fita de RNA intermediária de polaridade negativa, a qual originará uma fita de RNA fita simples polaridade positiva. As partículas virais são montadas ao

redor dessa nova fita em um compartimento de membrana intracelular, mais frequentemente no retículo endoplasmático, passam pela via secretora do hospedeiro e são liberadas para a superfície da célula (LINDENBACH e cols., 2007) (**Figura 1.12**).



**Figura 1.12 – Ciclo replicativo do vírus da Hepatite C** (Extraído de PAWLITSKY e cols., 2007).

O genoma viral possui três papéis distintos no ciclo viral: como RNA mensageiro para a tradução de todas as proteínas virais, como um molde para replicação do RNA e como material genético para ser empacotado e formar novas partículas virais. A

organização do genoma é semelhante para todos os gêneros: as proteínas são produzidas a partir de uma poliproteína única e longa de 3000 ou mais aminoácidos, que é clivada por um conjunto de proteases virais e do hospedeiro. As proteínas estruturais são codificadas na porção N-terminal da poliproteína e as não estruturais (NS) na porção C-terminal (LINDENBACH e cols., 2007).

Dentre as proteínas estruturais, estão as glicoproteínas de envelope E1 e E2. E1 (30 kDa) e E2 (70 kDa) são as glicoproteínas do HCV importantes para a entrada do vírus, pois são responsáveis por mediar a ligação do HCV, a fusão das membranas e a montagem de partículas infecciosas (GOFFARD e cols., 2003; MORADPOUR e cols., 2007). Elas são produzidas pela poliproteína através da clivagem pela peptidase sinal do hospedeiro. São proteínas transmembrana tipo-1 com um grande ectodomínio N-terminal e um domínio C-terminal transmembrana. Os ectodomínios de E1 e E2 são altamente glicosilados, sendo a glicosilação de E1 dependente da co-expressão de E2, formando um complexo E1-E2 (heterodímeros não covalentes), que é importante para a montagem e liberação do HCVpp. E1 e E2 possuem seis e onze sítios de glicosilação, respectivamente, e muitos deles são bem conservados. Os heterodímeros ficam retidos na membrana do retículo endoplasmático, provavelmente devido aos domínios transmembrana, que também são essenciais para a formação do heterodímero (DUBUISSON, 2007).

A proteína p7 é uma pequena proteína hidrofóbica de aproximadamente 7 kDa, que atravessa a membrana duas vezes com o N-terminal e o C-terminal direcionados para o lúmen e um pequeno *loop* citoplasmático carregado positivamente. Esta proteína é essencial para a infecciosidade *in vivo* e *in vitro*. A p7 pode formar oligômeros e originar canais na membrana, sendo, por isso, considerada uma viroporina, condutor de cátions que são inibidos por algumas drogas, como a amantadina (LINDENBACH e cols., 2007; MORADPOUR e cols., 2007).

A proteína NS2 possui 23 kDa, é uma proteína que atravessa a membrana e em seu C-terminal possui um domínio cisteína protease, cuja função é clivar a junção NS2/3. Estudos de metagêneses têm descrito que esta clivagem é necessária para replicação do HCV em cultura de células e para a infecciosidade *in vivo*. NS2 possui um papel importante na produção de partículas infecciosas: quimeras de genoma de HCVcc foram encontradas produzindo altos níveis de infecciosidade quando fragmentos de genoma foram fusionados entre o primeiro e segundo domínio transmembrana da NS2 (LINDENBACH e cols., 2007).

A NS3 possui 70 kDa e é uma proteína com múltiplas funções, contendo um domínio serina protease em seu N-terminal e um domínio RNA helicase/NTPase em seu C-terminal. Sua atividade helicase tem sido mostrada como essencial para a replicação do RNA e infecciosidade viral (LINDENBACH e cols., 2007).

NS4A é a menor proteína não estrutural, com 8 kDa, porém possui múltiplas funções no ciclo viral, como facilitar o reconhecimento de substratos do RNA pela protease/helicase NS3 (LINDENBACH e cols., 2007). NS4B (27 kDa) é uma proteína integral de membrana contendo quatro domínios centrais transmembrana, que separam as regiões N-terminal e C-terminal. Ela parece ter um papel importante na organização do complexo que se liga à membrana durante a replicação viral (LINDENBACH e cols., 2007; MORADPOUR e cols., 2007).

A proteína NS5A é uma fosfoproteína de 58 kDa, e, quando hiperfosforilada, fica ancorada à membrana através de sua região N-terminal. Assim como a proteína capsídica, NS5A também interage com o RNA viral e acredita-se que seu estado fosforilado seja importante para a replicação do mesmo (LINDENBACH e cols., 2007; MORADPOUR e cols., 2007). A proteína NS5B com 68 kDa é a RNA polimerase do vírus: a maior enzima da replicação do RNA do HCV, denominada NS5B RdRp (*RNA-dependent RNA*

*polimerase*). Ela é responsável por sintetizar uma fita de RNA complementar negativa utilizando o genoma viral como molde e, a partir desta fita negativa, sintetizar a fita de RNA positiva (MORADPOUR e cols., 2007). Ela possui uma cauda que se insere no RE e qualquer mutação que interfira nessa associação com a membrana ocasiona um dano na replicação do RNA (LINDENBACH e cols., 2007).

#### **1.1..2.1.1.1. A Proteína Capsídica do HCV**

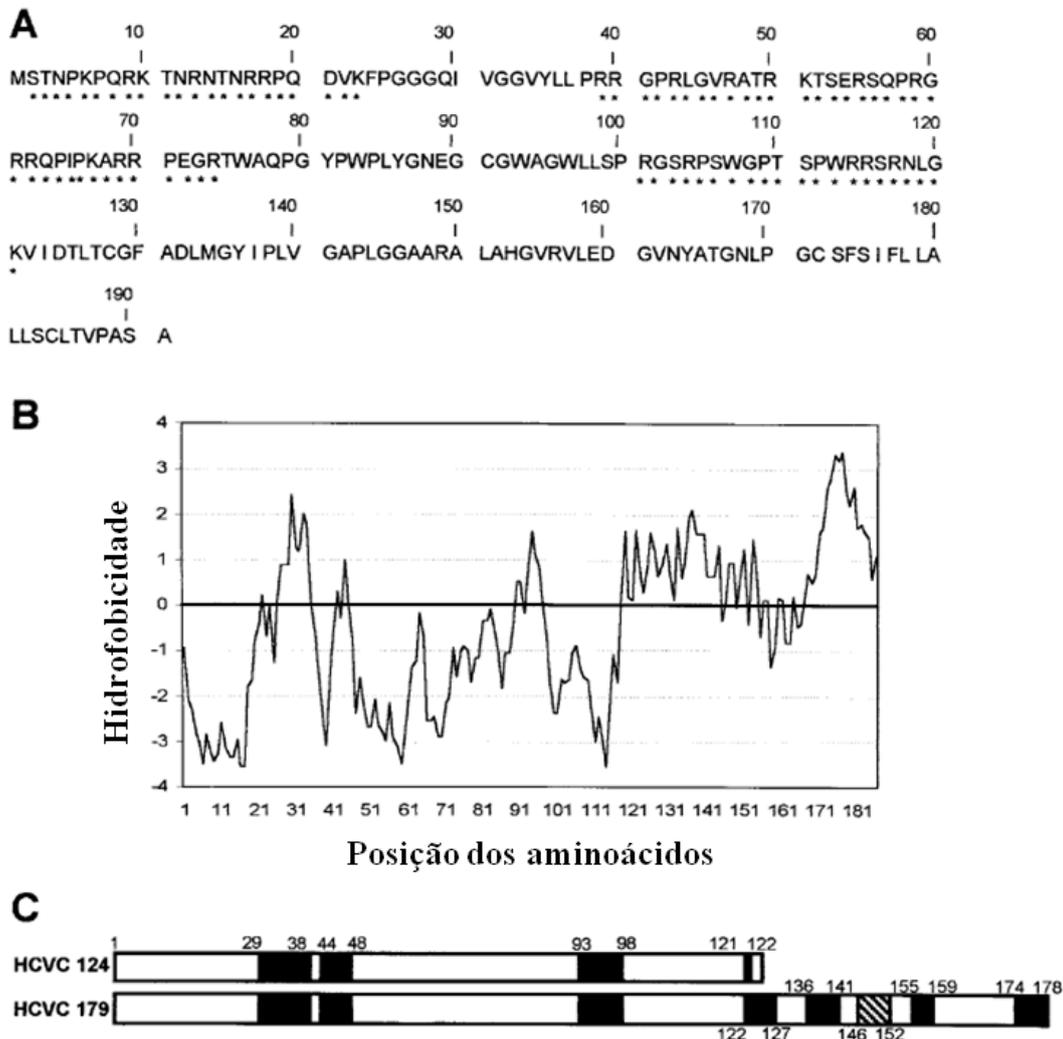
A proteína capsídica do HCV, a qual é o objeto de nosso estudo, tem sido relacionada a diversas funções. A sua principal função é formar o capsídeo e proteger o RNA genômico viral, enquanto o vírus passa de uma célula para outra, ou de uma pessoa para outra. Contudo, a proteína capsídica do HCV apresenta efeitos pleiotrópicos sobre as funções celulares, desde a modulação da transcrição de genes e apoptose, até a transformação celular, metabolismo lipídico e supressão imune (YANG e cols., 2002; MOORMAN e cols., 2003; KOIKE, 2005). A modulação destas funções celulares pela proteína capsídica usualmente prossegue pela sua ligação a componentes celulares específicos e provavelmente resulta na patogênese do HCV.

A proteína capsídica é o primeiro domínio expresso durante a síntese da poliproteína do HCV na membrana do retículo endoplasmático. Esta proteína não é glicosilada e representa o domínio mais conservado de toda a poliproteína. Entre os resíduos 191 e 192, ocorre uma clivagem por uma sinalase luminal do RE, formando uma espécie imatura da proteína capsídica de 23 kDa, que se apresenta ancorada na membrana (SANTOLINI e cols., 1994; YASUI e cols., 1998).

O processo de maturação da proteína capsídica ainda não foi completamente elucidado. Acredita-se que ocorra uma reação de clivagem ao redor do resíduo 179 (**Figura 1.13**), formando uma proteína madura (proteína capsídica íntegra), porém menor,

de 21 kDa. A enzima provavelmente envolvida é a mesma sinalase do RE ou uma peptidase independente de sinal peptídico do RE (HUSSY e cols., 1996). A proteína capsídica íntegra consiste de um domínio hidrofílico maior na porção N-terminal, com muitos resíduos básicos, e um domínio hidrofóbico menor na porção C-terminal. O domínio hidrofóbico tende a se associar com lipídios na membrana e é necessário para a estabilidade da proteína. Um estudo demonstrou que, na ausência deste domínio hidrofóbico, pelo truncamento da molécula no resíduo 152, a proteína capsídica é direcionada ao núcleo (SUZUKI e cols., 1995).

Outra proteína de 16 kDa (proteína capsídica truncada), com 124 resíduos do N-terminal (**Figura 1.13**), também tem sido observada (LO e cols., 1994). A produção dessa espécie de proteína capsídica é intensificada pela presença de um resíduo de Lisina no códon 9 que está presente somente na cepa HCV-1. A proteína capsídica truncada localiza-se predominantemente no núcleo (LO e cols., 1995). Trabalhos têm mostrado que a proteína capsídica truncada apresenta estrutura randômica, enquanto que a proteína capsídica inteira é composta basicamente por  $\alpha$ -hélices e é um oligômero (KUNKEL e WATOWICH, 2004; BOULANT e cols., 2005). A proteína capsídica truncada (HCV124) apresenta regiões altamente hidrofílicas, ricas em Argininas e Lisinas, e outras altamente hidrofóbicas, como mostradas na **Figura 1.13**. O papel biológico da forma truncada ainda não está bem caracterizado.



**Figura 1.13 - Análises da sequência primária da Proteína Capsídica do Vírus da Hepatite C. (A)** Sequência de aminoácidos da proteína, mostrando aminoácidos básicos altamente conservados, formando um “cluster” carregado positivamente (\*) entre os resíduos 2 ao 23, 39 ao 74 e 101 ao 121. **(B)** Gráfico de hidrofobicidade da proteína capsídica para os resíduos 1 ao 191, usando ProScale. **(C)** Esquema da proteína capsídica do HCV com 179 e 124 aminoácidos: HCV 179 e HCV 124, respectivamente (Adaptado de KUNKEL e cols., 2001).

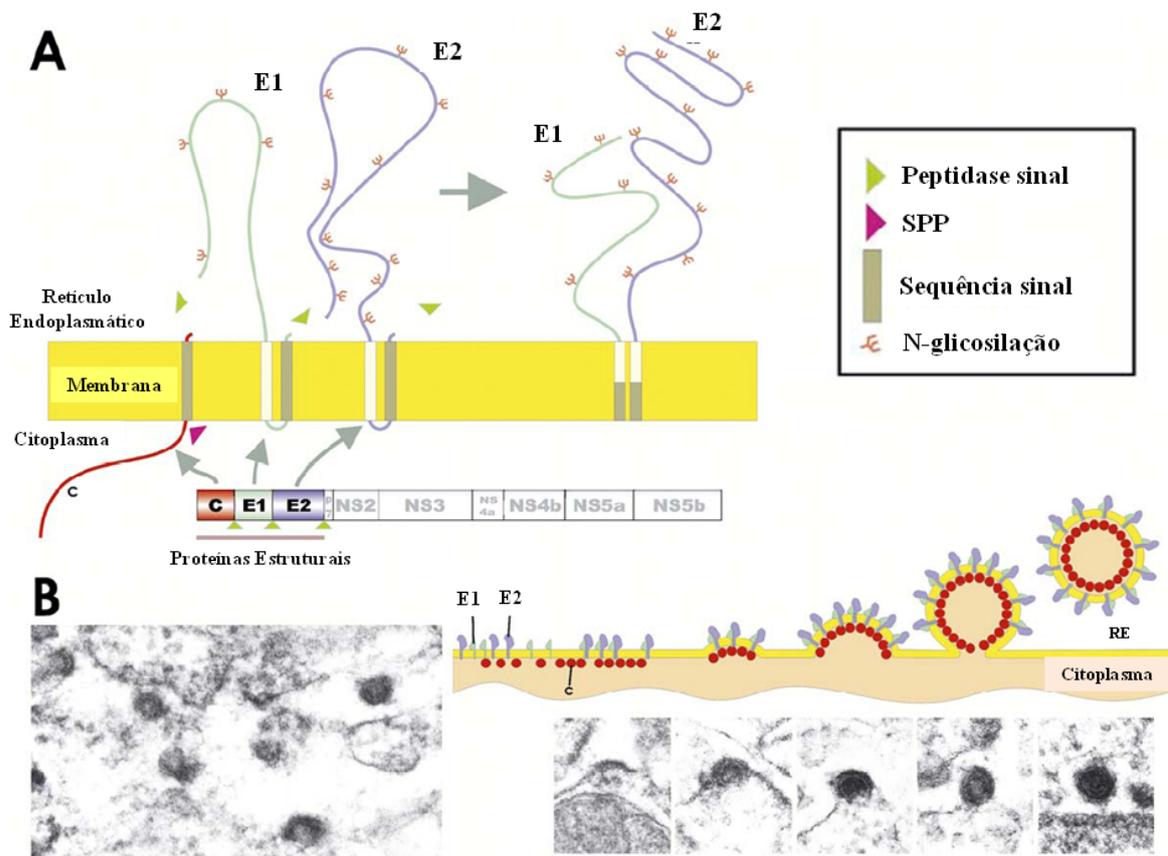
A proteína capsídica é um componente estrutural do vírion HCV, capaz de se autoassociar para encapsidar o RNA viral e interagir com as glicoproteínas do envelope, E1 e E2. Estudos têm demonstrado que a região N-terminal da proteína capsídica é a responsável pela ligação com RNA (HUSSY e cols., 1996) e que esta ligação é inespecífica, uma vez que outros tipos de ácidos nucleicos poderiam se ligar a este domínio. Além disso, a forma truncada da proteína capsídica já é capaz de formar o

capsídeo na presença de ácidos nucleicos (RNA ou DNA) inespecíficos (MAJEAU e cols., 2004; FROMENTIN e cols., 2007).

#### **1.1.2.1.1.2. Montagem do nucleocapsídeo viral**

##### *Estrutura do capsídeo do Vírus da Hepatite C*

A principal função da proteína capsídica do HCV no ciclo viral é formar o nucleocapsídeo e proteger o genoma viral. Após a clivagem da poliproteína, a proteína capsídica madura monta capsídeos do vírus da Hepatite C, mais provavelmente na face citoplasmática do retículo endoplasmático (BLANCHARD, 2002; 2003). Infelizmente, ainda não existem estudos que acompanhem os eventos de montagem do capsídeo viral. O que se conhece sobre a estrutura do capsídeo viral *in vivo* tem sido demonstrado a partir de partículas virais extraídas do soro de pessoas infectadas ou de biópsias de fígado infectado. Capsídeos não envelopados têm sido observados, por microscopia eletrônica de transmissão, no citoplasma de hepatócitos, enquanto partículas envelopadas têm sido observadas no retículo endoplasmático (SHIMIZU e cols., 1996; BOSMAM e cols., 1998). A presença de capsídeos na membrana ou dentro do retículo por microscopia eletrônica de transmissão sugere que o RE seja o local de montagem do capsídeo viral (SHIMIZU, 1996; MAILLARD, 2001; BLANCHARD, 2002). Além disso, o modelo de partículas semelhantes ao vírus (VLPs, do inglês “*Virus-Like Particles*”), obtidas por expressão das proteínas estruturais em células de mamíferos, demonstrou que o brotamento do HCV ocorre na membrana do RE (**Figura 1.14**) e que a proteína capsídica dirige este processo (ROINGEARD e cols., 2004).



**Figura 1.14: Associação das proteínas estruturais do HCV na membrana e o modelo para a morfogênese do HCV.** O modelo é baseado no brotamento de HCV-LP observado por microscopia eletrônica em células de mamíferos expressando a sequência referente à capsídica-E1-E2. **A)** Após a clivagem por peptidases sinal de células hospedeiras, E1 e E2 são extensivamente glicosiladas e formam um complexo heterodimérico que está retido no compartimento do RE. A proteína capsídica é processada por outras enzimas do hospedeiro (peptidase peptídeo sinal ou SPP). **B)** Formação de partículas do vírus no lúmen do RE por invaginação da membrana contendo proteínas de envelope do HCV e a interação desta membrana com a proteína capsídica (Adaptado de ROINGEARD e cols., 2004).

Análises do soro de pacientes infectados pelo HCV revelam que nucleocapsídeos não envelopados podem ser encontrados em grandes quantidades. Baseado em análises de ensaios cromatográficos e de microscopia eletrônica foi verificado que as partículas do vírus da Hepatite C possuem entre 30 e 80 nm, sendo de 30-40 nm *in vivo* e em torno de 60 nm *in vitro* (YUASA e cols., 1991; KUNKEL e cols., 2001). Entretanto, ainda não está claro o que governa o tamanho do capsídeo e se as diferenças de tamanho são biologicamente significantes.

O HCV exibe uma densidade baixa para um pequeno e envelopado vírus de RNA. Medidas em gradiente de sacarose indicam que a densidade de partículas infecciosas do HCV é de 1,10 g/mL (BRADLEY e cols., 1992). Essa baixa densidade pode estar relacionada com a capacidade do vírus de interagir com lipoproteínas do soro e tal fato parece ser importante para neutralização e entrada do vírus na célula. A densidade do replicon HCVcc RNA é similar a dos encontrados em isolados clínicos, com valor aproximado de 1,15 g/mL (WAKITA e cols., 2005; YI e cols., 2006), enquanto a densidade das partículas infecciosas é próxima de 1,10 g/mL (CAI e cols., 2005; LINDENBACH e cols., 2005; ZHONG e cols., 2005).

#### *Alguns sistemas modelos para estudar a montagem do capsídeo viral*

Enquanto micrografias eletrônicas de hepatócitos ou do soro de pessoas infectadas dão uma idéia do que ocorre *in vivo*, outros sistemas têm sido utilizados para auxiliar no entendimento do processo de montagem do capsídeo viral. Nestes sistemas simplificados, proteínas capsídicas recombinantes são incubadas com RNA ou DNA na ausência de outros fatores celulares. Em 2001, Kunkel e colaboradores mostraram que o N-terminal da proteína capsídica do HCV era suficiente para a montagem do capsídeo viral, visto que sua incubação com RNA estruturados (RNAt) gerava capsídeos de forma regular, semelhantes aos encontrados em indivíduos infectados. Ao contrário, a proteína inteira recombinante foi capaz de montar partículas, porém irregulares, indicando a necessidade de fatores celulares para coordenar a montagem viral *in vivo* de maneira correta (KUNKEL e cols., 2001). Apesar da irregularidade dos capsídeos formados a partir da forma inteira da proteína, foi mostrado que a proteína capsídica, assim como somente sua parte N-terminal, tem toda a informação necessária para a montagem de partículas semelhantes ao capsídeo viral na presença de RNA.

Um sistema livre de células, representado por um sistema híbrido entre um sistema *in vitro* e sistemas celulares, tem recentemente sido desenvolvido para estudar a montagem do HCV. Nestes sistemas, extratos celulares são usados para reconstituir e ligar a tradução de proteínas a eventos pós-traducionais, tal como a montagem do capsídeo viral. Análises de microscopia eletrônica de transmissão revelam que capsídeos formados a partir da proteína capsídica do HCV inteira neste sistema, são morfológicamente semelhantes aos capsídeos observados no soro de indivíduos infectados, tanto em tamanho como em estrutura (KLEIN e cols., 2004), validando o sistema livre de células para estudos. Além disso, posteriormente foram identificados resíduos que são críticos para o processo de montagem do capsídeo viral (KLEIN e cols., 2005).

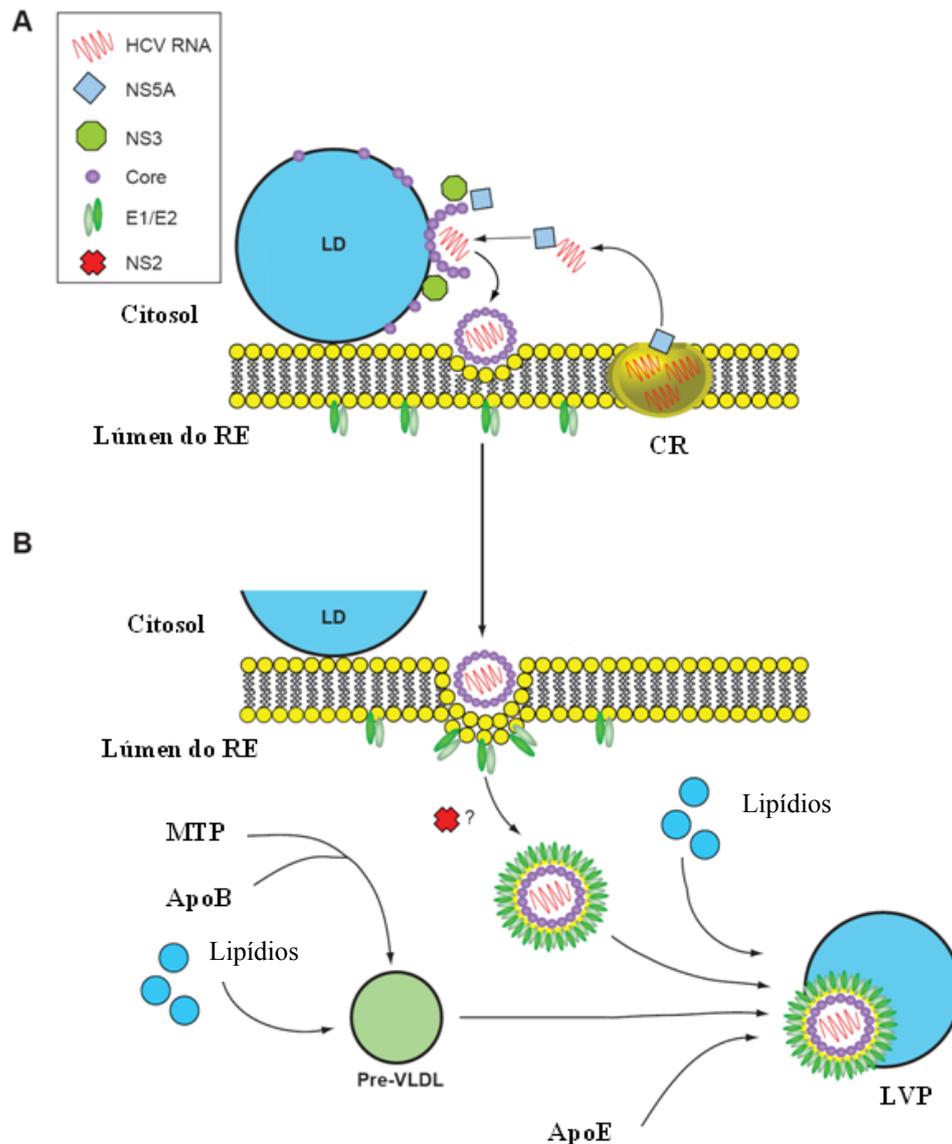
Alguns sistemas celulares têm sido utilizados para estudar a montagem do capsídeo viral. A proteína capsídica, quando superexpressa em células de inseto, monta partículas de aproximadamente 30-60 nm no retículo endoplasmático (BAUMERT e cols., 1998; BAUMERT e cols., 1999; MAILLARD e cols., 2001), o que se aproxima da montagem produzida *in vivo*. Quando as proteínas do envelope E1 e E2 são expressas juntamente com a capsídica, os capsídeos podem ser vistos brotando dentro do retículo endoplasmático e de vesículas citoplasmáticas, mas partículas semelhantes ao vírus não são liberadas. Portanto, este sistema recapitula o que é visto em hepatócitos e suporta a suposição de que os capsídeos são montados no retículo endoplasmático, embora a produção de vírus seja ainda bloqueada nas etapas tardias do ciclo de infecção viral. Partículas semelhantes a capsídeos também têm sido observadas após expressão da proteína capsídica em leveduras, enquanto linhagens celulares de mamíferos não suportam a montagem do capsídeo viral (MAJEU, 2004).

### *Requisitos para a montagem do capsídeo do HCV*

Um modelo ideal para a montagem do capsídeo viral ainda não foi descrito, contudo muito tem sido elucidado sobre os requerimentos e sobre o processo de montagem a partir de análises de várias observações nestes diversos sistemas comentados anteriormente. Estudos em solução têm sido úteis para análises estruturais, já tendo sido revelado que a proteína capsídica do HCV sofre mudanças conformacionais quando monta partículas semelhantes a capsídeos (KUNKEL e WATOWICH, 2002). A proteína capsídica truncada, considerada uma proteína naturalmente desenovelada, tem um ganho de estrutura em folhas- $\beta$  quando forma multímeros no processo de montagem do capsídeo viral (RODRÍGUEZ-CASADO e cols., 2006). Mais recentemente, foi mostrado que este aumento de conteúdo de estrutura em folhas- $\beta$  é devido à interação entre os monômeros, e que regiões ricas em Arginina ficam livres em nucleocapsídeos vazios (RODRÍGUEZ-CASADO e cols., 2007).

Sistemas modelos para a montagem do HCV também têm sido utilizados para definir regiões importantes da proteína capsídica. Estudos utilizando mutantes da proteína capsídica truncada têm revelado que a região C-terminal é dispensável para a montagem (KUNKEL e cols., 2001; LORENZO e cols., 2001). De fato, análises sistemáticas de deleções e mutações pontuais em sistemas livres de células têm confirmado que realmente o C-terminal não é necessário para a montagem, e também têm demonstrado que 68 aminoácidos são importantes para a formação do capsídeo (KLEIN e cols., 2004; 2005). Esta região da proteína contém numerosos resíduos básicos organizados em dois grupos. A deleção de qualquer um destes grupos diminui significativamente a montagem viral (KLEIN e cols., 2005). Diferentemente, a ausência de regiões neutras da proteína não afeta a montagem do capsídeo, sugerindo que a carga global da região N-terminal da proteína capsídica é crítica para o processo de montagem.

Além destas características relacionadas à estrutura da proteína capsídica do HCV, que são cruciais para a montagem, estudos têm mostrado os papéis desenvolvidos por outros componentes virais no processo de montagem, bem como dos caminhos celulares que contribuem para formação do HCV. A descrição dos fatores chaves, tanto virais como do hospedeiro, que são necessários para a produção de partículas infecciosas, foi revisada por Jones e McLauchlan e está mostrada na **Figura 1.15** (JONES e McLAUHLAN, 2010).



**Figura 1.15: Modelo para a montagem do HCV.** Com base nas evidências atuais, a montagem inicia do lado citosólico da membrana do ER e maturação completa ocorre no lúmen ER antes da liberação da célula. **(A)** Nos primeiros passos da montagem, a proteína é direcionada para gotículas lipídicas (LD). Complexos replicativos (CR) virais são recrutados para a superfície de LD em uma maneira dependente das proteínas capsídica e NS5A, sendo capazes de transferir o RNA replicado do complexo replicativo para se associar com a proteína capsídica e, assim, permitir a encapsulação do genoma. Durante esta fase, NS3 também é necessária para a formação do capsídeo, caracterizado por vírions não infecciosos que serão submetidos a novas etapas de maturação. **(B)** As etapas tardias de montagem envolvem a aquisição de um envelope lipídico e a incorporação das glicoproteínas E1/E2 em virions. NS2 parece conferir a infecciosidade dos virions, talvez por mediar uma interação entre os complexos de glicoproteínas (E1 e E2) e partículas imaturas. Durante a maturação, partículas virais nascentes combinam-se com pré-VLDLs (produzido por lipidação inicial de apoB pelo MTP), lipídios na forma de LDs luminal e outros componentes das lipoproteínas, tais como apoE para gerar lipovirion (LVP). A fase em que participa p7 não é clara e, portanto, não foi incluída no modelo (Adaptado de Jones e McLAUCHLAN, 2010).

### *O grau de especificidade da proteína capsídica do HCV pelo RNA viral*

Além da multimerização para a formação do capsídeo viral, outra função realizada pela proteína capsídica durante a montagem é encapsular o RNA viral. Muitos vírus encapsulam RNA celular não específico se o RNA genômico viral não está presente. Além disso, muitos vírus usam o RNA como uma base para a montagem, e/ou para nuclear o processo de montagem do capsídeo. A proteína do HCV parece agir de forma similar. O N-terminal é extremamente hidrofílico, devido à presença de muitos resíduos básicos agrupados em certas regiões. Resíduos básicos frequentemente estão envolvidos na interação com ácidos nucleicos, pois a carga positiva pode interagir com os radicais fosfato carregados negativos em toda estrutura dos ácidos nucleicos. De fato, a proteína capsídica liga ao RNA viral (FAN e cols., 1999; SHIMOIKE e cols., 1999) e esta associação é dependente dos resíduos básicos presentes na região N-terminal. Consistente com esta observação, e suportando a ideia de que o RNA age como uma base para a montagem, o RNA é necessário para a montagem do capsídeo *in vitro* (KUNKEL e cols., 2001). Adicionalmente, a proteína capsídica tem capacidade de agir como chaperones de RNA, sugerindo que a proteína pode também ajudar a reestruturar o RNA, o que teria implicações para as proteínas virais encapsularem um genoma específico (CRISTOFARI e cols., 2004).

A proteína capsídica tem sido descrita como capaz de se ligar a RNA ribossomal (SANTOLINE e cols., 1994), RNAt (KUNKEL e cols., 2001; FROMENTIN e cols., 2007), RNA genômico viral (FAN e cols., 1999; KUNKEL e cols., 2001; CRISTOFARI e cols., 2004) e alguns RNAs inespecíficos (FROMENTIN e cols., 2007). Muitas proteínas capsídicas têm uma alta afinidade para estruturas específicas no seu RNA genômico, permitindo que elas se liguem preferencialmente ao próprio RNA. Santolini e colaboradores reportaram que a proteína capsídica liga equivalentemente ao RNA viral e a

RNA heterólogo, sugerindo que a proteína capsídica do HCV não tem uma grande especificidade (SANTOLINI e cols., 1994).

Desta forma, o mecanismo de montagem do capsídeo viral do HCV ainda deixa várias lacunas. Além disso, possíveis intermediários de montagem ainda não são descritos. A presença de capsídeos não envelopados em pacientes infectados pelo HCV sugere que estas partículas sejam montadas no citoplasma. Mas pouco se conhece sobre como este processo de montagem acontece. Trabalhos não demonstram claramente se somente o RNA viral é empacotado. Além disso, não está claro se pode haver a montagem do capsídeo viral a partir da proteína capsídica truncada *in vivo*. Neste trabalho, realizaremos estudos do processo de montagem de partículas semelhantes a capsídeos (NCLs) do HCV a partir da proteína capsídica truncada (neste trabalho denominada HCV124) e utilizando duas sequências de DNA inespecíficas.

### **1.1.3. Relação estrutura-função de proteínas**

A primeira estrutura tridimensional de uma proteína resolvida foi a da Mioglobina em 1958 (KENDREW e cols., 1958). Nos últimos 51 anos, o campo da Biologia Estrutural tem crescido de maneira extraordinária, de forma que atualmente existem milhares de estruturas de proteínas depositadas no Banco de Dados de Proteínas (PDB). Em paralelo a este crescimento, o conhecimento estrutural nos levou a criar um dogma, onde a função biológica de uma proteína estaria intrinsecamente definida na sua estrutura tridimensional.

O maior desafio após a Era Genômica é a determinação da função das sequências protéicas codificadas. Nesta época, apareceram evidências de que estados desenovelados ou parcialmente enovelados de uma proteína seriam a chave para entender certos processos biológicos. A caracterização e a determinação da função desse tipo de proteína têm se tornado um grande desafio, uma vez que existe uma alta proporção dessas sequências no

genoma de todos os organismos, com funções até então desconhecidas. A desordem estrutural pode ser local ou global. Regiões localmente desestruturadas são mais comuns e têm sido observadas a partir de cristalografia por difração de raios-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Em 1978, foram caracterizados pequenos peptídeos com função hormonal, que apresentam, em solução, uma estrutura altamente flexível ao acaso (BÖSCH e cols., 1978), os quais presumivelmente adotam uma estrutura definida após sua ligação com receptores.

Um levantamento feito em 1994 mostrou que metade das sequências protéicas depositadas no *Swiss Protein Data-Base* continha segmentos de baixa complexidade que correspondiam a regiões não globulares (WOOTTON, 1994). Uma rede algorítmica neural foi desenvolvida para detectar proteínas que apresentam longas regiões desestruturadas, usando somente a sequência primária das proteínas (ROMERO e cols., 1998). Usando este algoritmo, milhares de proteínas foram preditas conter extensos segmentos desordenados com aproximadamente 40 resíduos.

A visão tradicional da relação estrutura-função da proteína estava diretamente relacionada à noção de que a função depende de uma estrutura tridimensional bem definida. Entretanto, tem sido demonstrado que, para muitas proteínas e domínios de proteínas, o estado funcional pode ser intrinsecamente desestruturado (TOMPA, 2005). Várias revisões sobre estas proteínas têm sido realizadas (DUNKER e cols., 2008; TOMPA, 2005) e diferentes termos foram utilizados para descrevê-las, incluindo naturalmente desnaturadas, naturalmente desenoveladas, intrinsecamente desestruturadas, e outras diversas variações (DUNKER e cols., 2008).

### **1.1.3.1. Proteínas intrinsecamente desestruturadas**

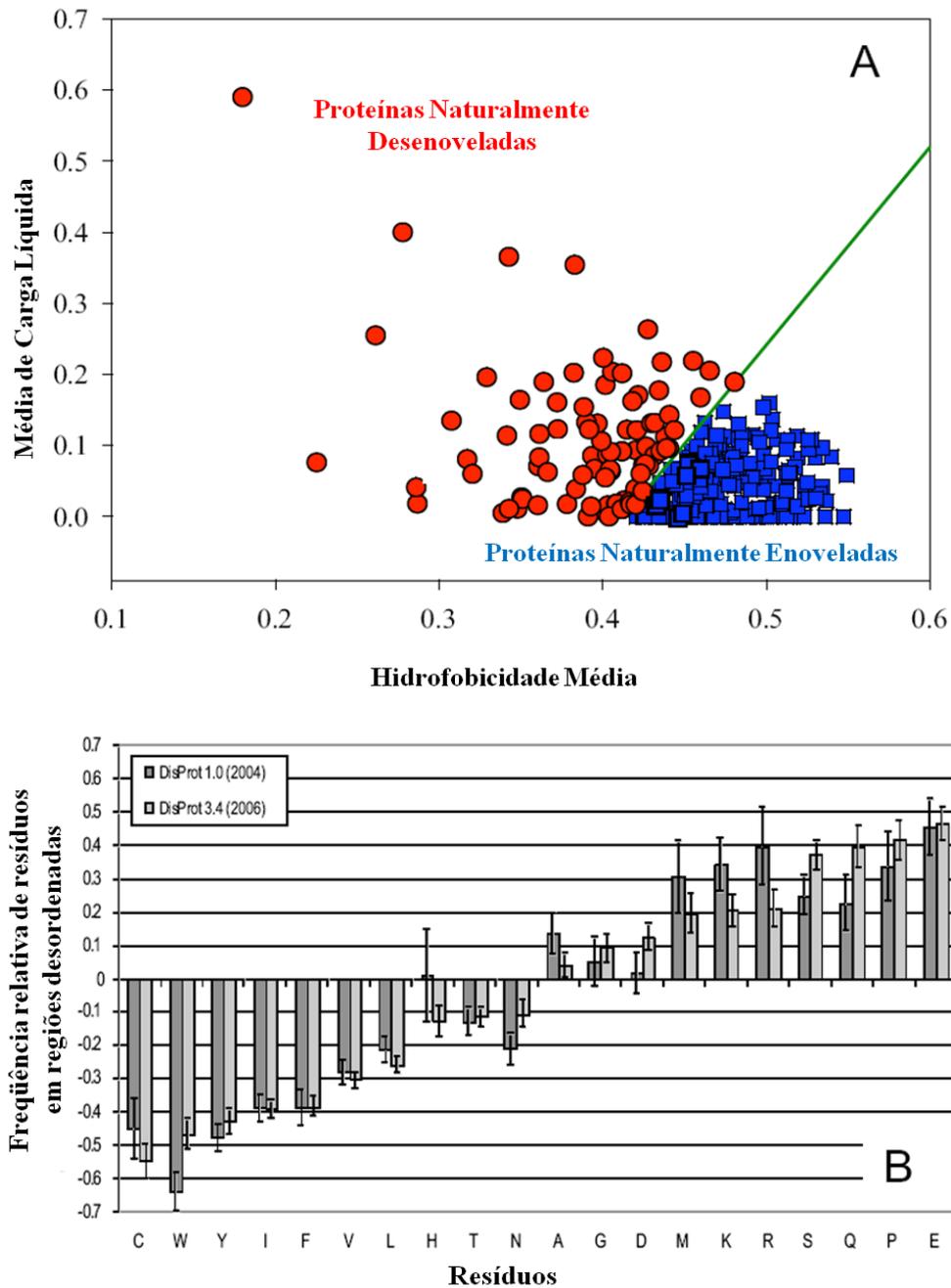
O baixo grau intrínseco de estruturação pode conferir vantagens adicionais em uma proteína, incluindo a capacidade de ligar diferentes alvos celulares. Existem inúmeros domínios que são desestruturados em solução, porém ganham estrutura após a ligação com determinado alvo, podendo levar ao controle do ciclo celular e regulação transcricional e traducional. Estes domínios desestruturados também estão presentes em proteínas que são rapidamente destruídas. Assim, a reciclagem rápida de proteínas que participam de mecanismos críticos de controle celular pode ser proporcionada pela sua forma desestruturada na ausência de um ligante, promovendo um excelente controle por permitir uma resposta rápida às mudanças das condições celulares (DUNKER e cols., 2008).

Proteínas que não possuem estrutura rígida sob condições fisiológicas podem ser separadas em dois grupos distintos. Membros do primeiro grupo apresentam flexibilidade, são mais compactas e possuem estrutura secundária, sendo que essas características mostram propriedades típicas de “*molten globule*” (PTISYN, 1995). Proteínas pertencentes ao outro grupo comportam-se quase como estruturas ao acaso. Este segundo grupo de proteínas apresenta estrutura extremamente flexível, essencialmente não compacta (estendida), e possuem pouca ou nenhuma estrutura secundária em condições fisiológicas, sendo então classificadas como “intrinsecamente desestruturadas”.

A estrutura tridimensional de uma proteína globular é estabilizada por várias interações não covalentes de naturezas distintas, tais como ligações de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos, interações de van der Waals, dentre outras. No entanto, todas as informações necessárias para o correto enovelamento de uma proteína regular estão incluídas na sua sequência de aminoácidos (ANFINSEN, 1961). A ausência de estrutura regular nas proteínas intrinsecamente desestruturadas levanta questões sobre peculiaridades envolvidas nestas sequências de aminoácidos. Algumas dessas peculiaridades já são bem conhecidas e

incluem a presença de numerosos grupos carregados, tanto positivamente quanto negativamente, em pH neutro, apresentando um pI com valores extremos (WEINREB e cols., 1996), além de um baixo conteúdo de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (GAST e cols., 1995).

A comparação entre a hidrofobicidade total e os resíduos carregados na sequência de uma proteína nos permite prever se a sequência de aminoácidos codificará uma proteína intrinsecamente desordenada ou uma proteína estruturada (DUNKER e cols., 2008). Desta forma, a combinação entre um baixo conteúdo de resíduos hidrofóbicos e um grande conteúdo de resíduos carregados representa um importante pré-requisito para a ausência de estrutura compacta em proteínas em condições fisiológicas (**Figura 1.16**).



**Figura 1.16: Peculiaridades das seqüências de aminoácidos de proteínas intrinsecamente desestruturadas.** **A)** Gráfico da carga geral média *versus* hidrofobicidade média para 275 proteínas enoveladas (quadrados azuis) e 91 proteínas naturalmente desenoveladas (círculos vermelhos) (Uversky e cols., 2000). **B)** Composição de aminoácidos de regiões intrinsecamente desordenadas contendo 10 resíduos ou mais do banco de dados do DisProt, relativos ao sistema de proteínas globulares. Cinza escuro representam os dados extraídos do DisProt 1.0 (152 proteínas), enquanto cinza claro são os dados extraídos do DisProt 3.4 (460 proteínas). A média das composições de aminoácidos foi calculada para regiões desordenadas (Adaptado de DUNKER e cols., 2008).

Vários fatores podem influenciar estruturalmente as proteínas intrinsecamente desestruturadas, tais como o aumento de temperatura, variações de pH, presença de íons e ligantes de naturezas diversas. Muitos trabalhos recentes têm verificado o ganho de estrutura em proteínas intrinsecamente desestruturadas quando ligadas a alvos celulares específicos (como uma grande variedade de pequenas moléculas, substratos, cofatores, outras proteínas, ácidos nucleicos, membranas, etc) (UVERSKY e cols., 2000; WRIGHT e DYSON., 1999; DUNKER e cols., 2001). O ganho de estrutura formado pelo complexo pode ser explicado pela mudança dos parâmetros carga/hidrofobicidade, o qual se torna compatível com os valores típicos para proteínas intrinsecamente desestruturadas. Este aumento de estrutura pode ser de diferentes graus, desde enovelamentos locais a enovelamentos globais.

A proteína capsídica do HCV não está apenas envolvida no papel de montagem do capsídeo viral, mas também pode atuar como uma proteína multifuncional que afeta vários processos celulares através da interação com diversos alvos celulares (KREKULOVA e cols., 2006). Esta proteína é capaz, por exemplo, de alterar o metabolismo lipídico, transcrição gênica, apoptose e gerar estresse oxidativo (KREKULOVA e cols., 2006). Além disso, como comentado anteriormente, possui um grande número de resíduos carregados positivamente presentes no N-terminal e uma baixa hidrofobicidade (**Figura 1.13**). Os primeiros 120 aminoácidos presentes no N-terminal da proteína capsídica representam um domínio principalmente hidrofílico contendo três regiões altamente básicas, ricas em arginina e lisina. Há alguns anos atrás, um trabalho mostrou que a proteína capsídica truncada que contém os primeiros 124 aminoácidos (HCV124) apresenta uma estrutura desordenada (KUNKEL e WATOWICH, 2004), tal como outras proteínas intrinsecamente desestruturadas, caracterizada por um desvio para o vermelho no espectro de fluorescência de Triptofano e picos de elipticidade negativos em 200 nm em

espectros de dicroísmo circular (CD). Neste último ano, os estudos da estrutura e dinâmica da proteína capsídica do HCV (82 aminoácidos) confirmou que metade do N-terminal da proteína capsídica é desordenado em solução aquosa, e a incluiu como um membro da família IUP (do inglês, “*Intrinsically Unstructured Protein*”) (DUVIGNAUD e cols., 2009). Em nosso trabalho, avaliamos características relacionadas à estrutura-termodinâmica-função da proteína capsídica truncada (HCV124), assim como o processo de formação de partículas semelhantes ao capsídeo desencadeado por ácidos nucléicos inespecíficos por diferentes metodologias.

## 1.2. Objetivos

### *Objetivo geral*

Neste trabalho, temos como objetivo investigar aspectos moleculares e estruturais da proteína capsídica do Vírus da Hepatite C (HCV) e da montagem do capsídeo do HCV, utilizando, principalmente, medidas espectroscópicas e calorimétricas.

### *Objetivos específicos 1 - Relação estrutura-função da proteína capsídica do HCV*

- ✓ Expressar e purificar a proteína capsídica do HCV truncada (HCV124)
- ✓ Investigar o conteúdo de estrutura secundária e terciária da HCV124 e os efeitos de diferentes condições, tais como diferentes pHs, diferentes concentrações de sal ou detergentes, por espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular;
- ✓ Investigar o conteúdo de estrutura secundária e terciária da HCV124 e os efeitos de diferentes ligantes, tais como a sonda fluorescente bis-ANS e ácidos nucleicos inespecíficos (DNA ou RNA), por espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular;
- ✓ Estudar as propriedades termodinâmicas da montagem do capsídeo por calorimetria;
- ✓ Compreender aspectos relacionados à relação estrutura-função da proteína capsídica do HCV do ponto de vista termodinâmico.

***Objetivos específicos 2 - Análise da formação de partículas semelhantes a capsídeos do Vírus da Hepatite C***

- ✓ Expressar e purificar a região N-terminal da proteína capsídica do HCV (HCV124) e a mesma fusionada à proteína fluorescente verde (GFP);
- ✓ Investigar a dependência de concentração de proteína ou de ácido nucléico na montagem do capsídeo viral, utilizando espectrofotometria, ensaios de gel “*shift*” e polarização de fluorescência;
- ✓ Verificar se a fusão da GFP à proteína capsídica interfere no processo de montagem do nucleocapsídeo viral por espectrofotometria, ensaios de gel “*shift*” e microscopia eletrônica de transmissão;
- ✓ Investigar a presença de possíveis intermediários do processo de montagem de partículas semelhantes ao capsídeo viral (NLPs), utilizando ensaios de gel “*shift*” e espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS).

## **1.3 – Material e Métodos**

### **1.3.1. Reagentes**

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico. A água é destilada e deionizada em um sistema de purificação de água Millipore. Os tampões utilizados são obtidos da Sigma Chemical Co., bem como a ureia e o hidrocloreto de guanidina.

### **1.3.2. Ácidos nucleicos**

Os ácidos nucleicos utilizados nesse estudo, DNA consenso de p53, DNA poli(GC) e o RNA, foram sintetizados e purificados pela Prodimol Biotecnologia S.A.

### **1.3.3. Obtenção de Células Competentes**

As células *Escherichia coli*, cepa BL21 (DE3), foram crescidas em 50 mL de meio de cultura LB (extrato de levedura 5,0 g/L, triptona 10,0 g/L e NaCl 5,0 g/L, (Merck) pH 7,5) até alcançar a fase estacionária em um agitador rotatório a 37°C. A cultura foi então diluída 20 vezes e centrifugada a 5000 rpm/15 min (rotor RPR 9.2 HITACHI), o sobrenadante descartado e o precipitado ressuscitado em 1 L de água estéril gelada e novamente centrifugado a 5000 rpm/15 min (rotor RPR 9.2 HITACHI). O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuscitado agora em 500 mL de água gelada estéril, e centrifugado a 5000 rpm/15 min (rotor RPR 9.2 HITACHI). Mais uma vez o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 20 mL de água com 10% de glicerol, para posterior centrifugação a 5000 rpm/15 min (rotor RPR 20.2 HITACHI). Após todos estes ciclos de lavagem, o precipitado final foi então ressuscitado em 3 mL de água com 10% de glicerol e congelado a -80°C. Todas estas etapas visam à retirada do

excesso de sal da amostra e à obtenção de uma alta concentração de bactérias para a transformação das mesmas com os plasmídeos de interesse (CHUNG e cols., 1989).

#### **1.3.4. Transformação das Células Competentes por Eletroporação**

As células BL21 (DE3) competentes foram eletroporadas para inserir os plasmídeos pETCT específicos (*HCV124* e *HCV124GFP*) na razão de 40  $\mu$ L de bactéria para 1  $\mu$ L de plasmídeo. Os plasmídeos foram cedidos pelo nosso colaborador neste projeto, o Prof. David Peabody (University of New Mexico School of Medicine - USA). Após eletroporação, as células foram imediatamente transferidas para 1 mL de meio LB, crescidas em um agitador rotatório a 37°C por 1 hora, e por fim plaqueadas em placas com agar sólido e ampicilina 0,1 mg/mL (*HCV124*) ou kanamicina (*HCV124GFP*) e mantidas a 37°C por 12 horas (CHUNG e cols., 1989).

Para o plasmídeo com a sequência da proteína capsídica do HCV (*HCV124* 1a ou *HCV124GFP*), após o primeiro plaqueamento, várias colônias foram retiradas das placas e colocadas em 1 mL de meio LB com antibiótico específico e crescidas em um agitador rotatório a 37°C por aproximadamente 7 horas. Diluições seriadas foram feitas até 10<sup>6</sup> e alíquotas de 10  $\mu$ L foram plaqueadas novamente em placas com e sem antibiótico. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C durante a noite e aos 990  $\mu$ L restantes do crescimento de 7 horas foram adicionados glicerol estéril na concentração final de 15% e congelados a – 80°C. No dia seguinte, os tubos congelados correspondentes às placas que apresentaram um número aproximado de colônias na presença e na ausência de antibiótico foram selecionados para o descongelamento e propagação. Este procedimento de duplo plaqueamento é importante, uma vez que a expressão da proteína *HCV124* é extremamente

tóxica para célula, o que pode acarretar na perda do plasmídeo durante a etapa de crescimento bacteriano.

### **1.3.5. Expressão e purificação das proteínas capsídicas do HCV (HCV124 e HCV124GFP) - cromatografia de troca iônica e de afinidade (ou fase reversa)**

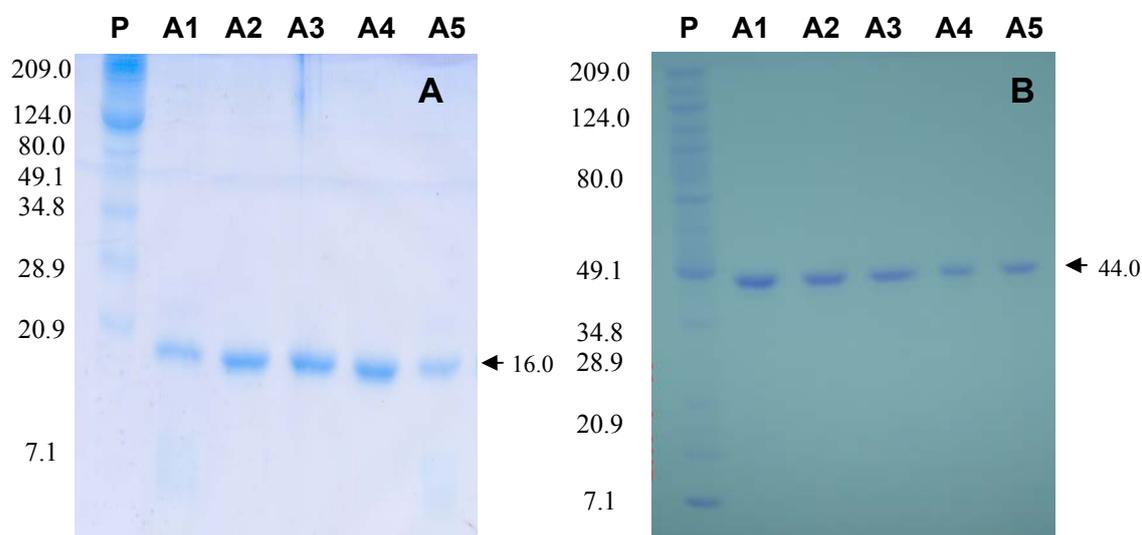
A proteína capsídica do vírus da Hepatite C HCV124 ou HCV124GFP, que apresenta os primeiros 124 aminoácidos, foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) e purificada para posteriores estudos estruturais e de formação de capsídeos na presença de diferentes ácidos nucleicos.

O plasmídeo contendo a sequência truncada da proteína HCV124 ou HCV124GFP foi inserido nas células competentes por eletroporação e os clones selecionados conforme descrição acima. Estes clones foram propagados em meio LB até atingir uma D.O. (600 nm) de 0,8 e foram induzidos por IPTG por aproximadamente 3 horas. Após esta etapa, as células foram então centrifugadas e congeladas. No dia seguinte, as bactérias foram sonicadas por 10 ciclos de 10 segundos cada, com intervalos de 1 minuto, em um tampão de lise contendo NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, NaCl 250 mM, ureia 8 M, EDTA 2 mM e DTT 2 mM, pH 7,0. Após a lise bacteriana, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante, depois de filtrado, foi aplicado em uma coluna de troca iônica SP Sepharose, previamente equilibrada com tampão Hepes 25 mM, NaCl 150 mM e ureia 8 M, pH 7,0. A proteína foi eluída com um gradiente de NaCl (0,05 – 1,0 M), utilizando um sistema AKTA.

As frações correspondentes a HCV124 ou HCV124GFP, que contêm uma cauda de histidina para facilitar a purificação, foram aplicadas em uma coluna de afinidade por níquel. Após a lavagem com uma solução contendo imidazol 150 mM, e posterior

passagem em tampão Fosfato 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,0, a proteína (HCV124 ou HCV124GFP) foi eluída passando o mesmo tampão em pH 3,0. Em seguida, as frações coletadas foram lidas em um espectrofotômetro a 280 nm. O grau de pureza da proteína foi aferido por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 15% e corado por azul de comassie (SDS-PAGE) (**Figura 1.17**).

A proteína HCV124, em um clone sem a cauda de histidina, também foi purificada utilizando uma coluna de troca iônica HiPrep 16/10 SP XL. (Amersham Biosciences), e em seguida uma coluna de fase reversa (SR2 Poros), e os resultados com esta proteína foram semelhantes. A proteína foi então quantificada através da medida de absorvância em 280 nm e sua correlação com o coeficiente de extinção molar, o qual foi calculado pelo programa *Protparam tool* da base *ExPASy* ( $37.980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e estocada a  $4^{\circ}\text{C}$  em tampão Fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 3,0.



**Figura 1.17 - Avaliação do grau de pureza da HCV124 e HCV124GFP-** **A)** Gel da proteína HCV124. **B)** Gel da proteína HCV124GFP, onde P representa o Padrão de Peso Molecular, e A1, A2, A3, A4 e A5 representam as frações de cada purificação.

### **1.3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida, sistema BIO-RAD, com o objetivo de monitorar as etapas de expressão e purificação e verificar o grau de pureza final da amostra (**Figura 1.17**). No gel, a fase separadora consiste de uma concentração de 15% de acrilamida em pH 8,8, enquanto a fase concentradora requer uma concentração de 4% em pH 6,8. A eletroforese foi realizada com uma corrente constante a 25 mA por aproximadamente 90 min, utilizando o tampão de corrida Tris-glicina pH 8,3 (Tris 15,5 g/L, glicina 94 g/L e SDS 10%). O gel foi corado com uma solução 0,1% de *Comassie Brilliant Blue G*, 40% de metanol e 10% de ácido acético por 2 h, e descorado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético (LAEMMLI, 1970).

### **1.3.7. Análise das NLPs por espectrofotometria**

Neste trabalho, a formação de partículas semelhantes ao capsídeo viral foi estudada para as formas HCV124 e HCV124GFP verificando o aumento da turbidez nas amostras. Esse aumento foi verificado a partir de leituras de D.O. a 350 nm em um espectrofotômetro SP2000 UV (BEL *Photonics*), durante 5 minutos para avaliar a D.O. máxima.

Primeiramente, a concentração de ácido nucléico foi mantida constante (5  $\mu\text{M}$  para cada experimento) e variando a concentração das duas formas da proteína, de 1  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  para a HCV124 e de 1  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$  para a HCV124GFP.

### **1.3.8. Ensaio de interação proteína-DNA por Ensaio do Desvio da Mobilidade Eletroforética (EMSA ou *gel shift*)**

EMSA é uma ferramenta amplamente utilizada para estudar regulação gênica e determinar ligação de proteínas com DNA (FRIED e CROTHERS, 1981; GRNAER e REVZIN, 1981). Através da observação da migração das moléculas em uma eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida ou agarose, podemos distinguir formação de complexos (proteína:DNA). O complexo proteína:DNA migra de forma mais lenta do que moléculas de DNA livre, sendo por isso chamado de “*gel shift*” ou “*gel retardation assay*”.

Esta técnica foi usada visando à identificação da ligação da HCV124 ou HCV124GFP ao DNA poli(GC) ou DNA p53. Para isso, utilizamos oligonucleotídeos correspondentes à sequência consenso de ligação à p53 ou a sequência não-específica poli(GC). Os oligonucleotídeos eram marcados com P<sup>32</sup> ou fusionados à sonda fluorescente Alexa 488, o que permite a sua observação nos diferentes ensaios. A proteína capsídica do HCV em diferentes concentrações foi incubada com estes oligonucleotídeos. As amostras foram diluídas em tampão Fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4, com volume final de 20 µL de reação. Foram adicionados 5 µL de tampão de corrida (TBE (Tris/Borato/EDTA) após a incubação e verificamos que não houve alteração do pH. A eletroforese foi realizada usando a voltagem de 170 V. Para as amostras com DNA marcado com P<sup>32</sup>, após a eletroforese, o gel foi transferido para um papel de filtro e seco a vácuo (Heto Dry). A membrana foi acondicionada em um cassete juntamente com um filme (Kodak) que foi estocado a -80 °C por 18 horas. Em seguida, a revelação foi feita em uma câmara escura, permitindo a visualização das bandas na autorradiografia. Ao DNA, em diferentes concentrações, foi adicionada proteína HCV124 ou HCV124GFP que teve sua concentração variada (todas as concentrações estão indicadas nos respectivos resultados).

### **1.3.9. Análise por Microscopia Eletrônica de transmissão de capsídeos *in vitro* formados pela ligação da proteína HCV124 a sequências inespecíficas de DNA**

A microscopia eletrônica é uma ferramenta bastante empregada na obtenção do conhecimento das diferentes etapas da via de infecção de um vírus, bem como na formação de partículas virais.

O ensaio de formação de capsídeo *in vitro* consiste na incubação da proteína HCV124 com DNA poli(GC) ou DNA p53 contendo 21 pares de base, na razão de 1:3 em tampão de montagem (Acetato de Magnésio 1,7 mM, Acetato de Potássio 100 mM, Hepes 25 mM, imidazol 500 mM, pH 7,4) ou em tampão Fosfato (Fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0).

Após este processo, a amostra foi fixada em grades de níquel e contrastada com acetato de uranila para posterior observação por microscopia eletrônica de transmissão (MET), onde verificamos a formação de capsídeos. Cada experimento requer dois controles, onde grades só com a proteína e grades só com o DNA foram também observadas. As grades foram visualizadas em microscópio eletrônico Morgani operado em 100 kV. Em seguida, realizamos o processamento digital das imagens adquiridas com o Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., Mountain View, Calif.). Estes experimentos foram feitos em colaboração Prof. Davis Fernandes Ferreira do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ.

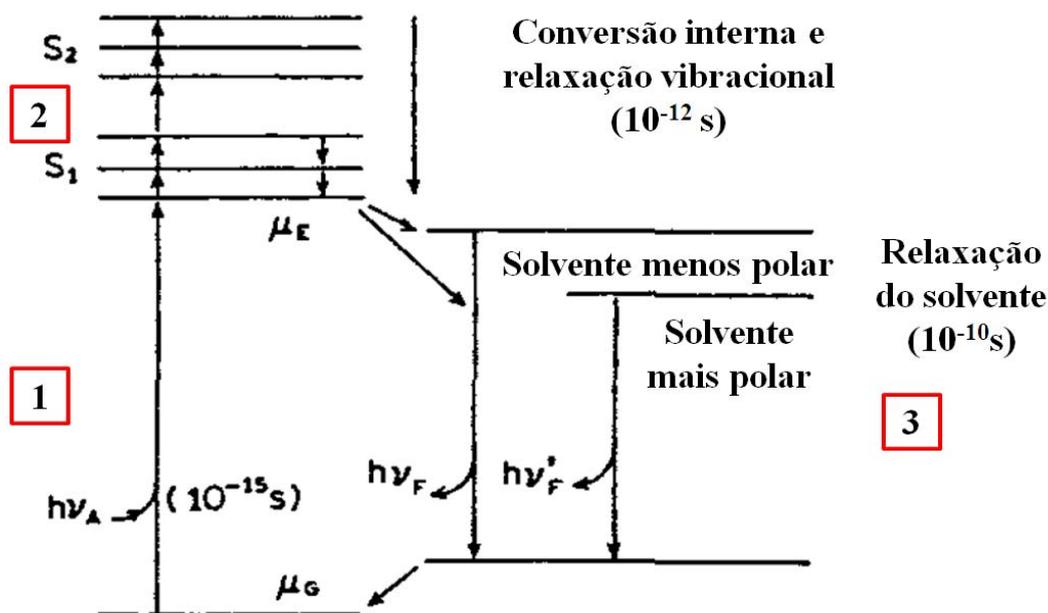
## 1.3.10. Medidas espectroscópicas

### 1.3.10.1. Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro modelo ISS K2 (ISS Inc., Champaign, IL). A espectroscopia de fluorescência permite estudar a dinâmica de proteínas ou mesmo de complexos protéicos, uma vez que tanto a fluorescência quanto a dinâmica ocorrem em escalas de tempo muito próximas. O monitoramento de estruturas virais por espectroscopia de fluorescência (LAKOWICZ, 1983) permite acompanhar as mudanças na conformação destas estruturas, uma vez que essa fluorescência é oriunda de aminoácidos aromáticos presentes nessas proteínas.

Fluorescência é o resultado de um processo que compreende três estágios. No estágio 1 (Excitação), um fóton de energia é aplicado por uma força externa, como uma lâmpada incandescente ou um laser, e é absorvido por um fluoróforo, criando um estado eletrônico excitado ( $S_1'$ ). No estágio 2, representado pelo tempo de vida do estado excitado que dura em torno de 1-10 nanosegundos, e no qual o fluoróforo sofre mudanças conformacionais e também pode ser submetido a vários tipos de interações. Este tipo de processo tem duas consequências importantes: primeiro, a energia de  $S_1'$  é parcialmente dissipada, levando a um estado relaxado ( $S_1$ ) do qual a emissão de fluorescência se origina (conversão interna, relaxação vibracional e relaxação do solvente); segundo, nem todas as moléculas inicialmente excitadas pela absorção no estágio 1 retornam ao estado fundamental  $S_0$  pela emissão de fluorescência. Já no estágio 3, onde a emissão de fluorescência ocorre, um fóton de energia  $h_{EM}$  é emitido e o fluoróforo retorna ao estado fundamental  $S_0$  (**Figura 1.18**). O rendimento quântico é a razão entre o número de fótons emitidos (estágio 3) e o número de fótons absorvidos (estágio 1). Devido à dissipação de energia durante o tempo de vida do estado excitado, a energia deste fóton é baixa e emitida

em comprimento de onda maior que o fóton excitado  $h_{EX}$ . A diferença do comprimento de onda entre o fóton excitado e o emitido ( $h_{EX} - h_{EM}$ ) é chamada de desvio de Stokes.

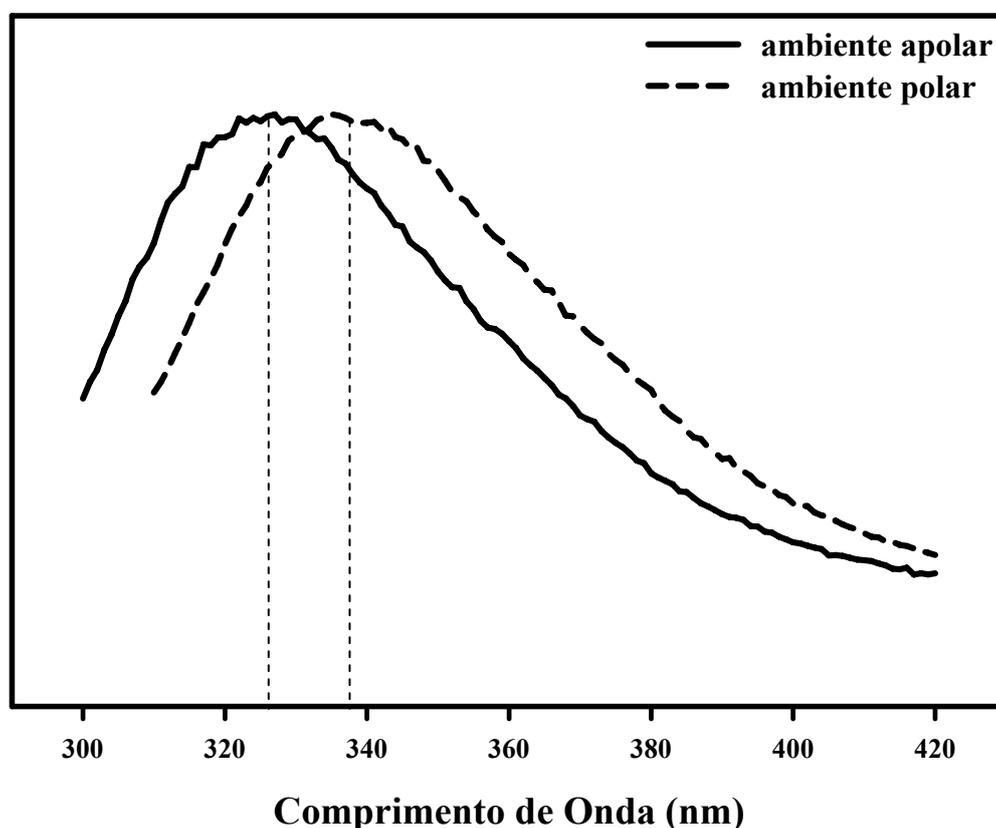


**Figura 1.18: Diagrama de Jablonski para fluorescência com relaxação do solvente.** Esquema dos três estágios envolvidos no fenômeno de fluorescência. Estágio 1: excitação; estágio 2: tempo de vida do estado excitado; estágio 3: emissão de fluorescência.  $\mu_G$  representa o estado fundamental e  $\mu_E$  o estado excitado (Adaptado de LAKOWICZ, 1999).

No presente estudo, acompanhamos a emissão de fluorescência dos resíduos de Triptofano da proteína capsídica do HCV, que são aminoácidos hidrofóbicos bastante sensíveis a qualquer mudança de polaridade do meio (LAKOWICZ, 1999). Sendo assim, a mudança na emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano, quando excitados em um determinado comprimento de onda, reflete as mudanças de polaridade do ambiente em que eles se encontram (LAKOWICZ, 1983). Podemos acompanhar então a ligação da proteína HCV124 a diferentes ligantes, ou a alteração estrutural promovida por certas condições, através da mudança no espectro de emissão de fluorescência do Triptofano, ou seja, por mudanças no centro de massa do espectro para comprimentos de onda menores. Em ambientes apolares, ou seja, com pouco acesso ao solvente polar, esses resíduos emitem

fluorescência em comprimentos de onda menores (em torno de 320 nm) e, portanto, mais energéticos.

Nos ensaios de interação do HCV124 com micelas, à medida que os Triptofanos da proteína tornam-se internalizados para o meio apolar das micelas, estes passam então a emitir fluorescência em comprimentos de onda menores e mais energéticos, uma vez que a energia gasta é menor para ocorrer uma reorientação das moléculas do solvente (**Figura 1.19**).



**Figura 1.19: Espectros de fluorescência de resíduos aromáticos.** A linha contínua representa um espectro de fluorescência de resíduos aromáticos, como por exemplo, o Triptofano, em ambientes apolares. Em linha pontilhada está representado um espectro de fluorescência de resíduos aromáticos em ambientes polares, mostrando o desvio que ocorre no espectro quando, por exemplo, ocorre a desnaturação ou dissociação de uma proteína e estes resíduos são expostos ao solvente.

O centro de massa espectral  $\langle \nu \rangle$ , que é obtido pela emissão de fluorescência de aromáticos, é diretamente proporcional à energia de emissão quando expresso em números de onda e pode ser calculado conforme a equação 1.1:

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum \nu_i \cdot F_i}{\sum F_i} \quad \text{Eq.(1.1)}$$

onde  $F_i$  é a fluorescência emitida em um determinado número de onda  $\nu_i$ , sendo o somatório realizado a partir de uma grande quantidade de valores  $F$ .

### 1.3.10.2 - Polarização de fluorescência

A partir da técnica de polarização de fluorescência, podemos avaliar o perfil de ligação da proteína capsídica do HCV truncada e fusionada a GFP ao ácido nucléico de interesse. A polarização de fluorescência de uma molécula marcada depende do tempo de vida de fluorescência e do tempo de correlação rotacional. Quanto maior o tamanho das partículas, menor a velocidade de giro das mesmas e maior a polarização de fluorescência.

Em um experimento típico, a amostra contendo uma sonda fluorescente (no caso, o DNA p53 ou DNA poli(GC)) é excitada com uma luz polarizada linear e a intensidade dos componentes vertical e horizontal da luz emitida é medida. A polarização ou a anisotropia são calculadas usando as seguintes equações:

$$\text{Polarização (P): } I_V - I_H / I_V + I_H \quad \text{Eq.(1.2)}$$

$$\text{Anisotropia (r): } I_V - I_H / I_V + 2I_H \quad \text{Eq.(1.3)}$$

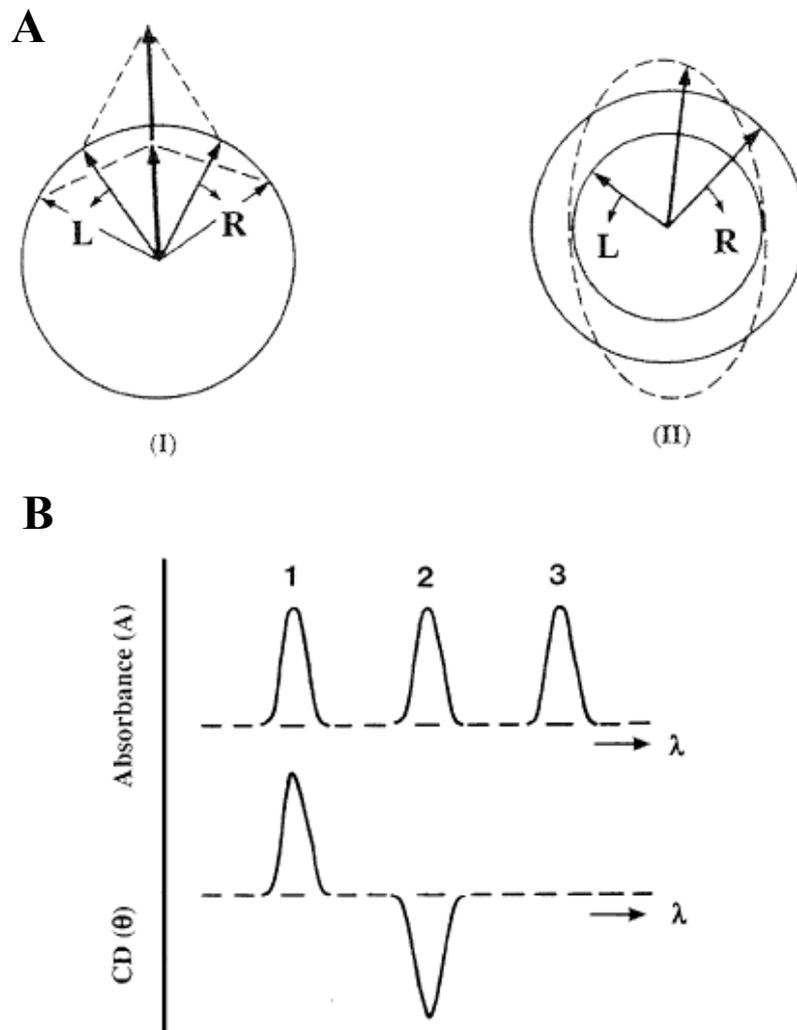
onde  $I_H$  é a intensidade paralela ao plano de excitação e  $I_V$  é a emissão perpendicular ao plano de excitação.

Medidas de polarização foram utilizadas para verificar a interação entre a proteína HCV124 ao DNA p53 ou ao DNA poli(GC) marcados com a sonda fluorescente Alexa 488N.

### 1.3.10.3. Dicroísmo Circular

A medida de Dicroísmo Circular (CD) nos fornece uma ideia da estrutura secundária de proteínas ou de peptídeos, além de nos permite verificar possíveis mudanças provocadas pela interação de ligantes, bem como verificar um processo de desnaturação promovido por agentes desnaturantes. A grande vantagem desta técnica, em comparação a técnicas que proporcionam resolução atômica, tais como ressonância magnética nuclear e cristalografia por difração de raios-X, é a rapidez de informação e as baixas concentrações necessárias (na faixa de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  M).

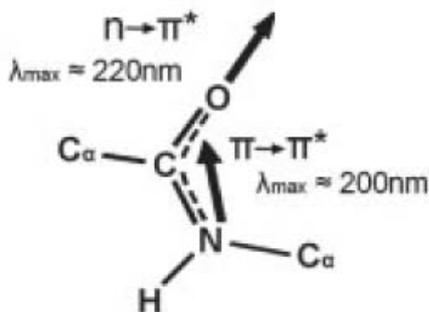
Macromoléculas biológicas, tais como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, são compostas de muitas unidades opticamente ativas que exibem sinal de dicroísmo circular. Moléculas opticamente ativas interagem com a luz polarizada e provocam alteração na polarização da luz incidente. O instrumento de CD (espectropolarímetro) detecta esta alteração através da medida da diferença de absorção de uma luz circularmente polarizada à direita (R) e à esquerda (L) ( $\Delta A = A_L - A_R$ ) (**Figura 1.20A**) após esta passar através de uma amostra. Esta medida é geralmente reportada em termos de elipticidade em graus ( $\theta$ ) (**Figura 1.20B**). É importante notar que  $\theta = \tan^{-1} (L-R/L+R)$ , onde “L-R” e “L+R” representam o raio menor e o maior da elipse resultante, respectivamente. O espectro de CD é obtido quando o dicroísmo é medido em função do comprimento de onda.



**Figura 1.20: Origem do efeito do Dicroísmo Circular (CD).** (A) Componentes circularmente polarizados para direita (R) e esquerda (L) da radiação plano-polarizada: (I) os dois componentes têm a mesma amplitude e quando combinados geram uma radiação plano polarizada; (II) os componentes têm magnitudes diferentes, resultando em uma radiação elipticamente polarizada. (B) Relação entre absorção e o espectro de CD. O sinal 1 apresenta um espectro de CD positivo com L maior que R; o sinal 2 apresenta um espectro de CD negativo com R absorvido maior que o L; o sinal 3 se refere a um cromóforo aquiral (Extraído de KELLY e cols., 2005).

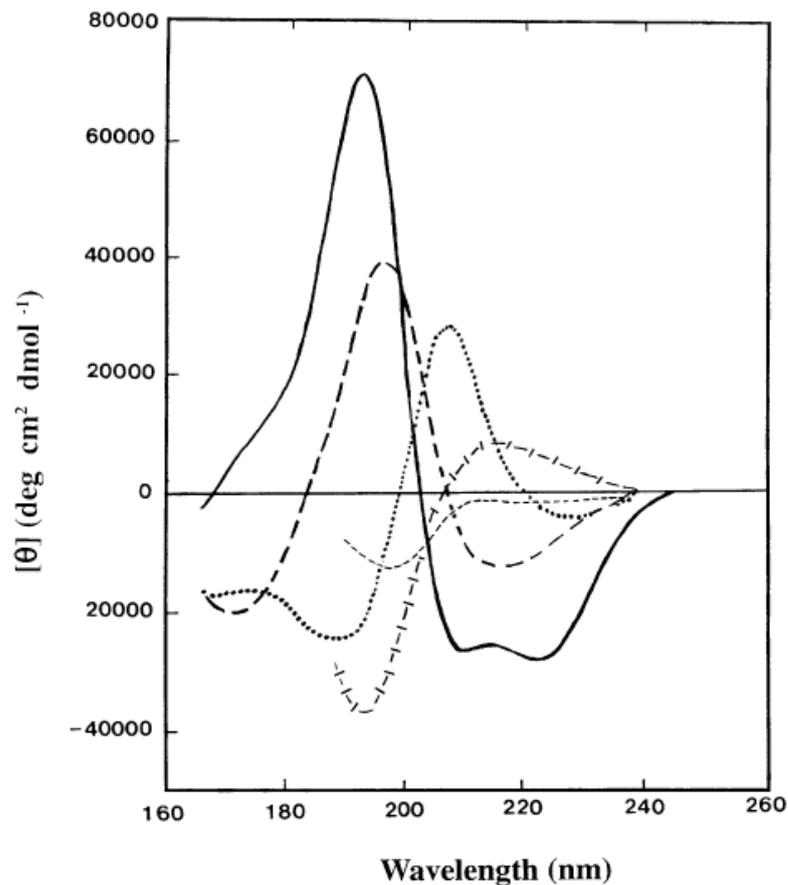
Os espectros de proteínas na faixa de comprimento de onda do UV (ultravioleta) distante (absorção em 240 nm ou menor) são devidos principalmente à ligação peptídica. Há uma fraca transição ( $n \rightarrow \pi^*$ ) centrada em torno de 220 nm e uma mais intensa ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) em torno de 190 nm (Figura 1.21). Esta absorção está associada aos grupos amidas, e são influenciados pela geometria da cadeia polipeptídica (ângulos  $\phi$  e  $\psi$ ) de proteínas

(WHITMORE & WALLACE, 2007). Assim, os espectros de proteínas são reflexos dos diferentes tipos de estrutura secundária.



**Figura 1.21: Diagrama de um peptídeo mostrando a orientação dos dipolos (indicados em setas) das transições  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ . (Extraído de WHITMORE e WALLACE, 2008)**

Os espectros de dicroísmo circular com picos negativos de elipticidade bruta em torno de 222 e 208 nm, por exemplo, são característicos de proteínas ou peptídeos com estrutura  $\alpha$ -hélice (**Figura 1.22**). Já um único pico em torno de 216-218 nm é característico de estrutura em folha- $\beta$ , enquanto que um pico em torno de 200 nm é típico de proteínas intrinsecamente desestruturadas. Análises de CD podem fornecer informações a respeito de diversos outros tipos de estrutura, como podem ser visualizados na **Figura 1.22**.



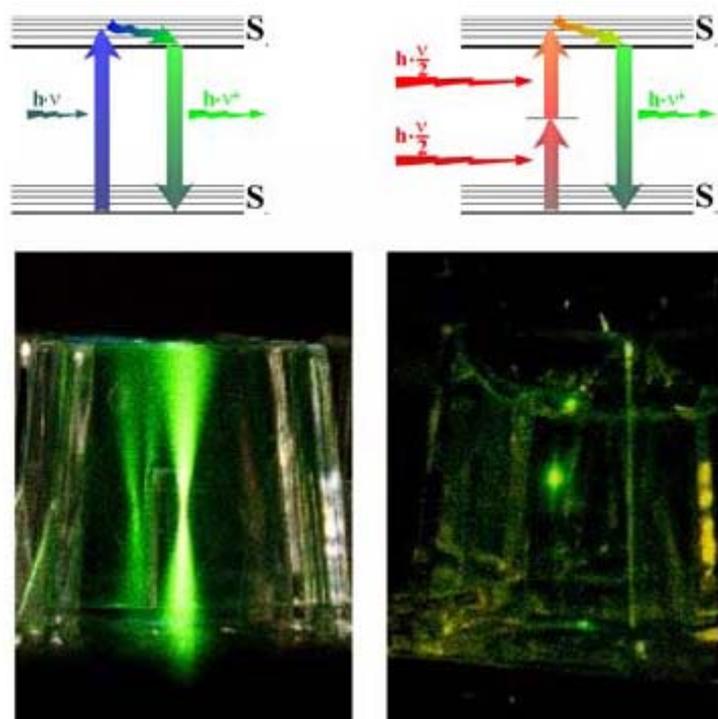
**Figura 1.22: O espectro de CD no UV (ultravioleta) distante está associado com vários tipos de estrutura secundária.** A linha sólida representa  $\alpha$ -hélice, a linha tracejada longa representa folha- $\beta$ , a linha pontilhada representa volta- $\beta$ , a linha tracejada cruzada representa hélice  $3_{10}$ , a linha tracejada curta representa estrutura irregular (Extraído de KELLY e cols., 2005).

Para a proteína HCV124, a concentração utilizada foi de 25  $\mu\text{M}$  em tampão Fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. A leitura foi realizada em cubeta de 0,02 cm. O espectropolarímetro usado foi o modelo Jasco J-715 1505 e os espectros foram adquiridos na faixa do UV nos comprimentos de onda de 260 a 190 nm, a cada 0,2 nm. Os espectros são uma média de três varreduras e são representativos de três medidas independentes.

#### 1.3.10.4. Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS)

A técnica de espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS, do inglês “*Fluorescence Correlation Spectroscopy*”) permite a caracterização de ligações

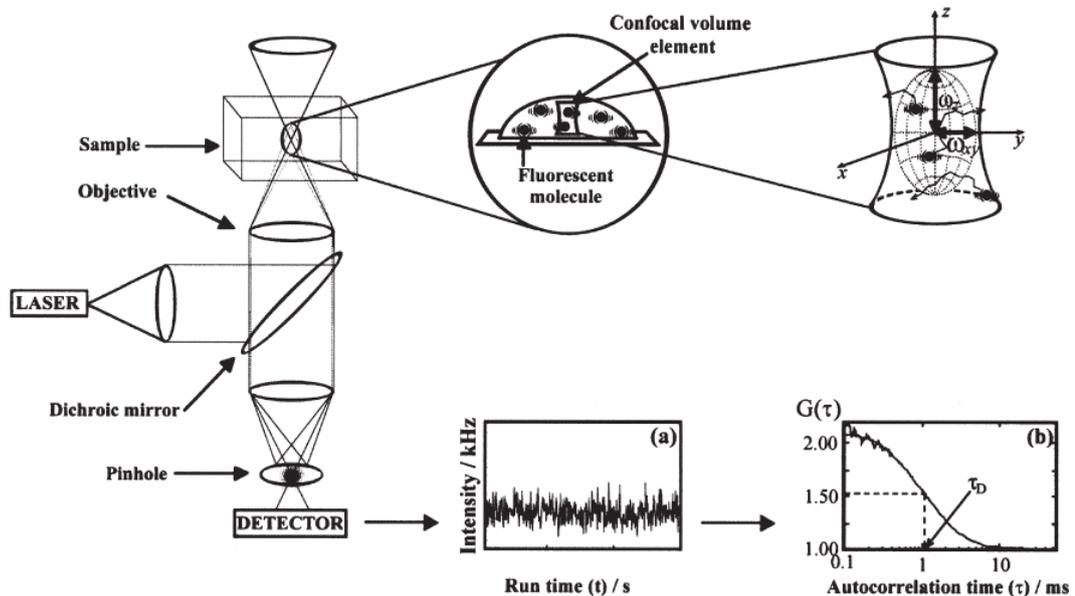
moleculares, multimerização, agregação e enovelamento protéico *in vitro* (HAUSTEIN, 2004; THOMPSON e cols., 2002) e em células vivas (VUKOJEVIC e cols., 2005). A excitação por dois fótons utilizada nesta técnica delimita um volume de excitação, ou observação, na faixa de fentolitros (**Figura 1.23**). Para que a excitação por dois fótons ocorra é necessária a incidência de fótons em tempos muito próximos, e a probabilidade disto acontecer é muito pequena, ficando a excitação limitada ao local de maior incidência de fótons.



**Figura 1.23: Excitação por dois fótons.** Comparação da excitação por um (esquerda) e dois fótons (direita). A excitação por dois fótons requer a absorção de dois fótons teoricamente com o dobro do comprimento de onda usualmente requerido para a excitação, dentro de um intervalo de aproximadamente fentosegundos. A probabilidade disto acontecer é muito pequena, ficando a excitação restrita a um pequeno volume (fentolitros), que é onde há intensidade suficiente para a excitação do fluoróforo (Extraído de SCHWILLE e HAUSTEIN).

Dessa forma, na FCS se mede diretamente as flutuações de fluorescência dentro deste volume de observação e esta técnica é normalmente usada para obter informação sobre o número de moléculas fluorescentes neste pequeno volume e o coeficiente de difusão da

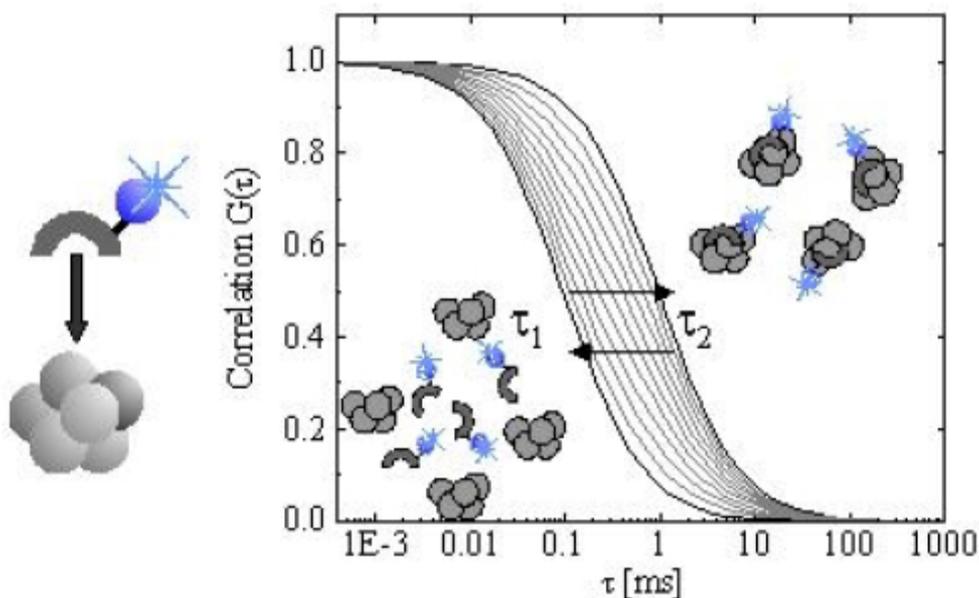
função de autocorrelação do sinal de fluorescência (**Figura 1.24**) (CHEN e cols., 1999, 2002).



**Figura 1.24: Esquema de um Experimento de FCS.** Do lado esquerdo estão representados componentes de um microscópio para o experimento de FCS. Acima à direita está mostrado o pequeno volume de excitação por dois fótons. Abaixo à direita, mostra a flutuação de fluorescência no tempo, que pode ser autocorrelacionada como mostrado no gráfico posterior (Extraído de VUKOJEVC e cols., 2005).

Devido à sensibilidade desta técnica, é possível analisar soluções de baixa concentrações (nM) e analisar moléculas individualmente. A partir do coeficiente de difusão das moléculas individuais e da análise do histograma de contagem de fótons (“*Photon Counting Histogram*” ou PCH), o qual verifica a quantidade média de fótons que cada molécula emite, podemos identificar interações moleculares (**Figura 1.25**), e desta forma, os possíveis intermediários de montagem da capsídeo do Vírus da Hepatite C (CHEN e cols., 1999). Além disso, a técnica de FCS nos permite analisar o empacotamento de ácidos nucléicos virais, como já verificado em alguns trabalhos (SABANAYAGAM e cols., 2007).

Todas as nossas medidas foram realizadas em um espectrômetro de Correlação de Fluorescência ALBA (ISS, Illinois) acoplado a microscópio Nikon TE2000-U, equipado com laser pulsátil de Titânio:Safira Tsunami bombeado por um laser Millenia XV (Spectra Physics).



**Figura 1.25: Determinação de interações moleculares.** Mudanças no tempo de difusão de um pequeno ligante após ligação a uma proteína grande (Extraído de SCHWILLE e HAUSTEIN, 2004).

### 1.3.11. Espalhamento de Luz

A medida de espalhamento de luz visa obter elementos que levem a uma estimativa do tamanho da partícula em solução. Uma luz incide sobre a amostra e é espalhada de acordo com o tamanho da partícula, ou seja, quanto maior a partícula, maior a quantidade de luz espalhada. A detecção da luz espalhada é obtida a  $90^\circ$ , e utilizamos um comprimento de onda de 320 nm, uma vez que nem proteínas nem ácidos nucleicos absorvem luz neste comprimento. Com o objetivo de refinar a medida de espalhamento, a detecção da luz espalhada foi obtida na faixa de 315 e 325 nm, selecionada por um

monocromador, sendo assim quantificada pela área correspondente aos valores de intensidade obtidos nesta faixa. Com este tipo de medida conseguimos analisar a dissociação de grandes complexos, como vírus, ou a agregação de proteínas ou domínios. As medidas foram realizadas no espectrofluorímetro modelo ISS K2 (ISS Inc., Champaign, IL).

### **1.3.12. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)**

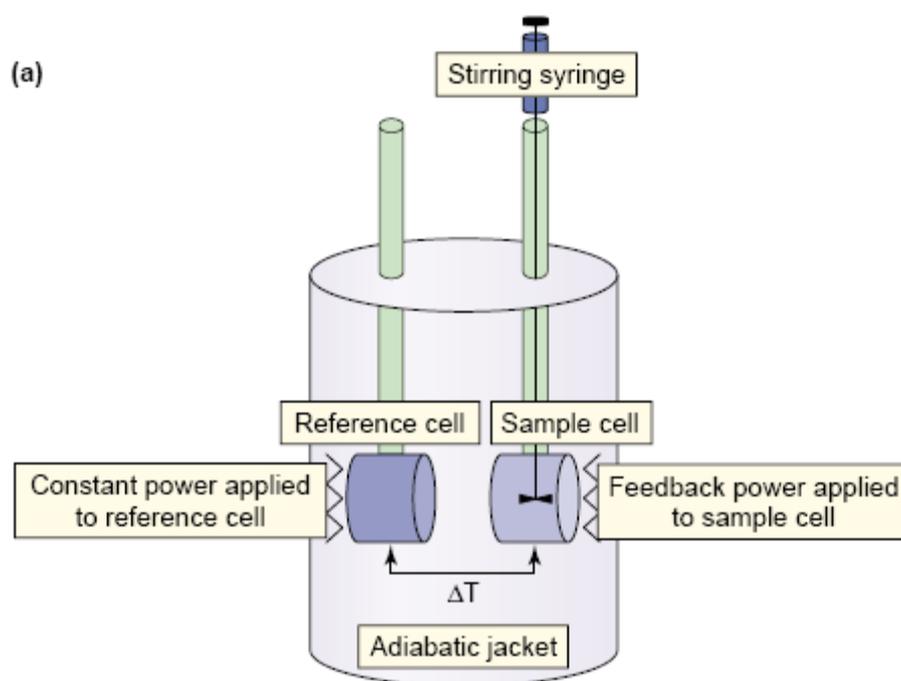
A cromatografia de gel filtração consiste em passar uma mistura de proteínas através de uma coluna contendo uma matriz gelatinosa com pequenas esferas porosas, onde pequenas moléculas que conseguem entrar nos poros arrastam-se lentamente por dentro de sucessivos poros à medida que passam pela coluna, ao contrário das maiores, que se movem mais rapidamente e são eluídas num tempo menor. A coluna de gel filtração utilizada foi a GPC300, com um fluxo de 0,5 mL/min para HCV124. O sistema foi equilibrado em tampão Fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 para a proteína HCV124, ambos sendo filtrados e deaerados em sistema Millipore. A eluição das amostras foi monitorada por absorbância a 280 nm.

### **1.3.13. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)**

Os experimentos de ITC (*"Isothermal Titration Calorimetry"*) foram realizados em colaboração com a Professora Maria Lucia Bianconi, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Um instrumento de ITC consiste de duas celas idênticas, compostas de uma liga metálica com uma alta eficiência de condução térmica, recoberta por uma câmara adiabática. Circuitos termossensíveis detectam diferenças de temperatura entre as duas celas e a câmara. Resistências elétricas localizadas entre ambas as celas e entre as celas e a

câmara são ativadas, quando necessário, para manter as temperaturas idênticas em todos os componentes (**Figura 1.26**). Durante a injeção da amostra, que ocorre a partir de uma seringa colocada dentro da cela, pode haver liberação de calor (reação exotérmica), ou consumo de calor (reação endotérmica). O calor absorvido ou liberado durante uma titulação calorimétrica é proporcional à fração ligada de ligante. Para nossos experimentos, a amostra contendo 20  $\mu\text{M}$  de HCV124 foi colocada na cela de amostra, enquanto a cela de referência continha somente água. Antes da injeção dos ácidos nucleicos, a amostra foi aquecida até a temperatura de 37°C, na qual foi realizado o experimento.



**Figura 1.26: Representação esquemática da compensação de potência no calorímetro de titulação isotérmica** (Extraído de HOLDGATE e WARD, 2005).

A partir desta técnica, podemos determinar diretamente a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) (**Figura 1.27**). Esta variação está relacionada à quantidade de calor absorvido ou liberado à pressão constante e ao trabalho realizado através do termo  $P\Delta V$ , onde  $P$  representa a pressão e  $\Delta V$ , a variação do volume:

$$\Delta H = \Delta U + P\Delta V \quad \text{Eq. (1.4)}$$

onde  $\Delta U$  é a mudança da energia interna do sistema.

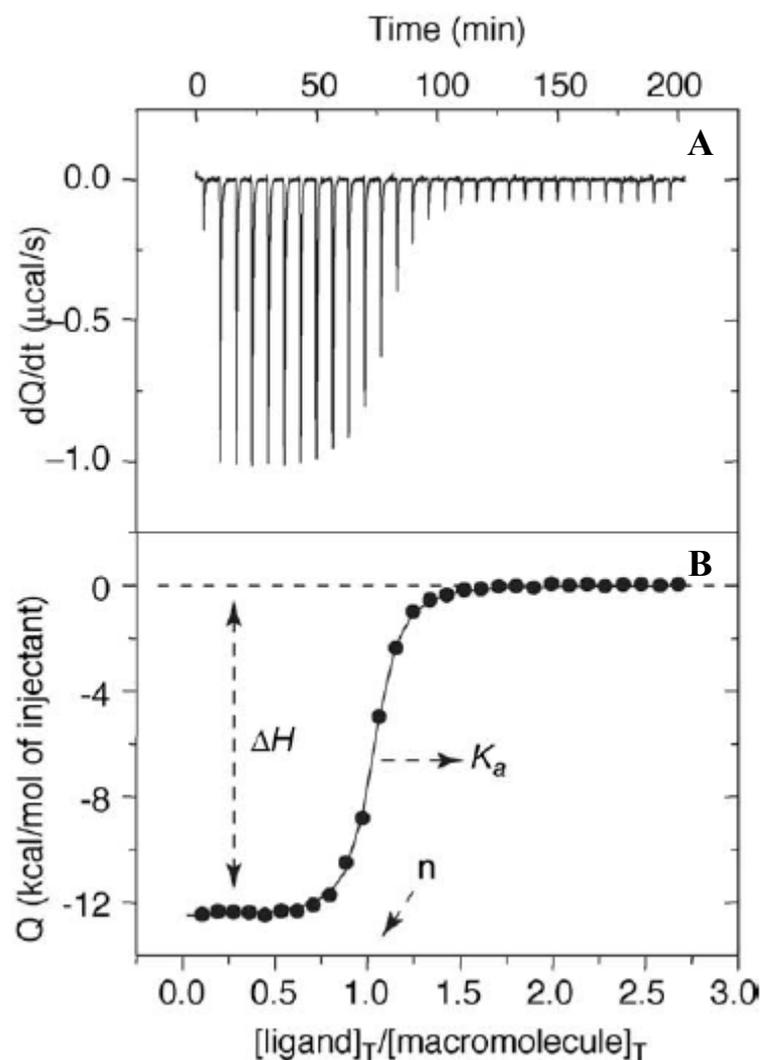
A partir de um experimento de ITC, podemos também extrair a estequiometria (N) e a constante de associação ( $K_a$ ) (**Figura 1.27**). A variação de entalpia não é um indicador da espontaneidade da reação. A correlação da variação da entalpia ( $\Delta H$ ) com a variação de entropia ( $\Delta S$ ), que fornece uma ideia do grau de organização de um sistema, nos permite verificar, a partir da variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), se o processo é espontâneo ou não.

Podemos obter a variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) a partir da constante de associação, como verificado na equação 1.5:

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad \text{Eq. (1.5)}$$

A variação de entropia do sistema pode ser obtida a partir da relação entre a variação de entalpia e a variação de energia livre de Gibbs, como podemos observar na equação 1.6:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Eq. (1.6)}$$



**Figura 1.27: Experimento representativo da interação de um ligante a uma proteína.** Perfil calorimétrico (A) e curva de titulação (B), indicando o que define a estequiometria ( $n$ ), a afinidade ( $K_a$ ) e a entalpia ( $\Delta H$ ), que é medida diretamente (Extraído de FREIRE, 2004).

Além disso, podemos verificar a variação da capacidade calorífica ( $\Delta C_p$ ) a partir da variação da entalpia em diferentes temperaturas (Eq. 1.7). O  $\Delta C_p$  para a ligação com o peptídeo AVPI foi obtido assumindo a dependência linear de  $\Delta H$  sobre a temperatura e, pode nos fornecer informações sobre o tipo de ligação, como por exemplo, se a ligação é predominantemente hidrofóbica.

$$\Delta C_p = \Delta \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad \text{Eq. (1.7)}$$

Para verificar a variação de entalpia relacionada à montagem de partículas semelhantes ao capsídeo viral, a concentração da proteína capsídica do HCV foi de 10  $\mu\text{M}$ , em tampão Fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. Os experimentos acompanhando a variação de entalpia na formação de partículas semelhantes a capsídeos foram realizados colocando HCV124 20  $\mu\text{M}$  na cela e titulando com uma solução de DNA a 100  $\mu\text{M}$ . A titulação de HCV124 com DNA ou RNA envolveu 12 injeções, 1 de 1  $\mu\text{L}$  e 11 de 3  $\mu\text{L}$ . O experimento foi realizado em tampão Fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 a 37°C.

## 1.4. Resultados Parte 1

### 1.4.1. Apresentação do Manuscrito 1 (Anexo 1)

Nesta seção está apresentado e discutido o artigo intitulado “*The structure-function relationship for truncated core protein of the Hepatitis C Virus*”, a ser submetido à publicação.

A região N-terminal da proteína capsídica do HCV é descrita como uma proteína intrinsecamente desestruturada. Além do seu papel estrutural, essa proteína é responsável por vários processos virais e celulares, desempenhando um papel crítico na patogênese do HCV, porém os mecanismos não são bem compreendidos.

Neste manuscrito descrevemos características relacionadas à relação estrutura-função da proteína capsídica do HCV truncada (HCV124) e correlacionamos aspectos termodinâmicos. Nós mostramos que a proteína capsídica truncada e monomérica pode adotar estruturas intermediárias em diferentes condições, tais como na presença da sonda bis-8-anilinaftaleno-1-sulfonato (bis-ANS), trifluoretanol (TFE), dodecil sulfato de sódio (SDS) ou altas concentrações de sal. Estes ligantes ou condições físico-químicas podem mimetizar os ambientes fisiológicos onde a proteína capsídica do HCV pode ser capaz de se ligar a diferentes alvos e desempenhar diferentes funções.

Por outro lado, quando submetemos a proteína capsídica do HCV a pHs próximos ao ponto isoelétrico (pH 12), nós verificamos a formação de partículas semelhantes a nucleocapsídeos (NLPs) na ausência de ácidos nucléicos. Este resultado mostra, pela primeira vez, que a neutralização de resíduos básicos é o principal fator que dirige o processo de multimerização em solução. Isto indica que termodinamicamente o excesso de carga positiva da HCV124 representa uma barreira energética crucial para o processo de multimerização. Este resultado também explica a baixa especificidade de ácidos nucléicos

requerida para a montagem em solução. Nós também mostramos que a montagem de NLPs desencadeada por ácidos nucleicos é entalpicamente dirigida, provavelmente devido ao calor liberado predominantemente pelas interações eletrostáticas entre os ácidos nucleicos e os resíduos básicos da proteína.

Baseado em nossos dados, a proteína capsídica truncada do HCV, uma proteína intrinsecamente desestruturada, pode adotar uma estrutura intermediária ou montar NLPs dependendo da condição ou ligante. Estes resultados revelam a base estrutural e termodinâmica das diferentes funções da proteína capsídica na patogênese do HCV.

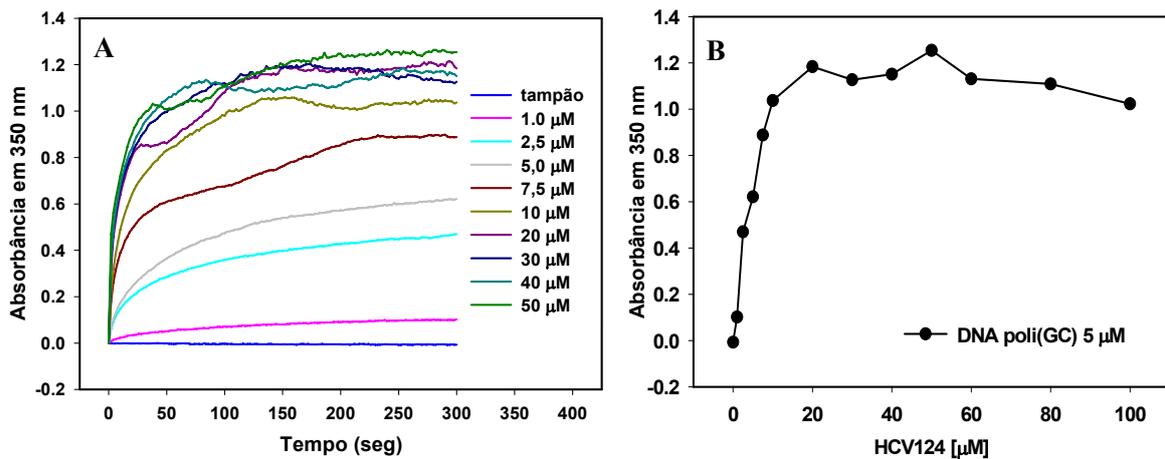
#### **1.4.2. Análise da formação em solução de partículas semelhantes a capsídeos do HCV**

Nesta parte do trabalho, tivemos como objetivo investigar características relacionadas à montagem do capsídeo do Vírus da Hepatite C em solução, no intuito de fornecer mais informações sobre este processo ainda pouco entendido. Apesar do HCV ser um vírus envelopado, sendo sua montagem associada à membrana do retículo endoplasmático, devido à dificuldade de estudar tais partículas e as adicionais informações que podem ser obtidas em solução, os estudos com a proteína purificada se tornam de grande importância para a compreensão do processo de replicação viral. Além disso, são encontradas no soro de pacientes partículas não envelopadas, tornando os estudos em solução mais miméticos do processo celular.

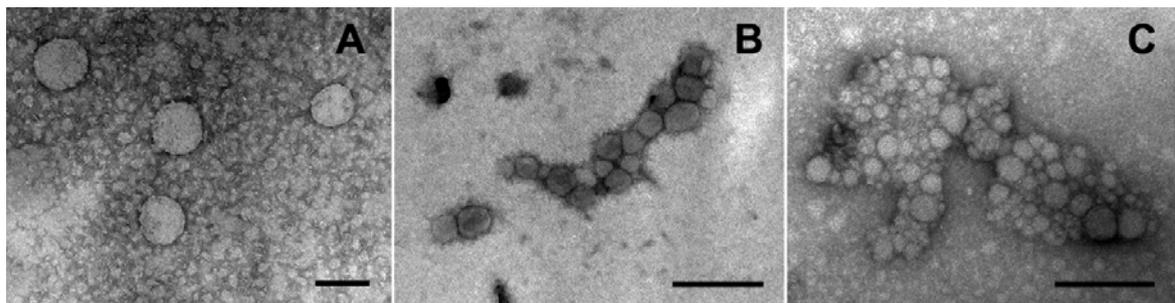
Em 2007, Fromentim e colaboradores, trabalhando com a proteína capsídica de 120 aminoácidos do HCV purificada, criou um método para a análise da cinética de formação de capsídeos virais por espectrofotometria, o qual se baseia na correlação da absorbância em 350 nm com a formação de NLPs (Fromentin e cols., 2007). Em nossa tentativa de melhor compreendermos o processo de formação de NLPs em solução, inicialmente

realizamos ensaios similares com outras sequências de ácidos nucléicos inespecíficas e confirmamos a correlação de formação de capsídeos com absorção a 350 nm, por espectroscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão, o que validou também nossas condições para os estudos de montagem.

A primeira sequência de DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) utilizada foi uma sequência DNA poli(GC) (5'– AAA GGA CGC GCG GCG TTA –3'), a partir da qual houve a montagem de partículas semelhantes às partículas virais (NLPs), como verificado pelo aumento da absorbância a 350 nm (**Figura 1.28**) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (**Figura 1.29**). Por ambas as técnicas, a dependência de concentração de proteína foi evidenciada. Além disso, as partículas não se apresentavam eletrondensas no interior, como observado por MET, o que indica a presença do DNA encapsulado. A dependência de concentração deste DNA no processo de formação de partículas semelhantes ao capsídeo viral também foi observada (dados não mostrados). A partir desses dados, utilizamos outra sequência de DNA, o DNA consenso para p53 (5'– TTT CCT AGA CAT GCC TAA TTA –3'), e uma sequência de RNA fita simples, a fim de verificar o grau de especificidade da interação da proteína HCV124 com algumas das sequências utilizadas. Por se tratar de um vírus de RNA, utilizamos este RNA, o qual forma um grampo. Desta forma, somos capazes de investigar a influência da estrutura do ácido nucléico na montagem, além da importância das bases nitrogenadas. Por estes ensaios, os resultados foram similares, indicando que a montagem em solução não exige grande especificidade.



**Figura 1.28: Ensaio de montagem de partículas semelhantes ao capsídeo viral do HCV monitorado por espectrofotometria. A)** Em diferentes concentrações da proteína HCV124, foi adicionado 5 µM de DNA poli(GC) e acompanhada a absorbância em 350 nm. **B)** Absorbância máxima obtida versus concentração da proteína HCV124. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 e são representativos de três experimentos independentes.

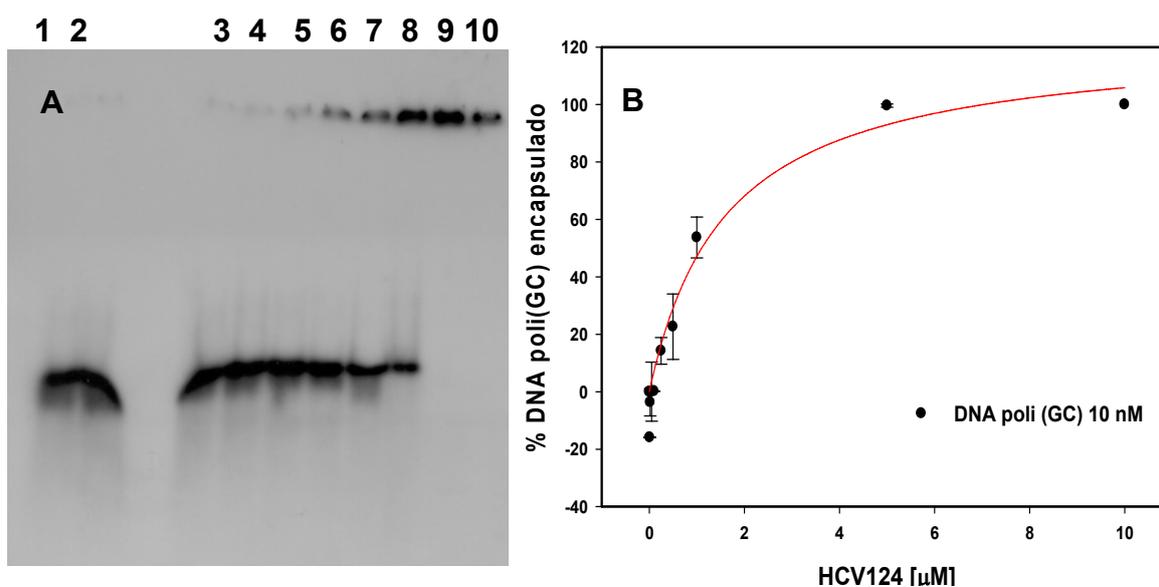


**Figura 1.29: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de partículas semelhantes ao capsídeo viral formadas a partir da proteína HCV124 em diferentes concentrações.** A proteína HCV124 ((A) 5, (B) 10 e (C) 50 µM) foi incubada na presença de DNA poli(GC) 5 µM. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, para posterior fixação em grades de carbono. As amostras foram contrastadas com acetato de uranila. A barra para (A) é de 100 nm e para (B) e (C) de 300 nm.

### 1.4.3. Interação proteína-ácido nucléico analisada por Ensaio de desvio de mobilidade eletroforética (EMSA ou *gel shift*)

O ensaio de desvio de mobilidade eletroforética ou *gel shift* foi utilizado com intuito de investigarmos em qual faixa de concentração há a interação entre a proteína

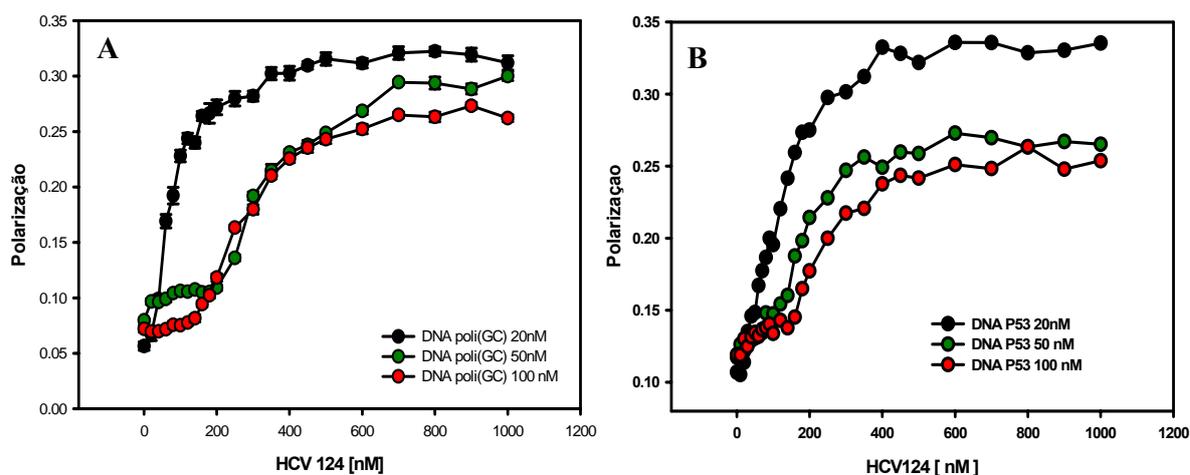
HCV124 e os ácidos nucléicos estudados e se existem intermediários no processo de montagem das NLPs. Nesses ensaios, o DNA poli(GC) marcado radioativamente com  $P^{32}$  foi incubado na presença de diferentes concentrações de proteína (**Figura 1.30**). Nossos resultados indicam que não existem intermediários estáveis em equilíbrio durante o processo de montagem das partículas de NLPs, pelo menos na faixa de concentração utilizada, pois não foi detectada nenhuma banda intermediária neste processo. Também identificamos por esta técnica uma concentração aproximada de proteína (5  $\mu\text{M}$ ) onde todo o DNA utilizado estivesse encapsulado (**Figuras 1.30A e 1.30B**).



**Figura 1.30: Interação da proteína capsídica do HCV com DNA poli(GC).** **A)** EMSA realizado com DNA poli(GC) marcado radiotivamente ( $P^{32}$ ) a 10 nM (coluna 1). As concentrações da proteína capsídica do HCV (colunas de 2-10) foram de 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente. As bandas inferiores correspondem ao DNA livre, enquanto as bandas superiores correspondem a partículas grandes, possivelmente as partículas semelhantes ao capsídeo. **B)** Porcentagem de DNA poli(GC) encapsulado em função da concentração de proteína. Estas porcentagens foram calculadas por densitometria utilizando o programa ImageJ. Não verificamos agregados nas imagens de microscopia.

#### **1.4.4. Análise das partículas semelhantes a capsídeo por polarização de fluorescência**

Outra forma de análise utilizada para investigar a formação de NLPs é através de polarização de fluorescência, na qual somos capazes de avaliar a alteração do giro da molécula de DNA promovida pela ligação da proteína HCV124. Com o aumento da concentração de proteína capsídica, houve uma diminuição no giro molecular de DNA poli(GC) e DNA p53 marcado com Alexa488, o que reflete o aumento nos valores de polarização. Existe uma diferença significativa para a curva de titulação do DNA poli(GC) a 20 nM com a HCV124, em relação às curvas do DNA a 50 nM ou 100 nM, mostrando que existe uma dependência de concentração no processo, como verificado por espectrofotometria. Além disso, a formação de um platô em torno de 200  $\mu$ M de HCV124 para concentrações de 50 nM e 100 nM de DNA poli(GC), mostra que existem duas transições e sugere que existem formas monoméricas da proteína ligadas ao DNA ou a formação de intermediários durante o processo de montagem, os quais não foram identificados nos experimentos de *gel shift* (**Figura 1.31**).

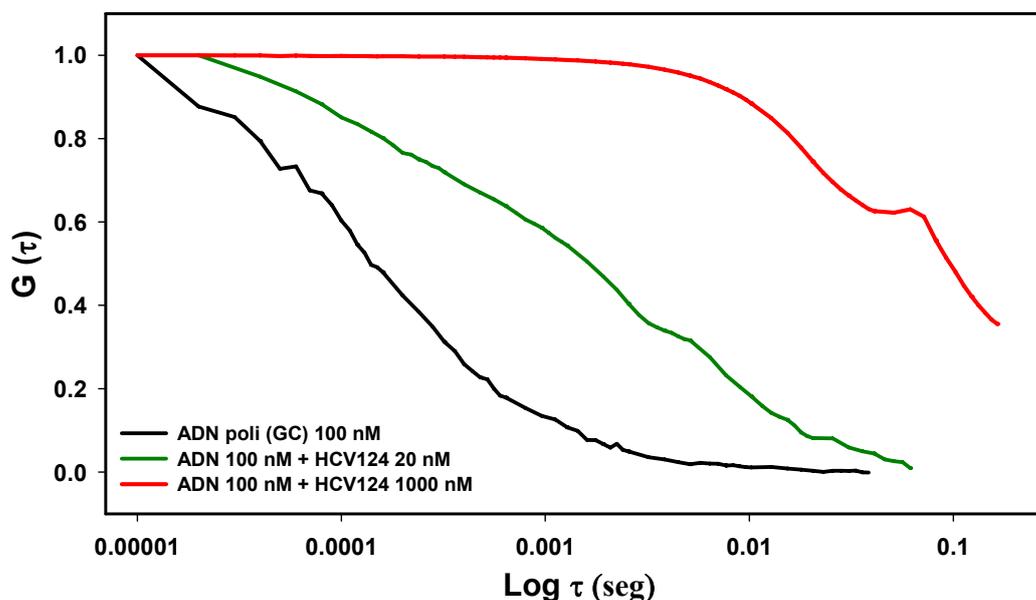


**Figura 1.31: Análise do empacotamento de DNA pela proteína HCV124 por polarização de fluorescência.** As concentrações de DNA e proteína estão indicadas no gráfico. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 e são representativos de três experimentos independentes.

#### 1.4.5. Análise da interação proteína-DNA por Espectroscopia de Correlação de Fluorescência

A técnica de espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) foi utilizada para auxiliar no entendimento do encapsulamento destes pequenos ácidos nucleicos pela proteína HCV124 em solução. A partir desta técnica, obtemos sinais provenientes de dois canais e os mesmos são correlacionados (auto-correlação). A auto-correlação é aferida em diferentes tempos, sendo que quando acontece em tempos grandes indica partículas grandes com difusão lenta, enquanto que a auto-correlação está restrita a tempos curtos, indicam moléculas pequenas livres com rápida difusão. Nossos dados mostram que ao aumentarmos a concentração de DNA poli(GC), há um aumento no tempo de difusão dessas partículas, como verificado pelo desvio da auto-correlação para tempos maiores, sugerindo que está ocorrendo a formação de partículas maiores, possivelmente partículas semelhantes ao nucleocapsídeo (**Figura 1.32**). Ao realizar as medidas com concentrações de proteína menores que DNA, verificamos uma difusão intermediária, indicando, assim

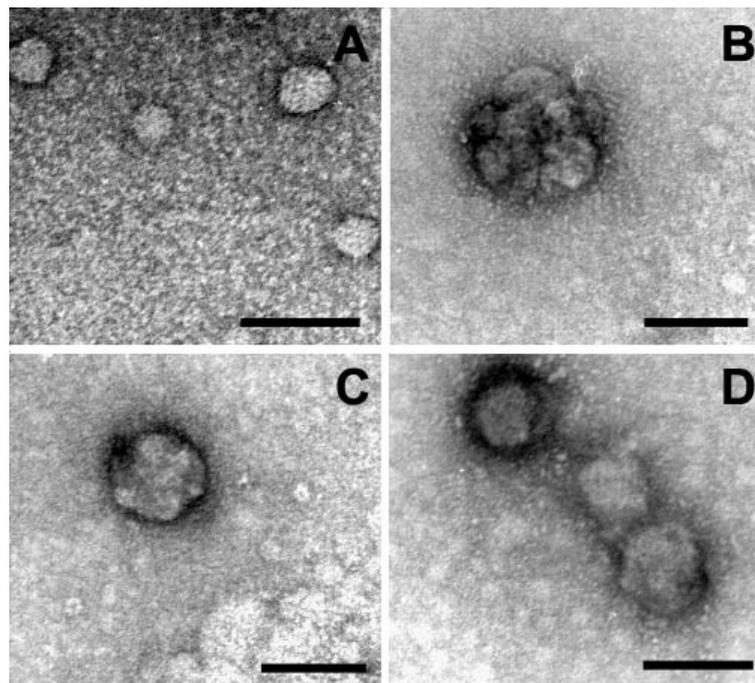
como as medidas de polarização, que possa existir nesta situação a presença de formas monoméricas da proteína ligadas ao DNA ou a formação de intermediários durante o processo de montagem (**Figura 1.32**). É importante notar que nossos dados que indicam formas monoméricas ligadas aos ácidos nucleicos ou intermediários nas situações onde a concentração de proteína é próxima ou menor que a concentração dos ácidos nucleicos.



**Figura 1.32: Análise da interação HCV124-DNA poli(GC) por Espectroscopia de Correlação de Fluorescência.** As concentrações de proteína ou de ácido nucleico estão indicadas no gráfico. O tampão utilizado foi fosfato 10 mM (pH 7,4) em NaCl 100 mM. As funções de auto-correlação são representativas de três medidas independentes.

Nossa próxima etapa, com o objetivo de ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos na montagem de partículas do HCV, foi expressar, purificar e caracterizar a proteína HCV124 fusionada à Proteína Fluorescente Verde (GFP), para verificar se a adição da GFP na região C-terminal da proteína manteria sua capacidade de montar NLPs, o que abriria novas perspectivas para estudos por microscopia de fluorescência e FCS dentro de células.

Para verificar então se a fusão com GFP não inibiria o processo de montagem, realizamos ensaios similares aos realizados anteriormente com a forma não fusionada. Primeiramente, incubamos a proteína na presença de DNA poli(GC) ou DNA p53 e observamos por microscopia eletrônica de transmissão (**Figura 1.33**). As micrografias destas amostras mostraram que a fusão com GFP não impediu a formação das NLPs (**Figura 1.33**). Interessantemente, nós também verificamos que a forma solúvel desta proteína fusionada montava partículas semelhantes ao nucleocapsídeo viral (**Figura 1.33A**). Provavelmente, a GFP que estericamente simularia a região C-terminal da proteína capsídica do HCV, favorece a montagem. Medidas de FCS corroboraram estes dados.

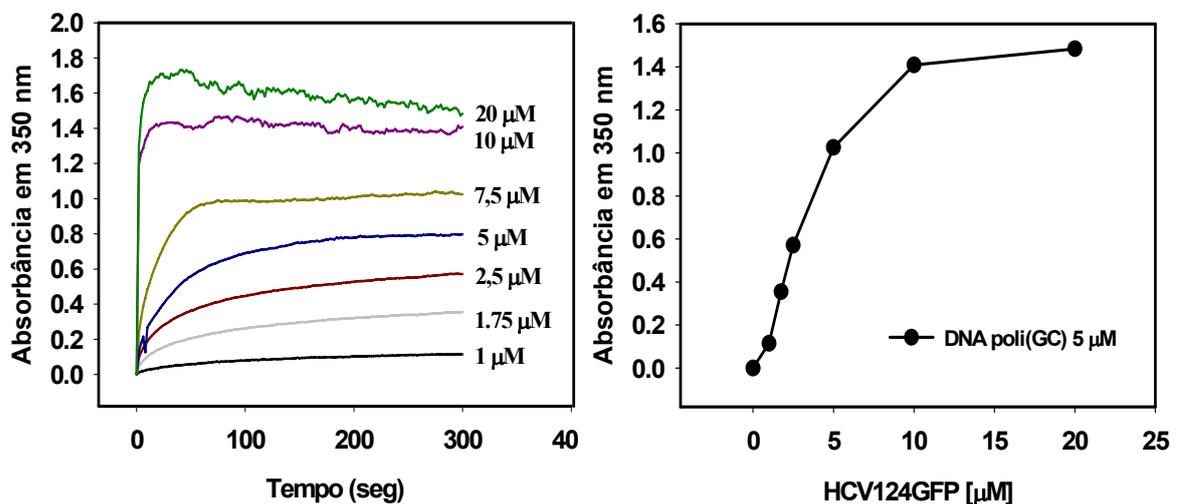


**Figura 1.33: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de partículas semelhantes ao capsídeo viral formadas a partir da proteína HCV124 fusionada à GFP (HCV124GFP) *in vitro*** – Partículas semelhantes às partículas virais formadas pela HCV124GFP na presença de DNA: **A)** HCV124GFP solúvel. **B)** HCV124GFP agregada. **C)** HCV124GFP + DNA p53 1  $\mu$ M; **D)** HCV124G + DNA poli(GC) 1  $\mu$ M. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, para posterior fixação em grades de níquel. As amostras foram contrastadas com acetato de uranila. Barras, 300 nm para A e B, e 100 nm para C e D.

### 1.4.6. Cinética de Formação das NLPs em solução

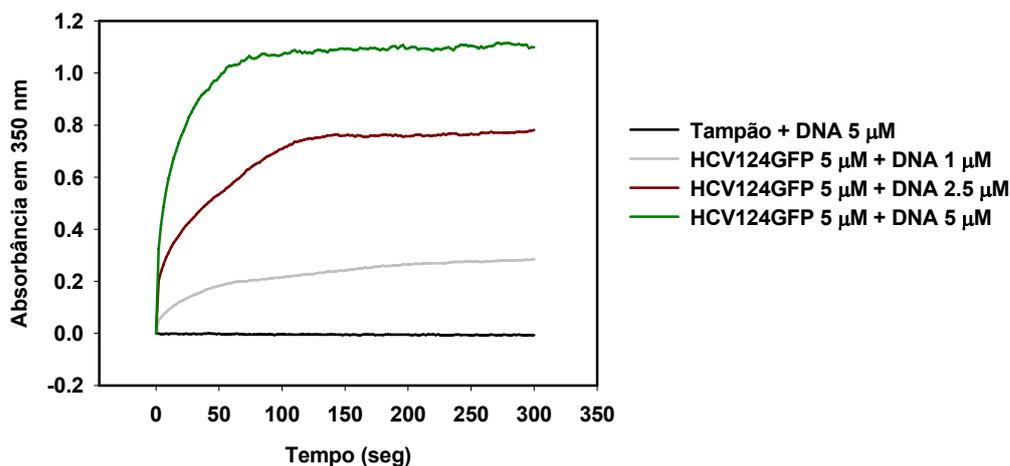
Inicialmente, de maneira similar para a forma não fusionada, realizamos medidas cinéticas da formação de NLPs com a finalidade de observarmos o tempo necessário para o equilíbrio da reação e se a formação de capsídeos é dependente da concentração de proteína ou de DNA. Para tanto, adicionamos concentrações crescentes de DNA poli(GC) a uma concentração específica de HCV124GFP. As medidas cinéticas foram realizadas por espectrofotometria a 350 nm por cinco minutos, com leituras realizadas com intervalos de dois segundos (Figura 1.34).

Através desses ensaios, demonstramos que além da montagem com ambas as sequências de DNA não ser inibida pela presença de GFP (dados com DNA p53 não mostrados), o perfil cinético de formação de capsídeo mostra a formação de NLPs de maneira similar ao da forma não fusionada, indicando que não há grandes alterações no processo (Figura 1.34).



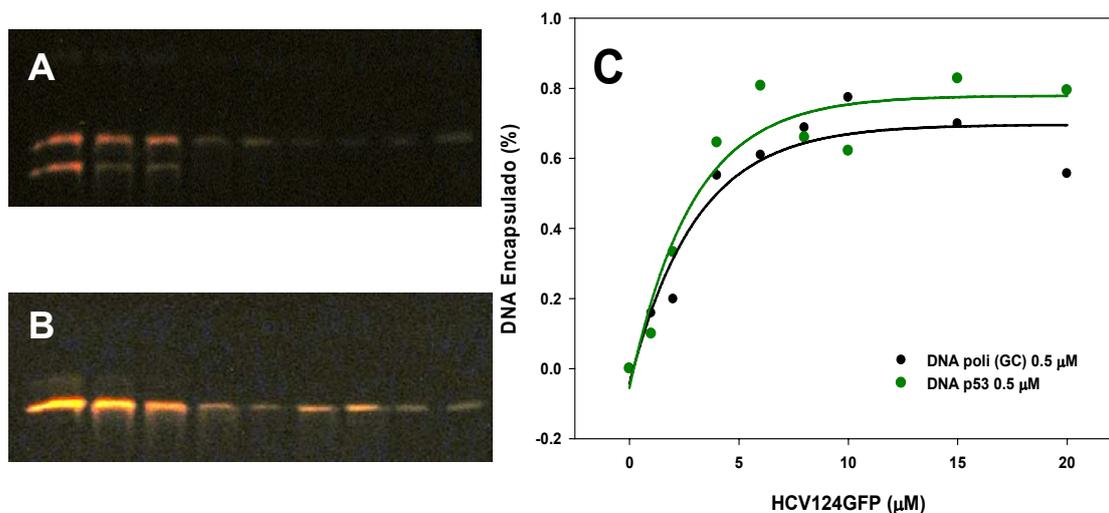
**Figura 1.34: Ensaio de montagem de partículas semelhantes a capsídeo viral a partir da proteína HCV124 fusionada a GFP monitorado por espectrofotometria.** A diferentes concentrações da proteína HCV124GFP, foram adicionados 5 µM de DNA poli(GC) e acompanhada a absorbância em 350 nm. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 e são representativos de três experimentos independentes.

Nós também observamos que houve dependência de concentração de DNA no processo de formação de partículas semelhantes ao capsídeo viral a partir da proteína HCV124 fusionada a GFP (**Figura 1.35**).



**Figura 1.35: Dependência de concentração de DNA verificada em ensaio de montagem de partículas semelhantes ao capsídeo viral a partir de HCV124GFP por espectrofotometria.** Em diferentes concentrações de DNA poli(GC) foram adicionados 50  $\mu$ M de proteína HCV124 e acompanhada a absorvância em 350 nm. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 e são representativos de três experimentos independentes.

Da forma similar à que analisamos a proteína HCV124, em seguida tentamos identificar possíveis intermediários de montagem a partir da proteína fusionada a GFP, utilizando a técnica de *gel shift*. Neste caso, DNA poli(GC) e DNA p53 marcados com a sonda fluorescente Alexa488N foram incubados na presença de diferentes concentrações de proteína (**Figura 1.36**). Os resultados indicam, novamente, que não existem intermediários de montagem, pois não foi detectada nenhuma banda intermediária do processo.



**Figura 1.36: Análises do empacotamento de DNA p53 e DNA poli(GC) pela proteína HCV124 fusionada a GFP por EMSA (*gel shift*).** EMSA realizado com DNA poli(GC) (A) ou DNA p53 (B) marcados com Alexa 488 a 0,5 μM (coluna 1). As concentrações da proteína capsídica do HCV (colunas de 2-10) foram de 1 μM, 2 μM, 4 μM, 6 μM, 8 μM, 10 μM, 15 μM e 20 μM, respectivamente. (C) Porcentagem de DNA poli(GC) e DNA p53 encapsulados. Estas porcentagens foram obtidas a partir de análises das bandas do EMSA por densitometria utilizando o programa ImageJ. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0.

Por fim, utilizamos FCS, e nossos dados mostram que a HCV124GFP livre já gerava uma função de auto-correlação para tempos maiores indicando a presença de partículas maiores, possivelmente partículas semelhantes ao nucleocapsídeo na ausência de ácidos nucleicos (dados não mostrados). Estes dados corroboram as imagens de microscopia eletrônica para a proteína solúvel.

## 1.5. Discussão

O ciclo replicativo do Vírus da Hepatite C tem sido considerado um grande alvo para intervenção farmacológica (PAWLOTSKY e cols., 2007). Já existem inúmeras informações sobre a replicação deste vírus (PAWLOTSKY e cols., 2007), mas a elucidação de todos os mecanismos ainda não se concretizou. O papel da Proteína Capsídica para a estrutura viral já é bem estabelecido, porém os mecanismos moleculares e termodinâmicos envolvidos no processo de montagem viral não estão elucidados, assim como existem inúmeras lacunas a respeito das características relacionadas a suas diferentes funções na patogênese do HCV.

### 1.5.1. Relação estrutura-função da Proteína Capsídica do HCV

Proteínas intrinsecamente desestruturadas (IUPs, do inglês *intrinsically unstructured proteins*) apresentam uma vantagem funcional considerável em relação a proteínas globulares rígidas (WRIGHT & DYSON, 1999; DYSON & WRIGHT, 2002). A baixa entropia conformacional (flexibilidade limitada) de proteínas globulares compactas limita sua interação a ligantes específicos, e normalmente apresentam funções específicas. Por outro lado, IUPs apresentam alta entropia conformacional (alta flexibilidade) permitindo-lhes interagir eficientemente com vários alvos diferentes, quando comparadas a uma proteína enovelada com flexibilidade conformacional limitada (WRIGHT & DYSON, 1999; DYSON & WRIGHT, 2002). Para melhor compreendermos por qual razão algumas proteínas enovelam-se em estruturas compactas, enquanto outras continuam desestruturadas em condições fisiológicas, estudos envolvendo proteínas intrinsecamente desestruturadas em diversas condições têm sido cruciais. Talvez uma das características mais interessantes de proteínas desestruturadas é a sua funcionalidade. Em geral, uma

função envolve a ligação a um ligante, tais como outras proteínas, ácidos nucléicos e membranas e, normalmente, a essa interação está associada a indução de alguma estruturação da estrutura anteriormente desordenada. A falta do C-terminal da proteína capsídica do HCV a leva para uma forma desestruturada (KUNKEL & WATOWICH, 2004). O entendimento da termodinâmica da relação estrutura-função desta proteína, que participa do ciclo de replicação viral e patogênese HCV, é de grande importância.

Para investigarmos a relação estrutura-função da proteína capsídica do HCV, nós a submetemos à presença de diferentes ligantes e a diferentes condições, os quais poderiam mimetizar ambientes celulares, e acompanhamos mudanças estruturais principalmente por medidas espectroscópicas e microscopia eletrônica de transmissão. Dentre as condições utilizadas, selecionamos solventes que frequentemente têm influência na cinética de enovelamento de proteínas e peptídeos (BODKIN & GOODFELLOW, 1996; LU e cols., 1997; HAMADA e cols., 2000). A ação de álcoois resulta de diferentes propriedades, tais como: polaridade do solvente, da constante dielétrica, do comprimento da cadeia de hidratos de carbono, o número de grupos OH, grau de halogenação. No caso de alguns álcoois utilizados com frequência, a ordem de efetividade é TFE isopropanol > etanol > metanol (HIROTA e cols., 1997). Em nosso trabalho, por adição de concentrações crescentes de álcool verificamos a alteração da estrutura secundária da HCV124, e estas alterações foram monitoradas por dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência. Nossos dados mostram que as mudanças na estrutura secundária promovidas pelo butanol e TFE são muito semelhantes (**Figura 1, Anexo 1**). O efeito do TFE sobre a estabilidade de três diferentes peptídeos foi recentemente investigado por meio de simulações (ROCCATANO e cols., 2002). Os dados mostram que, em uma mistura TFE/água, o solvente orgânico se une em torno do peptídeo, formando uma matriz que exclui parcialmente a água. Esta matriz, por sua vez promove a formação de interações locais e,

como consequência, favorece a formação e estabilização da estrutura secundária. Juntos, estes fatores favorecem a formação de ligações de hidrogênio intrapeptídeo.

A sonda bis-ANS se liga covalentemente a segmentos apolares em proteínas, especialmente na proximidade de cargas positivas (ROSEN & WEBER, 1969). A ligação da sonda bis-ANS à HCV124 indica a presença de regiões hidrofóbicas estruturadas na proteína. Proteínas que consistem de regiões desestruturadas intercaladas com pequenas regiões estruturadas são normalmente proteínas intrinsecamente desestruturadas. Estas regiões estruturadas são conhecidas por serem importantes para a ligação específica em alguns casos (FUXREITER e cols., 2004; OLDFIEL e cols., 2005; MOHAN e cols., 2006). A possível presença de distintas regiões estruturadas da HCV124 também pode estar correlacionada a sua capacidade de se ligar a vários alvos. Além disso, o bis-ANS foi capaz de induzir um leve aumento da estrutura secundária da proteína, provavelmente através da neutralização da carga positiva.

Dodecil sulfato de sódio (SDS) tem sido usado para induzir a estrutura ordenada em certos peptídeos ou proteínas intrinsecamente desestruturadas (PARKER & SONG, 1992), pois mimetiza ligantes ou membranas em ambientes celulares. Aqui, nós mostramos que ambos monômeros ou micelas de SDS podem interagir com a HCV124 e induzir mudanças na região dos resíduos de triptofano e na estrutura secundária, o que pode ser verificado pelo desvio para o azul no espectro de fluorescência e pelo aumento da elipticidade negativa em torno de 220 nm nos espectros de CD (**Figura 2, Anexo 2**). Além das interações hidrofóbicas, os monômeros de SDS podem ligar à HCV124 através de interações eletrostáticas entre sua carga negativa e as cargas positivas de alguns aminoácidos da proteína. Essas interações podem diminuir a repulsão entre os resíduos positivos na estrutura da proteína, favorecendo o enovelamento local. A interação da HCV124 com micelas de SDS provavelmente ocorre pela penetração de porções

hidrofóbicas, tais como resíduos de triptofano, no interior das micelas, o que pode também favorecer o enovelamento local. Por outro lado, essas interações hidrofóbicas provavelmente impedem contatos intermonômeros necessários para o processo de montagem.

Estudos recentes, por meio de microscopia eletrônica (ME) e espectrofotometria, têm mostrado que o aumento da turbidez após a adição de ácidos nucleicos está ligado à formação de NLPs (FROMENTIN e cols., 2007), assim como realizamos neste trabalho. Aqui, nós não fomos capazes de observar um aumento na turbidez ou aumento da dispersão de luz na presença de bis-ANS, SDS e álcoois, sugerindo que, nestes casos, existe um enovelamento local da forma monomérica da HCV124 ou de intermediários do processo de montagem.

A região N-terminal tem sido identificada como a responsável pela montagem do capsídeo viral, enquanto a região C-terminal parece estar envolvida com a localização da proteína dentro da célula, já que é capaz de interagir com membranas (KUNKEL e cols., 2001; LORENZO e cols., 2001). Além disso, Klein e colaboradores identificaram 68 aminoácidos necessários para a montagem do capsídeo, utilizando um sistema livre de células (KLEIN e cols., 2004; 2005). Esta região N-terminal da proteína contém numerosos resíduos básicos, organizados em dois grupos. A deleção de qualquer um destes grupos diminui significativamente a montagem viral (KLEIN e cols., 2005). Contudo, regiões neutras da proteína não parecem ser essenciais para a montagem do capsídeo, sugerindo que a carga global da região N-terminal da proteína capsídica é crítica para o processo de montagem.

Trabalhos recentes têm demonstrado que mudanças no pH podem induzir um parcial enovelamento de proteínas intrinsecamente desestruturadas devido à minimização de sua carga líquida presente em pH neutro, diminuindo assim a carga/repulsão

intramolecular e permitindo um colapso hidrofóbico orientado. Além disso, as cargas positivas sobre as subunidades da proteína provavelmente se repelem agindo contra a montagem de capsídeos (SILBER & PODGORNIK, 2007). Em nosso estudo, o aumento do pH próximo ao pI da HCV124 promoveu mudanças estruturais a nível quaternário e secundário da proteína, provavelmente pela diminuição da repulsão intramolecular. Os resíduos de triptofano tornaram-se menos exposto ao solvente como verificado por dados de fluorescência (**Figura 3C, Anexo 1**), indicando que eles estão envolvidos na montagem. Além disso, o aumento do espalhamento de luz em pH 12 sugeriu uma montagem macromolecular, tais como a formação de NLPs vazias ou agregados (**Figura 3D, Anexo 1**). A formação de NLPs vazias foi confirmada por microscopia eletrônica (**Figura 4C, 4D e 4E, Anexo 1**). Interessantemente, as medidas espectrofotométricas de montagem de NLPs desencadeada pela incubação da HCV124 em pH 12 (**Figura 4A e 4B, Anexo 1**) são semelhantes às provocadas por ácidos nucleicos (**Figura 5 e 6, Anexo 1**). Assim, nossos dados indicam que a perda de carga positiva ou neutralização de resíduos básicos da proteína capsídica do HCV é o principal fator que impulsiona a formação de NLPs em solução e em baixas concentrações. Um trabalho recente mostrou que a proteína capsídica truncada é capaz de montar partículas semelhantes ao capsídeo viral em solução na ausência de ácidos nucleicos estruturados, apenas em concentrações muito elevadas, no entanto os mecanismos não são bem compreendidos (ACOSTA-RIVERO e cols., 2005). O mesmo grupo mostrou que as regiões desestruturadas formam pequenas folhas- $\beta$ , e que estas podem atuar como ligantes de monômeros na proteína (RODRIGUES-CASADO e cols., 2006). Portanto, a neutralização de resíduos básicos favorece os contatos entre as formas monoméricas da proteína no processo de montagem. Termodinamicamente o excesso de cargas positivas da HCV124 representa uma importante barreira energética para o processo de multimerização da proteína em NLPs (**Figura 8, Anexo 1**). Desta forma,

tendo em vista o mecanismo de montagem viral, *in vivo* o RNA viral parece nuclear e diminuir esta barreira energética, facilitando seu empacotamento.

Anteriormente, Kunkel e colaboradores relataram que duas variantes da proteína com 124 e 179 aminoácidos obtidas a partir de células de *E. coli* recombinantes, montam NLPs *in vitro*, porém para isso exige moléculas estruturadas de RNA (variação de 0,1-10  $\mu$ M) (KUNKEL e cols., 2001). Atualmente, como mostrado em nossos dados também, já está bem caracterizado que a montagem de NLPs do HCV pode ser promovida por ácidos nucleicos inespecíficos. Aqui, nós mostramos que a multimerização da proteína capsídica é impulsionada pela neutralização de resíduos básicos, a qual pode ser promovida principalmente por interações eletrostáticas com os ácidos nucleicos (**Figura 5 e 6, Anexo 1**) ou por desprotonação de resíduos básicos (**Figura 4, Anexo 1**), desencadeada por pHs mais altos. Esta característica também explica a baixa especificidade para o empacotamento de ácidos nucleicos em solução. Assim, nossos dados sugerem que o processo de montagem *in vivo* não exige uma grande especificidade para o RNA viral e sugere que seja possível a proteína capsídica do HCV interagir com RNAs mensageiros celulares e montar partículas transientes. Esta característica pode estar relacionada com sua capacidade de alterar algumas funções celulares e, conseqüentemente, a patogênese do HCV.

Por outro lado, também verificamos que as partículas formadas pela interação inespecífica com ácidos nucleicos desmontam após eluição em uma coluna de filtração em gel (dados não mostrados). Estes dados indicam que a proteína capsídica e as NLPs formadas estão em equilíbrio termodinâmico em solução. Além disso, observamos também que algumas horas após a formação das partículas, as mesmas naturalmente se desmontavam (dados não mostrados). Estes resultados mostraram que as partículas são instáveis e que são provavelmente geradas por interações transitórias. Estruturas de

membrana geralmente são importantes para manter a integridade da estrutura do capsídeo em ambientes hidrofílico (MAJEAU e cols., 2004). Desta forma, nossos dados indicam que a região C-terminal da proteína, através da inserção na membrana, tem uma importância crucial para a estabilização das partículas nativas em solução.

Aspectos energéticos relacionados à montagem do capsídeo também são importantes para a compreensão do processo biológico. Por exemplo, a montagem dos capsídeos do Vírus da Hepatite B é impulsionada por interações proteína-proteína fracas e é caracterizada por uma variação de entalpia e entropia positiva (CERES & ZLOTNICK, 2004). Assim, neste caso, a reação é dirigida pela entropia, o que é caracterizado por grandes contatos hidrofóbicos. Diferentemente, a ligação das proteínas intrinsecamente desestruturadas, as quais são geralmente altamente hidrofílicas, envolve um custo entrópico associado com a transição desordem-ordem (DYSON & WRIGHT, 2005). Aqui, verificamos que a força motriz termodinâmica chave para o processo de montagem de NLPs a partir da HCV124 é a contribuição favorável de entalpia (**Figura 7, Anexo 1**), a qual provavelmente é maior do que o custo entrópico, dando um bom exemplo de compensação entalpia-entropia associada ao processo de montagem em solução. O calor liberado no processo de montagem é provavelmente devido à neutralização de resíduos básicos por interações eletrostáticas entre a HCV124 e ácidos nucleicos.

Em conclusão, mostramos que a proteína capsídica truncada do HCV, uma proteína intrinsecamente desestruturada típica, pode adotar uma conformação intermediária na sua forma monomérica ou montar NLPs de uma maneira dependente de alguns ligantes ou condições. Algumas condições, tais como SDS e TFE, podem minimizar uma barreira energética, favorecendo a HCV124 assumir uma estrutura intermediária, enquanto outras condições, tais como a ligação de ácidos nucleicos e pH próximo de 12, podem promover a oligomerização em NLPs. Assim, propomos um modelo termodinâmico relacionado à

relação estrutura-função da proteína capsídica truncada do HCV que está representado na **Figura 8, Anexo 1**. Além disso, nossos dados mostraram que a montagem de NLPs em solução desencadeada por RNA ou DNA é impulsionada por fatores entálpicos, provavelmente devido à neutralização de resíduos básicos. Estas observações importantes auxiliam na compreensão da natureza física dos diferentes papéis de proteína capsídica do HCV na patogênese deste vírus. Além disso, a descrição dessas características peculiares pode levar a novas abordagens no planejamento de fármacos que poderiam aumentar a eficiência do tratamento contra a Hepatite C.

### **1.5.2. Análise da formação de partículas semelhantes a capsídeos do Vírus da Hepatite C**

Um modelo ideal para a montagem do capsídeo viral ainda não existe, no entanto algumas características, tais como algumas proteínas e alguns fatores celulares envolvidos no processo, bem como a importância de regiões específicas ou de aminoácidos isolados, têm sido reveladas. Apesar de estudos no ambiente celular se aproximarem do real, estudos em solução com proteínas purificadas nos permitem investigar fatores individuais que dificilmente seriam conseguidos em células ou *in vivo*, tais como a cooperatividade estrutural de montagem, a influência da carga global, assim como características relacionadas à estrutura-função da proteína capsídica, visto que se trata de uma proteína intrinsecamente desestruturada. Nossos dados sobre a montagem de NLPs em solução a partir da proteína capsídica do HCV truncada sugerem cooperatividade estrutural na montagem e mostram que a fusão da GFP não impede a formação da NLPs, permitindo estudos futuros em ambiente celular.

### ***A proteína capsídica truncada do HCV (HCV124) liga e encapsula DNA inespecificamente in vitro***

Muitos vírus provavelmente encapsulariam RNA celular não específico se o RNA genômico viral não estivesse presente ou em altas concentrações. Além disso, muitos vírus usam o RNA como uma base para a montagem, e/ou para nuclear o processo de montagem do capsídeo. A proteína do HCV parece agir de forma similar. Seu N-terminal é extremamente hidrofílico, devido à presença de muitos resíduos básicos agrupados em certas regiões. A proteína capsídica se liga ao RNA viral (FAN e cols., 1999; Shimoike e cols., 1999) e esta associação é dependente dos resíduos básicos presentes na região N-terminal. Consistente com esta observação, e suportando a ideia de que o RNA age como um núcleo para a montagem, o RNA foi requerido para a montagem do capsídeo “*in vitro*” (KUNKEL e cols., 2001). Posteriormente, foi verificado que, em altas concentrações, a proteína capsídica truncada (HCV124) na ausência de ácidos nucleicos já é capaz se multimerizar organizadamente para formar NLPs (RODRÍGUEZ-CASADO e cols., 2006). Nós também fomos capazes de formar NLPs na ausência de DNA ou RNA, confirmando esses dados já publicados (dados não mostrados).

Enquanto a noção de que a proteína capsídica do HCV se liga ao RNA é bem estabelecida, ainda não é claro se a proteína capsídica liga preferencialmente ao RNA genômico do HCV em relação a RNAs celulares. Já foi descrito que esta proteína se liga ao RNA ribossomal (Santoline e cols., 1994), a RNAt (Kunkel e cols., 2001; Fromentin e cols., 2007), ao RNA genômico viral (Fan e cols., 1999; Kunkel e cols., 2001; Cristofari e cols., 2004) e a DNAs inespecíficos (Fromentin e cols., 2007). Desta forma, se a proteína capsídica se liga em muitos diferentes ácidos nucleicos, como o RNA genômico seria especificamente empacotado? Muitas proteínas capsídicas têm uma alta afinidade para estruturas específicas no seu RNA genômico, permitindo que liguem preferencialmente ao

RNA próprio. Além disso, o RNA viral pode ser encapsulado, preferencialmente, devido à sua alta concentração no compartimento de replicação viral. Não é claro se a proteína capsídica do HCV tem alta afinidade para o RNA genômico viral. Alguns trabalhos sugerem certo grau de especificidade pelo RNA viral (FAN e cols., 1999). No entanto, Santolini e colaboradores reportaram que a proteína capsídica do HCV se liga equivalentemente ao RNA viral e a RNAs heterólogos, sugerindo que esta proteína não tem uma grande especificidade (SANTOLINI E cols., 1994). Se a proteína capsídica do HCV não liga especificamente ao RNA viral, então alguns outros mecanismos devem existir para promover o empacotamento do genoma viral (KUNKEL e cols., 2001). Uma possibilidade, comentada por alguns trabalhos é que a montagem ocorre em microambientes que contêm uma simples forma de RNA, no caso o RNA genômico do HCV. Nossos dados corroboram a ideia de que a HCV124 engloba ácidos nucléicos inespecíficos, já que desencadeamos a formação de NLPs após a adição de DNA poli(GC), DNA p53 fita dupla (21 pares de bases) ou de um RNA inespecífico (18 pares de bases). Além disso, há uma nítida dependência de concentração de proteína e DNA, como verificado em concentrações micromolares por espectroscopia de fluorescência ou nanomolares por *gel shift* e medidas de polarização. Trabalhos publicados anteriormente corroboram nossos dados, já que mostram a dependência de concentração de DNA para o processo, porém somente em concentrações micromolares (FROMETIN e cols., 2007). Provavelmente a concentração do ácido nucléico e o seu tamanho são determinantes para o processo de montagem de NLPs.

### ***Cooperatividade do processo de montagem de NLPs do HCV***

O mecanismo de montagem do capsídeo viral do HCV ainda deixa várias lacunas, e ainda não foi caracterizado se existe possíveis intermediários de montagem. A proteína

capsídica truncada (HCV124) apresenta-se na forma monomérica. Já a proteína capsídica inteira tem sido identificada como um homodímero em solução (BOULANT e cols., 2005). Além disso, a proteína capsídica inteira em condições de montagem de NLPS tem sido identificada, em *Pichia Pastoris*, como dímeros, trímeros e multímeros (ACOSTA-RIVERO e cols., 2004). Em desacordo com estes dados, nossas análises de formação de NLPs por *gel shift* indicam que o processo é cooperativo, já que não identificamos bandas intermediárias, as quais seriam correspondentes a possíveis intermediários tanto para a forma truncada quanto para a forma fusionada à GFP. Talvez os intermediários possam ser formados através da interação entre as regiões C-terminal, sendo restritos à proteína capsídica inteira e à membrana do retículo endoplasmático. De modo geral, estes mecanismos ainda não são esclarecidos. O entendimento destes mecanismos envolvendo a HCV124 é bastante importante, já que existem capsídeos não envelopados em pacientes infectados pelo HCV (MAILLARD e cols., 2001), os quais provavelmente sejam montados no citoplasma. Para o vírus SV40 já tem sido verificado, de forma similar aos nossos resultados, que na montagem do vírus pela proteína capsídica VP1 existe grande cooperatividade (MUKHERJEE e cols., 2007). A partir da técnica de espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) e polarização de fluorescência, em concentrações menores de proteínas que de DNA, foi possível verificar outra espécie que pode ser o DNA ligado a proteína monomérica. Para HCV124GFP nossos ensaios espectrofotométricos e análises de *gel shift* mostram que o perfil de montagem de NLPs é mantido de forma similar à HCV124, indicando que a fusão de GFP não altera de forma significativa o processo.

Por fim, nossas análises indicam que a montagem em solução acontece de forma altamente cooperativa, já que não foram detectados intermediários estáveis em equilíbrio. A presença de intermediários poderia ser interessante já que poderiam ser alvos diretos de

fármacos para inibição da replicação viral por impedir a montagem, mas parece não ser o caso. No entanto, estes mecanismos podem ser mais profundamente estudados pela técnica de FCS dentro de células, ou seja, considerando os fatores celulares, a partir da proteína fusionada a GFP. Nós mostramos que a GFP não impede a formação de NLPs, validando a continuidade de nossos estudos em células por microscopia de fluorescência e FCS.

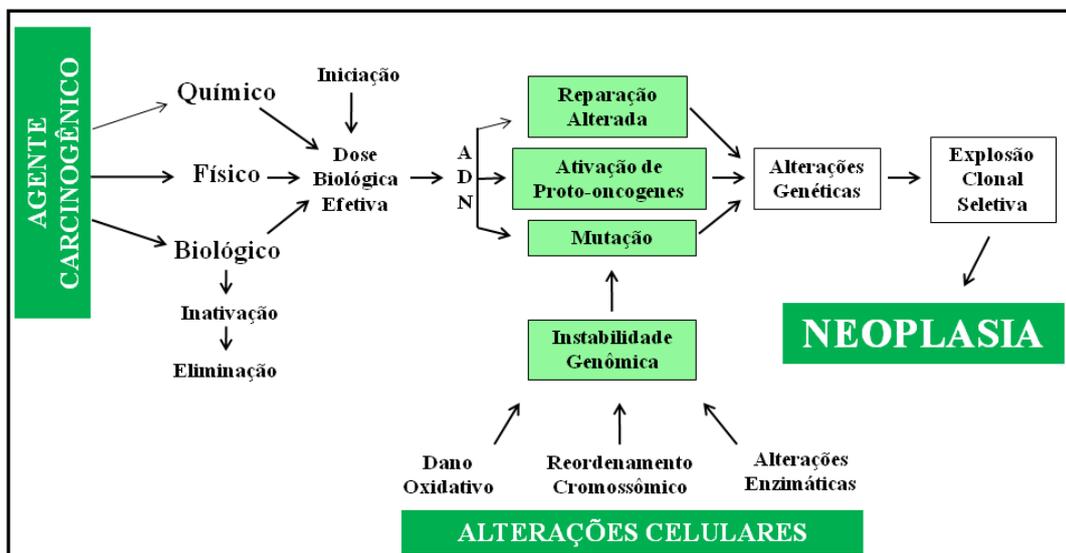
## 1.6. Conclusões

- ✓ Nós mostramos que a proteína capsídica truncada do HCV pode adotar uma estrutura intermediária em diferentes condições ou na presença de diferentes ligantes, os quais podem mimetizar ambientes fisiológicos na qual a HCV124 possa se ligar a diferentes alvos e exercer diferentes funções;
- ✓ A neutralização de resíduos básicos é o principal fator de dirige o processo de multimerização da HCV124 em solução visto que ao submetemos a pHs próximos ao seu ponto isoelétrico (pI 12) verificamos a formação de NLPs, na ausência de ácidos nucléicos;
- ✓ A forma da proteína capsídica fusionada a GFP foi capaz de formar capsídeo de forma similar a HCV124, mostrando que a montagem não é inibida pela GFP e indica que não existem grandes alterações, o que a valida para estudos em células.
- ✓ O processo de formação de capsídeos parece ser altamente cooperativa já que não foi possível a detecção de intermediários bem definidos nas medidas realizadas;
- ✓ A formação de NLPs pela adição de ácidos nucléicos foi entalpicamente dirigida, o que nos sugere uma grande importância de interações eletrostáticas neste processo.
- ✓ Assim, a HCV124 se mostrou capaz de adquirir um enovelamento local ou oligomerizar em NLPs dependentemente da condição ou do ligante. Nossa informação estrutural e análises termodinâmicas revelam características relacionadas a multiplicidade da função do HCV124 e explica a baixa especificidade de ácidos nucléicos para a montagem in vitro.

## 2. Parte 2

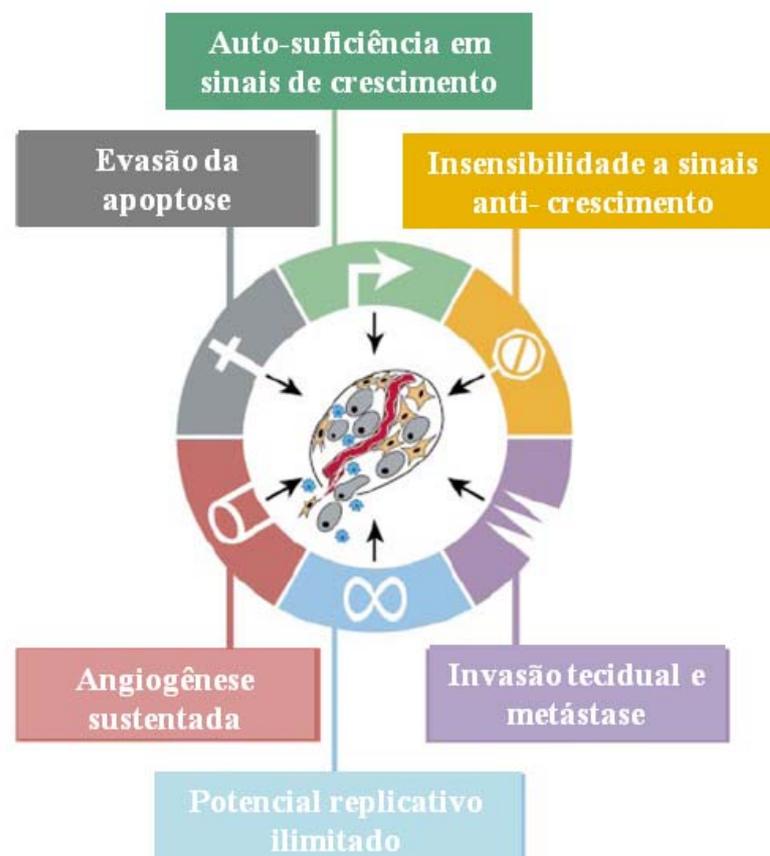
### 2.1. Introdução

O câncer é um processo multifatorial de transformação celular, que leva ao crescimento desregulado de uma célula. Existem inúmeros agentes cancerígenos, os quais podem ser químicos, físicos ou biológicos (**Figura 2.1**). Estes agentes, quando em doses biologicamente efetivas, podem diretamente afetar o DNA, desencadeando a ativação de proto-oncogenes, alterar sistemas de reparo, além de induzir mutações, que podem favorecer o desenvolvimento de neoplasia. Alterações celulares, tais como dano oxidativo, reordenamento cromossômico e alterações enzimáticas também podem gerar uma instabilidade genômica também favorecendo mutações, ativação de proto-oncogenes e a alteração nos sistemas de reparo (**Figura 2.1**) (INCA, 2002). Todas estas alterações adquiridas ao longo dos anos podem favorecer o processo de transformação celular característico de neoplasias.



**Figura 2.1:** As etapas da carcinogênese (Extraído de INCA, 2002, p. 58).

Em 2000, Hanahan e Weinberg descreveram as seis principais características ou alterações adquiridas neste processo de transformação celular. Estas características são: auto-suficiência de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de anti-crescimento, presença de mecanismos de evasão da morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e capacidade de invasão tecidual e metástase (**Figura 2.2**) (HANAHAN e WEINBERG, 2000).



**Figure 2.2: Capacidades adquiridas no câncer.** A maioria dos cânceres, se não todos, adquire as mesmas capacidades funcionais durante seu desenvolvimento, por diferentes mecanismos (Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2000).

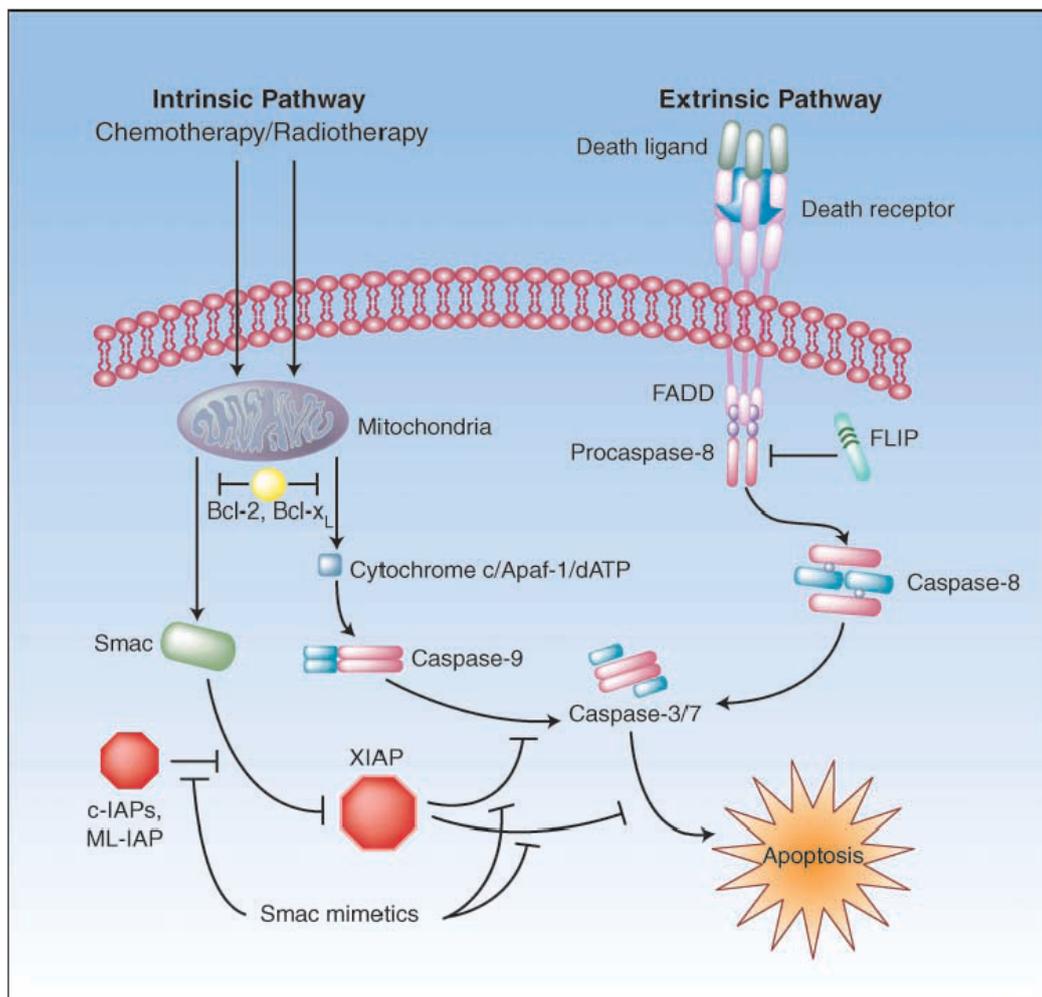
Estas alterações funcionais são adquiridas devido a mutações ou alterações cromossômicas que levam a uma alteração de expressão de proteínas-chave no desenvolvimento normal celular. Como exemplo, a superexpressão de receptores de fatores de crescimento, como é o caso da proteína Her2, faz com que a célula tenha sua auto-

suficiência de sinais de crescimento. Outro exemplo é a superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, como é o caso das Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs), que insensibilizam a célula à morte celular programada (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Neste trabalho, daremos uma atenção especial à apoptose, pois é o processo em que nossa proteína de estudo está envolvida.

### **2.1.1. Apoptose**

A morte celular é um processo fundamental da vida e, em organismos multicelulares, a mesma pode ser criticamente importante para a organização de células e tecidos do corpo (SPIERINGS e cols., 2005). Com o desenvolvimento acelerado da Biologia Molecular e de técnicas sensíveis ao estudo de eventos celulares, vários fenômenos, organelas, proteínas e suas funções ou interações estão sendo descobertos e melhor compreendidos. O acúmulo deste conhecimento tem nos permitido entender com mais detalhes o controle que mantém as células vivas, e através de quais mecanismos as células morrem. O processo de Apoptose possui um papel fundamental no desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares (STELLER, 1995; HORVITZ, 1999). A inibição da apoptose pode, por exemplo, levar ao desenvolvimento de tumores ou doenças auto-imunes, enquanto a morte celular excessiva está envolvida em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, além de outras como a osteoporose pós-menopausa (HUANG e cols., 2003). Já a multiplicação desordenada de células também pode ser um processo potencialmente perigoso, pois, neste caso, existe o favorecimento do desenvolvimento de câncer e a alteração do volume tecidual. Portanto, para a manutenção de uma homeostase celular e tecidual normal é necessário um perfeito balanço entre a divisão celular e a apoptose.

O processo de apoptose é dividido principalmente em uma via extrínseca, que ocorre por sinalização de receptores celulares de morte, e uma via intrínseca, que pode ocorrer a partir da mitocôndria (VUCIC e FAIRBROTHER, 2007) (**Figura 2.3**). O estresse do retículo endoplasmático representa outra via intrínseca de indução de apoptose, a qual está associada à liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no processo de ativação de caspases (RAJESH e cols., 2009).

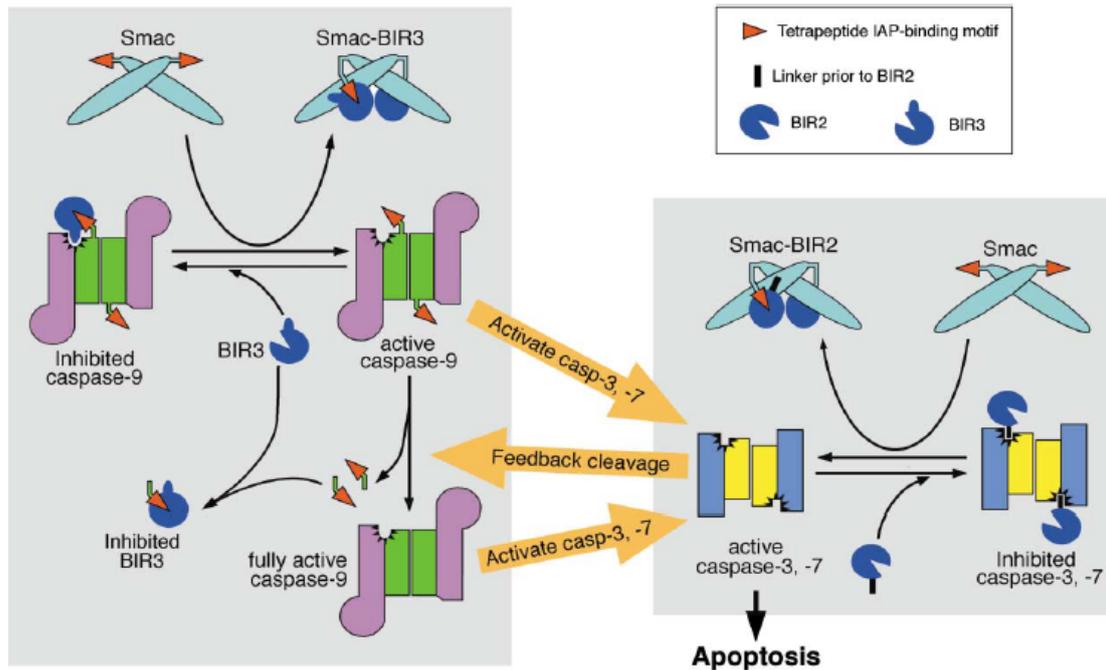


**Figura 2.3: Vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas.** A via de morte celular intrínseca é iniciada por estímulos, tais como a irradiação, tratamento com quimioterápicos, ou retirada de fatores de crescimento. A subsequente ativação de membros pró-apoptóticos somente BH3 da família Bcl-2 neutraliza as proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, levando à disfunção do potencial de membrana mitocondrial e à liberação de citocromo C e da proteína Smac/DIABLO da mitocôndria para o citoplasma. Este processo desencadeia a ativação de Apaf-1, levando à formação do apoptossomo seguido pelo recrutamento e ativação das caspases-9. A caspase-9 cliva e ativa as caspases efetoras 3 e 7 para desencadear a apoptose por clivar substratos celulares chaves. IAPs (ex: XIAP) inibem a ativação das caspases, e esta inibição pode ser revertida por IAPs antagonistas (por exemplo, Smac/DIABLO e Omi) liberadas da mitocôndria. A via extrínseca da apoptose é desencadeada quando receptores de morte, como Fas, DR5, ou receptor 1 de TNF são estimulados. A interação destes receptores com seus respectivos ligantes resulta no recrutamento da proteína adaptadora FADD e a caspase-8. Este processo leva à ativação da caspase-8 e subsequente ativação dos efetores caspase-3 e caspase-7. As IAPs representam a última linha de defesa contra morte celular, pois inibem as caspases-3, caspases-7 e caspases-9 (XIAP). Além disso, as mesmas previnem que fatores endógenos, tal como a Smac/DIABLO, antagonizem o bloqueio das caspases pela atividade inibitória na XIAP (ML-IAP, c-IAP1 e c-IAP2). Moléculas miméticas de Smac ligam-se às IAPs e abolem sua atividade inibitória por interromper as interações críticas entre IAP-caspase e IAP-Smac (Extraído de VUCIC e FAIRBROTHER, 2007).

A via extrínseca ocorre a partir da indução da expressão de uma proteína chamada Fas ligante (também chamada CD-95L) em linfócitos ativos predominantemente (HENGARTNER, 2000). A via intrínseca (via mitocondrial) inicia-se quando a membrana mitocondrial recebe o estímulo apoptótico, desencadeando a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP, “**M**itochondrial **O**uter **M**embrane **P**ermeabilization”), levando à liberação de proteínas intermembranares fundamentais (SPIERINGS e cols., 2005). Assim, a permeabilização da membrana externa da mitocôndria é o ponto chave desta via. Esta é mediada predominantemente pelos membros da família Bcl-2 (célula B de linfoma) pró-apoptótica, Bax e Bak, e inibida por membros da família Bcl-2 anti-apoptótica. As proteínas somente BH3 (“BH3-only proteins”), membros da família Bcl-2 que apresentam só o domínio BH3, regulam a MOMP por ativar Bax e Bak ou por antagonizar as proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas. MOMP permite que proteínas do espaço intermembranar tenham acesso ao citosol. Citocromo C, liberado da mitocôndria, liga-se e desencadeia a ativação de Apaf-1, levando à formação de um complexo chamado apoptossomo, que leva ao recrutamento e ativação da caspase-9. Caspase-9 cliva e ativa as caspases efetoras 3 e 7, responsáveis pelo processo apoptótico por clivar substratos-chave da célula. Já as Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs) são capazes de inibir a ativação das caspases, e esta inibição pode ser revertida por IAPs antagonistas (por exemplo, Smac/DIABLO e Omi) liberadas da mitocôndria após MOMP (LI & YUAN, 1999; HENGARTNER, 2000).

As caspases, principais executoras da apoptose, são cisteíno-proteases que estão em sua forma ativa em células apoptóticas (EARNSHAW e cols., 1999). As caspases são as principais executoras da apoptose e, desta forma, também são alvos em potencial para drogas que inibam o processo de apoptose e salvem as células deste caminho sem volta

para a morte. Uma vez ativadas, as caspases efetoras são responsáveis pela clivagem proteolítica de um grande número de substratos celulares, levando à morte celular. A ativação das caspases é um processo de fundamental importância no entendimento de como a apoptose acontece e de como é regulada (**Figura 2.4**). Todas as caspases são produzidas em células como zimogênios cataliticamente inativos e devem sofrer ativação proteolítica durante a apoptose. A ativação da caspase-9 ocorre após homodimerização induzida após a formação do apoptossomo. Então, nesta ativação não ocorre clivagem proteolítica, mas somente um rearranjo estrutural que resulta na exposição do sítio ativo. Além disso, a inibição da ativação da caspase-9 ocorre justamente pelo impedimento da homodimerização promovida pela ligação do domínio BIR3 das IAPs, proteínas inibidoras da apoptose (SHIOZAKI e cols., 2003). Já com relação à ativação da caspase-3, esta acontece a partir da ação da caspase-9 ativa que cliva a procaspase-3, levando à ativação por exposição de sítio ativo. A inibição da caspase-3 se deve à interação com o domínio BIR2 das IAPs, que bloqueia estericamente o sítio de ligação ao substrato (RIEDL e cols., 2001). Uma proteína chamada Smac/DIABLO é capaz de interagir com as IAPs, retirando sua função, permitindo assim a ativação de caspases.



**Figura 2.4: Diagrama esquemático dos mecanismos de ativação e inibição de caspases.** Do lado esquerdo, o motivo tetrapeptídico (setas vermelhas), que representa o N-terminal da Smac e a pequena subunidade da caspase-9, se liga sobre a superfície dos domínios de IAPs (XIAP, c-IAP-1, c-IAP2 e Livin/ML-IAP). Este motivo é responsável tanto pela inibição da caspase-9, através da ligação com BIR3, quanto pela retirada da inibição através da substituição do tetrapeptídico da caspase-9 pelo tetrapeptídico da Smac. A clivagem por “feedback” positivo por caspase-3 e 7 remove permanentemente a inibição de caspase-9 mediada por IAP. A liberação do peptídeo ligador da caspase-9 pode antagonizar a inibição mediada por IAP de outras caspases. Do lado direito, em contrapartida, o segmento ligador N-terminal do domínio BIR2 da XIAP é primariamente responsável pela inibição da caspase-3. A ligação da Smac ao domínio BIR2 pode deixar este segmento ligador indisponível pela ligação à caspase-3. Somente os domínios isolados são representados e não a IAP completa (Extraído de SHI, 2002).

Como o mecanismo de ativação e inibição das caspases já está bem caracterizado, é importante considerarmos as interações envolvidas e as competições pela ligação a sítios em comum existentes na apoptose, como é o caso dos tetrapeptídeos provenientes da Smac/DIABLO e da caspase-9, que ligam-se ao mesmo sítio do domínio BIR3 da IAP. Interessantemente, a caspase-9 tem a mesma região ligante de IAP que a Smac/DIABLO. A Smac/DIABLO apresenta o tetrapeptídico AVPI, enquanto a caspase-9 o tetrapeptídico ATPF, sendo os dois responsáveis pela competição por um sítio de ligação no domínio BIR3 da IAP (**Figura 2.4**) (SHI, 2002). A relação da quantidade de cada uma destas

moléculas e suas respectivas afinidades é que ditará o caminho a ser seguido pela célula, morte ou vida (**Figura 2.4**). Em casos de excesso de IAP, que contém o domínio BIR3, haveria uma inibição da caspase-9, pois a concentração de Smac/DIABLO existente seria insuficiente para inibir todas as IAPs, insensibilizando a célula à morte, o que é bem caracterizado em células cancerosas.

#### **2.1.1.1. Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs)**

As Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs, do inglês “Inhibitor Apoptosis Protein”) foram originalmente identificadas em baculovírus, onde proviam um mecanismo para aumentar a propagação viral através da inibição de apoptose defensiva por células hospedeiras de insetos (CROOK e cols., 1993; BIRNBAUM e cols., 1994). IAPs celulares foram subsequentemente descritas em insetos e em vertebrados (ROTHER e cols., 1995; LISTON e cols., 1996, UREN e cols., 1996; DUCKETT e cols., 1996).

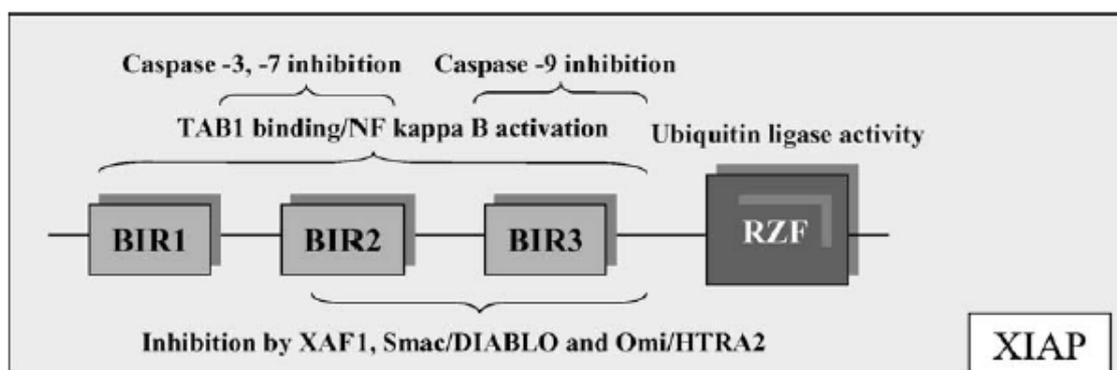
Estas proteínas inibidoras de apoptose são extremamente importantes na cascata apoptótica. Entre os membros da família IAP incluem-se seis proteínas: NAIP (“Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein”), IAP1 (“Inhibitor of apoptosis Protein-1”), IAP2 (“Inhibitor of apoptosis Protein-2”), XIAP (“X-linked inhibitor apoptosis”), Survivina e BRUCE (“BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme”) (LACASSE e cols., 1998; DEVERAUX e REED, 1999; VERHAGEN e cols., 2001). IAPs são caracterizadas pela presença de um ou mais domínios repetidos de IAP de baculovírus (BIR), que são uma região de 70 a 100 aminoácidos, conservada durante a evolução, caracterizada por ter atividade inibitória de caspases. As proteínas XIAP, IAP1 e IAP2 ligam-se às caspases 3, 7 e 9, inibindo-as (ROY e cols., 1997; DEVERAUX e cols., 1997; DEVERAUX e cols., 1998; GOFFREDO e cols., 2005).

As IAPs agem em um ponto entre a vida e a morte celular. A superexpressão de XIAP, IAP1 ou IAP2 inibe a apoptose em resposta a uma variedade de estímulos apoptóticos, incluindo fator de necrose tumoral, Fas e estaurosporina (DEVERAUX e REED, 1999). As IAPs podem também ser importantes em desordens neurodegenerativas, como por exemplo, a superexpressão de XIAP atenua a produção celular deficiente por uma injúria isquêmica em hipocampos de ratos (XU e cols., 1999) e bloqueia a morte neuronal dopaminérgica em um modelo de doença de Parkinson.

A expressão das proteínas inibidoras de apoptose tem sido investigada em várias linhagens celulares cancerosas humanas (TAMM e cols., 2000; NOTARBARTOLO e cols., 2004). A XIAP e a cIAP1 foram superexpressas na maioria das linhagens analisadas, com substancial variabilidade em seus níveis.

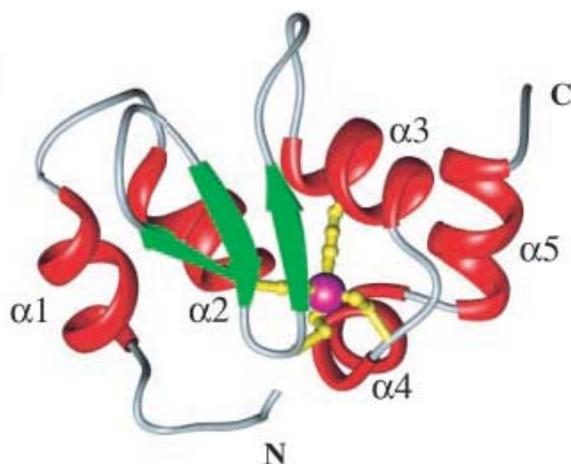
As proteínas inibidoras de apoptose suprimem o processo de apoptose por suprimir a ativação das procaspases e por inibir a ação enzimática das caspases maduras (SRINIVASULA e cols., 1998; YANG e cols., 1998; CHECINSKA e cols., 2003). Assim, a expressão destas proteínas deve ser muito bem controlada.

Dentre as IAPs, a XIAP é a proteína inibidora de apoptose mais potente, conhecida e caracterizada. Esta apresenta três domínios BIR e um domínio que se liga à ubiquitina (WRZESIEN-KUS e cols., 2004) (**Figura 2.5**). O BIR1 ainda não tem função conhecida. O domínio BIR2 (resíduos 124-240) é responsável pela inibição da ativação da caspase-3, além da inibição de sua atividade quando a mesma se encontra ativa. O domínio BIR3 (resíduos 238-358), proveniente da XIAP e foco deste estudo, é capaz de se ligar e levar à inibição da ativação da caspase-9 (LIU e cols., 2000). O domínio BIR3 apresenta 120 aminoácidos e uma massa molecular aproximada de 14 kDa. Este domínio por si só já é capaz de conferir a resistência à apoptose, por bloquear a via apoptótica em fase anterior à ativação das caspases efetoras.



**Figura 2.5:** Esquema da estrutura de um dos mais importantes membros da família IAP. Os domínios IAP de baculovírus 2 e 3 (BIR2 e BIR3) são responsáveis pela inibição das caspases-3, 7 e 9. BIR2 e BIR3 são alvos da inibição pela região ligadora de IAP Smac/DIABLO, HTAR2/Omi e XAF1. Ambos os domínios são envolvidos na ativação de NF-Kappa B. RZF mostra atividade ligase a ubiquitina. O papel do BIR1 não é ainda totalmente compreendido (Extraído de Wrzesien-kus e cols., 2004).

A estrutura do domínio XIAP-BIR3 (241-356), o qual é nosso objeto de estudo, consiste de 5  $\alpha$ -hélices, 3 fitas- $\beta$  e um átomo de zinco, o qual é coordenado pelos resíduos conservados Cis300, Cis303, Cis327 e His320 (**Figura 2.6**) (SUN e cols., 2000).



**Figura 2.6:** Estrutura do domínio XIAP-BIR3. Em vermelho estão representadas as  $\alpha$ -hélices do domínio BIR3 da XIAP, e as 3 fitas- $\beta$  estão representadas em verde. O átomo de zinco está representado em magenta e as cadeias laterais dos resíduos que quelam o zinco estão representadas em amarelo. Estrutura depositada no Protein Data Bank sob n° 1F9X (Sun e cols., 2000).

O domínio XIAP-BIR3 inibe a caspase-9, pois é capaz de formar um heterodímero com a sua forma monomérica. A caspase-9 é ativa como dímero, e todas as 18 estruturas de caspases publicadas, incluindo iniciadoras e efetoras, são identificadas como homodímeros arranjados predominantemente pela interface hidrofóbica (SHIOZAKI e cols., 2003). Assim, o domínio XIAP-BIR3 sequestra a caspase-9 em um estado monomérico, eliminando a possibilidade de formação da conformação com o sítio ativo arranjado (SHIOZAKI e cols., 2003). Um peptídeo N-terminal, ligador da pequena subunidade da caspase-9 (ATPF), interage com uma superfície conservada sobre XIAP-BIR3, levando à inibição (SRINIVASULA e cols., 2001; SHIOZAKI e cols., 2003). Desta forma, e a partir da inibição da caspase-3, a morte celular é reprimida em várias linhagens celulares tumorais específicas que superexpressam as XIAPs.

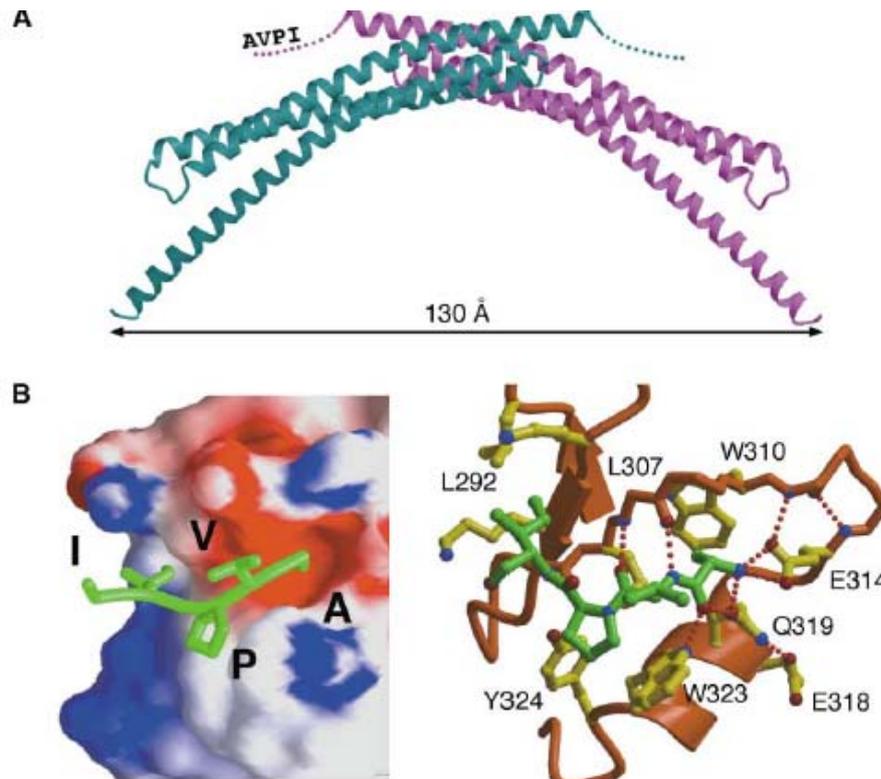
Atualmente, já se sabe que a elevada expressão de IAPs participa na oncogênese, por ajudar a permitir células malignas a escapar da morte celular apoptótica. A proteína Smac/DIABLO é capaz de interagir com as IAPs, eliminando seu efeito e sensibilizando estas células cancerosas a apoptose.

#### **2.1.1.2. A Proteína Smac/DIABLO**

A Proteína Smac/DIABLO, como já comentado, é outro importante regulador da apoptose que é liberado da mitocôndria durante o estímulo apoptótico. Smac é original do inglês “Second Mitochondria-derived Activator of Caspases” (DU e cols., 2000), enquanto que DIABLO, “Direct IAP Binding protein with Low pI” (VERHAGEN e cols., 2000). Esta proteína promove a ativação da caspase-9 por se ligar às IAPs removendo seu efeito inibitório e permitindo a continuidade do processo de morte celular programada.

A proteína Smac/DIABLO é constituída de 184 aminoácidos por monômero, com 21 kDa cada. A estrutura cristalográfica da Smac/DIABLO foi determinada a 2.2 Å de

resolução e demonstrou que, na forma madura ela apresenta-se como um homodímero em forma de arco, possuindo um raio hidrodinâmico equivalente a uma proteína de 100 kDa (CHAI e cols., 2000). A Smac/DIABLO é sintetizada como uma proteína de 239 aminoácidos, sendo 55 aminoácidos da porção N-terminal responsáveis pela ligação à membrana mitocondrial. Essa sequência é removida proteoliticamente e não aparece na proteína madura. Além disso, com a clivagem há a exposição de um tetrapeptídeo N-terminal, AVPI, que é essencial para a função da proteína. O monômero da proteína apresenta três hélices sobrepostas: H1, H2 e H3, sendo que a maioria dos resíduos hidrofóbicos localiza-se no interior, entre as hélices (**Figura 2.7**). Certas mutações pontuais na interface dimérica foram capazes de desfazer completamente o dímero, o que pôde ser comprovado através de gel filtração (CHAI e cols., 2000).



**Figura 2.7: Estrutura da Smac/DIABLO e do complexo formado na ligação do Tetrapeptídeo AVPI da Smac/DIABLO ao domínio XIAP-BIR3 das IAPs. A)** Diagrama esquemático da proteína Smac dimérica madura. Os resíduos desordenados do N-terminal estão mostrados como linhas tracejadas. **B)** A interação do tetrapeptídeo Smac N-terminal (Ala-Val-Pro-Ile) com o domínio BIR3 da XIAP. O domínio BIR3 é representado como uma superfície modelo no lado esquerdo, com áreas hidrofóbicas coloridas de vermelho. Detalhes atômicos das interações são mostrados no lado direito, além da verificação da existência de resíduos de triptofano, 310 e 323, envolvidos na ligação e essenciais para medidas de espectroscopia de fluorescência (Extraído de Shi, 2001).

No caso das XIAPs ("X-linked IAP"), o domínio BIR2 é responsável por ligar-se à caspase-3 e o BIR3 à caspase-9. A forma dimérica da proteína Smac/DIABLO interage com os domínios BIR2 e mais fortemente com o BIR3 da IAP. Já o monômero interage apenas com o BIR3. Para aferir esta interação, a estrutura cristalográfica da Smac/DIABLO ligada ao domínio BIR3 da IAP foi determinada a 2.6 Å de resolução (WU e cols., 2000). Na realidade, o responsável pela interação da Smac/DIABLO com o domínio BIR3 é o tetrapeptídeo Ala, Val, Pro, Ile (AVPI), apesar de existir contatos adicionais da Smac/DIABLO com o BIR3 a partir de suas hélices H2 e H3. A base

estrutural da ligação Smac/DIABLO, a partir do tetrapeptídeo AVPI, ao domínio XIAP-BIR3 foi determinada por Liu e colaboradores em 2000. Neste estudo, foi utilizado um peptídeo com os 9 aminoácidos N-terminal da Smac/DIABLO, sendo que só os resíduos AVPI foram bem definidos por RMN, enquanto que os resíduos 5-9 estavam desordenados. Uma mutação pontual no N-terminal da Smac/DIABLO, substituindo-se o resíduo de alanina por metionina, leva à perda de sua função, por impedir que ela se ligue às IAPs (WU e cols., 2000; LIU e cols., 2000). Os resíduos Val, Pro e Ile também são importantes na interação, já que mutações pontuais destes aminoácidos levam a uma diminuição da afinidade entre o peptídeo e o domínio BIR3 das IAPs (WU e cols., 2000; LIU e cols., 2000). Dados obtidos por RMN mostram que o domínio BIR3 complexado com o peptídeo AVPI consiste de três fitas- $\beta$ , 5  $\alpha$ -hélices, 1 hélice  $3_{10}$  e um zinco ligando-se a três cisteínas e uma histidina (LIU e cols., 2000). A partir de dados de RMN do domínio isolado pode-se verificar que as estruturas são similares. Contudo, duas regiões de voltas (resíduos 276-280 e 308-314), que não puderam ser caracterizadas no domínio livre, tornam-se bem definidas com a ligação do peptídeo AVPI, indicando que estas regiões são estabilizadas na interação.

Estudos já comprovaram que existe um tetrapeptídeo motivo ligante de IAP. A caspase-9 também apresenta um tetrapeptídeo ligante ao domínio BIR3 das IAPs. Pesquisadores têm mostrado que a ligação do AVPI da Smac/DIABLO exclui o ATPF da caspase-9, sugerindo que a Smac/DIABLO potencializa a atividade da caspase-9 por romper a interação do peptídeo da própria caspase-9 ao domínio BIR3 (Srinivasula e cols., 2001). Estudos revelam que o tetrapeptídeo AVPI, proveniente da Smac, se liga com grande afinidade e especificidade.

Estudos cristalográficos mostraram que peptídeos derivados da Smac/DIABLO foram capazes de suprimir a ação das IAPs (WU e cols., 2000). Estes estudos foram

realizados com o objetivo de desvendar como se daria a interação do tetrapeptídeo AVPI, do N-terminal da Smac/DIABLO, com o domínio BIR3 da XIAP. A ancoragem do AVPI no BIR3 é feita por intermédio de oito ligações de hidrogênio intermoleculares, além de interações de van der Waals e interações hidrofóbicas (Wu e cols., 2000). Além disso, o primeiro resíduo, a alanina, liga-se em uma região hidrofóbica facilitando a formação de ligações de hidrogênio adicionais por aminoácidos vizinhos. Dois resíduos na XIAP, Trp310 e Glu314, importantes para a ligação e inibição da caspase-9 (SUN e cols., 2000), são também envolvidos em contatos críticos com o tetrapeptídeo da Smac (LIU e cols., 2000; WU e cols., 2000).

### **2.1.1.3. Apoptose como alvo para terapia contra o câncer**

O conhecimento das proteínas envolvidas no desenvolvimento do câncer, assim como a aquisição de informações de suas funções e suas interações proteína-proteína ou proteína-ácido nucléico, a possibilidade de desenhos de drogas mais específicas e menos tóxicas torna-se muito mais concreta e viável, o que acarretaria em tratamentos menos agressivos e mais eficazes (ARKIN, 2005).

Com o avanço da Biologia Molecular, a pesquisa e o conhecimento de mecanismos celulares foram intensamente acelerados. Como exemplo, com a descoberta do gene 2 do linfoma de célula B (família Bcl-2) chegou-se ao conceito de que o desenvolvimento de câncer envolve não somente a divisão celular desregulada, mas também a resistência à apoptose. Esta característica é extremamente importante, porque além da célula fisiologicamente ter uma sobrevivência enorme, a célula neoplásica apresenta-se resistente a vários tipos de tratamentos (HERSEY e ZHANG, 2003). Já está descrito que vários tipos de câncer apresentam tal resistência, como por exemplo, o câncer pancreático. Mudanças na expressão e mutações de proteínas apoptóticas são comuns neste tipo de

câncer, tornando-se as células multi-resistentes à apoptose, o que contribui para o desenvolvimento do tumor (WESTPHAL e KALTHOFF, 2003). Muitos estudos têm sido realizados no sentido do desenvolvimento de métodos de modulação da apoptose. Entre os possíveis grupos terapêuticos encontram-se: interferência por RNA, construções anti-senso, oligonucleotídeos, quimioterapia, vetores retrovirais e inibidores específicos de proteínas apoptóticas (WESTPHAL e KALTHOFF, 2003).

A supressão da apoptose pode contribuir para a carcinogênese por vários mecanismos, incluindo prolongamento da vida celular (assim, facilitando o acúmulo de mutações gênicas), permitindo a sobrevivência da célula independente de fatores de crescimento, promovendo resistência à resposta imune, e permitindo o descontrole do ciclo celular (REED, 1994; THOMPSON, 1995; YANG e KORSMEYER, 1996; AMBROSINI e cols., 1997). Desta forma, dentre outros mecanismos, a apoptose tem sido um alvo bastante importante e promissor na busca de terapias alternativas para o combate do câncer (HERSEY e ZHANG, 2003; FESIK, 2005; GHOBRIAL e cols., 2005). O entendimento das alterações ocorridas no câncer pode fornecer informações básicas para o desenvolvimento de tratamentos com alvos específicos, com o intuito de induzir a morte de células neoplásicas ou, pelo menos, sensibilizá-las à ação de agentes citotóxicos estabelecidos ou à radioterapia.

Com a grande importância do estudo de agentes que induzem apoptose, centenas de trabalhos já foram publicados e existe um grande investimento nesta área. Entre as proteínas envolvidas, como descrito anteriormente, as IAPs são altamente expressas em várias classes de câncer. Por exemplo, as IAPs têm sido encontradas com superexpressão em amostras de biópsia tumoral, incluindo linhagens de células leucêmicas ou blastos isolados de pacientes com leucemia aguda (WRZESIE-KUS e cols., 2004). A expressão de Smac/DIABLO em células de carcinoma ovariano induziu apoptose via ativação de

caspase-9, o que demonstra que a superexpressão de XIAP deveria estar inibindo a morte celular, conseqüentemente, ocasionando a resistência ao tratamento (MCNEISH e cols., 2003). As IAPs são capazes de interagir com caspases iniciadoras e efetoras, inibindo suas funções, e desta forma a morte celular. Assim, vários estudos indicam que as IAPs têm potencial como alvo terapêutico chave em células cancerosas que superexpressam essas proteínas, por inibir a apoptose (NACHMIAS e cols., 2004; WRIGHT e DUCKETT, 2005; MANNHOLD e cols., 2010). Por exemplo, em câncer de próstata, as IAPs têm sido um grande alvo para a indução de apoptose (WATSON e FITZPATRICK, 2005).

Uma das principais abordagens para desenvolver fármacos antitumorais é encontrar potentes antagonistas, principalmente da proteína XIAP, para o tratamento de câncer. Trabalhos mostram que pacientes com baixos níveis da proteína XIAP têm uma sobrevida significativamente maior do que os que têm altos níveis de XIAP (TAMM e cols., 2000). Além disso, já tem sido demonstrado também que peptídeos sintéticos da Smac aumentam os efeitos de agentes quimioterápicos por ligação à XIAP e cIAP1 *in situ* (ARNT e cols., 2002). Vários estudos buscam o melhor entendimento da interação da XIAP (FRANKLIN e cols., 2003; SCHIMMER e cols., 2004), ou mais especificamente do domínio BIR3, com peptídeos da Smac/DIABLO, para obter informações essenciais para a obtenção de uma droga mais potente, mais específica e menos tóxica (OOST e cols., 2004; PARK e cols., 2005; SUN e cols., 2005).

Atualmente, muito se sabe sobre a estrutura do domínio BIR3 da XIAP, bem como sua interação com a Smac/DIABLO. Porém, alguns pontos ainda não foram abordados, como um estudo dos parâmetros termodinâmicos da interação com ligantes para um melhor entendimento da natureza da inibição desta proteína. A correlação de dados termodinâmicos com dados estruturais e dinâmicos também é crucial para o esclarecimento de várias questões. Responder tais questões faz-se fundamental para

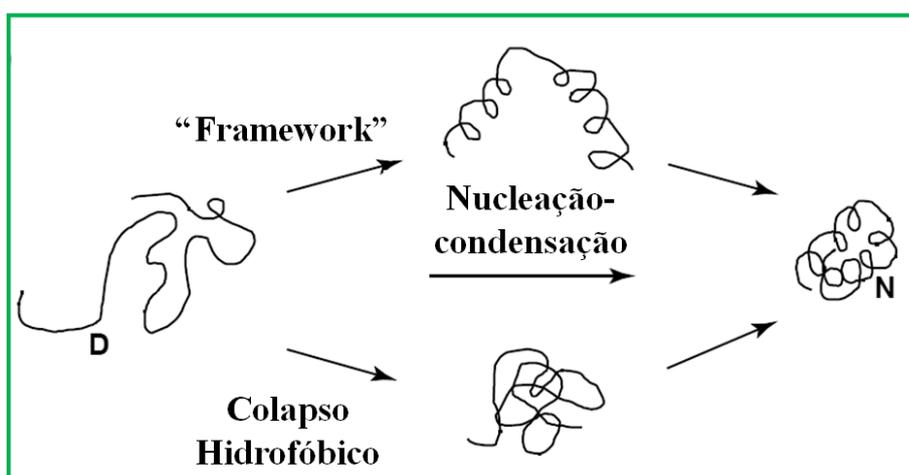
auxiliar e acelerar o desenvolvimento de drogas anticancerígenas, já que fornecem importantes características da interação. Nossos estudos visam fornecer dados para a compreensão da afinidade de interação de diferentes peptídeos ao domínio BIR3, além de fornecer parâmetros termodinâmicos de suma relevância na caracterização desta interação. Calorimetria e espectroscopia de fluorescência foram utilizadas para investigar as mudanças de estabilidade do domínio e os parâmetros termodinâmicos da interação de diferentes ligantes ao domínio XIAP-BIR3. Análises estruturais por dicroísmo circular e um levantamento das estruturas da XIAP também foram realizados, com intuito de um melhor entendimento das interações.

### **2.1.2. Enovelamento protéico e estabilidade de proteínas**

O enovelamento protéico é conhecido como um processo de automontagem, guiado pela descoberta de uma estrutura de menor energia (BALDWIN, 2007). Muitas teorias sobre o enovelamento e estabilidade de proteínas têm sido propostas, baseado em estudos experimentais e teóricos (GUMMADI, 2003). A pesquisa de um único modelo e de mecanismo simples de enovelamento protéico leva a múltiplas propostas. A primeira que envolve o crescimento por nucleação propõe que a estrutura terciária rapidamente propaga de um núcleo inicial de estrutura secundária. Contudo, a nucleação prediz a ausência de intermediários de enovelamento, o que iria contra o campo do enovelamento de proteínas nos anos 1970 e 1980, o qual foi dominado por estudos de intermediários de enovelamento. Dois modelos alternativos prevalecem, sendo o primeiro destes o modelo de “*framework*”, no qual é proposto que a estrutura secundária se enovela primeiro, seguindo pela ligação de unidades de estruturas secundárias pré-formadas para formar a proteína enovelada (PTITSYN, 1987; KIM e BALDWIN, 1990). O segundo foi o modelo do colapso hidrofóbico, na qual o colapso hidrofóbico dirige a compactação da proteína, e então o

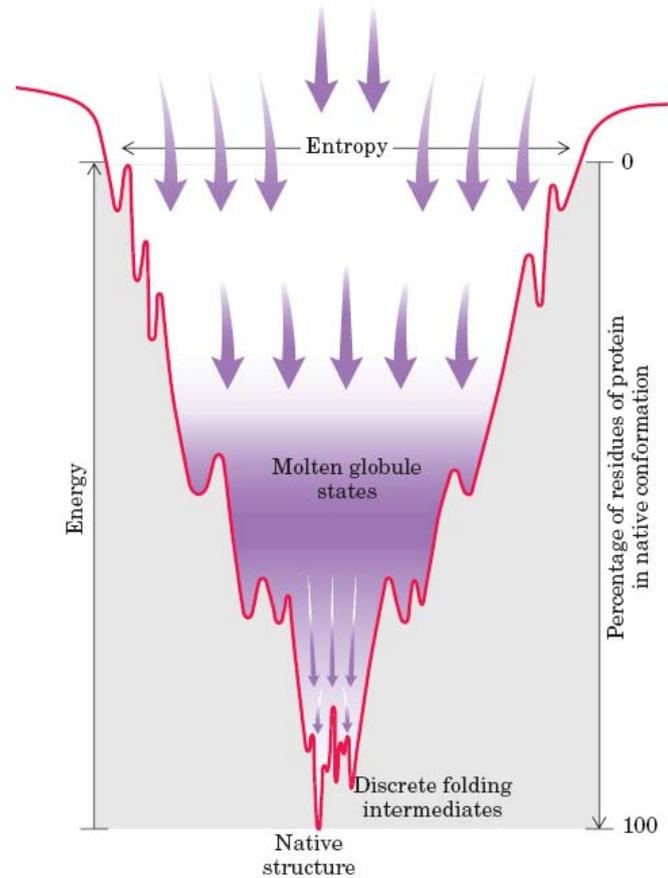
enovelamento é confinado a um volume (**Figura 2.8**) (TANFORD, 1962; BALDWIN, 1989).

Assim, as proteínas parecem enovelar por diversos caminhos. Um mecanismo simples de nucleação-condensação descreve as características gerais do enovelamento da maioria dos domínios envolvendo suas variações (**Figura 2.8**) (DAGGETT e FERSHT, 2003). Em geral, a estrutura secundária é inerentemente instável e sua estabilidade é aumentada por interações hidrofóbicas. Consequentemente, uma extensa interligação das interações da estrutura secundária e terciária determina o estado de transição para o enovelamento, o qual é estruturalmente similar ao estado nativo, sendo formado por um colapso geral (condensação) em torno de um núcleo difuso. À medida que a propensão para estrutura secundária estável aumenta, o enovelamento torna-se mais hierárquico e eventualmente segue o mecanismo “*framework*”, onde o estado de transição é montado de elementos de estrutura secundária pré-formados (DAGGETT e FERSHT, 2003).



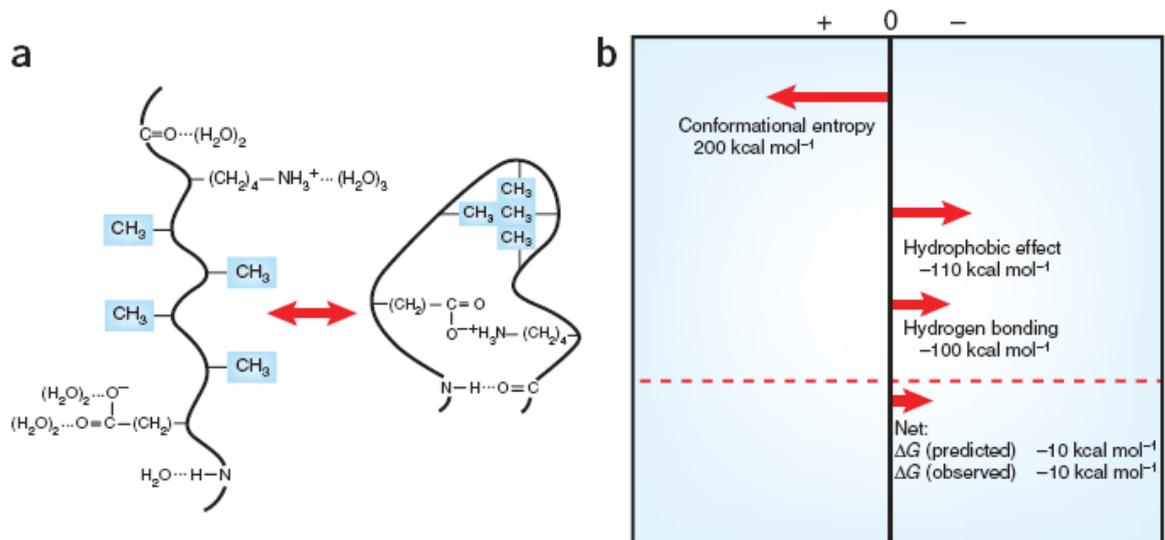
**Figura 2.8: Visão esquemática do enovelamento protéico, mostrando os dois modelos clássicos extremos de enovelamento protéico: o modelo do colapso hidrofóbico e do “*framework*”. O modelo de nucleação-condensação é a combinação dos dois modelos, e isto pode se dar para ambos os modelos com mudanças na estabilidade relativa da estrutura secundária e terciária (Adaptado de DAGGETT e FERSHT, 2003).**

Termodinamicamente, o enovelamento é guiado por fatores entálpicos relacionados às ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações eletrostáticas. Além destes fatores, interações hidrofóbicas favorecem altamente o enovelamento, por aumentar a entropia do sistema, visto que aumenta a entropia da água. Outros fatores estão explicados através do funil de enovelamento na **Figura 2.9**. O enovelamento errado pode ocorrer para diferentes proteínas e está associado a diversas patologias, como revisado por Chiti e Dobson (CHITI e DOBSON, 2006). Na maioria destes casos, o mau enovelamento desencadeia agregação protéica, podendo gerar fibras amilóides que se depositam em células, gerando alterações funcionais. Características de enovelamento neste âmbito não serão descritas em detalhes, pois não se correlacionam diretamente a este trabalho.



**Figura 2.9: A termodinâmica do enovelamento protéico ilustrada como um funil de enovelamento.** No topo, o número de conformações é alto, assim como a entropia conformacional. Somente uma pequena fração das interações intramoleculares que existirão no estado nativo estão presentes. No processo de enovelamento, o caminho termodinâmico é descendo o funil para um nível de menor energia, o qual está relacionado a uma redução do número de estados presentes (decréscimo de entropia), um aumento da quantidade de proteína no estado nativo. Depressões nas laterais do funil representam intermediários de enovelamento semiestáveis, os quais podem, em alguns casos, deixar o processo de enovelamento mais lento (Extraído de LENHINGER, 2004).

As duas principais forças de estabilização de proteínas são o efeito hidrofóbico e as ligações de hidrogênio, e a principal força desestabilizadora é a perda da entropia conformacional (PACE, 2009). Estas estão mostradas na **Figura 2.10**, com valores aproximados de sua magnitude para uma proteína de 100 resíduos de aminoácidos. A estabilidade conformacional de uma proteína é um equilíbrio das forças de maiores intensidades.



**Figure 2.10: Forças estabilizantes e desestabilizantes no enovelamento de uma proteína.** **A)** Esquema ilustrativo da formação de uma ligação de hidrogênio, uma interação hidrofóbica e um par iônico no enovelamento de uma proteína. **B)** As estimativas das contribuições para a energia livre do enovelamento de uma proteína de 100 resíduos. Contribuições da formação de pares de íons são relativamente pequenas e não aparecem (Extraído de PACE, 2009).

### 2.1.3. O uso de agentes desnaturantes nos estudos de estabilidade de proteínas

O conhecimento da estabilidade de uma proteína é essencial para a compreensão de sua estrutura e função. Desta forma, tem sido de grande interesse acompanhar a desnaturação de diversas proteínas, usando agentes físicos como alta pressão hidrostática e altas temperaturas, ou certos agentes químicos como a ureia ou o hidrocloreto de guanidina.

Diversos estudos têm emergido sobre o uso da alta pressão hidrostática, para tentar revelar estados intermediários na via de montagem e desmontagem de vários vírus, proteínas multiméricas e complexos proteína-ácido nucléico, endereçando muitas questões de reconhecimento macromolecular (Silva e cols., 1996). Além disso, vários estudos têm mostrado a importância de comparar complexos protéicos, complexos proteína-ligantes e

integrar informações sobre estrutura, dinâmica e energética (WEBER, 1992; SILVA e cols., 2001).

A perturbação por pressão pode produzir novas informações acerca da estabilidade, volume e empacotamento de macromoléculas em uma extensa variedade de fenômenos biológicos, e tem sido particularmente útil na investigação de transições conformacionais em proteínas (JONAS e JONAS, 1994; HEREMANS e SMELLER, 1998). A técnica de pressão é desfavorável às interações hidrofóbicas, que são predominantemente responsáveis pela manutenção da estrutura terciária de uma proteína (SILVA e cols., 1996). Assim, a pressão não provoca diretamente alterações significativas na estrutura secundária, promovendo apenas mudanças na estrutura terciária e quaternária das proteínas e sendo assim menos drástica que muitos agentes desnaturantes (WEBER e DRICKAMER, 1983). Porém, esta alteração a nível de estrutura quaternária e terciária pode levar a uma alteração de estabilidade, o que pode favorecer a perda da estrutura secundária. A variação negativa de volume que ocorre com a dissociação ou desenovelamento protéico procede integralmente de interações mais íntimas entre a cadeia polipeptídica e a água. Assim, a pressão desestabiliza interações hidrofóbicas e eletrostáticas, além de eliminar as cavidades existentes (SILVA e cols., 1996; HUMMER e cols., 1998; SILVA e cols., 2001).

Quanto aos agentes desnaturantes químicos, o uso de concentrações crescentes também nos permite obter uma estimativa do estado conformacional das proteínas, que pode variar do estado nativo ao totalmente desnaturado (PACE, 1986; SHORTLE e cols., 1989), bem como comparar a estabilidade conformacional de proteínas mutantes e proteínas em complexo com ligantes. Apesar das interações moleculares destes desnaturantes com as superfícies das proteínas ainda não terem sido completamente elucidadas, estes vêm sendo amplamente empregados no estudo da desnaturação protéica.

A ureia, por não possuir carga, é o agente desnaturante químico mais apropriado para o estudo dos efeitos das interações eletrostáticas ou da estabilidade total de proteínas (WU e WANG, 1999). Inicialmente, dois modelos usados para analisar a curva de desnaturação por ureia foram propostos (PACE, 1986; SCHELLMAN, 1987): modelo 1, no qual a interação do desnaturante com a proteína pode ser tratada como uma ligação específica, ou seja, acredita-se que as interações que envolvem as proteínas e o desnaturante sejam mais favoráveis do que as interações com a água (TANFORD, 1970); e o modelo 2, onde o desnaturante atua indiretamente através dos efeitos no solvente, deslocando o equilíbrio entre o estado nativo/enovelado para o estado desnaturado/desenovelado.

Estudos mais recentes têm mostrado também que as interações apolares entre proteína-ureia, e não interações polares, são as principais interações que dirigem a desnaturação (STUMPE e GRUBMULLER, 2007; 2008). Estudos por simulação de dinâmica molecular da interação de aminoácidos com ureia têm revelado características importantes do processo de desnaturação (STUMPE e GRUBMULLER, 2007). Particularmente existe uma forte preferência de contatos da ureia com resíduos aromáticos e com cadeias laterais apolares, assim como com a cadeia principal de todos os aminoácidos. Além disso, ligações de hidrogênio entre proteína-ureia são significativamente mais fracas que as ligações de hidrogênio entre proteína-água ou água-água. Assim, a partir deste trabalho, as interações hidrofóbicas proteína-ureia são as forças dominantes que dirigem a desnaturação (STUMPE e GRUBMULLER, 2007).

O cloridrato de guanidina é geralmente 1,5 a 2,5 vezes mais efetivo na desnaturação protéica do que a ureia, sendo esta diferença maior para proteínas mais polares. Por ser um sal, o GdnHCl em soluções aquosas encontra-se ionizado. Em baixas concentrações, os íons  $\text{Gdn}^+$  e  $\text{Cl}^-$  se ligam às cadeias laterais de aminoácidos carregados

negativa e positivamente, respectivamente, reduzindo ou eliminando qualquer interação eletrostática. Em altas concentrações, o GdnHCl se torna desnaturante, não interessando o tipo de interação eletrostática presente na proteína (MONERA e cols., 1993), sendo o desnaturante apropriado para determinar a contribuição específica das interações hidrofóbicas ou não iônicas para a estabilidade protéica.

Com a Era da Genômica Estrutural, o interesse no uso de informação estrutural na investigação da função de proteínas tem aumentado bastante. Assim, informações sobre a estabilidade de proteínas e domínios fornecem parâmetros importantes da estrutura. A estabilização de proteínas por ligação de peptídeos também vem sendo bem caracterizada (CELEJ e cols., 2003; 2005). Nosso trabalho visou a comparar a estabilidade do domínio BIR3 com a do complexo BIR3-AVPI frente a alta pressão hidrostática, altas temperaturas, ureia e hidrocloreto de guanidina.

#### **2.1.4. Dinâmica de proteínas**

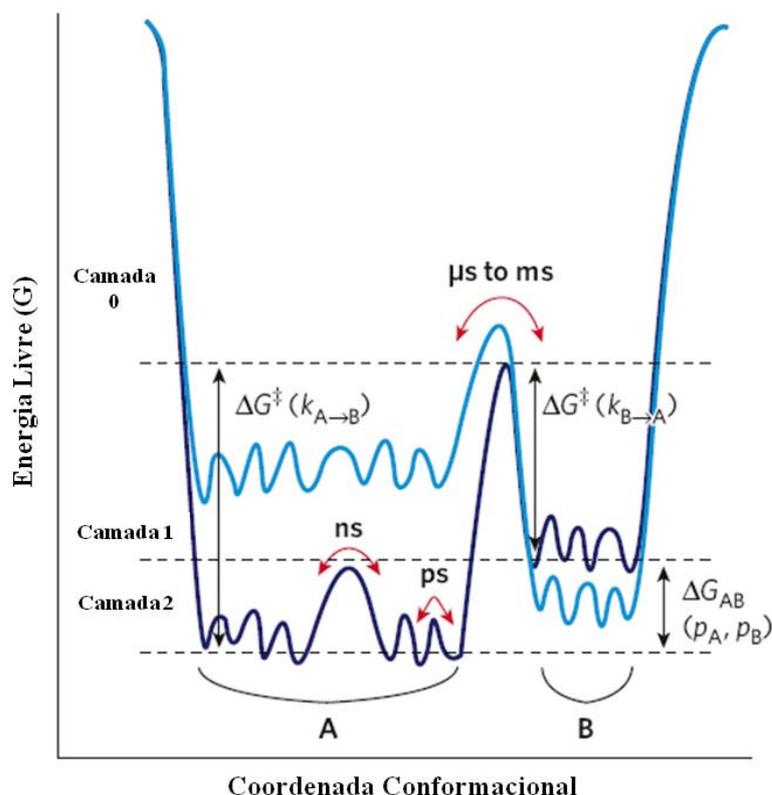
A compreensão da função de uma proteína em nível atômico foi revolucionada pela alta resolução obtida inicialmente por cristalografia de raios-X, resultando em um aumento nos estudos das relações estrutura-função. Os detalhes nestas estruturas coloridas nas capas das revistas modernas podem ser enganosos, sugerindo que uma única estrutura, o "estado enovelado", é a resposta final. As proteínas apresentam um grande conjunto de conformações em torno da estrutura média, o que é um resultado da energia térmica. Uma descrição completa de proteínas exige um panorama de energia multidimensional que define a probabilidade relativa dos estados conformacionais (termodinâmica) e as barreiras de energia entre eles (cinética) (HENZLER-WILDMAN e KERN, 2007). Em Biologia, este conceito ganhou, recentemente, atenção, levando a uma extensão do paradigma da

estrutura-função para incluir dinâmica. Para entender as proteínas em ação, uma quarta dimensão deve ser adicionada, o tempo.

Os movimentos de uma proteína variam da escala de picosegundos a segundos. Movimentos na escala de pico a nanosegundos correspondem a movimentos locais e de segmentos, enquanto a barreira de energia é menor que a energia térmica ( $kT$ ) (constante de Boltzman x temperatura) (VALENTE e cols., 2006). Estes são chamados de movimentos térmicos. Todos os movimentos rotacionais ocorrem na escala de tempo de dezenas de nanosegundos e também são dirigidos termicamente. Em proteínas bem estruturadas, as mesmas apresentam apenas conformações de menor energia e apresentam baixa entropia conformacional. Neste caso, a proteína sofre somente movimentos que ocorrem exclusivamente na escala de tempo de pico a nanosegundos (VALENTE e cols., 2006). Este exemplo refere-se a uma proteína apresentando uma “única” conformação, mas com regiões de flexibilidade local.

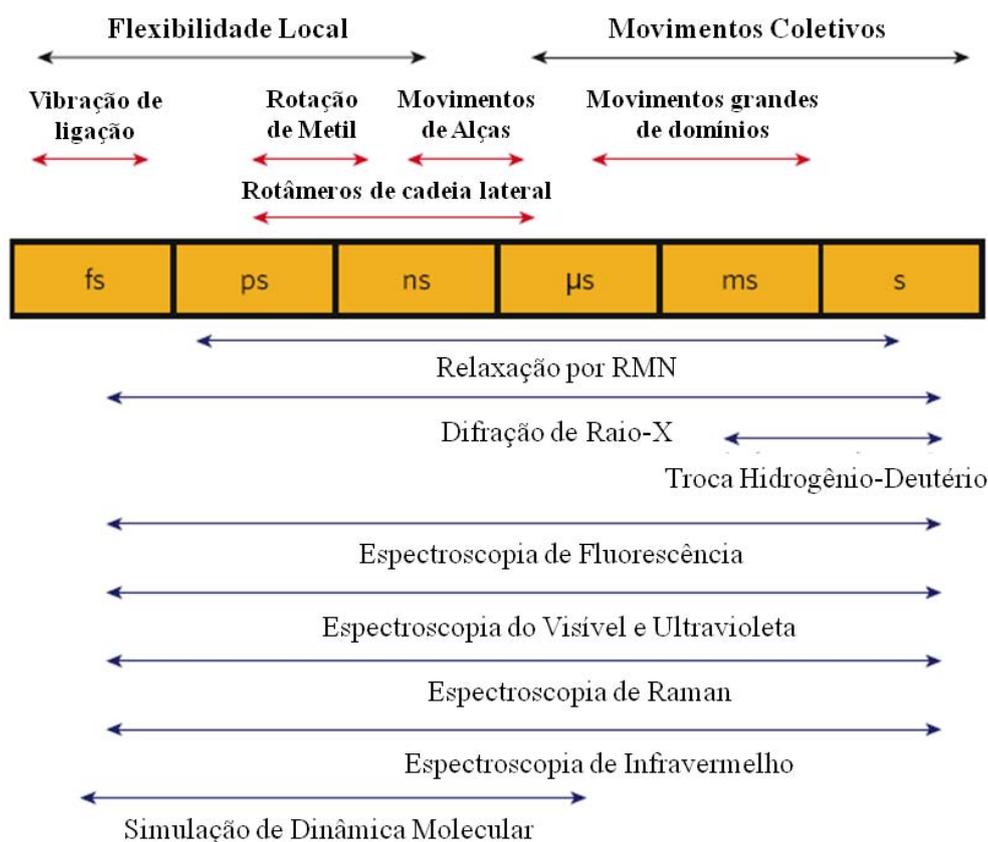
O panorama energético da **Figura 2.11** apresenta, além dos movimentos térmicos (escala de pico e nanosegundos), mais que um estado conformacional de baixa energia (conformações A e B). Neste caso, existem movimentos que ocorrem tipicamente na escala de tempo de micro a milisegundos. As longas escalas de tempo são justificadas pela presença de barreira de energia maior que  $kT$ . Esta escala de tempo prevalece em regiões da proteína que exibem duas ou mais conformações (VALENTE e cols., 2006).

O equilíbrio entre diferentes estados pode ser mudado, por exemplo, pela interação com ligantes, por uma mutação da proteína e por alterações em condições externas. As mudanças de equilíbrio podem ser devido à desestabilização do estado nativo (ex: enzima inativa) e/ou à estabilização do novo estado conformacional (ex: enzima ativa) (GARDINO e cols., 2009).



**Figura 2.11: O panorama energético define a amplitude e a escala de tempo dos movimentos de proteína. A) Seção transversal unidimensional do panorama energético de uma proteína que mostra a hierarquia da dinâmica de proteínas e as barreiras de energia. Cada camada é classificada da seguinte descrição introduzida pelo Frauenfelder e colaboradores. Um estado é definido como um mínimo da superfície de energia, enquanto que um estado de transição é o máximo entre os poços. As populações dos estados da camada-0, A e B ( $p_A, p_B$ ), são definidas como as distribuições de Boltzmann, com base na sua diferença em energia livre ( $\Delta G_{AB}$ ). A barreira entre esses estados ( $\Delta G^\ddagger$ ) determina o taxa de interconversão ( $k$ ). As camadas inferiores descrevem flutuações mais rápidas entre um grande número de subestados intimamente relacionados dentro da camada de energia 2. Uma mudança no sistema poderá alterar o panorama energético (de azul escuro para azul claro, ou vice-versa). Por exemplo, ligantes, a mutação da proteína e alterações em condições externas podem mudar o equilíbrio entre os estados (Adaptado de HENZLER-WILDMAN e KERN, 2007).**

Sofisticados métodos biofísicos, tais como RMN, SDM, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de infravermelho e de Raman, são necessários para medir as propriedades físicas, nas quais a dinâmica por ser inferida (**Figura 2.12**).



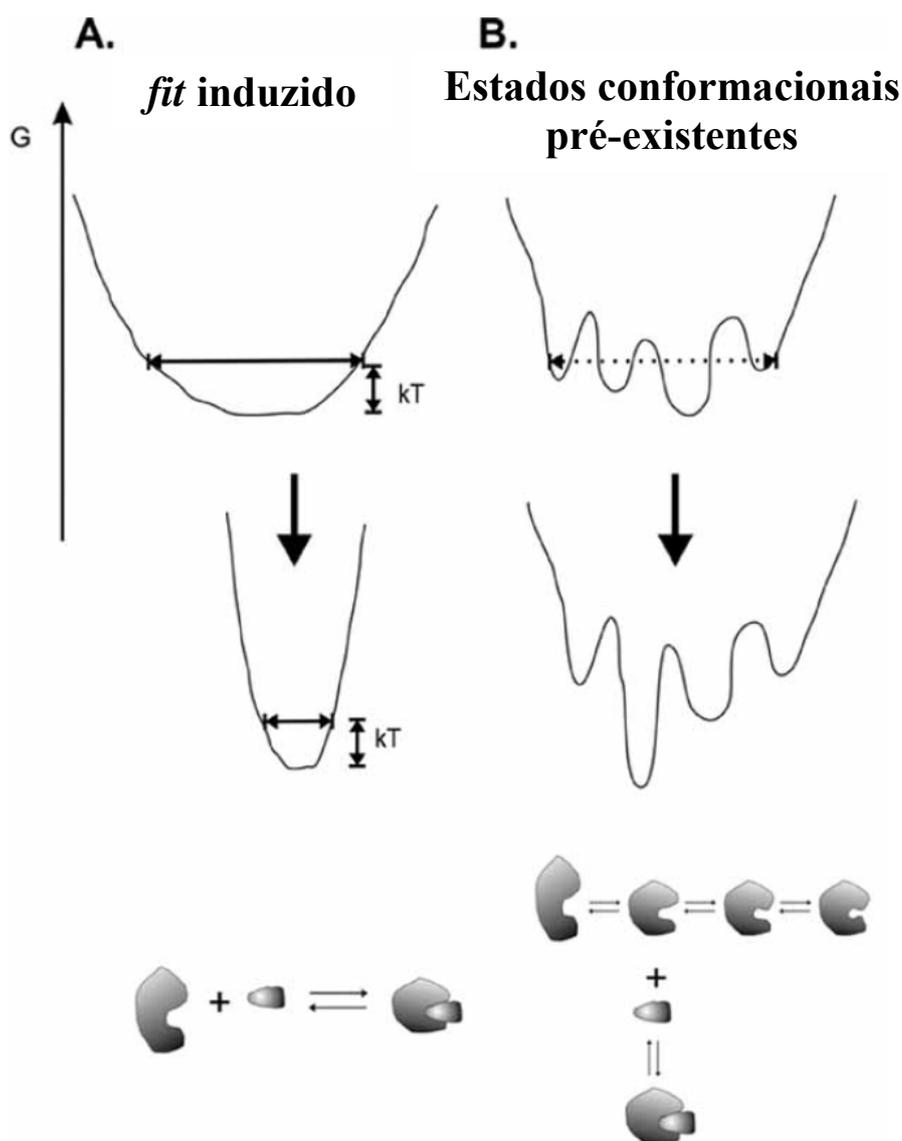
**Figura 2.12:** A escala de tempo de processos dinâmicos em proteínas e os métodos experimentais que podem detectar as flutuações de cada determinada escala de tempo (Adaptado de Henzler-Wildman e Kern, 2007).

O entendimento da dinâmica de proteínas é importante para a compreensão de sua estabilidade e função, assim como compreender as alterações promovidas por ligantes pode favorecer o desenho racional de fármacos (CRESPO e FERNANDEZ, 2008). Um particular interesse é o papel da entropia conformacional de uma proteína modulando a energia livre de interação de um ligante à proteína (FREDERICK e cols., 2007). Uma decomposição simplística enfatiza o fato que a entropia de interação ( $\Delta S_{\text{ligação}}$ ), obtida por métodos calorimétricos, é composta de contribuições associadas com a proteína, o ligante e o solvente:

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta H_{\text{ligação}} - T\Delta S_{\text{ligação}} = \Delta H_{\text{ligação}} - T(\Delta S_{\text{proteína}} + \Delta S_{\text{ligante}} + \Delta S_{\text{solvente}})$$

Transições de um ligante do estado não ligado desordenado (alta entropia) para um estado ligado ordenado (baixa entropia) podem profundamente influenciar a entropia de associações macromoleculares (FREDERICK e cols., 2007). Além disso, já é bem estabelecido que a interação a partir de áreas de superfície hidrofóbica e consequente liberação de água de hidratação para o solvente podem contribuir significativamente para a termodinâmica de interação. As contribuições entrópicas das alterações de entropia conformacional, assim como alterações na entropia rotacional e translacional, têm sido mais recentemente caracterizadas por ressonância magnética nuclear (FREDERICK e cols., 2007). Desta forma, estudos da dinâmica de proteínas são extremamente importantes para o entendimento da estabilidade termodinâmica de proteínas, bem como de interações biomoleculares.

Existem dois modelos para explicar uma interação molecular: *fit* induzido e a seleção de estados conformacionais pré-existent. Características relacionadas a estes dois mecanismos estão descritas na **Figura 2.13**.



**Figure 2.13: Dois modelos para explicar interação: *fit* induzido e o modelo incluindo estados conformacionais pré-existentes.** Do lado esquerdo (A) está representado o panorama de energia antes e depois da interação de um dado receptor, seguindo o modelo de *fit* induzido. Em particular situação exibida pela figura, a entropia conformacional (seta horizontal) é altamente reduzida após interação. A penalidade entrópica será significativa nesta circunstância. Abaixo, esquema do equilíbrio de interação é reflexo do panorama de energia. Os ícones representam as mudanças estruturais induzidas pela interação. No lado direito (B) está representado o panorama de energia antes e depois da interação de um dado receptor, seguindo o modelo de seleção conformacional. Na presença de um ligante, um dos estados conformacionais é reconhecido pelo ligante. Esta causa diminuição de energia do estado conformacional (estabilização), levando a um desvio das populações para o estado conformacional ligado. A representação com ícones ilustra o equilíbrio de ligação (Adaptado de VALENTE e cols., 2006).

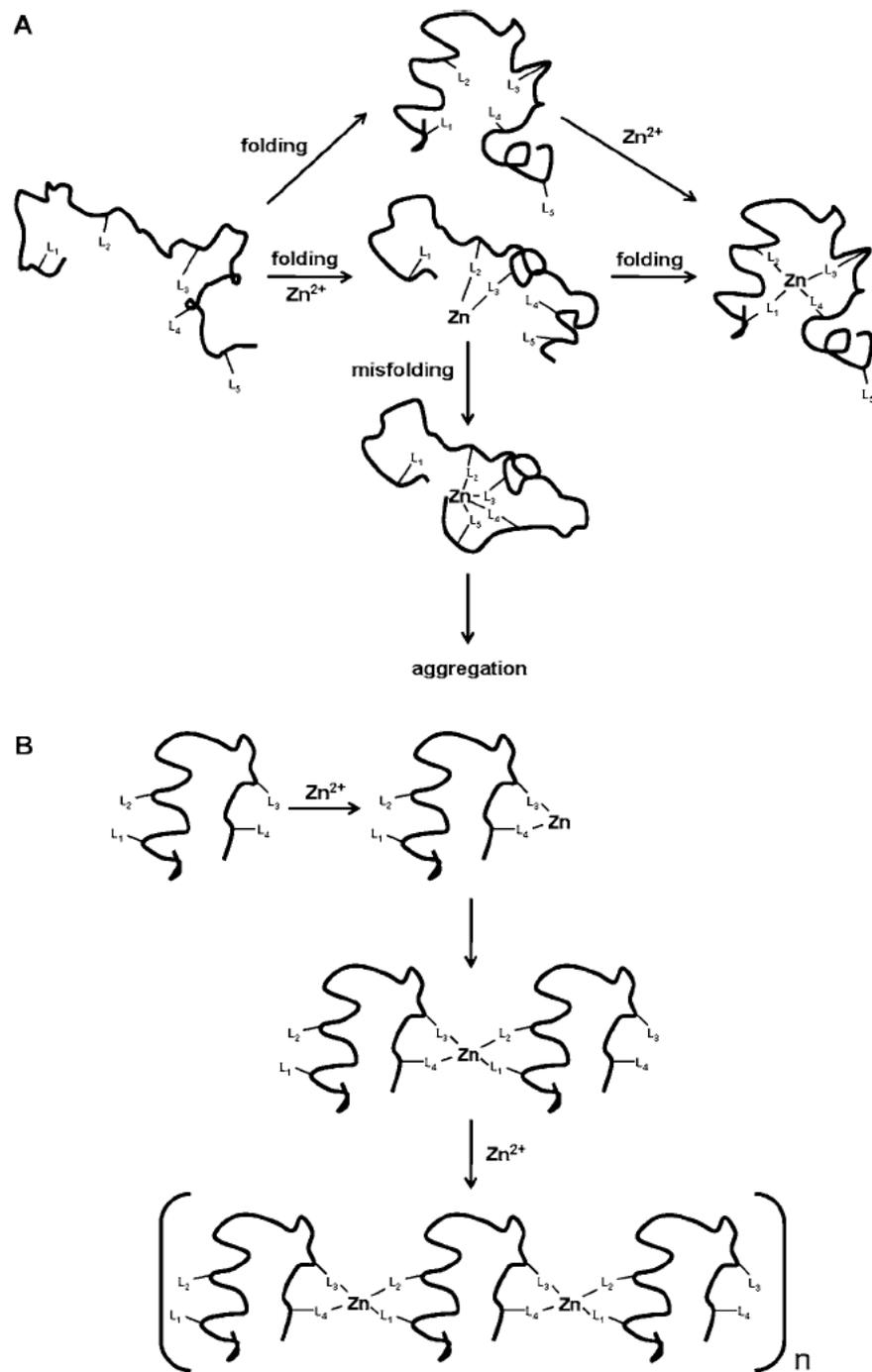
### **2.1.5. Importância do zinco em algumas estruturas protéicas e em funções biológicas**

Vários processos biológicos importantes para a manutenção da vida dependem de íons como elementos essenciais. Processos redoxes biológicos, tais como a fixação de nitrogênio, fotossíntese e respiração mitocondrial, contam com a química do ferro, manganês e cobre (HARTWIG e cols., 2001). O zinco ( $Zn^{2+}$ ) é o primeiro entre equivalentes na série de metais importantes biologicamente (WOLFGAND e LI, 2009). O zinco desempenha papel essencial nos sistemas biológicos, com uma variedade das funções desempenhadas pelas proteínas de ligação de zinco. Até 10% do proteoma humano é potencialmente capaz de ligar ao zinco *in vivo*, sendo a classe mais abundante a de metaloproteínas (Andreini e cols., 2005). Destas proteínas, foram registradas como segue: 397 proteínas de zinco são hidrolases; 302 são ligases, 167 são transferases; 43 são oxidoreduases e 24 são liases/isomerases. Existem 957 fatores de transcrição; 221 proteínas de sinalização; 141 proteínas de transporte/armazenamento; 53 proteínas dos sítios estruturais de metais; e 19 proteínas envolvidas no reparo do DNA, replicação e de tradução (WOLFGAND e LI, 2009). Além disso, muitas proteínas que ligam a zinco não têm função conhecida.

O íon zinco ( $Zn^{2+}$ ) exibe propriedades adequadas para funções catalíticas e estruturais das proteínas. Estas propriedades fazem do zinco o metal de transição mais comum observado em proteínas, embora sua concentração total no corpo humano (2-3 g) não o torna o mais abundante. A deficiência de zinco é prejudicial em muitos aspectos, para a função normal dos organismos, com notáveis efeitos sobre o crescimento e sistema imune (VALLEE e FALCHUK, 1993). Dada a importância e a diversidade de metaloproteínas e enzimas contendo zinco, a perturbação da homeostase do zinco, a deficiência de zinco através da dieta ou alterações genéticas em proteínas de zinco, estão

correlacionadas com o aparecimento de muitos com risco de vida e doenças como câncer e diabetes. Estes avanços resultaram no reconhecimento de enzimas ou outras proteínas que ligam ao zinco, as quais se tornam alvos moleculares para intervenção na doença (ANZELLOTTI e FARRELL, 2008). A compreensão da base molecular da bioquímica do zinco na Medicina e na doença tem sido facilitada pelos avanços em Biologia Molecular e técnicas espectroscópicas.

A concentração celular de zinco total está na faixa de centenas de micromolar. Contudo, a maioria do zinco está fortemente ligado, sendo a concentração no estado estacionário de íons zinco livre bastante baixa, na faixa de picomolar (WOLFGAND e LI, 2009). As concentrações de zinco no interior das células são rigorosamente controladas para cumprir todas as funções biológicas do zinco em proteínas e para evitar efeitos colaterais indesejados do excesso de íons zinco, tais como a sua influência sobre o enovelamento errado e a agregação de proteínas (**Figura 2.14**). As diferentes formas com que o zinco pode interagir com proteínas estão ilustradas e comentadas na **Figura 2.14**.



**Figura 2.14: Interações entre proteínas e zinco.** A) Intramolecular: Zinco se liga a ligantes próximos com tamanho ideal, auxiliando ao enovelamento correto ou ao mau enovelamento levando à agregação. O zinco também pode se ligar às proteínas pré-enoveladas. B) Intermolecular: Em sítios interfaciais, o zinco interage com várias cadeias peptídicas para estabelecer interações entre proteínas homólogas ou heterólogas. A formação de agregados pode ser devido a ambos, normal e processos aberrantes (Extraído de WOLFGAND e Li, 2009).

Durante sua vida biológica, cada proteína que tem afinidade por zinco, liga e libera zinco. Como o zinco é reincorporado a novas proteínas sintetizadas, o destino do zinco, uma vez que as proteínas de zinco são degradadas, é desconhecido. Interações dinâmicas entre zinco-proteína são importantes na regulação de proteínas, na detecção de zinco, no transporte de zinco através das membranas celulares, na redistribuição de zinco intracelular, e para as suas funções em proteínas em geral (WOLFGAND e LI, 2009). A influência da coordenação de zinco na dinâmica de proteínas, uma quarta dimensão na Biologia Estrutural, tem tornado evidente tanto nos sítios estruturais e quanto nos catalíticos que apresentam o zinco, proporcionando novas perspectivas sobre as funções de metais em proteínas.

#### ***Zinco na estrutura do domínio XIAP-BIR3 como possível alvo de novos fármacos***

O domínio XIAP-BIR3 apresenta um átomo de zinco, o qual é coordenado por três cisteínas conservadas (Cis300, Cis303 e Cis327) e uma histidina (His320) (Sun e cols., 2000). Um trabalho recente mostrou que o tratamento com o quelante de zinco permeável a membrana TPEN induz a rápida depleção de XIAP a nível pós-traducional em células de câncer de próstata. Além disso, TPEN foi capaz de promover a ativação de caspase-3 e -9, e sensibiliza células de câncer de próstata para apoptose mediada por TRAIL (MAKHOV e cols., 2008). Estas descobertas indicam que agentes quelantes de zinco podem ser usados para sensibilizar células malignas para a ação de agentes citotóxicos estabelecidos via diminuição de XIAP. O papel do zinco na estrutura, estabilidade e função do domínio XIAP-BIR3 ainda não foi descrito.

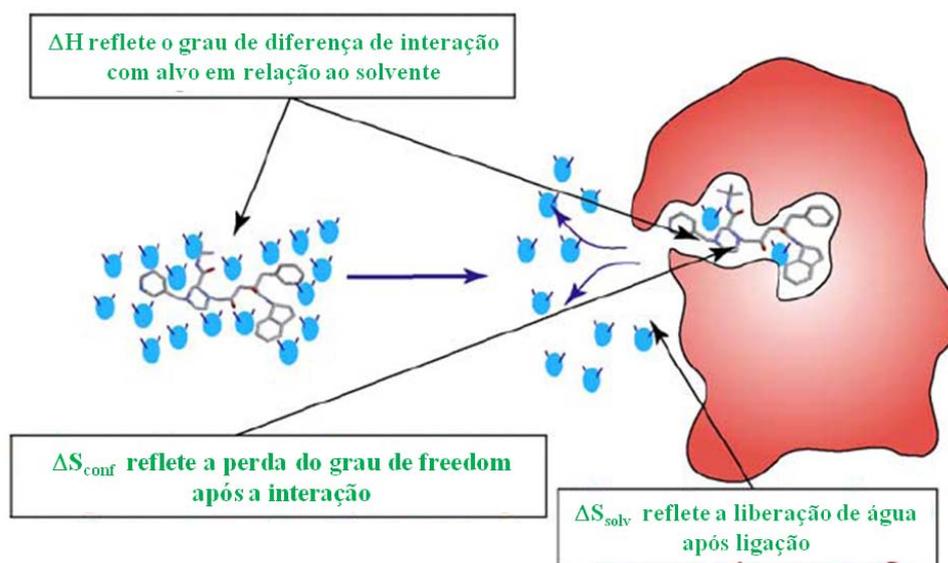
### 2.1.6. Termodinâmica de interação proteína-ligante e calorimetria aplicada à otimização do desenho racional de fármacos

A afinidade de interação é ditada pela energia de interação de Gibbs ( $\Delta G$ ),  $K_a = e^{-\Delta G/RT}$ , a qual é gerada de duas diferentes contribuições, a entalpia e a entropia ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ). Muitas diferentes combinações de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  podem resultar em uma mesma afinidade de interação.

Um dos mais importantes objetivos no desenvolvimento de novos compostos é a otimização de suas afinidades de ligação em direção ao alvo molecular, já que a afinidade de ligação é diretamente relacionada com sua potência. Além disso, este objetivo não pode comprometer importantes propriedades, tais como a solubilidade e biodisponibilidade. Recentes avanços experimentais e computacionais permitem monitorar as forças termodinâmicas que definem a afinidade de ligação, tais como as mudanças de entalpia e entropia, assim provendo importantes características para a otimização do processo de desenho racional de drogas (WEBER e SALEMME, 2003; LIANG, 2008). O acesso aos parâmetros da afinidade de ligação facilita o desenvolvimento de compostos de alta afinidade. Estes parâmetros podem ser medidos experimentalmente por Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC).

A mudança de entalpia reflete a força das interações entre a droga e a proteína-alvo em relação à força com o solvente. Uma entalpia favorável aumenta pelas interações de ligações de hidrogênio e van der Waals entre o fármaco e o alvo (RUBEN e cols., 2006), enquanto que a entalpia desfavorável está associada com a desolvatação de grupamentos polares (**Figura 2.15**) (FREIRE, 2004). A entalpia associada com a desolvatação de grupamentos apolares é em torno de uma ordem de magnitude menor que a de grupamentos polares (CABANI e cols., 1981). Dois termos definem a entropia de ligação:

um é a entropia relacionada à solvatação associada ao sítio de ligação com grupos hidrofóbicos expostos ao solvente, e segundo é a entropia conformacional (**Figura 2.15**) (RUBEN e cols., 2006).



**Figure 2.15: Principais fatores termodinâmicos relacionados à interação proteína-ligante.** A afinidade de pequenas moléculas ao seu alvo (vermelho) é determinada pelo balanço da magnitude das interações com o alvo e estas com a água do solvente (azul). Calorimetria isotérmica de titulação é a única técnica que mede diretamente a magnitude das forças associadas com a interação. Os mais importantes determinantes de uma ligação que podem ser controlados por pessoas que planejam fármacos são a entalpia de interação ( $\Delta H$ ), a entropia de solvatação ( $\Delta S_{\text{solv}}$ ) e as mudanças na entropia conformacional ( $\Delta S_{\text{conf}}$ ) (Adaptado de Freire, 2004).

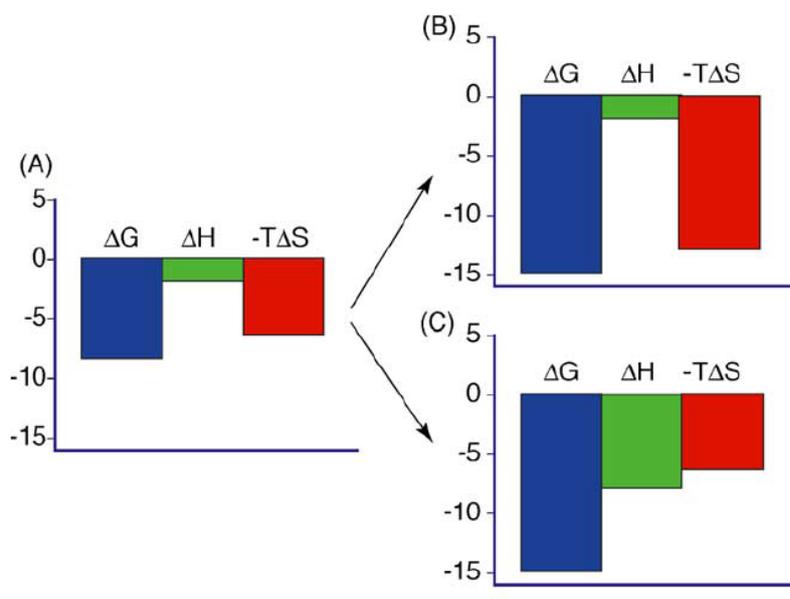
Uma mudança de entalpia favorável é obtida de uma ótima complementaridade de geometria entre a droga e o alvo e os locais das ligações de hidrogênio. Como estas interações são estereo-específicas, uma mudança de entalpia favorável não somente contribui para a afinidade, mas também para a seletividade (RUBEN e cols., 2006). A caracterização de todos os parâmetros termodinâmicos de diferentes ligantes fornece importantes informações para o entendimento das propriedades relacionadas às interações entre a droga e a proteína-alvo, favorecendo a otimização do desenho racional de drogas.

Alterações na estrutura do receptor por *fit* induzido ou seleção conformacional também são de extrema importância para a afinidade de um ligante ao seu alvo, visto que:

$$\Delta G_{\text{total}} = \Delta G_{\text{interação}} + \Delta G_{\text{conformacional}} (\Delta H_{\text{conformacional}} + \Delta S_{\text{conformacional}})$$

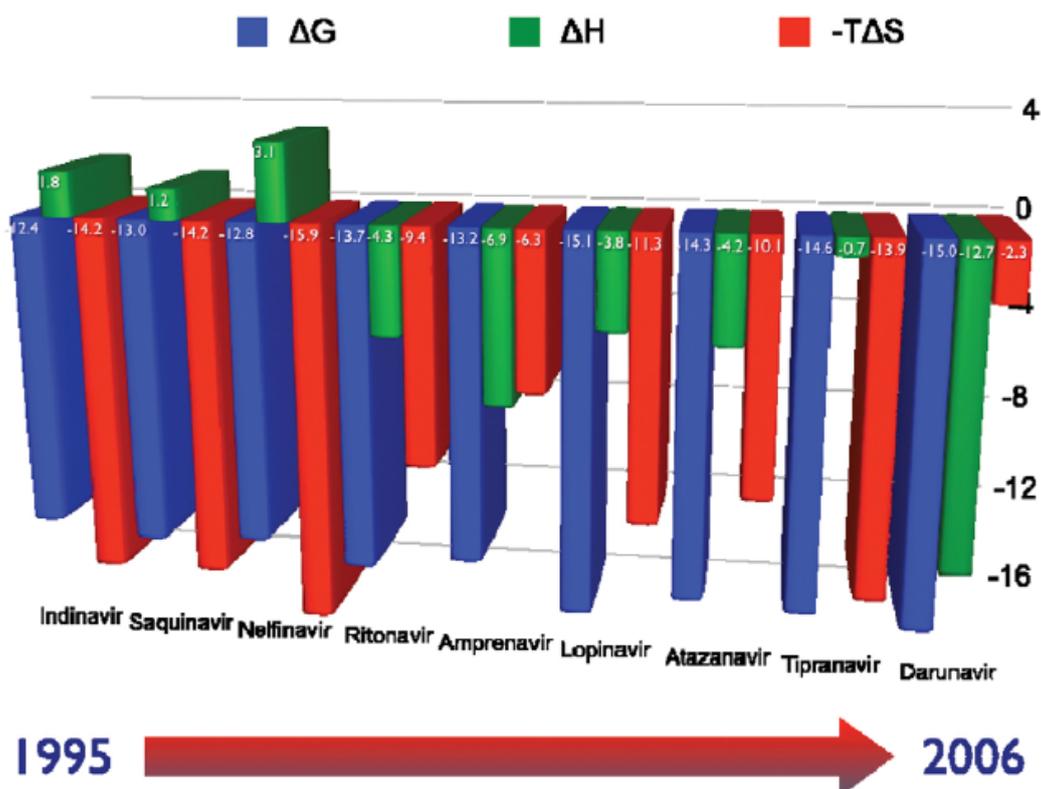
Assim, o ganho de estrutura em uma proteína após interação a um ligante pode levar a um aumento da entalpia favorável e à perda de entropia conformacional, e vice-versa. Um aumento da entalpia favorável pode ser devido ao calor liberado pela formação de ligações de hidrogênio na estabilização de estrutura secundária. Assim, a correlação de dados estruturais com dados calorimétricos pode levar a um melhor entendimento da interação proteína-ligante, auxiliando, desta forma, no desenvolvimento de estratégias para o desenho racional de fármacos.

Outro fator importante a ser analisado no estudo de interações proteínas-ligantes é a compensação entálpico-entrópica que pode acontecer com mais ou menos intensidade (WHITESIDES & KRISHNAMURTHY, 2005). Este fenômeno pode dificultar o desenho de uma droga com maior potência, já que possíveis alterações entrópicas são dificilmente caracterizadas. Assim, a compreensão de como esta compensação acontece em um modelo biológico fornece mais informações para o desenho de uma droga. No processo de otimização, termodinamicamente busca-se o aumento da contribuição favorável da entalpia ou entropia (**Figura 2.16**), e de forma ideal de ambos.



**Figura 2.16: Otimização termodinâmica de fármacos.** Assinatura termodinâmica para um composto hipotético com afinidade de 1  $\mu\text{M}$  (painel A) e das potenciais otimizações (painéis B e C). O composto no painel B foi otimizado entropicamente, enquanto o do painel C foi otimizado entalpicamente. Embora ambos os compostos tenham a mesma afinidade, eles provavelmente terão propriedades diferentes (ex: seletividade), pois as mudanças de entalpia e entropia são originadas de diferentes tipos de interações (Extraído de FREIRE, 2004).

A entalpia de interação é notavelmente mais difícil de otimizar que a entropia de interação, e tal fato tem resultado em moléculas desbalanceadas termodinamicamente, o que dificulta a otimização da potência. Contudo, o papel da entalpia de ligação durante a evolução de fármacos pode ser apreciável por considerar dois exemplos da literatura, para os quais dados termodinâmicos para séries completas de fármacos estão disponíveis (Freire, 2008). A progressão de inibidores de proteases de HIV-1, principais componentes na quimioterapia de AIDS, e a progressão de estatinas, fármacos utilizados ao combate do colesterol alto, estão entre as mais descritas no mundo. Na **Figura 2.17** mostra a assinatura termodinâmica de todos inibidores de proteases do HIV-1 aprovados pelo FDA, na qual fica evidenciada a importância da entalpia na evolução de fármacos.



**Figura 2.17: A assinatura termodinâmica de inibidores da protease de HIV-1 aprovados pelo FDA.** É aparente que as melhores entalpias têm acompanhado a pesquisa para inibidores com melhor afinidade de interação, seletividade e perfil de resistência a fármacos. Todos os inibidores de protease com afinidade picomolar têm entalpia de ligação favorável (Extraído de Freire, 2008).

Assim, análises calorimétricas da interação de ligantes com proteínas alvos fornecem informações que dificilmente podem ser obtidas por outras técnicas. Estas informações são de extrema importância no desenho de drogas baseadas na estrutura. Nos últimos dois anos, devido à enorme importância da correlação entre dados estruturais e calorimétricos, o programa PDBcal foi desenvolvido (LI e cols., 2008). Neste banco de dados, a estrutura de uma proteína complexada a um determinado ligante é depositada, juntamente com todos os parâmetros termodinâmicos da interação. Este programa foi criado com base nas observações de que compostos desenhados a partir de determinadas estruturas, não apresentam nenhum aumento na afinidade, como esperado pelas análises estruturais, devido ao fenômeno de compensação entropia-entalpia. Neste contexto, a

relação estrutura/atividade (SAR, "structure/activity relationship"), que incorpora explicitamente a interface entre entalpia e entropia, acelera o processo de otimização de fármacos (FREIRE, 2008).

Outra propriedade termodinâmica bastante importante em associações moleculares é a variação da capacidade calorífica ( $\Delta C_p$ ). A mais significativa consequência das mudanças de solvatação em interações termodinâmicas provavelmente se relaciona com a variação na capacidade calorífica. Interações hidrofóbicas, devido à liberação de moléculas de água da camada de solvatação para o solvente, levam a uma variação negativa da capacidade calorífica (Sturtevant, 1977). Porém, já é bem sabido que alterações na capacidade calorífica não estão somente ligadas a interações hidrofóbicas, mas à cooperatividade das interações fracas (Cooper, 2005; Cooper e cols., 2007). Assim, a partir deste parâmetro, podemos ter uma ideia da contribuição de forças hidrofóbicas em interações moleculares. Além disso, grandes alterações na flexibilidade de uma proteína também contribuem para mudanças da capacidade calorífica. Alterações conformacionais ou o processo de seleção conformacional associado a uma interação pode levar a um estado com menor flexibilidade, com uma diminuição na capacidade calorífica ( $\Delta C_p$  negativo) (STURTEVANT, 1977). Todas estas características auxiliam no entendimento do reconhecimento molecular, e conseqüentemente podem auxiliar o planejamento de novos candidatos a fármacos.

O parâmetro capacidade calorífica relaciona-se à quantidade de calor que uma molécula tem que absorver para que um mol de proteína possa mudar de 1 K. No estudo da estabilidade protéica, a variação da capacidade calorífica refere-se à diferença entre as capacidades caloríficas do estado nativo menos o desnaturado. A medida dessas quantidades termodinâmicas fornece uma descrição termodinâmica completa de uma transição nativo- desnaturado, pois a partir delas podemos obter uma função de capacidade

calorífica ( $C_p \times T$ ) (HAYNIE, 2001). A estabilização de proteínas na presença de ligantes também pode ser utilizada como parâmetro para rastreamento de possíveis fármacos (BRUYLANTS e cols., 2005). A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) pode ser utilizada para o rastreamento de ligantes de alta afinidade, já que fornece a temperatura de desnaturação da proteína, que pode ser alterada na presença de um ligante (HOLDGATE e WARD, 2005). Além disso, podemos obter a variação de entalpia de desnaturação que está associada à estrutura da proteína, e ainda as mudanças nesta promovidas por ligantes.

Nesta parte do trabalho, caracterizamos parâmetros importantes da interação de diferentes peptídeos ao domínio BIR3 da proteína inibidora de apoptose XIAP por ITC. Estudos das alterações da estabilidade do domínio XIAP-BIR3 provocadas por peptídeos foram realizados por DSC. A partir da correlação com dados estruturais e com informações da dinâmica molecular (simulação de dinâmica molecular ou RMN), revelamos importantes características que auxiliam no entendimento da natureza da inibição da XIAP e adicionamos novas informações que devem ser consideradas no desenho racional de novos candidatos a fármacos anti-apoptóticos para o combate de malignidades.

## 2.2. Objetivos

### *Objetivo geral*

Neste trabalho, temos como objetivo investigar aspectos estruturais, dinâmicos e termodinâmicos que envolvem a inibição da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP, utilizando principalmente medidas espectroscópicas e calorimétricas.

### *Objetivos específicos 1: Análise estrutural e termodinâmica da interação do tetrapeptídeo AVPI ao domínio BIR3 da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP.*

- ✓ Expressar e purificar o domínio XIAP-BIR3;
- ✓ Caracterizar estruturalmente o domínio BIR3 por medidas de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular;
- ✓ Estudar a estabilidade do domínio XIAP-BIR3 e do complexo BIR3-AVPI frente a agentes desnaturantes químicos e físicos, comparativamente;
- ✓ Verificar os parâmetros termodinâmicos da interação do domínio XIAP-BIR3 com o tetrapeptídeo AVPI por calorimetria;
- ✓ Caracterizar parâmetros termodinâmicos de desnaturação do domínio XIAP-BIR3 e os efeitos da ligação do tetrapeptídeo AVPI;
- ✓ Verificar os efeitos da ligação do AVPI na estrutura secundária e dinâmica do domínio XIAP-BIR3 a partir de simulação de dinâmica molecular;
- ✓ Verificar os efeitos da ligação do AVPI na dinâmica do domínio XIAP-BIR3 a partir de ressonância magnética nuclear.

***Objetivos específicos 2: Análise estrutural e termodinâmica da interação de diferentes peptídeos ao domínio BIR3 da Proteína Inibidora de Apoptose XIAP.***

- ✓ Expressar e purificar o domínio XIAP-BIR3;
- ✓ Caracterizar estruturalmente o domínio BIR3 e as possíveis mudanças conformacionais na presença de diferentes peptídeos por medidas de dicroísmo circular;
- ✓ Caracterizar parâmetros termodinâmicos de interação do domínio BIR3 com diferentes peptídeos, tais como variação de entalpia e entropia, afinidade e estequiometria, utilizando calorimetria de titulação isotérmica (ITC);
- ✓ Verificar a alteração da estabilidade do domínio BIR3 na presença de diferentes peptídeos, utilizando calorimetria diferencial de varredura (DSC);
- ✓ Correlacionar os dados termodinâmicos da interação dos diferentes peptídeos ao domínio XIAP-BIR3 com dados estruturais, com o intuito de favorecer o entendimento da natureza da inibição do domínio XIAP-BIR3 por ligantes;
- ✓ Utilizar simulação de dinâmica molecular no auxílio do entendimento dos efeitos dos ligantes na estrutura e estabilidade do domínio XIAP-BIR3;
- ✓ Rastrear diferenças de interações locais que justifiquem as diferenças do perfil termodinâmico de interação dos diferentes ligantes peptídicos com o domínio XIAP-BIR3 utilizando simulação de dinâmica molecular;
- ✓ Realizar análises de estruturas do domínio XIAP-BIR3 depositadas no sítio “Protein Data Bank (PDB)” na presença de diferentes ligantes com o intuito da identificação de alterações estruturais comuns a certos ligantes.
- ✓ Fornecer novas informações que favoreçam o desenho de drogas pró-apoptóticas mais potentes e específicas contra o câncer.

***Objetivos específicos 3: O papel do íon zinco na estrutura, estabilidade termodinâmica e função do domínio XIAP-BIR3.***

- ✓ Expressar e purificar o domínio XIAP-BIR3;
- ✓ Caracterizar as possíveis mudanças conformacionais associadas à retirada do íon zinco do domínio XIAP-BIR3 por medidas de dicroísmo circular;
- ✓ Caracterizar a importância de íon zinco para a estabilidade do domínio XIAP-BIR3 utilizando espectroscopia de fluorescência e calorimetria diferencial de varredura (DSC), assim como sua influência nos parâmetros termodinâmicos de desnaturação ( $\Delta G$  e  $\Delta H$ );
- ✓ Verificar se após a retirada do zinco o XIAP-BIR3 mantém sua capacidade de inibir caspases a partir de espectroscopia de fluorescência e calorimetria de titulação isotérmica (ITC);
- ✓ Utilizar simulação de dinâmica molecular no auxílio do entendimento do papel do zinco na estrutura e estabilidade do domínio XIAP-BIR3;
- ✓ Validar, estruturalmente, o íon zinco como um alvo para o desenho de fármacos que visam retirar a atividade de IAPs em células cancerosas.

## **2.3 – Material e Métodos**

### **2.3.1 – Reagentes**

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico. A água é destilada e deionizada em um sistema de purificação de água Millipore. Os tampões utilizados são obtidos da Sigma Chemical Co., bem como a ureia e o hidrocloreto de guanidina.

### **2.3.2 - Peptídeos**

Os tetrapeptídeos ligantes do domínio XIAP-BIR3 foram sintetizados pela Genemed Syhthesis Inc. (South San Francisco, CA). A identidade e a pureza (95%) foram determinadas por análise de aminoácidos, espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta resolução.

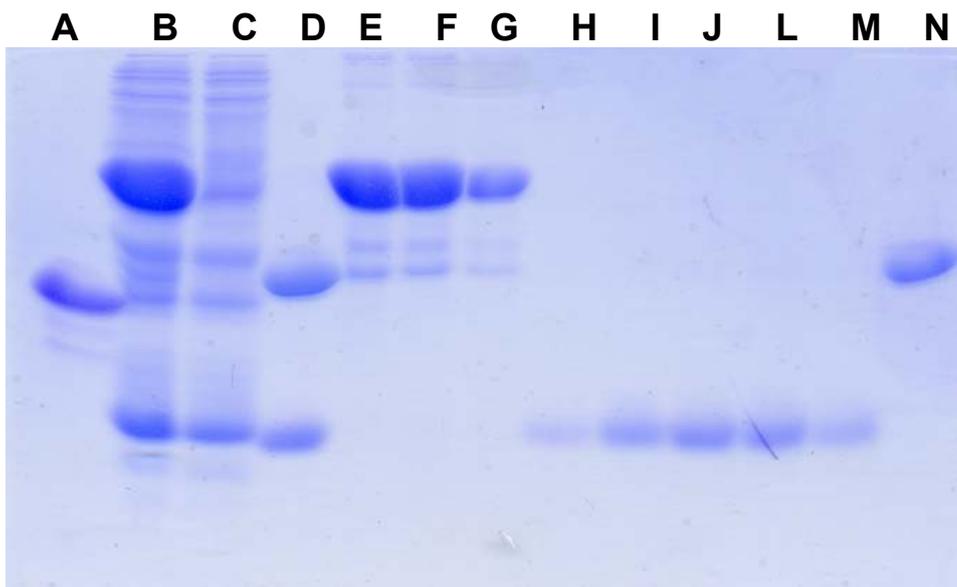
### **2.3.3 – Transformação das Células Competentes por Eletroporação**

As células BL21 (DE3) competentes foram eletroporadas para inserir o plasmídeo pET15b, gentilmente cedido pelo Prof. Yigong Shi (Princeton University, USA), contendo a sequência da proteína XIAP-BIR3, na razão de 40  $\mu$ L de bactéria para 1  $\mu$ L de plasmídeo. Após eletroporação, as células foram imediatamente transferidas para 1 mL de meio LB e crescidas em um agitador rotatório a 37°C por 1 hora. Por fim, as células foram plaqueadas em placas com agar sólido e ampicilina 0,1 mg/mL e colocadas em estufa a 37°C por 12 horas (CHUNG e cols., 1989).

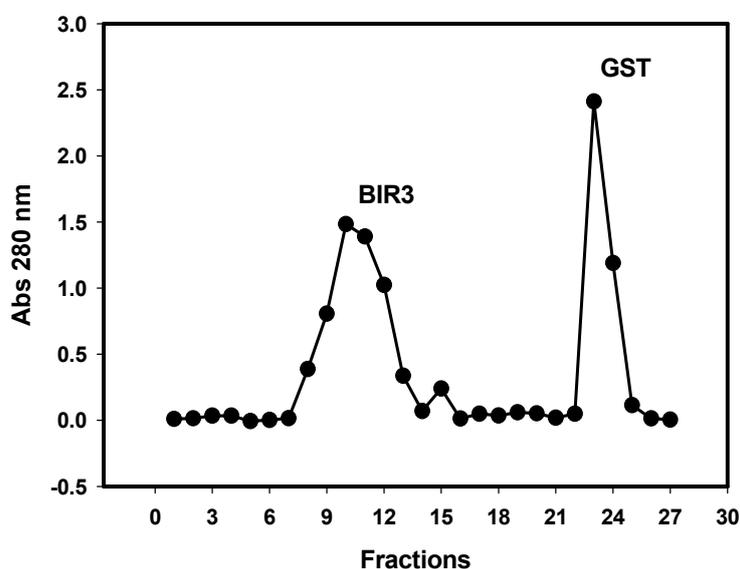
### 2.3.4 – Expressão e Purificação do Domínio BIR3 da Proteína

#### XIAP

As bactérias transformadas, depois de induzida a expressão do domínio específico por 5 h com IPTG, foram centrifugadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, os clones congelados foram ressuspensos em tampão de lise (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM, DTT 2 mM, pH 7,3) e, posteriormente, sonicados por 10 ciclos de 10 segundos cada, com intervalos de 1 minuto. Após a lise, a amostra foi centrifugada e os restos celulares precipitados foram eliminados. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de afinidade por GST anteriormente equilibrada com um tampão de ligação (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM, DTT 2 mM, pH 7,3). Enquanto o domínio BIR3 da XIAP fusionado a GST fica retido na coluna, as outras proteínas indesejáveis presentes no sobrenadante são eluídas. Após a aplicação da amostra, é feita a passagem de mais tampão de ligação até a eliminação de proteínas contaminantes. Este monitoramento foi realizado coletando amostras e medindo a absorvância a 280 nm até a obtenção de uma D.O. próxima a zero. Em seguida, realizamos a eluição do domínio BIR3 fusionado a GST utilizando o tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM, Glutathione reduzida 10 mM, DTT 1 mM, pH 8,0). A verificação da pureza da amostra foi realizada por gel SDS-PAGE (**Figura 2.18**). A clivagem para a retirada da cauda GST foi realizada a partir da atividade da trombina de plasma humano (Sigma Chemical CO.), que era estocada em água contendo 1000 unidades por mL, e a remoção da cauda da amostra foi obtida por nova passagem na coluna, onde a GST ligava-se e o domínio era eluído (**Figuras 2.18 e 2.19**). Incubamos o domínio BIR3 fusionado a GST em diferentes concentrações de trombina e coletamos amostras em tempos variados para a verificação da melhor condição de clivagem.

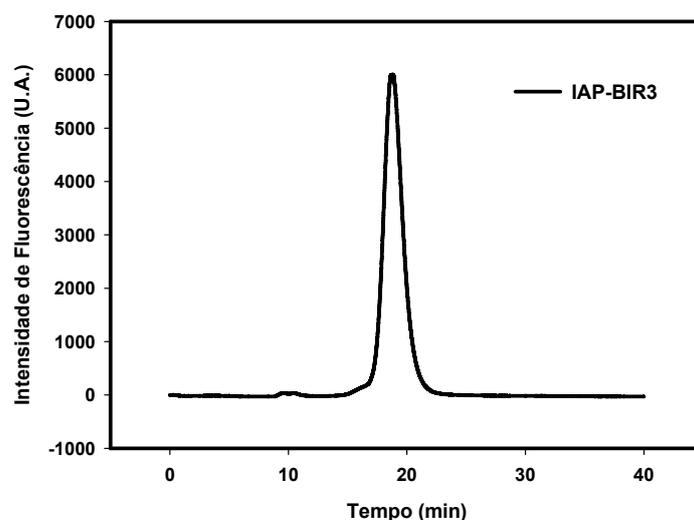


**Figura 2.18: Etapas da purificação do domínio BIR3 analisadas por SDS-PAGE 15%.** A- Proteína controle de 21 kDa. B- Extrato extraído após lise celular. C- Extrato após passagem na coluna, onde nota-se que o BIR3 é retido na coluna. D- Cauda GST e o domínio BIR3 após clivagem com trombina. E, F e G- Domínio BIR3 fusionado à cauda GST após eluição na coluna. H, I, J, L e M- Domínio BIR3 puro após remoção da cauda e da trombina. N- Cauda GST eluída pura após segunda passagem na coluna GSTrap. Os respectivos pesos equivalentes as bandas estão indicados ao lado em kDa.



**Figura 2.19: Retirada da cauda GST pós-clivagem verificada por absorvância a 280 nm.** O primeiro pico corresponde ao domínio BIR3 (e trombina em concentrações menores) e o segundo, à cauda GST.

Dessa forma, verificamos a concentração ideal e o melhor tempo para a total clivagem a partir da análise por eletroforese SDS-PAGE (dados não mostrados). Para finalização e confirmação da purificação, além da retirada da trombina, passamos a amostra em uma coluna de gel-filtração (Superdex 75), como pode ser observado na **Figura 2.20**. Além disso, confirmamos a pureza por SDS-PAGE. A quantificação foi realizada a partir da leitura da absorbância em 280 nm em espectrofotômetro, e o cálculo da concentração do domínio foi realizado utilizando o coeficiente de extinção molar ( $30.440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), extraído do programa ProtParam encontrado no servidor EXPASY. O coeficiente de extinção molar foi obtido a partir da estrutura primária do domínio XIAP-BIR3. As condições para os espectros de absorbância foram cloridrato de guanidina 6 M, em tampão fosfato 20 mM, pH 6,5.



**Figura 2.20: Verificação da pureza do domínio XIAP-BIR3 após gel-filtração em HPLC.** A passagem final pela coluna de gel filtração (coluna Superdex 75) confirma o grau de pureza do domínio BIR3 e elimina a presença de contaminantes como a trombina.

### 2.3.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida, sistema BIO-RAD, com o objetivo de monitorar as etapas de expressão e purificação e verificar o grau de pureza final da amostra (**Figura 2.18**). No gel, a fase separadora consiste de uma concentração de 15% de acrilamida para o domínio XIAP-BIR3. A fase concentradora requer uma concentração de 4% em pH 6,8. A eletroforese foi realizada com uma corrente constante a 25 mA por aproximadamente 90 min. O tampão de corrida usado foi Tris-glicina pH 8,3 (Tris 15,5 g/L, glicina 94 g/L e SDS 10%). O gel foi corado com uma solução 0,1% de Comassie Brilliant Blue G, 40% de metanol e 10% de ácido acético por 2 h, e descorado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético (Laemmli, 1970).

### 2.3.6 – Agentes desnaturantes químicos

O preparo de nossas soluções estoques de hidrocloreto de guanidina e ureia foi realizado pesando quantidades calculadas estequiometricamente para as concentrações de 7 M e 10 M, respectivamente. As concentrações foram aferidas e confirmadas a partir de medidas do índice de refração e utilizando as equações abaixo:

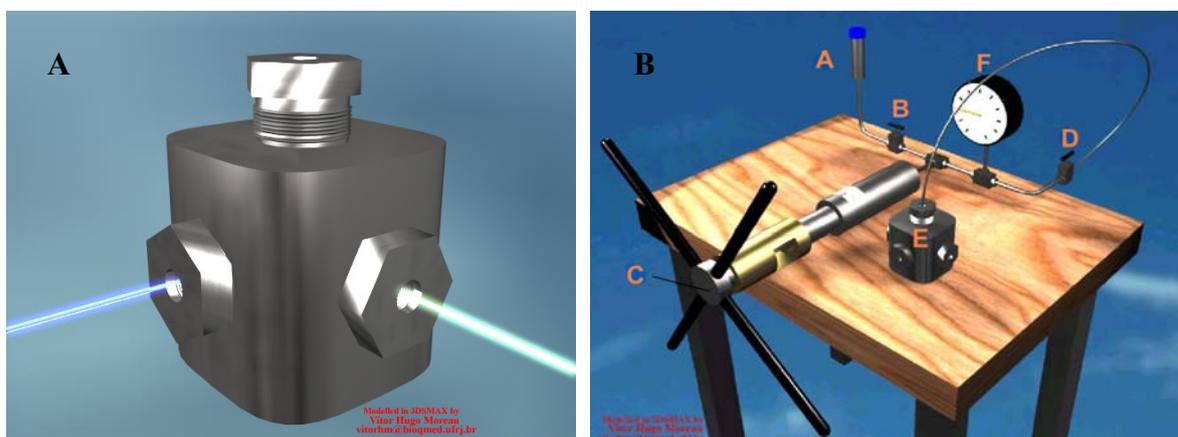
$$\text{Para ureia: } 117,66(\Delta N) + 29,753 (\Delta N)^2 + 185,56 (\Delta N)^3 \quad \text{Eq. (2.1)}$$

$$\text{Para GdnHCl: } 57,147(\Delta N) + 38,68(\Delta N)^2 - 91,60(\Delta N)^3 \quad \text{Eq. (2.2)}$$

onde o  $\Delta N$  é a diferença do índice de refração entre a solução desnaturante e o tampão (CREIGHTON, 1997).

### 2.3.7 – Pressão Hidrostática e Termodinâmica

A célula de alta pressão (**Figura 2.21A**) foi descrita por Paladini & Weber (1981) e fabricada pela ISS Inc. (Urbana-Champaign, IL). A célula de pressão é de aço vascomax e equipada com três janelas ópticas de quartzo ou safira (SILVA e cols., 1992), além de uma abertura superior por onde é colocada a cubeta de quartzo em forma de garrafa e é acoplado um tubo flexível que conecta a bomba ao gerador de pressão. Esta cubeta é fechada na sua extremidade por um tubo flexível de polietileno, que equaliza a pressão entre o meio hidrostático (etanol) e a amostra que se encontra no interior da cubeta. A célula de pressão também suporta diferentes temperaturas pelo acoplamento de um banho-maria circulatório (Fisher Scientific). O uso de gás nitrogênio também se faz necessário para evitar a condensação de água na superfície óptica durante os experimentos a temperaturas inferiores a 4°C, o que não foi caso aqui, pois todos os nossos experimentos foram realizados a 25°C, exceto os que utilizamos alta temperatura.



**Figura 2.21: Sistema de alta pressão hidrostática.** Ilustração dos componentes do sistema de alta pressão. **(A)** Célula de pressão e as suas janelas ópticas. **(B)** Componentes do gerador de pressão: A- reservatório de etanol; B- válvula que controla a saída do etanol para o gerador de pressão; C- gerador manual de pressão; D- válvula que controla a saída do etanol do gerador de pressão para a célula de pressão; E- célula de pressão onde é colocada a amostra; F- manômetro que afere a pressão aplicada na amostra.

Toda a célula de pressão é preenchida com etanol absoluto, escolhido por possuir um índice de refração muito similar ao do quartzo, o que impede o desvio da luz até a amostra. A luz incidida sobre a amostra é coletada num ângulo de 90°, permitindo que o monitoramento da fluorescência emitida seja feito antes, durante e depois da aplicação da pressão.

O segundo componente do sistema de pressão é o gerador de pressão propriamente dito (**Figura 2.21B**). Ele é composto por um pistão operado manualmente, que tem por objetivo comprimir o etanol no interior da tubulação e, conseqüentemente, a amostra. Esta compressão se dá por duas válvulas que controlam o fluxo de etanol no tubo conectado à bomba. A pressão gerada no sistema é acompanhada por um manômetro.

A alta pressão é um método que nos permite perturbar de maneira controlada a estrutura de diversas proteínas, com o objetivo de explorar os fatores que determinam o enovelamento de proteínas bem como a montagem de estruturas virais. A pressão hidrostática apresenta algumas vantagens sobre as outras formas de perturbação da estrutura das proteínas, por ser uma variável física que, ao contrário da temperatura, não altera a energia interna do sistema, afetando somente o volume do sistema formado pela proteína e solvente (WEBER & DRICKAMER, 1983; WEBER, 1987). Outra vantagem é que o processo de desnaturação em alguns casos pode ser completamente reversível, e, além disso, a pressão não provoca diretamente alterações significativas na estrutura secundária, promovendo mais significativamente mudanças na estrutura terciária e quaternária das proteínas (WEBER & DRICKAMER, 1983).

As interações que mantêm a estrutura tridimensional de proteínas monoméricas, também mantêm proteínas oligoméricas. Estas interações compreendem ligações como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. De uma forma geral, o enovelamento de uma proteína, ou a associação de

proteínas, gera um aumento no volume devido à formação de cavidades que excluem o solvente das proximidades dos aminoácidos (Silva & Weber, 1993). Estas cavidades são chamadas de volumes mortos e foram observadas por experimentos de cristalografia de raios-X. Sendo assim, a pressão hidrostática, quando aplicada a estruturas protéicas, pode afetar as interações entre cadeias diferentes, promovendo a dissociação, como também entre segmentos de uma mesma cadeia, promovendo a desnaturação (SILVA & WEBER, 1993; MOZHAEV e cols., 1994; GROß e cols., 1994).

De acordo com o princípio de Le Chatelier, o aumento da pressão causa um deslocamento do equilíbrio no sentido das espécies que ocupam menor volume, como por exemplo, as formas dissociadas, onde moléculas de água penetram em cavidades “mortas” rompendo interações e aumentando a camada de solvatação.

Em nossos experimentos com alta pressão hidrostática, utilizamos XIAP-BIR3 10  $\mu$ M ou XIAP-BIR3 10  $\mu$ M + AVPI 30  $\mu$ M em tampão Tris 15 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM e DTT 1 mM.

## **2.3.8 – Medidas Espectroscópicas**

### **2.3.8.1 – Espectroscopia de Fluorescência**

Os espectros de fluorescência do domínio XIAP-BIR3 foram obtidos em um espectrofluorímetro modelo ISS K2 (ISS Inc., Champaign, IL). Os princípios da técnica estão descritos na seção 1.3.10.1 da parte 1 desta tese.

No presente estudo, acompanhamos a emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano domínio XIAP-BIR3, que são aminoácidos hidrofóbicos bastante sensíveis a qualquer mudança de polaridade do meio (LAKOWICZ, 1999). Sendo assim, a mudança

na emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano, quando excitados em um determinado comprimento de onda, reflete nada mais que as mudanças de polaridade do ambiente em que eles se encontram (LAKOWICZ, 1983). Assim, podemos acompanhar a interação da proteína XIAP-BIR3 a diferentes ligantes, ou a alteração estrutural promovida por certas condições, pela mudança no espectro de emissão de fluorescência do triptofano. Por exemplo, à medida que os triptofanos são internalizados, o centro de massa do espectro passa para comprimentos de onda menores e mais energéticos. Nos ensaios de interação do domínio XIAP-BIR3 com os peptídeos, à medida que há a interação os seus triptofanos passam a experimentar um meio mais apolar, estes passam então a emitir fluorescência em comprimentos de onda menores e mais energéticos, uma vez que parte dessa energia é gasta para ocorrer uma reorientação das moléculas do solvente. Triptofanos em ambientes menos expostos ao solvente sofrem menos os efeitos de relaxação do solvente.

### **2.3.8.2 – Dicroísmo Circular**

A medida de dicroísmo circular nos dá uma ideia da estrutura secundária de proteínas ou de peptídeos, além disso nos permite verificar possíveis mudanças provocadas pela interação de ligantes ou como verificar um processo de desnaturação promovido por agentes desnaturantes. A grande vantagem desta técnica, em comparação a técnicas que proporcionam resolução atômica, tais como ressonância magnética nuclear e cristalografia por difração de raios-X, é a rapidez de informação e as baixas concentrações necessárias (na faixa de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  M).

Nos experimentos de desnaturação do domínio XIAP-BIR3, as amostras foram diluídas a uma concentração de 10  $\mu$ M em tampão Tris 15 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, a pH 7,4. Estas amostras foram incubadas com cada concentração de ureia durante a noite e a leitura foi realizada em cubeta de 0,2 cm. Para os ensaios de interação com XIAP-

BIR3, foi utilizada uma concentração de 150  $\mu\text{M}$  do domínio, e em relação ao complexo uma concentração de 150  $\mu\text{M}$  de XIAP-BIR3 e 450  $\mu\text{M}$  de cada peptídeo respectivo (razão 1:3 domínio: peptídeo). Estes ensaios foram realizados em tampão fosfato 15 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, a pH 7,4. A leitura foi realizada em uma cubeta de 0,01 cm. O espectropolarímetro usado foi o modelo Jasco J-715 1505 e os espectros foram adquiridos na faixa do UV nos comprimentos de onda de 260 a 190 nm, a cada 0,2 nm.

### **2.3.9 – Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)**

A cromatografia de gel filtração consiste em passar uma mistura de proteínas através de uma coluna contendo uma matriz gelatinosa com pequenas esferas porosas, onde pequenas moléculas que conseguem entrar nos poros arrastam-se lentamente por dentro de sucessivos poros à medida que passam pela coluna, ao contrário das maiores, que se movem mais rapidamente e são eluídas num tempo menor. A coluna de gel filtração utilizada foi a Superdex 75, com um fluxo de 0,5 mL/min para o domínio XIAP-BIR3. O sistema foi equilibrado em tampão Tris-Cl 15 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, a pH 7,4, para o domínio XIAP-BIR3, sendo filtrado e deaerado em sistema Millipore. A eluição das amostras foi monitorada por absorbância a 280 nm.

### **2.3.10 – Calorimetria**

#### **2.3.10.1 – Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)**

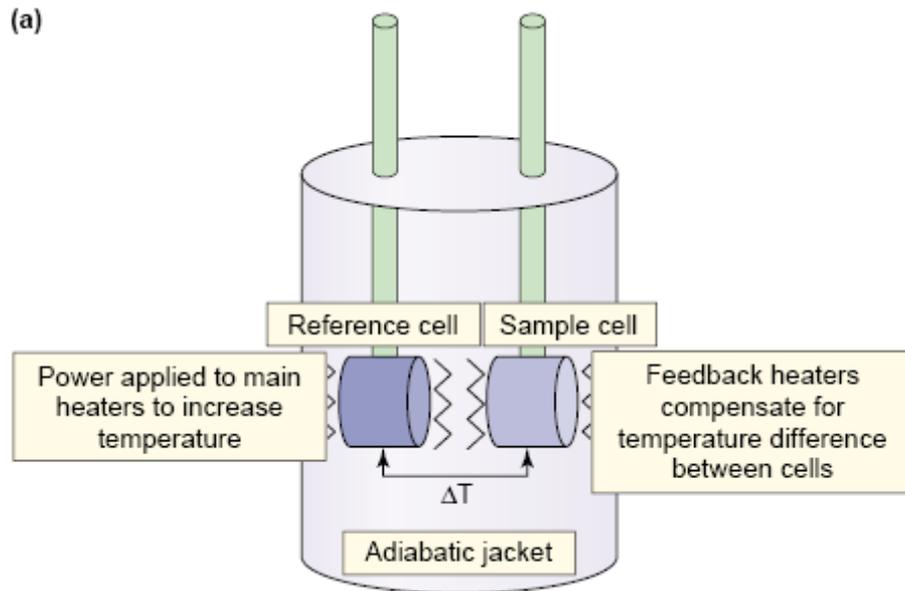
Os experimentos de ITC (“Isothermal Titration Calorimetry”) foram realizados em colaboração com a Professora Maria Lucia Bianconi, do Instituto de Bioquímica

Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os princípios da técnica estão descritos na seção 1.3.13 da parte 1 desta tese.

Os experimentos de ITC foram realizados usando o aparelho VP-ITC da MicroCal. XIAP-BIR3 (10  $\mu\text{M}$ ) e peptídeos (500  $\mu\text{M}$ ) foram solubilizados em Tris-Cl 15 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 7,4. As amostras foram degaseificadas sob vácuo antes das titulações. A titulação de BIR3 com AVPI envolveu 25 injeções de 3  $\mu\text{L}$  cada de solução ligante (1 x 1  $\mu\text{L}$  e 24 x 3  $\mu\text{L}$ ). Em todos os casos, a solução de AVPI foi injetada em intervalos de 5 minutos. A temperatura da titulação foi de 10, 25 ou 37°C para o AVPI e a 25°C para os outros peptídeos. O calor de diluição dos peptídeos foi subtraído dos dados de titulação do XIAP-BIR3. A primeira injeção de cada experimento não foi levada em consideração nas análises dos dados, sendo que pelo menos três experimentos em cada temperatura foram analisados separadamente, permitindo o cálculo de um valor médio dos parâmetros termodinâmicos e de ligação.

### **2.3.10.2 – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

A partir da calorimetria diferencial de varredura conseguimos medir a diferença de capacidade calorífica entre duas soluções. Dessa forma, podemos determinar parâmetros importantes de uma proteína, tal como estabilidade. O instrumento de DSC está ilustrado na **Figura 2.22**.

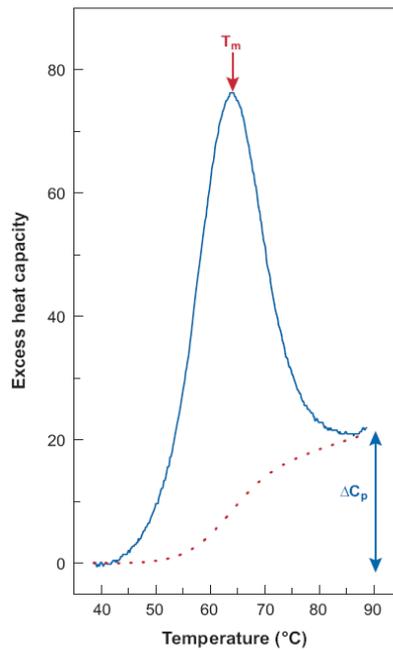


**Figura 2.22: Representação esquemática de um típico instrumento de Calorimetria Diferencial de Varredura.** A partir de um sistema de compensação, conseguimos medir a diferença de capacidade calorífica entre duas soluções, que ficam armazenadas em celas separadas em um sistema adiabático (Extraído de HOLDGATE e WARD, 2005).

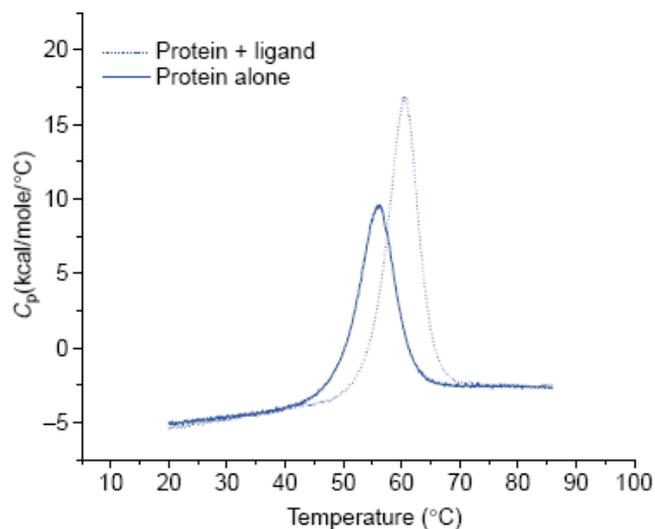
45

A **Figura 2.23** está ilustrando um exemplo típico de calorimetria diferencial de varredura. Detalhes de obtenção de dados são descritos na legenda da figura.

A partir desta técnica podemos determinar importantes parâmetros de estabilidade de uma proteína, tais como a temperatura média de desnaturação e a variação de entalpia de desnaturação. Desta forma, podemos indicar efeitos de ligantes sobre a estrutura de uma proteína (**Figura 2.24**).



**Figura 2.23: Experimento típico de calorimetria diferencial de varredura.** A partir de uma curva de temperatura, podemos obter a temperatura média de desnaturação ( $T_m$ ) como indicado, assim como a variação de entalpia de desnaturação, que é definida pela área formada na transição, e a variação da capacidade calorífica, a qual é definida pelo desvio da linha de base após a desnaturação (Extraído de CHAIRES, 2008).



**Figura 2.24: Dados normalizados retirados de um experimento típico de DSC.** Este experimento mostra um dado de uma proteína (linha sólida) e o aumento na temperatura de desenovelamento na presença do ligante (linha pontilhada). Podemos observar o aumento da  $T_m$ , pelo desvio do pico que define a temperatura de desenovelamento ( $T_m$ ) e um aumento na área sobre o pico é o calor de desenovelamento ( $\Delta H$ ) (Extraído de HOLDGATE e WARD, 2005).

### **2.3.11 - Simulação de Dinâmica Molecular**

Simulações de dinâmica molecular ajudam na compreensão dos processos bioquímicos e dão uma dimensão dinâmica aos dados estruturais. Por causa disto, tornaram-se a ferramenta chave para a investigação de biomoléculas. Com este método podemos partir de estruturas obtidas experimentalmente ou de modelos e simular comportamentos das proteínas em solução através de cálculos computacionais. Desta forma é possível monitorar, em escala atômica, mudanças conformacionais da molécula que estejam associadas a sua atividade biológica na escala de nanossegundos. Podemos também estudar interações da proteína com os possíveis ligantes fisiológicos e a importância destas interações para a estabilidade do XIAP-BIR3, em nosso caso.

#### **2.3.11.1 - Métodos de Análise utilizados**

##### ***Desvio da Raiz Média Quadrática***

O Desvio da Raiz Média Quadrática (RMSD do inglês *Root Mean Square Deviation*) (SPIEGEL, 1994) é o resultado do cálculo realizado para a comparação de dois conjuntos de dados. Sua aplicação neste trabalho é o cálculo para a comparação das coordenadas dos átomos (excluindo o solvente) ao longo do tempo das simulações em relação à estrutura inicial como referência, o que nos fornece uma ideia do equilíbrio do sistema. Nesse caso, temos um gráfico do desvio global da estrutura em relação à conformação inicial do XIAP-BIR3 ou do complexo XIAP-BIR3/peptídeo (Ex: AVPI) versus tempo.

Outra análise com base na raiz da média quadrática é a Flutuação da Raiz Média Quadrática (RMSF do inglês *Root Mean Square Fluctuation*). Este método difere em relação ao primeiro pelo fato de agora tomarmos como referência a estrutura média calculada após a simulação de Dinâmica Molecular e calcularmos a flutuação de cada

resíduo aminoácido em relação à sua posição média. Nesse caso, temos um gráfico do desvio ou flutuação conformacional de cada resíduo versus sua posição na cadeia polipeptídica. A expressão geral do RMSF é mostrada na equação a seguir:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad \text{Eq. (2.3)}$$

onde  $n$  é o número total de amostras,  $X_i$  é a coordenada tridimensional de cada átomo da amostra  $i$  e a coordenada de referência  $X$ . O resultado destes cálculos dá ideia do quanto a proteína variou ao longo do tempo, o que se correlaciona com a entropia conformacional, além de permitir observar as variações locais, neste caso, quais os resíduos que tiveram maior variação. Assim, também podemos ter uma ideia da variação de entropia conformacional do domínio XIAP-BIR3 em diferentes condições.

### ***Ligações de Hidrogênio***

Neste trabalho, as ligações de hidrogênio foram mapeadas seguindo o critério Doador-Hidrogênio-Aceptor entre XIAP-BIR3 e os peptídeos com distância máxima: Doador-Aceptor igual a 3,5 Å e ângulo mínimo (Doador-Hidrogênio-Aceptor) igual a 120°. As coordenadas foram coletadas a cada picosegundo de simulação e foram também consideradas as ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água do solvente entre a proteína e o ligante.

### ***Área de Interação Intermolecular***

A avaliação da Área de Interação Intermolecular pelo cálculo da superfície de contato proteína-ligante, com a discriminação para as áreas médias de contato com cada resíduo de aminoácido, é uma das melhores ferramentas no acesso a informações sobre a

qualidade e quantidade das interações entre a enzima e os ligantes, dando um respeitável subsídio para o desenvolvimento de um fármaco.

Esta técnica se vale da avaliação da superfície intermolecular entre duas ou mais superfícies moleculares, por exemplo, entre Proteína e Ligante. A Superfície Molecular ou Superfície de van der Waals e a Superfície Acessível ao Solvente (SAS) (RICHARDS, 1971) são definidas a partir de uma prova esférica correndo sobre a proteína com seus átomos representados por suas esferas de van der Waals. Diferente da avaliação da superfície molecular, que leva em conta apenas as esferas de van der Waals, na avaliação da Superfície Acessível ao Solvente esta ponta de prova tem diâmetro próximo de 0,14 nm para simular uma molécula de água. A partir das superfícies moleculares da proteína e do ligante é possível determinar a Superfície Intermolecular como sendo a superfície de intersecção entre a SAS do ligante e a SAS da proteína. Para esta análise, foi desenvolvido o programa SURFINMD v1.42 (ALAN e cols., 2008), que aplica o algoritmo de Connolly (CONNOLLY, 1983) para cálculo da área média da superfície de contato molecular, e também individualiza a contribuição de interação para cada resíduo de uma proteína.

GROMACS é um software que é usado para gerar e analisar Simulações de Dinâmica Molecular (HESS e cols., 2008). Usando a versão 4 do GROMACS, nós criamos 20 ns de simulação nos dois sistemas para gerar diversidade estrutural para cada sistema da proteína. Um sistema foi o domínio XIAP-BIR3 (com 117 resíduos) complexado com um íon Zinco e o segundo sistema usado como o primeiro sistema, mas complexado com o tetrapeptídeo AVPI. Cada sistema adicionalmente consistiu do seguinte: uma caixa de simulação com moléculas de água e um íon Sódio para a neutralização do sistema, dando aproximadamente 72.000 átomos no sistema. Cada sistema foi tratado com uma condição periódica de contorno com etapas de minimização de energia. Foram 50 ns de simulação a pressão constante de 1 bar e a 15 °C. Um passo de integração de 2 fs foi usado com o

algoritmo LINCS (HESS e cols., 1997), aprisionando todas as ligações covalentes em seus comprimentos de equilíbrio. A força de campo usada foi 53a6, GROMOS96 (VAN GUNSTEREN e cols., 1996).

### 2.3.12 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN e a cristalografia de raios X são as únicas duas técnicas que podem revelar a estrutura tridimensional de proteínas e de outras biomoléculas com detalhes atômicos (DYSON & WRIGHT, 2004). As proteínas constituem sistemas dinâmicos intrinsecamente flexíveis. A dinâmica mostrada pelas proteínas está intimamente relacionada às suas propriedades biofísicas e funções biológicas, tais como: estabilidade termodinâmica, enovelamento, reconhecimento molecular e catálise enzimática (PALMER e cols., 1997). A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) emergiu como uma técnica extremamente importante na caracterização da dinâmica de proteínas em solução, o que representa uma vantagem em relação à cristalografia de raio-X. A investigação da dinâmica intramolecular de proteínas através da RMN comumente mede os seguintes parâmetros de relaxação: as taxas de relaxação longitudinal ( $R1$ ) e transversa ( $R2$ ) e os efeitos nucleares Overhauser (NOE) heteronucleares. As medidas das taxas de relaxação dos *spins* nucleares fornecem informações acerca de movimentos internos que acontecem em uma escala de tempo rápida (subnanossegundos) e lenta (micro- a milissegundos), assim como informações acerca da difusão rotacional global da molécula (5-50 nanossegundos). Enquanto isso, movimentos entre domínios protéicos, que acontecem em uma escala de tempo muito lenta (segundos a dias) podem ser inferidos a partir de medidas das taxas de transferência de magnetização entre núcleos de hidrogênio que exibem deslocamentos químicos diferentes (ISHIMA & TORCHIA, 2000). Com o advento da marcação isotópica de proteínas com  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^2\text{H}$ ,

os parâmetros de relaxação podem ser medidos de forma simultânea em uma multiplicidade de sítios ao longo da cadeia polipeptídica e das cadeias laterais (BRÜSCHWEILER, 2003). Nesta tese, iremos nos ater apenas a estudos estruturais e ao parâmetro de relaxação efeito nuclear Overhauser (NOE) heteronuclear, o qual foi medido para sistemas de *spins* IS isolados constituídos pelos grupamentos amídicos da cadeia principal das proteínas estudadas.

Desta forma, realizamos medidas de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (“*Heteronuclear Single Quantum Coherence*”) e medidas de NOE (“*Efeito Nuclear Overhauser*”) heteronuclear do domínio XIAP-BIR3 livre e complexado com AVPI a 15 °C em um espectrômetro Bruker DRX600 de 600 MHz (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany), usando uma sonda de tripla ressonância de 5 mm com gradiente em Z equipado com uma sonda criogênica (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany). As amostras do domínio XIAP-BIR3 foram dializadas e concentradas em tampão Tris 15 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 7,4. As amostras foram preparadas com 10% de D<sub>2</sub>O (Isotec., Miamisburg, OH). Os dados de RMN foram processados com o programa NMRpipe (DELAGLIO e cols., 1995) e analisados usando o programa NMRVIEW, versão 5.0.3 (JOHNSON e BLEVINS, 1994). Os espectros de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC do domínio XIAP-BIR3 foram assinalados de acordo com Sun e colaboradores (SUN e cols., 2000).

## 2.4. Resultados - Parte 2

### 2.4.1. Apresentação do Manuscrito 2 (Anexo 2)

Nesta seção, está apresentado e discutido o artigo intitulado “*Conformational selection, dynamic restriction and hydrophobic effect coupled to the stabilization of the BIR3 domain X-linked inhibitor of apoptosis protein by the tetrapeptide AVPP*”, aceito para publicação no periódico *Biophysical Chemistry* (Anexo 2).

Em células tumorais, os níveis de Proteínas Inibidoras de Apoptose, tais como XIAP, são muito elevados, bloqueando o processo de morte celular programada. Antagonistas destas proteínas IAPs, como os tetrapeptídeos aqui descritos, vêm sendo foco de grande interesse na Medicina devido à sua potencial aplicação terapêutica por induzir a apoptose de células tumorais. Assim, informações sobre as interações destes tetrapeptídeos, ou outros ligantes, com a XIAP podem auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos contra o câncer.

Nesta parte do trabalho, mostramos características estruturais, de estabilidade, dinâmicas e termodinâmicas da inibição do domínio BIR3 da proteína XIAP pelo tetrapeptídeo AVPI. Nós mostramos que o XIAP-BIR3 é altamente estável a desnaturantes químicos e físicos. Além disso, a ligação do peptídeo AVPI foi capaz de aumentar ainda mais sua estabilidade. Verificamos que a interação é entálpica e entropicamente dirigida, havendo perda de entropia conformacional. Estes achados indicam fortemente que a entropia da água é de grande importância para a interação e a estabilização do domínio.

Mostramos neste estudo que existe um processo de seleção conformacional acoplado à interação do AVPI ao domínio XIAP-BIR3. Nossos dados indicam uma seleção de conformações mais rígidas e com as fitas- $\beta$  mais estáveis. Utilizando RMN e simulação

de dinâmica molecular, também verificamos que a interação leva à diminuição de flexibilidade de dois *loops* do domínio, além das regiões C- e N-terminais. A redução da capacidade calorífica, obtida por medidas de calorimetria, está associada diretamente a esta diminuição da dinâmica da proteína, além da grande contribuição hidrofóbica.

Estes novos detalhes sobre as forças moleculares que controlam a afinidade e a especificidade de interação do AVPI ao domínio XIAP-BIR3 devem ser considerados no desenho racional de fármacos que poderiam bloquear IAPs, levando células tumorais à morte celular programada.

### **2.4.2. Um estudo estrutural e termodinâmico da interação de peptídeos antagonistas da XIAP - Manuscrito 3 (Anexo 3)**

Nesta seção, estão descritos os dados que compõem o artigo intitulado “*New insights for drug design of IAPs antagonists: structural and thermodynamic approach*”, o qual se encontra em fase final de preparação (Anexo 3).

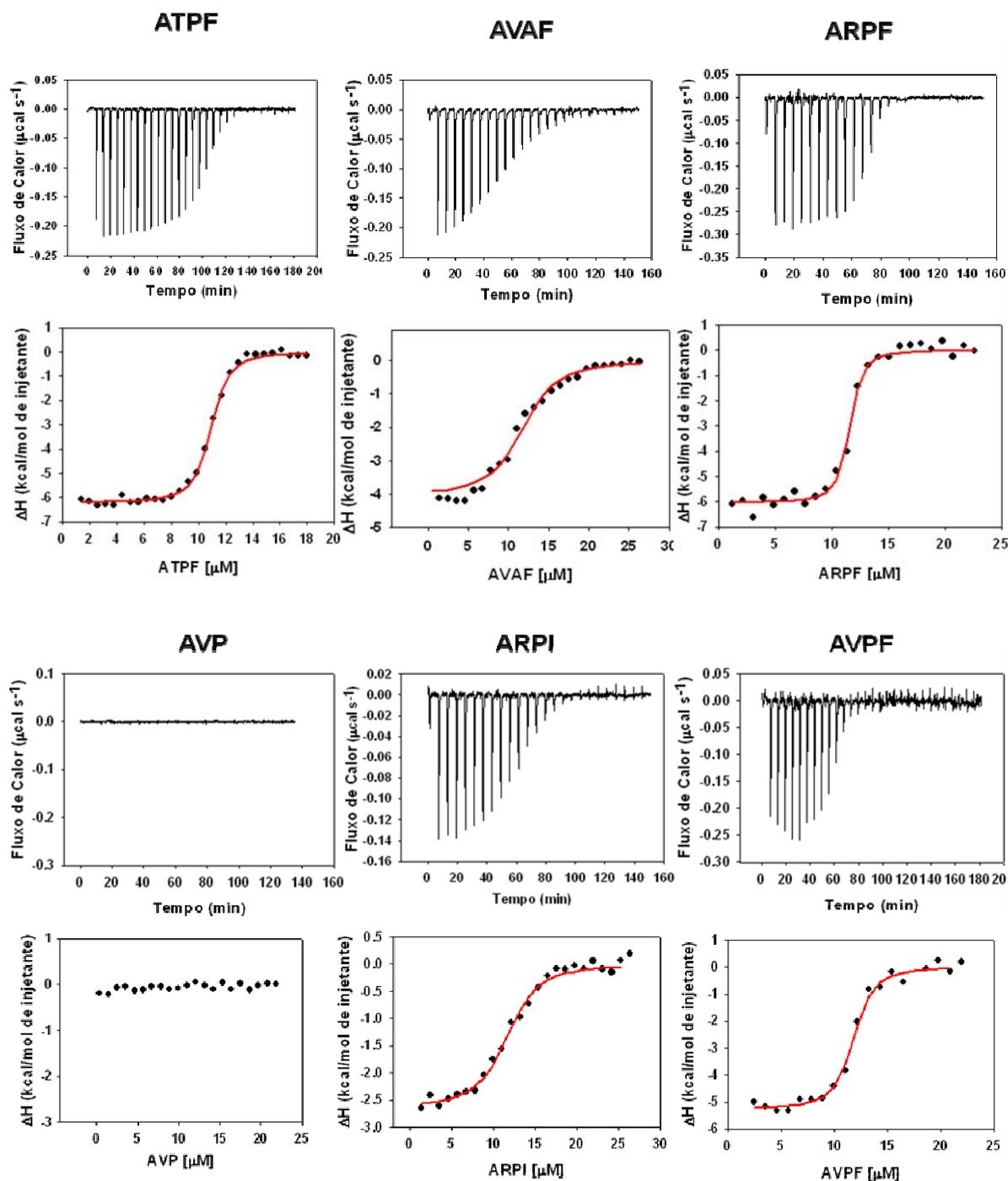
A estrutura e a função do domínio BIR3 das IAPs vêm sendo estudadas com o objetivo de obter informações importantes para o entendimento dos seus mecanismos de ação celulares e moleculares. Dados estruturais de RMN e cristalografia já revelaram aminoácidos importantes para sua função, assim como o alvo a ser considerado em sua estrutura (WU e cols., 2000; LIU e cols., 2000). Também já existem informações estruturais importantes quanto à interação do BIR3 com seu inibidor natural, o tetrapeptídeo AVPI da proteína Smac/DIABLO (LIU e cols., 2000; WU e cols., 2000).

#### ***Estudo da interação do domínio BIR3 das IAPs com diferentes tetrapeptídeos utilizando Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC)***

Inicialmente, nosso grupo caracterizou a interação entre o domínio XIAP-BIR3 e o tetrapeptídeo AVPI (SOUZA e cols., 2010), como descrito na seção anterior. Após este estudo, buscamos realizar uma análise mais detalhada da interação com outros seis peptídeos, com o intuito de verificar a importância de grupamentos químicos individualmente. Além disso, buscamos correlacionar nossos dados termodinâmicos com dados estruturais, o que poderia nos fornecer características cruciais para o entendimento da natureza da inibição do domínio XIAP-BIR3.

Estes sete peptídeos foram escolhidos baseado nas suas afinidades que já foram descritas previamente (SHI., 2002). Utilizando ITC, obtivemos todos os perfis

calorimétricos e a alteração de  $\Delta H$  com a concentração do ligante, os quais estão mostrados na **Figura 2.25**.



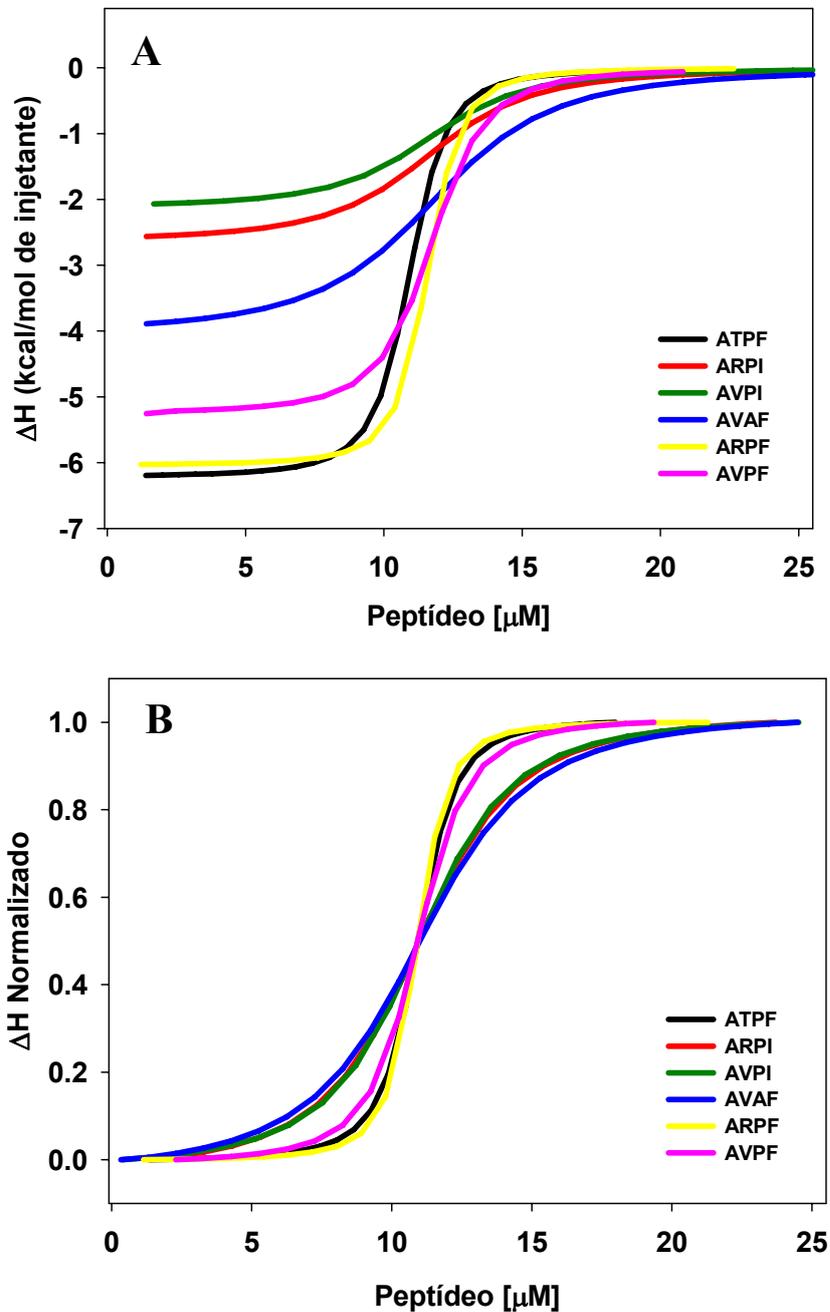
**Figura 2.25:** Titulação calorimétrica de XIAP-BIR3 com os diferentes peptídeos. As injeções foram feitas em intervalos de 5 minutos. Nestes gráficos estão representadas as variações de entalpia com as injeções dos respectivos peptídeos a 25°C. Foram realizadas 30 injeções de 3  $\mu\text{L}$ . A curva é representativa de três medidas independentes e o tampão utilizado foi: Tris 15 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 7,4. A concentração de XIAP-BIR3 foi 10  $\mu\text{M}$  e dos peptídeos na seringa foi de 500  $\mu\text{M}$ .

A partir destas curvas calorimétricas, determinamos os parâmetros termodinâmicos da interação destes peptídeos, os quais estão mostrados na **Tabela 2.1**. Nossos dados mostram que o quarto aminoácido parece ser essencial para a interação, uma vez que o tripeptídeo AVP não interage eficientemente em concentração micromolar a 25°C. Podemos observar também que o peptídeo que tem Fenilalanina na posição 4 torna-se mais favorecido pela entalpia, enquanto que o que apresenta Isoleucina pela entropia (**Tabela 2.1**).

**Tabela 2.1: Parâmetros de ligação para interação entre os peptídeos e o domínio BIR3 estimados a partir de dados de calorimetria isotérmica de titulação (ITC).**

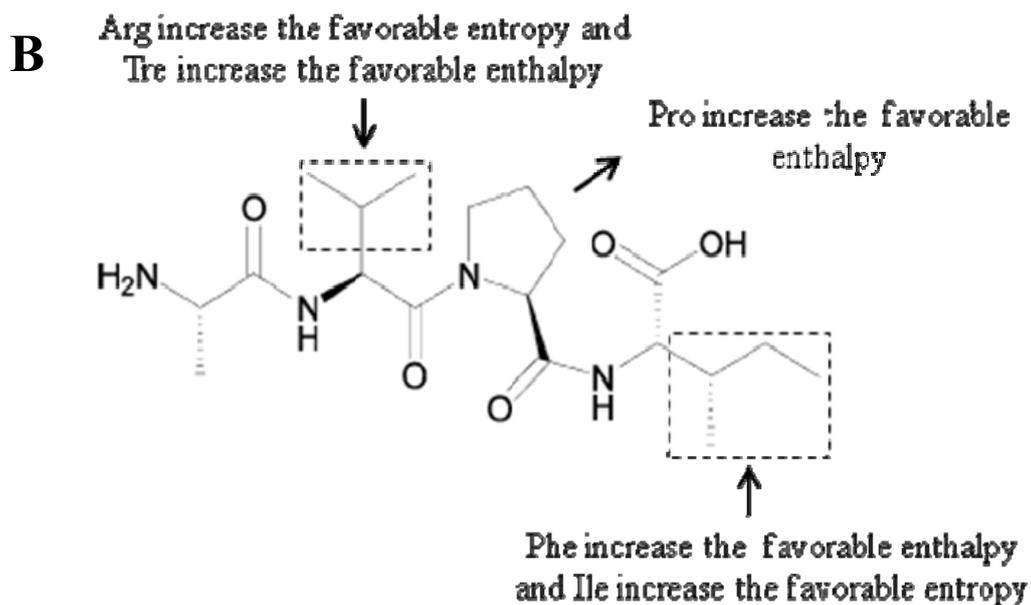
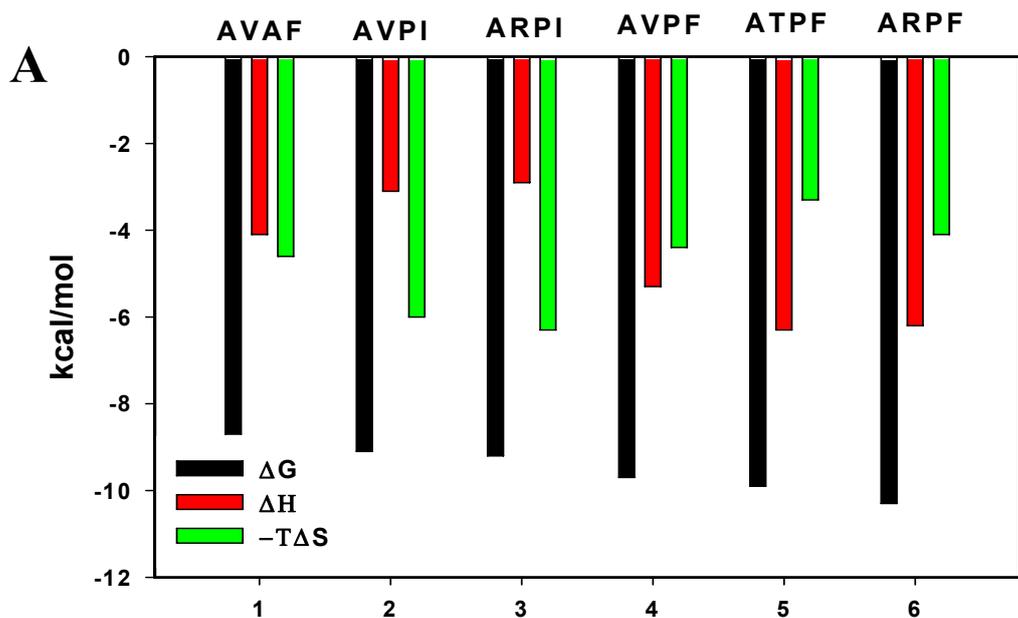
Parâmetro	Peptídeo					
	AVPI	ATPF	ARPF	AVPF	AVAF	ARPI
N	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
K (10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> )	7.5 ± 1.2	18.8 ± 1.6	35.5 ± 1.2	12.2 ± 0.6	2.3 ± 1.0	5.9 ± 1.5
ΔH (kcal · mol <sup>-1</sup> )	-3.1 ± 0.3	-6.3 ± 0.2	-6.2 ± 0.2	-5.3 ± 0.2	-4.1 ± 0.2	-2.9 ± 0.4
ΔS (cal · mol <sup>-1</sup> )	19.1 ± 1.3	12.0 ± 0.6	13.7 ± 0.5	14.7 ± 0.5	15.5 ± 0.1	21.1 ± 0.1
ΔG (kcal·mol <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup> )	-8.8 ± 0.1	-9.9 ± 0.1	-10.3 ± 0.1	-9.7 ± 0.2	-8.7 ± 0.2	-9.2 ± 0.3

A partir da análise de nossos resultados, podemos verificar que a fenilalanina na posição 4 aumenta a variação de entalpia do sistema, indicando que um maior número de ligações de hidrogênio ou de van der Waals estão sendo formadas. A partir da **Figura 2.26A**, fica mais evidente a grande diferença entre os valores de ΔH para os ligantes. As diferenças de afinidade também podem ser observadas pela diferença do perfil das curvas (**Figura 2.26B**). O quanto mais íngreme a curva, maior a afinidade deste peptídeo pelo domínio XIAP-BIR3.



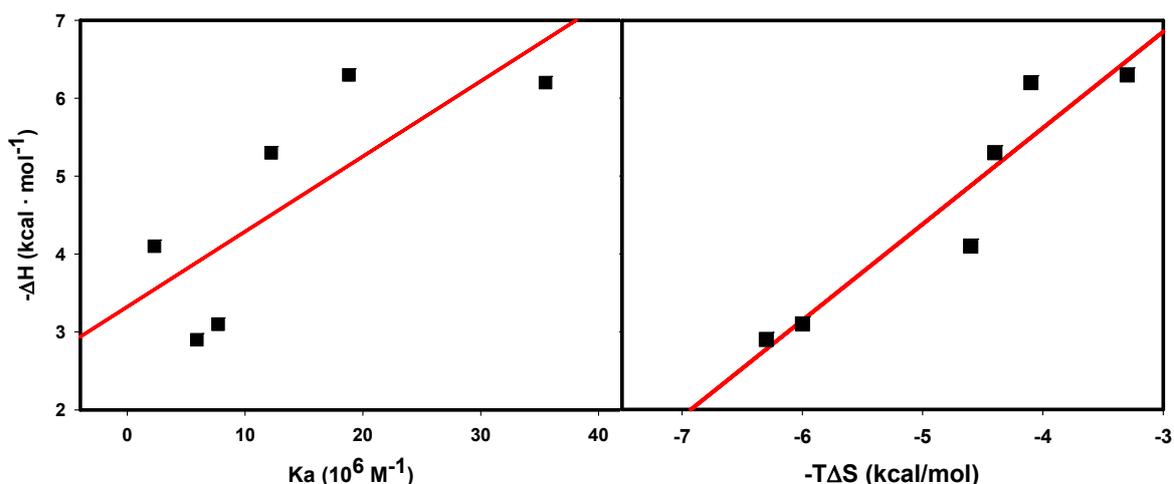
**Figura 2.26:** Curvas construídas a partir dos experimentos de calorimetria de titulação isotérmica, de maneira a representar o grau de variação de entalpia (A) e de afinidade (B) entre os peptídeos.

Através de análises das diversas combinações entálpico-entrópica (**Figura 2.27**), podemos observar que as alterações no  $\Delta G$  não são muito significativas, porém há uma grande diferença entre os valores de variação de entropia e entalpia.



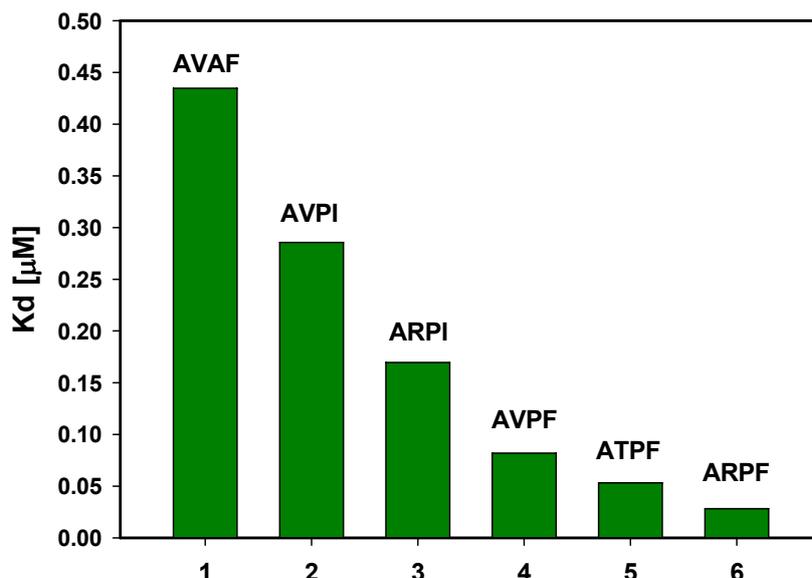
**Figura 2.27: Análises termodinâmicas dos peptídeos.** A) Perfil termodinâmico da ligação dos peptídeos ao domínio XIAP-BIR3, em ordem de afinidade. B) Principal contribuição termodinâmica dos resíduos de tetrapeptídeos por comparação dos peptídeos utilizados.

Após análises estruturais, também observamos que a afinidade está intimamente correlacionada com o  $\Delta H$  (**Figura 2.28**). Esta característica é importante, pois ligantes que se ligam mais dirigidos pela variação de entalpia tendem a apresentar um maior grau de especificidade. Também observamos que existe uma compensação entrópica associada ao aumento de  $\Delta H$  para todos os peptídeos utilizados (**Figura 2.28**).



**Figura 2.28:** Correlação da afinidade com a variação de entalpia na ligação de diferentes ligantes ao domínio BIR3. Compensação entálpico-entrópica na ligação de diferentes peptídeos ao domínio XIAP-BIR3.

Além disso, estas pequenas alterações de  $\Delta G$  desencadeiam uma diferença de até 15 vezes na constante de dissociação (**Figura 2.29**). Esta diferença tem grande relevância, já que a concentração necessária para o efeito é menor, gerando um menor custo econômico e uma menor toxicidade.



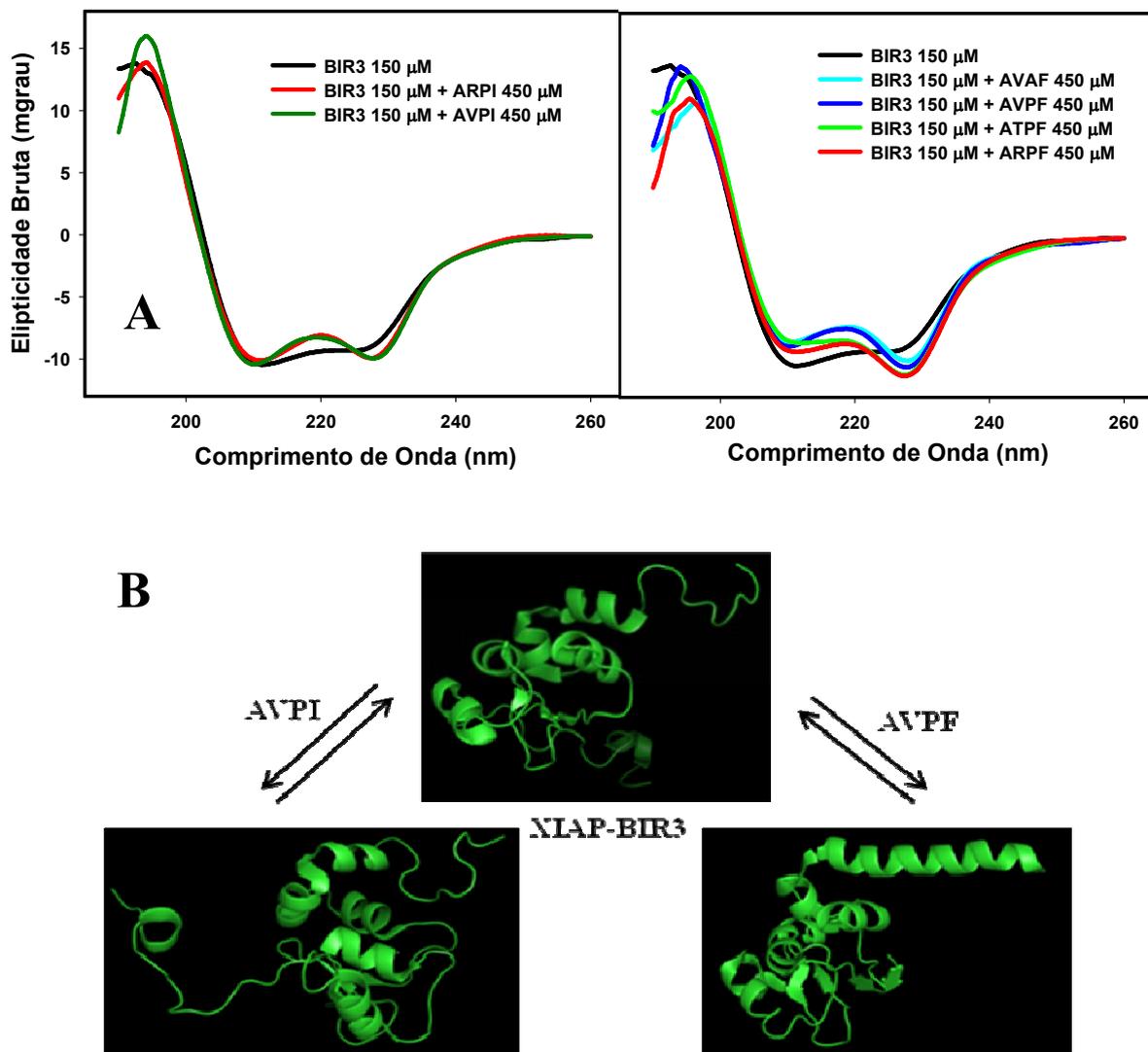
**Figura 2.29:** Gráfico demonstrando as diferenças da constante de dissociação dos diferentes peptídeos.

*Análises estruturais da interação de diferentes peptídeos ao domínio XIAP-BIR3 a partir de medidas de Dicroísmo Circular e de Estruturas Depositadas no “Protein Data Bank”*

A estrutura tridimensional do domínio BIR3 da XIAP, determinada por espectroscopia de RMN, consiste de cinco  $\alpha$ -hélices, três fitas- $\beta$  e um átomo de zinco ligado a três cisteínas e uma histidina (SUN e cols., 2000). Entretanto, a análise da estrutura secundária por CD ainda não foi relatada.

O espectro de dicroísmo circular do domínio BIR3 nos mostrou um pico em 223 nm e um pico em 209 nm, que são picos característicos de estrutura  $\alpha$ -hélice. Este resultado era esperado, pois, apesar de três fitas- $\beta$ , as 5  $\alpha$ -hélices contribuem com uma intensidade maior na elipticidade. O pico mais intenso em 208 nm também é esperado para proteínas que apresentam ambas as estruturas  $\alpha$ -hélice e fita- $\beta$ , contudo com maior quantidade de  $\alpha$ -hélice. (FASMAN, 1996). A presença de ligantes leva a algumas mudanças do espectro, no qual o pico de 223 nm é desviado para 226 nm (**Figura 2.30A**). Em torno de 218 nm, também houve uma perda de elipticidade bruta com a ligação do

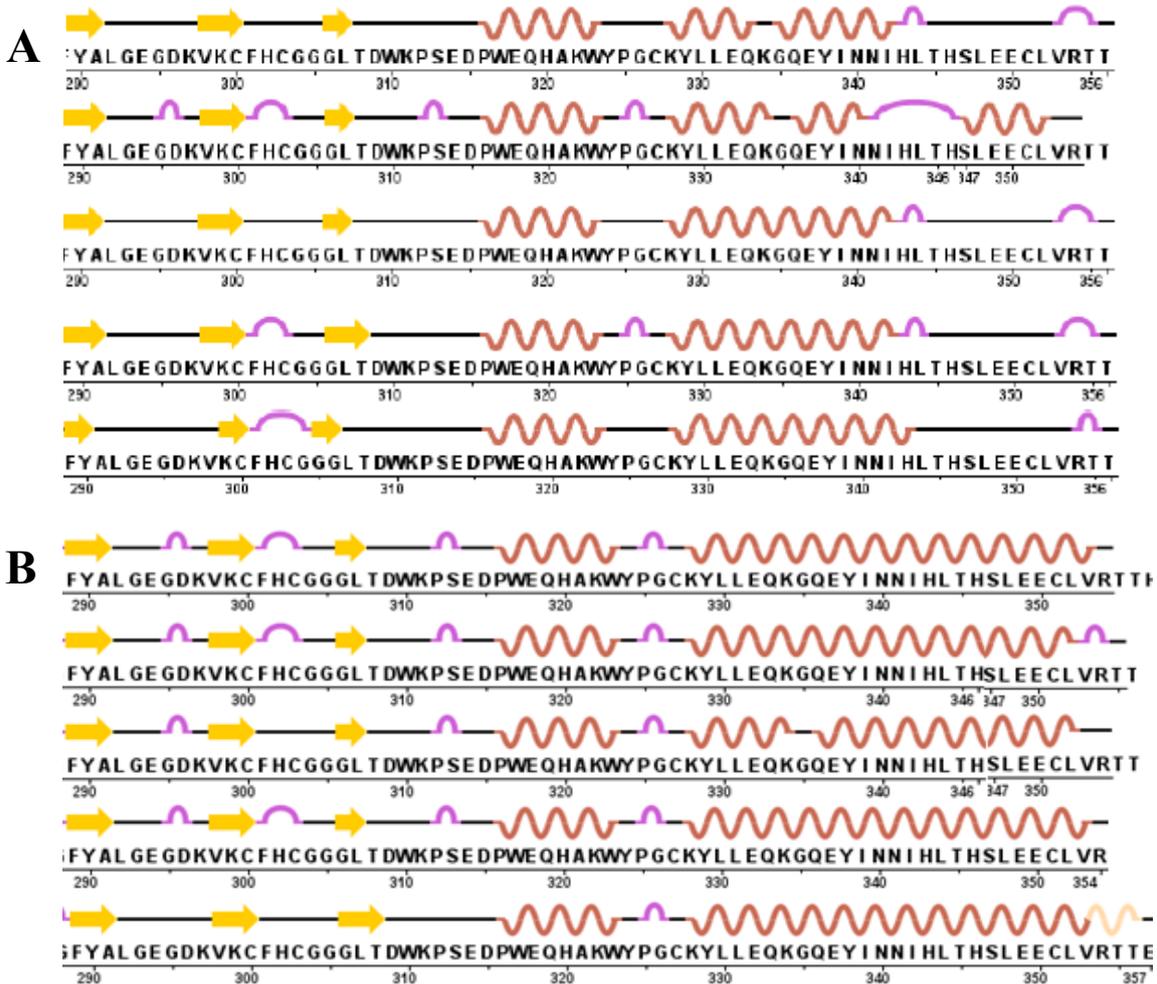
AVPI. Assim, verificamos que a ligação de diferentes peptídeos levou a significativas alterações no espectro de CD, podendo indicar pequenas, mas significativas mudanças estruturais. Os espectros da interação dos peptídeos contendo fenilalanina passaram a ter o pico de 226 nm mais negativo que o de 208 nm, indicando um aumento de  $\alpha$ -hélice (**Figura 2.30A**). Os espectros dos peptídeos isolados não apresentaram sinal de elipticidade bruta, como esperado, já que não existe estruturação (dados não mostrados), e foram subtraídos do espectro do domínio XIAP-BIR3 na presença dos peptídeos correspondentes. Corroborando nossos resultados ao compararmos as estruturas do domínio XIAP-BIR3 na presença de AVPF, podemos verificar a estabilização de uma estrutura em  $\alpha$ -hélice.



**Figura 2.30: Análise da estrutura secundária do XIAP-BIR3 na presença dos peptídeos.** A) Espectros de dicroísmo circular do XIAP-BIR3 livre e na presença de diferentes peptídeos. Os espectros são a média de 3 varreduras, realizados a 25°C e representativos de três experimentos independentes. A cubeta utilizada foi de 0,02. B) Estruturas do domínio XIAP-BIR3 (PDB: 1F9X), e dos complexos XIAP-BIR3/AVPI (PDB: 1G3F) e XIAP-BIR3/AVPF (PDB: 2OPZ).

As alterações estruturais verificadas por dicroísmo circular estão de acordo com dados da estrutura do domínio XIAP-BIR3 na presença de diferentes ligantes obtidos por ressonância magnética nuclear ou cristalografia (Figura 2.30B e Figura 2.31). Na Figura 2.31, podemos observar que existem significativas alterações na estrutura do domínio

BIR3 na presença de diferentes ligantes, principalmente por um aumento no conteúdo em  $\alpha$ -hélice.



**Figura 2.31: Diferenças do conteúdo de estrutura secundária do domínio XIAP-BIR3 isolado e na presença de ligantes de dados extraídos do PDB ("Protein Data Bank").** A) Esquema de estrutura secundária da região C-terminal do domínio XIAP-BIR3 que mantém os últimos AA terminais desestruturados quando complexados a determinados ligantes. B) Esquema de estrutura secundária da região C-terminal do domínio XIAP-BIR3 que tem nos últimos AA terminais uma estabilização de  $\alpha$ -hélice quando complexados com outros ligantes.

*Análise dos efeitos de diferentes peptídeos na estabilidade termodinâmica do Domínio XIAP-BIR3 a partir de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)*

Análises da estabilidade do domínio XIAP-BIR3 foram realizadas utilizando calorimetria diferencial de varredura. Realizamos varreduras de temperatura (25 a 90 °C) medindo  $\Delta C_p$  XIAP-BIR3 na presença de cada peptídeo separadamente (dados não

mostrados). Todos os ligantes foram capazes de estabilizar o domínio, porém em magnitudes diferentes, como mostrado na **Tabela 2.2**. Estas alterações de estabilidade podem estar ligadas a alterações na estrutura secundária verificadas por dicroísmo circular. Em adição, os valores de  $\Delta H$  de desnaturação também aumentaram de forma significativa, indicando o aumento do número de ligações de hidrogênio ou de van der Waals estabilizando o domínio (**Tabela 2.2**).

**Tabela 2.2: Parâmetros de desnaturação térmica do domínio XIAP-BIR3 livre e complexado com diferentes peptídeos.**

	<b>Kd (nM)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b><math>\Delta H^{cal}</math> (kcal·mol<sup>-1</sup>)</b>
<b>BIR3 50 <math>\mu</math>M</b>	–	68.9 $\pm$ 0.2	25.7 $\pm$ 0.2
<b>+ AVAF 150 <math>\mu</math>M</b>	434 $\pm$ 18	73.5 $\pm$ 0.3	XXXX
<b>+ AVPI 150 <math>\mu</math>M</b>	285 $\pm$ 15	77.3 $\pm$ 0.2	84.4 $\pm$ 0.4
<b>+ ARPI 150 <math>\mu</math>M</b>	169 $\pm$ 11	74.5 $\pm$ 0.2	48.8 $\pm$ 0.2
<b>+ AVPF 150 <math>\mu</math>M</b>	81 $\pm$ 8	81.1 $\pm$ 0.3	XXXX
<b>+ ATPF 150 <math>\mu</math>M</b>	53 $\pm$ 6	79.6 $\pm$ 0.2	XXXX
<b>+ ARPF 150 <math>\mu</math>M</b>	28 $\pm$ 5	82.1 $\pm$ 0.1	XXXX

Parâmetros termodinâmicos obtidos à pressão atmosférica (Ver detalhes em Material e Métodos).

### **2.4.3. Investigando o papel de íons Zinco na estrutura, estabilidade e função do domínio BIR3**

Nesta seção, estão descritos os dados que compõem o artigo intitulado “*The role of the ion Zinc on the XIAP-BIR3 structure, thermodynamic stability and function*”, que se encontra em fase final de preparação.

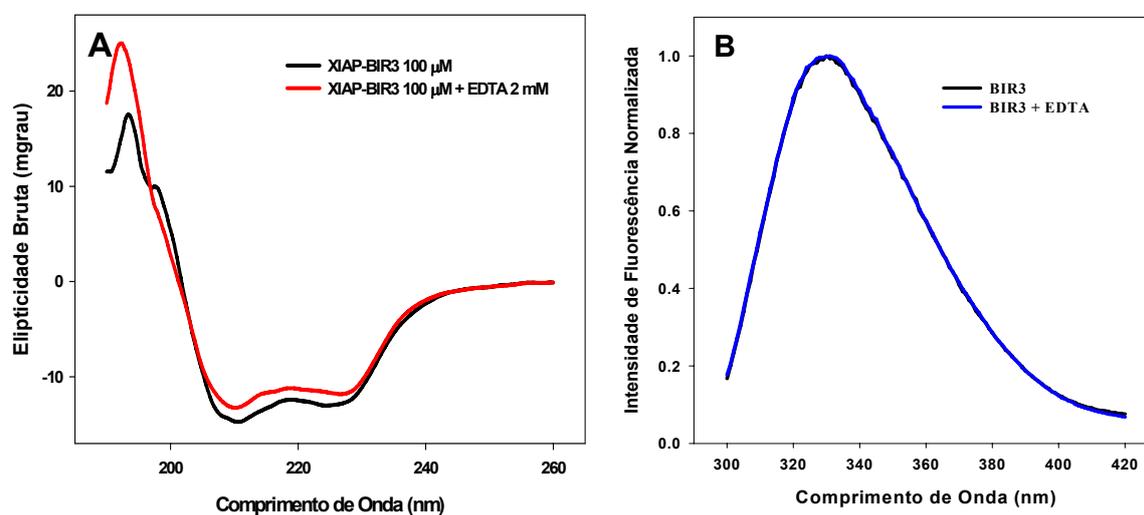
Após os estudos sobre a interação dos tetrapeptídeos com o domínio BIR3, os quais visam a auxiliar o planejamento de fármacos e o entendimento deste reconhecimento molecular, passamos a investigar as consequências estruturais e funcionais da retirada do íon zinco deste domínio. Esta proposta surgiu de um trabalho que, a partir da utilização de um agente quelante de zinco de maneira intracelular, verificou que ocorria a degradação da XIAP de forma específica, e que as células de câncer de próstata são sensibilizadas a apoptose mediada por TRAIL. Desta forma, o sítio de zinco na XIAP parece ser um possível alvo para o desenho de fármacos.

O entendimento das alterações de estrutura, estabilidade e função do domínio XIAP-BIR3 associadas ao sequestro do zinco desta proteína, podem fornecer informações que elucidem o papel deste íon para o domínio.

#### ***Análise das consequências estruturais da retirada de zinco do domínio XIAP-BIR3 por Dicroísmo Circular e espectroscopia de fluorescência***

Como dito anteriormente, a estrutura tridimensional do domínio BIR3 da XIAP, determinada por espectroscopia de RMN, consiste de cinco  $\alpha$ -hélices, três fitas- $\beta$  e um átomo de zinco coordenado por três cisteínas e uma histidina (SUN e cols., 2000). Já está bem estabelecido que o zinco está presente na estrutura do domínio XIAP-BIR3. Realizamos medidas na presença de zinco e não observamos alteração na estabilidade ou

estrutura do domínio, confirmando que o domínio purificado já se encontrava com zinco ligado (dados não mostrados). Para retirar o zinco utilizamos EDTA que se liga ao zinco com uma afinidade extremamente alta, com um  $K_d$  de aproximadamente  $10^{-16}$  M, enquanto que para proteínas no é na faixa de  $10^{-10}$ - $10^{-12}$  (NYBORG & PEERSEN). Baseado em trabalhos que verificam os efeitos de zinco, realizamos as medidas na presença 0,2 ou 2 mM de EDTA. Os efeitos de 2 mM foram ligeiramente maiores. Inicialmente, buscamos verificar os efeitos do sequestro do zinco na estrutura secundária e terciária do XIAP-BIR3. Para isso, utilizamos espectroscopia de fluorescência técnicas capazes de nos dar uma ideia da perda de estrutura secundária ou da mudança do ambiente dos triptofanos da proteína, a qual indicaria alterações na estrutura terciária. Nossos resultados mostram que não houve alterações significativas no ambiente do triptofano, e as alterações nos espectros de CD indicam uma pequena perda de estrutura secundária na presença de EDTA (**Figura 2.32**).

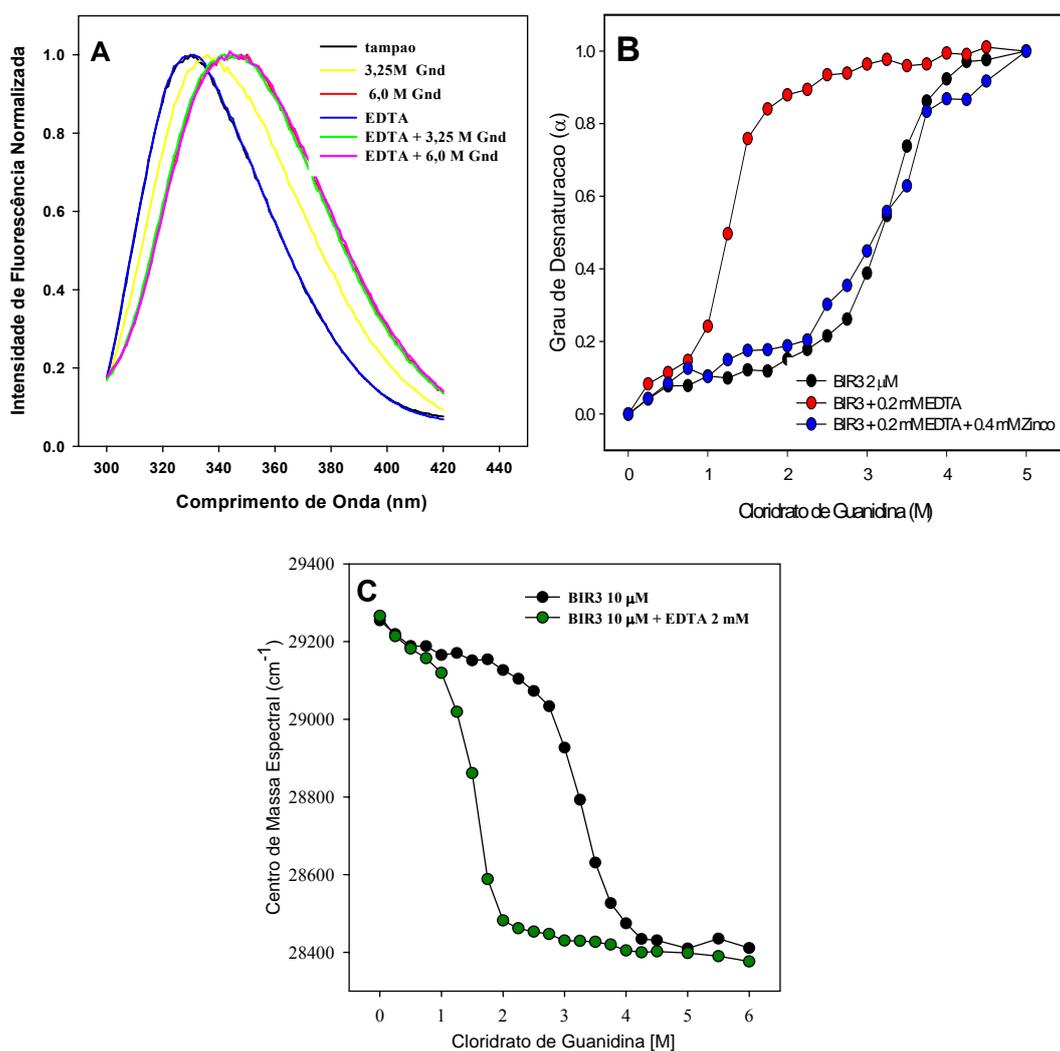


**Figure 2.32: Análises do efeito da retirada de zinco sobre a estrutura secundária e terciária do domínio XIAP-BIR3.** A) Espectros de dicroísmo circular do XIAP-BIR3 e do mesmo na presença de EDTA. B) Espectros de fluorescência normalizados do XIAP-BIR3 na ausência e na presença de EDTA 2 mM. Condições: Fosfato 15 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, DTT 1 mM. Concentração de domínio XIAP-BIR3: 10 μM.

### ***Análise dos efeitos da retirada de zinco na estabilidade do Domínio XIAP-BIR3***

Nossas medidas espectroscópicas mostram pequenas mudanças estruturais do domínio na ausência de íons ligados, o que sugere que este efeito poderia justificar a degradação em ambiente celular. Passamos a investigar se estas pequenas alterações acarretariam em uma diminuição da estabilidade. Para isso, utilizamos diferentes metodologias e diferentes agentes desnaturantes para verificar se haveria grandes alterações de estabilidade deste domínio na presença de EDTA, um quelante de íons divalentes. De forma preliminar, investigamos a diferença de estabilidade frente ao agente desnaturante cloridrato de guanidina após o tratamento com EDTA. A presença de EDTA (0,2 mM) (**Figura 2.33B**) ou (2 mM) (**Figura 2.33C**) desestabiliza bastante o domínio. Para confirmar que a estabilidade do domínio está associada à retirada do zinco, realizamos curvas de desnaturação na presença de EDTA (0,2 mM) e na presença de EDTA (0,2 mM) mais um excesso de cloreto de zinco (0,4 mM). Com a adição de excesso de zinco (0,4 mM) após o tratamento com EDTA, a desestabilização é completamente revertida (**Figura 2.33B**), confirmando a presença de zinco na estrutura do domínio purificado, como já descrito para outros trabalhos (Liu, 2000).

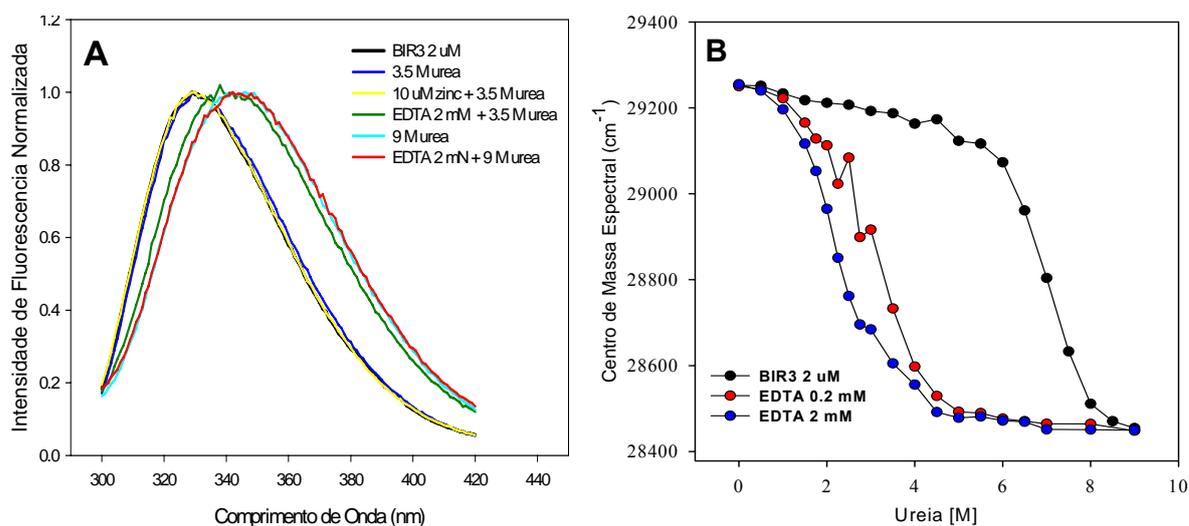
Nossas medidas mostram que, apesar da pequena mudança estrutural, a estabilidade da proteína fica bastante comprometida pelo sequestro do zinco (**Figura 2.33**).



**Figura 2.33: Importância do zinco para a estabilidade conformacional do domínio XIAP-BIR3 frente ao cloridrato de guanidina. A)** Espectros de fluorescências do domínio em diferentes condições como indicado no gráfico. **B)** O grau de desnaturação foi obtido a partir de valores de centro de massa espectral em cada concentração de cloridrato de guanidina. **C)** As análises de estrutura terciária foram monitoradas pelas mudanças de centro de massa espectral.

Da mesma forma, frente ao desnaturante químico ureia, mostramos que o sequestro do zinco leva a uma grande desestabilização do domínio XIAP-BIR3, como observado a partir de medidas de centro de massa espectral. Como já descrito por nosso grupo, o domínio BIR3 suporta até 5 M de ureia, sem grandes alterações de estrutura terciária e secundária (SOUZA e cols., 2010). Na presença de EDTA 2 mM, somente 2 M de ureia já

leva a uma mudança significativa no espectro de fluorescência, enquanto que 5 M de ureia leva a uma total desnaturação do domínio (**Figura 2.34**). Na presença de uma concentração 10 vezes menor de EDTA (0,2 mM), o efeito desestabilizador foi próximo ao na presença de 2 mM de EDTA. Na presença de excesso de zinco (EDTA 0,2 mM + ZnCl<sub>2</sub> 0,4 mM), a estabilidade do domínio é restabelecida (dados não mostrados), confirmando que a presença do zinco no domínio é um fator estabilizador. Estes dados corroboram os dados de guanidina, os quais mostram a grande importância do zinco na estabilidade termodinâmica e estrutural deste domínio.

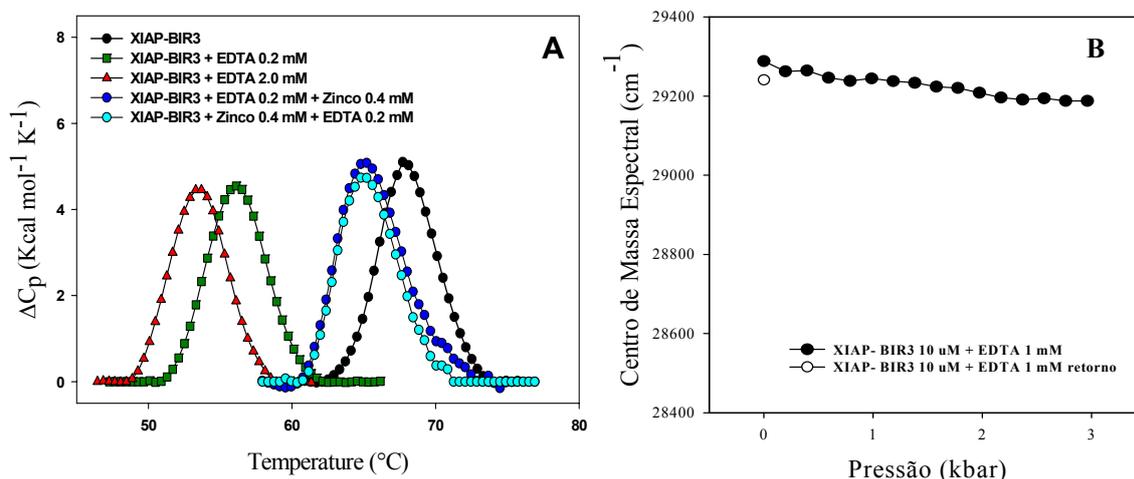


**Figura 2.34 – Estabilidade conformacional do domínio XIAP-BIR3 frente à ureia. A)** Espectros de fluorescências do domínio em diferentes condições como indicado no gráfico. **B)** As análises de estrutura terciária foram monitoradas pelas mudanças de centro de massa espectral. Para todos estes experimentos, a concentração de proteína foi 2  $\mu$ M.

Para confirmar a desestabilização e adicionar novos parâmetros sobre a alteração da estabilidade termodinâmica, utilizamos DSC, através da qual podemos verificar a diferença de estabilidade frente a altas temperaturas, um desnaturante físico. Anteriormente, tínhamos verificado que o XIAP-BIR3 é altamente estável à temperatura, tendo sua  $T_m$  em torno de 68 °C (SOUZA e cols., 2010). Na presença de 2 mM de EDTA, verificamos que a  $T_m$  diminui 14 °C, enquanto que com 0,2 mM diminui 13 °C (**Figura 2.35**). Desta forma,

mais uma vez mostramos a importância do zinco para a estabilidade do domínio, que é extremamente alta. A presença de excesso de zinco reverteu grande parte da desestabilização (Figura 2.35).

O XIAP-BIR3 é altamente resistente a altas pressões hidrostáticas como mostrado por nosso grupo (Souza e cols., 2010; Anexo 2). Após o tratamento com o EDTA o domínio permanece altamente estável a pressão (Figura 2.35B), indicando mais uma vez que não existem grandes alterações estruturais e que a proteína se mantém compacta, com poucos volumes “mortos”, sendo insensível a compressão.



**Figura 2.35: Estabilidade conformacional do domínio XIAP-BIR3 frente a agentes desnaturantes físicos.** (A) Termogramas experimentais do XIAP-BIR3 na ausência (em preto) e na presença de 0,2 (em verde) ou 2 mM de EDTA (em vermelho). Em ambos os casos, (—) representa o melhor *fit*. Para todas as medidas de DSC, a concentração de proteína foi de 50 mM, em tampão Tris 15 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM e DTT 1 mM. (B) Medidas de centro de massa espectral do XIAP-BIR3 em função do aumento da pressão hidrostática. A alta pressão hidrostática não promoveu mudanças significativas na estrutura do domínio. A amostra foi incubada por 10 min a cada pressão.

A partir destes dados, podemos obter alguns parâmetros de desnaturação do domínio XIAP-BIR3 que estão listados na Tabela 2.3, assim como os parâmetros na presença de EDTA 2 mM. As diferenças de todos estes parâmetros são extremamente altas,

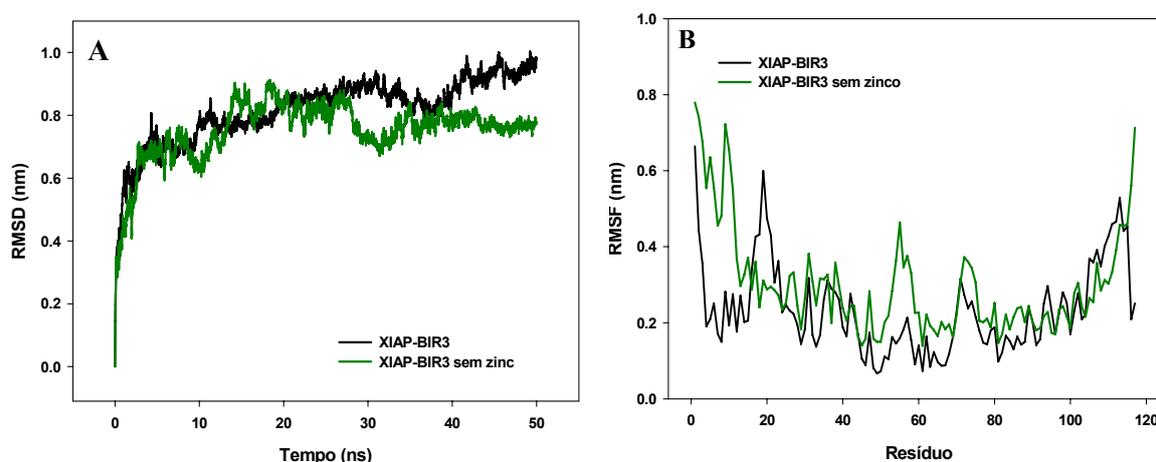
o que mostra que o zinco exerce um papel chave para a estabilidade estrutural e termodinâmica do domínio XIAP-BIR3.

**Tabela 2.3: Parâmetros termodinâmicos que mostram a diferença de estabilidade do domínio XIAP-BIR3 promovida pela retirada do zinco.**

	<i>Fluorescência</i>		<i>DSC</i>	
	[U] <sub>1/2</sub> (M)	[G] <sub>1/2</sub> (M)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sup>cal</sup> (kcal/mol)
<b>XIAP-BIR3</b>	5.8	3.4	68.9 ± 0.2	25.3 ± 2.3
<b>+ EDTA</b>	2.2	1.5	53.4 ± 0.2	20.2 ± 1.2

Análises da estabilidade do XIAP-BIR3 baseado nos dados de fluorescência e DSC na presença e na ausência de EDTA 2 mM. [U]<sub>1/2</sub> e [G]<sub>1/2</sub> correspondem às concentrações de ureia ou guanidina que causam 50% da desnaturação do XIAP-BIR3, respectivamente. Todos os parâmetros termodinâmicos foram obtidos à pressão atmosférica.

Para auxiliarmos na compreensão dos efeitos da retirada do zinco na dinâmica e exposição ao solvente deste domínio na escala de nanosegundos, utilizamos simulação de dinâmica molecular. Realizamos 50 ns de simulação, sendo que após 10 ns o sistema protéico já tinha atingido o equilíbrio. As estruturas no final da simulação eram equivalentes, como sugerido por nossos dados de RMSD (**Figura 2.36**). As medidas de RMSF sugerem que na ausência do zinco a flexibilidade total do domínio aumenta bastante, pelo menos nesta escala de tempo e salvo algumas regiões. Estes dados corroboram nossos dados experimentais que mostram a desestabilização do domínio.



**Figure 2.36: Simulação de dinâmica molecular do domínio XIAP-BIR3 na presença e ausência de zinco. (A) Root Mean Square Deviation (RMSD) dos átomos da cadeia principal do XIAP-BIR3 e do XIAP-BIR3 sem o zinco. (B) Root-mean-square fluctuations (RMSF) do XIAP-BIR3 e as mudanças promovidas pela retirada do zinco. PDB ID: 1f9x (XIAP-BIR3).**

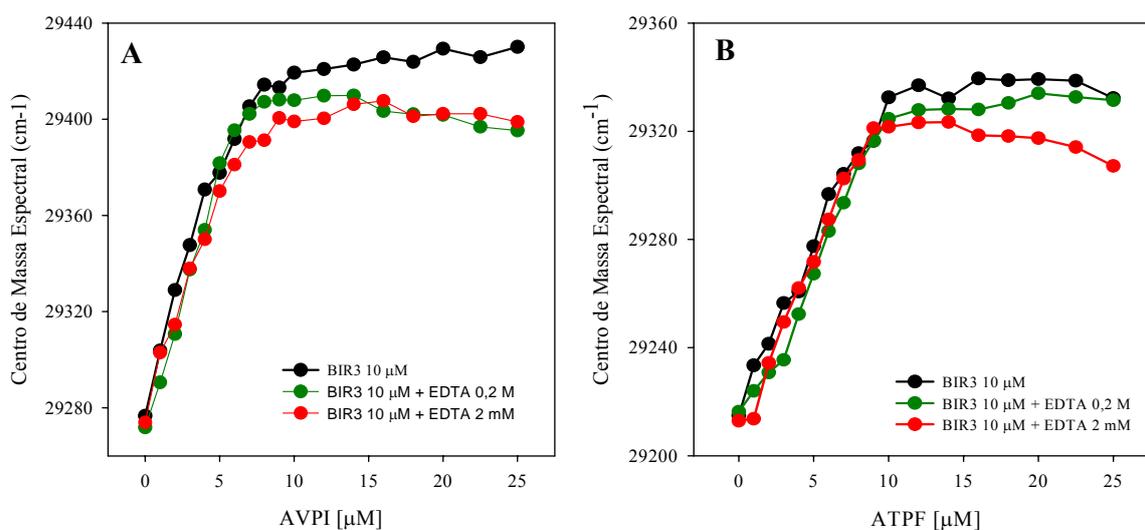
Além disso, para auxiliarmos no entendimento da perda de estabilidade do domínio, investigamos a variação da área acessível ao solvente do XIAP-BIR3 após a retirada do zinco. Nossos dados indicam que o domínio aumenta a área acessível ao solvente ( $\Delta SAS_{total} = 1039 \text{ \AA}^2$ ) (Tabela 2.4), o que pode estar correlacionado com a perda de estabilidade frente aos tratamentos químicos e físicos.

**Tabela 2.4: Análise da variação de SAS hidrofílico e hidrofóbico promovida pela remoção do zinco da estrutura do XIAP-BIR3.**

	SAS hidrofílica ( $\text{\AA}^2$ )	SAS hidrofóbica ( $\text{\AA}^2$ )	SAS total ( $\text{\AA}^2$ )
XIAP-BIR3	4902	5946	10849
XIAP-BIR3 sem zinco	5328	6559	11888

O domínio XIAP-BIR3 intracelularmente pode interagir com as proteínas Smac/DIABLO e caspases. Os tetrapeptídeos AVPI e ATPF são os principais responsáveis pela interação, respectivamente, e simulam sua função *in vitro* e *in vivo* (ARNT e cols.,

2002). Aqui investigamos, por espectroscopia de fluorescência, quais seriam as consequências da retirada do zinco na sua capacidade de interagir com estes peptídeos (**Figura 2.37**), propriedades que simulam a sua função biológica. Nossos resultados tanto para o AVPI quanto para o ATPF mostram que, em concentrações micromolares, o perfil da interação não sofre mudanças significativas (**Figura 2.37**). Dados de interação obtidos por calorimetria de titulação isotérmica confirmam a manutenção da estrutura com a retirada do zinco, visto que os parâmetros termodinâmicos na ausência ou na presença de 0,2 M EDTA foram similares (dados não mostrados). Desta forma, o zinco parece ter um papel importante na estabilidade do domínio XIAP-BIR3, no entanto para a sua estrutura e função parece ter um papel menos significativo.



**Figura 2.37: Ensaio por espectroscopia de fluorescência para verificar a capacidade funcional do domínio XIAP-BIR3 na ausência de zinco.** Medida da interação dos peptídeos AVPI (**A**) e ATPF (**B**) com o domínio BIR3 na presença de EDTA. Condições: Tris 15 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 7,4.

## 2.5. Discussão

Interações proteína-proteína representam importante alvo para intervenções terapêuticas. Proteínas terapêuticas e anticorpos têm tido um grande sucesso como antagonistas de complexos de proteínas extracelulares (PROJAN e cols., 2004). Contudo, já que as proteínas são geralmente impermeáveis à célula, existe uma grande importância no desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras, particularmente para alvos intracelulares.

Nas últimas décadas, as estruturas de muitas proteínas apoptóticas foram resolvidas por cristalografia de raio-X e RMN, e têm sido utilizadas no planejamento de candidatos a fármacos (BLUNDELL e cols., 2006). No entanto, apesar do amplo conhecimento das suas estruturas, os mecanismos envolvidos no reconhecimento molecular, como o grau da alteração da estabilidade termodinâmica destas proteínas promovida pelas interações com alvos celulares, ainda são pouco compreendidos.

O domínio XIAP-BIR3 é de particular interesse, pois representa um alvo promissor na terapia do câncer. Sua inibição permite que células tumorais que superexpressam XIAP entrem em apoptose (LACASSE e cols., 1998; NACHMIAS e cols., 2004). Estudos recentes têm demonstrado que a superexpressão de XIAP em alguns carcinomas prevê um mau prognóstico (MIZUTANI e cols., 2007) e desempenha um papel importante na regulação das respostas apoptóticas em células cancerosas, tanto mediadas pelo sistema imune como por terapias medicamentosas (SASAKI e cols., 2000; NG e cols., 2002; HU e cols., 2003). Além disso, uma baixa expressão ou inibição de XIAP pode reverter a resistência imunológica e a resistência ao tratamento (SASAKI e cols., 2000). Durante a apoptose, a inibição de caspases mediada pelas IAPs é removida pela proteína mitocondrial conhecida como Smac/DIABLO (VERHAGEN e cols., 2000; CHAI e cols., 2000), principalmente pela interação entre o domínio XIAP-BIR3 e o tetrapeptídeo AVPI

da Smac (LIU e cols., 2000). Estudos anteriores demonstraram que os peptídeos da Smac no citosol potencializam a atividade supressora tumoral do quimioterápico *in vitro* e *in vivo* com toxicidade mínima (ARNT e cols., 2002). Muitos estudos têm tentado explorar essa interação [LIU e cols., 2000; OOST e cols., 2004) com o objetivo de desenvolver drogas que se ligam a IAPs promovendo sua inibição sobre as caspases (FULDA e cols., 2002; ARNT e cols., 2002; YANG e cols., 2003).

A estrutura 3D do complexo entre XIAP-BIR3 e o tetrapeptídeo AVPI da Smac/DIABLO já foi determinada (LIU e cols., 2000). Compreender a dinâmica e estabilidade deste complexo e caracterizar os parâmetros de interação ao AVPI permitirão melhorar a compreensão da inibição da XIAP-BIR3 e podem ajudar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento do câncer.

### **2.5.1. Caracterização estrutural, termodinâmica e dinâmica da interação de XIAP-BIR3 e AVPI**

Neste trabalho, uma avaliação termodinâmica (em termos de componentes entalpia e entropia, além variação da capacidade calorífica) da interação entre AVPI e XIAP-BIR3 foi realizada, na tentativa de auxiliar na compreensão da inibição da XIAP-BIR3. Para projetar fármacos mais eficientes, é de fundamental importância correlacionar dados termodinâmicos e estruturais dessa interação (WEBER e SALEMME, 2003; LAFONT e cols., 2007; OLSSON e cols., 2008). Nossos dados mostraram que a interação XIAP-BIR3/AVPI é entálpica e entropicamente favorecida (**Tabela 1, Anexo2**), com uma variação negativa na capacidade calorífica ( $\Delta C_p = -157,13 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ). Já é bem estabelecido que alterações na capacidade calorífica não estão restritas às interações entre os grupos não-polares em água (COOPER, 2005). No entanto, o fato de que a interação é

entropicamente dirigida (**Tabela 1, Anexo2**), mesmo com perda de entropia conformacional (**Figura 6 e 7, Anexo2**), indica que as interações hidrofóbicas desempenham um papel importante tanto na interação quanto na estabilização da proteína. Assim, podemos concluir que a dessolvatação do ligante e do sítio de ligação, devido principalmente ao aumento da entropia da água, é um passo-chave na interação entre XIAP-BIR3 e AVPI.

Também já está bem caracterizado que a estabilidade térmica de proteínas é modificada por ligantes devido ao acoplamento mútuo entre os dois processos em equilíbrio: a interação e o desenovelamento (FUKADA e cols., 1983; SHRAKE e ROSS, 1990, 1992; CELEJ e cols., 2003). A energia livre de ligação adicional é responsável pela mudança da temperatura de desenovelamento, e pode incluir ou não as contribuições de mudanças conformacionais. As informações sobre as mudanças na estrutura e flexibilidade, associadas ao reconhecimento molecular, são importantes para o entendimento da termodinâmica da interação, bem como para o planejamento de candidatos a fármacos. Aqui nós mostramos que a ligação do tetrapeptídeo AVPI leva à estabilização do domínio XIAP-BIR3 frente à desnaturação induzida por ureia e temperatura (**Tabela 2, Anexo2**). No entanto, é importante entender se a estabilização é resultado de alterações na conformação do domínio XIAP-BIR3. A pequena variação do espectro de CD (**Figura 5A, Anexo2**) poderia estar relacionada com a formação de uma folha- $\beta$  antiparalela na interação do AVPI sobre XIAP-BIR3 (WU e cols., 2000), mas também pode ser devido à estabilização de um ou mais estados conformacionais pré-existentes, como verificado por RMN (**Figura 6A, Anexo2**). Além disso, nossos resultados de simulação de dinâmica molecular do domínio XIAP-BIR3 e do complexo XIAP-BIR3/AVPI (**Figura 5C, Anexo2**) sugerem que as estruturas fitas- $\beta$  são estabilizadas pela interação com o AVPI. Assim, a interação do AVPI parece selecionar

uma conformação ou mais, sendo esta(s) mais rígida(s) e com as estruturas fitas- $\beta$  mais estáveis.

As duas principais forças que estabilizam a estrutura da proteína são o efeito hidrofóbico e ligações de hidrogênio, e a principal força desestabilizadora é a perda de entropia conformacional (PACE, 2009). Nossos dados de simulação de dinâmica molecular indicam que a rede de ligações de hidrogênio no XIAP-BIR3 é um pouco estabilizada pela ligação do AVPI (**Figura 5B, Anexo2**) e algumas delas envolvem provavelmente fitas- $\beta$  (**Figura 5C, Anexo2**). Ao medir as constantes de acoplamento da ligação de H por RMN, outros autores também mostraram que a ligação de ligantes pode afetar as redes de ligação de hidrogênio de proteínas (CORDIER e cols., 2000). Por exemplo, ligantes do domínio SH3 induzem tensão nas ligações de hidrogênio que perfazem a superfície de interação SH3/ligante, desencadeando pequenas mudanças no comprimento das ligações de hidrogênio, as quais foram propagadas por todo o domínio (CORDIER e cols., 2000). Assim, o aumento da taxa de calor envolvida na desnaturação XIAP-BIR3 é devido à variação positiva da capacidade calorífica de desnaturação com a temperatura (**Figura 4B, Anexo2**), mas também pode ter uma contribuição de estabilização das ligações de hidrogênio que foram promovidas pela ligação ao AVPI.

Alterações na flexibilidade após a interação de ligantes, mutações ou mudanças nas condições da amostra podem ser interpretadas em termos de contribuições à entropia conformacional. A flexibilidade da cadeia principal e da cadeia lateral pode diminuir ou aumentar após a interação de um ligante (STONE, 2001). Uma diminuição está frequentemente associada a interações com "compensação entalpia-entropia" e/ou o processo de "*fit* induzido ou seleção conformacional", enquanto um aumento da entropia conformacional pode contribuir para a estabilização dos complexos. Liu e colaboradores observaram que duas voltas do domínio XIAP-BIR3, que não poderiam ser caracterizadas

estruturalmente por RMN na proteína livre, tornaram-se bem definidas quando o domínio está complexado com AVPI (LIU e cols., 2000). Surpreendentemente, uma única mutação (G306E) que estabiliza esses *loops* promove mudanças na afinidade ao ligante (MOORE e cols., 2009). Neste caso, houve uma perda de entropia favorável à interação, o que está relacionado com a redução de contatos hidrofóbicos. Nossos dados de simulação de dinâmica molecular do domínio e do complexo (**Figura 7, Anexo2**) também sugeriram que a interação com AVPI reduz a flexibilidade conformacional destas voltas (276-280 e 309-314) do domínio (**Figura 7B e 7C, Anexo2**), sendo somente uma delas envolvida na interação. Também por simulação, observamos que o XIAP BIR3 livre apresenta as regiões N- e C- terminais altamente desordenadas e flexíveis (**Figura 7B, Anexo2**), as quais também são estabilizadas na interação com o AVPI (**Figura 7B e 7C, Anexo2**). Os dados de NOEs heteronucleares corroboram a estabilização do XIAP-BIR3 na escala de ns-ps (**Figura 6C, Anexo2**). Todos estes dados indicam uma perda considerável de entropia conformacional no domínio XIAP-BIR3 associada à ligação com AVPI. Variações de entropia conformacional e da capacidade calorífica podem ser tanto importantes na estabilização das estruturas desordenadas de proteínas (STONE, 2001) e, além disso, são importantes fatores envolvidos na estabilização do domínio XIAP-BIR3.

Já é bem conhecido da termodinâmica fundamental que as mudanças na flexibilidade acopladas a interações modulam a entropia conformacional, o que contribui significativamente para o  $\Delta C_p$  (STURTEVANT, 1977). Ambas as flutuações na escala de tempo de ps-ns ou  $\mu$ s-ms, as quais podem ser obtidas por medidas de relaxamento, afetam o  $\Delta C_p$ . Além disso, a redistribuição do estado nativo induzida pela interação de um ligante parece ser uma fonte significativa de  $\Delta C_p$ . A redução da população/densidade de microestados contribui para o aumento na variação negativa do  $\Delta C_p$  (EFTINK e cols., 1983; WANG e cols., 2001). Nossos resultados mostram que a interação do peptídeo

envolve o processo de seleção conformacional (**Figura 6A, Anexo2**), com redução da flexibilidade do domínio (**Figura 6 e 7, Anexo2**). Portanto, nossos dados calorimétricos, os quais mostram um  $\Delta C_p$  negativo ( $-157,3 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) após a interação com o AVPI, parecem estar fortemente associados à dinâmica da proteína, além da contribuição de interação hidrofóbica. É interessante notar que, mesmo quando a interação hidrofóbica é preponderante (AVPI tem um caráter hidrofóbico), a entropia conformacional é importante para a redução do  $\Delta C_p$  e para a ligação de solutos hidrofóbicos. O número de conformações do complexo XIAP-BIR3/AVPI é provavelmente menor do que da proteína livre, resultando em uma diminuição no componente entrópico da energia livre de interação do AVPI.

A rigidez estrutural e a flexibilidade de proteínas são extremamente equilibradas após o enovelamento, e a interação de ligantes pode perturbar as contribuições de energia pela entropia e entalpia (ZIDEK e cols., 1999). Na presença de complementaridade geométrica ideal das espécies que interagem, a restrição de flexibilidade residual da proteína pode ditar condições desfavoráveis para a estabilidade do complexo. Uma ampla troca entre entalpia e entropia tem sido indicada para o processo de interação proteína-proteína (FREIRE, 2008). As mudanças na energia conformacional ( $\Delta G_{\text{conf}}$ ) do complexo obtidas a partir dos experimentos de desnaturação por ureia ( $\Delta\Delta G = -1,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) mostram que o XIAP-BIR3 é altamente estabilizado, e que esta estabilização é significativamente importante para a afinidade do AVPI (**Tabela 2, Anexo2**). Embora a variação da entropia conformacional ( $\Delta S_{\text{conf}}$ ) seja desfavorável (**Figura 6 e 7, Anexo2**), a variação da entropia de ligação ( $\Delta S_{\text{lig}}$ ) é altamente favorável (**Tabela 1, Anexo2**). Assim, provavelmente a alta variação da entropia de hidratação ( $\Delta S_{\text{hid}}$ ), que está associada aos contatos hidrofóbicos, é essencial para a afinidade de ligação e de estabilização, o que

indica que a variação negativa da capacidade calorífica que ocorre na ligação com AVPI também é fortemente associada ao efeito hidrofóbico. Em conclusão, embora as ligações de hidrogênio também sejam estabilizadas, envolvendo restrição dinâmica, nossos dados sugerem fortemente que a estabilização do domínio XIAP-BIR3 pelo tetrapeptídeo AVPI também é bastante favorecida por fatores hidrofóbicos.

Embora a compensação entalpia-entropia seja fundamental para a otimização da afinidade (LAFONT e cols., 2007; OLSSON e cols., 2008), as estratégias de planejamento de fármacos se concentram unicamente na obtenção de novas interações intermoleculares favoráveis. No entanto, a associação de fármacos a proteínas muitas vezes implica em uma penalidade entrópica, geralmente decorrendo de ajuste induzido (*fit* induzido), comprometendo a afinidade. Recentemente, estudos utilizando métodos de relaxação por RMN mostraram que, quando diferentes peptídeos ligam à calmodulina, a aparente mudança na entropia conformacional é linearmente relacionada com a mudança na entropia total da interação (FREDERICK e cols., 2007). Estes resultados mostram que a mudanças entropia conformacional da proteína podem contribuir significativamente para a energia livre de associação de proteína-ligante. Além disso, outros autores têm demonstrado que a desordem induzida em complexos proteína-ligante pode ser uma estratégia no desenho de fármacos (CRESPO & FERNANDEZ, 2008). A perda de entropia conformacional do domínio XIAP-BIR3, que resulta da seleção de conformação(ões) de flexibilidade reduzida pela interação, principalmente dos dois *loops* e de regiões terminais, é um fator desfavorável crucial à afinidade de AVPI e parece ser um importante aspecto a ser considerado no planejamento racional de candidatos a fármacos.

Nosso modelo relativamente simples da interação XIAP-BIR3/AVPI tem características interessantes, porque aborda a correlação entre as alterações na estabilidade da proteína promovida pela interação do ligante, e o processo de seleção conformacional, a

restrição dinâmica e efeito hidrofóbico. Assim, verificamos que a estabilização do domínio XIAP-BIR3 pela interação com AVPI é resultado do efeito hidrofóbico (entropicamente dirigido) e da estabilização das ligações de hidrogênio (entalpicamente dirigido). Contudo, esta interação foi parcialmente compensada por uma perda de entropia conformacional, a qual parece estar associada à seleção de conformação(ões) pré-existente(s) (na escala de  $\mu$ s-ms) e à redução da flexibilidade (na escala de ps-ns). Estes dados fornecem informações importantes sobre a interação entre a proteína proapoptótica Smac/DIABLO e as IAPs, e podem auxiliar na compreensão da natureza da inibição do domínio XIAP-BIR3.

### **2.5.2. Novas abordagens para auxiliar no planejamento de antagonistas de IAPs: um estudo estrutural e termodinâmico**

A interação de ligantes a macromoléculas biológicas é fundamental para muitos aspectos da Bioquímica e Biologia Celular. Eventos de interação geralmente não ocorrem isoladamente em Bioquímica, e são quase sempre associados a outras reações, tais como mudanças de protonação, transições estruturais e de enovelamento (WHITESIDES & KRISHNAMURTHY, 2005). Para a compreensão de uma interação, se faz necessário a medida de afinidade, estequiometria, componentes de entalpia e entropia, além das contribuições das reações acopladas.

Nos últimos anos, as estruturas de muitas proteínas apoptóticas foram resolvidas por cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear, as quais têm sido utilizadas para o desenho de candidatos a fármacos. No entanto, os compostos planejados exclusivamente com base na estrutura, muitas vezes não resultam em qualquer melhoria da afinidade de interação por causa do fenômeno compensação entalpia-entropia (LANFONT

e cols., 2007). A energia livre de interação é uma medida-chave da natureza favorável de um evento químico. No desenho de fármacos de forma computacional, a afinidade de interação é comumente usada para guiar a descoberta ou a otimização da potência de fármacos. Durante a otimização de uma interação, tende-se tentar melhorar o perfil farmacocinético/toxicológico de um composto, mantendo a potência suficiente para o alvo (WEBER & SALEMME, 2003). Estes esforços são muitas vezes conduzidos a partir de informações estruturais do complexo receptor-ligante previamente obtidas por difração de raios-X ou RMN. Na prática, não é raro que a maioria dos derivados que venham a surgir a partir desses esforços não possuem maior potência, apesar da introdução de novos grupos funcionais que formam interações favoráveis com o receptor (LANFONT e cols., 2007). Isso ocorre porque os efeitos de compensação entre entalpia e entropia não são captados pelos dados de afinidade estrutural e de interação isoladamente (LANFONT e cols., 2007). Além disso, a maioria das estratégias de desenho de fármacos está centrada em torno da otimização da afinidade de ligação, porém compostos caracterizados por assinaturas termodinâmicas diferentes (ou seja, a proporção em que a entalpia e entropia contribuem para a afinidade de interação) não apresentam o mesmo comportamento, mesmo que tenham a mesma afinidade pelo alvo. Devido a mudanças de entalpia e entropia serem originárias de diferentes tipos de interações, algumas propriedades, tais como a seletividade de um composto pela sua proteína alvo ou a resposta a mutações associadas com resistência a drogas, dependem em grande parte da sua assinatura termodinâmica (FREIRE, 2008). Além disso, para obter um composto de afinidade extremamente alta de ligação se faz necessário que tanto as mudanças de entalpia quanto entropia contribuam favoravelmente para a interação e não se oponham umas às outras.

XIAP-BIR3 é um domínio de interesse particular, pois a sua inibição permite que as células tumorais que superexpressam XIAP entrem em apoptose, sendo, portanto, alvo

promissor na terapia contra o câncer. Nos últimos anos, muitos estudos têm caracterizado a estrutura do domínio XIAP-BIR3. Essa estrutura consiste de cinco  $\alpha$ -hélices e três fitas- $\beta$ . Depois que a estrutura do XIAP-BIR3 foi resolvida por RMN, vários trabalhos têm determinado a sua estrutura na presença de ligantes diferentes, tais como o peptídeo AVPF (WIST e cols., 2007), o peptídeo AVPIAQKSE (LIU e cols., 2000), e vários miméticos de pequenas moléculas de Smac/DIABLO. Com base em estruturas depositadas no PDB, verificamos alterações significativas na estrutura secundária, principalmente pela formação ou estabilização de  $\alpha$ -hélice na região C-terminal. Estes dados corroboram os nossos resultados de CD, visto que existem diferenças significativas nos espectros de CD do domínio XIAP-BIR3 devido à ligação de peptídeos. Recentemente, caracterizamos a estabilidade do domínio XIAP-BIR3 e mostramos seleção conformacional, restrição dinâmica e efeito hidrofóbico associados à estabilização do domínio pela interação com o AVPI (SOUZA e cols., 2010). Assim, dividimos essas mudanças estruturais em duas categorias: 1- mudanças promovidas pelos peptídeos contendo Isoleucina na posição quatro são semelhantes e ocorrem devido à estabilização de fitas- $\beta$ , envolvendo seleção conformacional como mostrado pelo nosso grupo; 2- mudanças promovidas por peptídeos contendo Fenilalanina na posição quatro indicam aumento em  $\alpha$ -hélice, visto que há um aumento no pico negativo em 222 nm nos espectros de CD. Nossos dados sugerem que estas alterações estruturais induzidas por peptídeos podem contribuir para a afinidade do ligante, provavelmente devido ao calor liberado na formação de ligações de hidrogênio para a estabilização em  $\alpha$ -hélice (entalpicamente dirigida) (SOUZA e cols., 2010).

Os parâmetros termodinâmicos da ligação de peptídeos ao XIAP-BIR3 foram determinados por ITC e mostram que para todos os peptídeos a reação é tanto entalpicamente quanto entropicamente favorecida (**Figura 2.25; Tabela 2.1**). É importante observar que as pequenas mudanças conformacionais promovidas por peptídeos, como

indicado pelos dados de CD (**Figura 2.30**) e análises das estruturas depositadas no PDB (**Figura 2.31**), podem contribuir para a variação de entalpia e entropia, e consequentemente para a afinidade. Estes estudos termodinâmicos podem ser utilizados para auxiliar no desenho de fármacos. Medidas de calorimetria diferencial de varredura mostraram um aumento de 5°C a 14°C na temperatura média de desnaturação para os complexos com peptídeos em comparação com o XIAP-BIR3 livre (**Tabela 2.2**). Assim, a ligação dos peptídeos parece aumentar a integridade estrutural e a estabilidade do XIAP-BIR3. Alterações do espectro de CD-UV foram observadas na faixa de 200-240 nm para os complexos em comparação com o XIAP-BIR3 livre (**Figura 2.30**), indicando também que a estrutura secundária do BIR3 foi alterada após a complexação. Essas mudanças nos espectros de CD-UV podem ser interpretadas apenas qualitativamente, em termos de um ligante induzir pequenas mudanças no conteúdo de  $\alpha$ -hélice ou folha- $\beta$  da proteína. A formação de novas interações intramoleculares no domínio XIAP-BIR3 estabilizadas pela interação com os peptídeos podem contribuir fortemente para a afinidade.

Dissecar fatores envolvidos em uma interação é de grande importância, além de um grande desafio (WHITESIDES & KRISHNAMURTHY, 2005). É impossível atribuir o cooperativismo entre entropia ou de entalpia quando existe a perturbação de um sistema de forma confiável. O problema é que existem vários fatores que podem contribuir para a entalpia e para as mudanças de entropia. Para ligantes monofuncionais, podemos destacar:

- 1- interações entre ligante-receptor, o que poderia dar uma contribuição favorável pelo  $\Delta H$ ;
- 2- efeitos hidrofóbicos, o que seria favorável ao  $\Delta S$  e desfavorável associado à dessolvatação de grupos polares,
- 3- restrição de movimentos intermoleculares, o que seria desfavorável para o  $\Delta S$  (FREDERICK e cols., 2007), e
- 4- alterações conformacionais na proteína e/ou ligante, que podem fazer contribuições favoráveis ou desfavoráveis a  $\Delta H$  e

$\Delta S$ . Um ganho estrutural poderia tornar  $\Delta H$  e  $\Delta S$  mais negativos faria  $\Delta H$  e  $\Delta S$  mais positivos (WHITESIDES & KRISHNAMURTHY, 2005). Estas modificações compensatórias em  $\Delta H$  e  $\Delta S$  são frequentemente grandes. É claro que as interações e o efeito hidrofóbico estão envolvidos na interação do XIAP-BIR3 com tetrapeptídeos. A restrição do movimento intermolecular do XIAP-BIR3 acoplado à interação com AVPI foi demonstrado pelo nosso grupo (Souza e cols., 2010). Para os peptídeos que parecem levar a um aumento no conteúdo de  $\alpha$ -hélice, existe uma variação negativa de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  como verificado pelos nossos dados calorimétricos. Além disso, a ligação destes peptídeos pode levar a uma restrição dinâmica, pelo menos local, pois é uma consequência natural do enovelamento de proteínas. Nossos dados mostraram que existe uma compensação entalpia-entropia ao comparar a interação dos diferentes peptídeos (**Figura 2.28**), o que poderia estar relacionado, pelo menos em parte, a um pequeno enovelamento da proteína, ou a estabilização de uma conformação enriquecida em  $\alpha$ -hélice, o que corrobora análises de estruturas do domínio a presença de diferentes ligantes depositadas no PDB (**Figura 2.31**).

Em conclusão, a correlação entre os dados de CD e análises de estruturas depositadas no PDB com os dados calorimétricos sugere fortemente que a afinidade pelo domínio XIAP-BIR3 não é majoritariamente devido às interações diretas com o alvo molecular, mas há uma grande contribuição dos efeitos indiretos da interação que envolvem mudanças na estrutura e dinâmica do XIAP-BIR3. XIAP-BIR3 apresenta conformações que estão em troca conformacional (SOUZA e cols., 2010). É possível que cada grupo de peptídeos ou outros ligantes possam selecionar uma conformação ou conformações específicas. Desta forma, nossos estudos fornecem novas abordagens sobre a estrutura e termodinâmica da inibição do XIAP-BIR3 em solução e conseqüentemente são importantes para o desenvolvimento de novos fármacos.

### **2.5.3. Papel do zinco na estrutura, estabilidade termodinâmica e função do domínio XIAP-BIR3**

Íons são elementos essenciais para vários processos biológicos importantes para a manutenção da vida (HARTWIG e cols., 2001). O íon zinco ( $Zn^{2+}$ ) pode exibir propriedades adequadas para funções catalíticas e estruturais das proteínas (WOLFGAND e LI, 2009). Estes avanços resultaram no reconhecimento de enzimas ou outras proteínas que ligam ao zinco, as quais se tornam alvos moleculares para intervenção em determinadas doenças (ANZELLOTTI e FARRELL, 2008).

A concentração celular de zinco total está na faixa de centenas de micromolar. Contudo, a maioria do zinco está fortemente ligado, sendo a concentração no estado estacionário de íons zinco livre bastante baixa, na faixa de picomolar (WOLFGAND e LI, 2009). O zinco pode interagir com proteínas de diferentes formas. Pode interagir intramolecularmente e auxiliar no enovelamento correto ou incorreto, levando à agregação protéica. O zinco também pode se ligar às proteínas pré-enoveladas (Wolfgang e Li, 2009). Além disso, pode interagir intermolecularmente auxiliando a formação de pequenos ou grandes oligômeros.

O domínio XIAP-BIR3 apresenta um átomo de zinco, o qual é coordenado por três cisteínas conservadas (Cis300, Cis303 e Cis327) e uma histidina (His320) (Sun e cols., 2000) em uma configuração clássica de motivo de dedo de zinco (*zinc finger motif*) (RICHTER e DUCKETT, 2000) que é específica. Um trabalho recente mostrou que o tratamento com o quelante de zinco permeável à membrana TPEN induz a rápida depleção de XIAP a nível pós-traducional em células de câncer de próstata. Além disso, TPEN foi capaz de promover a ativação de caspase-3 e -9, e sensibiliza células de câncer de próstata para apoptose mediada por TRAIL (MAKHOV e cols., 2008). Estas descobertas indicam que agentes quelantes de zinco podem ser usados para sensibilizar células malignas para a

ação de agentes citotóxicos estabelecidos via diminuição de XIAP. O papel do zinco na estrutura, estabilidade e função do domínio XIAP-BIR3 ainda não foi descrito.

Alguns trabalhos têm mostrado a importância do zinco para a estrutura de proteínas assim como para o seu enovelamento. Por exemplo, a proteína NS3 do Vírus da Hepatite C sofre uma alteração estrutural associada à interação com o zinco (ABIAN e cols., 2009). O equilíbrio conformacional da proteína NS3 é controlado e modulado pela interação com o zinco, em um processo de enovelamento associado à interação (ABIAN e cols., 2009). Em contrapartida, nossos dados mostram que o zinco não é crucial para estrutura do domínio XIAP-BIR3, assim como não é para o seu enovelamento, visto que não existiram grandes alterações nos espectros de dicroísmo circular e fluorescência em sua ausência. Desta forma, estes dados indicam que o enovelamento do domínio é independente da presença do zinco e, portanto, a interação do zinco acontece na estrutura do domínio já pré-formada. Ainda estamos utilizando RMN para confirmarmos a pouca influência do zinco na estrutura do domínio.

O zinco também tem sido descrito de grande importância para estabilidade de proteínas. Estudos dos efeitos do zinco na estabilidade estrutural da proteína supressora de tumor p53 mostraram que a interação com zinco leva a uma alteração estrutural, a qual aumenta a estabilidade da proteína (XUE e cols., 2009). Em nossas análises, verificamos por diferentes metodologias e agentes desnaturantes que a interação do zinco, apesar de não ser essencial para a estrutura, exerce um papel fundamental para a estabilidade desta estrutura já pré-formada. Na ausência deste íon, o XIAP-BIR3 é altamente desestabilizado, o que possivelmente pode estar correlacionado à sua degradação em células por ação de agentes quelantes de zinco, como verificado por Makhov e colaboradores (MAKHOV e cols., 2008).

Interações dinâmicas entre zinco-proteína são importantes na regulação de proteínas, na detecção de zinco, no transporte de zinco através das membranas celulares, na redistribuição de zinco intracelular, e para as suas funções em proteínas em geral (WOLFGAND e LI, 2009). A influência da coordenação de zinco na dinâmica de proteínas, uma quarta dimensão na Biologia Estrutural, tem se tornado evidente tanto nos sítios estruturais quanto nos catalíticos que apresentam o zinco, proporcionando novas perspectivas sobre as funções de metais em proteínas. Simulação de dinâmica molecular foi utilizada para nos auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na desestabilização verificada neste trabalho. Por análises comparativas, a área acessível ao solvente torna-se maior na proteína sem o zinco, o que a torna mais suscetível à ação de agentes desnaturantes. Além disso, o domínio torna-se mais flexível, o que mostra o papel do zinco para a restrição dinâmica, a qual também se correlaciona com a perda de estabilidade deste domínio.

A deficiência de zinco é prejudicial em muitos aspectos, para a função normal dos organismos, com notáveis efeitos sobre o crescimento e sistema imune (VALLEE e FALCHUK, 1993). Dada a importância e a diversidade de metaloproteínas e enzimas contendo zinco, a perturbação da homeostase do zinco, a deficiência de zinco através da dieta ou alterações genéticas em proteínas de zinco, estão correlacionadas com doenças como câncer e diabetes. Estes avanços resultaram no reconhecimento de enzimas ou outras proteínas que ligam ao zinco, as quais se tornam alvos moleculares para intervenção na doença (ANZELLOTTI e FARRELL, 2008). Neste trabalho, também investigamos se a presença do zinco no domínio é fundamental para sua capacidade de interagir com as caspases (ATPF) ou com a Smac/DIABLO (AVPI). Nossos dados mostraram que o zinco não tem um papel significativo na capacidade do domínio exercer sua função, o que pode ser explicado pela manutenção de sua estrutura.

Em resumo, o zinco parece ser especialmente e unicamente importante para a estabilidade do domínio, como verificamos por diferentes metodologias. Sua retirada não implicou em desestruturação e nem prejudicou sua capacidade de interagir com seus alvos celulares. Este estudo elucidou o papel do zinco no domínio BIR3-XIAP, e assim, indica o zinco como um bom alvo para intervenção farmacológica para pacientes com tumores que superexpressam XIAP.

## 2.6. Conclusões

- A estabilização do domínio BIR3 da proteína inibidora de apoptose XIAP pela interação com o tetrapeptídeo AVPI da Smac/DIABLO envolve seleção conformacional, restrição dinâmica e efeito hidrofóbico.
- O aumento da afinidade dos peptídeos ao domínio XIAP-BIR3 está em grande parte associado ao favorecimento entálpico proveniente de mudanças estruturais, aliado a um menor grau de compensação entrópica.
- O íon zinco ligado ao domínio XIAP-BIR3 representa um alvo para agentes terapêuticos, pois tem extrema importância para sua estabilidade, apesar de não ser necessário para o seu correto enovelamento, para sua estrutura ou para sua função fisiológica.
- Todas nossas análises estruturais, dinâmicas e termodinâmicas revelam novas características da natureza da inibição da XIAP, adicionando assim novas informações para o auxílio no desenho racional de fármacos que inibam as IAPs, favorecendo a morte de células cancerosas.

### 3. Referências Bibliográficas

- ABIAN, O., NEIRA, J.L. & VELAZQUEZ-CAMPOY, A. Thermodynamics of zinc binding to hepatitis C virus NS3 protease: a folding by ligand binding. **Proteins** 77:624-636 (2009).
- ACOSTA-RIVERO, N., RODRIGUES, A., MUSSACHIO, A., POUTU, J., FALCON, V., TORRES, D., AGUILLAR, C., LINARES, M., ALONSO, M., PEREZ, A., MENEZES, I., MORALES-GRILLO, J., MARQUES, G. & DUENAS-CARRERA, S.A. A C-terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles into virus-like particles *in vitro* in the absence of structured nucleic acids. **Biochem Biophys Res Con** 334: 901-906 (2005).
- AMBROSINI, G., ADIDA, C. & ALTIERI, D.C. A novel anti-apoptosis gene, surviving, expresses in cancer and lymphoma. **Nature Med.** 3: 917-217 (1997).
- ANDREINI, C., BANCI, L., BERTINI, I. & ROSATO, A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. **J. Proteome Res.** 5: 196–201 (2005).
- ANFINSEN, C. B. Points of current interest in protein chemistry. **Lab Invest.** 10: 987-91 (1961).
- ANZELLOTTI, A. I. & FARRELL, N. P. Zinc metalloproteins as medicinal targets. **Chem. Soc. Rev.** 37, 1629–1651 (2008).
- ARKIN, M. Protein-protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. **Current Opinion in Chemical Biology** 9: 317-324 (2005).
- ARNT, C.R., CHIOREAN, M.V., HELDEBRANT, M.P., GORES, G.J. & KAUFMANN, S.H. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 *in situ*. **The Journal of Biological Chemistry** 277: 44236-44243 (2002).
- BALDWIN, R.L. How does protein folding get started? **Trends Biochem. Sci.** 14: 291–294 (1989).
- BALDWIN, R.L. Energetics of protein folding. **J. Mol. Biol.** 371: 283-301 (2007).
- BAUMERT, T. F., ITO, S., WONG, D. T., & LIANG, T. J. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. **J Virol** 72: 3827-3836 (1998).
- BAUMERT, T. F., VERGALLA, J., SATOI, J., THOMSON, M., LECHMANN, M., HERION, D., GREENBERG, H. B., ITO, S., & LIANG, T. J. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. **Gastroenterology** 117: 1397-1407 (1999).

BIRNBAUM, M.J., CLEM, R.J. & MILLER, L.K. An apoptosis inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with cys/his sequence motif. **Journal of Virology** 68: 2521-2528 (1994).

BLANCHARD, E., BRAND, D., TRASSARD, S., GOUDEAU, A. & ROINGEARD, P. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. **J. Virol.** 76(8):4073-9 (2002).

BLANCHARD, E., HOURIOUX, C., BRAND, D., AIT-GOUGHOUlte, M., MOREAU, A., TRASSARD, S., SIZARET, P.Y., DUBOIS, F. & ROINGEARD, P. Hepatitis C virus-like particle budding: role of the core protein and importance of its Asp111. **J. Virol.** 77(18): 10131-8 (2003).

BLUNDELL, T.L., SIBANDA, B.L., MONTALVÃO, R.W., BREWERTON, S., CHELLIAH, V., WORTH, C.L., HARMER, N.J., DAVIES, O., BURKE, D. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 29;361(1467):413-23 (2006).

BODKIN, M.J. & GOODFELLOW, J.M. Hydrophobic solvation in aqueous trifluoroethanol solution. **Biopolymers** 39: 43–50 (1996).

BÖSCH, C., BUNDI, A., OPPLIGER, M. & WÜTHRICH, K. <sup>1</sup>H nuclear-magnetic-resonance studies of the molecular conformational of monomeric glucagons in aqueous solution. **Eur. J. Biochem.** 91: 209-214 (1978).

BOSMAN, C., VALLI, M.B., BERTOLINI, L., SERAFINO, A., BOLDRINI, R., MARCELLINI, M., & CARLONI, G. Detection of virus-like particles in liver biopsies from HCV-infected patients. **Res Virol.** 149(5):311-4 (1998).

BOULANT, S., VANBELLE, C., EBEL, C., PENIN, F. & LAVERGNE, J. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. **Journal of Virology** 79(17): 11353-11365 (2005).

BRADLEY, D. W. Virology, molecular biology and serology of hepatitis C virus. **Transf Med Rev** 7: 92-102 (1992).

BRUSCHWEILER, R. New approaches to the dynamics interpretation and prediction of NMR relaxation data from proteins. **Curr Opin Struct Biol** 13(2):175-83 (2003).

BRUYLANTS, G., WOUTERS, J. & MICHAUX, C. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. **Curr. Med. Chem.** 12(17):2011-20 (2005).

BUDKOWSKA, A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. **J. Virol.** 75: 8240-8250 (2001).

BUT, D.Y., LAI, C., YUEN, M. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, n.11, p.1652-1656 (2008).

CABANI, S. GIANNI, P.; MOLLICA, V.; LEPORI, L. Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous solution. **J. Solution Chem.** 10: 563-595 (1981).

CACCIOLA, I., POLLICINO, T., SQUADRITO, G., CERENZIA, G., ORLANDO, M.,E., & RAIMONDO, G. Occult Hepatitis B Virus Infection in Patients With Chronic Hepatitis C Liver Disease. **The New England Journal of Medicine** 341(1): 22-6 (1999).

CAI, Z., ZHANG, C., CHANG, K.S., JIANG, J., AHN, B.C., WAKITA, T., LIANG, T.J. and LUO, G. Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. **The Journal of Virology** 79(22): 13963-13973 (2005).

CAMPIOTTO, S., PINHO, J.R.R., CARRILHO, F.J., DA SILVA, L.C., SOUTO, F.J.D., SPINELLI, V., PEREIRA, L.M.M.B., COELHO, H.S.M., SILVA, A.O., FONSECA, J.C., ROSA, H., LACET, C.M.C. & BEARNRDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 38(1): 41-49 (2005).

CARDOSO, M. S., KOERNER, K. & KUBANEK, B. Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus and HIV: preliminary results. **Transfusion** 38: 905-907 (1998).

CARVALHO, A.B. & SOUZA, T.L.F. em Bases Moleculares em Clínica Médica (Eds Carvalho-Alves, P.C., Da Poian, A.T. & Abrahão, A.) 89-103 (2010).

CELEJ, M.S., DASSIE, A.S., FREIRE, E., BIANCONI, M.L. & FIDELIO, G.D. Ligand-induced thermostability in proteins: Thermodynamic analysis of ANS-albumin interaction. **Biochimia et Biophysica Acta** 1750: 122-133 (2005).

CELEJ, M.S., MONTICH, G.G. & FIDELIO, G.D. Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. **Protein Sci.** 12: 1496-1506 (2003).

CERES, P. & ZLOTNICK, A. Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. **Biochemistry** 41: 11525-11531 (2002).

CHAI, J., DU, C., WU, J-W., KYIN, S., WANG, X & SHI, Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. **Nature** 406: 855-862 (2000).

CHAIRES, J.B. Comorimetry and thermodynamics in drug design. **Annu. Rev Biophys** 37: 135-51 (2008).

CHECINSKA, A., GIACCONE, G.; KRUYT, F. & FERREIRA, C. G. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. **Cancer Research** 63: 831-837 (2003).

CHEN, Y., MÜLLER, J.D., SO, P.T., GRATTON, E. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. **Biophys J.** 77(1): 553-67 (1999).

CHEN, Y., MULLER, J.D., RUAN, Q. & GRATTON, E. Molecular Brightness characterization of EGFP in vivo by fluorescence fluctuation spectroscopy. **Biophysical Journal** 82:133-144 (2002).

CHITI, F. & DOBSON, C.M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. **Annual Review of Biochemistry** 75: 333-366 (2006).

CHOO, Q. L., KUO, G., WEINER, A. J., OVERBY, L. R., BRADLEY, D. W. & HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne Non-A, Non-B viral hepatitis genome. **Science** 244: 359-362 (1989).

CHU, C. & LEE, S. Hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfection: Epidemiology, clinical features, viral interactions and treatment. **J. Gastroenterol. Hepatol.** 23(4): 512-20 (2008).

CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L. & MILLER, R. H. One step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Biochemistry (USA)**. 86: 2172-2175 (1989).

COCQUEREL, L., VOISSET, C. & DUBUISSON, J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. **Journal of General Virology** 87(Pt5):1075-1084 (2006).

COOPER, A. Heat capacity effects in protein folding and ligand binding: a re-evaluation of the role of water in biomolecular thermodynamics. **Biophysical Chemistry** 115: 89-97 (2005).

COOPER, A., CAMERON, D., JAKUS, J. & PETTIGREW, G.W. Pressure perturbation calorimetry, heat capacity and the role of water in protein stability and interactions. **Biochemical Society** 35: 1547-50 (2007).

CORDIER, F., WANG, C., GRZESIEK, S. & NICHOLSON, L.K. Ligand-induced strain in hydrogen bonds of the c-Src SH3 domain detected by NMR. **J. Mol. Biol.** 304: 497-505 (2000).

CORMIER, E.G., TSANIS, F., KAJUMO, F., DURSO, R.J., GARDNER, J.P. & DRAGIC, T. CD 81 is a coreceptor for hepatitis C virus. **PNAS** 101(19): 7270-7274 (2004).

CREIGHTON, T.E. Protein structure: A practical approach. Oxford University Press, Heidelberg, Germany. (1997).

CRESPO, A. & FERNANDEZ, A. Induced disorder in protein-ligand complexes as a drug design strategy. **Molecular Pharmaceutics** 5(3): 430-437 (2008).

CRISTOFARI, G., IVANYI-NAGY, R., GABUS, C., BOULANT, S., LAVERGNE, J. P., PENIN, F. & DARLIX, J. L. The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA *in vitro*. **Nucleic Acids Res** 32: 2623-2631 (2004).

CROOK, N.E., CLEM, R.J. & MILLER, L.K. An apoptosis inhibiting baculovirus gene with a zinc finger like motif. **Journal of Virology** 67: 2168-2174 (1993).

DAGGETT, V. & FERSHT, A. R. Is there a unifying mechanism for protein folding? **TRENDS in Biochemical Sciences** 28: 18-25 (2003).

DELAGLIO, F., GRZESIEK, S., VUISTER, G.W., ZHU, G., PFEIFER, J. & BAX, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, **J. Biomol. NMR**. 6(3): 277-93 (1995).

DEVERAUX, Q.L. & REED, J.C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. **Genes Dev**. 13: 239-252 (1999).

DEVERAUX, Q.L., STENNICKE, H.R., VAN ARSDALE, t, ZHOU, Q., SRINIVASULA, S.M., ALNEMRI, E.S., SALVESEN, G.S. & REED, J.C. IAP block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome C by direct inhibition of distinct caspases. **EMBO J**. 17: 2215-2223 (1998).

DEVERAUX, Q.L., TAKAHASHI, R., SALVESEN, G.S. & REED, J.C. X-linked IAP is direct inhibitor of cell-death proteases. **Nature** 388: 300-304 (1997).

DIXIT, N.M. e PERELSON, A.S. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. **Cell Mol Life Sci**. 63(7-8):832-42 (2006).

DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L. & WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell** 102: 33-42 (2000).

DUBUISSON, J. Hepatitis C Virus Proteins. **World J Gastroenterol**. 13(17): 2406-2415 (2007).

DUCKETT, C.S., NAVA, V.E., GEDRICH, R.W., CLEM, R.J., VANDONGEN, J.L., GILFILLAN, M.C., SHIELS, H., HARDWICK, J.M. & THOMPSON, C.B. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. **EMBO J**. 15: 2685-2694 (1996).

DUNKER, A. K., LAWSON, J. D., BROWN, C. J., WILLIAMS, R. M., ROMERO, P., OH, J. S., OLDFIELD, C. J., CAMPEN, A. M., RATLIFF, C. M., HIPPS, K. W., AUSIO, J., NISSEN, M. S., REEVES, R., KANG, C.-H., KISSINGER, C. R., BAILEY, R. W., GRISWOLD, M. D., CHIU, W., GARBER, E. C. & OBRADOVIC, Z. Intrinsically disordered proteins. **J. Mol. Graph. Model**. 19: 26-59 (2001).

DUNKER, A. K., OLDFIELD, C. J., MENG, J., ROMERO, P., YANG, J. Y., CHEN, J. W., VACIC, V., OBRADOVIC, Z. & UVERSKY, V. N. The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins. **BMC Genomics** 9(Suppl 2):S1 (2008).

DUVIGNAUD, J.B., SAVARD, C., FROMENTIN, R., MAJEAU, N., LECLERC, D., & GAGNÉ, S.M. Structure and dynamics of the N-terminal half of hepatitis C virus core protein: an intrinsically unstructured protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 378(1):27-31 (2009).

DYSON, H.J & WRIGHT, P.E. Insights into the structure and dynamics of unfolded proteins from nuclear magnetic resonance. **Adv. Protein Chem.** 62: 311-340 (2002).

DYSON, H.J. & WRIGHT, P.E. Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. **Chem. Rev.** 104(8): 3607-22 (2004).

EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M. & KAUFMANN, H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and function during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.** 68: 383-424 (1999).

EFTINK, M. R., ANUSIEM, A. C. & BILTONEN, R. L. Enthalpy-entropy compensation and heat capacity changes for protein-ligand interactions: general thermodynamic models and data for the binding of nucleotides to ribonuclease A. **Biochemistry** 22(16) 3884-3896 (1983).

FAN, Z., YANG, Q.R., TWU, J.S., & SHERKER, A.H. Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein. **J. Med. Virol.** 59(2):131-4 (1999).

FARCI, P., SHIMODA, A., COIANA, A., DIAZ, G., PEDDIS, G., MELPOLDER, J. C., STRAZZERA, A., CHIEN, D. Y., MUNOZ, S. J, BALESTRIERI, A., PURCELL, R. H. & ALTER, H. J. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. **Science** 288(5464):339-44 (2000).

FEINSTONE, S. M., KAPIKIAN, A. Z., PURCELL, R. H., ALTER, H. J. & HOLLAND, P. V. Transfusion associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **N Engl. J. Med.** 292:767-770 (1975).

FELD, J.J. & HOOFNAGLE, J.H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature** 436(7053):967-972 (2005).

FESIK, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature** 5: 876-885 (2005).

FORNS, X. & BUKH, J. The molecular biology of hepatitis C virus: genotypes and quasispecies. **Clinics in Liver Disease** 3 (4): 693-716 (1999).

FRANKLIN, M.C., KADKHODAYAN, S., ACKERLY, ALEXANDRU, D., DISTEFANO, M.D., OLLIOTT, L.O., FLYGARE, J.A., MAUSISA, G., OKAWA, D.C., ONG, D., VUCIC, D., DESHAYES, K. & FAIRBROTHER, W.J. Structure and function analysis of peptide antagonists of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). **Biochemistry** 42: 8223-8231 (2003).

FREDERICK, K.K., MARLOW, M.S., VALENTINE, K.G. & WAND, A.J. Conformational entropy in molecular recognition by proteins. **Nature** 448:325-330 (2007).

FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. **Drug Discovery Today: Technologies** 1(3): 295-299 (2004).

FREIRE, E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? **Drug Discovery Today** 13: 869-874 (2008).

FRIED, M. e CROTHERS, D.M. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. **Nucleic Acids Res.** 9(23): 6505-25 (1981).

FROMENTIN, R., MAJEAU, N., GAGNÉ, M.L., BOIVIN, A., DUVIGNAUD, J. & LECLERC, D. A method for in vitro assembly of hepatitis C virus core protein and for screening of inhibitors. **Analytical Biochemistry** 366: 37-45 (2007).

FUKADA, H., STURTEVANT, J.M. & QUIOCHO, F.A. Thermodynamics of the binding of L-arabinose and of D-galactose to the L-arabinose-binding protein of Escherichia coli. **J. Biol. Chem.** 258(21) 13193-8 (1983).

FULDA, S., WICK, W., WELLER, M. & DEBATIN, K.M. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. **Nat Med.** 8(8): 808-15 (2002).

FUXREITER, M.; SIMON, I.; FRIEDRICH, P. & TOMPA, P. Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. **J. Mol. Biol.** 338, 1015-1026 (2004).

GARDINO, A.K., VILLALI, J., KIVENSON, A., LEI, M., LIU, C. F., STEINDEL, P., EISENMESSER, E. Z., LABEIKOVSKY, W., WOLF-WATZ, M., CLARKSON, M. W., & KERN, D. Transient Non-native Hydrogen Bonds Promote Activation of a Signaling Protein. **Cell** 139: 1109–1118 (2009).

GAST, K, DAMASCHUN, H., ECKERT, K., SCHULZE-FORSTER, K., MAURER, H. R., MULLER-FROHNE, M., ZIRWER, D., CZARNECKI, J. & DAMASCHUN, G. Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. **Biochemistry** 34(40):13211-8 (1995).

GHOBRIAL, I.M., WITZIG, T.E. & ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J. Clin.** 55: 178-194 (2005).

GOFFARD, A. & DUBUISSON, J. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. **Biochimie** 85(3-4): 295-301 (2003).

GOFFREDO, D., RIGAMONTI, D., ZUCCATO, C., TARTARI, M., VALENZA, M. & CATTANEO, E. Prevention of cytosolic IAPs degradation: a potential pharmacological target in Huntington's disease. **Pharmacological Research** 52: 140-150 (2005).

GROß, M., AUERBACH, G. & JAENICKE, R. Proteins under pressure. The influence of high pressure on structure, functions and assembly of proteins. **Eur. Biochem. Soc.** 221: 617-630 (1994).

GUMMADI, S.N. What is the role of thermodynamics on protein stability? **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 8: 9-18 (2003).

HAMADA, D., CHITI, F., GUIJARRO, J. L., KATOABA, M. TADDEI, N. & DOBSON, C. M. Evidence concerning rate-limiting steps in protein folding from the effects of trifluoroethanol. **Nat. Struct. Biol.** 7, 58-61 (2000).

HANAHAH, D. & WEINGERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell** 100: 57-70 (2000).

HARTWIG, A. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. **Antioxidants & Redox Signaling** 3(4): 625-634 (2001).

HAUSTEIN, E., SCHWILLE, P. Single-molecule spectroscopic methods. **Curr Opin Struct Biol.** 14(5):531-40 (2004).

HAYNIE, D.T. Gibbs free energy-applications, In **Biological thermodynamics**, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Australia, pp, 119-178 (2001).

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature** 407: 770-776 (2000).

HENZLER-WILDMAN, K. & KERN, D. Dynamic personalities of proteins. **Nature** 450: 964-972 (2007).

HEREMANS, K. & SMELLER, L. Protein structure and dynamics at high pressure. **Biochimica et Biophysica Acta** 1386: 353-370 (1998).

HERSEY, P. & ZHANG, X.D. Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. **J. Cell. Physiol.** 9: 9-18 (2003).

HESS, L.B., BEKKER, H., BERENDSEN, H.J.C. & FRAAIJE, J.G., LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **J. Comput. Chem.** 18: 1463-1472 (1997).

HESS, L.B., KUTZNER, C., VAN DER SPOEL, D. & LINDAHL, E., "GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation". **J. Chem. Theory Comput.** 4(2): 435-447(2008).

- HIROTA, N., MIZUNO, K. & GOTO, Y. Cooperative  $\alpha$ -helix formation of  $\beta$ -lactoglobulin and mellitin induced by hexafluoroisopropanol. **Protein Sci** 6: 416-421(1997).
- HOLDGATE, G.A. & WARD, W.H.J. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. **Drug Discovery Today** 10(22):1543-1550 (2005).
- HORVITZ, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis*. **Cancer Res.** 59: 1701-1706 (1999).
- HUANG, Y., RICH, R.L., MYSZKA, D.G. & WU, H. Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. **The Journal of Biological Chemistry** 278: 49517-49522 (2003).
- HUMMER, G., GARDE, S., GARCÍA, A.E., PAULAITIS, M.E. & PRATT, L.R. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95: 1552-1555 (1998).
- HUSSY, P., LANGREN, H., MOUS, J. & JACOBSEN, H. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. **Virology** 224: 93-104 (1996).
- INCA. Fisiopatologia do câncer. Em: Ações de enfermagem no controle do câncer. 2. ed. Rio de Janeiro, p. 55-81 (2002).
- ISHIMA, R. & TORCHIA, D.A. Protein dynamics from NMR. **Nat. Struct. Biol.** 7(9):740-3 (2000).
- JONAS, J. & JONAS, A. High-pressure NMR spectroscopy of proteins and membrane. **Annual Review Biophys. Biomol. Struct.** 23: 287-318 (1994).
- JONES, D.M. & MCLAUCHLAN, J. Hepatitis C virus: assembly and release of virus particles. **Journal Biological Chemistry**. Papers in Press. Published on May 10, 2010 as Manuscript R110.133017.
- JOHNSON, B. A. & BLEVINS, R. A. NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. **J. Biomol. NMR** 4: 603-614 (1994).
- KELLY, S. M., JESS, T. J. & PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta** 175: 119 - 139 (2005).
- KENDREW, J. C, BODO, G., DINTZIS, H. M., PARRISH, R. G., WYCKOFF, H. & PHILLIPS, D. C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. **Nature** 181(4610): 662-6 (1958).

- KLEIN, K. C., DELLOS, S. & LINGAPPA, J. R. Identification of residues in the hepatitis C virus core protein that are critical for capsid assembly in a cell-free system. **J. Virol.** 79 in press (2005).
- KLEIN, K. C., POLYAK, S. J. & LINGAPPA, J. R. Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. **J. Virol.** 78(17): 9257-69 (2004).
- KIM, P.S. & BALDWIN, R.L. Intermediates in the folding reactions of small proteins. **Annu. Rev. Biochem.** 59: 631-660 (1990).
- KIM, M., HA, Y., & PARK, H. J. Structural requirements for assembly and homotypic interactions of the hepatitis C virus core protein. **Virus Res.** 122(1-2): 137-43 (2006).
- KOIKE, K. Hepatitis C as a metabolic disease: Implication for the pathogenesis of NASH. **Hepatol. Res.** 33(2):145-50 (2005a).
- KOIKE, K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.** 3(10 Suppl 2):S132-5 (2005b).
- KREKULOVA, L., REHAK, V. & RILEY, L.W. Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. **Folia Microbiol.** 51 (6), 665-680 (2006).
- KUNKEL, M. & WATOWICH, S. J. Biophysical characterization of hepatitis C virus core protein: implications for interactions within the virus and host. **FEBS Letters.** 557:174-180 (2004).
- KUNKEL, M. & WATOWICH, S. J. Conformational changes accompanying self-assembly of the hepatitis C virus core protein. **Virology** 294: 239-245 (2002).
- KUNKEL, M., LORINCZI, M., RIJNBRAND, R., LEMON, S. M. & WATOWICH, S. J. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. **Journal of Virology** 75(5): 2119-2129 (2001).
- KUO, G. CHOO, Q. L., ALTER, H. J., GITNICK, G. L., REDEKER, A. G., PURCELL, R. H., MIYAMURA, T., DIENSTAG, J. L., ALTER, M. J. & STEVENS, C. E. An Assay for circulating antibodies to major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science** 244: 362-364 (1989).
- LACASSE, E.C., BAIRD, S., KORNELUCK, R.G. & MACKENZIE, A.E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. **Oncogene** 17: 3247-3259 (1998).
- LAFONT, V., ARMSTRONG, A.A., OHTAKAK, H., KISO, Y., MARIO AMZEL, L., & FREIRE, E. Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization. **Chem Biol Drug Des.** 69(6):413-22 (2007).

LAKOWICZ, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum press, New York, N.Y. (1983).

LAKOWICZ, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum press, New York, N.Y. (1999).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685 (1970).

LARGE, M. K., KITTLESEN, D. J. & HAHN, Y. S. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. **J. Immunol.** 162(2):931-8 (1999).

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4ed. Nova Iorque: W. H. Freeman (2004).

LI, H. & YUAN, J. Deciphering the pathways of cell death. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 11: 261-266 (1999).

LI, L., DANTZER, J.J., NOWACKI, J., O'CALLAGHAN, B.J., & MEROUEH, S.O. PDBcal: a comprehensive dataset for receptor-ligand interactions with three-dimensional structures and binding thermodynamics from isothermal titration calorimetry. **Chem. Biol. Drug Des.** 71(6):529-32 (2008).

LIANG Y. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)** 40(7):565-76 (2008).

LINDENBACH, D. B., THIEL, J. H. & RICE, C. M. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. Eds. Lippincott-Raven Publishers. Capítulo 33: 1101-1152 (2007).

LINDENBACH, D. B., EVANS, M.J., SYDER, A.J., WÖLK, B., TELLINGHUISEN, T.L., LIU, C.C., MARUYAMA, T., HYNES, R.O., BURTON, D.R., MCKEATING, J.A., RICE, C.M. Complete Replication of hepatitis C virus in cell culture. **Science** 309(5734), 623-626 (2005a).

LINDENBACH, B. D., MEULEMAN, P., PLOSS, A., VANWOLLEGHEM, T., SYDER, A. J., MCKEATING, J. A., LANFORD, R. E., FEINSTONE, S. M., MAJOR, M. E., LEUROX-ROELS, G. & RICE, C. M. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious *in vivo* and can be recultured *in vitro*. **PNAS** 103(10), 3085-3809 (2005b).

LISTON, P., ROY, N., TAMAI, K., LEFEBVRE, C., BAIRD, S., CHERTONHORVAT, G., FARAHANI, R., MCLEAN, M., IKEDA, J.E., MACKENZIE, A. & KORNELUK, R.G. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. **Nature** 379: 349-353 (1996).

LIU, Z., SUN, C., OLEJNICZAK, E.T., MEADOWS, R.P., BETZ, S.F., OOST, T., HERRMANN, J., WU, J.C. & FESIK, S.W. Structural basis of binding of Smac/DIALBLO to the XIAP BIR3 domain. **Nature** 408: 1004-1008 (2000).

LO, S. Y., MASIARZ, F., SOON, B. H., MICHAEL, M. C. L. & JING-HSIUNG, O. U. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. **Virology** 13: 455-461 (1995).

LO, S. Y., SELBY, M., TONG, M. & JING-HSIUNG, O. U. Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. **Virology** 199: 124-131 (1994).

LOHMANN, V., KORNER, F., KOCH, J., HERIAN, U., THEILMANN, L., BARTENSCHLAGER, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in hepatoma cell line. **Science** 285: 110-113 (1999).

LORENZO, L.J., DUEÑAS-CARRERA, S., FALCÓN, V., ACOSTA-RIVERO, N., GONZÁLEZ, E., DE LA ROSA, M.C., MENÉNDEZ, I. & MORALES, J. Assembly of truncated HCV core antigen into virus-like particles in *Escherichia coli*. **Biochem Biophys Res Commun** 281(4): 962-5 (2001).

LU, H., BUCK, M., RADFORD, S. E. & DOBSON, C. M. Acceleration of the folding of lysozyme by trifluoroethanol. **J. Mol. Biol.** 265, 112-117 (1997).

MAILLARD, P., KRAWCZYNSKI, K., NITKIEWICZ, J., BRONNERT, C., SIDORKIEWICZ, M., GOUNON, P., DUBUISSON, J., FAURE, G., CRAINIC, R., & BUDKOWSKA, A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. **J. Virol.** 75, 8240-8250 (2001).

MAJEAU, N., GAGNÉ, V., BOIVIN, A., BOLDUC, M., MAJEAU, J., OUELLET, D. & LECLERC, D. The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. **Journal of General Virology** 85: 971-981 (2004).

MANNHOLD, R., FULDA, S. & CAROSATI, E. IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy. **Drug Discov. Today** 0: 1-10 (2010).

MAKHOV, P., GOLOVINE, K., UZZO, R.G., ROTHMAN, J., CRISPEN, P.L., SHAW, T., SCOLL, B.J. & KOLENKO, V.M. Zinc chelation induces rapid depletion of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and sensitizes prostate cancer cells to TRAIL mediated apoptosis. **Cell Death Differ.** 15(11): 1745–1751 (2008).

MCHUTCHISON, J. G. Understanding Hepatitis C. **The American Journal of Managed of Care** 10, NO. 2, SUP. (2004).

MCNEISH, I.A., BELL, S., MCKAY, T., TENEV, T., MARANI, M. & LEMOINE, N.R. Expression of Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells induces apoptosis via a caspase-9-mediated pathways. **Experimental Cell Research** 286: 186-198 (2003).

MELNIKOVA, I. Hepatitis C therapies. **Nature Reviews Drug Discovery** 7:799-800 (2008).

MICHELSEN, P.P., FRANQUE, S.M., & VAN DONGEN, J.L. Viral hepatitis and hepatocarcinoma. **World J. Surg. Oncol.** 20:3-27 (2005).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hepatites virais: o Brasil está atento/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 3.ed. Brasília (2008).

MIZUTANI, Y., NAKANISHI, H., LI, Y.N., MATSUBARA, H., YAMAMOTO, K., SATO, N., SHIRAIISHI, T., NAKAMURA, T., MIKAMI, K., OKIHARA, K., TAKAHA, N., UKIMURA, O., KAWAUCHI, A., NONOMURA, N., BONAVIDA, B., MIKI, T. Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis. **Int J Oncol.** 30(4):919-25 (2007).

MOHAN, A., OLDFIELD, C.J., RADIVOJAC, P., VACIC, V., CORTESE, M.S., DUNKER, A.K., UVERSKY, V.N. Analysis of molecular recognition features (MoRFs). **J Mol Biol.** 6:362(5):1043-59 (2006).

MONERA, O. D., ZHOU, N. E., KAY, C. M. & HODGES, R. S. Comparison of antiparallel and parallel two-stranded  $\alpha$ -helical coiled-coils: Design, synthesis, and characterization. **J. Biol. Chem.** 268: 19218-19227 (1993).

MOORE, C.D., WU, H., BOLANOS, B., BERGQVIST, S., BROOUN, A., PAULY, T. & NOWLIN, D. Structural and biophysical characterization of XIAP BIR3 G30E mutant: insights in protein dynamics and application for fragment-based drug design. **Chem. Biol. Drug Des.** 74 212-223 (2009).

MOORMAN, J.P., PRAYTHER, D., MCVAY, D., HAHN, Y.S. & HAHN, C.S. The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fas oligomerization. **Virology** 312(2): 320-9 (2003).

MORADPOUR, D., PENIN, F. & RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nature Reviews** 5: 453-463 (2007).

MOZHAEV, V. M. HEREMANS, K., FRANK, J., MASSON, P. & BALNY, C. Exploiting the effects of high pressure in biotechnological applications. **Tibtech.** 124: 493-501 (1994).

MUKHERJEE, S., ABD-EL-LATIF, M., BRONSTEIN, M., BEN-NUN-SHAUL, O., KLER, S., & OPPENHEIM, A. High cooperativity of the SV40 major capsid protein VP1 in virus assembly. **PLoS One.** 2(1):e765 (2007).

NACHMIAS, B., ASHHAB, Y. & BEN-YEHUDA, D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. **Semin. Cancer. Biol.** 14: 231-243 (2004).

NG, C.P. and BONAVIDA, B. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation: Sensitization by overexpression of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pl (Smac/DIABLO). **Mol Cancer Ther.** 1 1051-1058 (2002).

NOTARBARTOLO, M., CERVELLO, M., POMA, P., DUSONCHET, L., MELI, M. & D'ALESSANDRO, N. Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells. **Oncol. Rep.** 11: 133-136 (2004).

NYBORG, J.K. & PEERSEN, O.B. That zinging feeling: the effects of EDTA on the behavior of zinc-binding transcriptional regulators. **Biochem. J.** 381:e3-e4 (2004).

OLDFIELD, C.J., CHENG, Y., CORTESE, M.S., ROMERO, P., UVERSKY, V.N., & DUNKER, A.K. Coupled folding and binding with alpha-helix-forming molecular recognition elements. **Biochemistry** 44(37): 12454-70 (2005).

OLSSON, T.S., WILLIAMS, M.A., PITT, W.R., & LADBURY, J.E. The thermodynamics of protein-ligand interaction and salvation: insights for ligand design. **J Mol Biol** 384(4): 10002-17 (2008).

OOST, T.K., SUN, C., ARMSTRONG, R.C., AL-ASSAAD, A., BETZ, S.F., DECKWERTH, T.L., DING, H., ELMORE, S.W., MEADOWS, R.P., OLEJNICZAK, E.T., OLEKSIJEW, A., OLTERSODORF, T., ROSENBERG, S.H., SHOEMAKER, A.R., TOMASELLI, K.J., ZOU, H. & FESIK, S.W. Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer. **J. Med. Chem.** 47: 4417-4426 (2004).

PACE, C. N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. **Methods Enzymol.** 131: 266-280 (1986).

PACE, C.N. Energetics of protein hydrogen bonds. **Nature Structural & Molecular Biology** 16: 681-682 (2009).

PALADINI, A.A.Jr. & WEBER, G. Pressure-induced reversible dissociation of enolase. **Biochemistry** 20: 2587-2593 (1981).

PALMER, A.G. Probing molecular motion by NMR. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 7(5):732-7 (1997).

PARK, C., SUN, C. OLEJNICZAK, E.T., WILSON, A.E., MEADOWS, R.P., BETZ, S.F., ELMORE, S.W. & FESIK, S.W. Non-peptidic small molecule inhibitors of XIAP. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 15: 771-775 (2005).

PARKER, W. & SONG, P. S. Protein structures in SDS micelle-protein complexes. **Biophysical Journal** 61: 1435-1439 (1992).

PAWLOTSKY, J.M., CHEVALIEZ, S. & MCHUTCHISON, J.G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. **Gastroenterology** 132(5):1979-98 (2007).

PAWLOWSKA, M. & HALOTA, W. PEG IFN alpha-2a in the treatment of chronic hepatitis C in patients with treatment failure. **Przegląd Epidemiologiczny** 61(1): 23-7 (2007).

PENIN, F., DUBUISSON, J., REY, F. A., MORADPOUR, D. & PAWLITSKY, J. Structural Biology of Hepatitis C Virus. **Hepatology** 39: 5-19 (2004).

PERZ, J.F., FARRINGTON, L.A., PECORARO, C., HUTIN, Y.J.F., & ARMSTRONG, C.L. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; Boston, A. USA; Sept 30 Oct 3, 2004

PRINCE, A. M, BROTMAN, B., GRADY, G. F, KUHNS, W. J., HAZZI, C. & LEVINE, R. W. Long incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. **Lancet ii**: 241-246 (1974).

PROJAN, S.J., GILL, D., LU, Z. e HERRMANN, S.H. Small molecules for small minds? The case for biologic pharmaceuticals. **Expert Opin Biol Ther.** 4(8):1345-50 (2004).

PTITSYN, O.B. Protein folding: hypotheses and experiments. **J. Protein Chem.** 6: 273–293 (1987).

PURCELL, R. The hepatitis C virus: overview. **Hepatology** 26(3 Suppl 1): 11S-14S (1997).

RAJESH P. RASTOGI, RICHA & RAJESHWAR P. SINHA. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. **EXCLI Journal** 8:155-181 (2009).

REED, J.C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. **J. Cell Biol.** 124: 1 (1994).

REYNOLDS, G.M., HARRIS, H.J., JENNINGS, A., HU, K., GROVE, J., LALOR, P.F., ADAMS, D.H., BALFE, P., HÜBSCHER, S.G., MCKEATING, J.A. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. **Hepatology.** 47(2):418-27 (2008).

RICHTER, B.W. & DUCKETT, C.S. The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond. **Science Signaling** 44:1-17 (2000).

RIEDL, S.J., RENATUS, M. SCHWARZENBACHER, R., ZHOU, Q., SUN, C., FESIK, S.W., LIDDINGTON, R.C. & SALVESEN, G.S. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. **Cell** 104: 791-800 (2001).

ROCCATANO, D., COLOMBO, G., FIORONI, M. & MARK, A. E. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A Molecular dynamics study. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 19: 12179-12184 (2002).

RODRÍGUEZ-CASADO, A., MOLINA, M. & CARMONA, P. Conformational features of truncated hepatitis C virus core protein in virus-like particles. **Biopolymers** 82: 334-338 (2006).

RODRÍGUEZ-CASADO, A., MOLINA, M. & CARMONA, P. Spectroscopy study of conformational changes accompanying self-assembly of HCV core protein. **PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics** 66: 110-117 (2007).

ROINGEARD, P., HOURIOUX, C., BLANCHARD, E., BRAND, D., & AIT-GOUGHOUlte, M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. **Biology of the Cell** 96 (2004) 103–108.

ROMERO, P., OBRADOVIC, Z., KISSINGER, C. R., VILAFRANCA, J. E., GARNER, E., GUILLIOT, S. & DUNKER, A. K. Thousands of proteins likely to have long disordered regions. **Pac. Symp. Biocomput.** 3: 437-448 (1998).

ROSEN, C. G. & WEBER, G. Dimer Formation from 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate Catalyzed by Bovine Serum Albumin. A New Fluorescent Molecule with Exceptional Binding Properties. **Biochemistry** 8:3915-3919 (1969).

ROTH, W. K., WEBER, M. & SEIFRIED, E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. **Lancet** 353: 359-363 (1999).

ROTHER, M., PAN, M.G., HENZEL, W.J., AYRES, T.M. & GOEDDEL, D.V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral-inhibitor of apoptosis proteins. **Cell** 83: 1243-1252 (1995).

ROY, N., DEVERAUX, Q.L., TAKAHASHI, R., SALVESEN, G.S. & REED, J.C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. **EMBO J.** 16: 6914-6925 (1997).

RUBEN, A.J., KISO, Y. & FREIRE, E. Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective. **Chem. Biol. Drug Des.** 67(1):2-4 (2006).

SABANAYAGAM, C.R., ORAM, M., LAKOWICZ, J.R. & BLACK, L.W. 2007 Viral DNA packaging studied by fluorescence correlation spectroscopy. **Biophys J.** 15;93(4):L17-9 (2007).

SANTOLINI, E., MIGLIACCIO, G. & LA MONICA, N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. **J. Virol.** 68: 3631-3641 (1994).

SASAKI, K., TSUTSUMI, A., WAKAMIYA, N., OHTANI, K., SUZUKI, Y., WATANABE, Y., NAKAYAMA, N., KOIKE, T. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. **Scand J Gastroenterol.** 35(9): 960-5 (2000).

SCARSELLI, E., ANSUINI, H., CERINO, R., ROCCASECCA, R.M., ACALI, S., FILOCAMO, G., TRABONI, C., NICOSIA, A., CORTESE, R. & VITELLI, A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO Journal** 21(91): 5017-5025 (2002).

SCHELLMAN, J. A. The thermodynamic stability of proteins. **Annu. Rev. Biophys. Chem.** **16**: 115-137 (1987).

SCHIMMER, A.D., WELSH, K. PINILLA, C., WANG, Z., KRAJEWSKA, M., BONNEAU, M., PEDERSEN, I.M., KITADA, S., SCOTT, F.L., BAILY-MAITRE, B., GLINSKY, G., SCUDIERO, D., SAUSVILLE, E., SALVESEN, G., NEFZI, A., OSTRESH, J.M., HOUGHTEN, R.A. & REED, J.C. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. **Cancer Cell** **5**: 25-35 (2004).

SCHWILLE, S. & HAUSTEIN, E. Fluorescence spectroscopy correlation. An introduction to its concepts and applications. From Experimental Biophysics Group, D-37077 Gottingen. Germany.

SEEFF, L. B., WRIGHT, E. B., ZIMMERMAN, H. J. & McCOLLUM, R. W. Cooperative study of post-transfusion hepatitis. 1969-74: incidence and characteristics of hepatitis and responsible risk factors. **Am. J. Med.** **270** (2): 255-366 (1975).

SHEPARH, C.W., FINELLI, L. & ALTER, M. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis** **5**: 558-567 (2005).

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Molecular Cell** **9**: 459-470 (2002).

SHIMIZU, Y.K., FEINSTONE, S.M., KOHARA, M., PURCELL, R.H. & YOSHIKURA, H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. **Hepatology** **23**(2):205-9 (1996).

SHIMOIKE, T., MIMORI, S., TANI, H., MATSUURA, Y. & MIYAMURA, T. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. **J Virol.** **73**(12):9718-25 (1999).

SHIOZAKI, E.N., CHAI, J., RIGOTTI, D.J., RIEDL, S.J., LI, P., SRINIVASULA, S.M., ALNEMRI, E.S., FAIRMAN, R. & SHI, Y. mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. **Mol. Cell** **11**(2): 519-27 (2003).

SHORTLE, D., MEEKER, A. K. & GERRING, S. R. Effects of denaturants at low concentration on the reversible denaturation of staphylococcal nuclease. **Arch. Biochem. Biophys.** **272**: 1030-1036 (1989).

SHRAKE, A. & ROSS, P.D. Ligand-induced biphasic protein denaturation, **J. Biol. Chem.** **265**(9) 5055-9 (1990).

SHRAKE, A. & ROSS, P.D. Origins and consequences of ligand-induced multiphasic thermal protein denaturation. **Biopolymers** **32**(8) 925-40 (1992).

SINGAL, A. K. & ANAND, B. S. Management of hepatitis C virus infection in HIV/HCV co-infected patients: Clinical review. **World J. Gastroenterol.** 15(30): 3713-3724 (2009).

SIBER, A. & PODGORNİK, R. Role of electrostatic interactions in the assembly of empty spherical viral capsids. **The American Physical Society** 76: 061906 (2007).

SILVA, J. L., FOGUEL, D., DA POIAN, A.T. & PREVELIGE, P.E., JR. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. **Current Opinion Structure Biology** 6: 166-175 (1996).

SILVA, J. L., FOGUEL, D. & ROYER, C. A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends Biochem. Sci.** 26: 612-618 (2001).

SILVA, J. L. & WEBER, G. Pressure stability of proteins. **Annu. Rev. Phys. Chem.** 44: 89-113 (1993).

SORIANO, V., VISPO, E. LABARGA, P., MEDRANO, J. & BARREIRO, P. Viral hepatitis and HCV co-infection. **Antiviral Research** 85(1): 303-15 (2010).

SOUZA, T.L.F, SANCHES, D., GONÇALVES, R.B., PITA, S.S.R., PASCUTTI, P.G., BIANCONI, M.L., ALMEIDA, F.C.L., SILVA, J.L. AND OLIVEIRA, A.C. Conformational selection, dynamic restriction and hydrophobic effect coupled to the stabilization of the BIR3 domain of human X-linked inhibitor of apoptosis protein by the tetrapeptide AVPI. **Biophysical Chemistry** (2010).

SPIEGEL, M.R. Estatística. Em: (Ed.). Estatística p.74-75, 106-110 (1994).

SPIERINGS, D., MCSTAY, G., SALEH, M., BENDER, C., CHIPUK, J., MAURER, U. & GREEN, D. R. Connected to death: the (Unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. **Science** 310: 66-67 (2005).

SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., FERNADES-ALNEMRI, T. & ALNEMRI, E. S. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. **Mol. Cell** 1: 949-957 (1998).

SRINIVASULA, S.M., SALEH, A., HEDGE, R., DATTA, P. SHIOZAKI, E., CHAI, J., ROBBINS, P.D., FERNANDES-ALNEMRI, T., SHI, Y. & ALNEMRI, E.S. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO mediates opposing effects on caspase activity and apoptosis. **Nature** 409: 112-116 (2001).

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science** 267: 1445-1449 (1995).

STONE, M.J. NMR relaxation studies of the role of conformational entropy in protein stability and ligand binding. **Acc. Chem. Res.** 34(5): 379-388 (2001).

STUMPE, M.C. & GRUBMULLER, H. Interaction of Urea with Amino Acids: Implications for Urea-Induced Protein Denaturation **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 129: 16126-16131 (2007).

STUMPE, M.C. & GRUBMULLER, H. Polar or Apolar - The Role of Polarity for Urea-Induced Protein Denaturation. **PLoS Computational Biology** 4 (11): 1-10 (2008).

STURTEVANT, J.M. Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 74: 2236 (1977).

SUN, C., CAI, M., MEADOWS, R.P., XU, N., GUNASEKERA, A.H., HERRMANN, J., WU, J.C. & FESIK, S.W. NMR structure and mutagenesis of the third BIR domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. **The Journal of Biological Chemistry** 275(43): 33777-33781 (2000).

SUN, H., NIKOLOVSKA-COLESKA, Z., CHEN, J., YANG, C., TOMITA, Y., PAN, H., YOSHIOKA, Y., KRAJEWSKI, K., ROLLER, P.P & WANG, S. Structure-based design, synthesis and biochemical testing of novel and potent Smac peptide-mimetics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 15: 793-797 (2005).

SUZUKI, R., MATSUURA, Y., SUZUKI, T., ANDO, A., CHIBA, J., HARADA, S., SAITO, I. & MIYAMURA, T. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C-terminus deleted. **J. Gen. Virol.** 76: 53-61 (1995).

SZABO, E., LOTZ, G., PASKA, C. KISS, A. & SCHAFF, Z. Viral hepatitis: new data on hepatitis C infection. **Pathol. Oncol. Res.** 9(4): 215-221 (2003).

TAMM, L. KORNBLAU, S. M., SEGALL, H., KRAJEWSKI, S., WELSH, K., KITADA, S., SCUDIERO, D. A., TUDOR, G., QUI, Y.H., MONKS, A., ANDREEFF, M. & REED, J.C. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. **Clin. Cancer Res.** 6: 1796-1803 (2000).

TANFORD, C. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of globular confirmation of proteins. **J. Am. Chem. Soc.** 84, 4240-4247 (1962).

TANFORD, C. Protein denaturation. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. **Adv. Protein. Chem.** 24: 1-95 (1970).

TANG, H. & GRISE, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clin. Sci.** 117(2): 49-65 (2009).

TEIXEIRA, R., FILHO, O. A. M. & OLIVEIRA, G. C. Hepatite C – Aspectos Críticos de uma Epidemia Silenciosa. Coopmed. Editora Médica. Editora Fiocruz 1-12 (2004).

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science** 267:1456 (1995).

THOMPSON, A.J.V. & MCHUTCHISON, J.G. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). **Journal of Viral Hepatitis** 16(6): 377-387 (2009).

THOMPSON, N.L., LIETO, A.M., ALLEN, N.W. Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy. **Curr Opin Struct Biol.** 12(5):634-41 (2002).

TOMPA, P. The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. **FEBS Letters** 579: 3346–3354 (2005).

UREN, A.G., PAKUSCH, M., HAWKINS, C.J., PULS, K.L. & VAUX, D.L. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93: 4974-4978 (1996).

UVERSKY, V.N., GILLESPIE, J.R. & FINK, A.L. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? **Proteins** 41(3):415-427 (2000).

VALENTE, A.P., MIYAMOTO, C.A. & ALMEIDA, F.C.L. Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds. **Current Medicinal Chemistry** 13: 3697-3703 (2006).

VALLEE, B. L. & FALCHUK, K. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiol. Rev.** 73, 79–118 (1993).

VAN GUNSTEREN, W.F., BILLETER, S.R., EISING, A.A., HÜNENBERGER, P.H., KRÜGER, P., MARK, A.E., SCOTT, W.R.P. & TIRONI, I.G., Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide, Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, Switzerland (1996).

VERHAGEN, A.M., COULSON, E.J. & VAUX, D.L. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. **Genome Biol.** 2: 7 (2001).

VERHAGEN, A., EKERT, P. G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L. M., REID, G. E., MORITZ, R. L., SIMPSON, R. J. & VAUX, D. L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing inhibitor of apoptosis (IAP) proteins. **Cell** 102: 43-53 (2000).

VUCIC, D. & FAIRBROTHER, W. The Inhibitor of Apoptosis Proteins as therapeutic Targets in Cancer. **Clin. Cancer Res.** 13(20): 5995-6000 (2007).

VUKOJEVIC, V., PRAMANIK, A., YAKOVLEVA, T., RIGLER, R., TERENIUS, L. & BAKALKIN, G. Study of molecular events in cells by fluorescence correlation spectroscopy. **Cell Mol. Life Sci.** 62:535-550 (2005).

WAKITA, T., PIETSCHMANN, T., KATO, T., *e cols.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. **Nature Medicine** 11(7): 791-796 (2005).

WANG, C., PAWLEY, N. H. & NICHOLSON, L. K. The role of backbone motions in ligand binding to the c-Src SH3 domain. **J. Mol. Biol.** 313 873-887 (2001).

WATSON, R. W. & FITZPATRICK, J. M. Targentig apoptosis in prostate cancer: focus on caspases and inhibitors of apoptosis proteins. **BJU Int.** 2: 30-34 (2005).

WEBER, G. Dissociation of Oligomeric Proteins by Hydrostatic Pressure. Em High Pressure Chemistry and Biochemistry. *NATO-ASI Series (van Eldik, R. & Jonas, J., eds.)* pp.401-420 (1987).

WEBER, G. Effects of temperature and pressure on molecular associations and on single peptide chain proteins. Em Protein Interactions, pp. 199-215, Chapman and Hall (1992).

WEBER, G. & DRICKAMER, H.G. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. **Q. Rev. Biophys.** 16: 89-112 (1983).

WEBER, P.C. & SALEMME, F.R. Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 13(1):115-21 (2003).

WEINREB, P. H., ZHEN, W., POON, A. W, CONWAY, K. A, & LANSBURY, P. T. JR. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. **Biochemistry** 35(43): 13709-15 (1996).

WESTPHAL, S. & KALTHOFF, H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. **Molecular Cancer** 2: 6 (2003).

WETLAUFER, D.B. Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 70: 697-701 (1973).

WHITESIDES, G.M., & KRISHNAMURTHY, V.M. Designing ligands to bind proteins. **Q. Rev. Biophys.** 38(4):385-95 (2005).

WIST, A.D., GU, L., RIEDL, S.J., SHI, Y., & MCLENDON, G.L. Structure-activity based study of the Smac-binding pocket within the BIR3 domain of XIAP. **Bioorg. Med. Chem.** 15(8): 2935-43 (2007).

WITHMORE, L. & WALLACE, B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and references databases. **Biopolymers** 89(5): 392-400 (2008).

WOLFGAND M. & LI, Y. Coordination dynamics of Zinc in proteins. **Chem. Ver.** 109, 4682-4707 (2009).

WOOTTON, J. C. Non-globular domains in protein sequences: automated segmentation using complexity measures. **Comput. Chem.** 18: 269-285 (1994).

WRIGHT, P. E. & DYSON, H. J. Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein-structure-function paradigm. **J. Mol. Biol.** 293: 321-331 (1999).

WRIGHT, C.W. & DUCKETT, C.S. Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. **The Journal of Clinical Investigation** 115: 2673-2678 (2005).

WRZESIEN-KUS, A., SMOLEWSKI, P., SOBCZAK-PLUTA, A., WIERZBOWSKA, A. & ROBAK, T. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. **Apoptosis** 9: 705-715 (2004).

WU, G., CHAI, J., SUBER, T.L., WU, J., DU, C., WANG, X. & SHI, Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. **Nature** 408: 1008-1012 (2000).

WU, J.W. & WANG, Z.X. New evidence for the denaturant binding model. **Protein Science** 8: 2090-2097 (1999).

XU, D., BUREAU, Y., MCINTYRE, D.C., NICHOLSON, D.W., LISTON, P., ZHU, Y., FONG, W.G., CROCKER, S.J., KOMELUR, R.G. & ROBERTSON, G.S. Attenuation of ischemia-induced cellular and behavioral deficits by X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein overexpression in the rat hippocampus. **J. Neurosci.** 19: 5026-5033 (1999).

XUE, Y., WANG, S. & FENG, X. Effect of metal ion on the structural stability of tumour suppressor protein p53 DNA-binding domain. **J. Biochem.** 146:193-100 (2009).

YANG, X., CHANG, H. Y. & BALTIMORE, D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. **Science** 281: 1355-1357 (1998).

YANG, E. & KORSMEYER, S.J. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family. **Blood** 88: 386 (1996).

YANG, S.H., LEE, C.G., LEE, C.W., CHOI, E.J., YOON, S.K., AHN, K.S. & SUNG, Y.C. Hepatitis C virus core inhibits the Fas-mediated p38 mitogen activated kinase signaling pathway in hepatocytes. **Mol. Cells** 13(3): 452-62 (2002).

YASUI, K., WAKITA, T., TSUKIYAMA-KOHARA, K., FUNAHASHI, S. I., ICHIKAWA, M., KAJITA, T., MORADPOUR, D., WANDS, J. R. & KOHARA, M. The antive form and maturation process of hepatitis C virus core protein. **J. Virol.** 72: 6048-6055 (1998).

YI, M., VILLANUEVA, R.A., THOMAS, DL, *e cols.* Production of infectious genotype 1<sup>a</sup> hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. **PNAS** 103(7), 2310-2315 (2006).

YUASA, T., ISHIKAWA, G., MANABE, S., *e cols.* The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre. **Journal of General Virology** 72: 2021-2024 (1991).

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clinical Microbiology Reviews** 13 (2): 223-235 (2000).

ZHANG, J., RANDALL, G., HIGGINBOTTOM, A., *e cols.* CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. **Journal of Virology** 78(3): 1448-1455 (2004).

ZHONG, J., GASTAMINZA, P., CHENG, G, *e cols.* Robust hepatitis C virus infection in vitro. **PNAS**. 102(26): 9294-9299 (2005).

ZIDEK, L., NOVOTNY, M.V. & STONE, M.J. Increased protein backbone conformational entropy upon hydrophobic ligand binding, **Nature Struct. Biol.** 6 1118–1121 (1999).

## *Anexos*

## THE STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIP FOR TRUNCATED CORE PROTEIN OF HEPATITIS C VIRUS

\*\* Theo L. F. Souza<sup>1</sup>, \*\* Sheila M. B. Lima<sup>1</sup>, Vanessa L. A. Braga<sup>1</sup>, Ana Carolina Q. Vaz<sup>1</sup>, David S. Peabody<sup>2</sup>, Davis F. Ferreira<sup>3</sup>, Maria L. Bianconi<sup>1</sup>, Jerson L. Silva<sup>1</sup> and Andréa C. Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biologia Estrutural and Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Macromoléculas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology and Cancer Research and Treatment Center, University of New Mexico School of Medicine, Albuquerque, NM 87131.

<sup>3</sup>Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.

**Running Title:** Conformational changes of HCV124 induced by ligands.

**\*Corresponding Author:** Andréa Cheble de Oliveira – Mailing Address: Avenida Carlos Chagas Filho, 373 - CCS/ICB/ B1 E, sl. 08, Cidade Universitária, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: (5521) 2562-6756.

E-mail: [cheble@bioqmed.ufrj.br](mailto:cheble@bioqmed.ufrj.br).

\*\* Theo L. F. Souza and Sheila M. B. Lima are equally first authors.

Key Words: HCV, core protein, intrinsically disordered protein, circular dichroism, fluorescence, capsid assembly.

## SUMMARY

The N-terminal of Hepatitis C Virus (HCV) core protein has been described as an intrinsically disordered protein. In addition to its structural function, HCV core protein is responsible for several viral and cellular processes, playing a critical role in HCV pathogenesis, but the mechanisms are not well understood. Here, we utilized spectrophotometry, fluorescence spectroscopy, circular dichroism, electron microscopy and calorimetry to investigate the structure-function relationship of HCV core protein in a truncated form and to add some thermodynamic aspects. We show that the truncated and monomeric HCV core protein can adopt intermediate structures in different conditions, such as in the presence of the probe bis-8-anilinonaphthalene-1-sulfonate (bis-ANS), trifluorethanol (TFE), sodium dodecil sulphate (SDS) or high salt concentration. These ligands and physical conditions can mimic the physiological environment where HCV core protein is able to bind to different targets and play different functions. On the other hand, when we submitted the HCV core protein to pH values close to the isoelectric point, we verified the formation of nucleocapsid-like particles (NLPs) by electron microscopy and light scattering. This result shows clearly, for the first time, that the neutralization of basic residues is the main factor that drives the multimerization process *in vitro*. We also showed that the NLPs assembly triggered by short unspecific DNA or RNA is enthalpically driven, as verified by isothermal titration calorimetry. Overall, these results can shed light on the thermodynamics and structural basis of the different functions of the HCV core protein.

## INTRODUCTION

Hepatitis C Virus (HCV) is a member of the *Flaviviridae* family, genus *Hepacivirus*, which causes acute and chronic liver diseases. It is estimated that there are about 170 million people worldwide who are infected with HCV (1). Current therapies against HCV are unsatisfactory (2). Therefore, there is an urgent need to identify targets for the development of novel drugs to prevent the spread of the disease.

HCV contains one copy of a positive-stranded RNA genome which encodes a single polyprotein with approximately 3,000 amino acids. This polyprotein is processed by both cellular and viral proteases at the level of the endoplasmic reticulum (ER) into at least ten mature proteins (3). The cleavage of the polyprotein precursor generates four structural proteins: the core protein C, which forms the viral nucleocapsid; the envelope glycoproteins E1 and E2; and p7, a short membrane peptide that forms an ion channel in membranes, besides six non structural proteins (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B), that are involved in polyprotein processing and viral replication. The first cleavage forms an immature core protein containing 191 amino acids (4,5). During the following cleavage, the C protein remains anchored to the ER through a C-terminal hydrophobic region (6) and it gets further processed at its C-terminus by a signal peptide peptidase resulting into a mature protein composed by the N-terminal of 179 amino acids (7-9). Another type of the core protein, composed by 124 amino acids residues, has been observed as the main product in a translational study *in vitro* with microsomal membranes (10). The production of this specie is increased by the presence of a lysine residue in the 9 codon and showed nuclear localization (11), however the biological role is poorly known.

The first 120 amino acids present in the N-terminal of the core protein mainly form a hydrophilic domain that contains three highly basic clusters. This fragment contains immunodominant antigenic sites. Few years ago, a work already showed that the truncated HCV core protein containing the first 124 amino acids (HCVCP124) has a disorder structure (12), like other "natively unfolded" proteins, characterized by a red shift in the tryptophan fluorescence spectra and negative ellipticity at 200 nm in circular dichroism (CD) spectra. In the last year, studies of structure and dynamics of HCV core protein (82 amino acids) confirmed that N-terminal half of whole HCV core is disordered in aqueous solution and that is a member of the IUP family (13).

“Intrinsically disordered” proteins belong to the group of proteins lacking ordered structure under conditions of neutral pH *in vitro*. Recent works have demonstrated the functional activity of this class of proteins (14-16) and it has been suggested that the lack of rigid globular structure under physiological conditions might represent a considerable functional advantage allowing them to interact efficiently with several different targets in the cell (14,17,18). The core protein of Hepatitis C Virus is a multifunctional protein that is involved in many viral and cellular processes. In addition of its structural role that involves RNA package and protection, the core protein has been reported to interact with over a dozen cellular proteins, thereby impacting immune presentation, apoptosis, cell transformation, lipid metabolism, and transcription (19). Thus, there is great evidence that the core protein plays a critical role in HCV pathogenesis, but the mechanisms are not well understood.

The focus of this research was to understand the thermodynamic character of the structure-function relationship for the HCV core protein. With this aim, we incubated HCVCP124 at different conditions or in the presence of different ligands and analyzed structural changes by fluorescence spectroscopy, circular dichroism, light scattering, electronic microscopy and calorimetry. We verified that the intrinsically disordered and truncated form of the core protein of Hepatitis C Virus (HCVCP124) can adopt intermediate structures in the presence of different alcohols, the probe bis-8-anilinonaphthalene-1-sulfonate (bis-ANS), trifluorethanol (TFE), sodium dodecil sulphate (SDS), different NaCl concentrations and different pH values. Interestingly, we also observed by electron microscopy and spectrophotometry that the HCV core protein at low concentration naturally forms nucleocapsid-like particles (NLPs) at pH values close to its isoelectric point, in the absence of nucleic acids. Moreover, we used electron microscopy, spectrophotometry and calorimetry to analyze the assembly process of NLPs triggered by unspecific nucleic acids. Thermodynamic characteristics related to the structure-function relationship of HCVCP124 were discussed. Our structural information reveals features related to the multiplicity of functions of HCV core protein and can explain why the *in vitro* formation of NLPs does not require high specificity, being mainly driven by neutralization of basic residues, which correspond to approximately 20% of the N-terminal of the protein.

## MATERIALS AND METHODS

**Abbreviations.** bis-ANS, bis-8-anilinoanthracene-1-sulfonate; CD, circular dichroism; IPTG, isopropyl thiogalactoside; LB, Luria–Bertani; PMSF, phenyl methyl sulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulphate; TFE, trifluoroethanol.

**Chemicals.** All reagents were of analytical grade. Distilled water was filtered and deionized through a Millipore water purification system. The probe bis-8-anilinoanthracene-1-sulfonate (bis-ANS) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). The experiments were performed at 20°C using the standard buffer: 10 mM Tris, pH 7.0, 100 mM NaCl.

**Expression and purification of the truncated HCV core protein (HCVCP 124).** The HCVCP 124 was propagated to midlog phase ( $OD_{600} = 0.8$ ) in *Escherichia coli* strain BL21(DE3) at 37 °C. The protein expression was induced with 2 mM IPTG. Three hours after induction the cells were centrifuged (6000 r.p.m. for 20 min; RPR 9.2 rotor; Beckman) at 4 °C and frozen at – 20 °C overnight. After thawing, the cells were resuspended in lysis buffer (25 mM  $NaH_2 PO_4$ , 250 mM NaCl, 8 M urea, 2 mM EDTA and 2 mM DTT, pH 7.0) and were sonicated. The cell debris was pelleted by centrifugation (15000 r.p.m. for 20 min; RPR 20.2 rotor; Beckman). The clarified lysate containing the core protein was applied to a cation-exchange column (SP Sepharose) equilibrated with denaturing cation buffer (25 mM HEPES, pH 7.0, 50 mM NaCl, 8 M urea). The core protein was eluted with a linear NaCl gradient (0.05 – 1.0 M). Fractions containing core protein were subsequently applied to a reverse-phase high pressure liquid chromatography column (Poros SR2) and eluted with a linear  $H_2O$ -Acetonitrile gradient with 0.1 % TFA. The core protein fraction was pooled and dialyzed overnight at 4 °C against refolding buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl pH 7.0). The homogeneity of purified core protein was determined by 15 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with Coomassie Brilliant Blue. Protein concentration was determined by UV spectrophotometry at a wavelength of 280 nm in 6 M guanidine hydrochloride solution, using extinction coefficients of  $37,980 M^{-1}$  determined using ExPASy program (20).

**Fluorescence Spectroscopy.** Fluorescence spectra were recorded in an ISSK2 spectrofluorometer (ISS Inc., Champaign, IL). The tryptophan residues were excited at 280 nm and emission was observed from 300 to 420 nm. Changes in fluorescence spectra were quantitated by the spectral center of mass,  $\langle \nu \rangle$ :

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum \nu_i \cdot F_i}{\sum F_i}$$

where  $F_i$  stands for the fluorescence emitted at wavenumber  $\nu_i$ . The summation is carried out over the range of appreciable values of  $F$ .

For experiments in the presence of bis-ANS, the excitation wavelength was 360 nm and emission was collected from 400 nm to 600 nm.

**Light scattering.** Light scattering measurements were performed in an ISSK2 spectrofluorometer (ISS Inc., Champaign, IL). Scattered light was collected at an angle of 90° to the incident light. The samples were excited at 320 nm and collected in the range of 315 to 325 nm. This wavelength was chosen because neither protein nor RNA absorb at 320 nm.

**Circular Dichroism.** Conformational changes of HCVCP 124, treated with increasing NaCl (100-500 mM) or pH (3-12), and in the presence of bis-ANS, different concentrations of TFE (10-50 %), SDS monomers (20  $\mu$ M), SDS micelles (4 mM), NaCl and alcohols, were analyzed by CD. The samples were diluted for a 25  $\mu$ M final concentration and the spectra were obtained in buffer 10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, using a 0.02 cm path-length quartz cell. The spectropolarimeter used was a Jasco J-715 1505 model. Wavelength range: 260 to 190 nm.

**Nucleic acid binding to HCVCP 124.** The effect of the presence of nucleic acids on the structure of HCVCP was analyzed. The protein was incubated with poly(GC) DNA, DNA consensus p53, and a synthetic RNA. The nucleic-acid/protein ratio was 1:1. The sample concentration utilized was 2.5  $\mu$ M for CD measurements (0.2 cm path-length quartz cell) and 2.5  $\mu$ M for fluorescence experiments and it was diluted in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 M NaCl.

**Kinetic analysis of *in vitro* assembly reactions.** For kinetic analysis, the optical density was monitored at 350 nm in a spectrometer at 25°C. Fixed amount of DNA (100  $\mu$ L, 5  $\mu$ M final concentration) was added to different concentrations of HCVCP 124 in a final volume of 600  $\mu$ L. Optical density was recorded by Swift II software every 2 s for 10 min. The maximum value represents the maximum optical density obtained during this 5 min analysis.

**Transmission Electron Microscopy.** After specific kinetics analysis the same samples were adsorbed to carbon grids for 10 min. Grids were washed three times with 100 mM ammonium acetate and stained for 2 min with 2% uranyl acetate and the NCLPs were examined on electron microscope.

**Isothermal titration calorimetry (ITC).** ITC measurements were performed using a VP-ITC calorimeter from MicroCal, Llc (Northampton, MA). The titration of 20  $\mu$ M HCV core protein involved 13 injections ( $1 \times 1 \mu$ L and  $12 \times 5 \mu$ L) of 0.1 mM unspecific nucleic acids (RNA or DNA) at 5 min intervals, with constant stirring at 317 rpm. The temperature was set at 37 °C. The HCV core protein solutions were degassed under vacuum before the titrations, and the reference cell was filled with Milli-Q water. The heat of dilution of nucleic acids into the buffer was subtracted from the raw data obtained using HCVCP 124. The data were analyzed using the Origin 7.0 software package provided by the manufacturer. The data from the first injection in each experiment were not used in the analysis. Three independent experiments were analyzed separately.

## RESULTS

Intrinsic fluorescence can provide a convenient means to monitor conformational changes on proteins. Generally, the aromatic residues, mainly tryptophans, buried in the hydrophobic interior of the protein, emit fluorescence at approximately 325 nm when excited at 280 nm. When the protein unfolds in the presence of denaturing agents, the exposure of buried residues reflects conformational changes of the protein, shifting the emission to approximately 355 nm. Analysis of HCVCP 124 by intrinsic fluorescence showed that the six tryptophan residues, located at positions 76, 83, 93, 96, 107 and 113, were extremely solvent-exposed (Figure 1A), reflecting characteristics of an unfolded protein. Analyzing the far-UV CD spectrum, we observed that the protein also exhibited a negative signal at 200 nm, in accordance with a non-structured protein (Figure 1). Our data corroborate results already published (12), suggesting that the HCVCP 124 presents mainly random coil structure.

### ***TFE and butanol promote changes in the secondary and tertiary structure of HCVCP 124***

The HCVCP 124 shows a random structure in solution according to experiments *in vitro*. Structural studies in the presence of solvents permit to elucidate the stability, folding pathway and intermolecular interactions. In this work, we performed experiments in the presence of butanol and their fluorinated derivative (trifluoroethanol – TFE). Alcohols are suitable to modulate the interactions between the polypeptide chain and the TFE has been used not only in order to promote the formation of helical structure in protein fragments and peptides (21-23), but in many other instances such as the transformation of proteins into molten globule-like intermediates (24-27) and the stabilization of intermediate structures of proteins (28). To investigate the effects of alcohols on the HCVCP 124 structure, the samples were incubated with increasing concentrations of these solvents: 10 to 50 % butanol and 10 to 50 % of TFE. The results show that for both the most effective change in the tertiary and secondary structure was in the presence of 30 % butanol and 30 % TFE, as verified by fluorescence spectroscopy (Figure 1A) and circular dichroism (Figure 1B), respectively.

### ***bis-ANS binding - Extrinsic fluorescence analysis***

As part of our structural characterization of HCVCP 124 we used the fluorophore bis-ANS (bis-8-anilinonaphthalene-1-sulfonate). This probe binds noncovalently to nonpolar segments in proteins, especially in proximity to positive charges (29). Since its binding is followed by a large increase in its fluorescence quantum yield, this fluorescent probe has been frequently used to study hydrophobic sites, conformational changes, and to detect the presence of molten globule state in proteins (30,31). However, possible effects of these fluorescent probes on protein conformation and stability have been extensively studied (30,32,33). In a recent paper, we showed that binding of bis-ANS on a fused coat protein of the bacteriophage MS2 changed the stability, leading the protein to a more unstable form (34). In the present work, we observed that bis-ANS binding to HCVCP 124 was not able to induce significant changes in the tryptophan region at room temperature (Figure 1C). However, the binding of the probe was enough to promote changes in the secondary structure of HCV124 (Figure 1D).

### ***Characterization of changes on the secondary structure of HCVCP 124 by SDS***

Sodium dodecyl sulfate (SDS) has been used to induce ordered structure (alpha-helix or beta-sheet) in certain peptides or "intrinsically unstructured" proteins. The SDS-induced structures formed by these peptides are amphiphilic, showing both a hydrophobic and a hydrophilic face. Previous work in this area has revealed that SDS induces helical folding in a wide variety of non-helical proteins (35). Here, we verified that the interaction of HCVCP 124 with SDS micelles or monomers promotes changes in the tryptophan region (Figure 2A, 2B, and 2C) characterized by a blue shift in the fluorescence spectra. Moreover, a small stabilization of the secondary structure of HCVCP 124 was also observed by an increase in the ellipticity around 222 nm at the CD spectra (Figure 2D).

### ***NaCl promotes changes on the tertiary and secondary structure of HCVCP 124***

High salt concentrations can promote alterations in protein structures by decreasing electrostatic interactions and by increasing hydrophobic effect. HCVCP 124 is highly positively charged, representing in around 20% of basic residues. Thus, we investigated if high salt concentrations were able to promote changes in the HCVCP 124 structure. Our data

show that high NaCl concentration was able to induce changes in the tryptophan region (Figure 3A) and in the secondary structure of the HCVCP 124 (Figure 3B), as verified by fluorescence spectroscopy and CD, respectively.

### ***Neutralization of basic residues promoted by high pH values induces the formation of empty NLPs***

Changes on pH can induce partial folding of intrinsically unordered proteins due to the minimization of their large net charge present at neutral pH, thereby decreasing charge/charge intramolecular repulsion and permitting hydrophobic-driven collapse to the partially folded intermediate. Our results showed that an increase in pH to near to the pI of HCVCP 124 (pH 12) promotes an increase in tertiary structure, as indicated by lower exposure of the tryptophan residues to the solvent. This profile is characterized by the blue shift in the spectra (Figure 3C). In these measurements, we observed an increase in light scattering in the pH values near pH 12 (Figure 3B), indicating the formation of NLPs. To confirm the NLPs formation we used spectrophotometry (Figure 4A and 4B) and transmission electron microscopy (Figure 4C, 4D and 4E). The micrographs show the formation of NLPs with heterogeneous particle size. Our results showed that the formation of NLPs occurs in a similar way to the NLPs formed by addition of nucleic acids.

### ***Nucleic acids binding promotes NLPs formation***

The formation of NLPs triggered by addition of nucleic acids has been well characterized. Moreover, structural studies showed that the secondary structure of these protein particles involves  $\beta$ -sheet enrichment in relation to its protein monomer (36,37). A recent work describes the development of a method that allow the kinetics of assembly to be followed *in vitro* by measurement of solution turbidity using a spectrophotometer (38). Here, we realized similar experiments in order to investigate if two short unspecific DNAs (poly(GC) and p53 consensus) and a short structured RNA can dispartate NLPs assembly. We showed that the two short DNAs (dsDNA of 21 bp) and the RNA (18bp) can be a substrate for formation of NLPs. This process was dependent on concentration of both DNA/RNA or protein as verified by spectrophotometer (Figure 5) and confirmed by electron microscopy (Figure 6).

### ***Thermodynamics of the NLP assembly***

In order to investigate some energetic aspects that govern the HCV assembly we utilized isothermal titration calorimetry. We were able to verify that the assembly triggered by the different nucleic acids was enthalpically driven (Figure 7). These data likely are due to the heat released from electrostatic interactions between basic residues and phosphate radicals from the nucleic acids. These interactions appear to be the main thermodynamic factor that driven the assembly process *in vitro*. The assembly promoted by high pH is similarly driven by neutralization of basic residues.

## DISCUSSION

The lack of a rigid globular structure under physiological conditions might represent a considerable functional advantage for intrinsically unfolded proteins, allowing them to interact efficiently with several different targets, when compared to a folded protein with limited conformational flexibility (14,39). To better understand the reason why some proteins fold into a 3D-well organized structure but others remain unfolded at physiological conditions, studies involving "intrinsically unfolded" proteins under several conditions are crucial. Perhaps one of the most interesting features of disordered proteins is their functionality. In general, their function involves binding to a partner ligand, such as other proteins, nucleic acids or membranes, and typically such interaction is associated with the induction of folding in the previously disordered structure. The lack of the C-terminal leads the HCV core protein to an unstructured form (12). The understanding of the thermodynamics of the structure-function relationship of the HCV core protein, which participates in the viral replication cycle and HCV pathogenesis, is of crucial interest.

Recent studies have investigated the influence of the co solvents on the folding kinetics of proteins and peptides (23,40-42). Despite of the numerous applications, the various effects and detailed mechanisms of how alcohols act on proteins and peptides are still not understood. The action of these alcohols results from different properties such as: solvent polarity, dielectric constant, length of the carbohydrate chain, number of OH groups, degree of halogenation. In the case of some frequently used alcohols, the order of effectiveness is TFE > isopropanol > ethanol > methanol (43). The secondary structures of HCVCP 124 induced by increasing alcohol concentrations were monitored by far-UV CD. Our data showed that the changes in the secondary structure promoted by butanol and TFE were very similar. The effect of TFE on the stability of three different peptides was recently investigated by simulations (44). The data show that in a TFE/water mixture, the organic co solvent aggregates around the peptide, forming a matrix that partly excludes water, removing alternative hydrogen-bonding partners and providing low dielectric environment. This matrix in turn promotes the formation of local interactions and, as a consequence, ordered secondary structure. Together, these factors favor the formation of intra peptide hydrogen bonds.

Bis-ANS binds noncovalently to nonpolar segments in proteins, especially in proximity to positive charges (29). The binding of the probe bis-ANS on the HCVCP 124

indicates the presence of structured hydrophobic regions in the protein. Proteins that consist of unfolded regions interspersed with short structured regions are typically intrinsically unstructured proteins. These structured regions are known to be important in specific ligand binding in some cases (45-47). The presence of discrete folded regions in the HCVCP 124 structure may also account for the ability of HCVCP 124 to bind to several targets. In addition, bis-ANS was able to induce an increase in the core protein secondary structure, likely by positive charge neutralization.

Sodium dodecyl sulfate (SDS) has been used to induce ordered structure in certain peptides or intrinsically unstructured proteins (35). Here, we showed that either SDS micelles or monomers can interact with HCVCP 124 protein and induce the changes in the tryptophan region and in the secondary structure, what can be verified by the blue shift in the fluorescence spectra and changes in the CD spectra (Figure 2). As well as hydrophobic interactions, the SDS monomers can bind to the HCVCP 124 through electrostatic interactions with positive charges of some amino acids in the core protein. These interactions can decrease the repulsion among positive charged residues in the protein structure, favoring the local folding. The interaction of HCVCP 124 with SDS micelles likely occurs by the penetration of hydrophobic portions, such as of tryptophan residues, in the interior of micelles what can also favor local folding. On the other hand, these hydrophobic interactions likely prevented contacts inter-monomers necessary to the assembly process.

Recent studies by using electron microscopy (EM) and spectrometry have verified that the increase in turbidity after nucleic acids addition is linked to the formation of NLPs (38). Here, we were not able to observe any increase in turbidity or increase in the light scattering in the presence of bis-ANS, SDS and alcohols, indicating that, in these cases, there is a local folding in the monomer form of HCVCP 124 or with intermediates of the assembly process.

Recent works have demonstrated that changes on pH induce partial folding of intrinsically unordered proteins due to the minimization of their large net charge present at neutral pH, thereby decreasing charge/charge intramolecular repulsion and allowing a hydrophobic-driven collapse to the partially folded intermediate. In addition, the charges on the protein subunits are expected to yield electrostatic repulsion acting against the assembly of capsids (48). In our study, an increase in pH near the pI of HCVCP 124 promoted changes on the quaternary and secondary structures of HCVCP 124, likely by the decrease in the

intramolecular repulsion. The tryptophan residues became less exposed to the solvent as verified by fluorescence data (Figure 3C), indicating that they are involved in the assembly. Moreover, the increase of light scattering measurements at pH 12 suggested macromolecular assembly, such as the formation of empty NLPs or aggregates (Figure 3D). The formation of empty NLPs was confirmed by electron microscopy (Figure 4C, 4D and 4E). Spectrophometric measurements of NLPs assembly triggered by the incubation of HCVCP 124 at pH 12 (Figure 4A and 4B) are similar to that triggered by nucleic acids (Figure 5 and 6). Thus, our data indicate that the loss of positive charge or neutralization of basic residues of the HCV core protein is the major factor that drives the NLPs formation *in vitro* at low concentrations. A recent work showed that a C-terminal truncated Hepatitis C Virus core protein variant assembles into virus-like particles *in vitro* in the absence of structured nucleic acids, however only at very high concentrations (49). The same group showed the temporal dynamics of exchange for the protein in particles assembly: arginine residues exchange first, followed by turns and unordered structures, followed by  $\beta$ -sheets which may act as linkers of protein monomers (37). Therefore, the neutralization of basic residues favors contacts among monomeric forms of the protein to assembly process. Thermodynamically the excess of positive charges of HCVCP 124 represents an important energetic barrier to the multimerization process of the protein into NLPs (Figure 8). This characteristic also explains the low specificity to package of nucleic acids *in vitro*.

Previously, Kunkel *et al.* reported that two variants of purified HCcAg comprising 124 aa and 179 aa, respectively, obtained from recombinant *E. coli* cells, assembled *in vitro* into NLPs requiring structured RNA molecules (range 0.1 – 10  $\mu$ M) (50). However, a recent work reported that the C-terminal truncated Hepatitis C Virus core protein variant assembles *in vitro* into virus-like particles in the absence of structured nucleic acids (49). Little is known about the *in vivo* assembly pathway or the structure of the HCV nucleocapsid and virion. As for other flaviviruses, HCV core protein interacts with nucleic acids *in vitro* to form nucleocapsid particles. In addition, it is well characterized that the assembly into NLPs of HCV can be promoted by unspecific nucleic acids. Here, we showed that the HCV core protein multimerization is driven by neutralization of basic residues, which can be promoted mainly by electrostatic interactions with nucleic acids (Figure 5 and 6) or by deprotonation of basic residues (Figure 4) triggered by higher pHs. These data suggest that the assembly

process *in vivo* does not require great specificity to viral RNA and that is possible that HCV core protein can interact with cellular mRNAs and assemble. Moreover, this characteristic can be related with its capacity to modulate some cellular functions and consequently with HCV pathogenesis.

On the other hand, we also verified that particles formed by interacting with unspecific nucleic acids (DNA poly(GC), DNA consensus p53 and RNA) disassemble after elution in gel filtration chromatography (data not shown). These data indicate that the core protein and the NLPs formed are in thermodynamic equilibrium. In addition, we also observed that some hours after the formation of particles also naturally disassemble (data not shown). These results showed that the particles are unstable and that are probable generated by transient interactions. Membrane structures are usually important to maintain the integrity of the capsid structure in hydrophilic environments (51). In conclusion, our data indicate that the viral RNA or the C-terminal of HCV core protein, by insertion in the membrane, have crucial importance in the stabilization of the native particles *in vivo*.

Energetic aspects of capsid assembly are important to understanding of the biological process. The assembly of Hepatitis B Virus capsids is driven by weak protein-protein interactions and is characterized by positive enthalpy and entropy (52). Thus, in this case, the reaction is entropy-driven, characterized by the largely hydrophobic contacts. Differently, the binding of intrinsically unstructured proteins, which are usually highly hydrophilic, to its target involves an entropic cost associated with the disorder-to-order transition (53). Here, we verified that the key thermodynamic driving force for the assembly process of NLPs formed by the HCVCP 124 is the favorable enthalpic contribution (Figure 7), what likely is higher than the entropic cost, giving a good example of enthalpy-entropy compensation associated to assembly process. The heat released in the assembly process likely is due to the neutralization of basic residues by electrostatic interactions between HCV124 and nucleic acids.

Based on the data described, we showed that the truncated HCV core protein, a typical intrinsically unordered protein, can adopt an intermediate conformation or assemble into NLPs in a dependent way of some ligands or conditions. Some conditions, such as SDS and TFE, can minimize the energetic barrier favoring the HCVCP 124 to assume an intermediate structure and other conditions, such as binding of nucleic acids and basic pH, can promote the assembly into NLPs. Thus, we proposed a thermodynamic model related to the structure-

function relationship to the truncated HCV core protein that is represented in the figure 8. In addition, we showed that the RNA or DNA package *in vitro* is driven by enthalpic factors likely due to the neutralization of basic residues. These important observations may help in the understanding of the physical nature of the different roles of HCV core protein in the HCV pathogenesis. Furthermore, the description of these peculiar characteristics can lead to new approaches in drug design that could increase the efficiency of the treatment against Hepatitis C.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We gratefully acknowledge Emerson Gonçalves for excellent technical assistance. This work was supported in part by an international grant from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) to J.L.S. and by grants from Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB) of Brazil to J.L.S. and A.C.O., and by a grant from the National Institutes of Health (NIH) to D.S.P.

## REFERENCES

1. Ivanyi-Nagy, R., Kanevsky, I., Gabus, C., Lavergne, J.P., Ficheux, D., Penin, F., Fossé P., Darlix, J.L. (2006). Analysis of hepatitis C virus RNA dimerization and core-RNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 34(9), 2618-33.
2. Bailly, F., Ahmed, S.N.S., Pradat, P. and Trepo, C. (2010). Management of nonresponsive hepatitis C. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 8(4), 379-395.
3. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2001). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In Knipe, D. M., Howley, P. M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 991-1042.
4. Choo, Q., Kuo, G., Ralston, R. & 15 other authors (1994); Vaccination of chimpanzees against infection by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1294-1298.
5. Lauer, G. M. & Walker, B. D. (2001). Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 345, 41–52.
6. Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67, 1385–1395.
7. Liu, Q., Tackney, C., Bhat, R., Prince, A. & Zhang, P. (1997). Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol* 71, 657–662.
8. McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21, 3980–3988.
9. Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S.-I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J. R. & Kohara, M. (1998). The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 72, 6048–6055.
10. Lo, S. Y., Selby, M., Tong, M. & Ou, J.-H. (1994). Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. *Virology* 199, 124-131.
11. Lo, S. Y., Masiarz, F., Soon, B. H., Michael, M. C. L. & J.-H. (1995). Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 213, 455-461.

12. Kunkel, M. & Watowich, S. J. (2004). Biophysical characterization of hepatitis C virus core protein: implications for interactions within the virus and host. *FEBS Letters*. 557:174-180.
13. Duvignaud, J.B., Savard, C., Fromentin, R., Majeau, N., Leclerc, D., Gagné, S.M. (2009). Structure and dynamics of the N-terminal half of hepatitis C virus core protein: an intrinsically unstructured protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 378(1), 27-31.
14. Wright, P. E. & Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: reassessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 293, 321-331.
15. Uversky, V. N., Gillespie, J. R. & Fink, A. L. (2000). Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 41, 415–427.
16. Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C. J. & 17 other authors (2001). Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* 19, 26-59.
17. Uversky, V. N. (2002). What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* 269, 2–12.
18. Tompa, P. (2005). The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Letters* 59, 3346-3354.
19. McLauchlan, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J. Viral Hepat.* 7(1), 2-14.
20. Appel, R. D., Bairoch, A. & Hochstrasser, D. F. (1994). A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem Sci* 19, 258-260.
21. Sönnichsen, F. D., Van Eyk, J. E., Hodges, R. S. & Sykes, D. B. (1992). Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry* 31, 8790-8798.
22. Dyson, H. J. & Wright, P. E. (1993). Peptide conformation and protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 3, 60-65.
23. Lu, H., Buck, M., Radford, S. E. & Dobson, C. M. (1997). Acceleration of the folding of lysozyme by trifluoroethanol. *J Mol Biol* 265, 112-117.
24. Buck, M., Radford, S. E. & Dobson, C. M. (1993). A partially folded state of hen egg-white lysozyme in trifluoroethanol: structural characterization and implications for protein folding. *Biochemistry* 32, 669-678.

25. Alexandrescu, A. T., Ng Y-L & Dobson, C. M. (1994). Characterization of a trifluoroethanol-induced partially state of  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Mol. Biol.* 235, 587-599.
26. Gast, K., Zirwer, D., Müller-Frohne, M. & Damaschum, G. (1999). Trifluoroethanol-induced conformational transitions of proteins: insights gained from the differences between  $\alpha$ -lactalbumin and ribonuclease A. *Protein Sci.* 8, 625-634.
27. Konno, T., Iwashita, J. & Nagayama, K. (2000). Fluorinated alcohol, the group of cosolvents that stabilize the molten-globule state relative to a highly denatured state of cytochrome *c*. *Protein Sci* 9, 564-569.
28. Luo, P. & Baldwin, R. L. (1998). Trifluoroethanol stabilizes the pH 4 folding intermediate of sperm whale apomyoglobin. *J Mol Biol* 279, 49-57.
29. Rosen, C. G. & Weber, G. (1969). Dimer Formation from 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate Catalyzed by Bovine Serum Albumin. A New Fluorescent Molecule with Exceptional Binding Properties. *Biochemistry* 8, 3915-3919.
30. Shi, L., Palleros, D. R. & Fink, A. L. (1994). Protein conformational changes induced by 1,1-Bis(4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid): Preferential binding to the molten globule of DnaK. *Biochemistry* 33, 7536–7546.
31. Arighi, C., Rossi, J. & Delfino, J. (1998). Temperature-induced conformational transition of intestinal fatty acid binding protein enhancing ligand binding: A functional, spectroscopy and molecular modeling study. *Biochemistry* 37, 16802–16814.
32. Ali, V., Prakash, K., Kulkarni, S., Ahmad, A., Madhusudan, K.P., & Bhakuni, V. (1999). 8-Anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) induces folding of acid unfolded cytochrome *c* to molten globule state as a result of electrostatic interactions. *Biochemistry* 38, 13635–13642.
33. Matulis, D., Baumann, C.G., Bloomfield, V.A. & Lovrien, R.E. (1999). 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers* 49, 451–458.
34. Lima, S. M. B., Vaz, A. C. Q., Souza, T. L. F., Peabody, S. D., Silva, J. L. & Oliveira, A. C. (2006). Dissecting the role of protein-protein and protein-nucleic acids interactions on MS2 Bacteriophage stability. *FEBS Journal* 273(7), 1463-75.
35. Parker, W. & Song, P. (1992) Protein structures in SDS micelle-protein complexes. *Biophys J* 61, 1435-1439.
36. Rodríguez-Casado, A., Molina, M. & Carmona, P. (2006) Conformational Features of Truncated Hepatitis C Virus Core Protein in Virus-Like Particles. *Biopolymers* 82, 334-338.

37. Rodríguez-Casado, A., Molina, M. & Carmona, P. (2007) Spectroscopy study of conformational changes accompanying self-assembly of HCV core protein. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* 66, 110-117.
38. Fromentin, R., Majeau, N., Gagné, M.L., Boivin, Annie., Duvignaud, J., Leclerc, D. (2007) A method for *in vitro* assembly of hepatitis C virus core protein and for screening of inhibitors. *Analytical Biochemistry* 366, 37–45.
39. Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2002). Insights into the structure and dynamics of unfolded proteins from nuclear magnetic resonance. *Adv Protein Chem.* 62, 311–340.
40. Bodkin, M. J. & Goodfellow, J. M. (1996). Hydrophobic solvation in aqueous trifluoroethanol solution. *Biopolymers* 39, 43–50.
41. Chiti, F., Taddei, N., Webster, P., Hamada, D., Fiaschi, T., Ramponi, G. & Dobson, C. M. (1999). Acceleration of the folding of acylphosphatase by stabilization of local secondary structure. *Nat Struct Biol* 6, 380-387.
42. Hamada, D., Chiti, F., Guijarro, J. L., Katoaba, M. Taddei, N. & Dobson, C. M. (2000). Evidence concerning rate-limiting steps in protein folding from the effects of trifluoroethanol. *Nat Struct Biol* 7, 58-61.
43. Hirota, N., Mizuno, K. & Goto, Y. (1997). Cooperative  $\alpha$ -helix formation of  $\beta$ -lactoglobulin and mellitin induced by hexafluoroisopropanol. *Protein Sci* 6, 416-421.
44. Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M. & Mark, A. E. (2002) Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A Molecular dynamics study. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 19, 12179-12184.
45. Mohan, A.; Oldfield, C. J.; Radivojac, P.; Vacic, V.; Cortese, M. S.; Dunker, K. A.; Uversky, V. N. (2006) Analysis of Molecular Recognition Features (MoRFs). *J Mol Biol* 362, 1043-1059.
46. Fuxreiter, M.; Simon, I.; Friedrich, P.; Tompa, P. (2004) Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol* 338, 1015-1026.
47. Oldfield, C. J., Cheng, Y., Cortese, M. S., Romero, P. & Uversky, V. N.; Dunker, K. A. (2005) Coupled binding and folding with R-helixforming Molecular Recognition Elements. *Biochemistry* 44, 12454-12470.

48. Siber, A. and Podgornik, R. (2007) Role of electrostatic interactions in the assembly of empty spherical viral capsids. *The American Physical Society*, 76, 061906.
49. Acosta-Rivero, N., Rodrigues, A., Mussachio, A., Poutu, J., Falcon, V. Torres, D., Aguillar, C., Linares, M., Alonso, M., Perez, A., Menezes, I., Morales-Grillo, J., Marques, G., Duenas-Carrera, S.A. A c-terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles into virus-like particles *in vitro* in the absence of structured nucleic acids. *Biochem Biophys Res Con* 2005, 334, 901-906.
50. Kunkel, M., Lorinczi, M., Rijnbrand, R., Lemon, S. M. & Watowich, S. J. (2001). Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* 75, 2119–2129.
51. Majeau, N., Gagne, V., Boivin, A., Bolduc, M., Majeau, J., Ouellet, D. and Leclerc, D. (2004) The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. *Journal of General Virology*, 85, 971–981.
52. Ceres, P. and Zlotnick, A. (2002) Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry*, 41, 11525-11531.
53. Dyson, H. J. and Wright, P.E.. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews* 6, 19-208.

## LEGENDS

**Figure 1 - Effects of TFE, butanol and bis-ANS on the secondary and tertiary structure of HCVCP 124.** Changes on the tertiary structure (**A**) and secondary structure (**B**) of HCVCP 124 in the presence of 30% butanol or 30 % TFE. (**C**) Fluorescence measurements of HCVCP 124 in the presence of bis-ANS at room temperature. (**D**) Changes on the secondary structure observed by Far-UV CD of HCVCP 124 in the presence of the probe.

**Figure 2 - Characterization of changes on the tertiary and secondary structure of HCVCP 124 by SDS.** The interaction of HCVCP 124 with SDS monomers (**A** and **B**) or micelles (**A** and **C**) promoted changes in the tryptophan region as verified by a blue shift in the fluorescence spectra of the protein. (**D**) The secondary structure changes in the presence of both monomers and micelles of SDS.

**Figure 3 – Effects of NaCl and pH on the structure of HCVCP 124.** Changes in the tryptophan region promoted by high NaCl concentration (**A**) and high pH values (**C**). (**B**) The secondary structure changes in the presence of different NaCl concentrations. (**D**) Light scattering of HCVCP 124 at different pH values.

**Figure 4 – NLPs formation triggered by basic pH.** **A**) Kinetics of *in vitro* assembly of different concentrations of HCVCP 124 triggered by basic pH. **B**) Plot of maximum values of D.O. by HCVCP 124 concentration. **C, D and E**) Electron micrographs of negatively stained nucleocapsid-like particles (NLPs) produced from truncated HCV core protein (20  $\mu$ M) at pH 12. Bars: C- 100 nm and D-E 300 nm.

**Figure 5 – Influence of HCV core protein concentration on *in vitro* assembly.** Kinetics of *in vitro* capsid assembly triggered by addition of 5  $\mu$ M DNA poly(GC) (**A**), 5  $\mu$ M DNA consensus p53 (**C**) and 5  $\mu$ M RNA (**E**) to each different protein concentration. Plot of maximum values of D.O. by HCVCP 124 concentration are showed in **B** (DNA poly(GC)), **D** (consensus p53) and **F** (RNA).

**Figure 6 – Electron micrograph of negatively stained nucleocapsid-like particles (NLPs) produced from truncated HCV core protein at different concentrations. A) 2.5  $\mu$ M HCVCP 124. B) 10  $\mu$ M HCVCP 124. C) 50  $\mu$ M HCVCP124. To each protein concentration was added 5  $\mu$ M poly(GC) DNA. Bars: A- 100 nm and B-C 300 nm.**

**Figure 7 – Enthalpic contribution to the formation of nucleocapsid-like particles revealed by isothermal titration calorimetry. A) Heat flux profile associated with injections of 5  $\mu$ M nucleic acid in the calorimetric cell containing HCVCP 124 at 20  $\mu$ M at 37°C. The buffer used was 10 mM phosphate (pH 7.4) with 100 mM NaCl.**

**Figure 8 – Free energy diagram proposed to the conversion between the disordered state of HCVCP 124 to monomer state more structured or oligomeric state (empty capsid).**

Figure 1

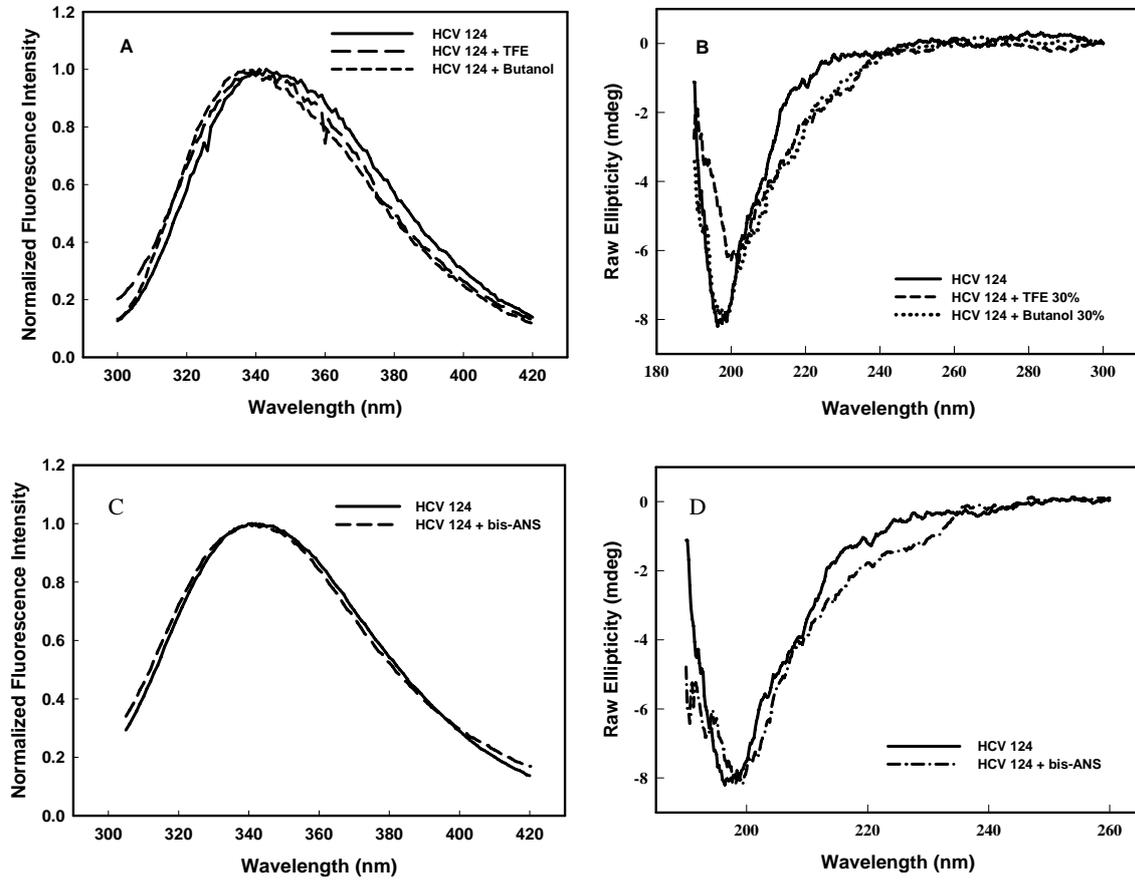


Figure 2

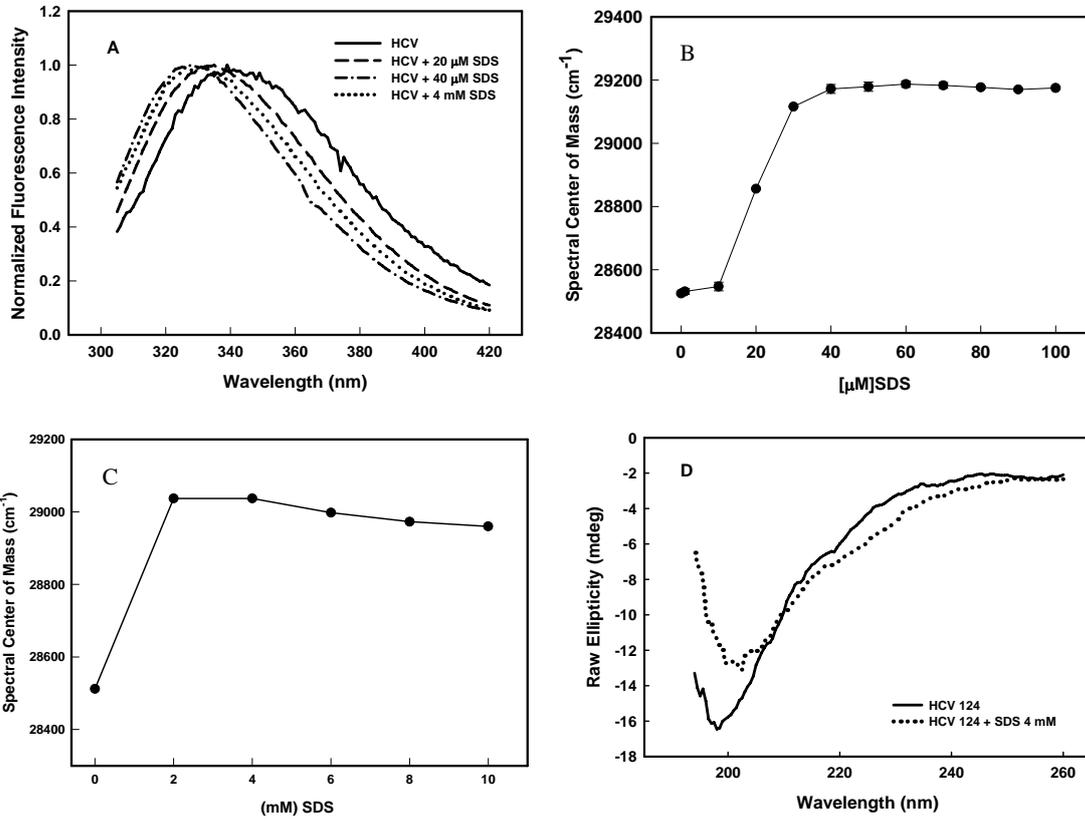


Figure 3

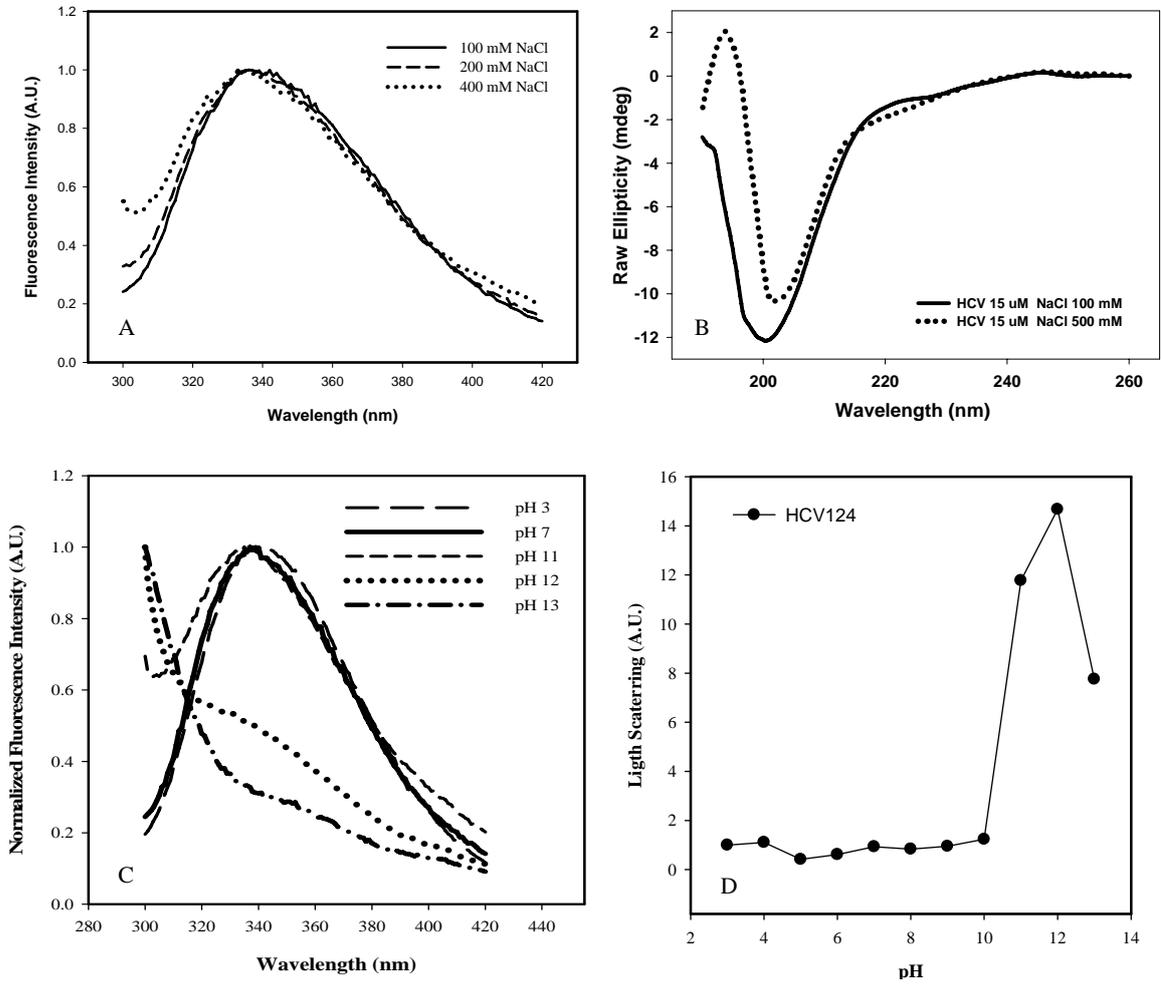


Figure 4

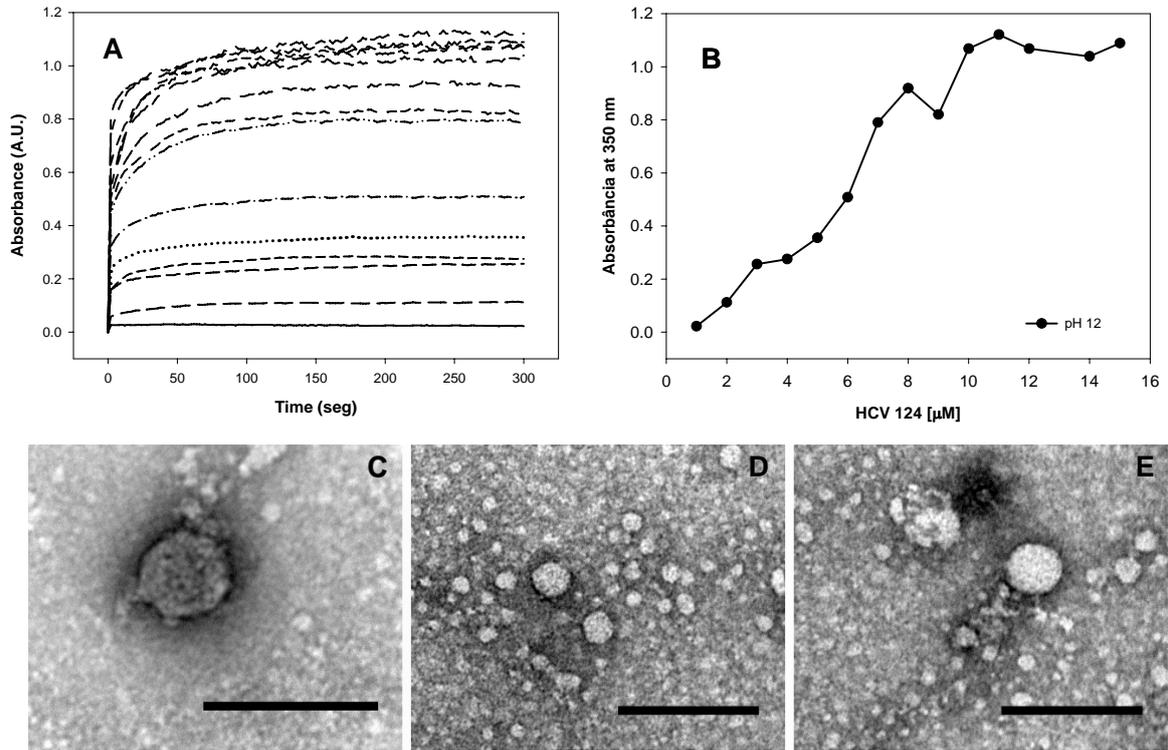
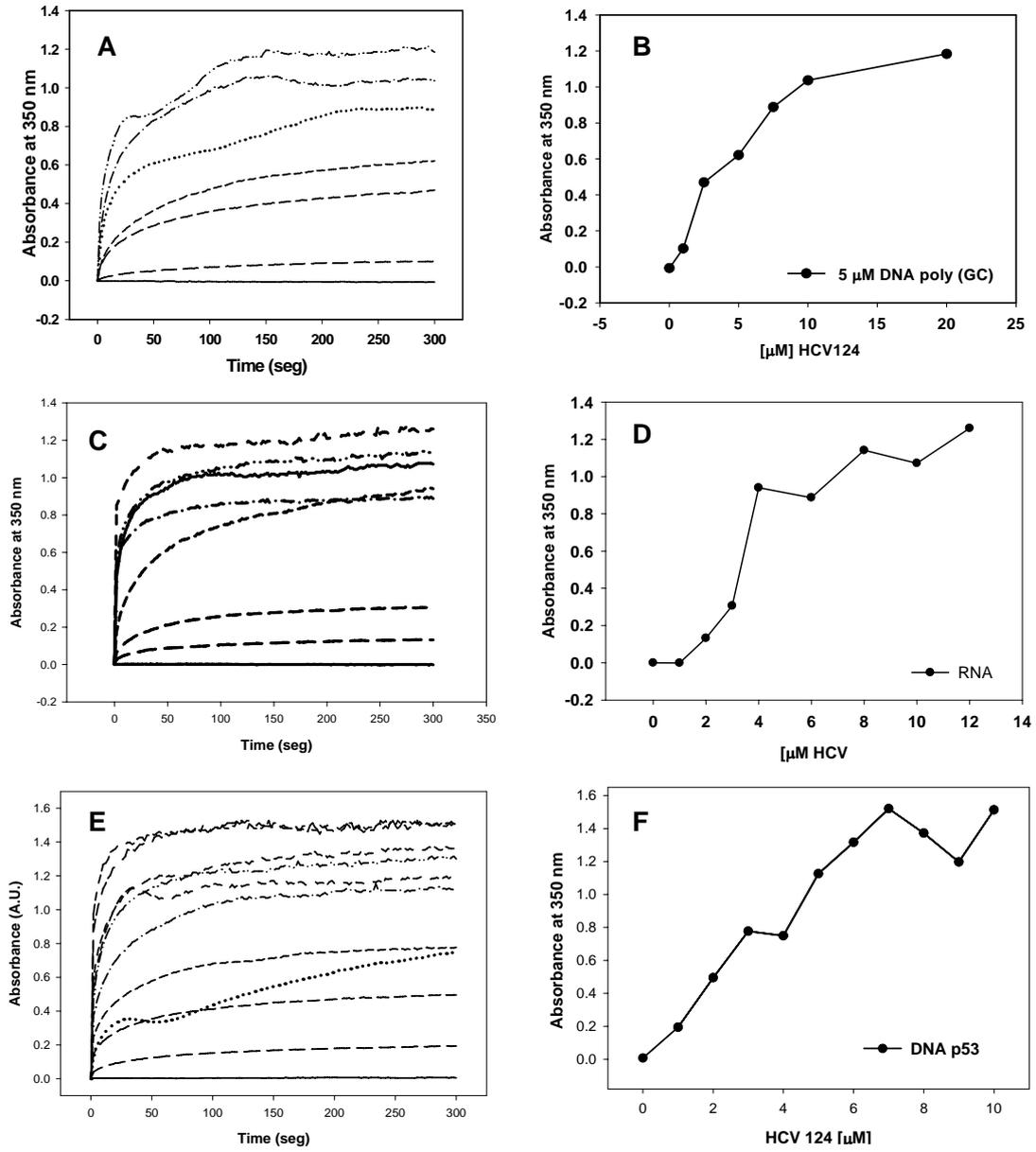


Figure 5



**Figure 6**

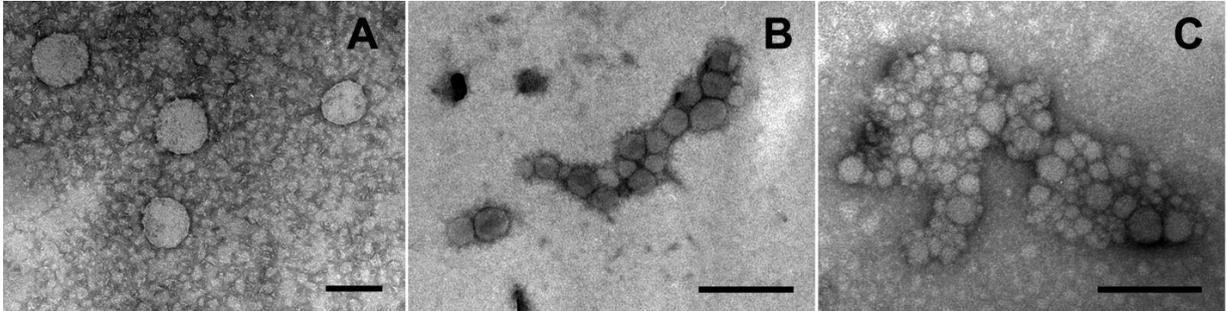


Figure 7

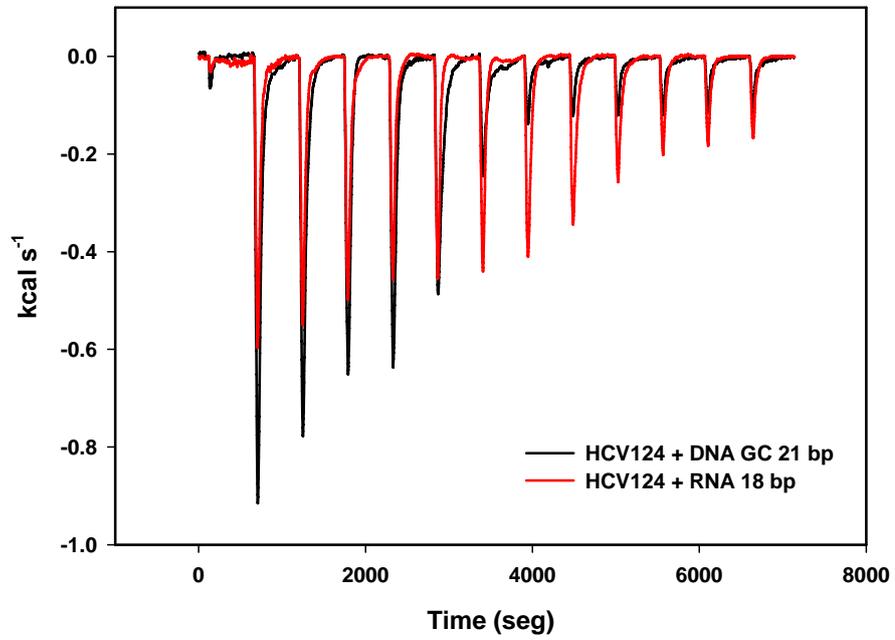
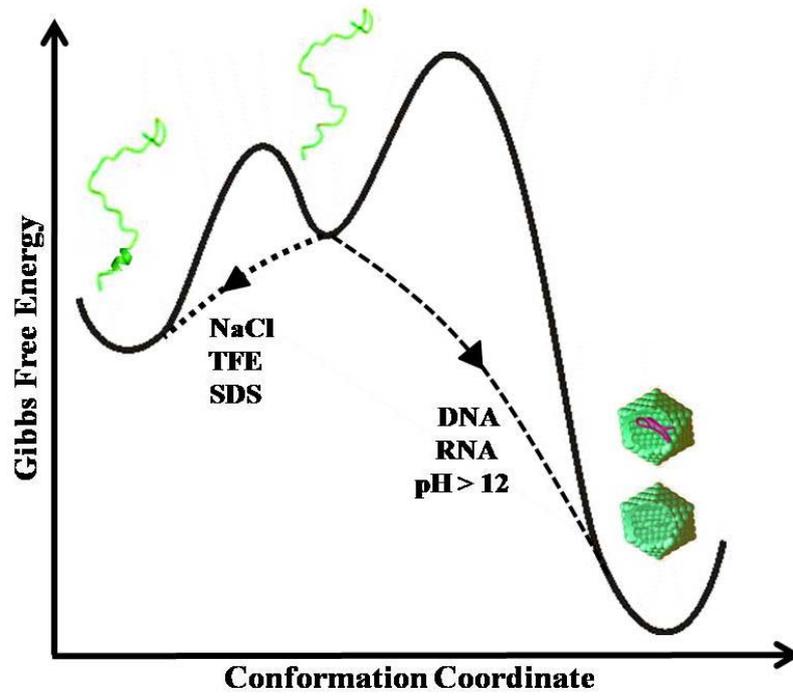


Figure 8



**CONFORMATIONAL SELECTION, DYNAMIC RESTRICTION AND HYDROPHOBIC EFFECT COUPLED TO THE STABILIZATION OF THE BIR3 DOMAIN OF HUMAN X-LINKED INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEIN BY THE TETRAPEPTIDE AVPI**

Theo Luiz Ferraz de Souza<sup>1</sup>, Daniel Sanches<sup>1</sup>, Rafael Braga Gonçalves<sup>1</sup>, Samuel Silva da Rocha Pita<sup>2</sup>, Pedro Geraldo Pascutti<sup>2</sup>, M. Lucia Bianconi<sup>1</sup>, Fabio Ceneviva Lacerda de Almeida<sup>1</sup>, Jerson L. Silva<sup>1</sup> and Andréa Cheble de Oliveira<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biologia Estrutural and Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Macromoléculas, Instituto de Bioquímica Médica, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem – INBEB, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular (LMDM), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil.

**Running Title:** Structural stability of the XIAP-BIR3/AVPI complex

**\*Corresponding Author:** Andréa C. Oliveira (e-mail: cheble@bioqmed.ufrj.br) – Mailing Address: Av. Carlos Chagas Filho 373 - CCS/IBqM/ Bloco E, sala 08, Cidade Universitária, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: (5521) 2562-6756.

†This work was supported in part by an International Grant from ICGEB to J.L.S. and by grants from the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology (CNPq Millennium Program), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio

(FUJB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pronex Program/CNPq of Brazil to J.L.S. and A.C.O., and FINEP to M.L.B.

**Abbreviations:** BIR, baculoviral IAP repeat; caspase, cysteinyl aspartate-specific proteinase; CD, circular dichroism; Cyt c, cytochrome c; DIABLO, **D**irect **I**AP **B**inding protein with **L**Ow pI; IPTG, isopropylthiogalactoside; LB, Luria–Bertani; Smac, **S**econd **M**itochondria-derived **A**ctivator of **C**aspases; UV, ultraviolet.

**Key words:** XIAP-BIR3/AVPI interaction, protein stability, thermodynamics, spectroscopy, calorimetry, apoptosis.

## **ABSTRACT**

The XIAP-BIR3 domain blocks a substantial portion of the apoptosis pathway and is an attractive target for novel therapeutic agents for the cancer treatment. The tetrapeptide AVPI, from the protein Smac/DIABLO, binds to the XIAP-BIR3 domain, allowing the cancer cells to die. Here, we characterize the binding parameters of AVPI to XIAP-BIR3 and analyze its effects on the thermodynamic stability of this domain. XIAP-BIR3 was exceptionally stable to physical and chemical treatments and became even more stable by interaction with AVPI. Nuclear magnetic resonance experiments demonstrated that conformational selection is taking place upon AVPI interaction to XIAP-BIR3. Molecular dynamics simulations corroborate that the flexibility of XIAP-BIR3 is significantly reduced. The positive binding entropy associated to loss of conformational entropy involved in the binding indicates that hydrophobic interactions play important role in the interaction and domain stabilization. The mechanism of XIAP-BIR3 stabilization and its implications for drug affinity optimization were discussed.

## INTRODUCTION

Apoptosis is an essential process to the development and homeostasis of multicellular organisms, and it can lead to a variety of diseases, such as neurodegenerative disorders and cancer, when deregulated [1-3]. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) are members of an important class of endogenous proteins that can inhibit apoptosis in both intrinsic and extrinsic pathways [4,5]. Among the IAPs that have been studied, the human X-linked IAP (XIAP) seems to be the most potent, and it plays a key role in binding to and inhibiting an initiator caspase (caspase-9) and two effector caspases (caspase-3 and caspase-7) [6-9].

All members of the family present at least one baculoviral IAP repeat (BIR) motif, although many of them contain three motifs. XIAP is a single protein that has three BIR domains and a C-terminal RING finger that are specific for different caspases [10]. Analyses of the structure and function of XIAP have demonstrated that the third BIR domain (BIR3) inhibits caspase-9 selectively and that the inhibition of caspase-3 and 7 is mediated by the linker region between BIR1 and BIR2 [6,7,9,11,12]. The interaction between XIAP and the caspases can be inhibited by Smac/DIABLO, a second mitochondrial activator of the caspases/direct IAP-binding protein, which is released from mitochondria upon initiation of the apoptotic signaling process [13-16]. Structural and biological studies have shown that the interaction between XIAP and Smac/DIABLO takes place between a well-defined surface groove in the BIR3 domain of XIAP and four amino acid residues (AVPI, i.e., Ala-Val-Pro-Ile) at the N-terminus of Smac/DIABLO [14,15]. This four-residue binding-motif, i.e., the IAP-binding motif (IBM), is also present both in human and mouse caspase-9 [17].

Excessive expression of XIAP and other IAPs occurs in several types of human cancer cells [18-20] and it predicts a worse prognosis [21]. Several studies have demonstrated that XIAP plays a critical role in the resistance of cancer cells to chemotherapeutic agents,

radiation, and other treatments [22-24]. Thus, different approaches to the inhibition of the antiapoptotic function of XIAP have been explored recently, including the use of antisense oligonucleotides [25] and XIAP inhibitors [26,27]. The tetrapeptide AVPI, from the Smac/DIABLO, and other synthetic Smac peptides are able to interact with the XIAP-BIR3 domain, thereby inhibiting XIAP and increasing the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents both *in vitro* [28,29] and *in vivo* [28-30]. Therefore, several of these approaches have been undertaken to understand the interaction between XIAP-BIR3 and AVPI. Different techniques, including nuclear magnetic resonance [14], crystallography [15] and fluorescence polarization [15,26], have already provided essential data regarding this interaction. Novel anti-IAP candidate drugs have been designed based on the interaction between XIAP-BIR3 and AVPI [31]. However, the thermodynamics aspects of this interaction have not been studied in depth. Many biological processes depend strictly on the thermodynamic stability of the interacting biomolecules [32-37]. In addition, detailed information of the structural-thermodynamic relationships of protein-ligand interactions is of great benefit to structure-based drug design [35]. A better understanding of the structural, dynamic and thermodynamics contributions involved in the formation of XIAP-BIR3/AVPI complex can provide some insight for drug affinity optimization.

Here we investigate the binding of AVPI to the XIAP-BIR3 domain in order to analyze its effects on the thermodynamic stability of this domain using fluorescence spectroscopy, circular dichroism, and calorimetry. We find that XIAP-BIR3 domain is highly stabilized upon interaction with the tetrapeptide AVPI against urea and thermal denaturation. Nuclear magnetic resonance and molecular dynamics simulations were also used to assist us in understanding the effects of AVPI on the structure and dynamics of XIAP-BIR3 domain. Thermodynamic parameters of the association between XIAP-BIR3 and AVPI, such as

enthalpy ( $\Delta H$ ), entropy ( $\Delta S$ ), Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) and heat capacity ( $\Delta C_p$ ) were determined using isothermal titration calorimetry (ITC). In addition, we also calculated the unfolding parameters ( $\Delta G$ ,  $[U_{1/2}]$ , and  $T_m$ ) of XIAP-BIR3 and verified the changes after binding to AVPI. The molecular mechanism of XIAP-BIR3 stabilization and the implications for drug design were discussed.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** All reagents were of analytical grade. The experiments were performed in the standard buffer: 15 mM Tris, pH 7.4, containing 150 mM NaCl and 1 mM DTT.

**Protein preparation.** The recombinant XIAP-BIR3 domain (residues 238-358) was overexpressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) as C-terminal GST-fusion proteins using the pGEX-2T vector from Pharmacia, in LB medium at 37 °C. This plasmid containing the XIAP-BIR3 sequence was kindly provided by Dr. Yigong Shi [15]. Expression of the protein was induced with 2 mM IPTG. Five hours after induction, the cells were centrifuged (6,000 r.p.m. for 20 min; RPR 9.2 rotor; Beckman) at 4 °C and were frozen overnight at -20 °C. After thawing, the cells were resuspended in lysis buffer (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7.4) and sonicated. The cell debris was pelleted by centrifugation (15,000 r.p.m. for 20 min; RPR 20.2 rotor; Beckman). The supernatant was applied to a GST affinity column, washed with binding buffer and the protein was eluted with 10 mM reduced glutathione. After purification, the GST tag was removed using thrombin, followed by a second round of purification using the same column. The purity of the product was confirmed using high performance liquid chromatography (Superdex-75 column from Pharmacia) (data not shown). The samples were dialyzed against the standard buffer (15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.4).

**High pressure and fluorescence spectroscopy.** The high-pressure vessel that we used has been described by Paladini and Weber and was purchased from ISS Inc. (Champaign, IL). Fluorescence emission measurements were recorded using an ISSK2 spectrofluorometer (ISS Inc., Champaign, IL). The intrinsic fluorescence was excited at 280 nm and the emission was

observed from 300 to 420 nm. Changes in the fluorescence spectra at pressure  $p$  were evaluated by the changes in the spectral center of mass,  $\langle \nu_p \rangle$ :

$$\langle \nu_p \rangle = \frac{\sum \nu_i F_i}{\sum F_i} \quad (1)$$

$F_i$  represents the fluorescence emitted at wavenumber  $\nu_i$ , and the summation is carried out over the range of appreciable values of  $F$ .

**Chemical denaturation.** The samples were incubated with increasing concentrations of urea (0.5 to 9.3 M) and allowed to equilibrate overnight at 25 °C prior to the measurements that were carried out in the presence and absence of the denaturant. Each experiment was performed at least three times with different protein preparations.

The free energy change can be correlated empirically using the following equation [38]:

$$\Delta G_u = \Delta G^\circ - m [\text{Urea}] \quad (2)$$

$\Delta G_u$  is the free energy of denaturation at each [Urea],  $\Delta G^\circ$  is the free energy of denaturation in the absence of denaturant, and  $m$  is the proportionality constant. The free energy of denaturation was calculated using the Gibbs equation ( $\Delta G_u = -RT \ln K$ ), and the denaturation constant at each urea concentration ( $K_u = [(\alpha_u)/(1 - \alpha_u)]$ ) was determined using the values of  $\alpha_u$  [39].

**Circular dichroism spectroscopy (CD).** CD spectra were recorded using a Jasco J-715 1505 spectropolarimeter. The XIAP-BIR3 samples were diluted to a final concentration of 150  $\mu\text{M}$  in 15 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl and 1 mM DTT. The spectra were obtained using a 0.01-cm path length quartz cuvette. The spectra were averaged from three

scans that were recorded at 50 nm/min and are representative of three independent experiments. The CD spectra of the buffer or AVPI in buffer were subtracted from the respective raw data. Only the far UV region (190 to 260 nm) was analyzed.

***Isothermal titration calorimetry (ITC).*** ITC measurements were performed using a VP-ITC calorimeter from MicroCal, Llc (Northampton, MA). The titration of 10  $\mu\text{M}$  BIR3 with AVPI involved 18 injections ( $10 \times 3 \mu\text{L}$  and  $8 \times 7.5 \mu\text{L}$ ) of 0.933 M AVPI solution with 5 min intervals and constant stirring at 400 rpm. The temperature was set at 10, 25 or 37  $^{\circ}\text{C}$ . The BIR3 solutions were degassed under vacuum before the titrations, and the reference cell was filled with Milli-Q water. The heat of dilution of AVPI into the buffer was subtracted from the raw data obtained using XIAP-BIR3. The data were analyzed using the Origin 7.0 software package provided by the manufacturer. The data from the first injection (1  $\mu\text{L}$ ) in each experiment was not used in the analysis. Four independent experiments were analyzed separately, and the fitted parameters were averaged. The heat capacity change ( $\Delta C_p$ ) associated with the binding of AVPI to XIAP-BIR3 was obtained from the temperature dependence of the calorimetric enthalpy ( $\Delta H^{\text{cal}}$ ) of binding, assuming linear behavior.

***Differential scanning calorimetry (DSC).*** The DSC thermograms were obtained using a VP-DSC from MicroCal, Llc (Northampton, MA). XIAP-BIR3 (50  $\mu\text{M}$ ) was prepared in 15 mM Tris, 150 mM NaCl and 1 mM DTT (pH 7.4) in the absence and presence of AVPI (150  $\mu\text{M}$ ). The reference cell was filled with the same buffer used for sample preparation. To prevent the formation of air bubbles, the samples and buffers were degassed exhaustively before filling the calorimeter cells. In this particular case the unfolding process was irreversible due to protein aggregation and we were able to obtain only the calorimetric enthalpy. Scan rate

dependence was observed, where slow scan rate favors the protein aggregation. A scan rate of  $90\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$  was used for all the experiments to avoid any anomaly of the baseline due to protein precipitation.

***Nuclear magnetic resonance (NMR).***  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuclear single quantum coherence spectra (HSQC) and heteronuclear NOE measurements were acquired at  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  at 600 MHz in a Bruker DRX600 spectrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany) using a 5-mm cryogenic inverse detection triple resonance probe with z gradient (TCI) (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany). The proteins were dialyzed and concentrated in 15 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.4. Samples were prepared with 10%  $\text{D}_2\text{O}$  (Isotec., Miamisburg, OH). The NMR data were processed with NMRpipe [40] and analyzed using NMRVIEW, version 5.0.3 [41]. The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of the XIAP-BIR3 were assigned according to Sun *et al.* [11].

***Molecular dynamics simulations (MDS).*** GROMACS is a software suite that is used to generate and analyze MD simulations [42]. Using GROMACS version 4, we run 50 ns simulations of both systems to generate structural diversity for each protein set. One of the systems was the XIAP-BIR3 protein (with 115 residues) complexed with a zinc ion and the second system used the first system, but complexed with the tetrapeptide, AVPI. Each system additionally consisted of the following: an edge of 9.0 nm at the simulation box fulfilled with simple point charge [43] water molecules and one sodium ion for system charge neutralization, giving approximately 72,000 atoms in the system. Each system, treated with a periodic boundary condition, underwent a 5000-step energy minimization using the steepest descent algorithm, while restraining the heavy atoms in the system. This was followed by a 5000-step energy minimization using the steepest descent algorithm without any restriction on

the atoms. Another 5000-step energy minimization was carried out while applying a conjugated gradient algorithm. Thus, a 1000-ps harmonic position restrained the MD simulation at 288 K, at which temperature all the protein atoms remained motionless. The electrostatic, the neighbor list switch and van der Waals interactions were set to 1.1, 1.1 and 0.9 nm, respectively. We used separate external temperature baths [44] at 288 K and a coupling constant  $\tau_T = 0.1$  ps for the protein and non-protein components of each system. The 20 ns production run simulation was carried out at constant pressure of 1 bar, and this was maintained by coupling the system weakly to pressure baths [44], using  $\tau_P = 1.0$  ps, and constant temperature, as above. An integration time step of 2 fs was used with the LINCS [45] algorithm, constraining all covalent bonds to their equilibrium lengths. The force field used was GROMOS96 [46], 53a6. For each system, a structural ensemble was created by extracting the structures generated by the simulation every 2.0 ps.

## RESULTS

### *The characterization of the interaction between XIAP-BIR3 and the tetrapeptide AVPI*

We used isothermal titration calorimetry (ITC) to study the interaction between XIAP-BIR3 and AVPI, allowing the thermodynamic ligand-binding parameters to be determined with accuracy [47]. Figure 1A depicts a representative experiment, showing the determination of the exothermic heat of binding from successive injections of AVPI into the cell containing BIR3 at 25 °C, after correction for the heat of dilution of AVPI. The discontinuity in the heat flux profile is due to differences in the injection volume, as indicated by the arrow (see Materials and Methods section). The peaks show a decrease in area after each ligand addition until saturation is achieved. The enthalpy changes at 25 °C as a function of the concentration of AVPI are shown in Figure 1B. Our results show that the binding of AVPI to XIAP-BIR3 occurs in equimolar proportion ( $n \sim 1$ ). The binding is exothermically and entropically favored in the temperature range studied (Table 1). The binding constant and the Gibbs free energy were also obtained from the ITC data (Table 1). The changes in heat capacity can be used to estimate the thermodynamic contribution of bound waters in protein complexes [48]. In our study, we calculated the heat capacity change ( $\Delta C_p$ ) of the binding from the linear dependence of the binding enthalpy on the temperature. The negative heat capacity ( $\Delta C_p = -157.3 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) was observed to the XIAP-BIR3/AVPI interaction.

The intrinsic fluorescence of tryptophan provides a convenient means to monitor conformational changes in proteins, as this aromatic residue is sensitive to the polarity of the environment. XIAP-BIR3 domain has four tryptophan residues. Two of them, W310 and W323, which are partially exposed to the solvent, interact with AVPI when complexes are formed [14]. Here, these residues allowed us to follow the binding of AVPI to XIAP-BIR3

using fluorescence spectroscopy. The interaction between XIAP-BIR3 and AVPI was investigated by monitoring the intensity of the intrinsic fluorescence emission spectra and the center of spectral mass as the concentration of AVPI was increased from 2 to 60  $\mu\text{M}$  (Figures 2A and 2B). The spectral center of mass increased gradually as the ligand:domain molar ratio was raised, reaching a maximal at saturating concentrations (i.e., at a 3:1 ligand:domain molar ratio). These data show that the interaction involves changes in the Trp environment and confirm the contact among AVPI and these residues. Thus, we carried out all stability studies using a 3:1 AVPI:XIAP-BIR3 molar ratio.

***The binding of AVPI induces an increase in the stability of XIAP-BIR3 towards chemical agents***

Urea and guanidine hydrochloride are potent protein denaturants, which destabilize the secondary and tertiary structures by disrupting the hydrogen bonds, hydrophobic, and electrostatic interactions. In order to measure the stability of XIAP-BIR3, which consists of five  $\alpha$ -helices and a three-stranded  $\beta$ -sheet [11], we performed fluorescence and CD measurements using increasing concentrations of urea (0.5 to 9.3 M) or guanidine hydrochloride (data not shown). The samples were incubated overnight in each concentration of urea. Since tryptophan fluorescence spectra are sensitive to the environment, the unfolding of XIAP-BIR3 could be followed by measuring the red shift of the fluorescence spectra by the decrease of the spectral center of mass. We also monitored the changes in the secondary structure (by CD analysis) induced by treatment with urea (at 228 nm) at each denaturant concentration. To better analyze these results, we converted the data to unfolded fraction values (Figure 3A). The XIAP-BIR3 domain was very stable towards urea, as an increase of the unfolded fraction was only observed at concentrations as high as 6 M urea (Figure 3A).

The same measurements were performed in the presence of the tetrapeptide to determine if the changes in the stability of XIAP-BIR3 are promoted by AVPI binding. The results showed that AVPI increases the stability of the XIAP-BIR3 domain towards urea. This stabilization can also be observed by comparing the  $[U]_{1/2}$  and  $\Delta G^\circ$  values in the absence and presence of AVPI (Figure 3B and Table 2). After dilution of the unfolded sample to subdenaturant concentrations or the removal of urea by dialysis we verified that the spectral center of mass values and the ellipticity in CD return to a value near to the initial one (data not show). Thus, the XIAP-BIR3 unfolding was fully reversible in the absence and in the presence of AVPI in these conditions.

***The XIAP-BIR3-AVPI complex is highly stable and not dissociable by pressure***

Studies on the effects of high pressure on biological systems have provided new information on protein-protein, protein-ligand, protein-nucleic acid interactions and virus assembly [49,50]. In addition, pressure is a physical agent and such as temperature, it is relevant in the study of protein unfolding and protein-protein interactions. The advantage on using hydrostatic pressure or temperature to study protein stability is due to the fact that they induce less drastic changes than chemical agents. Hence, these methods do not represent a chemical interference in the sample [50]. For this reason, we also investigated the effects of high pressure and temperature on the stability of XIAP-BIR3. After increasing the pressure to 3 kbar, the spectral center of mass was not significantly affected. This result confirms that XIAP-BIR3 is quite stable under high pressure (Figure 4A). When XIAP-BIR3 was bound to AVPI, the complex remained stable, and the increase in pressure did not induce dissociation of AVPI (Figure 4A).

### ***AVPI binding induced an increase in the thermal stability of the XIAP-BIR3 domain***

Differential scanning calorimetry (DSC) has been widely used to study folding-unfolding processes in proteins. In this work, we used DSC to investigate the thermal stability of XIAP-BIR3 and the effects of AVPI binding. Figure 4B shows the experimental thermograms for the free XIAP-BIR3 domain and for XIAP-BIR3 in the presence of AVPI (after baseline subtraction).

The thermogram of free XIAP-BIR3 shows a single peak for the thermally-induced unfolding process with the denaturation temperature ( $T_m$ ) centered at 68.9 °C, and a calorimetry enthalpy ( $\Delta H^{cal}$ ) of 25.6 kcal.mol<sup>-1</sup> (Figure 4B and Table 2). At a ligand:protein molar ratio of 3:1, AVPI binding considerably increases the thermal stability of XIAP-BIR3, as observed by the increases in both the  $T_m$  and the calorimetry enthalpy (Figure 4B). Upon AVPI binding, the  $T_m$  of XIAP-BIR3 increased 8.4 °C and the  $\Delta H^{cal}$  increased 58.7 kcal.mol<sup>-1</sup> (Table 2). These data confirm that the stability of XIAP-BIR3 increases after AVPI binding, as observed by fluorescence and CD using urea-induced denaturation. The unfolding enthalpy can not be obtained due to the protein aggregation.

### ***The effects of AVPI on the secondary structure of XIAP-BIR3***

To investigate possible changes in the secondary structure that could be associated with the stabilization of the XIAP-BIR3 domain, we used circular dichroism (CD). Although this domain also contains  $\beta$ -strand structures [11], the CD spectrum of XIAP-BIR3 shows characteristic of  $\alpha$ -helical structures with ellipticity minima at 209 and 224 nm. The binding

of AVPI promoted alterations on the rotation of the circularly polarized light at 210–225 nm, suggesting slight changes in the secondary structure (Figure 5A).

To better understand the effects of the AVPI binding on the XIAP-BIR3 structure and dynamics, we also used NMR and molecular dynamics simulations in the absence and in the presence of AVPI. In our molecular dynamics simulations data, the root mean square deviation (RMSD) measurements of the backbone atoms of XIAP-BIR3 and of the XIAP-BIR3/AVPI complex show that the system stabilized after 10 ns of simulation (Figure 7A). The changes in the CD spectra (Figure 5A) and mostly the molecular dynamics simulations data suggested that in the presence of AVPI there is a stabilization of hydrogen bonds (Figure 5B) and different secondary structures, mainly  $\beta$ -strands (Figure 5C).

### ***The effects of AVPI on the dynamics of XIAP-BIR3***

From analysis of the domain dynamics by NMR, we can verify that several resonances of XIAP-BIR3 are missing in the HSQC spectrum in the absence of the peptide (Figure 6A, in red) and this is typical of conformational exchange in a timescale of milli to microseconds. Extensive line broadening occurs when the conformational switch is in a regime of intermediate exchange, *i e*, the rate of exchange is approximately the chemical shift difference between each conformational sub-state ( $k_{ex} \sim \Delta\nu$ ). The regions involved in conformational exchange are the residues of the N- and C-terminal, besides of two loops (residues 276-280 and 308-314) [14]. In other words, these residues are in two or more conformational sub-states. The kind of motion means that the energy barriers for inter-conversion among these sub-states are higher than the thermal energy (kT) [51].

Upon addition of AVPI several new resonances appear as sharp lines in the spectra (Figure 6A, in black). This is a strong indication that AVPI led to the stabilization of one

of the conformational sub-states. This is the so-called conformational selection mechanism of binding [51]. Once AVPI is bound, the energy of this conformational sub-state is lowered and there is a population shift toward the lowest energy state. In addition, the new resonances that appear in the HSQC of the XIAP-BIR3/AVPI complex due to conformational selection do not exhibit decreased heteronuclear NOE indicating that they are rigid in the bound state (Figure 6C, in black), validating and corroborating the molecular dynamics simulation data (RMSF) (Figure 7B). The loop(293-299), however, displays negative (in red) or near zero (black or green dash circle) heteronuclear NOEs (Figure 6B and 6C), indicating local thermal motions that occur on a fast time scale with respect to molecular tumbling, what also corroborates the MDS data. These results confirm that the selection of some conformer(s) in solution involves dynamic restriction of the loop(276-280) and loop(309-314) and of the N- and C- terminal regions of the domain, and that the loop(293-299) remains highly flexible in the complex.

Adding structural details and corroborating NMR results, the root-mean-square fluctuations (RSMF) measurements showed that the flexibility of the same loops of the XIAP-BIR3 (residues 276-280 and 308-314) is reduced in the presence of AVPI, including the loop(276-280) that forms the binding site (Figure 7B and 7C). The terminal regions, that are highly flexible in the free protein, are also stabilized by AVPI binding (Figure 7B and 7C). The loop(293-299) remains flexible, as verified also by the NMR data. All these results strongly indicate that the AVPI binding promotes a large loss of conformational entropy.

## DISCUSSION

In the past few years, the structures of many apoptotic proteins have been solved by X-ray crystallography and NMR, and have been used in drug design [52]. However, despite the extensive knowledge of their structures, the mechanisms and thermodynamic stabilities of the interactions of these proteins with cellular targets are still poorly understood.

The XIAP-BIR3 domain is of particular interest as it is a promising target in cancer therapy. Its inhibition allows tumorigenic cells that overexpress XIAP to enter into apoptosis [53,54]. Recent studies have shown that overexpression of XIAP in some carcinomas predicts a worse prognosis [21] and plays an important role in the regulation of the apoptotic responses in cancer cells to both immune- and drug-mediated therapies [23,24,27,29]. In addition, downregulation or inhibition of XIAP may reverse immune and therapy resistance [23,27]. During apoptosis, the IAP-mediated inhibition of caspase is removed by the mitochondrial protein known as Smac or DIABLO [13,55], mainly by the interaction between the XIAP-BIR3 domain and the AVPI tetrapeptide from Smac [14]. Previous studies have shown that Smac peptides in the cytosol potentiate the tumor-suppressive activity of the chemotherapeutic agent *in vitro* and *in vivo* with minimal toxicity [29]. Many studies have attempted to explore this interaction [14,27] and to develop drugs that bind to IAPs promoting its inhibition [27-30]. The 3D structure of the complex between XIAP-BIR3 and AVPI-Smac is available [14]. Understanding the dynamics and stability of this complex and characterizing the AVPI-binding parameters will improve the understanding of the XIAP-BIR3 inhibition and may help in the development of new strategies for cancer treatment.

A fully thermodynamic evaluation (in terms of the enthalpy and entropy components besides heat capacity variation) of the interaction between AVPI and XIAP-BIR3 was here carried out to assist the understanding of XIAP-BIR3 inhibition. It is crucial to correlate the

thermodynamic and structural data to design more efficient drugs [35,56-58]. Our data show that XIAP-BIR3/AVPI interaction is both enthalpically and entropically favored (Table 1) with a negative variation in heat capacity ( $\Delta C_p = -157.13 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ). Changes in heat capacity are not restricted to the interactions between non-polar groups in water [48]. However, the fact that the binding is entropically driven (Table 1), even with loss of conformational entropy (Figure 6 and 7), indicates that hydrophobic interactions play an important role in both the interaction and protein stabilization. Thus, we can conclude that the desolvation of the ligand and of the binding site, mainly driven by the enhanced water entropy, is a key-step in the AVPI binding to XIAP-BIR3.

It is well known that protein thermal stability is modified by ligand binding due to the coupling between two mutual processes under equilibrium: binding and unfolding [59-62]. The additional binding free energy is responsible for shifting the unfolding temperature, and it could include or not contributions from conformational changes. The information about changes in structure and flexibility associated to molecular recognition is important to the understanding of the thermodynamics of interaction as well as for drug discovery. Here we show that the binding of the AVPI tetrapeptide leads to the stabilization of BIR3 against urea- and temperature-induced unfolding (Table 2). However, it is important to understand if this stabilization results from changes in the conformation of XIAP-BIR3. The small change in the CD spectra (Figure 5A) could be related to the formation of a short anti-parallel  $\beta$ -strand within the three-stranded  $\beta$ -sheet of XIAP-BIR3 upon AVPI binding [15] but it could also be due to the stabilization of one or more pre-existent conformational states, as verified by NMR analyses (Figure 6A). In addition, our results of molecular dynamics simulations of the XIAP domain and of the XIAP-BIR3/AVPI complex (Figure 5C) indicate that  $\beta$ -strands structures

are stabilized due to AVPI binding. Thus, the binding of AVPI appears to select more rigid conformer(s) and with more stable  $\beta$ -strand structures.

The two main forces that stabilize protein structure are the hydrophobic effect and hydrogen bonding, and the main destabilizing force is the loss of conformational entropy [63]. Molecular dynamics simulations data indicate that the network of hydrogen bonds in XIAP-BIR3 is slightly stabilized by AVPI (Figure 5B) and some of these likely involve  $\beta$ -strands (Figure 5C). By measuring the H-bond coupling constants by NMR, other authors have also shown that the binding of ligands can affect the protein hydrogen-bonding networks [64]. For instance, ligand binding to the SH3 domain induces strain in the hydrogen bonds that buttress the SH3/ligand binding surface, and small changes in the lengths of hydrogen bonds are propagated throughout the domain. Thus, the high increase in the heat involved in XIAP-BIR3 denaturation is due to the positive variation of heat capacity of unfolding (Figure 4B and Table 2), but also can have a contribution of hydrogen bonds stabilization that were promoted by the AVPI binding.

Changes in flexibility upon ligand binding, mutation, or changes in sample conditions can be interpreted in terms of contributions to conformational entropy. Backbone and side chain flexibility can either decrease or increase upon ligand binding [65]. Decreases are often associated with “enthalpy-entropy compensation” and “induced fit or conformational selection” binding, whereas increases in conformational entropy can contribute to stabilization of complexes. Liu *et al.* [14] observed that two loops of the XIAP-BIR3 domain, which could not be structurally characterized by NMR in the free protein, became well-defined upon AVPI binding. Remarkably, a single mutation (G306E) that stabilizes these loops promotes changes in the ligand affinity [66]. In this case, there is a loss of favored entropy to the interaction that is related to the reduction of hydrophobic contacts. Our molecular dynamics simulations data

of the domain and of the complex (Figure 7) also suggested that the binding of AVPI reduces the conformational flexibility of the loop(276-280) and loop(309-314) of the domain (Figure 7B and 7C), in which one of them is involved in the interaction. The free XIAP-BIR3 presents the N- and C-terminals highly disordered and flexible as verified by molecular dynamics simulations (Figure 7B), which are stabilized by AVPI binding (Figure 7B and 7C). The heteronuclear NOE data corroborate the stabilization of the XIAP-BIR3 in the ns-ps scale (Figure 6C). All these data indicate a significant loss of conformational entropy in the XIAP-BIR3 domain associated to the AVPI binding. Variations in conformational entropy and heat capacity may both be important in stabilizing the folded structures of proteins [65] and also are important factors involved in the XIAP-BIR3 stabilization.

It is already well known from fundamental thermodynamics that changes in flexibility upon binding modulate conformational entropy, which contributes significantly to  $\Delta C_p$  [67]. Both ps-ns and  $\mu$ s-ms timescale fluctuations, which can be probed by relaxation experiments, affect  $\Delta C_p$ . Furthermore, restrictions of soft vibrational modes characterized by force constants weak enough to be affected by ligand binding have been suggested to account for up to 20% of the total  $\Delta C_p$  [67]. Moreover, the redistribution of the native state ensemble induced by ligand binding appears to be a significant source of  $\Delta C_p$ . A reduction of the population/density of microstates will contribute to increased negative  $\Delta C_p$  [68,69]. Our results show that the peptide binding involves the conformational selection process (Figure 6A) with reduction of domain flexibility (Figure 6 and 7). Therefore, our calorimetric data, showing a negative  $\Delta C_p$  ( $-157.3 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) upon AVPI binding seem to be strongly associated to protein dynamics, besides the contribution of hydrophobic interaction. It is interesting to note that even when hydrophobic interaction is preponderant (AVPI is hydrophobic) the conformational entropy is important for the reduction of  $\Delta C_p$  and for the

binding of hydrophobic solutes. The number of conformers of XIAP-BIR3/AVPI complex is most probably smaller than that for the free protein, resulting in a decrease in the entropic component of the free energy upon AVPI binding. Therefore, the interaction between XIAP-BIR3 and AVPI is significantly compromised by the entropic free energy component, which restricts the number of conformers.

The structural rigidity and flexibility of proteins are critically balanced after folding, and the binding of ligands may perturb the interplay between the entropic and enthalpic energetic contributions [70]. In the presence of optimal geometrical complementarity of the interacting species, the residual restriction of protein flexibility on ligand binding could dictate unfavorable conditions for the stability of the complex. An extensive exchange between enthalpy and entropy has been indicated for the protein–protein interaction process [71]. The changes in the conformational energy ( $\Delta G_{\text{conf}}$ ) of the complex obtained from the urea denaturation experiments ( $\Delta\Delta G = - 1.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) show that XIAP-BIR3 is highly stabilized and that this stabilization is significantly important to the AVPI affinity (Table 2). Although the variation on conformational entropy ( $\Delta S_{\text{conf}}$ ) is unfavorable (Figure 6 and 7), the variation on binding entropy ( $\Delta S_{\text{bind}}$ ) is highly favorable (Table 1). Thus, likely the high variation of hydration entropy ( $\Delta S_{\text{hydr}}$ ) that is associated to the hydrophobic contacts is essential to binding affinity and stabilization, what indicates that the negative variation of heat capacity that occurs on binding to AVPI is also strongly associated to the hydrophobic effect. In conclusion, although the hydrogen bonds are also stabilized involving dynamic restriction, our data strongly suggest that the XIAP-BIR3 domain stabilization by the tetrapeptide AVPI is also strongly favored by hydrophobic factors.

While the enthalpy-entropy compensation is critical for the optimization of affinity [35,57], most drug-design strategies focus solely on promoting favorable intermolecular

interactions. However, protein-drug associations often entail an entropic penalty, generally arising from induced fit, compromising the affinity. Recently, studies using NMR relaxation methods showed that when different peptides bind to calmodulin, the apparent change in the corresponding conformational entropy is linearly related to the change in the overall binding entropy [72]. These results show that changes in the protein conformational entropy can significantly contribute to the free energy of protein-ligand association. In addition, other authors have demonstrated that induced disorder in protein-ligand complexes can provide an interesting drug-design strategy [73]. The loss of conformational entropy of the XIAP-BIR3 domain, which arises from conformational selection, and from reduced flexibility mainly of the two loops and of terminal regions related to binding, is a crucial unfavorable factor to affinity of AVPI and seems to be an important aspect that is possible to play with in drug design procedures.

In summary, this study provides the first thermodynamics analysis of the unfolding of the XIAP-BIR3 domain and the XIAP-BIR3/AVPI complex. This simple model of XIAP-BIR3 interacting with AVPI that we have used in the present work has interesting features because it addresses the correlation among the changes in protein stability promoted by ligand interaction and the conformational selection process, dynamic restriction and hydrophobic effect. We verified that the stabilization of the XIAP-BIR3 domain by the AVPI interaction is resulted from the hydrophobic effect (entropy driven) and stabilization of hydrogen bonds (enthalpy driven) that was partially compensated by a loss of conformational entropy, which was associated to the selection of pre-existent conformer(s) (ms- $\mu$ s scale) and flexibility reduction (ns-ps scale). These data provide important additional information on the interaction between Smac/DIABLO and IAPs and help in understanding the nature of XIAP-BIR3 inhibition. This information may prove important in the design of anti-cancer drugs.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Emerson R. Gonçalves for excellent technical assistance. We also would like to thank Dr. Yigong Shi for kindly providing the plasmid with the XIAP-BIR3 sequence.

## REFERENCES

1. H. Steller, Mechanisms and genes of cellular suicide, *Science* 267 (1995) 1445-1449.
2. G.S. Salvesen and C.S. Duckett, IAPs proteins: blocking the road to death's door, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 401-410.
3. M. JacobsonWeil and M. Raff, Programmed cell death in animal development, *Cell* 88 (1997) 347-354.
4. Q.L. Deveraux and J.C. Reed, IAP family proteins-suppressors of apoptosis, *Genes Dev.* 13 (1999) 239-252.
5. S.W. Fesik, Insights into programmed cell death through structural biology, *Cell* 103 (2000) 273-282.
6. R. Takahashi, Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G.S. Salvesen and J.C. Reed, A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7787-7790.
7. S.J. Riedl, M. Renatus, R. Schwarzenbacher, Q. Zhou, C. Sun, S.W. Fesik, R.C. Liddington and G.S. Salvesen, Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP, *Cell* 104 2001 791-800.
8. J. Chai, E. Shiozaki, S.M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E.S. Alnemri and Y. Shi, Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP, *Cell* 104 (2001) 769-780.
9. Y. Huang, Y. C. Park, R.L. Rich, D. Segal, D. G. Myszka and H. Wu, Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain, *Cell* 104 (2001) 781-790.
10. Q.L. Deveraux, E. L., H.R. Stennicke, K. Welsh, G.S. Salvesen and J.C. Reed, Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases, *EMBO J.* 18 (1999) 5242-5251.

11. C. Sun, M. Cai, R.P. Meadows, N. Xu, A.H. Gunasekera, J. Herrmann, J.C. Wu, S.W. Fesik, NMR structure and mutagenesis of the third BIR domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33777-33781.
12. S.M. Srinivasula, R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, J.C. Shiozaki, R.A. Lee, P.D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi and E.S. Alnemri, A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis, *Nature* 410 (2001) 112-116.
13. J. Chai, C. Du, J.W. Wu, S. Kyin, X. Wang and Y. Shi, Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO, *Nature* 406 (2000) 855-862.
14. Z. Liu, C. Sun, E.T. Olejniczak, R.P. Meadows, S.F. Betz, T. Oost, J. Herrmann, J.C. Wu and S.W. Fesik, Structural basis of binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain, *Nature* 408 (2000) 1004-1008.
15. G. Wu, J. Chai, T.L. Suber, J. Wu, C. Du, X. Wang and Y. Shi, Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO, *Nature* 408 (2000) 1008-1012.
16. S.M. Srinivasula, P. Datta, X.J. Fan, T. Fernandes-Alnemri, Z. Huang and E.S. Alnemri, Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 36152-36157.
17. J.W. Wu, A.E. Cocina, J. Chai, B.A. Hay and Y. Shi, Structural analysis of a functional DIAP1 fragment bound to grim and hid peptides, *Mol. Cell* 8 (2001) 95-104.
18. G. Ambrosini, C. Adida and D.C. Altieri, A novel anti-apoptosis gene, surviving, expresses in cancer and lymphoma, *Nature Med.* 3 (1997) 917-217.
19. L. Tamm, S.M. Kornblau, H. Segall, S. Krajewski, K. Welsh, S. Kitada, D.A. Scudiero, G. Tudor, Y.H. Qui, A. Monks, M. Andreeff and J.C. Reed, Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1796-1803.

20. D. Vucic, H.R. Stennicke, M.T. Pisabarro, G.S. Salvesen and V.M. Dixit, ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas, *Curr. Biol.* 10 (2000) 1359-1366.
21. Y. Mizutani, H. Nakanishi, Y.N. Li, H. Matsubara, K. Yamamoto, N. Sato, T. Nakamura, K. Mikami, N. Takaha, O. Ukimura, A. Kawauchi, N. Nonomura, B. Bonavida and T. Miki, Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis, *Int. J. Oncol.* 30(4) (2007) 919-925.
22. M. Holcik, C. Yeh, R.G. Korneluk and T. Chow, Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death, *Oncogene* 19 (2000) 4174-4177.
23. H. Sasaki, Y. Sheng, F. Kotsuji and B.K. Tsang, Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells, *Cancer Res.* 60 (2000) 5659-5666.
24. C.P. Ng and B. Bonavida, X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation: Sensitization by overexpression of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pl (Smac/DIABLO), *Mol Cancer Ther.* 1 (2002) 1051-1058.
25. Y. Hu, G. Cherton-Horvat, V. Dragowska, S. Baird, R.G. Korneluk, J.P. Durkin, L.D. Mayer and E.C. LaCasse, Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cells in vitro and in vivo, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 2826-2836.
26. Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P.P. Roller, K. Krajewski, N.G. Saito, J.A. Stuckey and S. Wang, Development and optimization of a binding

- assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization, *Anal. Biochem.* 332 (2004) 261-273.
27. T.K. Oost, C. Sun, R.C. Armstrong, A. Al-Assaad, S.F. Betz, T.L. Deckwerth, H. Ding, S.W. Elmore, R.P. Meadows, E.T. Olejniczak, A. Oleksijew, T. Oltersdorf, S.H. Rosenberg, A.R. Shoemaker, K.J. Tomaselli, H. Zou and S.W. Fesik, Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 4417-4426.
28. S. Fulda, W. Wick, M. Weller and K.M. Debatin, Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo, *Nat. Med.* 8 (2002) 808-815.
29. C.R. Arnt, M.V. Chiorean, M.P. Heldebrant, G.J. Gores and S.H. Kaufmann, Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ, *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) 44236-44243.
30. L. Yang, T. Mashima, S. Sato, M. Mochizuki, H. Sakamoto, T. Yamori, T. Oh-hara and T. Tsuruo, Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: Therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide, *Cancer Res.* 63 (2003) 831-837.
31. H. Sun, J. A. Stuckey, Z. Nikolovska-coleska, D. Qin, J. L. Meagher, S. Qiu, J. Lu, C. Yang, N. G. Saito, and S. Wang, Structure-based design, synthesis, evaluation, and crystallographic studies of conformationally constrained smac mimetics as inhibitors of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), *J. Med. Chem.* 51 (2008) 7169-7180.
32. R.B. Gonçalves, D. Sanches, T.L. Souza, J.L. Silva and A. C. Oliveira, The proapoptotic protein Smac/DIABLO dimer has the highest stability as measured by pressure and urea denaturation, *Biochemistry* 47(12) (2008) 3832-3841.

33. S.M. Lima, A.C. Vaz, T.L. Souza, D.S. Peabody, J.L. Silva and A. C. Oliveira, Dissecting the role of protein-protein and protein-nucleic acid interactions in MS2 bacteriophage stability, *FEBS J.* 273(7) (2006) 1463-1475.
34. E. Freire, The thermodynamic linkage between protein structure, stability, and function, *Methods Mol. Biol.* 168 (2001) 37-68.
35. T.S.G. Olsson, M.A. Williams, W.R. Pitt and J.E. Ladbury, The thermodynamics of protein–ligand interaction and solvation: insights for ligand design, *J. Mol. Biol.* 384 (2008) 1002-1017.
36. E.A.Jr. Ribeiro and C.H. Ramos, Circular permutation and deletion studies of myoglobin indicate that the correct position of its N-terminus is required for native stability and solubility but not for native-like heme binding and folding, *Biochemistry* 44 (2005) 4699-4709.
37. I. Cherny, M. Overgaard, J. Borch, Y. Bram, K. Gerdes and E. Gazit, Structural and thermodynamic characterization of the *Escherichia coli* RelBE toxin-antitoxin system: indication for a functional role of differential stability, *Biochemistry* 46(43) (2007) 12152-12163.
38. N.C. Pace, Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Methods Enzymol.* 131 (1986) 266-280.
39. G. Weber, *Protein Interactions*, Chapman and Hall, New York, 1992.
40. F. Delaglio, S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer and A. Bax, NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J Biomol NMR.* 6(3) (1995) 277-93.
41. B. A. Johnson and R. A. Blevins, NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J. Biomol. NMR* 4 (1994) 603–614.

42. L.B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel and E. Lindahl, "GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation", *J. Chem. Theory Comput.* 4(2) (2008) 435-447.
43. H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren and J. Hermans, Interaction model for water in relation to protein hydration, In: B. Pullman, Editor, *Intermolecular Forces*, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, The Netherlands, 1981.
44. H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A.D. Nola and J. R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690.
45. L.B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen and J.G. Fraaije, LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comput. Chem.* 18 (1997) 1463–1472.
46. W.F. van Gunsteren, S.R., Billeter, A.A. Eising, P.H. Hünenberger, P. Krüger, A.E. Mark, W.R.P. Scott and I.G. Tironi, *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide*, Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, Switzerland (1996).
47. S. Leavitt and E. Freire, Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry, *Current Opinion in Structural Biology* 11(5) (2001) 560-566.
48. A. Cooper, Heat capacity effects in protein folding and ligand binding: a re-evaluation of the role of water in bimolecular thermodynamics, *Biophysical Chemistry* 115 (2005) 80-97.
49. J.L. Silva, D. Foguel, A.T. Da Poian and P. E. Jr. Prevelige, The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages, *Current Opinion Structure Biology* 6 (1996) 166-175.
50. J.L. Silva, D. Foguel, and C.A. Royer, Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure, *Trends Biochem. Sci.* 26 (2001) 612-618.
51. A.P. Valente, C.A. Miyamoto and F.C. Almeida, Implications of protein conformational diversity for binding and development of new biological active compounds, *Current Medicinal Chemistry* 13 (2006) 3697-3703.

52. T.L. Blundell, B.L. Sibanda, R.W. Montalva, S. Brewerton, V. Chelliah, C.L. Worth, N. J. Harmer, O. Davies and D. Burke, Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery, *Phil. Trans. R. Soc. B* 361 (2006) 413-423.
53. E.C. Lacasse, S. Baird, R.G. Korneluck and A.E. Mackenzie, The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer, *Oncogene* 17 (1998) 3247-3259.
54. B. Nachmias, Y. Ashhab and D. Ben-Yehuda, The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer, *Semin. Cancer. Biol.* 14 (2004) 231-243.
55. A. Verhagen, P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson and D.L. Vaux, Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing inhibitor of apoptosis (IAP) proteins, *Cell* 102 (2000) 43-53.
56. P.C. Weber and F.R. Salemme, Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions, *Current Opinion Structural Biology* 13 (2003) 115-121.
57. V. Lafont, A.A. Armstrong, H. Ohtaka, Y. Kiso, M. Amzel and E. Freire, Compensating Enthalpic and Entropic Changes Hinder Binding Affinity Optimization, *Chem. Biol. Drug. Design* 69 (2007) 413-422.
58. G.M. Whitesides and V.M. Krishnamurthy, Designing ligands to bind proteins, *Quarterly Reviews of Biophysics* 38 (2005) 385-395.
59. M.S. Celej, G.G. Montich and G.D. Fidelio, Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility, *Protein Science* 12 (2003) 1496–1506.
60. H. Fukada, J.M. Sturtevant and F.A. Quioco, Thermodynamics of the binding of L-arabinose and of D-galactose to the L-arabinose-binding protein of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 258(21) (1983) 13193-8.

61. A. Shrake and P.D. Ross, Ligand-induced biphasic protein denaturation, *J. Biol. Chem.* 265(9) (1990) 5055-9.
62. A. Shrake and P.D. Ross, Origins and consequences of ligand-induced multiphasic thermal protein denaturation, *Biopolymers* 32(8) (1992) 925-40.
63. C.N. Pace, Energetics of protein hydrogen bonds, *Nature Structural & Molecular Biology* 16(7) (2009) 681-682.
64. F. Cordier, C. Wang, S. Grzesiek and L.K. Nicholson, Ligand-induced strain in hydrogen bounds of the c-Src SH3 domain detected by NMR, *J. Mol. Biol.* 304 (2000) 497-505.
65. M.J. Stone, NMR relaxation studies of the role of conformational entropy in protein stability and ligand binding, *Acc Chem Res.* 34(5) (2001) 379-388.
66. C.D. Moore, H. Wu, B. Bolanos, S. Bergqvist, A. Brooun, T. Pauly and D. Nowlin, Structural and biophysical characterization of XIAP BIR3 G30E mutant: insights in protein dynamics and application for fragment-based drug design, *Chem Biol Drug Des* 74 (2009) 212-223.
67. J.M. Sturtevant, Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74(6) (1977) 2236-40.
68. M. R. Eftink, A. C. Anusiem and R. L. Biltonen, Enthalpy-entropy compensation and heat capacity changes for protein-ligand interactions: general thermodynamic models and data for the binding of nucleotides to ribonuclease A, *Biochemistry* 22(16) (1983) 3884-3896.
69. C. Wang, N. H. Pawley, L. K. Nicholson, The role of backbone motions in ligand binding to the c-Src SH3 domain. *J. Mol. Biol.* 313 (2001) 873-887.
70. L. Zidek, M.V. Novotny and M.J. Stone, Increased protein backbone conformational entropy upon hydrophobic ligand binding, *Nature Struct. Biol.* 6 (1999) 1118–1121.
71. A.L. Lee, S.A. Kinnear and A.J. Wand, Redistribution and loss of side chain entropy upon formation of a calmodulin–peptide complex, *Nature Struct. Biol.* 7 (2000) 72–77.

72. K.K. Frederick, M.S. Marlow, K.G. Valentine and A.J. Wand, Conformational entropy in molecular recognition by proteins, *Nature* 448 (2007) 325-330.
73. A. Crespo and A. Fernandez, Induced disorder in protein-ligand complexes as a drug-design strategy, *Molecular Pharmaceutics* 5(3) (2008) 430-437.

## TABLES

**TABLE 1 – Binding parameters for the XIAP-BIR3/AVPI interaction estimated from ITC data.**

Parameter	Temperature		
	10 °C	25 °C	37 °C
<b>n</b>	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
<b>K (10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>)</b>	4.2 ± 0.9	7.8 ± 1.2	8.5 ± 0.4
<b>ΔH (kcal · mol<sup>-1</sup>)</b>	-1.2 ± 0.1	-3.1 ± 0.1	-5.5 ± 0.1
<b>ΔS (cal · mol<sup>-1</sup>)</b>	26.6 ± 0.8	19.1 ± 1.3	10.7 ± 0.7
<b>ΔG (kcal · mol<sup>-1</sup>)</b>	-8.5	-8.8	-8.9

The data are the mean values of three independent experiments ± standard deviations.

**TABLE 2 – Thermodynamic parameters of the unfolding of the XIAP-BIR3 domain in the absence and presence of AVPI.**

	<b>T<sub>m</sub></b> (°C)	<b>Q/mol</b> (T <sub>m</sub> ) (kcal/mol)	<b>U<sub>1/2</sub> Flu</b> (M)	<b>U<sub>1/2</sub> CD</b> (M)	<b>ΔG°<sub>25°C</sub></b> (kcal/mol)
<b>XIAP-BIR3</b>	68.9 ± 0.1	25.7 ± 2.2	6.5	5.8	4.1
<b>XIAP-BIR3/AVPI</b>	77.3 ± 0.1	84.4 ± 3.4	7.6	6.9	5.2

The enthalpy values were obtained from differential scanning calorimetry analysis. The Q/mol (heat released by mol) utilized was measured at the T<sub>m</sub> at which the ΔG is zero. [U]<sub>1/2</sub> corresponds to the concentrations of urea that cause 50% of the denaturation of the XIAP-BIR3 as verified by fluorescence (Flu) and circular dichroism (CD). The Gibbs free energies (ΔG°) were calculated from the urea denaturation data by using the equation (2).

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1 – Calorimetric titration of XIAP-BIR3 with the tetrapeptide AVPI.** (A) The heat flux profile associated with the injections of the ligand to the calorimetric cell at 25 °C. The arrow indicates where the volume of titration was increased. (B) The binding isotherm at 25 °C. The measurements were also carried out at 10 °C and 37 °C.

**FIGURE 2 – Fluorescence analysis of XIAP-BIR3 and AVPI interaction complex.** (A) Normalized fluorescence spectra of the XIAP-BIR3 domain and the XIAP-BIR3/AVPI complex. (B) The spectral center of mass changes after the concentration of the tetrapeptide increases. Buffer: 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 1 mM DTT, pH 7.4.

**FIGURE 3 – The conformational stability of the XIAP-BIR3 domain towards urea.** (A) The BIR3 domain and the BIR3-AVPI complex were incubated overnight at room temperature in the presence of the indicated concentrations of urea. To analyze the tertiary structure, we monitored the spectral center of mass changes in the fluorescence data. The secondary structure was investigated using the raw ellipticity at 228 nm for the urea experiments. (B) Plot of  $RT \ln[\alpha/(1-\alpha)]$  versus urea concentration. The protein and AVPI concentrations used were 10  $\mu$ M and 30  $\mu$ M, respectively.

**FIGURE 4 – The conformational stability of the XIAP-BIR3 domain towards physical agents.** (A) At room temperature, significant changes in the XIAP-BIR3 structure were not promoted at pressures below 3.1 kbar. The incubation time at each pressure was 10 min. All data points represent the average and standard deviation of three experiments. The protein

concentration was 10  $\mu\text{M}$ . (B) Thermal unfolding curves of XIAP-BIR3 in the presence and absence of AVPI. The experimental thermograms of XIAP-BIR3 are shown in the absence (closed circles) and in the presence (open circles) of AVPI. In both cases, the solid line represents the best fit. For all DSC experiments, the protein concentration was 50  $\mu\text{M}$ , and the AVPI concentration was 150  $\mu\text{M}$ .

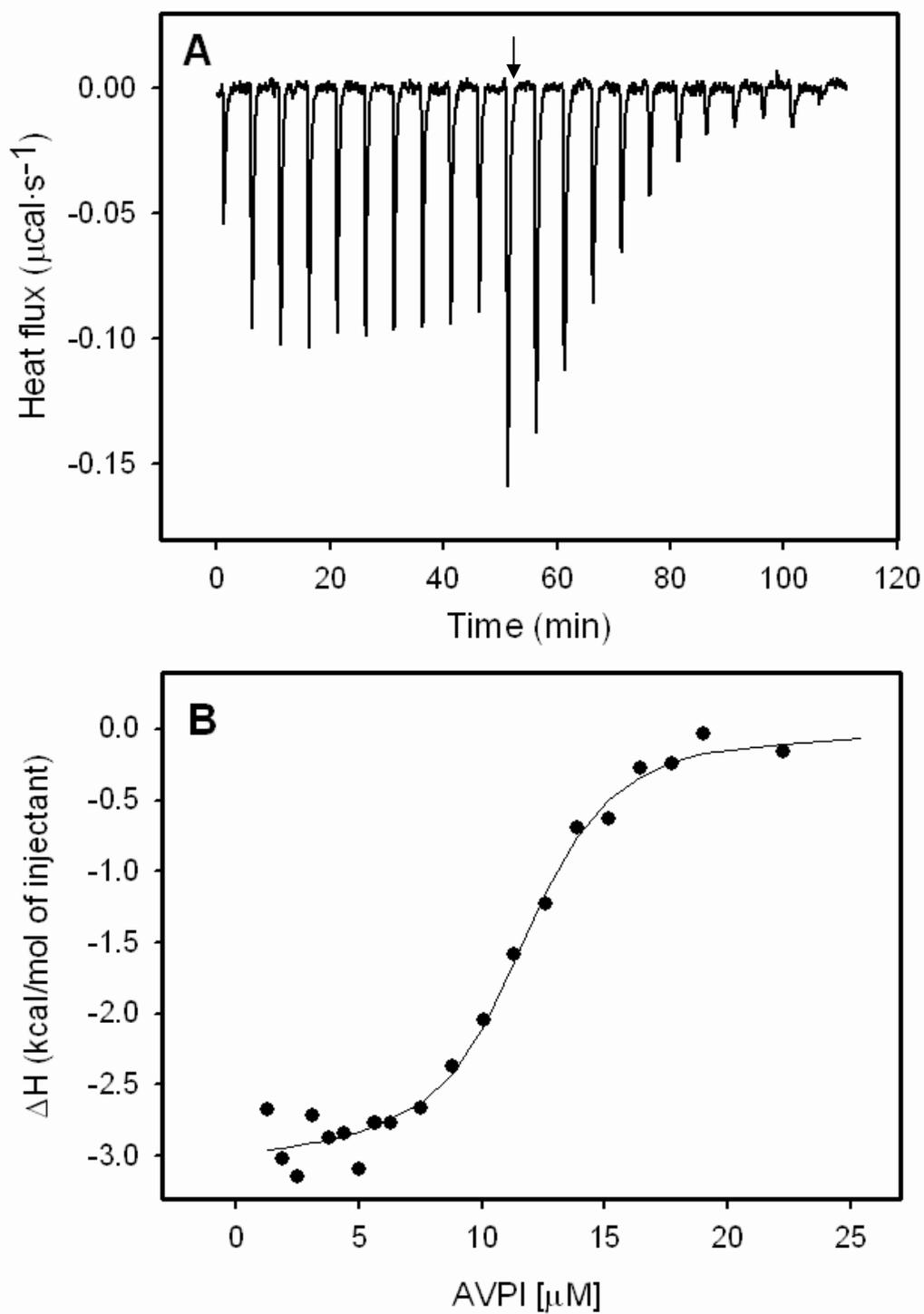
**FIGURE 5 – The secondary structure of the XIAP-BIR3 domain and of the XIAP-BIR3/AVPI complex, as verified by circular dichroism and by molecular dynamics simulations.** (A) The CD spectra of XIAP-BIR3 and the XIAP-BIR3/AVPI complex. The concentration of the domain was 150  $\mu\text{M}$ . (B) The hydrogen-bonding profile of the XIAP-BIR3 domain and of the XIAP-BIR3/AVPI complex during the period between 10 and 20 ns of simulation. (C) The types of secondary structure are color-coded as reported in the figure. The simulations were generated from the structures deposited in the PDB. PDB ID: 1f9x (XIAP-BIR3 domain) and 1g3f (XIAP-BIR3/AVPI complex) [11, 14].

**FIGURE 6 – Analysis of XIAP-BIR3/AVPI interaction using nuclear magnetic resonance.** (A)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of the XIAP-BIR3/AVPI complex (in black) superimposed on the XIAP-BIR3 free (in red) showing the appearance of new peaks (highlighted in black circles) that were not observed for this free protein at 15  $^\circ\text{C}$ . (B) and (C)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Heteronuclear NOE of XIAP-BIR3 free and of the XIAP-BIR3/AVPI complex at 15  $^\circ\text{C}$ , respectively. The regions in fast thermal dynamics, where heteronuclear NOE is negative or close to zero are showed in red (negative peaks) or highlighted by dashed circles (peak is absent because NOE are close to zero). Residues of the backbone are in black dashed circles while of the side chains of glutamine and asparagine are in green dashed circles. The residues

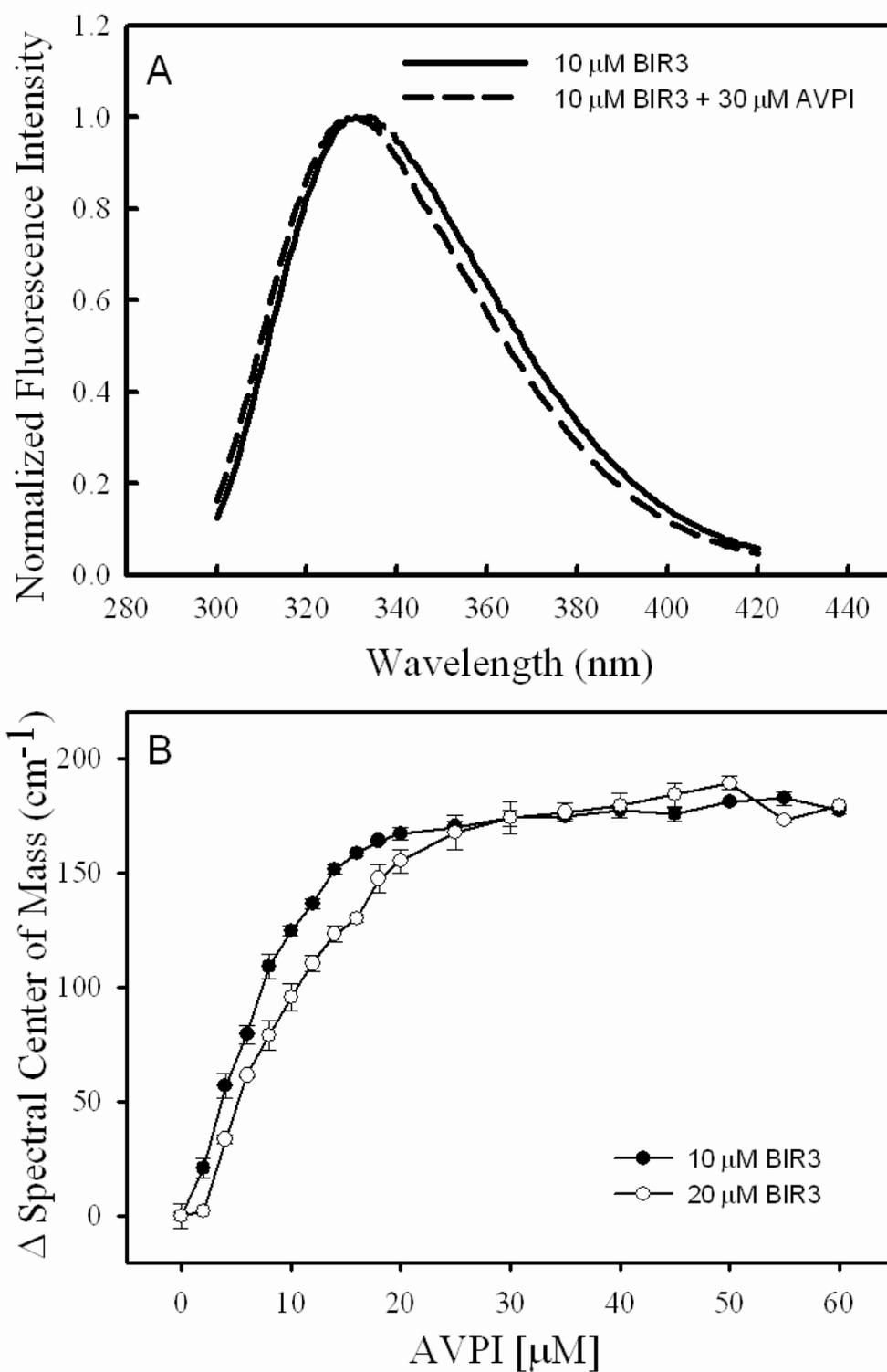
D309 (representing the loop(309-314)) that is rigid after AVPI binding and D296/K297 that remain flexible (representing the loop(293-299)) are underlined.

**FIGURE 7 – Molecular dynamics simulations reveal the effects of AVPI binding to the XIAP-BIR3 domain dynamics.** (A) Root Mean Square Deviation (RMSD) of the backbone atoms of XIAP-BIR3 and of the XIAP-BIR3/AVPI complex. (B) Root-mean-square fluctuations (RMSF) of the XIAP-BIR3 and the changes promoted by the binding of AVPI. The loops stabilized are surrounded in red, and the loop no stabilized in black. (C) Structure of XIAP-BIR3/AVPI complex (PDB ID: 1g3f). The residues of the XIAP-BIR3 involved in AVPI interaction are colored in red and the loops and terminal regions that are stabilized are represented in blue. The tetrapeptide AVPI is represented in yellow and the loop that does not stabilized in cyan.

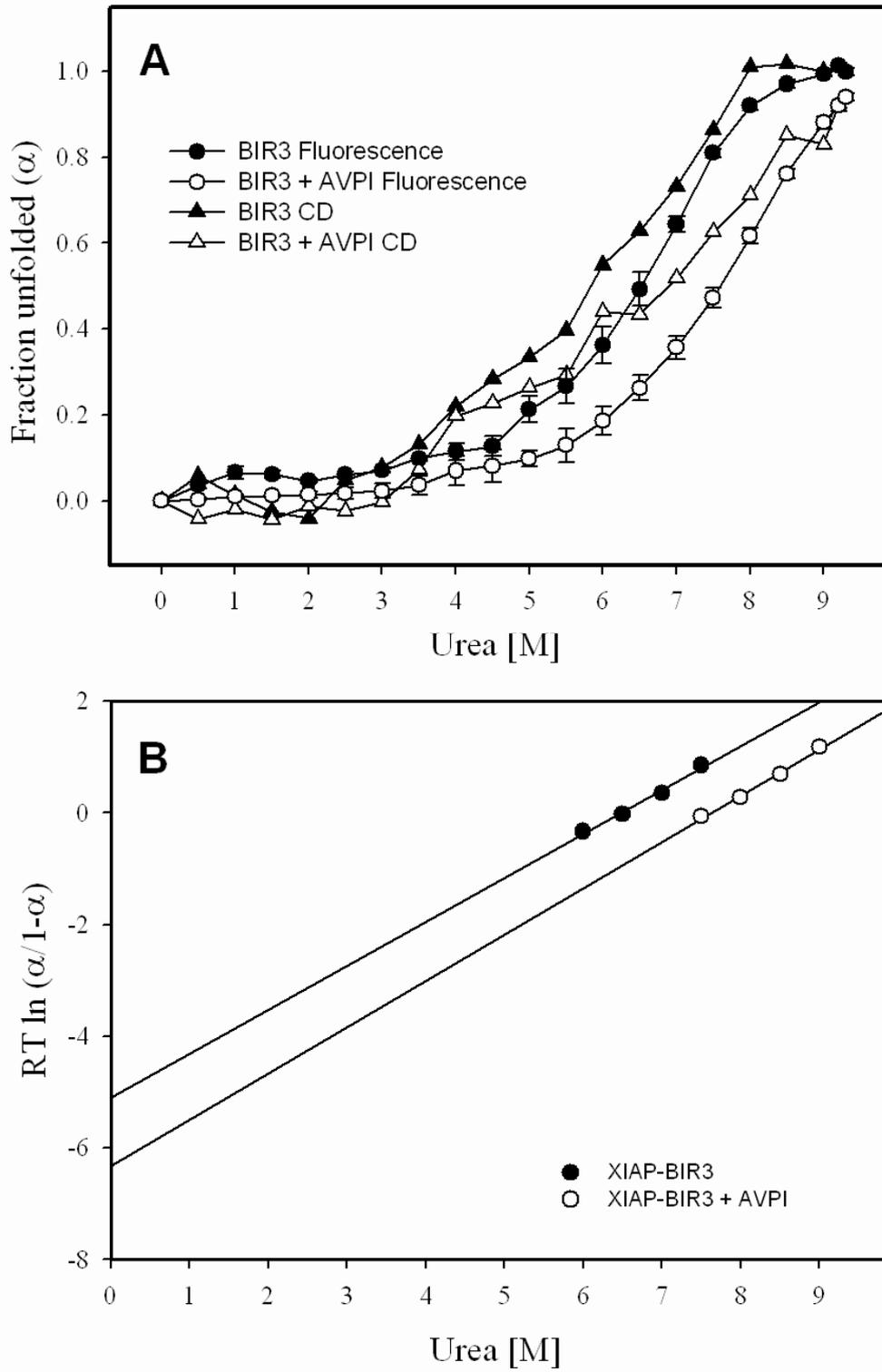
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

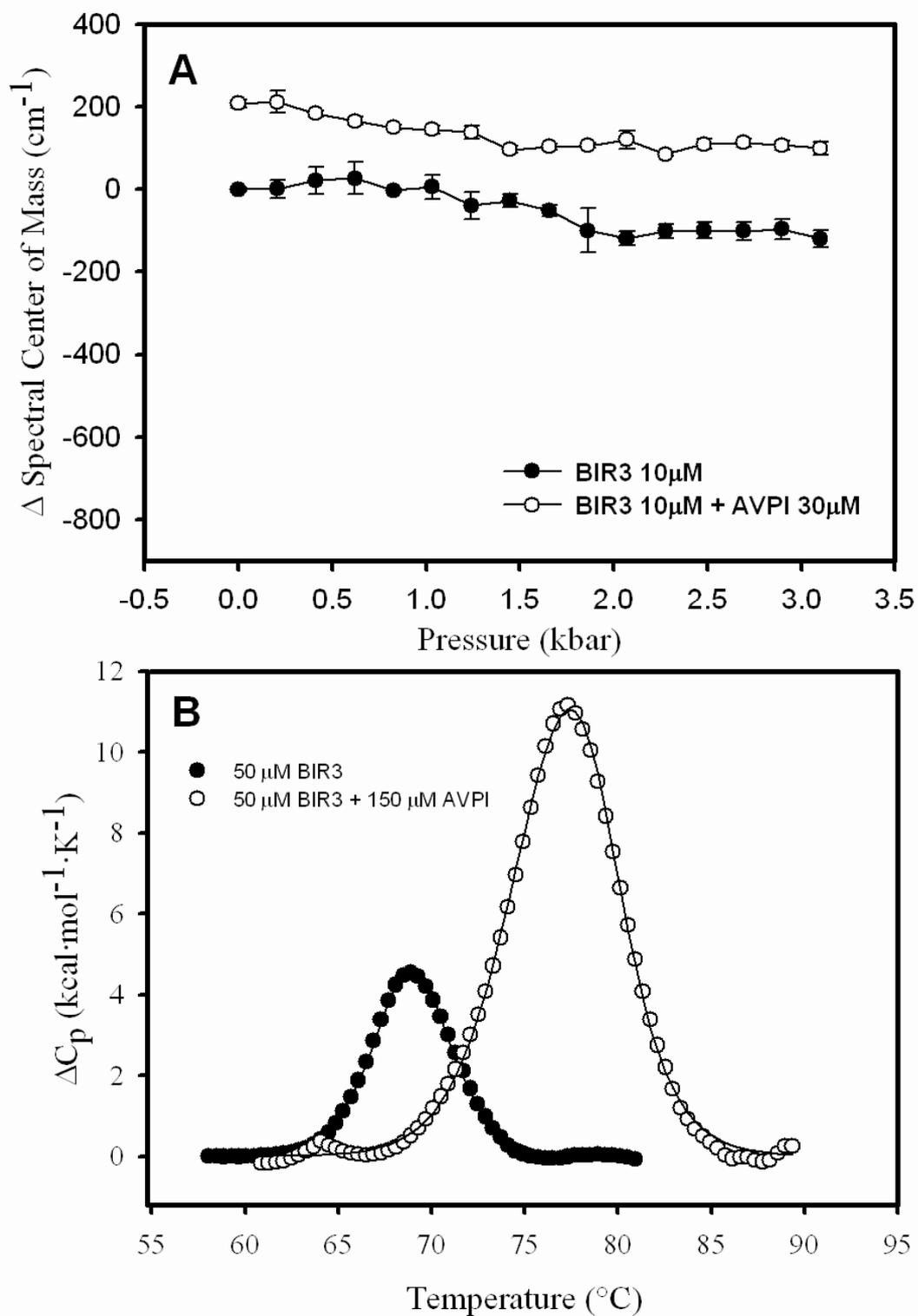


Figure 5

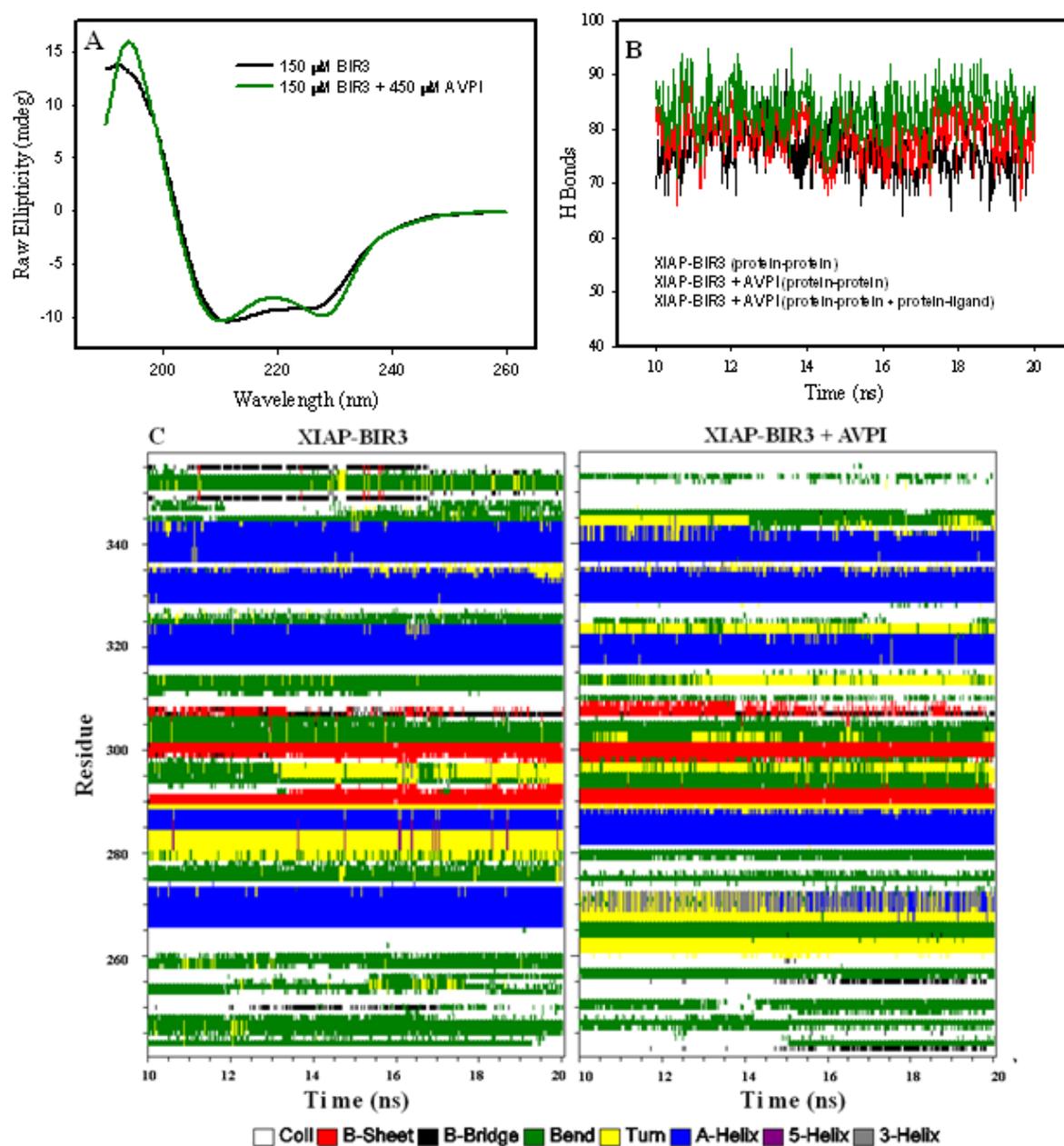


Figure 6

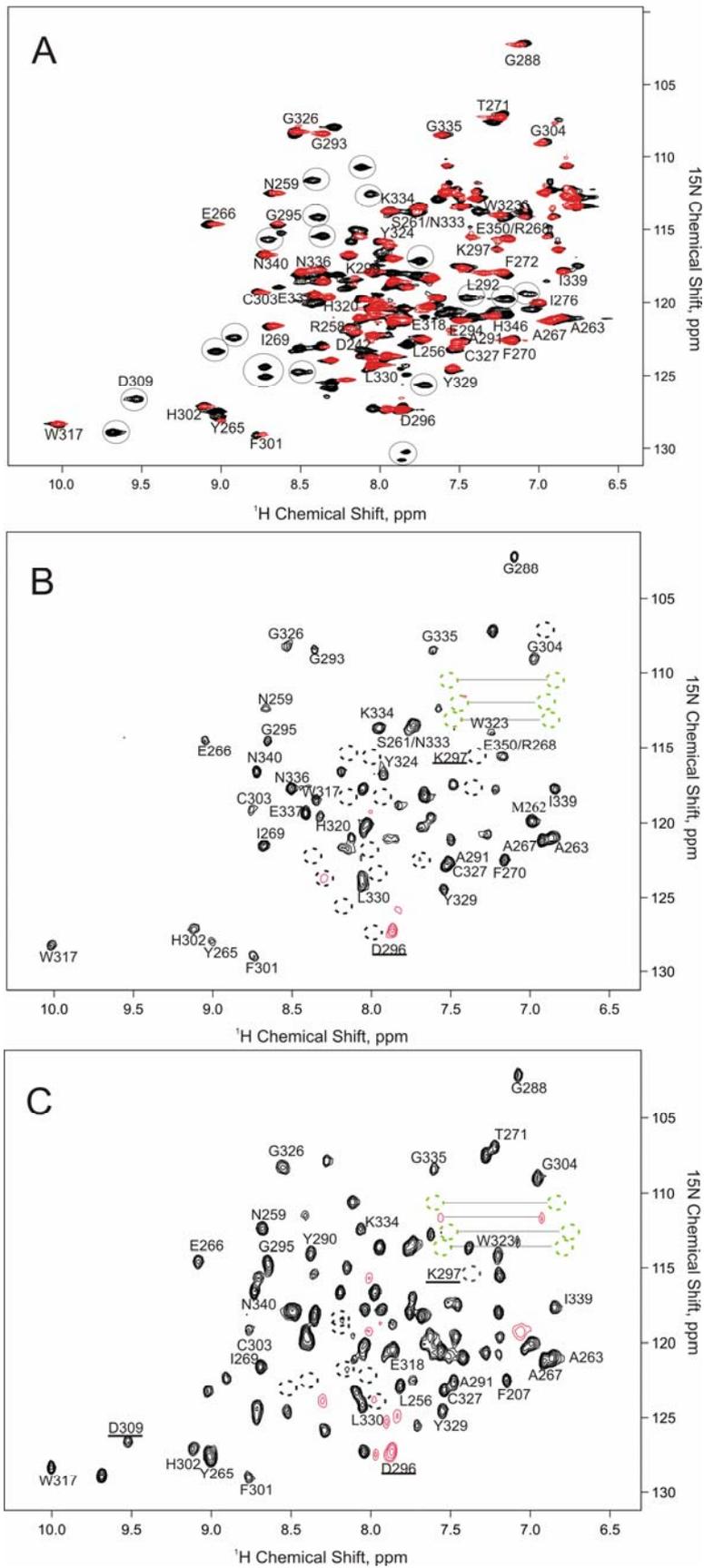
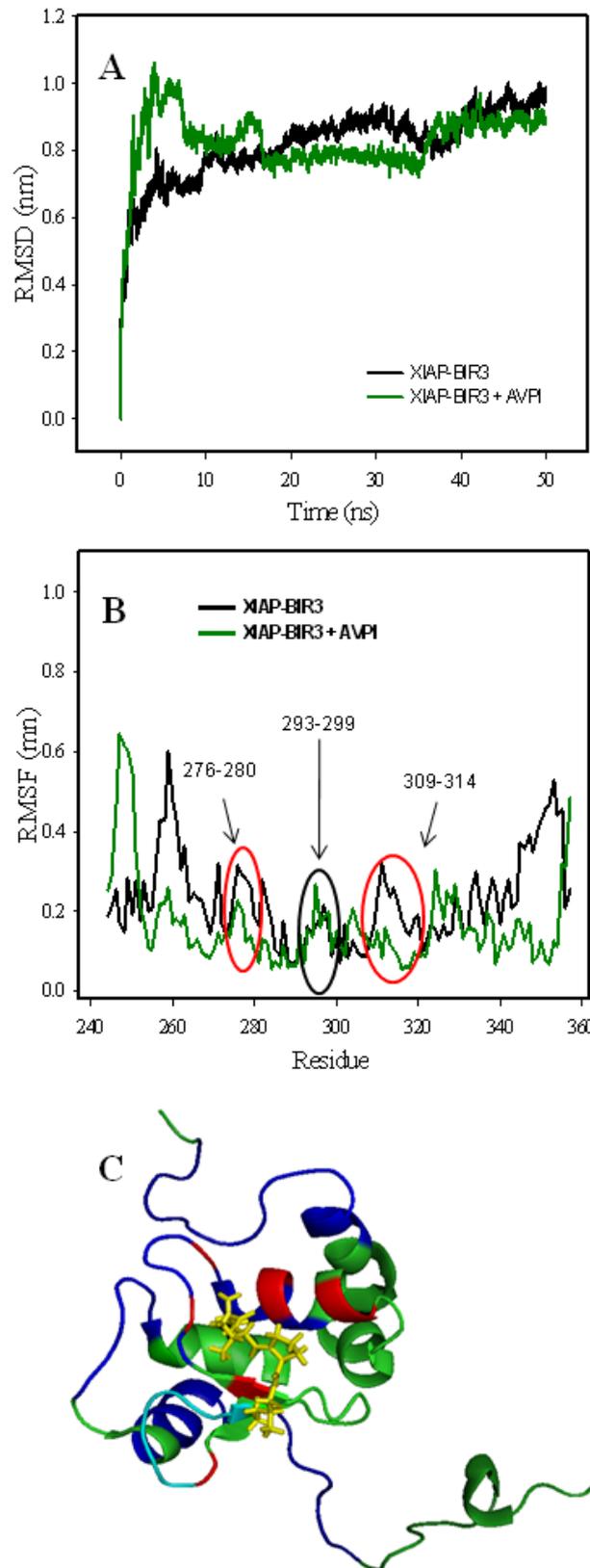


Figure 7



# NEW INSIGHTS TO ASSIST THE DESIGN OF IAP ANTAGONISTS: A STRUCTURAL AND CALORIMETRY APPROACH

**Souza, T. L. F., Sanches, D., Bianconi, M. L., Silva, J. L. and Oliveira, A. C.\***

Programa de Biologia Estrutural and Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Macromoléculas, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil.

**Running Title:** Structural stability and characterization of the XIAP-BIR3/ligands complexes

**\*Corresponding Author:** Andréa C. Oliveira (e-mail: cheble@bioqmed.ufrj.br) – Mailing Address: Avenida Carlos Chagas Filho, 373 - CCS/IBqM/ Bloco E, sala 08, Cidade Universitária, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: (5521) 2562-6756.

**Abbreviations:** BIR, baculoviral IAP repeat; caspase, cysteinyl aspartate-specific proteinase; CD, circular dichroism; Cyt c, cytochrome c; DIABLO, **D**irect **I**AP **B**inding protein with **L**ow pI; HPLC, high performance liquid chromatography; IAP, Inhibitor Apoptosis Proteins; IPTG, isopropyl thiogalactoside; LB, Luria–Bertani; PMSF, phenyl methyl sulfonyl fluoride; Smac, **S**econd **M**itochondria-derived **A**ctivator of **C**aspases; UV, ultraviolet.

## ABSTRACT

Proteins can undergo conformational changes after ligand or drug binding and this has often been ignored in drug design. However, conformational changes are fundamental for the understanding of the drugs affinity to their biological target. Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) have attracted a lot of attention in the recent past because of their potential therapeutic applications to induce apoptosis of cancer cells. In this work we utilized circular dichroism, isothermal titration calorimetry (ITC) and differential scanning calorimetry (DSC) in order to investigate new insights to be considered in the design of IAP antagonists. We characterized the binding parameters of seven tetrapeptides, and verified their effects on the XIAP-BIR3 domain structure and stability. Our ITC data showed that the binding of all tetrapeptides to the XIAP-BIR3 is both enthalpically and entropically favored. However, different combinations of enthalpy and entropy components can be observed. In addition, the increase of affinity is predominantly associated to the increase of enthalpy, but there are compensatory entropic effects. The influence in the thermodynamics of individual residues also was investigated. These analyses reveal that the presence of phenylalanine in the C-terminal increases the affinity by increasing the enthalpy. DSC data showed that all peptides increased the XIAP-BIR3 domain stability. Circular dichroism data suggested that the different affinities and the changes on stability were strictly associated to structural changes. Analyses of structures of the BIR3-XIAP domain bound to different ligands reveal two preferential conformations. In conclusion, our data indicate that the ligand affinity by the XIAP-BIR3 domain is strongly influenced by the contribution of structural changes, and is not only associated to local interactions. These data, in association with the available structural information for the XIAP-BIR3 complex, provide important new insights into the molecular forces that control the XIAP-BIR3 binding affinity and can assist the drug design of IAPs antagonists.

*Key words: XIAP-BIR3/Ligand interaction, protein stability, spectroscopy, calorimetry, apoptosis.*

## INTRODUCTION

Apoptosis (programmed cell death) plays a critical role in regulating cell number and in eliminating stressed or damaged cells from normal tissues [1]. Evasion of apoptosis is commonly recognized as a hallmark of all cancers [2]. Since most commonly used chemo and radiation therapies rely on activation of apoptotic pathways to kill cancer cells, tumor cells which are capable of evading apoptosis are often difficult to treat. Targeting critical apoptosis regulators with a goal to promote apoptosis in cancer cells is an attractive new cancer therapeutic strategy [3,4].

An important class of endogenous proteins that can inhibit apoptosis in both intrinsic and extrinsic pathways are the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) [4,5]. The human X-linked IAP (XIAP) is by far the best characterized IAP family member and most effective of all the IAPs at caspase inhibition [6]. All members of the family present at least one baculoviral IAP repeat (BIR) motif. XIAP shows three BIR domains and a C-terminal RING finger, with these domains presenting different specificities for caspases [7]. Analyses of structure and function of XIAP have demonstrated that the third BIR domain (BIR3) selectively inhibits caspase-9 and that the inhibition of caspase-3 and 7 occurs by the linker region between BIR1 and BIR2 [8,9]. Consistent with its potent apoptosis-suppressing function, XIAP is found to be highly expressed in many human tumor cell lines and tumor samples from patients and plays an important role in conferring resistance on cancer cells to a variety of anticancer drugs. Because XIAP blocks apoptosis at the downstream effector phase, a point where multiple signaling pathways converge, it represents a particularly attractive molecular target for the design of new classes of anti-cancer drugs aimed at overcoming the apoptosis resistance of cancer cells [10,11].

The antiapoptotic function of XIAP is antagonized by Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases/direct IAP-binding protein), a protein released from mitochondria into the cytosol upon initiation of the apoptotic signaling process [12,13]. Crystal and NMR structures show that Smac/DIABLO, through its N-terminal AVPI (Ala1-Val2-Pro3-Ile4) motif, interacts with the XIAP-BIR3 domain at the same site where caspase-9 binds, through its peptide ATPF (Ala1-Thr2-Pro3-Phe4), removing the inhibition of XIAP to caspase-9 by direct competition [13]. Excessive expression of XIAP and other IAPs occurs in several types of human cancer cells [14-16]. Several studies have demonstrated that XIAP plays a critical role in the resistance of cancer cells to chemotherapeutic agents, radiation, and others [17,18]. The tetrapeptide AVPI from the Smac/DIABLO or other Smac peptides are able to interact with XIAP-BIR3 domain, inhibit XIAP function, and increase the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents both *in vitro* [19,20] and *in vivo* [21].

Several approaches have been undertaken in order to understand XIAP-BIR3/AVPI interaction. Since the structure of XIAP-BIR3/AVPI complex was already solved by nuclear magnetic resonance [22] and crystallography [23], several optimization strategies have been employed for the design of small-molecular inhibitors of XIAP, such as docking and fluorescence polarization [24,25]. Successful drugs must display high affinity and high selectivity, goals that have been difficult to accomplish and that emphasize the need for better optimization strategies. Those strategies require control over the forces that maximize affinity towards the intended target and minimize affinity towards other proteins [26]. The simultaneous optimization of enthalpic and entropic interactions effectively implies overcoming the so-called 'enthalpy/entropy compensation' phenomenon [27,28]. In addition, structural changes coupling ligand binding can significantly contribute or evict the increase in the affinity [29,30].

Here, we used ITC (Isothermal Titration Calorimetry) to examine thermodynamics characteristics of the XIAP inhibition by seven selected peptides (ATPF, AVPF, ARPI, AVAF, AVP, GVPI, ARPF), as well as circular dichroism, DSC (Differential Scanning Calorimetry) and analyses of structures deposited in the PDB (Protein Data Bank) to investigate possible structural or stability changes coupled to these peptides interaction. We showed that the peptides interact on the XIAP-BIR3 by a process both enthalpy and entropy driven. However, different enthalpy or entropy components can be observed and the importance of the thermodynamics of individual residue is elucidated. The correlation of thermodynamic and structural data reveals that XIAP-BIR3 domain undergoes conformational changes after ligand binding, and that these changes are strictly associated to the increase in XIAP-BIR3 stability and ligand affinity. Implications for drug design are discussed.

## MATERIAL AND METHODS

**Chemicals.** All reagents were of analytical grade. Distilled water was filtered and deionized through a Millipore water purification system. The experiments were performed at 20 °C in the standard buffer: 15 mM Tris pH 7.4, containing 150 mM NaCl and 1 mM DTT.

**Protein preparation and peptides.** The protein preparation was realized as already describe [31]. The peptides were synthesized by the Genemed Syhthesis Inc. (South San Francisco, CA).

**Circular dichroism (CD) spectroscopy.** CD spectra were obtained in a Jasco J-715 1505 spectropolarimeter. XIAP-BIR3 samples were diluted to a final concentration of 150  $\mu$ M and the spectra were obtained in the standard buffer, using a 0.02 cm path length quartz cuvette. The concentration of all peptides was 450  $\mu$ M. Spectra were the average of three scans obtained at 50 nm/min and are representative of three independent measurements. Only the far UV region from 190 to 260 nm was analyzed.

**Isothermal titration calorimetry (ITC).** ITC measurements were performed using a VP-ITC calorimeter from MicroCal, Llc (Northampton, MA). The titration of 10  $\mu$ M BIR3 with all peptides (500  $\mu$ M in the syringe) involved 25-30 injections (3  $\mu$ L) of a 0.933 M peptide solution at 5 min intervals with constant stirring at 300 rpm. The temperature was set at 25 °C. BIR3 solutions were degassed under vacuum prior to the titrations, and the reference cell was filled with Milli-Q water. The heat of peptides dilution into buffer was subtracted from the raw data obtained with XIAP-BIR3. The data were analyzed by using the Origin 7.0

software provided by the manufacturer. The first injection (1  $\mu\text{L}$ ) in each experiment was not taken into account for data analysis. Three independent experiments were analyzed separately, and the fitted parameters were averaged.

*Differential scanning calorimetry (DSC).* The DSC thermograms were obtained in a VP-DSC from MicroCal, Llc (Northampton, MA). XIAP-BIR3 (50  $\mu\text{M}$ ) was prepared in standard buffer in the absence and in the presence of peptides (150  $\mu\text{M}$ ). The reference cell was filled with the same buffer used for the sample. To prevent the formation of air bubbles, samples and buffers were exhaustively degassed before filling the calorimeter cells. A scan rate of 90  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$  was used for all experiments.

## RESULTS

### *Different enthalpy/entropy compensations on binding of peptides to XIAP-BIR3*

In order to obtain direct thermodynamic parameters of binding of all peptides to the BIR3 domain, we used isothermal titration calorimetry (ITC). Figure 1 depicts a representative exothermic heat of binding from successive injections of peptides into the cell containing 10  $\mu$ M BIR3 at 25 °C, after subtraction of the respective heat of peptide dilution. The enthalpy changes at 25 °C as a function of peptide concentration are also shown in Figure 1. All peptides studied bind on XIAP-BIR3 domain in equimolar proportion ( $n \sim 1$ ). In addition, the binding is exothermic and entropically favored to all peptides in the studied temperature (Table 1). The binding constant and the Gibbs free energy were also obtained from the ITC data, and all thermodynamic parameters of the binding to each peptide are shown in Table 1. Different combinations of enthalpy and entropy components can be observed (Figure 2A) and the influence of the thermodynamics of individual residues can be verified. For example, the phenylalanine present in the C-terminal increases the enthalpy, while the isoleucine leads to an increase of entropic components. Thus, the increase in the affinity of the peptides containing Phe is associated to favored enthalpy. The arginine in the position 2 appears to increase the entropy component, while the Tre in the position 2 and the Pro in the position 3 seem to increase the favorable enthalpy (Figure 2B). In an overall view, the increase of the peptide affinity is predominantly associated to the increase of enthalpy (Figure 3A), but there are compensatory entropic effects (Figure 3B).

### ***Structural analysis of the peptides binding on XIAP-BIR3 domain***

Considering the results obtained by ITC, all structures studied were carried out using a 3:1 peptide:XIAP-BIR3 mole ratio. With exception of the tripeptide AVP and of the tetrapeptide GVPI, the binding of all peptides promoted significant alterations on rotation of the circular light at 210–225 nm in the CD spectra, suggesting changes in the secondary structure (Figure 4). It is interesting to note that changes promoted by peptides presenting Iso in the position 4 are similar (Figure 4A), while the peptides with Phe in the same position promoted different changes. In the case of Phe, there is a reduction of ellipticity near 208 nm and an increase in the ellipticity near 222 nm (Figure 4B). This change is characteristic of proteins presenting  $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helices in their structures, where the  $\alpha$ -helices are predominant [32]. These structural changes are in accordance with the alterations observed by the NMR or crystallography already published data of XIAP-BIR3 structure complexed to AVPI or AVPF (Figure 4C) [22,23]. In addition, the analyses of the solved structures of XIAP-BIR3 bound to different ligands, which were obtained from the PDB, reveal that some ligands lead to the formation or stabilization of an  $\alpha$ -helix structure in the C-terminal region of the XIAP-BIR3 domain (Figure 5). This finding corroborates our CD data, suggesting conformational selection or fit induced associated to the binding of some peptides.

### ***Peptides binding induced the increase on the thermal stability of the XIAP-BIR3 domain***

Differential scanning calorimetry (DSC) has been widely used to study folding-unfolding processes in proteins. In this work, we used DSC to investigate the effects of the peptides binding on the XIAP-BIR3 thermal stability. The thermogram of the free XIAP-BIR3 shows a single peak for the thermally induced unfolding with the denaturation temperature ( $T_m$ ) centered at 68.9 °C, and an unfolding enthalpy ( $\Delta H^{cal}$ ) of 25.6 kcal.mol<sup>-1</sup> as

already shown by our group [31]. The binding of the peptides considerably increases the thermal stability of the XIAP-BIR3 domain as observed by the increase in both the  $T_m$  and in the unfolding enthalpy, at a ligand:protein molar ratio of 3:1 (Table 2). Table 2 summarizes the calorimetric data and correlate data of affinity and protein stabilization.

## DISCUSSION

The reversible interaction or binding of ligands to biological macromolecules is fundamental to nearly every aspect of biochemistry and cell biology. Binding events typically do not occur in isolation in biochemistry, and are almost always coupled or linked to other reactions such as protonation changes, other ligand-binding interactions, structural transitions, and folding [28]. A complete understanding of binding requires a measure of affinity, stoichiometry, enthalpy and entropy components, in addition of the contributions of linked reactions.

In the last few years, the structures of many apoptotic proteins have been solved by X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance, which have been used for drug design. However, compounds designed solely based on structure often do not result in any improvement of the binding affinity because of entropy-enthalpy compensation [33]. The free energy of binding is a key measure of the favorable nature of a chemical event. In computational drug design, the binding affinity is commonly used to guide both discovery and optimization efforts. During optimization, one is attempting to ameliorate the pharmacokinetic/toxicology profile of a compound while maintaining sufficient potency to the target [34]. These efforts are often driven by structural information from either X-ray diffraction or NMR of the receptor-ligand complex. In practice, it is not uncommon that the majority of the derivatives that emerge from these efforts do not possess greater potency, despite the introduction of additional functional groups that form favorable interactions with the receptor. This is due to the compensatory effects between enthalpy and entropy, which are not captured by structural and binding affinity data alone [35]. In addition, most of the drug design strategies are centered on the optimization of the binding affinity, however compounds

characterized by different thermodynamics signatures (i.e. the proportion in which the binding enthalpy and binding entropy contribute to the binding affinity) do not exhibit the same overall behavior even if they have the same affinity against the intended target [35]. Because the enthalpy and entropy changes originate from different types of interactions; some properties like, for example, the selectivity of a compound towards related proteins or the response to mutations associated with drug-resistance depend on a significant extent on their thermodynamic signature [36]. Also, the achievement of extremely high binding affinity requires that both, enthalpy and entropy change, contribute favorably to binding and do not oppose each other.

XIAP-BIR3 is a domain of particular interest since it is a promising target in cancer therapy, as its inhibition allows tumorigenic cells that overexpress XIAP to enter into apoptosis [17,18]. In the last years many studies have characterized the structure of the XIAP-BIR3 domain. RMN data show that the XIAP-BIR3 consists of five  $\alpha$ -helices and a three-strands  $\beta$ -sheet. After XIAP-BIR3 structure was solved by RMN, several works have determined its structure in the presence of different ligands, such as the peptide AVPF [37], the peptide AVPIAQKSE [22], and several small-molecule mimetics of Smac [19,24]. Based on structures deposited in the PDB, we verified significant changes in the secondary structure, mainly by the  $\alpha$ -helices formation or the stabilization of the C-terminal. These data corroborate our CD results that demonstrate significant differences in the XIAP-BIR3 spectra due to the peptides binding. We grouped these structural changes into two class: 1- changes promoted by peptides containing Iso in the position four are similar and is due to  $\beta$ -strand stabilization, involving conformational selection as we showed for the AVPI [31], 2- changes promoted by peptides with Phe in the position four are associated to the increase in the  $\alpha$ -helices content according to an increase in the negative peak at 222 nm. Our data strongly

suggest that these structural changes induced by peptides binding contribute to the ligand affinity, likely by the heat released from the hydrogen bonds formed to the  $\alpha$ -helices stabilization (enthalpy driven).

The thermodynamic parameters of the peptides binding to the XIAP-BIR3 domain were determined by ITC and show that for all peptides the reaction was both enthalpically and entropically favored (Table 1). It is important to observe that the small conformational changes promoted by the peptides, as indicated by the CD data and by the analysis of structures deposited in PDB, can contribute to enthalpy or entropy variation, and consequently to the affinity. These thermodynamic studies can be used to assist on the anti-cancer drug design.

Differential scanning calorimetry measurements indicated an increase of 5°C to 14°C in the unfolding temperature for the BIR3-peptides complexes compared to the free XIAP-BIR3 domain (Table 2). In addition, the calorimetric enthalpy of denaturation increased significantly with all peptides tested. Thus, we believe that the peptide binding can enhance the structural integrity and the stability of XIAP-BIR3. Changes in the far-UV CD spectrum were observed from 200 to 240 nm for the peptides-BIR3 complexes compared to the free domain (Figure 4), indicating that the secondary structure of XIAP was altered upon interaction. These changes in the far-UV CD spectra could be interpreted only qualitatively in terms of ligand induced small changes in the  $\alpha$ -helical or  $\beta$ -sheet content. The new intramolecular interactions in the XIAP-BIR3 upon peptide binding contribute to the affinity.

We recently characterized the stability of the XIAP-BIR3 domain and showed conformational selection, dynamic restriction and hydrophobic effect coupled to the domain stabilization by AVPI binding [31]. By comparisons between NMR spectra or crystallography data of free XIAP-BIR3 and XIAP-BIR3/ligands complexes, is clearly observed that some

ligands stabilize the XIAP-BIR3 with increase in the  $\alpha$ -helix content (Figure 5). Dissecting these factors is a major challenge, so it is impossible to reliably assign the cooperativity to an entropy or enthalpy effect in this system. The problem is that there are several different factors that can contribute to the observed enthalpy and entropy changes. For these monofunctional ligand these factors are the following: 1 - Binding interactions, which could make a favorable contribution to  $\Delta H$ ; 2 - Hydrophobic effects, which could make a favorable contribution to  $\Delta S$  and an unfavorable contribution associated with the desolvation of polar groups; 3 - Restricting intermolecular motion, which would make an unfavorable contribution to  $\Delta S$  [29]; and 4 - Conformational changes in the protein and/or the ligand, which can make favorable or unfavorable contributions to  $\Delta H$  and  $\Delta S$ . Structural tightening could make  $\Delta H$  and  $\Delta S$  more negative, or structural loosening would make  $\Delta H$  and  $\Delta S$  more positive [48]. These compensatory changes in  $\Delta H$  and  $\Delta S$  are often very large relative to the size of the effect discussed here [38]. It is clear that binding interactions and hydrophobic effect are involved in the tetrapeptides interaction with XIAP-BIR3. Restricting intermolecular motion coupled to AVPI binding was demonstrated by our group [31]. For the peptides that lead to increase in  $\alpha$ -helices likely also lead to dynamic restriction, at least in local regions, because it is a natural consequence of protein folding.

Our study provides new insights into the structure and thermodynamics of XIAP-BIR3 inhibition in solution. We showed evidence that XIAP-BIR3, which presents the N and C-terminal regions highly flexible [31], exhibits a conformational induced fit or conformational selection upon some peptides binding that most likely serve as an important structural basis that is related with different binding affinities. Thus, the correlation of the CD data, ITC data and the PDB analyses strongly suggest that, besides ligand affinity is associated to direct interactions with the molecular target, there is a great contribution of the effects on the XIAP-

BIR3 structure and dynamics. XIAP-BIR3 shows different structures that are in conformational exchange [31] and it is possible that some peptides can be selective to specific conformer(s). The aromatic group present in the Phe in the position 4 appears to select specific conformer, which presents increase in  $\alpha$ -helices. Our thermodynamic analysis of the binding of different peptides provides new insights for the understanding of the nature of IAP inhibition that assist the drug design of IAPs antagonists, which are being developed as anti-cancer therapeutics.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Emerson R. Gonçalves for competent technical assistance. We also would like to thank Dr. Yigong Shi to kindly provide the plasmid with the XIAP-BIR3 sequence. This work was supported in part by grants from the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology (CNPq Millennium Program), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pronex Program/CNPq of Brazil to J.L.S and A.C.O., and FINEP to M.L.B.

## REFERENCES

1. JacobsonWeil, M. and Raff, M. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88 347-354 (1997).
2. Hanahan, D. & Weingerg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70 (2000).
3. Westphal, S. & Kalthoff, H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Molecular Cancer* 2: 6 (2003).
4. Arkin, M. Protein-protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. *Current Opinion in Chemical Biology* 9: 317-324 (2005).
5. Fesik, S.W. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103 273-282 (2000).
6. Deveraux, Q.L. and Reed, J.C. IAP family proteins-supressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13 239-252 (1999).
7. Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R.L., Segal, D., Myszka, D. G. and Wu, H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104 781-790 (2001).
8. Riedl, S.J., Renatus, Schwarzenbacher, M., R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S.W., Liddington, R.C. and Salvesen, G.S. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP, *Cell* 104 791-800 (2001).
9. Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, J.C., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. and Alnemri, E.S. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410 112-116 (2001).
10. Hersey, P. & Zhang, X.D. Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 9: 9-18 (2003).
11. Sasaki, H., Sheng, Y., Kotsuji, F. and Tsang, B.K. Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells, *Cancer Res.* 60 5659-5666 (2000).
12. Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X. and Shi, Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO, *Nature* 406 855-862 (2000).
13. Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecularr Cell* 9: 459-470 (2002).

14. Ng, C.P. and Bonavida, B. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation: Sensitization by overexpression of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pl (Smac/DIABLO), *Mol Cancer Ther.* 1 1051-1058 (2002).
15. Mizutani, Y., Nakanishi, H., Li, Y.N., Matsubara, H., Yamamoto, K., Sato, N., Nakamura, T., Mikami, K., Takaha, N., Ukimura, O., Kawauchi, A., Nonomura, N., Bonavida, B. and Miki, T. Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis, *Int. J. Oncol.* 30(4) 919-925 (2007).
16. Tamm, L., Kornblau, S. M., Segall, H., Krajewski, S., Welsh, K., Kitada, S., Scudiero, D. A., Tudor, G., Qui, Y.H., Monks, A., Andreeff, M. & Reed, J.C. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin. Cancer Res.* 6: 1796-1803 (2000).
17. Notarbartolo, M., Cervello, M., Poma, P., Dusonchet, L., Meli, M. & D'Alessandro, N. Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells. *Oncol. Rep.* 11: 133-136 (2004).
18. Holcik, M., Yeh, C., Korneluk, R.G. and Chow, T., Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death, *Oncogene* 19 4174-4177 (2000).
19. Arnt, C.R., Chiorean, M.V., Heldebrant, M.P., Gores, G.J. & Kaufmann, S.H. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 44236-44243 (2002).
20. Oost, T.K., Sun, C., Armstrong, R.C., AL-Assaad, A., Betz, S.F., Deckwerth, T.L., Ding, H., Elmore, S.W., Meadows, R.P., Olejniczak, E.T., Oleksijew, A., Oltersdorf, T., Rosenberg, S.H., Shoemaker, A.R., Tomaselli, K.J., Zou, H. & Fesik, S.W. Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.* 47: 4417-4426 (2004).
21. Hu, Y., Cherton-Horvat, G., Dragowska, V., Baird, S., Korneluk, R.G., Durkin, J.P., Mayer, L.D. and LaCasse, E.C. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cells in vitro and in vivo, *Clin. Cancer Res.* 9 2826-2836 (2003).

22. Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Betz, S.F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J.C. and Fesik, S.W. Structural basis of binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain, *Nature* 408 1004-1008 (2000).
23. Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J., Du, C., Wang, X. and Shi, Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO, *Nature* 408 1008-1012 (2000).
24. Nikolovska-Coleska, Z., Wang, R., Fang, X., Pan, H., Tomita, Y., Li, P., Roller, P.P., Krajewski, K., Saito, N.G., Stuckey, J.A. and Wang, S. Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization, *Anal. Biochem.* 332 261-273 (2004).
25. Nachmias, B., Ashhab, Y. and Ben-Yehuda, D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer, *Semin. Cancer. Biol.* 14 231-243 (2004).
26. Freire, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discovery Today: Technologies* 1(3): 295-299 (2004).
27. Ruben, A.J., Kiso, Y., Freire, E. Overcoming roadblocks in lead optimization: a thermodynamic perspective. *Chem Biol Drug Des.* 67(1):2-4 (2006).
28. Whitesides, G.M., Krishnamurthy, V.M. Designing ligands to bind proteins. *Q Rev Biophys.* 38(4):385-95 (2005).
29. Frederick, K.K., Marlow, M.S., Valentine, K.G. and Wand, A.J. Conformational entropy in molecular recognition by proteins, *Nature* 448 325-330 (2007).
30. Crespo, A. and Fernandez, A. Induced disorder in protein-ligand complexes as a drug-design strategy, *Molecular Pharmaceutics* 5(3) 430-437 (2008).
31. Souza, T.L., Sanches, Daniel., Gonçalves, R.B., Pita, S.S.R., Pascutti, P.G., Bianconi, M. L., Almeida, F.C.L., Silva, J.L.<sup>1</sup> and Oliveira, A.C.: Conformational selection, dynamic restriction and hydrophobic effect coupled to the stabilization of the domain of human x-linked inhibitor of apoptosis protein by the tetrapeptide AVPI. *Biophysical Chemistry* (2010).
32. Fasman, G.D. *Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules* (1996). Plenum Press. New York.
33. Olsson, T.S., Williams, M.A., Pitt, W.R., Ladbury, J.E. The thermodynamics of protein-ligand interaction and salvation: insights for ligand design. *J Mol Biol* 384(4): 10002-17 (2008).
34. Weber, P.C., Salemme, F.R. Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 13(1):115-21 (2003).

35. Lafont, V., Armstrong, A.A., Ohtakak, H., Kiso, Y., Amzel M., L., Freire, E. Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization. *Chem Biol Drug Des.* 69(6):413-22 (2007).
36. Freire, E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? *Drug Discovery Today* 13: 869-874 (2008).
37. Wist, A.D., Gu, L., Riedl, S.J., Shi, Y., Mclendon, G.L. Structure-activity based study of the Smac-binding pocket within the BIR3 domain of XIAP. *Bioorg Med Chem* 15(8): 2935-43 (2007).
38. Abian, O., Neira, J.L., Velazquez-Campoy, A. Thermodynamics of zinc binding to hepatitis C virus NS3 protease: a folding by ligand binding. *Proteins* 77:624-636 (2009).

## FIGURE LEGENDS

### **FIGURE 1 – Calorimetric titration of the XIAP-BIR3 domain with different peptides.**

A) Heat flux profile associated with the injections of ligand in the calorimetric cell at 25 °C.  
B) Binding isotherm at 25 °C. The measurements were also carried out at 10 and 37 °C. For all experiments the protein concentration was 10  $\mu$ M.

### **FIGURE 2 – The thermodynamics of binding of peptides antagonists of the XIAP-BIR3.**

A) The development of new and more powerful inhibitors is reflected in the trend toward a predominance of enthalpic and entropic contributions to the binding affinity. B) Scheme of the thermodynamic contribution of some residues to the ligand affinity, showing the structure-affinity relationship of Smac-based peptides to XIAP-BIR3. The increase of affinity mediated by the Phe in the position 4 is mediated by increase in the enthalpy.

**FIGURE 3 – Enthalpy-entropy compensation in the XIAP-BIR3 inhibition.** The  $K_a$  corresponds to the association constant to each peptide. The solid line corresponds to a linear fit of all data.

### **FIGURE 4 – Secondary structure analysis of the XIAP-BIR3 domain in solution and in complex with the different peptides by circular dichroism.** CD spectra of XIAP-BIR3 and XIAP-BIR3/peptides complex. In all measurements, the concentration of the domain was 150 $\mu$ M and of the peptides 450 $\mu$ M. Buffer: 15 mM Tris, 150 mM NaCl and 1 mM DTT, pH 7.4.

B) Structure of XIAP-BIR3 free and bounded to AVPI or AVPF. The enthalpy increment mediated by the Phe in the position 4 appears to be due to structural changes (for example, the

increase in  $\alpha$ -helix in the XIAP-BIR3/AVPF complex). On the other hand, is partially compensated by the loss of entropy that can be explained, at least, by the loss of conformational entropy.

**FIGURE 5 – Analysis of the difference in the secondary structure of the XIAP-BIR3 domain by using structures deposited in the PDB.** A) Conformations of the XIAP-BIR3 complexed with ligand, which does not promote conformational changes. B) Conformations of the XIAP-BIR3 complexed with ligand, which promotes an increase in the  $\alpha$ -helix content in the C-terminal.

**TABLE 1 – Binding parameters for XIAP-BIR3/Peptide interaction estimated from ITC data.**

Parameter	Peptide					
	AVPI	ATPF	ARPF	AVPF	AVAF	ARPI
<b>n</b>	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
<b>K (10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>)</b>	7.8 ± 1.2	18.8 ± 1.6	35.5 ± 1.2	12.2 ± 0.6	2.3 ± 1.0	5.9 ± 1.5
<b>ΔH (kcal · mol<sup>-1</sup>)</b>	-3.1 ± 0.1	-6.3 ± 0.2	-6.2 ± 0.2	-5.3 ± 0.2	-4.1 ± 0.2	-2.9 ± 0.4
<b>ΔS (cal · mol<sup>-1</sup>)</b>	19.1 ± 1.3	12.0 ± 0.6	13.7 ± 0.5	14.7 ± 0.5	15.5 ± 0.1	21.1 ± 0.1
<b>ΔG (kcal·mol<sup>-1</sup>)</b>	-8.8	-9.9 ± 0.1	-10.3 ± 0.1	-9.7 ± 0.2	-8.7 ± 0.2	-9.2 ± 0.3

Data are mean values of three independent experiments ± standard deviations.

**TABLE 2 – Thermal unfolding parameters of XIAP-BIR3 in the absence and presence of the different peptides.**

<b>BIR3</b>	<b>Kd (nM)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>ΔH<sup>cal</sup> (kcal·mol<sup>-1</sup>)</b>
–	–	68.9 ± 0.2	25.7 ± 0.2
<b>AVAF</b>	434 ± 18	73.5 ± 0.3	XXXX
<b>AVPI</b>	285 ± 15	77.3 ± 0.2	84.4 ± 0.4
<b>ARPI</b>	169 ± 11	74.5 ± 0.2	48.8 ± 0.2
<b>AVPF</b>	81 ± 8	81.1 ± 0.3	XXXX
<b>ATPF</b>	53 ± 6	79.6 ± 0.2	XXXX
<b>ARPF</b>	28 ± 5	82.1 ± 0.1	XXXX

All the thermodynamic parameters are those at atmospheric pressure (see text for details). The BIR3 concentration was 50 μM and the peptides concentration was 150 μM.

Figure 1

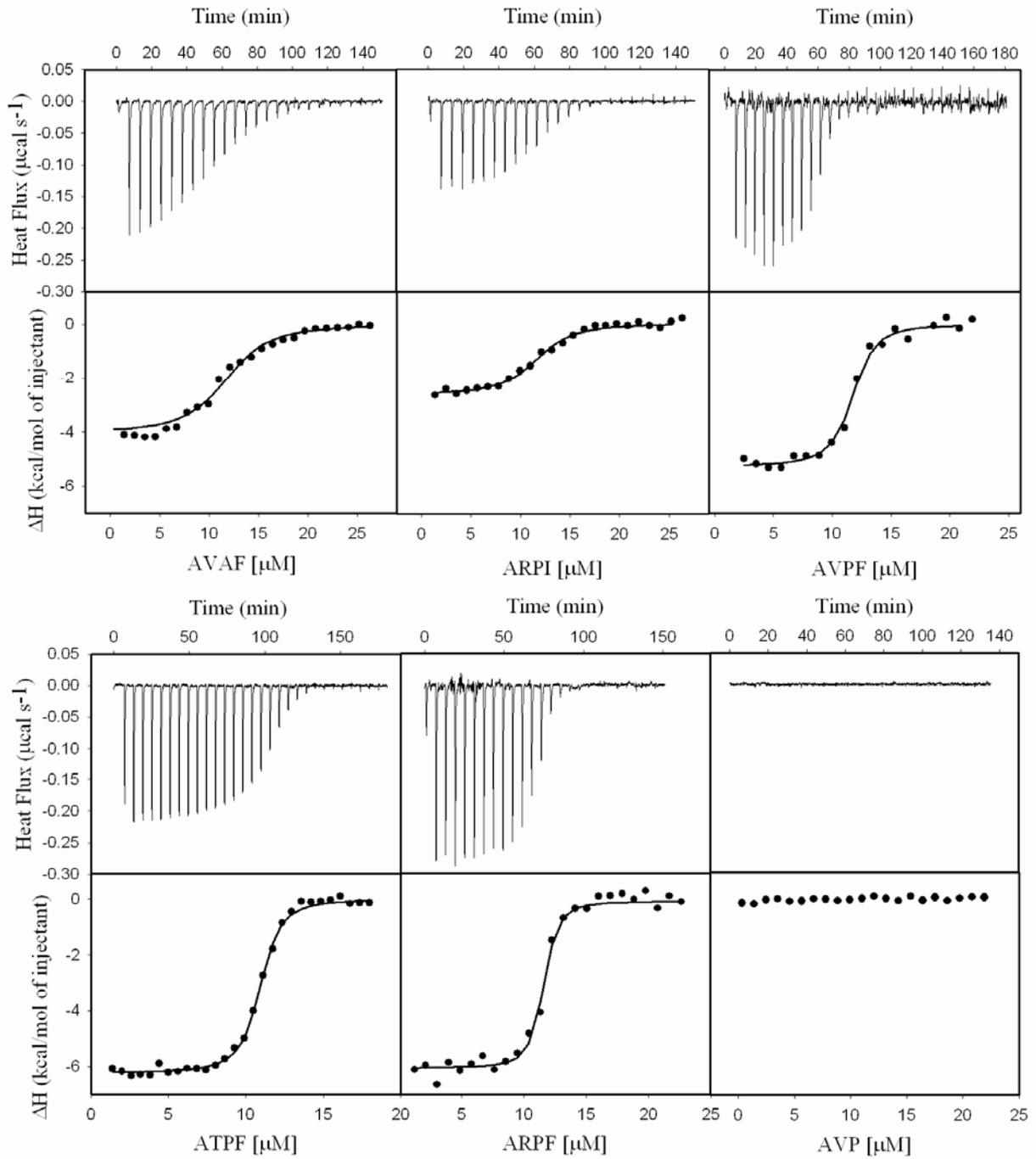


Figura 2

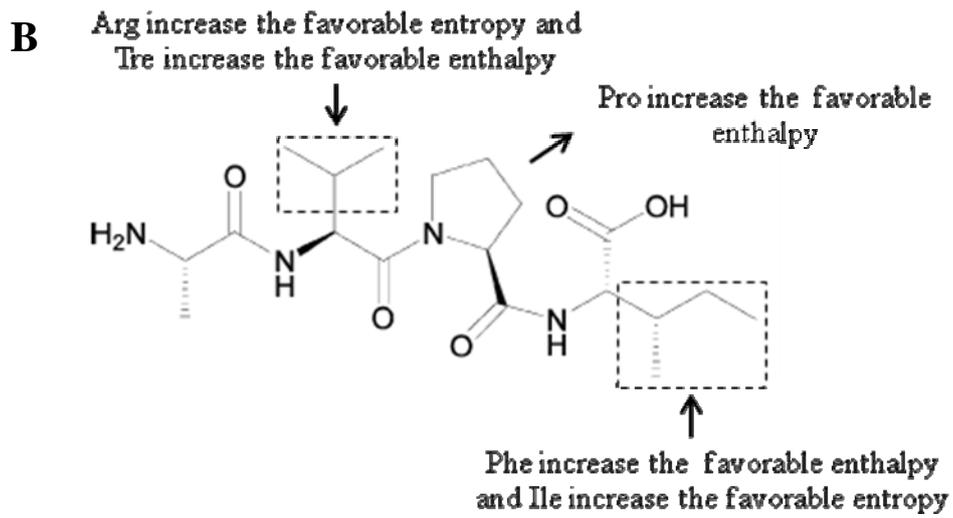
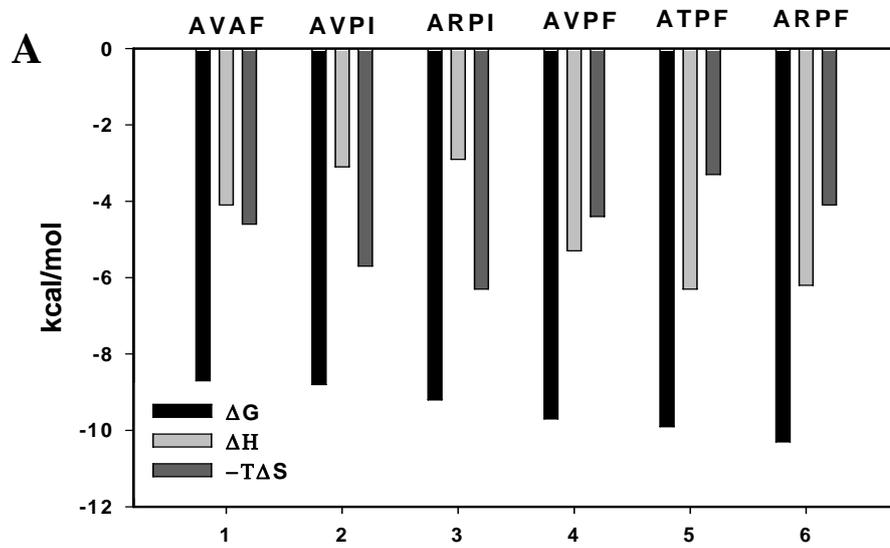


Figure 3

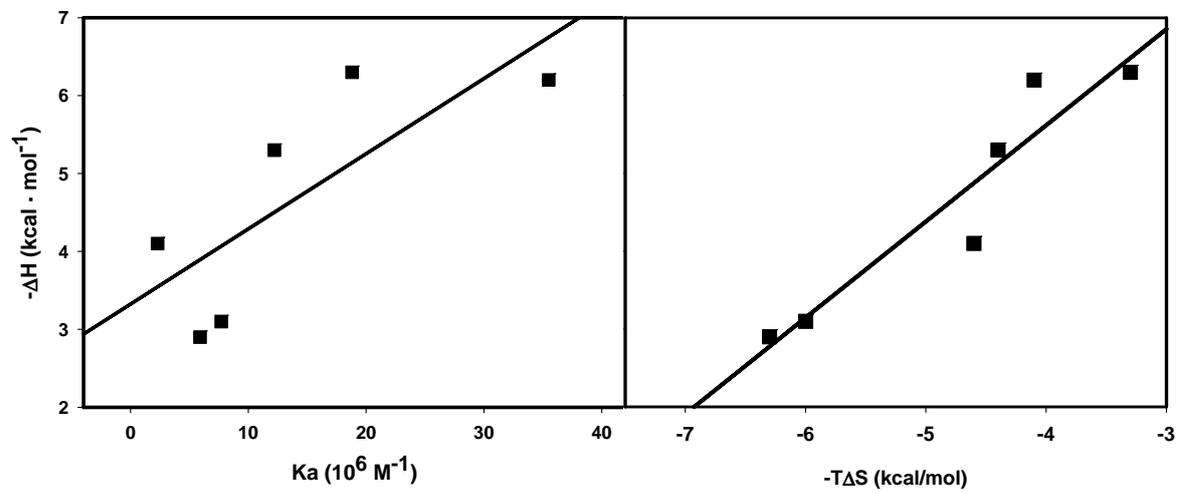


Figure 4

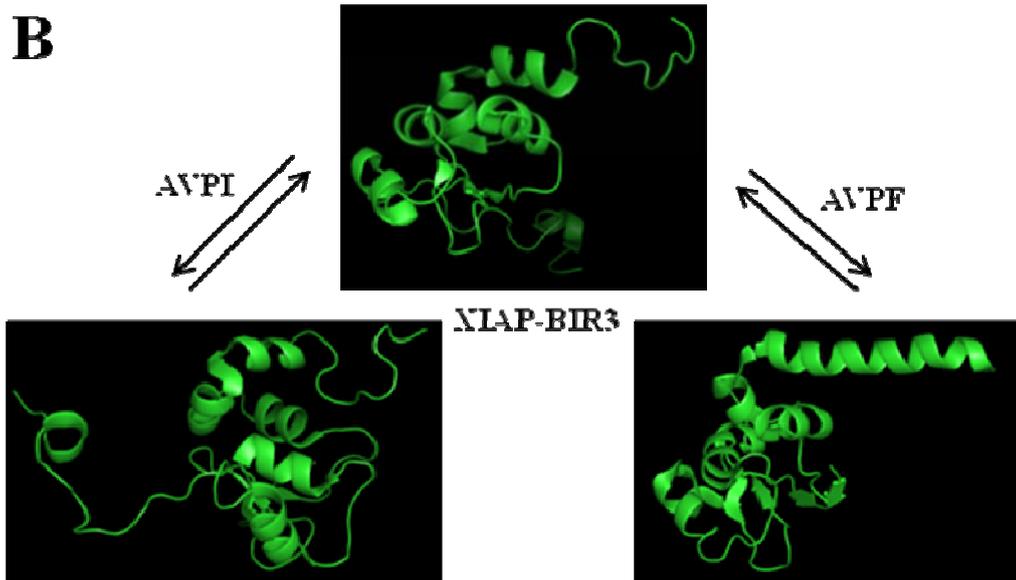
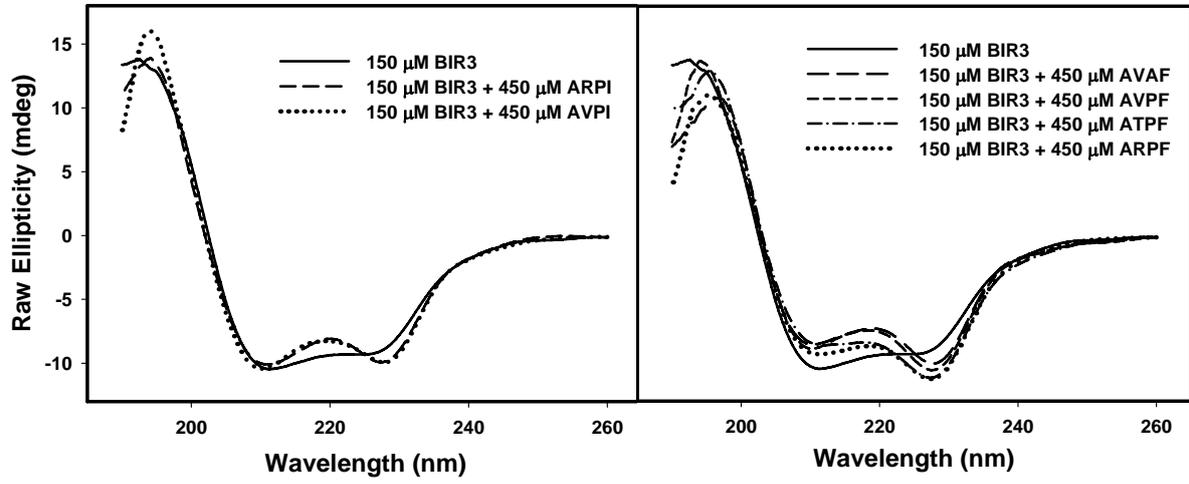
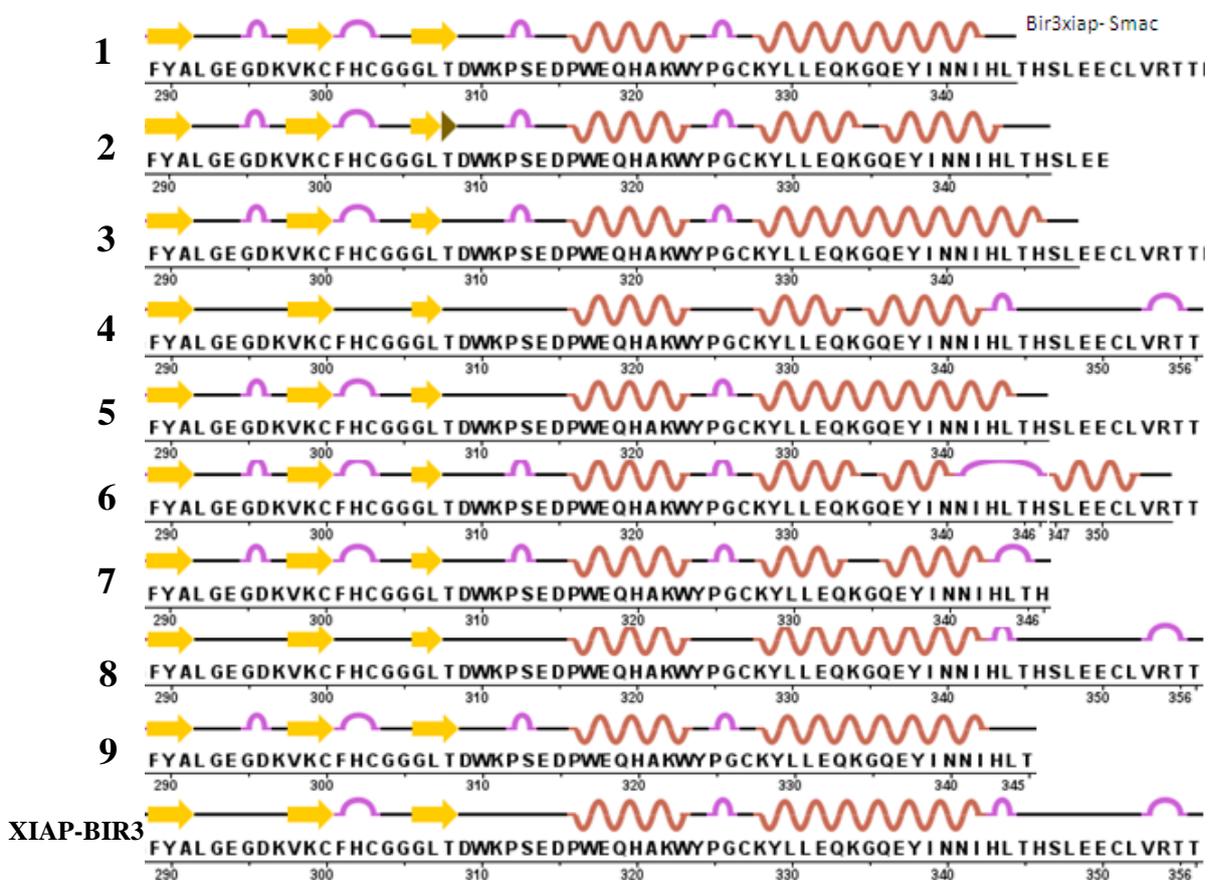
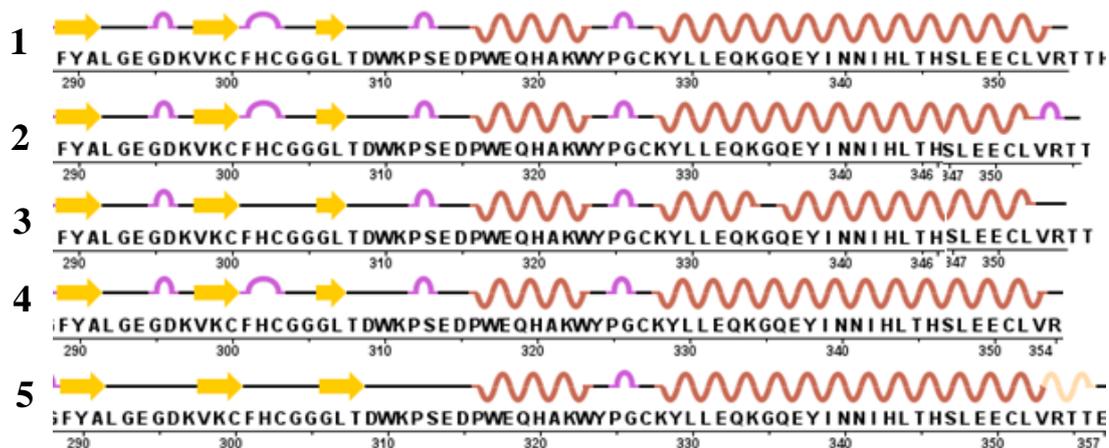


Figure 5

A



B



## CURRICULO VITAE

**Nome** Theo Luiz Ferraz de Souza  
**Nascimento** 15/01/1979 - Visconde do Rio Branco/MG – Brasil

### Formação Acadêmica/Titulação

- Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal do Juiz de Fora, março de 1998 a dezembro de 2003.
- Mestrado em Química Biológica pelo Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, abril de 2004 a março de 2006.

### Orientações e Supervisões

#### Orientação de Iniciação científica (concluída)

1. Lucas Jorge Marianno Costa. 2009. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
2. Rodrigo Fernandes Ponte. 2008. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.
3. Ana Carolina Queiroz Vaz.. 2006. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
4. Daniel Sanches. 2006. Iniciação científica (Ciências Biológicas - Modalidade Médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
5. Vanessa Lopes de Azevedo Braga. 2010. Curso (Ciências Biológicas - Modalidade Médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### Co-orientação de trabalhos de conclusão de curso de graduação (concluída)

1. Vanessa Lopes de Azevedo Braga. **Compreendendo a Montagem *in vitro* do Nucleocapsídeo do Vírus da Hepatite C.** 2010. Curso (Ciências Biológicas - Modalidade Médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### Co-orientação de mestrado (em andamento)

1. Vanessa Lopes de Azevedo Braga. **Estudos de montagem e interação vírus-célula do vírus da Hepatite C.** 2010. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### Comunicações em Congresso

- 39 comunicações em congressos nacionais
- 17 comunicações em congressos internacionais

### Publicações

1. GONCALVES, R. B., SANCHES, D., SOUZA, T. L. F., Silva, J.L., Oliveira, A.C. THE PRO-APOPTOTIC PROTEIN SMAC/DIABLO DIMER HAS THE HIGHEST STABILITY AS MEASURED BY PRESSURE AND UREA DENATURATION. *Biochemistry (Easton)*. , v.47, p.3832 - 3841, 2008.
2. LIMA, S. M. B., Vaz, A.C.Q., SOUZA, T. L. F., Peabody, D., Silva, J.L., Oliveira, A.C. DISSECTING THE ROLE OF PROTEIN-PROTEIN AND PROTEIN-NUCLEIC ACIDS INTERACTIONS ON MS2 BACTERIOPHAGE STABILITY. *The FEBS Journal*. , v.273, p.1463 - 1475, 2006.
3. SOUZA, T. L. F., SANCHES, D., GONCALVES, R. B., PITA, S. S. R., PASCUTTI, P. G., BIANCONI, M. L., AIMEIDA, F.C., Silva, J.L., Oliveira, A.C. CONFORMATIONAL SELECTION, DYNAMIC RESTRICTION AND HYDROPHOBIC EFFECT COUPLED TO THE STABILIZATION OF THE BIR3 DOMAIN OF HUMAN X-LINKED INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEIN BY THE TETRAPEPTIDE AVPI. Artigo aceito para publicação no periódico *Biophysical Chemistry*. 2010.

# 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](#)