

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**NATHANE CUNHA MEBUS ANTUNES**

**INFLUÊNCIA DE INTERFACES NEGATIVAMENTE CARREGADAS E  
MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS NA MONTAGEM DO  
NUCLEOCAPSÍDEO DO VÍRUS DENGUE**

RIO DE JANEIRO

2022

**NATHANE CUNHA MEBUS ANTUNES**

**INFLUÊNCIA DE INTERFACES NEGATIVAMENTE CARREGADAS E  
MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS NA MONTAGEM DO  
NUCLEOCAPSÍDEO DO VÍRUS DENGUE**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Thompson Da Poian  
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda de Almeida

RIO DE JANEIRO

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

A636i Antunes, Nathane Cunha Mebus  
Influência de interfaces negativamente  
carregadas e modificações pós-traducionais na  
montagem do nucleocapsídeo do vírus dengue / Nathane  
Cunha Mebus Antunes. -- Rio de Janeiro, 2022.  
178 f.

Orientadora: Andrea Thompson Da Poian.  
Coorientador: Fabio Ceneviva Lacerda de Almeida.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo  
de Meis, Programa de Pós-Graduação em Química  
Biológica, 2022.

1. Flavivírus. 2. Dengue. 3. Proteína do capsídeo.  
4. Nucleocapsídeo. I. Da Poian, Andrea Thompson ,  
orient. II. Lacerda de Almeida, Fabio Ceneviva ,  
coorient. III. Título.

569ª ATA DA COMISSÃO EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA BIOLÓGICA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA APRESENTADA E DEFENDIDA POR **NATHANE CUNHA MEBUS ANTUNES**.

No vigésimo quarto dia do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, às 13h00min, realizou-se de forma totalmente remota e em concordância com o disposto na Resolução CEPG nº 01, de 16 de março de 2020, tendo sido gravada através do aplicativo Zoom®, a defesa da Tese de Doutorado em Química Biológica apresentada e defendida por **Nathane Cunha Mebus Antunes**, intitulada: "**Influência de interfaces negativamente carregadas e modificações pós-traducionais na montagem do nucleocapsídeo do vírus dengue**". A Comissão foi organizada obedecendo ao disposto nas Resoluções do Conselho de Ensino para Graduados da UFRJ e no Regulamento do Programa de Pós-graduação em Química Biológica, área de concentração em Química Biológica, estando constituída pelos seguintes membros: ( ) **Paulo Mascarello Bisch** (Professor Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ), ( ) **Juliana Reis Cortines** (Professor Associado do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ), ( ) **Andre Marco de Oliveira Gomes** (Professor Associado II do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, UFRJ), ( ) **Tuane Cristine Ramos Gonçalves Vieira** (Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, UFRJ), ( ) **Luciana Jesus da Costa** (Professor Associado do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ), além de seu(ua) orientador(a), ( ) **Andrea Thompson Da Poian** (Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, UFRJ), sendo designado(a) Presidente da Banca, e de seu(ua) coorientador(a), ( ) **Fabio Ceneviva Lacerda de Almeida** (Professor Associado IV do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, UFRJ), ambo(a)s sem direito a voto. Após haver o(a) candidato(a) apresentado os resultados de sua tese, obedecendo ao prazo regimental, foi dada a palavra aos examinadores para arguição, na seguinte ordem: Paulo Mascarello Bisch, Juliana Reis Cortines e Andre Marco de Oliveira Gomes, tendo o(a) candidato(a) respondido às perguntas formuladas. Assim sendo, a Comissão Examinadora decidiu recomendar a outorga ao(à) candidato(a) do Grau de Doutor em Ciências (Química Biológica). Nada mais havendo a tratar, eu, Andrea Thompson Da Poian, lavrei a presente Ata, que assino em meu nome e dos demais membros da Banca Examinadora.

Rio de Janeiro, 24 de agosto de 2022.



---

Andrea Thompson Da Poian  
(Presidente da Banca)

*Ao meu amado pai, Wilson Mebus (in memorian),  
e à minha família.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, inteligência suprema, e a Jesus Cristo, por todo o amor e por me conduzirem em cada etapa da minha vida até aqui.

Ao Pai Thomaz, e aos professores e mentores que me acompanham, por me sustentarem nesta caminhada e por me tornarem mais consciente da importância da seriedade e simplicidade.

Um agradecimento muito especial aos meus pais, que me ensinaram a ser tudo o que sou hoje, e que muitas vezes se privaram de muitas coisas para que eu e minha irmã tivéssemos tudo. Ao meu pai, Wilson (*in memoriam*), que sempre estará em meu coração e pensamentos, até o momento do nosso reencontro. A minha mãe, Denise, que sempre foi, junto ao meu pai, a minha maior incentivadora. Obrigada por tudo!

À minha irmã, Vanessa, e ao meu tio, Dirceu, que sempre estiveram presentes torcendo por mim e me incentivando.

Ao meu esposo, Sharton, pela paciência e companheirismo. Por compartilhar comigo todas as angústias e vitórias da vida acadêmica e pessoal.

Aos meus sogros, pelos quais eu tenho muito carinho, pelo apoio, incentivo e torcida de sempre.

À minha orientadora, Andrea T. Da Poian, por ter me recebido no laboratório de Bioquímica do Vírus, há sete anos, e desde então não ter medido esforços para a minha formação e amadurecimento científico. Agradeço por ter acreditado em mim, por todas as oportunidades, pela confiança, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Ao meu coorientador, Fabio Almeida, por ter me acolhido e ensinado tanto desde o início do meu desenvolvimento científico. Obrigada pela paciência, amizade, confiança e todo suporte durante esses anos de formação.

A toda a equipe do Laboratório de Bioquímica de Vírus, Bioqvir, muito obrigada pela ajuda e amizade de cada um de vocês. Por compartilhar o conhecimento científico, os dias bons e ruins, conselhos e risadas. Obrigada por tornarem o doutorado e o ambiente de trabalho mais leves e prazerosos.

Um agradecimento especial às colegas de trabalho do projeto com a proteína do capsídeo do vírus dengue, Thaís e Glauce, pelo compartilhamento de conhecimentos. À Thaís, obrigada pela parceria de bancada nos últimos anos, especialmente durante o período da pandemia.

À Rose e a Dilma, pelo suporte técnico. Vocês foram parte fundamental para que tudo fosse possível.

A todos os membros do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, em

especial Peter e Gabi, com quem compartilhei momentos de crescimento e aprendizado durante a pandemia, no consórcio COVID-19 NMR. E ao Ícaro, por compartilhar seu conhecimento e pela parceria nos projetos desenvolvidos com a proteína do capsídeo do vírus dengue e no consórcio.

Aos membros do Laboratório de Física Biológica, em especial, ao Dr. Gilberto Weissmuller e ao Wellington Ferreira, que me ensinaram muito sobre microscopia de força atômica, ajudaram com a aquisição de imagens e contribuíram muito para esta tese.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – CNPEM, Campinas, SP) e ao Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) por oferecer suporte para a realização dos experimentos desta tese. Em especial, a técnica Adélia Belém, pelo excelente apoio técnico prestado.

A todos os professores, funcionários e técnicos do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, pelo apoio. Em especial, aos membros da secretaria da pós-graduação pelo carinho, comprometimento e prontidão de sempre.

A Dr<sup>a</sup> Tuane Vieira, por ter aceitado revisar essa tese. Muito obrigada pelas sugestões e disponibilidade.

A toda a banca examinadora por aceitarem o convite. Fico muito feliz e honrada por ter seus comentários e discussão como contribuição para a minha formação científica.

Ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo suporte financeiro.

*“Estude sempre. A renovação das ideias favorece  
a evolução do espírito”*

*André Luiz (Chico Xavier)*



## RESUMO

ANTUNES, Nathane Cunha Mebus. Influência de interfaces negativamente carregadas e modificações pós-traducionais na montagem do nucleocapsídeo do vírus dengue. 2022. Tese (Doutorado em Química Biológica), Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O vírus dengue (DENV), membro do gênero *Flavivirus*, causa uma importante doença viral transmitida por artrópodes. O DENV possui cerca de 50 nm e é composto por um envelope viral lipídico no qual as proteínas de superfície estão dispostas com simetria icosaédrica. O nucleocapsídeo (NC), localizado internamente, é composto pelo RNA viral empacotado pela proteína do capsídeo (C). Apesar da determinação da estrutura de partículas virais de diversos flavivirus por criomicroscopia eletrônica, faltam informações estruturais sobre a organização do NC. Neste contexto, essa tese teve por objetivo estabelecer as condições para a montagem *in vitro* de partículas semelhantes a nucleocapsídeo de DENV (NCLPs) utilizando DENVC recombinante, para avaliar a influência de fatores como a presença de interfaces carregadas negativamente (ácidos nucleicos ou superfícies), assim como a presença de modificações pós-traducionais (PTMs) em DENVC. Foram utilizadas técnicas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, espalhamento de luz estático, e anisotropia de fluorescência, associadas a microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), para avaliar a formação de NCLPs, na ausência ou presença de oligonucleotídeos. Os resultados das análises em solução comparando o efeito de oligonucleotídeos 2-, 5- e 25-mer, mostraram que 5-mer é o tamanho mínimo para a formação de NCLPs. A obtenção de NCLPs ocorreu de forma concentração-dependente e apresentou um perfil de saturação, com uma razão molar de 1:1 (DENVC:oligonucleotídeo), sugerindo um equilíbrio envolvendo o dímero de DENVC e a formação de oligômeros organizados, compatíveis com NCLPs. As imagens de AFM e MET utilizando concentrações sub-nanomolares de DENVC resultaram em NCLPs esféricas e regulares, na presença e na ausência de oligonucleotídeos, sugerindo que este processo foi dirigido pela presença de superfícies negativamente carregadas, como a mica e o carbono. Estes resultados sugerem que a montagem do NC depende da neutralização de cargas de DENVC e que esse processo deve ser finamente coordenado para evitar agregação inespecífica. O potencial eletrostático altamente positivo da superfície de DENVC deve contribuir para estes eventos. Nossa hipótese é que um ponto altamente positivo nas hélices  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  (R85/K86) pode ser o principal sítio de ligação do DENVC ao RNA viral, que deve ser neutralizado primeiro para permitir a formação do NC. Acreditamos que outras regiões de DENVC também estejam

envolvidas na ligação ao RNA, que pode ser modulada por modificações de carga ou estrutura causadas por PTMs em DENV C. Análises de bioinformática indicaram potenciais sítios para a PTMs, como fosforilação e metilação, localizadas principalmente no N-terminal intrinsecamente desordenado, e nas hélices  $\alpha 1$  e  $\alpha 4$ , regiões importantes para a interação com interfaces celulares e montagem do NC. Embora os resultados apresentados em relação ao papel das PTMs sejam preliminares, estabeleceram perspectivas importantes para análises *in vitro* de sua ocorrência e suas implicações para a montagem do NC.

Palavras-chave: proteína do capsídeo, nucleocapsídeo, superfícies negativamente carregadas, modificações pós-traducionais.

## ABSTRACT

ANTUNES, Nathane Cunha Mebus. Influence of negatively charged interfaces and post-translational modifications on the dengue virus nucleocapsid assembly. 2022. Tese (Doutorado em Química Biológica), Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Dengue virus (DENV), a member of the *Flavivirus* genus, causes an important arthropod-borne viral disease. DENV is about 50 nm in diameter and is composed of a lipid viral envelope in which surface proteins are arranged with icosahedral symmetry. Internally, the nucleocapsid (NC) is composed of viral RNA packaged by the capsid (C) protein. Despite the determination of several flaviviruses particles structure by cryo-electron microscopy, structural information about the organization of the NC is lacking. In this context, this work aimed to establish the conditions for *in vitro* assembly of DENV nucleocapsid-like particles (NCLPs) using recombinant DENVC, to assess the influence of factors such as the presence of negatively charged interfaces (nucleic acids or surfaces), as well as the presence of post-translational modifications (PTMs) in DENVC. Small-angle X-ray scattering, static light scattering, and fluorescence anisotropy techniques, associated with atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM), were used to evaluate the formation of NCLPs in the absence or presence of oligonucleotides. The solution analysis results comparing the effect of 2-, 5-, and 25-mer oligonucleotides showed that 5-mer is the minimum size of NCLPs assembly. NCLPs were obtained in a concentration-dependent manner and showed a saturation profile, with a molar ratio of 1:1 (DENVC:oligonucleotide), suggesting an equilibrium involving dimeric DENVC and an organized oligomer compatible with NCLPs. AFM and MET images using sub-nanomolar concentrations of DENVC resulted in regular, spherical NCLPs in the presence and absence of oligonucleotides, suggesting that this process was driven by negatively charged surfaces such as mica and carbon. These results suggest that NC assembly depends on the neutralization of DENVC charges and that this process must be finely coordinated to avoid unspecific aggregation. The highly positive electrostatic potential of the DENVC surface may contribute to these events. We hypothesize that a highly positive  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  helices spot (R85/K86) may be the main DENVC-RNA binding site, which must be neutralized first to allow NC assembly. We believe that other DENVC regions are also involved in RNA binding, which can be modulated by charge or structural changes caused by DENVC PTMs. Bioinformatics analyses indicated potential sites for PTMs, such as phosphorylation and methylation, located mainly in the N-terminal intrinsically disordered region, and  $\alpha 1$  and  $\alpha 4$  helices, critical regions

for the interaction with cellular interfaces and NC assembly. Although results of PTMs role are preliminary, they have established important perspectives for *in vitro* analyzes of their occurrence and their implications for NC assembly.

Keywords: capsid protein, nucleocapsid, negatively charged surface, post-translational modifications.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da estrutura do DENV. ....	19
<b>Figura 2</b> - Desenho esquemático do genoma de flavivírus e da poliproteína.....	20
<b>Figura 3</b> - Ciclo de replicação dos flavivírus. ....	22
<b>Figura 4</b> - Estrutura da partícula madura de DENV determinada por cryo-EM. ....	23
<b>Figura 5</b> - Estrutura da partícula viral madura e imatura de ZIKV determinadas por cryo-EM .....	25
<b>Figura 6</b> - Estrutura tridimensional de DENVC determinada por RMN.....	27
<b>Figura 7</b> - Contatos quaternários e terciários de DENVC. ....	28
<b>Figura 8</b> - Interação de DENVC com LDs. ....	31
<b>Figura 9</b> - Representação das principais PTMs. ....	35
<b>Figura 10</b> - Influência da fosforilação de WNV na interação com RNA viral e oligomerização. .....	39
<b>Figura 11</b> - Perfis de SAXS obtidos após interação de DENVC com oligonucleotídeos ssDNA. .....	55
<b>Figura 12</b> - Medidas de espalhamento de luz estática e anisotropia de fluorescência em função da concentração de oligonucleotídeo.....	57
<b>Figura 13</b> - Determinação da concentração de DENVC para análise de NCLPs por AFM. ....	59
<b>Figura 14</b> - Imagens de AFM de NCLPs após montagem <i>in vitro</i> . ....	61
<b>Figura 15</b> - Efeito da superfície da mica neutralizada na formação de NCLPs de DENVC ...	63
<b>Figura 16</b> - Imagens de MET de NCLPs após montagem <i>in vitro</i> . ....	66
<b>Figura 17</b> - Micrografias eletrônicas de NCLPs na presença de oligonucleotídeo 25-mer.....	67
<b>Figura 18</b> - Especificidade da montagem de NCLPs de DENVC em superfícies negativamente carregadas. ....	68
<b>Figura 19</b> - Análise do potencial eletrostático de superfície da proteína C de flavivírus.....	69
<b>Figura 20</b> - Outros fatores podem contribuir para a montagem de NCLPs.....	71
<b>Figura 21</b> -Representação esquemática de possíveis PTMs em DENVC. ....	73
<b>Figura 22</b> - Espectros 1D <sup>31</sup> P de DENVC. ....	75
<b>Figura 23</b> - Western blotting para detecção de fosforilação em DENVC recombinante. ....	77
<b>Figura 24</b> - Identificação de fosforilação em resíduos de Ser e Thr de DENVC por ensaio de western blotting. ....	79

<b>Figura 25</b> - Identificação de metilação em resíduos de Arg e Lys de DENVC por ensaio de western blotting. ....	80
<b>Figura 26</b> - Estrutura do DENV e modelo esquemático da montagem dos NCLPs.....	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Predição de modificações pós-traducionais .....	72
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AFM – Microscopia de força atômica (do inglês, atomic force microscopy)
- APTES - 3-aminopropil-trietoxisilano
- C – Proteína do capsídeo
- Cryo-EM – Criomicroscopia eletrônica (do inglês, cryo-electron microscopy)
- DENV – Vírus dengue
- DENVC – Proteína do capsídeo do vírus dengue
- DIPEA - N,N-diisopropiletilamina
- dsDNA – DNA de fita dupla sendo positivo
- E – Proteína do envelope
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, ethylenediamine tetraacetic acid)
- Fab – Fragmento de ligação ao antígeno (do inglês, fragment antigen-binding)
- HCV – Vírus da hepatite C (do inglês, Hepatitis virus C)
- HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidroxi-1-piperazin-1-il-etanosulfônico)]
- IPTG - Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida
- ITC – Calorimetria de titulação isotérmica (do inglês, isothermal titration calorimetry)
- JEV – Vírus da encefalite japonesa (do inglês, Japanese encephalitis virus)
- JEVC - Proteína do capsídeo do vírus da encefalite japonesa
- LDs – Gotículas lipídicas (do inglês, lipid droplets)
- LLPS – Separação de fase líquido-líquido (do inglês, liquid-liquid phase separation)
- M – Proteína de membrana
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- NC – Nucleocapsídeo
- NCLP – Partículas semelhantes a nucleocapsídeo (do inglês, nucleocapsid-like particles)
- NS – Proteínas não-estruturais
- N-terminal IDR – Região N-terminal intrinsecamente desordenada (do inglês, N-terminal intrinsically disordered region)
- PKC - Proteína quinase C
- prM – Proteína pré-membrana
- PTM – Modificação pós-traducional (do inglês, post-translational modification)
- RE – Retículo endoplasmático
- RMN – Ressonância magnética nuclear



SARS-CoV2 - Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (do inglês, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

SAXS – Espalhamento de luz a baixo ângulo (do inglês, small angle X-ray scattering)

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SPOV – Vírus Spondweni (do inglês, Spondweni virus)

ssDNA – DNA de fita simples senso positivo

ssRNA - RNA de fita simples de sentido positivo

TBEV – Vírus da encefalite transmitida pelo carrapato (do inglês, tick-borne encephalitis virus)

TGN – Trans-Golgi network (rede trans-golgi)

TX-100 – Triton-100

WNV – Vírus do Oeste do Nilo (do inglês, west nile virus)

WNVC – Proteína do capsídeo do vírus do Oeste do Nilo

WT – Tipo selvagem (do inglês, wild type)

YFV – Vírus da febre amarela (do inglês, yellow fever virus)

YFVC – Proteína do capsídeo do vírus da febre amarela

ZIKV – Vírus Zika

ZIKVC - Proteína do capsídeo do vírus Zika

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>Flavivírus: Dengue.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Ciclo replicativo dos flavivírus .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Estrutura da partícula viral dos flavivírus.....</b>	<b>23</b>
<b>1.4</b>	<b>Proteína do capsídeo dos flavivírus.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Proteína do capsídeo do vírus dengue.....</b>	<b>26</b>
1.4.1.1	Interação da proteína do capsídeo de flavivírus com ácidos nucleicos e montagem do nucleocapsídeo: foco no vírus dengue .....	28
1.4.1.2	Interação da proteína do capsídeo de flavivírus com interfaces lipídicas: foco no vírus dengue .....	30
<b>1.5</b>	<b>Técnicas utilizadas para o estudo de capsídeos.....</b>	<b>32</b>
<b>1.6</b>	<b>Modificações pós-traducionais .....</b>	<b>34</b>
<b>1.6.1</b>	<b>Modificações pós-traducionais em proteínas do capsídeo e consequências para a infecção viral.....</b>	<b>37</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Modificações pós-traducionais na proteína do capsídeo de flavivírus.....</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Análise da montagem de NCLPs.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Expressão e purificação de DENVC.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Preparo de oligonucleotídeos de DNA .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Espalhamento de luz a baixo ângulo – SAXS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Espalhamento de luz estático .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Anisotropia de fluorescência.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Estudo sobre a montagem de NCLPs por AFM .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.7</b>	<b>Neutralização de carga da mica (AP-Mica) para avaliar o efeito de superfície na montagem de NCLPs.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.8</b>	<b>Processamento e análise de imagens de AFM.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1.9</b>	<b>Estudo da montagem de NCLPs por MET.....</b>	<b>48</b>

4.1.10	Análise do potencial eletrostático de superfície de DENVC .....	49
4.1.11	Análise estatística .....	49
4.2	Identificação de PTMs em DENVC .....	49
4.2.1	Identificação de PTMs em DENVC através de análises de bioinformática .....	49
4.2.2	Identificação da presença de fosforilação em DENVC recombinante por RMN ..	50
4.2.3	Preparo de DENVC recombinante para ensaios de western blotting .....	51
4.2.4	Tratamento de DENVC recombinante com fosfatase .....	51
4.2.5	Infecção de células Huh7 com DENV .....	51
4.2.6	Preparo de extrato de proteínas .....	52
4.2.7	Ensaio de western blotting .....	52
5	RESULTADOS .....	54
5.1	Estudo em solução da montagem in vitro de NCLPs .....	54
5.2	Análise da montagem in vitro de NCLPs por técnicas de microscopia .....	58
5.2.1	Análise de NCLPs por AFM .....	58
5.2.1.1	Determinação da influência do efeito de superfície para a montagem de partículas NCLPs por AFM .....	62
5.2.2	Análise de montagem in vitro de NCLPs por MET .....	63
5.3	Análise do potencial eletrostático de superfície de DENVC .....	69
5.4	Análise de possíveis fatores que contribuem para a obtenção de NCLPs .....	70
5.5	Resultados preliminares da identificação de PTMs em DENVC .....	72
5.5.1	Identificação de PTMs em DENVC através de análises de bioinformática .....	72
5.5.2	Identificação da presença de fosforilação em DENVC recombinante por RMN ..	74
5.5.3	Identificação de PTMs em DENVC através de ensaios de western blotting .....	76
5.5.3.1	Ensaio de western blotting com DENVC recombinante .....	76
5.5.3.2	Ensaio de western blotting com DENVC expressa por células de mamífero .....	78
6	DISCUSSÃO .....	81
7	CONCLUSÃO .....	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92
	ANEXOS .....	102

# 1 INTRODUÇÃO

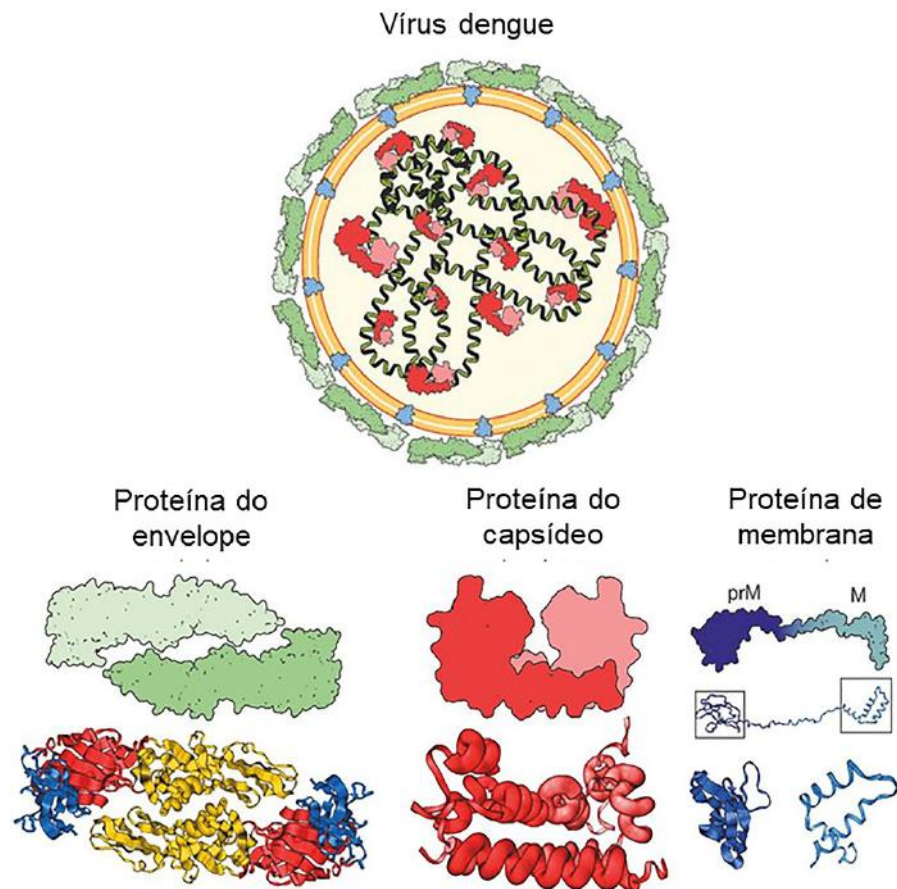
## 1.1 Flavivírus: Dengue

Os principais arbovírus de interesse em saúde pública pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que compreende mais de 50 vírus transmitidos por artrópodes. Pertencem ao gênero os vírus dengue (DENV), vírus do Oeste do Nilo (WNV, do inglês *West Nile Virus*), vírus da encefalite japonesa (JEV, do inglês *Japanese encephalitis virus*), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV, do inglês *Tick-borne encephalitis virus*), vírus da febre amarela (YFV, do inglês *Yellow Fever Virus*), vírus Spondweni (SPOV, do inglês *Spondweni virus*), vírus Zika (ZIKV), entre outros (Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR), 2022).

Atualmente, DENV causa aproximadamente 400 milhões de infecções anuais, colocando pelo menos 2,5 bilhões de pessoas em risco no mundo (PIERSON; DIAMOND, 2020). O Brasil é considerado um país endêmico para dengue, com aproximadamente 535.000 casos prováveis, 364 casos confirmados de dengue grave e 4.285 casos de dengue com sinais de alarme, em 2021 (BRASIL, 2021). A infecção aguda por flavivírus pode apresentar uma variedade de manifestações clínicas, podendo resultar desde doença branda (infecção assintomática ou episódios febris) a grave e com risco de vida (febre hemorrágica, síndrome de choque da dengue, encefalite, paralisia, defeitos congênitos, hepatite e insuficiência hepática) (HARAPAN *et al.*, 2020; PIERSON; DIAMOND, 2020). Apesar de os flavivírus causarem doenças importantes do ponto de vista de saúde pública, determinados aspectos do seu ciclo infeccioso, principalmente reconhecimento do genoma viral e montagem do NC, ainda são muito pouco compreendidos (BYK; GAMARNIK, 2016; TAN; FIBRIANSAH; LOK, 2020).

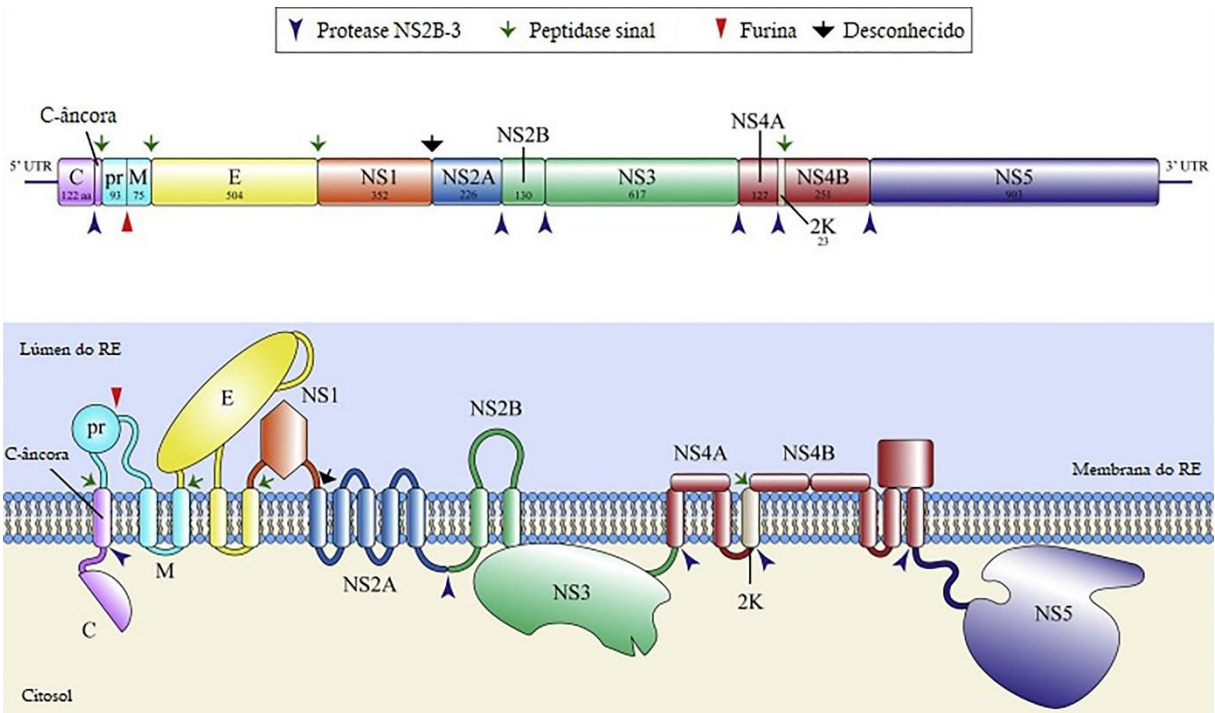
## 1.2 Ciclo replicativo dos flavivírus

Os flavivírus são vírus envelopados, cuja partícula viral madura consiste em uma estrutura esférica com cerca de 50 nm de diâmetro e simetria icosaédrica, formada por uma bicamada lipídica associada a duas proteínas estruturais, as proteínas de membrana (M) e de envelope (E) (KUHN *et al.*, 2002). No interior da partícula, o nucleocapsídeo (NC) é composto pelo genoma viral, um RNA de fita simples de sentido positivo (ssRNA) (~11 kb), empacotado pela proteína do capsídeo (C) (BARROWS *et al.*, 2018) (**Figura 1**).



**Figura 1** - Representação esquemática da estrutura do DENV. A partícula de DENV possui simetria icosaédrica sendo composta pelo envelope lipídico (laranja) revestido externamente pelas glicoproteínas E (verde) e com proteínas de membrana (prM/M) inseridas (azul). Internamente, está representado o NC, formado pelo genoma de ssRNA (linha preta em formato de mola), de aproximadamente 11 kb, associado a proteína C (vermelho). No painel inferior, estão representadas as proteínas estruturais (E, C e prM/M) que compõem a partícula viral com suas respectivas estruturas. Os domínios estruturais DI, DII e DIII que compõem a proteína E estão destacados em vermelho, amarelo e azul (Adaptado de CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O genoma dos flavivírus é traduzido como uma única cadeia polipeptídica, na membrana do retículo endoplasmático (RE). Durante o ciclo de replicação viral, esta proteína, que na verdade é uma poliproteína, é clivada pela protease viral e por proteases celulares dando origem a sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e as três proteínas estruturais citadas anteriormente, C, pré-membrana/membrana (prM/M) e E (BARROWS *et al.*, 2018; PIERSON; DIAMOND, 2020) (**Figura 2**).



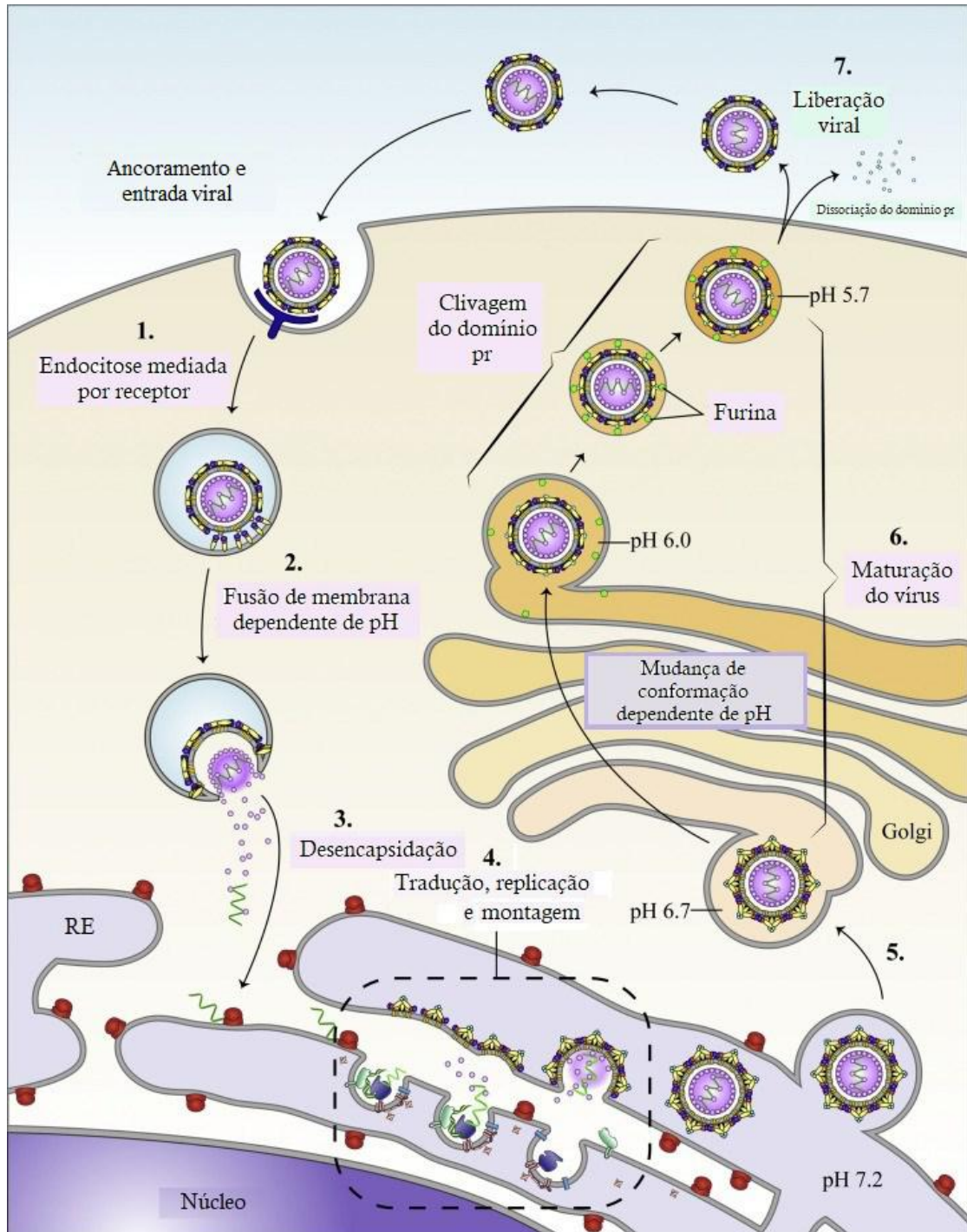
**Figura 2** - Desenho esquemático do genoma de flavivírus e da poliproteína. O RNA viral (parte superior da figura) é transcrito e traduzido em uma única poliproteína, que atravessa várias vezes a membrana do RE (parte inferior da figura). A poliproteína é processada, passando por modificações pós-traducionais e pela ação de proteases do hospedeiro - peptidase sinal (seta verde), furina (ponta de seta vermelha) e proteases desconhecidas (seta preta), e pela protease viral – NS2B-3 (ponta de seta azul), dando origem às proteínas virais estruturais (C, E e M) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Adaptado de NICHOLLS; SEVVANA; KUHN, 2020).

A proteína E desempenha um importante papel na entrada do vírus, uma vez que se liga a proteínas presentes na superfície da célula hospedeira que atuam como receptores virais, como as integrinas  $\alpha\beta$ , receptores de lectina tipo C e receptores de fosfatidilserina (LAURETI *et al.*, 2018). Essa interação permite a internalização da partícula viral através de um processo de endocitose mediada por clatrina (SMIT *et al.*, 2011). Após a endocitose, o endossomo passa por um processo de maturação, durante o qual há o bombeamento de prótons para o seu interior, por uma bomba de prótons dependente de ATP. A redução do pH desencadeia a alteração da conformação das glicoproteínas E, levando a fusão das membranas viral e endossomal, e consequente liberação do NC no citoplasma. Dessa forma, a proteína C se dissocia do RNA genômico, que é direcionado para o RE, onde é diretamente traduzido (já que é um ssRNA) ou replicado (BARROWS *et al.*, 2018).

Após a tradução, as proteínas NS atuam na replicação do material genético viral nos complexos de replicação associados às membranas celulares e na evasão da resposta imune do hospedeiro (BARROWS *et al.*, 2018; ZEIDLER *et al.*, 2017), enquanto as proteínas estruturais são utilizadas na produção de partículas virais e transporte do genoma viral. A proteína C de

DENV (DENV C), primeira proteína traduzida, está conectada à prM na sequência primária da poliproteína através de um peptídeo hidrofóbico. A protease NS3, associada ao cofator NS2B, medeia a clivagem proteolítica liberando a proteína C solúvel, deixando uma pequena porção imatura na membrana do RE, conhecida como C-âncora. Essa porção funciona como um peptídeo sinal que transfere prM para o lúmen do RE. A proteína C desempenha um papel essencial no reconhecimento do RNA viral recém-sintetizado e formação do NC (BYK; GAMARNIK, 2016).

Após a montagem do NC, ele brota no lúmen do RE, adquirindo a bicamada lipídica e as duas outras proteínas estruturais do vírus, a proteína E e o prM, que formam a partícula viral imatura. Essa partícula é transportada através da rede trans-Golgi (TGN, do inglês, *trans-Golgi network*), onde o baixo pH promove sua maturação devido a mudanças conformacionais na glicoproteína E, e subsequente clivagem do pr do prM pela furina, dando origem à proteína M, e promovendo a liberação da partícula viral madura (BYK; GAMARNIK, 2016; NICHOLLS; SEVVANA; KUHN, 2020). O ciclo replicativo descrito está representado na **Figura 3**.



**Figura 3** - Ciclo de replicação dos flavivírus. Primeiramente, (1) os flavivírus se ancoram às células hospedeiras e são reconhecidos por receptores presentes em sua superfície, sendo internalizados por endocitose mediada por clatrina. (2) Em baixo pH, as glicoproteínas E sofrem alterações conformacionais permitindo a fusão do envelope viral com o endossomo, levando à liberação do NC no citoplasma. (3) Com a liberação do NC, ocorre a dissociação da proteína C do RNA viral. (4) O RNA viral é então transportado para o RE onde é traduzido e replicado. A replicação do RNA viral ocorre em invaginações de membrana conhecidas como complexos de replicação, nas quais as proteínas NS recém-traduzidas atuam. A montagem da partícula viral ocorre na membrana do RE. O RNA viral recém-sintetizado se associa com a proteína C, sendo o NC em seguida envolvido pela membrana do RE contendo as glicoproteínas para a formação da partícula viral imatura. (5) As partículas imaturas recém-montadas brotam no lúmen do RE e são transportados através do TGN. (6) O processo de maturação ocorre no baixo pH do TGN que promove alterações conformacionais da glicoproteína E e subsequente clivagem do domínio pr da proteína prM pela furina. (7) Após a clivagem, ocorre a fusão da vesícula secretora com a membrana plasmática, liberando o domínio pr e a partícula viral madura no ambiente extracelular como um vírus infeccioso (Adaptado de NICHOLLS; SEVVANA; KUHN, 2020).

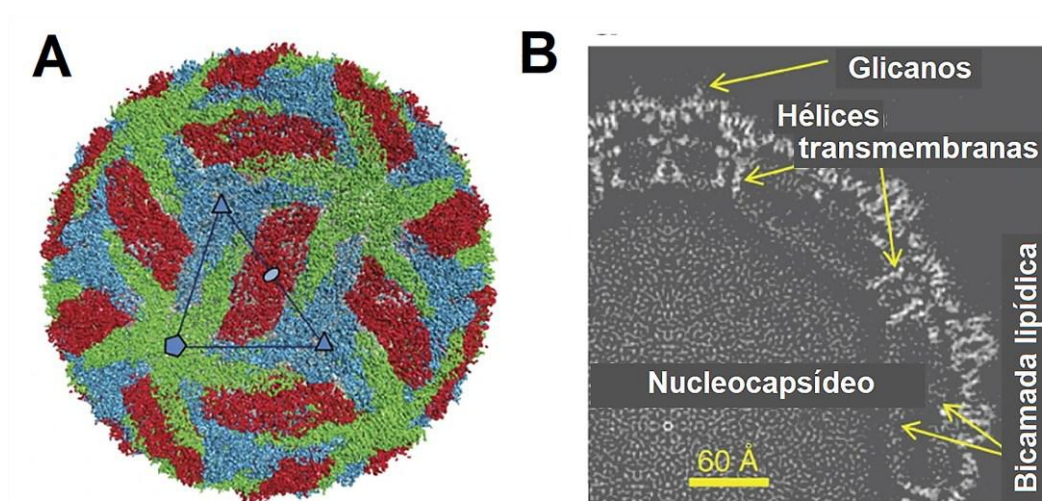


Embora o ciclo replicativo de DENV esteja bem elucidado, os mecanismos moleculares envolvidos em algumas de suas etapas ainda são desconhecidos. As principais questões em aberto referem-se aos processos que envolvem DENVC, incluindo como se dão: (i) o desnudamento do RNA após a entrada do vírus na célula, (ii) o recrutamento do RNA viral e a montagem do NC, e (iii) o direcionamento do NC para o lúmen do RE. O papel chave de DENVC nestes processos torna o estudo dessa proteína especialmente interessante.

### 1.3 Estrutura da partícula viral dos flavivírus

Os estudos utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de alta resolução, como criomicroscopia eletrônica (cryo-EM, do inglês *cryo-electron microscopy*), têm fornecido detalhes estruturais das partículas maduras de flavivírus, incluindo a organização das proteínas E e M na superfície do vírus. Atualmente estão disponíveis reconstruções em alta resolução obtidas por cryo-EM da partícula madura de flavivírus como DENV (ZHANG, X. *et al.*, 2013), WNV (ZHANG, W. *et al.*, 2013), ZIKV (SIROHI *et al.*, 2016), JEV (WANG *et al.*, 2017) e TBEV (FÜZIK *et al.*, 2018).

As estruturas obtidas revelaram que as partículas apresentam uma simetria icosaédrica e uma superfície lisa coberta por 180 cópias das proteínas E e M. No interior da partícula, o NC foi mostrado com baixa densidade eletrônica rodeado pela bicamada lipídica e pelas proteínas estruturais E e M, sendo considerado uma estrutura desordenada e amorfa (**Figura 4**) (KUHN *et al.*, 2002; SIROHI *et al.*, 2016; ZHANG, W. *et al.*, 2003; ZHANG, X. *et al.*, 2013).

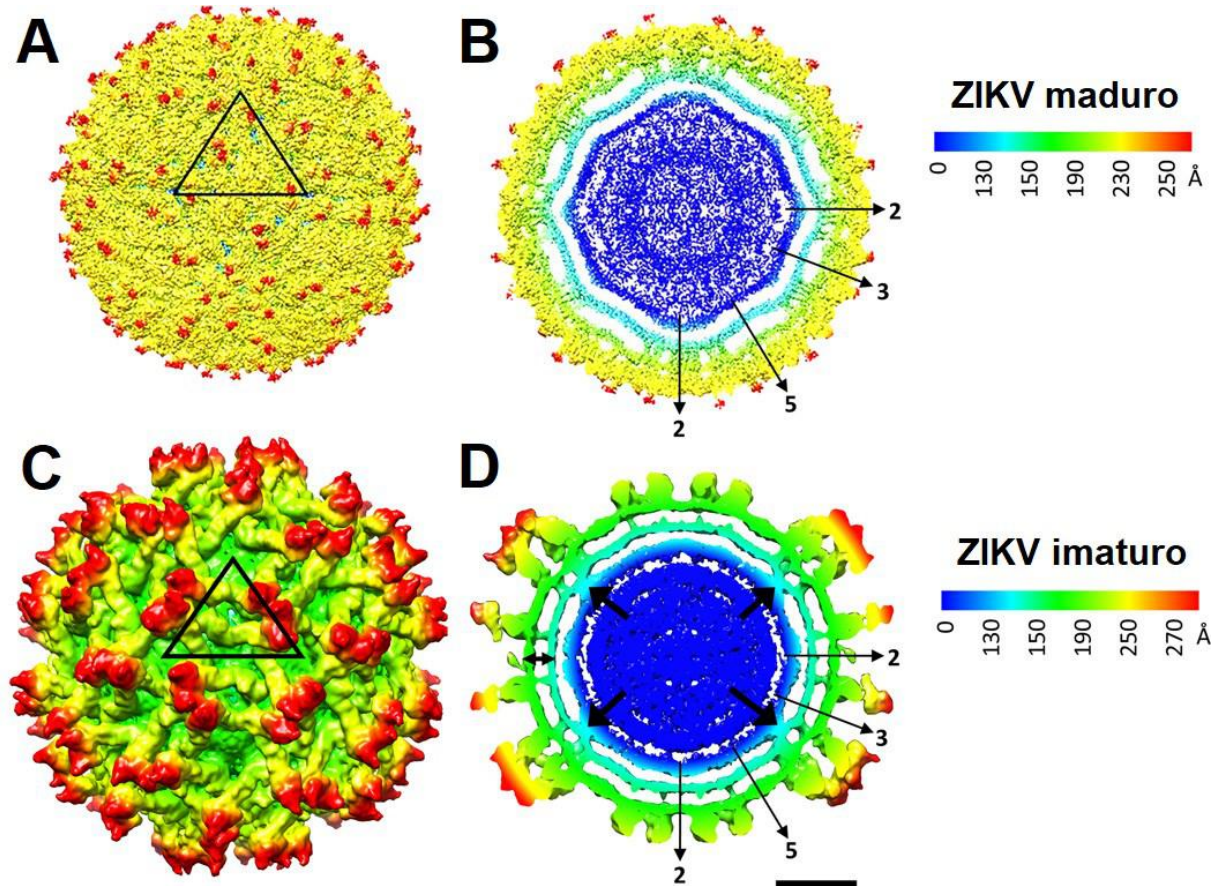


**Figura 4** - Estrutura da partícula madura de DENV determinada por cryo-EM. (A) Representação da reconstrução da partícula madura de DENV a partir de um mapa de densidade de cryo-EM, com resolução de 3,5 Å. Os heterodímeros E-M com a mesma simetria icosaédrica estão representados pela mesma cor (azul, verde ou vermelho). Os heterodímeros E-M em verde representam o eixo de quinta ordem (5-fold, pentágono) da simetria icosaédrica, enquanto os em azul refletem o eixo de terceira ordem (3-fold, triângulo), e os vermelhos, o eixo de

segunda ordem (*2-fold*, círculo oval). Em **(B)** está representada uma fatia central do mapa de densidade de cryo-EM perpendicular ao eixo de simetria de terceira ordem. O NC com baixa densidade e sem definição estrutural pode ser visualizado (Adaptado de ZHANG, X. *et al.*, 2013).

Existem algumas hipóteses para explicar a aparente ausência de organização do NC de flavivírus: (i) a estrutura do NC é icosaédrica, mas seus eixos de simetria não se alinham com a camada externa de glicoproteínas; (ii) o NC tem uma estrutura assimétrica com orientação aleatória; ou (iii) o NC pode ser altamente dinâmico, e portanto, não assumir uma estrutura única dentro da partícula viral (ZHANG, W. *et al.*, 2003; ZHANG; KOSTYUCHENKO; ROSSMANN, 2007). Dessa forma, considerando a ausência de estruturas de alta resolução do NC, informações estruturais acerca da simetria e do número exato de cópias da proteína C associadas ao genoma viral ainda não foram determinadas para os flavivírus. Essa escassez de informações reforça a importância do estudo da proteína C para a compreensão dos eventos que resultam na montagem do NC, além de outros processos coordenados por esta proteína durante a infecção viral.

Prasad e colaboradores mostraram a existência de alguma ordem no NC de partículas imaturas de ZIKV com resolução de 9 Å (PRASAD *et al.*, 2017). Os autores observaram uma densidade eletrônica residual compatível com o tamanho e forma do dímero da proteína C. No entanto, não foi possível obter nenhum detalhe estrutural acerca do NC (PRASAD *et al.*, 2017) (**Figura 5**). Além disso, essa observação foi feita somente para ZIKV imaturo. As estruturas de partículas imaturas de outros flavivírus, como DENV, WNV e SPOV, não apresentaram densidades correspondentes à proteína C (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2013; RENNER *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2007; ZHANG, Y. *et al.*, 2003).



**Figura 5** - Estrutura da partícula viral madura e imatura de ZIKV determinadas por cryo-EM. A superfície das partículas está representada em (A) e (C). Os cortes transversais de ZIKV maduro e imaturo foram coloridos radialmente e estão representados em (B) e (D). As setas pretas em (D) indicam a densidade entre o NC e a membrana viral, enquanto a seta de duas pontas mostra as camadas interna e externa da membrana. A unidade assimétrica é dada como um triângulo preto nos painéis A e C. A barra de escala tem 100 Å de comprimento (Adaptado de PRASAD *et al.*, 2017).

Recentemente, Tan e colaboradores obtiveram informações estruturais e observaram densidade eletrônica no NC de uma partícula imatura de ZIKV, estabilizada com fragmentos Fab de anticorpos monoclonais, DV62.5, que se liga às proteínas prM e E. Os autores mostraram uma subpopulação de ZIKVC que possui 116 aminoácidos, uma vez que a hélice  $\alpha 5$  transmembrana não foi clivada pela protease NS2B/NS3. Dessa forma, os dímeros de proteína C interagiriam hidrofobicamente através das hélices  $\alpha 5$ , e se complexariam com as proteínas prM e E para a formação de uma partícula viral imatura (TAN *et al.*, 2020). No entanto, possivelmente a construção utilizada induz a ordem de forma artificial, uma vez que ZIKVC fica ancorado no envelope, indo contra todos os estudos existentes que mostraram a falta de ordem do NC dos flavivírus (KUHN *et al.*, 2002; SIROHI *et al.*, 2016; ZHANG, W. *et al.*, 2003; ZHANG, X. *et al.*, 2013; ZHANG, Y. *et al.*, 2003).

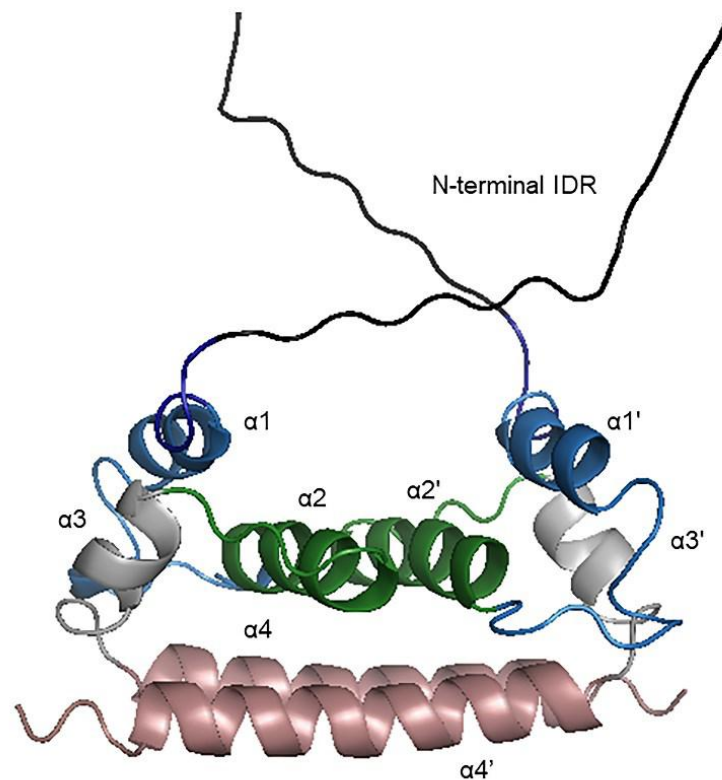
## 1.4 Proteína do capsídeo dos flavivírus

O papel canônico da proteína C é o reconhecimento e proteção do genoma viral garantindo uma montagem eficiente do NC. No entanto, essa proteína possui grande versatilidade, estando envolvida em diversas funções essenciais para a infecção viral (BYK; GAMARNIK, 2016).

Existem hoje seis estruturas em resolução atômica disponíveis para as proteínas C de flavivírus: quatro estruturas determinadas por difração de raios-X, para DENVC (XIA *et al.*, 2020), WNVC (DOKLAND *et al.*, 2004), ZIKVC (SHANG *et al.*, 2018) e JEVC (POONSIRI *et al.*, 2019); e duas estruturas determinadas por ressonância magnética nuclear (RMN), para DENVC (MA *et al.*, 2004) e ZIKVC (MORANDO *et al.*, 2019). As proteínas C dos flavivírus compartilham grande homologia estrutural e de distribuição de cargas, embora suas sequências primárias possuam baixa homologia. A análise dessas estruturas revelou particularidades, que a tornam estruturalmente únicas (FAUSTINO *et al.*, 2019; NEVES-MARTINS *et al.*, 2021).

### 1.4.1 Proteína do capsídeo do vírus dengue

A primeira estrutura de proteína C de flavivírus obtida foi a de DENVC, resolvida em solução por RMN, em 2004, por Ma e colaboradores. Trata-se de uma pequena proteína alfa-helicoidal, altamente positiva, que se apresenta como um homodímero estável em solução. Cada monômero é formado por quatro  $\alpha$ -hélices ( $\alpha 1$ – $\alpha 4$ ) ligadas por pequenos loops e uma região N-terminal intrinsecamente desordenada (N-terminal IDR) (MA *et al.*, 2004; MORANDO *et al.*, 2019; NEVES-MARTINS *et al.*, 2021) (**Figura 6**).



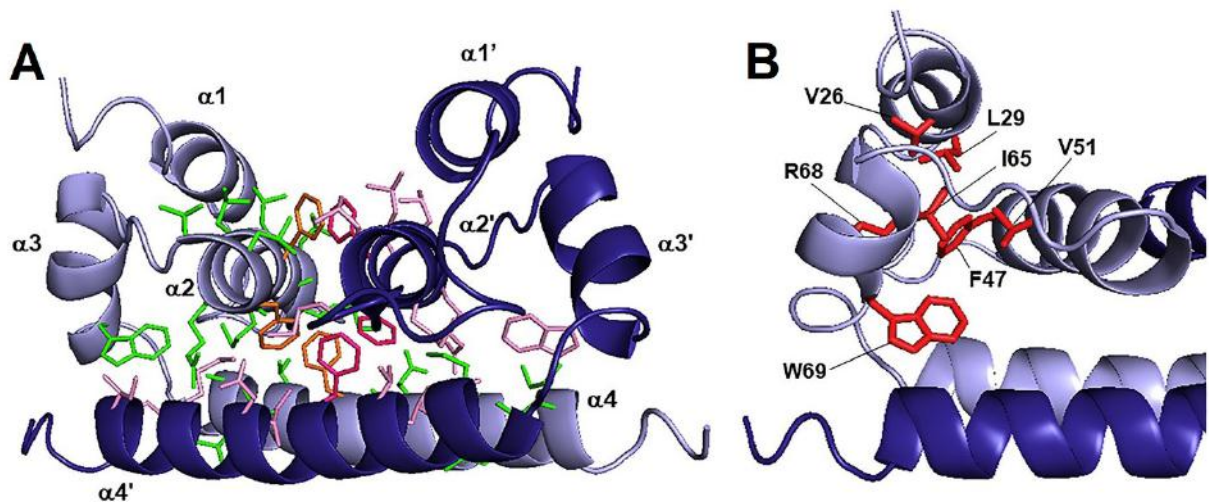
**Figura 6** - Estrutura tridimensional de DENV C determinada por RMN. A estrutura dimérica de DENV C é organizada em quatro hélices ( $\alpha 1/\alpha 1'$  em azul;  $\alpha 2/\alpha 2'$ , verde;  $\alpha 3/\alpha 3'$ , cinza; e  $\alpha 4/\alpha 4'$ , rosa) interconectadas por *loops*. O N-terminal IDR de cada monômero está representado por uma linha preta sem estrutura definida, representando a sua flexibilidade. A representação com vista lateral do dímero de DENV C foi gerada no PyMOL (PDB ID: 1R6R).

O N-terminal IDR é uma região flexível e rica em resíduos carregados positivamente. A região que conecta as hélices  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , bem como toda a hélice  $\alpha 2$ , é composta principalmente por resíduos hidrofóbicos, gerando um núcleo hidrofóbico, composto pelas cadeias laterais de Val 26, Leu 29, Phe 47, Val 51, Ile 65, Arg 68 e Trp 69, localizados em  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ . Na face oposta, as hélices  $\alpha 4/\alpha 4'$  concentram a maior parte da carga positiva da proteína (MA *et al.*, 2004).

No núcleo hidrofóbico, os resíduos Arg 68 e Trp 69 são fundamentais para a estabilidade estrutural da proteína, e são conservados entre os flavivírus. O Trp 69 desempenha um papel crucial na estabilização do dímero devido à orientação do seu anel indol, que é direcionado para o C-terminal do monômero adjacente (MA *et al.*, 2004).

A superfície dimérica de DENV C é composta principalmente pelas hélices antiparalelas  $\alpha 2/\alpha 2'$  e  $\alpha 4/\alpha 4'$ , onde se encontram a maior parte das interações responsáveis pela estabilização do dímero e proteção da superfície hidrofóbica da exposição ao solvente (MA *et al.*, 2004). Uma característica interessante observada em todas as estruturas disponíveis, é a predominância de contatos quaternários realizados pela hélice  $\alpha 4$  com as subunidades vizinhas, principalmente

com  $\alpha 2'$ ,  $\alpha 3'$  e  $\alpha 4'$ , como fica evidente na **Figura 7**. Os contatos terciários, por sua vez, estão restritos às cadeias laterais conservadas do núcleo hidrofóbico, composto pelas hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ , que circundam o Trp 69 (BHUVANAKANTHAM; NG, 2005; MA *et al.*, 2004) (**Figura 7B**).



**Figura 7** - Contatos quaternários e terciários de DENVC. (A) Representação da vista lateral de DENVC dimérica (PDB: 1R6R), com um monômero ( $\alpha 1$ – $\alpha 4$ ) colorido em azul claro e o outro ( $\alpha 1'$ – $\alpha 4'$ ) em azul escuro. As cadeias laterais dos resíduos possivelmente envolvidos em contatos quaternários são coloridas diferentemente para representar os resíduos de cada monômero, verde para os resíduos de  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ ; e rosa para os de  $\alpha 2'$ ,  $\alpha 3'$  e  $\alpha 4'$ . Estes contatos são predominantes na estrutura e estabilizam o dímero. Também são destacadas as cadeias laterais de resíduos de fenilalanina conservados envolvidos nas interações  $\pi$ -stacking, destacadas em laranja (F53, F56 e F84) e magenta (F53', F84' e F56'). (B) Os resíduos envolvidos em contatos terciários, que estão restritos às interações entre as cadeias laterais dos resíduos  $\alpha 1$  (V26, L29),  $\alpha 2$  (F47, V51) e  $\alpha 3$  (I65, R68, W69), estão indicados em vermelho (Adaptado de NEVES-MARTINS *et al.*, 2021).

Tomados em conjunto, os contatos quaternários e terciários são importantes para a estabilização do dímero, justificando a existência da proteína neste estado em solução. Além disso, a presença de pontes salinas (formada pelo resíduo Glu 87 com Lys 45 e Arg 55') e três interações  $\pi$ -stacking envolvendo resíduos de fenilalanina (Phe/F) conservados (F53/F53', F56/F84' e F56'/F84, coloridos em laranja e magenta na **Figura 7A**), também contribuem para a estabilização do dímero (MA *et al.*, 2004; NEVES-MARTINS *et al.*, 2021).

#### 1.4.1.1 Interação da proteína do capsídeo de flavivírus com ácidos nucleicos e montagem do nucleocapsídeo: foco no vírus dengue

A interação da proteína C de flavivírus com ácidos nucleicos tem sido explorada a partir de diferentes abordagens experimentais. Ensaio de mobilidade eletroforética em gel foram

realizados para avaliar a propriedade de ligação de JEVC e ZIKVC a fragmentos de DNA (LI *et al.*, 2018; TSENG *et al.*, 2007). Ambos os estudos demonstraram a capacidade dessas proteínas se ligarem a DNA. Mutações no núcleo hidrofóbico de JEVC interromperam a interação com DNA, demonstrando a importância dessa região nestes eventos (TSENG *et al.*, 2007). Para ZIKVC, mutações que extinguem resíduos positivos em toda a extensão da proteína interromperam sua capacidade de ligação ao DNA, sugerindo que estes resíduos estão envolvidos na interação com ácidos nucleicos e montagem do NC (LI *et al.*, 2018). Além disso, ensaios de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) mostraram que ZIKVC pode se ligar a pequenos oligonucleotídeos de RNA ou DNA (12-mer), fita simples ou dupla fita, com uma alta afinidade (na ordem de nanomolar) (SHANG *et al.*, 2018). Dessa forma, a ligação da proteína C a ácidos nucleicos é inespecífica e parece ser impulsionada principalmente por interações eletrostáticas (BYK; GAMARNIK, 2016).

Teoh e colaboradores avaliaram a importância das hélices  $\alpha 4/\alpha 4'$  para formação do NC e produção de partículas virais infecciosas. A construção de um clone infeccioso de DENV expressando DENVC com uma mutação dupla nos resíduos Arg 85 e Lys 86 (R85A/K86A) resultou em uma DENVC funcional, mas resultou em partículas virais com infecciosidade reduzida (TEOH *et al.*, 2014). Recentemente, foi demonstrado que a presença de mutações na interface dimérica formada pelas hélices  $\alpha 2/\alpha 2'$  e  $\alpha 4/\alpha 4'$  perturba a estabilidade estrutural e impede a interação de DENVC com ácidos nucleicos. Isso acontece principalmente quando os resíduos Leu 81 e Ile 88 são mutados, reforçando a importância das hélices  $\alpha 4/\alpha 4'$  (FIGUEIRA-MANSUR *et al.*, 2019). De forma similar, os resíduos de Leu 81 e Val 88 de YFVC apresentaram importância para a manutenção do dímero e produção de partículas infecciosas (PATKAR *et al.*, 2007).

A montagem do NC é um processo complexo e finamente coordenado, que depende de eventos como o reconhecimento do genoma viral pela proteína C, e sua interação com componentes celulares e virais. Dessa forma, o estudo da formação do NC é bastante desafiador e a falta de informações acerca destes processos dificulta abordagens experimentais como o isolamento de NC de células infectadas (BYK; GAMARNIK, 2016; JONES *et al.*, 2003; WELSCH *et al.*, 2009).

Apesar destas dificuldades, o isolamento de NC de vírions obtidos a partir de células infectadas foi descrito para TBEV (KIERMAYR *et al.*, 2004) e DENV2 (TEOH *et al.*, 2014), com o uso de detergentes específicos para a remoção do envelope viral. Em ambos os flavivírus, as partículas obtidas após o tratamento da partícula viral com Triton-100 (TX-100) apresentaram tamanho compatível com o NC, em torno de 30 nm (KIERMAYR *et al.*, 2004;

TEOH *et al.*, 2014). No entanto, foi relatada grande dificuldade nestas abordagens experimentais devido à forte agregação e baixa estabilidade, durante e após o processo de tratamento com detergentes e separação do envelope viral. Somente 50% das partículas de NC de TBEV foram obtidas sem agregação (KIERMAYR *et al.*, 2004), e as partículas de NC de DENV foram irregulares e pouco estáveis na ausência da bicamada lipídica (TEOH *et al.*, 2014).

Nestes trabalhos também foram obtidas partículas semelhantes a nucleocapsídeo (NCLPs, do inglês *nucleocapsid like particles*) a partir da interação da proteína C recombinante de TBEV (TBEVC) e DENV3 (DENVC3) com ácidos nucleicos (KIERMAYR *et al.*, 2004; TEOH *et al.*, 2014). Para a montagem de NCLPs com TBEVC foram utilizados RNA viral completo transcrito e oligonucleotídeos de DNA (36-mer) (KIERMAYR *et al.*, 2004), enquanto para a montagem com DENVC3, foram utilizados fragmentos de RNA e a interação foi realizada na presença de TX-100 (TEOH *et al.*, 2014). Além deste trabalho, foi relatada para DENV2 a montagem *in vitro* de partículas NCLPs obtidas após a interação de DENVC recombinante com oligonucleotídeos de DNA de diferentes comprimentos (50 e 70-mer) (LÓPEZ *et al.*, 2009).

Recentemente, Kaufman e colaboradores relataram a tentativa malsucedida da obtenção de TBEVC recombinante com sequência completa, e a obtenção de um mutante TBEVC truncado na extremidade N-terminal-IDR (TBEV- $\Delta$ 16-C). O mutante não formou NCLPs quando submetido às mesmas condições experimentais utilizadas para outras proteínas C de flavivírus, como DENVC. Somente agregados e partículas tubulares foram visualizadas por MET. No entanto, apesar de não ter formado NCLPs, outros ensaios demonstraram sua capacidade de ligar ácidos nucleicos (KAUFMAN *et al.*, 2020).

Embora existam relatos de obtenção de NCLPs na literatura, estes ainda são escassos para os flavivírus, especialmente DENV, e não fornecem informações sobre como ocorre a montagem de NCLPs. Os métodos de obtenção utilizados levaram a resultados e observações contraditórias quanto a obtenção dessas partículas de flavivírus.

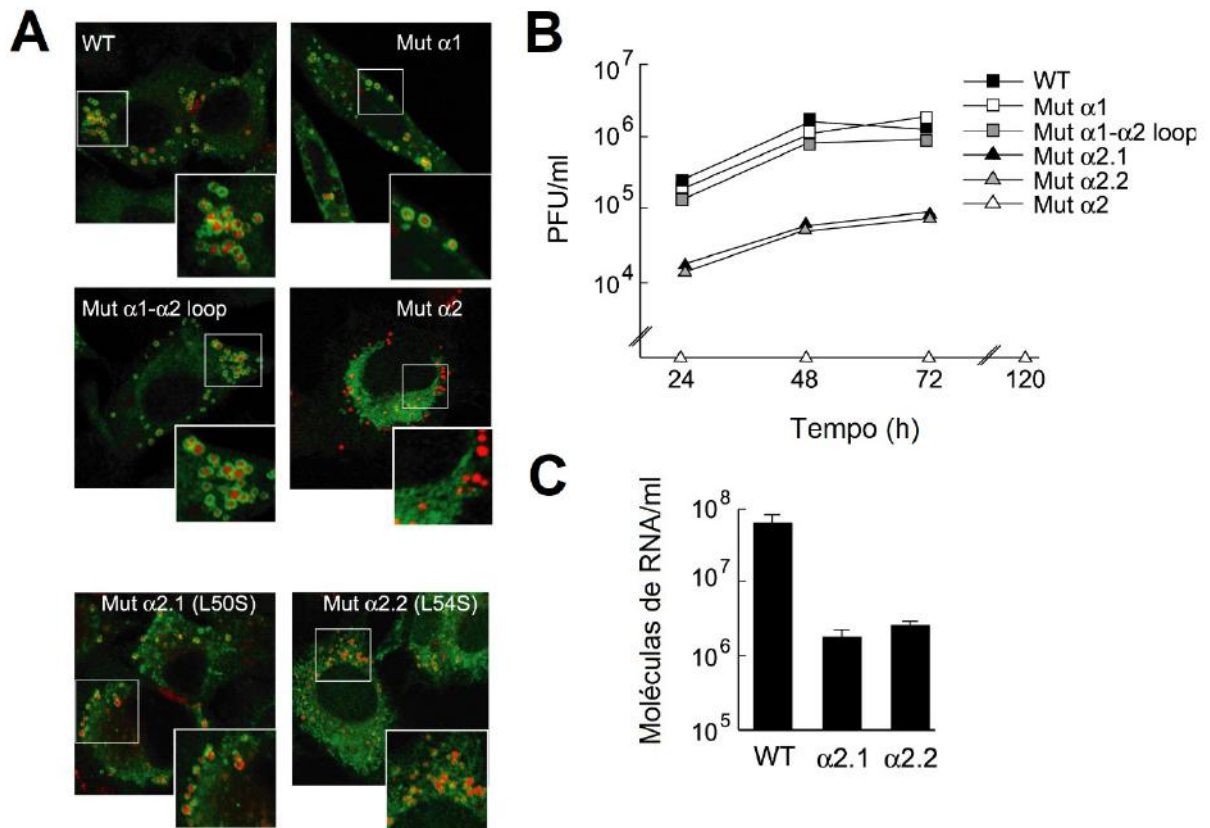
#### 1.4.1.2 Interação da proteína do capsídeo de flavivírus com interfaces lipídicas: foco no vírus dengue

A co-localização e interação entre a proteína C e interfaces lipídicas do hospedeiro, principalmente membranas e organelas derivadas do RE, como gotículas lipídicas (LDs, do inglês, *lipid droplets*), têm sido bem descritas para DENVC (CARVALHO *et al.*, 2012;



FAUSTINO *et al.*, 2014, 2015; MARTINS *et al.*, 2012; SAMSA *et al.*, 2009) e, recentemente, foi descrita também para outros flavivírus como ZIKVC (SHANG *et al.*, 2018), WNVC (MARTINS *et al.*, 2019) e JEVC (ISHIDA *et al.*, 2019). Para todos estes flavivírus, a proteína C se colocaliza com LDs e os resíduos envolvidos nesta interação, localizados no núcleo hidrofóbico  $\alpha 2/\alpha 2'$ , parecem ser conservados (MARTINS *et al.*, 2012).

A localização de DENVC na superfície de LDs foi descrita por nosso grupo de pesquisa, em 2009. Neste trabalho, foi mostrado que a interação de DENVC com LDs, a partir dos resíduos L50 e L54, presentes na fenda hidrofóbica desta proteína, é um evento crucial para a formação de partículas infecciosas de DENV. Mutações em ambos os resíduos (L50S-L54S) interromperam a associação de DENVC a LDs e a produção de partículas virais infecciosas. Com base nesses achados, a superfície de LDs foi sugerida como uma possível plataforma para montagem do NC. Além disso, uma hipótese é que essa interação promove o sequestro de DENVC, prevenindo sua ligação prematura ao RNA e contribuindo para a fina coordenação dos eventos envolvidos na montagem do NC (SAMSA *et al.*, 2009) (**Figura 8**).



**Figura 8** - Interação de DENVC com LDs. (A) A interação de DENVC e LDs foi avaliada por microscopia confocal de células BHK (*baby hamster kidney*) transfectadas com RNA de DENV sem mutações (WT) ou contendo mutações na hélice  $\alpha 1$  (Mut  $\alpha 1$ ), no loop entre  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  (Mut  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  loop), e na hélice  $\alpha 2$  (Mut  $\alpha 2$ ) de DENVC. A mutação da hélice  $\alpha 2/\alpha 2'$  em ambos os resíduos (L50S-L54S) interrompeu o direcionamento de DENVC para as LDs. (B) A quantidade de partículas infecciosas ao longo do tempo foi avaliada por meio de ensaios de plaque, realizados com sobrenadante das células BHK transfectadas com RNA WT ou mutantes. O

gráfico representa as unidades formadoras de placa (PFU) por mL em diferentes tempos pós-transfecção. Não houve produção de partículas virais infecciosas nas condições em que a célula foi transfectada com RNA contendo mutações em  $\alpha 2$ , indicando a importância desses resíduos para a co-localização e para a produção de partículas infecciosas. (C) Células BHK foram infectadas com construções de DENV WT, Mut  $\alpha 2.1$  e Mut  $\alpha 2.2$ , e o RNA viral foi quantificado por RT-PCR, mostrando que a mutação nos resíduos L50 ou L54 reduz a amplificação do RNA viral (Adaptado de SAMSA *et al.*, 2009).

Além dos resíduos localizados em  $\alpha 2/\alpha 2'$ , foi demonstrado que a região N-terminal IDR e *loop* entre as hélices  $\alpha 1/\alpha 1'$  e  $\alpha 2/\alpha 2'$  (L1-2) também participam da interação com LDs. Apesar de não participar diretamente da interação, o loop L1-2 parece promover uma flexibilidade estrutural do N-terminal IDR e modular a orientação da hélice  $\alpha 1/\alpha 1'$ , de modo que os resíduos do N-terminal IDR e da hélice  $\alpha 2/\alpha 2'$  se associem a LDs (MARTINS *et al.*, 2012).

A hélice  $\alpha 1$  possui tamanho e orientações variáveis, como observado nas estruturas resolvidas da proteína C de flavivírus (NEVES-MARTINS *et al.*, 2021). Essa flexibilidade da hélice  $\alpha 1$  modula o equilíbrio conformacional da proteína C nos estados aberto-fechado, e conseqüentemente, a interação da proteína com superfícies intracelulares hidrofóbicas, o que pode ser importante para a montagem do NC. Interessantemente, ZIKVC possui um N-terminal IDR mais longo e uma hélice  $\alpha 1$  mais curta, que influenciam na hidrofobicidade da proteína e na sua interação com as membranas (SHANG *et al.*, 2018).

Recentemente foi proposto um modelo para montagem do NC baseado na separação de fase líquido-líquido (LLPS, do inglês *liquid-liquid phase separation*) e associação com membranas. Segundo esse modelo, a interação entre a proteína C e o genoma viral desencadeia a LLPS para montagem do NC. Dessa forma, as gotículas (“*droplets*”) formadas nesse processo se associariam às membranas do RE durante a formação das partículas virais, estabilizando a interação entre o NC e a membrana, e culminando com o brotamento das partículas virais imaturas no lúmen do RE (AMBROGGIO *et al.*, 2021).

## 1.5 Técnicas utilizadas para o estudo de capsídeos

Diferentes técnicas, como microscopia de força atômica (AFM, do inglês *atomic force microscopy*), MET, difração de raios-X e cryo-EM, têm contribuído para o entendimento da estrutura e montagem de NCs (KONDYLIS *et al.*, 2019). Os eventos que culminam com a montagem do capsídeo são complexos e geralmente, requerem condições ótimas (concentração de sal, temperatura, pH etc.), etapas intermediárias, presença de proteínas *scaffold* (andaimes) ou ácidos nucleicos virais, além de uma coordenação fina para que ocorram corretamente (BRUINSMA; WUITE; ROOS, 2021). A complexidade e importância desses eventos para o

estabelecimento e sucesso da infecção viral tornam seu estudo desafiador. Neste trabalho, a montagem de NCLPs foi avaliada a partir diferentes técnicas em solução e na presença de superfícies, por técnicas de imageamento.

A MET e a difração de raios-X foram técnicas fundamentais para o estudo dos vírus icosaédricos e helicoidais, compreensão da organização dos capsômeros, bem como a distribuição de subunidades proteicas em suas superfícies. Mais recentemente, a cryo-EM permitiu a análise de partículas virais e de sua arquitetura em um estado mais próximo ao fisiológico (GRIGORIEFF; HARRISON, 2011). O AFM é outra importante ferramenta no estudo de estruturas virais (DE PABLO, 2018; KUZNETSOV; MCPHERSON, 2011). Neste tipo de microscopia de varredura, uma sonda contendo uma ponta fina varre o substrato produzindo um perfil topográfico, em escala subnanométrica, das partículas aderidas à superfície. O AFM tem sido aplicado a estudos de cinética de montagem e desmontagem de capsídeos, e no estudo da influência de diferentes superfícies na automontagem de NC (DE PABLO, 2018; VALBUENA; MATEU, 2015, 2017).

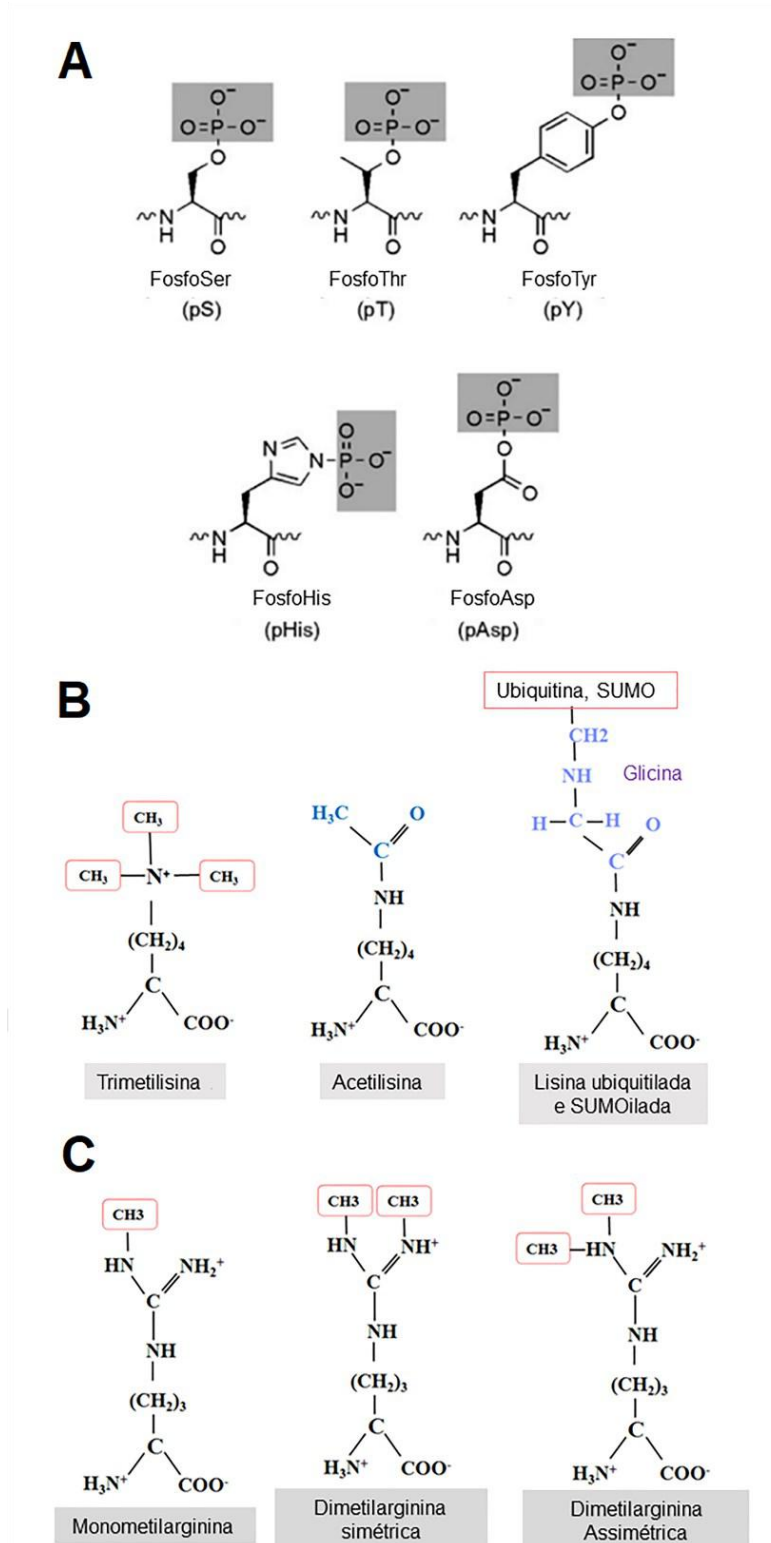
Em solução, pode-se avaliar a formação de NC por espalhamento de luz, espectroscopia de fluorescência, RMN, cromatografia de exclusão de tamanho, entre outras técnicas (KONDYLIS *et al.*, 2019). Em eventos pouco complexos pode-se considerar que as reações de montagem consistam em um equilíbrio entre subunidades de proteínas C e NC montados, que podem ser quantificados por mudança turbidez ou o espalhamento de luz estático (ou Rayleigh) (KONDYLIS *et al.*, 2019). No espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS, do inglês, *small angle X-ray scattering*), uma solução contendo partículas é irradiada com um feixe monocromático de raios-X e seu perfil de espalhamento pode então ser detectado. A radiação espalhada pelas partículas presentes na solução é registrada pela transferência de momento ( $s$ ), que inclui o ângulo de espalhamento  $2\theta$ . A partir dessa técnica é possível avaliar a montagem de capsídeos vazios ou na presença de ácidos nucleicos (KHAYKELSON; RAVIV, 2020).

As diversas técnicas de alta resolução disponíveis contribuem para a aquisição de conhecimentos acerca da montagem, estabilidade e dinâmica dos capsídeos virais, fundamentais para a compreensão da biologia de diversos vírus. A compreensão do processo de oligomerização de proteínas C para formação do NC a partir dessas técnicas pode fornecer *insights* para o entendimento de etapas fundamentais desse evento, como a regulação por outras proteínas, estruturas celulares ou processos, como modificações pós-traducionais, por exemplo.

## 1.6 Modificações pós-traducionais

As modificações pós-traducionais em proteínas (PTMs, do inglês “*Post-Translational Modifications*”) são modificações covalentes que acontecem por adição de grupos químicos a aminoácidos específicos ou eventos de clivagem proteolítica, por exemplo. Estas modificações podem afetar significativamente a estrutura e a dinâmica das proteínas, influenciando a função, estabilidade, distribuição de cargas, interações, localização celular, degradação e sinalização, e assumindo papéis regulatórios essenciais em células procarióticas e eucarióticas (RAMAZI; ZAHIRI, 2021; WALSH; GARNEAU-TSODIKOVA; GATTO, 2005).

A maioria das PTMs são reversíveis e envolvem a transferência de grupos químicos, por enzimas específicas, de uma molécula doadora para resíduos específicos da proteína alvo. Os grupos químicos mais comuns incluem: pequenas proteínas ou polipeptídeos, como a ubiquitina (ubiquitinação) ou proteínas semelhantes à ubiquitina (sumoilação, ISGilação); moléculas complexas, como carboidratos (glicosilação) e ácidos graxos (palmitoilação, miristoilação etc.); um ou mais grupos metil (metilação); grupos fosfato (fosforilação); ou grupos acetato (acetilação) (WALSH; GARNEAU-TSODIKOVA; GATTO, 2005). Algumas dessas PTMs estão exemplificadas na **Figura 9**, e serão detalhadas a seguir.



**Figura 9** - Representação das principais PTMs. (A) Representação das formas fosforiladas das cadeias laterais de aminoácidos em proteínas: fosfoserina (pS), fosfotreonina (pT), fosfotirosina (pY), além de fosforilações em histidina (pHis) e ácido aspártico (pAsp), menos frequentes (Adaptado de WALSH; GARNEAU-TSODIKOVA; GATTO, 2005). (B) Representação de PTMs em resíduos de Lys. A Lys pode ligar até três grupos metil (à esquerda); um único grupo acetil (meio); ou formar uma ligação com a porção C-terminal de uma glicina da ubiquitina ou SUMO (à direita). (C) Representação das três possíveis formas de metilação do resíduo de Arg: adição um grupo metil (monometilarginina) ou dois grupos metil (dimetilarginina), que podem assumir duas disposições, simétrica ou assimétrica (Adaptado de RAMAZI; ALLAVERDI; ZAHIRI, 2020).

A fosforilação é a PTM mais estudada ocorrendo tanto em procariotos quanto eucariotos. Esta modificação inclui a transferência, realizada por enzimas quinases, de um grupo fosfato do trifosfato de adenosina (ATP) para os resíduos de aminoácido da proteína alvo. Os resíduos alvo mais comuns são os grupos hidroxila de Ser e Thr, e menos frequentemente no grupo fenol da cadeia lateral da Tyr. Além destes resíduos, também foi relatada fosforilação em His, Pro, Arg, Asp e Cys (**Figura 9A**). A remoção de um grupo fosfato é uma reação enzimática catalisada por diferentes fosfatases. A adição do grupo fosfato pode perturbar a distribuição de cargas da proteína, podendo levar a mudanças conformacionais, alteração de sítios de ligação, entre outros, sendo essencial em alguns processos regulatórios (RAMAZI; ZAHIRI, 2021; WALSH; GARNEAU-TSODIKOVA; GATTO, 2005).

A metilação é catalisada por metiltransferases, que usam um S-adenosil-L-metionina (SAM) como grupo doador de metila (-CH<sub>3</sub>), que é adicionada a átomos de nitrogênio presentes na cadeia lateral de resíduos de Lys, Arg ou Gln (N-metilação), ou a cadeia carboxila de Glu (O-metilação). A N-metilação envolve a transferência de até três grupos metil para a amina terminal da Lys, enquanto a Arg pode ser metilada em um ou ambos os átomos de nitrogênio de seu grupo guanidino (BEDFORD; CLARKE, 2009; RAMAZI; ZAHIRI, 2021) (**Figura 9B-C**).

A glicosilação consiste na adição de cadeias de oligossacarídeos por meio da ligação covalente a resíduos específicos, por enzimas chamadas glicosiltransferases. Geralmente ocorre na cadeia lateral de resíduos de Ser, Thr, Asn e Trp, mas também pode ocorrer em Ala, Arg, Asp, Ile, Lys, Val, Glu, Pro, Tyr, Cys e Gly. A glicosilação pode ser classificada em seis grupos de acordo com o resíduo: N-glicosilação, O-glicosilação, C-glicosilação, S-glicosilação, fosfoglicosilação e glipiação. No entanto, N-glicosilação e O-glicosilação são os principais tipos e possuem papéis importantes na manutenção da conformação e atividade de proteínas (SPIRO, 2002).

A acetilação é catalisada pelas enzimas lisina acetiltransferase (KAT) e histona acetiltransferase (HAT), que transferem um grupo acetil (COCH<sub>3</sub>) proveniente do doador acetil-CoA, para o grupo  $\alpha$ -amino (N  $\alpha$ ) de resíduos amino-terminais (N $\alpha$ -acetilação) ou para o grupo  $\epsilon$ -amino das cadeias laterais de Lys (N  $\epsilon$ -acetilação). Podem ocorrer nos resíduos Lys, Ala, Arg, Asp, Cys, Gly, Glu, Met, Pro, Ser, Thr e Val, com diferentes frequências, embora esta modificação seja mais comum em Lys (VETTING *et al.*, 2005). A acetilação pode alterar as propriedades eletrostáticas de uma proteína neutralizando a carga positiva dos resíduos de Lys (LOBODA *et al.*, 2019; VETTING *et al.*, 2005).

A ubiquitinação é a adição covalente de um ou mais grupos ubiquitina, ou proteínas modificadoras semelhantes a ubiquitina (SUMO, NEDD8, ISG15, FAT10, ATG8, ATG12 e URM1) à cadeia lateral da proteína-alvo. Estes polipeptídeos são adicionados ao grupo  $\epsilon$ -amino do resíduo de Lys da proteína-alvo através de ligação com a porção C-terminal do seu resíduo de Gly, pelas enzimas ubiquitina ligases (WILSON, 2017).

Uma vez que os vírus dependem da maquinaria celular do hospedeiro para realizar seu ciclo infeccioso, suas proteínas também são suscetíveis a PTMs por enzimas celulares, de forma que estas modificações podem modular suas funções durante o ciclo viral. As PTMs podem influenciar várias etapas do ciclo viral, como a entrada do vírus na célula hospedeira, liberação do genoma viral, transcrição, degradação de proteínas virais, replicação e montagem de novas partículas virais (KUMAR *et al.*, 2021).

### **1.6.1 Modificações pós-traducionais em proteínas do capsídeo e consequências para a infecção viral**

As proteínas C desempenham papéis essenciais no ciclo replicativo dos vírus e podem ter suas funções reguladas por PTMs. A dinâmica de fosforilação da proteína C de diversos vírus já foi relacionada a transcrição, replicação, interação com o genoma viral, assim como sua encapsidação (CAREY *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2013; GAZINA *et al.*, 2000; LAW *et al.*, 2003; SUGAI *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2002; ZENGEL *et al.*, 2015).

Outros processos, como eventos de LLPS após a interação de proteínas nucleocapsídicas (N) com RNA, também são passíveis de modulação por fosforilação, como já foi visto para a proteína N de SARS-CoV2 (LU *et al.*, 2021). Eventos de LLPS foram descritos para DENVC e ZIKVC recentemente (AMBROGGIO *et al.*, 2021), e podem ser importantes alvos de regulação por PTMs.

Outras PTMs, como metilação, sumoilação, ISGylation, acetilação e glicosilação também foram mostradas em proteínas do capsídeo virais (ALLOOR *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2020; GIESE *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2014; MARUŠIČ *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2021). A metilação de resíduos de Arg presentes em motivos RGG/RG conservados da proteína N de SARS-CoV2, responsáveis pela mediação da ligação ao RNA viral, se mostrou necessária para a produção de partículas virais (CAI *et al.*, 2021).

A nucleoproteína (NP) do vírus Influenza A, por exemplo, sofre SUMOilação e acetilação, modificações essenciais para a replicação e propagação viral (GIESE *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2014). Já a NP do vírus Influenza B recebe uma ubiquitina-like ISG15 (ISGilação)

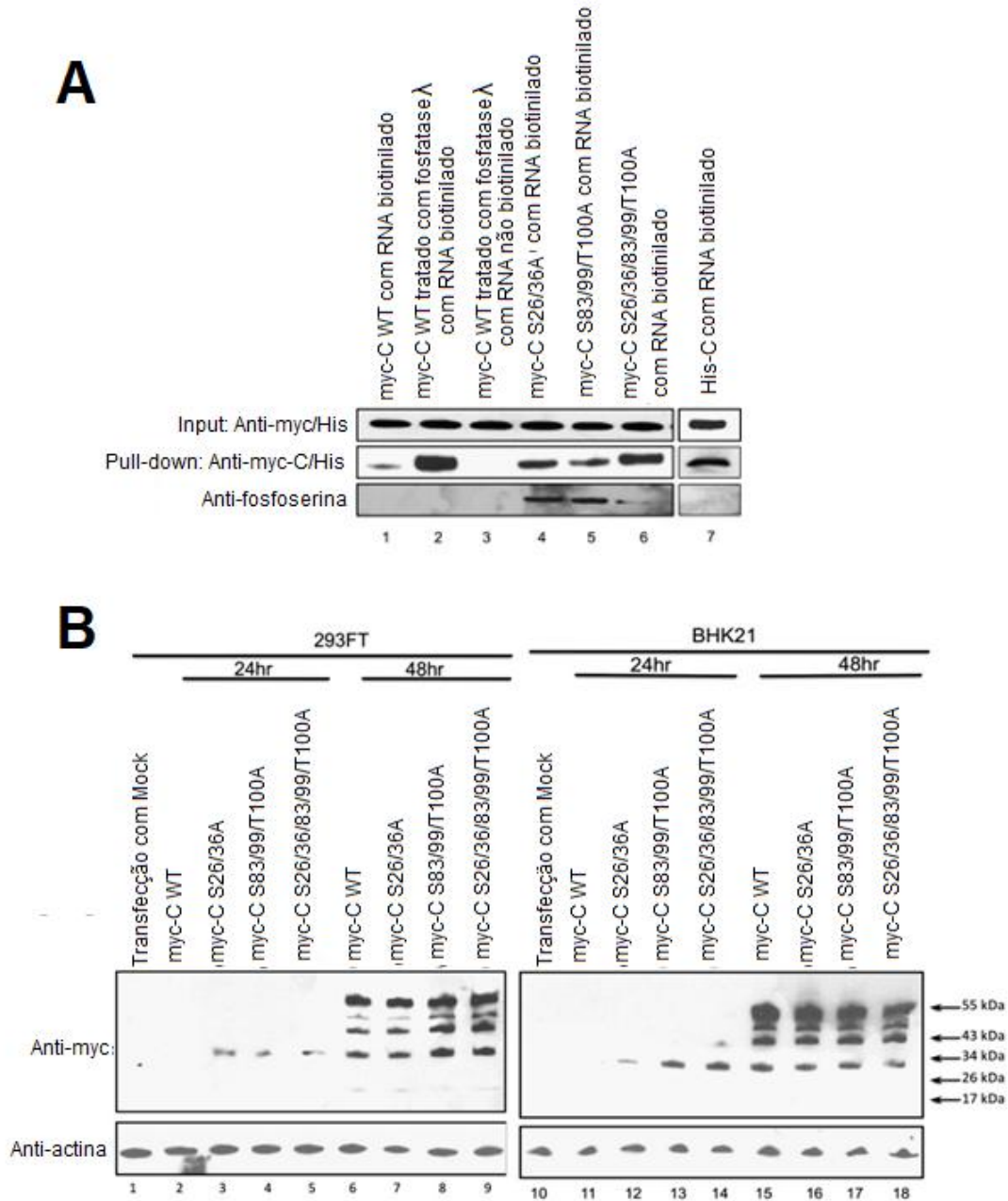
que bloqueia a síntese de RNA viral devido à inibição da oligomerização da NP (ZHAO *et al.*, 2016). A maioria das PTMs estudadas em proteínas do capsídeo se mostraram direta ou indiretamente ligadas à montagem do NC e propagação viral, sendo um campo importante para estudo.

### 1.6.2 Modificações pós-traducionais na proteína do capsídeo de flavivírus

A fosforilação de resíduos de Ser 53, 99 e 116 foi descrita para a proteína do core do vírus da hepatite C (HCV), um vírus da família *Flaviviridae*. Esse evento foi associado à atividade desempenhada pela proteína do core de HCV na supressão da transcrição de p21<sup>waf1</sup>, um inibidor de quinase dependente de ciclina e regulador da progressão do ciclo celular em células eucarióticas (JUNG *et al.*, 2001). Além dessa PTM, a ubiquitinação marca essa proteína para degradação proteossomal e tem sido associada a uma menor disponibilidade da mesma para a formação do NC, com consequente degradação do RNA viral por nucleases hospedeiras (SHIRAKURA *et al.*, 2007). A palmitoilação da proteína do core do HCV também tem um papel essencial na interação com membranas e gotículas lipídicas (MAJEAU *et al.*, 2009), interações estas que são importantes não somente para a replicação do HCV (MIYANARI *et al.*, 2007), mas também para DENV e WNV (MARTINS *et al.*, 2019; SAMSA *et al.*, 2009).

No caso dos flavivírus, demonstrou-se que os resíduos de Ser 83, 99 e Thr 100 de WNVC são fosforilados pela proteína quinase C (PKC), e que esta modificação é essencial para uma série de eventos que desencadeiam a apoptose durante a infecção (BHUVANAKANTHAM; CHEONG; NG, 2010). O mesmo grupo demonstrou que a interação de WNVC com RNA viral é regulada pela defosforilação da WNVC (**Figura 10A**), que também parece modular a localização celular de WNVC, mantendo-a no citoplasma para a montagem do NC. Além disso, demonstraram que a ausência de fosforilação contribui para os eventos de oligomerização após 24h de transfecção em duas diferentes linhagens celulares (HEK-293T e BHK) com WNVC contendo mutações que levam a hipofosforilação dos resíduos de Ser e Thr, uma vez que não são observados estados oligoméricos nos ensaios realizados com WNVC WT, como pode ser observado na **Figura 10B** (CHEONG; NG, 2011).





**Figura 10** - Influência da fosforilação de WNVC na interação com RNA viral e oligomerização. **(A)** A interação com RNA foi avaliada após transfecção de células HEK-293T com plasmídeo que codifica WNVC WT (myc-C WT) ou WNVC contendo mutações nos resíduos de Ser fosforilados (myc-C Ser26/36A; S83/99/T100A e S26/36/83/99/T100A). As proteínas expressas após transfecção e WNVC recombinante (His-C) foram misturadas com RNA viral 3' UTR biotinilado ou não biotinilado. Uma parte dos lisados contendo myc-C WT foi tratada com  $\lambda$ -fosfatase. Os complexos formados pela proteína e RNA biotinilado foram atraídos com esferas magnéticas conjugadas à estreptavidina e analisados por western blotting. O RNA só foi capaz de formar complexos com as proteínas myc-C tratadas com  $\lambda$ -fosfatase (2), myc-C mutante (4 a 6) e His-C (7), indicando que a ausência da fosforilação contribuiu para a interação de WNVC com RNA. **(B)** Para avaliar o efeito das fosforilações no processo de oligomerização, células HEK 293FT e BHK21 foram transfectadas com myc-C WT ou mutantes, e analisados por western blotting utilizando anticorpos anti-myc e anti-actina. A oligomerização foi mais aparente nos mutantes após 24h de transfecção, mas não foi observada para myc-C WT, indicando que a ausência de fosforilação também dirige a oligomerização (Adaptado de CHEONG; NG. 2011).

Embora DENVC tenha cargas positivas distribuídas ao longo de toda a sua superfície, a presença de locais com alta positividade nas hélices  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  pode representar pontos para a ligação coordenada ao RNA viral. Estes locais positivos são ricos em Lys e Arg (MA *et al.*, 2004; NEVES-MARTINS *et al.*, 2021), que são importantes sítios para PTMs, como metilação, ubiquitinação e acetilação, já descritas para outros vírus (KUMAR *et al.*, 2021; LOBODA *et al.*, 2019).

A presença de PTMs em WNVC, bem como em outras proteínas do capsídeo de diversos vírus de RNA, sugere que DENVC pode ser alvo de PTMs que participam da regulação de suas múltiplas funções, mas especialmente aquelas relacionadas à sua interação com o RNA viral, direcionando a oligomerização e a montagem do NC.

## 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desta tese foi estabelecer um sistema de montagem de partículas semelhantes a nucleocapsídeo de DENV, avaliando a influência de fatores como a presença de interfaces carregadas negativamente (ácidos nucleicos ou superfícies), assim como a presença de modificações pós-traducionais em DENVC.

## 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a montagem de NCLPs de DENV a partir da interação de DENVC recombinante com oligonucleotídeos de DNA de sequência curta (2-mer, 5-mer e 25-mer) através de experimentos em solução: espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), de espalhamento de luz estático (Rayleigh) e anisotropia de fluorescência;
- Estabelecer uma metodologia sistemática de montagem *in vitro* de NCLPs a partir da interação de DENVC recombinante com oligonucleotídeos de DNA de sequência curta (5-mer e 25-mer);
- Avaliar o diâmetro e forma das NCLPs montadas *in vitro* por AFM e MET;
- Compreender a influência de interfaces negativamente carregadas (ácidos nucleicos e superfícies) na formação de NCLPs por AFM e MET;
- Examinar a influência do potencial eletrostático de DENVC na interação com interfaces negativamente carregadas e montagem do NC;
- Identificar os possíveis sítios de PTMs em DENVC através de análises de bioinformática;
- Investigar a presença de fosforilação em DENVC por RMN;
- Investigar a presença de fosforilação e metilação em DENVC obtidas de células de mamífero infectadas/ DENVC recombinante através de ensaios western blotting.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Análise da montagem de NCLPs

#### 4.1.1 Expressão e purificação de DENVC

A sequência codificante da proteína C do vírus dengue sorotipo 2 (DENVC) contendo 100 resíduos (1-100) foi sintetizada e clonada no vetor pET3a pela empresa GenScript (Piscataway, NJ, EUA). DENVC recombinante foi expressa em *Escherichia coli* BL21-DE3-pLysS, *overnight*, a 30 °C, após indução com 0,5 mM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida).

As proteínas foram expressas em meio mínimo M9 suplementado com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). As condições de expressão de DENVC em M9 foram determinadas anteriormente, por nosso grupo de pesquisa, devido ao maior rendimento da proteína neste meio de expressão. Após a expressão, as células foram centrifugadas (~ 5.000 g por 30 min a 4 °C) e os pellets obtidos foram ressuspensos em tampão de lise (HEPES 25 mM, NaCl 0,2 M, EDTA 1 mM, glicerol 5% (v/v) e coquetel inibidor de protease (P8465, Sigma-Aldrich), pH 7,4). Em seguida, as células foram rompidas por ondas de ultrassom no equipamento *Vibra Cell*, modelo VCX130 (20 ciclos de 30s).

Após a sonicação, a concentração de NaCl do conteúdo sonicado foi ajustada para 2 M. A amostra foi submetida a agitação por 1h, a 4 °C. A incubação em alto sal foi seguida por uma ultracentrifugação a 70.400 g durante 50 min, em rotor 45Ti, na ultracentrífuga Beckmann. O sobrenadante contendo a proteína foi diluído em tampão HEPES com uma concentração final de 0,5 M de NaCl e submetido a uma cromatografia de afinidade em uma coluna de Heparina HiTrap (GE Healthcare). A proteína foi eluída utilizando-se um gradiente com concentrações crescentes de NaCl (0,5 - 2 M). DENVC foi eluída na fração correspondente a 1,5 M de NaCl.

A presença da proteína nas frações eluídas foi confirmada por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio) e sua pureza foi confirmada pela leitura da absorbância a 260 nm e 280 nm, para garantir que não haja contaminação por ácidos nucleicos. Para os experimentos de interação com oligonucleotídeos, DENVC teve o tampão em que foi eluída substituído por tampão contendo 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 7,4).

#### 4.1.2 Preparo de oligonucleotídeos de DNA

Oligonucleotídeos de DNA foram sintetizados e comprados da Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA, EUA). Foram sintetizados os seguintes oligonucleotídeos de DNA de fita simples (ssDNA): 5'- GG -3' (2-mer ssDNA); 5'- GGG GG -3' (5-mer ssDNA) e 5'- TCC ATG GTA GAC AGA GGA TGG GGG A -3' (25-mer ssDNA). Os oligonucleotídeos liofilizados foram ressuspensos em água *nuclease free* para uma concentração final de 10 mM. Os estoques intermediários de 100  $\mu$ M foram obtidos diluindo o estoque inicial em tampão contendo 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,4. As concentrações de 2-, 5- e 25-mer foram determinadas espectrofotometricamente utilizando os coeficientes de extinção molar de 21.600; 51.900 e 259.600 M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> a 260 nm, respectivamente.

#### 4.1.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo – SAXS

As medições do SAXS foram realizadas na linha SAXS1 no Laboratório Síncrotron Nacional (Campinas), propostas de número SAXS1-20170765 e SAXS1-20180425. Esta configuração abrange o intervalo de transferência de momento de  $0,1 < q < 5 \text{ nm}^{-1}$  ( $q = 4\pi \sin \theta/\lambda$ , sendo  $\theta$  metade do ângulo de espalhamento ( $2\theta$ ) e  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação incidente) (SVERGUN; KOCH, 2003). Os experimentos de SAXS foram realizados a 25 °C em tampão fosfato (55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, pH 7,4) utilizando um volume de 350  $\mu$ L em um capilar de quartzo submetido a vácuo. O tempo de exposição para cada amostra foi de 10s, e foram realizadas 30 coletas para cada repetição com intervalos de 1s. A concentração de DENVC utilizada foi de 60  $\mu$ M (1,4 mg/mL). Para os experimentos de interação com oligonucleotídeos, DENVC foi incubada com ssDNAs de 2, 5 e 25-mer nas seguintes razões molares DENVC:ssDNA molar: 1:0,1; 1:0,3; 1:0,5; 1:0,7; 1:1, para 2 e 5-mer; e 1:0,01; 1:0,03; 1:0,05; 1:0,07, para 25-mer. Todas as medidas obtidas para a amostra foram subtraídas da medida obtida com o tampão (branco). As proteínas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min, imediatamente antes da incubação, para impedir agregação e garantir que a amostra esteja monodispersa.

A análise dos dados obtidos foi realizada utilizando-se o programa PRIMUS/qt, da Suíte ATSAS (PETOUKHOV *et al.*, 2012). A partir da análise de Guinier foi calculado o raio de giro (R<sub>g</sub>), que é uma medida que permite estimar o tamanho das partículas na amostra, obtida a partir da aproximação de Guinier para o espalhamento de baixa resolução ( $qR_g < 1,1$ , ou  $qR_g < 1,3$

para espalhamentos globulares), descrita na Equação (1) (GUINIER *et al.*, 1955; SVERGUN; KOCH, 2003).

$$I(q) \propto \exp\left(-q^2 \frac{Rg^2}{3}\right) \quad \text{Equação (1)}$$

Onde  $I(q)$  é a intensidade de espalhamento e  $q$  é a magnitude do vetor de espalhamento.

O  $Rg$  foi determinado a partir da inclinação da reta do gráfico de aproximação de Guinier, onde os valores de  $\ln I(q)$  estão em função  $q^2$ , em duas regiões: a primeira variando do primeiro ao décimo ponto experimental (1-10), e a segunda faixa variando de 30-60, para as análises com 2-mer, ou de 40-70, para as análises com 5-mer. Essas faixas foram escolhidas para analisar a formação de grandes oligômeros solúveis e DENVC dimérica, em solução.

#### 4.1.4 Espalhamento de luz estático

Os experimentos de espalhamento de luz foram realizados no equipamento Agilent Technologies Care Eclipse. A luz espalhada foi coletada em um ângulo de  $90^\circ$  para a luz incidente. As amostras foram excitadas em 400 nm e a coleta foi realizada de 390 a 410 nm. Uma fenda de 2,5 nm foi usada tanto para excitação quanto para emissão. Concentrações crescentes de oligonucleotídeos de DNA (0 a 15  $\mu\text{M}$ ) foram adicionadas a uma solução proteica de 5  $\mu\text{M}$  (0,118 mg/mL) em 400  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (55 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,4). A solução foi completamente homogeneizada após cada adição de oligonucleotídeos, antes das medições de fluorescência. Os valores de intensidade de espalhamento foram corrigidos pelo fator de diluição e normalizados em função da intensidade de DENVC na ausência de oligonucleotídeos. As medidas obtidas com o tampão (branco) foram subtraídas das medidas experimentais. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.1.5 Anisotropia de fluorescência

Para obter mais informações sobre a formação de NCLPs em solução, foram realizados experimentos de anisotropia de fluorescência. Os experimentos foram realizados utilizando um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado com um controlador de temperatura (Peltier) a  $25^\circ\text{C}$  e polarizadores de excitação e emissão. Nos experimentos foi utilizada uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de comprimento óptico.

Para investigar a interação dos oligonucleotídeos de ssDNA com DENVC, isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich) foi ligado à proteína. Para isso, DENVC foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato (pH 10) e foi adicionado FITC a uma relação molar FITC:DENVC de 100:1 (partindo de uma concentração inicial de proteína de 50  $\mu$ M). A reação aconteceu por 120 min, em ambiente escuro à temperatura ambiente. O fluoróforo livre foi separado da mistura de reação com uma coluna de dessalinização PD-10 (GE Healthcare). A eficiência de marcação foi monitorada pela absorção nas regiões correspondentes à proteína e fluoróforo (280 nm para DENVC e 495 nm para FITC). A condição de marcação utilizada resultou em menos de 5% de eficiência. Essa baixa eficiência é importante, pois a fluoresceína se liga covalentemente aos resíduos de Lys da proteína marcada, que são resíduos positivos que podem ser importantes para a ligação com o ácido nucleico e formação de NCLP. Após a marcação, DENVC ligada a FITC (solução de 50 nM com tampão de fosfato — 55 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl e 5 mM EDTA, pH 7,4) foi titulada com concentrações crescentes de ssDNA (0 – 0,145  $\mu$ M). A anisotropia de fluorescência foi medida após excitação a 470 nm e emissão de fluorescência a 520 nm.

Para garantir que a marcação com FITC não alterou as propriedades da proteína ou impactou sua interação com oligonucleotídeos, experimentos semelhantes foram realizados com DENVC não-marcada utilizando a fluorescência intrínseca de seu resíduo de Trp (W69). Essa estratégia não foi escolhida inicialmente devido as propriedades espectrais do Trp, que possui dois momentos dipolo de absorção sobrepostos no estado excitado, de modo que cada estado tem um momento dipolo diferente, respondendo de formas diferentes a polaridade do solvente, tornando complexas as medidas de anisotropia (LAKOWICZ, 1999). Além disso, o curto tempo de vida do Trp também dificulta a aquisição das medidas de anisotropia. Por isso optamos pela ligação da proteína com FITC. Os experimentos usando o triptofano como fluoróforo foram coletados com comprimento de onda de excitação a 280 nm e emissão a 346 nm. Em todos os experimentos, cada medida de anisotropia foi uma média de 12 acumulações de medidas e os experimentos foram realizados em duplicatas.

Coletamos os valores de intensidade de emissão de fluorescência posicionando os polarizadores de excitação e emissão horizontalmente (H) ou verticalmente (V). Assim, coletamos  $I_{VV}$  (excitação V e emissão V),  $I_{VH}$ ,  $I_{HV}$  e  $I_{HH}$ . A anisotropia intrínseca ( $r_0$ ) foi calculada de acordo com as Equações (2) e (3) (LAKOWICZ, 1999) seguintes:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad \text{Equação (2)}$$

$$r_o = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad \text{Equação (3)}$$

Para excitação de um único fóton,  $r_o$  possui um valor teórico máximo de 0,4 quando os dipolos de excitação e emissão são paralelos e um valor mínimo de -0,2 quando os dipolos de excitação e emissão são perpendiculares. Dessa forma, a anisotropia fundamental de um fluoróforo é determinada pela Equação 4 (LAKOWICZ, 1999).

$$r_o = \frac{2}{5} \left( \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad \text{Equação (4)}$$

Onde  $\beta$  é o ângulo entre os dipolos de excitação e emissão. Considerando a variação de cada equipamento utilizado, os valores de anisotropia obtidos experimentalmente foram corrigidos por um fator numérico para ajustar os dados de acordo com os valores teóricos descritos na equação acima, de modo que o maior valor de anisotropia fosse de 0,4.

#### 4.1.6 Estudo sobre a montagem de NCLPs por AFM

As imagens de AFM foram obtidas no microscópio Bruker's Dimension Icon localizado no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CENABIO – UFRJ). O método de aquisição de imagens utilizado foi o modo *Tapping* e o cantiléver utilizado para varredura da amostra foi o R-TESPA-300 (Bruker, MPP-11120-10) (constante nominal de mola  $40 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$  e raio de ponta nominal de 8 nm).

Os experimentos de AFM foram realizados em ar à temperatura ambiente. Para definir as condições adequadas para a visualização de partículas, foram aplicadas diferentes concentrações de DENVC (15  $\mu\text{M}$ , 15 nM, 1,5 nM ou 0,5 nM) em tampão contendo 55 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 7,4) sobre a superfície da mica. Após definida a concentração em que não havia a formação de agregados ou tapetes de proteína sobre a mica, foram analisadas as condições de formação de partículas.

Para a visualização de NCLPs, DENVC foi preparada com uma concentração de 0,5 nM (11,8 ng/mL) e os oligonucleotídeos foram adicionados a uma relação molar DENVC:ssDNA de 2:1, para 5-mer, e 20:1, para 25-mer. Após 10 min de incubação, 200  $\mu\text{L}$  da amostra foram uniformemente dispersos na mica recém-clivada usando um *spin coater* (para realizar o revestimento da mica por rotação) a uma velocidade de 750 rpm por 10 min. Em seguida, três



lavagens com água Milli-Q (200  $\mu$ L) foram realizadas para remover sais do tampão da superfície mica. Este passo foi seguido por secagem sob jatos suaves de gás nitrogênio.

Durante a aquisição das imagens, foram varridas áreas de 1 x 1  $\mu$ m da superfície da amostra em uma resolução de 512  $\times$  512 pixels. Cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes. As imagens da AFM foram processadas com o Nanoscope Analysis Software (Bruker, Karlsruhe, Alemanha).

#### **4.1.7 Neutralização de carga da mica (AP-Mica) para avaliar o efeito de superfície na montagem de NCLPs**

Para os experimentos de neutralização de carga de superfície mica, a mica recém-clivada foi revestida com 3-aminopropil-trietoxissilano (APTES) para produzir uma superfície AP-mica, como descrito anteriormente (MURUGESAPILLAI *et al.*, 2017). A estrutura do APTES é composta por um grupo silano em uma das extremidades e um grupo amina na outra. Dessa forma, uma reação de silanização reveste a mica com uma camada formada por grupos amina ( $\text{NH}_2$ ), que ficam disponíveis para interação covalente com biomoléculas. Para a funcionalização da mica, superfícies de mica recém-clivadas foram colocadas em um dessecador a vácuo, juntamente com uma solução de 30  $\mu$ L de APTES e 10  $\mu$ L de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), em dois recipientes distintos posicionados abaixo da mica clivada. O dessecador foi então submetido a vácuo e a mica foi revestida pelo condensado formado após evaporação do APTES e DIPEA, por 2h em temperatura ambiente. Após esse tempo, o dessecador foi então purgado com gás argônio por 2 min e, em seguida, aberto ao ar para remover as soluções APTES e DIPEA. Na etapa seguinte, o dessecador foi purgado novamente com argônio por 2 min, e após, foi submetido a vácuo. As micas foram deixadas sob vácuo por dois dias para curar antes da obtenção das imagens. As amostras foram preparadas de forma similar à descrita no **item 4.1.6**. Foi realizada a incubação de 0,5 nM de DENVC na ausência ou presença do oligonucleotídeo 25-mer, por 10 min, respeitando a razão molar 20:1 (DENVC:ssDNA), e em seguida, 200  $\mu$ L de amostra foram aplicadas sobre a AP-mica. Após 10 min de incubação com a AP-mica foram realizadas cinco lavagens com água Milli-Q (200  $\mu$ L). O excesso de líquido foi removido com papel filtro, seguido de secagem sob jatos suaves de gás nitrogênio. As imagens foram obtidas em modo Tapping, utilizando o cantiléver R-TESPA-300, conforme descrito anteriormente.

#### 4.1.8 Processamento e análise de imagens de AFM

Na primeira etapa do processamento da imagem foi realizado o nivelamento (“Flatten”) e encaixe do plano da imagem (“Plane Fit”). Para a análise do diâmetro do NCLPs, o *software* Fiji (ImageJ) foi usado para criar macros automatizadas que foram executadas nas imagens para medir o diâmetro de Feret das partículas. A convolução da ponta da sonda foi corrigida considerando o raio de ponta nominal especificado pelo fabricante. A correção foi feita considerando a influência da ponta nas bordas de cada partícula da seguinte forma: diâmetro de Feret – 2 (raio de ponta). A distribuição de diâmetro e a análise por gráficos boxplot foram realizadas no GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

#### 4.1.9 Estudo da montagem de NCLPs por MET

Para a obtenção de mais informações acerca da forma e tamanho das partículas observadas por AFM, coletamos imagens de MET. A montagem *in vitro* foi realizada como descrito para os experimentos de AFM (**item 4.1.6**), com exceção da utilização do tampão fosfato com 300 mM NaCl e incubação *overnight*, para permitir uma melhor estabilização de partículas. Após a incubação, 3,5 µL das amostras (DENVC e DENVC:25-mer) foram depositadas em grades de cobre revestidas de carbono de 400 mesh (Electron Microscopy Sciences), previamente submetidas a tratamento com *glow discharge* no equipamento Pelco Easiglow™ (a 15 mA e 0,39 mbar de pressão de ar por 25s). A amostra foi incubada sobre a grade por 10 min e, em seguida, a grade foi lavada três vezes com água MilliQ (3,5 µL). O excesso de líquido foi removido com papel filtro. As partículas montadas *in vitro* foram contrastadas negativamente com 0,5% de ácido fosfotúngstico (PTA) por 30s, e posteriormente, o excesso de líquido foi removido com papel filtro. Citocromo C (Cyt C), uma pequena proteína carregada positivamente (MW = 12 kDa; pI = 9,47), semelhante a DENVC (MW ~ 24 kDa (dímero); pI = 12,48), e albumina de soro bovino (BSA), uma proteína neutra, foram usados como controles experimentais em experimentos de MET realizados na mesma condição descrita anteriormente (0,5 nM de proteína em tampão fosfato de 55 mM, com 300 mM NaCl, pH 7,4). As grades foram analisadas sob um FEI Tecnai Spirit Bio-Twin operado a 120 kV e no Hitachi HT 7800 operado a 100 kV, no CENABIO - UFRJ.

A magnificação da imagem variou de 120.000 a 180.000 vezes. Vários experimentos independentes foram realizados. O *software* Fiji (ImageJ) foi usado para medir o diâmetro de Feret das partículas. O contraste e o brilho foram ajustados para a máxima visibilidade das

partículas. A distribuição de diâmetro e a análise do Boxplot foram realizadas no GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

#### 4.1.10 Análise do potencial eletrostático de superfície de DENVC

Os valores de potencial eletrostático foram calculados para as estruturas em solução e cristal de DENVC (PDB IDs: 1R6R e 6VSO), ZIKVC (PDB IDs: 5YGH e 6C44), JEVC (PDB ID: 5OW2) e WNVC (PDB ID: 1SFK), através do *software* Adaptive Poisson–Boltzmann Solver (APBS) (disponível em: <https://server.poissonboltzmann.org/>) com os valores de carga e estados de protonação determinados pelo servidor PDB 2PQR juntamente com o programa PROPKA, em condições semelhantes as utilizadas em nossos experimentos: pH 7,0, 200 mM NaCl, 25 °C.

#### 4.1.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Foram analisadas diferenças estatísticas no diâmetro das NCLPs obtidas a partir dos experimentos de AFM e MET por meio de testes não-paramétricos; análise de variância unidirecional (ANOVA one-way) com um teste Kruskal Wallis e teste U Mann-Whitney, respectivamente. Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

## 4.2 Identificação de PTMs em DENVC

### 4.2.1 Identificação de PTMs em DENVC através de análises de bioinformática

Para avaliar a existência de sítios de PTMs em DENVC, uma sequência primária representativa de DENVC (GenBank: CAA36004.1) foi analisada utilizando as seguintes ferramentas, que predizem PTMs específicas ou mais de uma PTM de forma simultânea:

- NetPhos3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>), para predição de sítios de fosforilação;
- PRmePRed (<http://bioinfo.icgeb.res.in/PRmePRed/index.html>) para predição de metilação de argininas;
- SUMOplot (<https://www.abcepta.com/sumoplot>) para predição de sítios de SUMOilação;
- NetNGlyc (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>) para predição de sítios de N glicosilação;

- Musite (<https://www.musite.net/>) para análise simultânea dessas e outras PTMs.

Foram desconsiderados da análise resíduos com score abaixo de 0,5, que indicam menos de 50% de chance de determinado resíduo ser modificado pela PTM analisada, de modo que, quanto mais próximo a 1, maior a chance de o sítio ser alvo da PTM.

#### 4.2.2 Identificação da presença de fosforilação em DENVC recombinante por RMN

Para analisar a presença de grupos fosfato em DENVC, foram adquiridos espectros unidimensionais de RMN  $^{31}\text{P}$  (1D  $^{31}\text{P}$ ) em ensaios de RMN. A aquisição dos dados foi realizada no espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz, a 25 °C.

A amostra de DENVC para análise no espectrômetro de RMN foi preparada em tampão contendo 10 mM de Hepes, 200 mM de NaCl, 5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM de EDTA, 5 mM de azida, 2 mM de PMSF, pH 6,0, e 10% de  $\text{D}_2\text{O}$ , a uma concentração final de, aproximadamente, 100  $\mu\text{M}$  de DENVC. Além do espectro de DENVC, também foi obtido um espectro do tampão descrito acrescido de 5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , na ausência de proteína, para aquisição do espectro correspondente ao fosfato inorgânico (Pi).

Os espectros foram processados usando o programa TopSpin 3.1 (Bruker Biospin). Durante o processamento dos espectros e análise, as intensidades foram obtidas a partir do ajuste do formato dos picos bidimensionais da série de espectros e os erros experimentais foram obtidos a partir da relação sinal/ruído para cada frequência de CPMG (Carr-Purcell Meiboom-Gill).

O método utilizado é baseado na sequência de pulsos conhecida como Inversão-Recuperação-Carr-Purcell Meiboom-Gill (IR-CPMG), que gera mapas de correlação entre os tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ). A técnica de recuperação de inversão estima os valores de  $T_1$  ajustando a curva de recuperação de sinal adquirida em diferentes intervalos de tempo após um pulso de inversão ( $180^\circ$ ).

Foram obtidos os tempos de relaxamento ( $T_1$  e  $T_2$ ) e os valores médios das taxas de relaxação  $R_1$  e  $R_2$ . A média das taxas de relaxação  $R_2/R_1$  foram utilizadas para o cálculo do tempo de correlação rotacional global da proteína ( $\tau_c$ ) a partir da Equação (5), que define um modelo aproximado para um corpo rígido.

$$\tau_c \cong \frac{1}{4\pi\nu_{^{31}\text{P}}} \sqrt{6 \frac{R_2}{R_1} - 7} \quad \text{Equação (5)}$$

Na qual  $\nu_{31P}$  corresponde a frequência do  $^{31}P$  (MHz),  $R_2$  à taxa de relaxação transversal, e  $R_1$  à taxa de relaxação longitudinal.

#### **4.2.3 Preparo de DENVC recombinante para ensaios de western blotting**

Para avaliar a presença de fosforilação em DENVC recombinante, a proteína foi purificada conforme descrito anteriormente (**item 4.1.1**) e teve o tampão substituído por tampão contendo 10 mM de Hepes, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM de azida e 2 mM de PMSF (pH 7,4).

#### **4.2.4 Tratamento de DENVC recombinante com fosfatase**

A proteína DENVC (preparada conforme descrito no **item 4.2.3**) foi submetida a tratamento com fosfatase alcalina - FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific - EF0654). Duas formas de tratamento foram testadas: (i) 10  $\mu$ g de DENVC foi incubada com 10 unidades (U) de fosfatase (1U/ $\mu$ L), durante 3h, à temperatura ambiente, em tampão de reação (10 mM de Tris (pH: 7,4), 10 mM de NaCl, 1 mM de  $MgCl_2$ , 0,1 mM de ditioneitol (DTT) e glicérol 5%). A mesma condição, substituindo o volume de fosfatase pelo tampão de reação foi utilizada como controle; (ii) 2  $\mu$ g de DENVC foram incubados com 10 U de fosfatase (1U/ $\mu$ L) e 2  $\mu$ L de tampão FastAP<sup>TM</sup> 10X (Thermo Scientific) (100 mM Tris-HCl (pH 8,0 à 37 °C), 50 mM  $MgCl_2$ , 1 M KCl, 0.2% de TX-100 and 1 mg/mL BSA), de modo que na reação final o tampão fique na concentração de 1X. Na condição utilizada como controle, o volume de fosfatase foi substituído por tampão FastAP<sup>TM</sup> na concentração de 1X na reação final.

#### **4.2.5 Infecção de células Huh7 com DENV**

Células Huh7 (célula de carcinoma hepatocelular humano) foram plaqueadas na concentração  $3 \times 10^6$  células, em placas de 60  $cm^2$ , com meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram incubadas na presença de 5% de  $CO_2$  em estufa a 37 °C, e no dia seguinte, foram tratadas com mock (proporcional ao volume de vírus utilizado no momento da adsorção) ou infectadas com DENV2 (cepa 16681, MOI de 1) no meio DMEM descrito, sem SFB, por 1h. Após a adsorção viral, o meio de infecção foi removido, a monocamada foi lavada com PBS 1X e foi adicionado meio DMEM completo por 24h.

#### 4.2.6 Preparo de extrato de proteínas

Após 24h de infecção (**item 4.2.5**) a monocamada de células Huh7 foi lavada com PBS 1X e incubada com tripsina durante 5 min a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SFB, seguido de homogeneização e centrifugação a 1500 rpm durante 5 min. Após descartar o sobrenadante, o precipitado de células foi homogeneizado em PBS 1X (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) e centrifugado a 1500 rpm durante 5 min. Após descartar o sobrenadante, foi adicionado tampão de lise RIPA (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% TX-100, pH 7,5) suplementado com coquetel inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich) (1µl/10<sup>6</sup> células) e inibidor de fosfatase NaF (fluoreto de sódio) (919, Sigma-Aldrich). Após a homogeneização, a amostra foi submetida a um choque térmico para garantir a lise completa das células. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o extrato de proteínas citoplasmáticas foi dosado por método de Bradford.

#### 4.2.7 Ensaio de western blotting

A concentração de 40 µg de proteínas total ou 2 µg de DENVC recombinante purificada (tratada ou não tratada com fosfatase) foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 18% (SDS-PAGE) para separação das proteínas presentes no lisado celular. As proteínas foram previamente reduzidas e preparadas em tampão de amostra contendo 50 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM de β-mercaptoetanol; 2% de SDS; 0,1% de azul de bromofenol e 10% de glicerol, seguida pelo aquecimento a 100 °C por 5 min para desnaturação completa das proteínas. Para comparação do peso molecular das proteínas de interesse foi utilizado o padrão de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm) (Bio-Rad) em sistema trans-blotting semi-dry (Bio-Rad) a 15 V por 45 min. Após a etapa de transferência, as membranas foram bloqueadas por 1h com 5% de BSA diluído em tampão de lavagem TBS-T (TBS 1X contendo 0,1% de Tween-20). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas, separadamente, com os seguintes anticorpos primários: anti-DENVC (NBP2-42822 - NovusBio); anti-fosfoserina (#ab9332 - Abcam) e anti-fosfotreonina (#ab9337, Abcam), para detecção de fosforilação; anti-monometilarginina (#8015, Cell signaling) e anti-metilisina (#ab23366, Abcam), para detecção de metilação; e anti-GAPDH (MAB374, Sigma-Aldrich), utilizado como controle endógeno. A incubação foi realizada *overnight*, a 4 °C, sob agitação. Todos os anticorpos foram diluídos em

TBS-T contendo 5% de BSA na proporção de 1:1.000, exceto GAPDH, que foi utilizado na proporção 1:10.000. Ao término da incubação, as membranas foram lavadas 3x por 15 min com TBS-T, sob agitação, e após a lavagem, foram incubadas com anticorpo secundário respectivo ao *host* do anticorpo primário por 1h a temperatura ambiente e sob agitação. Os anticorpos secundários utilizados foram o IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (926-32211) e IRDye® 680CW Goat anti-mouse IgG (926-68070) (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA), na diluição de 1:15.000. Após a incubação com anticorpo secundário, foram realizadas três lavagens de 15 min com TBS-T, sob agitação, e uma lavagem de 15 min com TBS 1x para remover o detergente Tween-20 da membrana. Os sinais para DENVC, fosforilação e metilação foram quantificados no canal de 800 nm e o sinal para GAPDH no canal de 700 nm em um LI-COR Odyssey Infrared Western Blot Imaging System (LI-COR Biosciences). Para revelação por quimiluminescência, foi utilizado um anticorpo secundário anti-rabbit conjugado a HRP (Santa Cruz Biotechnology) e os reagentes luminol e peróxido de hidrogênio (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific).

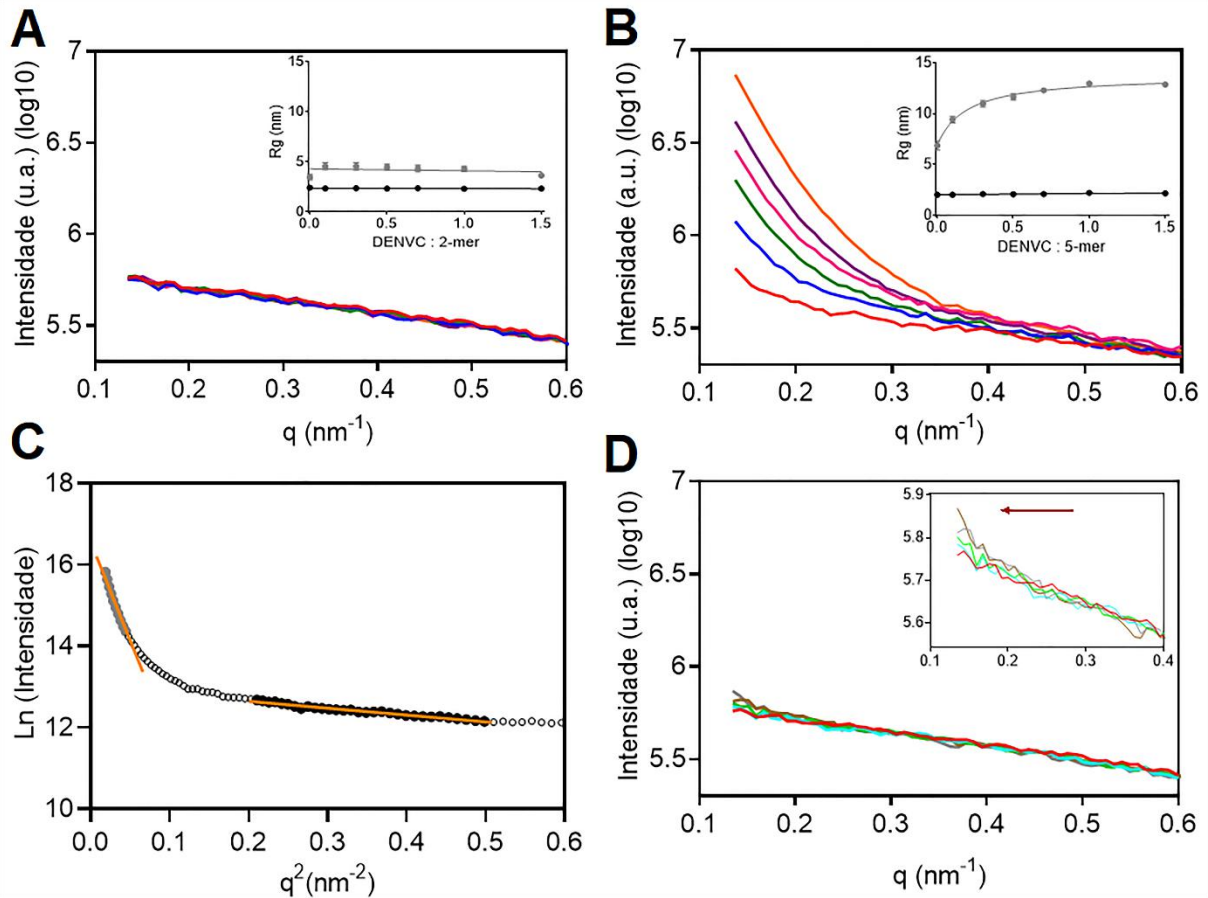
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudo em solução da montagem *in vitro* de NCLPs

Para estudar a montagem *in vitro* de NCLPs de DENVC em solução, primeiramente determinamos as condições e concentrações ideais de DENVC e dos oligonucleotídeos utilizados, assim como o efeito do tamanho do oligonucleotídeo nas reações de montagem. Para isso, DENVC recombinante foi incubada com oligonucleotídeos de ssDNA de diferentes comprimentos (2-mer, 5-mer e 25-mer), e a formação de partículas foi avaliada por meio de diferentes abordagens experimentais: SAXS, espalhamento de luz estático e anisotropia de fluorescência.

Para os experimentos de SAXS, foram obtidos perfis de espalhamento de luz para DENVC na ausência e na presença de concentrações crescentes dos oligonucleotídeos (**Figura 11**). A análise de Guinier obtida na ausência de DNA indicou um  $R_g$  ( $R_g = 2,05 \pm 0,04$  nm) compatível com o dímero de DENVC, expandido pela presença do IDR N-terminal, como pode ser observado nas **Figuras 11A e 11B** (gráficos inseridos no canto superior direito). Neste experimento, a adição dos oligonucleotídeos 5-mer promoveu um aumento significativo da intensidade de espalhamento em baixos valores do ângulo de espalhamento ( $q$ ,  $\text{nm}^{-1}$ ) ( $q \rightarrow 0$ ), o que indica a presença de grandes oligômeros solúveis (**Figura 11B**).





**Figura 11** - Perfis de SAXS obtidos após interação de DENVC com oligonucleotídeos ssDNA. (**A** e **B**) Representação dos perfis de SAXS de DENVC (60  $\mu\text{M}$ ) obtidos na ausência e presença de concentrações crescentes do oligonucleotídeo 2-mer (**A**) e 5-mer (**B**). As curvas foram coloridas de acordo com a razão molar de DENVC em relação ao oligonucleotídeo (DENVC: ssDNA): DENVC livre (linha vermelha), 1:0,1 (linha azul), 1:0,3 (linha verde), 1:0,5 (linha rosa), 1:0,7 (linha roxa) e 1:1 (linha laranja). Os gráficos inseridos em (**A**) e (**B**) mostram a análise de Guinier dos perfis de SAXS, com o raio de giro ( $R_g$ ) calculado em duas faixas: as linhas e círculos cinzas representam os valores de  $R_g$  obtidos para o intervalo do primeiro ao décimo ponto experimental (1-10), que corresponde à região do perfil de SAXS sensível à formação de grandes oligômeros solúveis. Enquanto as linhas e círculos pretos representam os intervalos de 30-60 (2-mer) ou 40-70 (5-mer), que correspondem à região do SAXS equivalente a DENVC dimérica em solução. (**C**) Representação do gráfico da aproximação de Guinier ( $\ln(\text{intensidade})$  vs  $q^2$ ) utilizado para analisar os dados obtidos com 5-mer. Os dados brutos são representados por círculos brancos, cinzas e pretos. As linhas laranja representam um ajuste linear para a região com valores mais baixos de  $q$ , que compreende os intervalos de 1-10 (círculos cinza), e a região com maiores valores de  $q$ , que compreende os intervalos de 40-70 (círculos pretos) dos dados. (**D**) Perfil de SAXS de DENVC obtido após a adição de 25-mer. As cores das curvas indicam a razão molar de DENVC em relação ao oligonucleotídeo (DENVC: ssDNA): DENVC livre (linha vermelha), 1:0,01 (linha azul clara), 1:0,03 (linha verde clara), 1:0,05 (linha cinza), 1:0,07 (linha marrom). O gráfico inserido representa uma ampliação da região em baixos valores de  $q$ . A seta vermelha indica um possível aumento na inflexão em valores baixos de  $q$  que é deslocado para a esquerda em relação ao perfil de 5-mer, mostrado em **B**.

A análise do gráfico de Guinier foi realizada em duas regiões, conforme ilustrado na **Figura 11C**. A região 1-10 é sensível à formação de grandes oligômeros solúveis, enquanto as regiões 30-60 (para 2-mer ssDNA) ou 40-70 (para 5-mer ssDNA) representam a DENVC dimérica em solução sem a influência dos oligômeros solúveis. É possível observar que o valor de  $R_g$  obtido para a região oligomérica se manteve constante com a adição do oligonucleotídeo

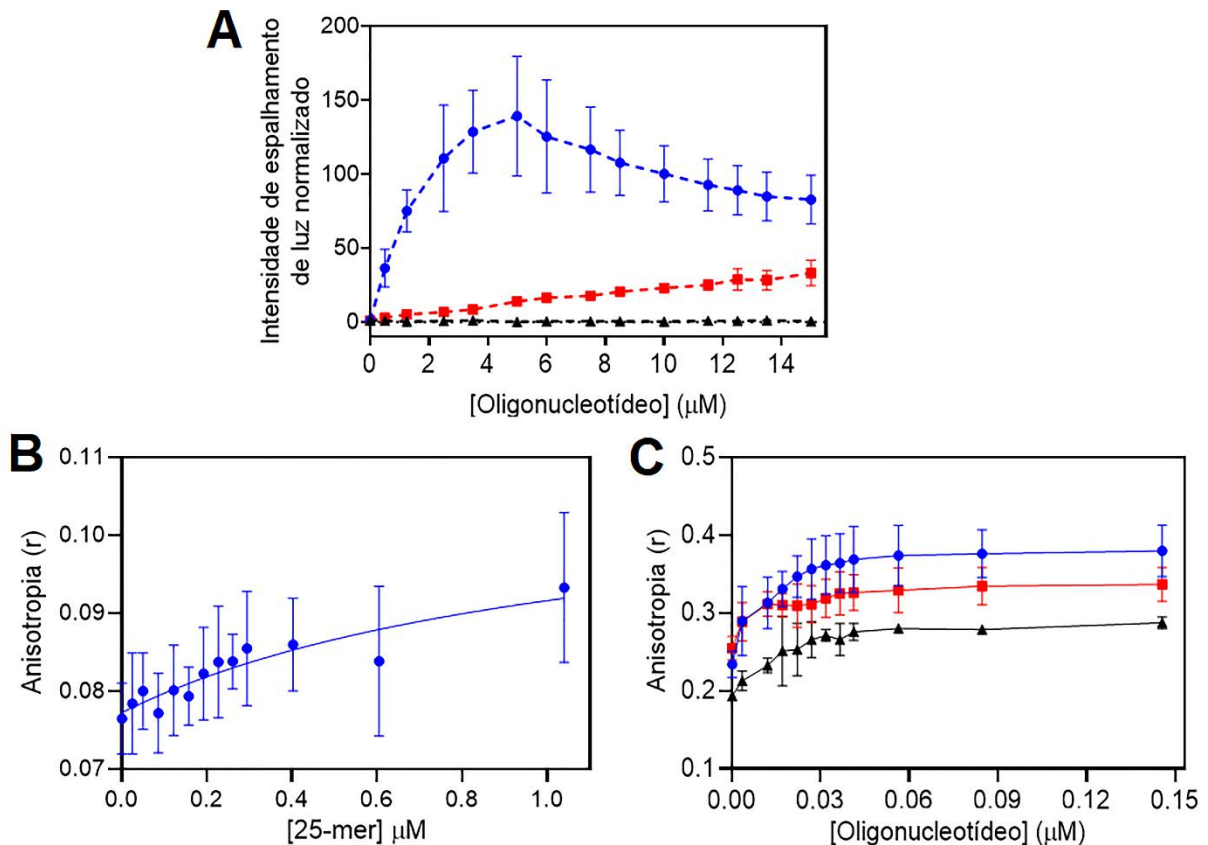
2-mer (inserção na **Figura 11A**) e aumentou significativamente com a adição de 5-mer (inserção na **Figura 11B**), atingindo um platô de valores de  $R_g$  de  $\sim 12,9$  nm. A análise de Guinier da região do dímero é constante, mantendo o valor de  $\sim 2,1$  nm mesmo após a adição de oligonucleotídeos 2-mer e 5-mer.

Estes dados sugerem a presença de DENVC dimérica e oligomérica em solução. De modo que, a adição do oligonucleotídeo 5-mer é significativamente mais eficiente para induzir a oligomerização do que o 2-mer. Esses dados também indicaram uma oligomerização dependente da concentração desencadeada pela adição de 5-mer. É importante mencionar que nos experimentos com 5-mer observamos uma precipitação visual em razões molares acima de 1:1.

Além disso, obtivemos os perfis de SAXS de DENVC após a adição de concentrações crescentes do oligonucleotídeo 25-mer (**Figura 11D**). No entanto, esses dados não foram tão conclusivos para seguir com as análises quanto os obtidos para o 5-mer (**Figura 11B**) porque o aumento da inflexão em valores baixos do ângulo de espalhamento ( $q$ ,  $\text{nm}^{-1}$ ) foi deslocado para a esquerda, em direção a valores menores de  $q$ . O desvio para a esquerda fica claro quando notamos que nenhum efeito foi observado para  $q > 0,3$  para o 25-mer (inserção na **Figura 11D**) e uma mudança significativa foi observada para  $q < 0,5$  para o 5-mer (**Figura 11B**).

Dessa forma, novas análises com uma nova configuração experimental seriam necessárias para obter dados mais conclusivos. Acreditamos que este resultado sugere a formação de oligômeros solúveis com tamanhos ligeiramente aumentados quando comparados aos oligômeros induzidos por 5-mer. Observe que a **Figura 11D** mostra os perfis de SAXS em baixas razões molares de DENVC:25-mer. Observamos que em razões molares superiores a 0,1, as curvas se deslocavam ainda mais para a esquerda, tornando-as não analisáveis com o *setup* empregado. Também é importante mencionar que a precipitação visual é observada em razões molares DENVC:25-mer superiores a 0,1.

Para obter mais informações sobre o efeito da adição desses oligonucleotídeos na oligomerização de DENVC, medimos o espalhamento de luz após a incubação da proteína com os oligonucleotídeos (**Figura 12A**). A adição de concentrações crescentes de 5-mer levou a um aumento nos valores de intensidade de espalhamento de luz de modo dependente da concentração, enquanto esse efeito não foi observado para o 2-mer. Ao usar o maior oligonucleotídeo (25-mer), uma maior intensidade de luz espalhada foi observada mesmo em concentrações mais baixas de oligonucleotídeo (**Figura 12A**). Este resultado complementa e suporta nossa hipótese com base nos dados SAXS (**Figura 11D**), que mostraram a formação de partículas maiores (maior espalhamento de luz) na presença do oligonucleotídeo 25-mer.



**Figura 12** - Medidas de espalhamento de luz estático e anisotropia de fluorescência em função da concentração de oligonucleotídeo. **(A)** Para as medidas de espalhamento de luz, DENVC (5  $\mu\text{M}$ ) foi titulada com concentrações crescentes (0 - 15  $\mu\text{M}$ ) dos oligonucleotídeos 2-mer (linha tracejada preta), 5-mer (linha tracejada vermelha) e 25-mer (linha tracejada azul). As amostras foram excitadas em 400 nm e a coleta foi realizada de 390 a 410 nm. **(B-C)** As medidas de anisotropia de DENVC titulada com concentrações crescentes de 25-mer, foi realizada na ausência e na presença de marcação com fluoresceína (FITC) – DENVC-FITC. **(B)** DENVC não marcada (2  $\mu\text{M}$ ) foi titulada com oligonucleotídeo 25-mer (linha azul) (concentração final de 0 a 1,04  $\mu\text{M}$ ). A anisotropia foi medida após excitação a 280 nm e emissão de fluorescência a 346 nm. **(C)** DENVC-FITC (50 nM) foi titulada com oligonucleotídeos 2-mer (linha preta), 5-mer (linha vermelha) e 25-mer (linha azul) (concentração final de 0 a 0,145  $\mu\text{M}$ ). A anisotropia foi medida após excitação a 470 nm e emissão de fluorescência a 520 nm. As barras de erro representam o desvio padrão das medidas em duplicata ou triplicata.

A formação de NCLPs após a adição de oligonucleotídeos 5- e 25-mer também foi mensurada pelo aumento da anisotropia de fluorescência de DENVC marcada com fluoresceína (**Figura 12C**). Essa abordagem experimental nos permitiu trabalhar em uma concentração de 50 nM de DENVC, evitando a precipitação da proteína na presença dos oligonucleotídeos, como observado nos experimentos de SAXS e espalhamento de luz, que foram realizados em uma faixa de concentração de micromolar. Além disso, nos permitiu uma melhor comparação da formação de NCLPs com oligonucleotídeos de 5 e 25-mers, mostrando a mesma razão molar de 1:1 (DENVC:oligonucleotídeo) para ambos, com afinidades de ligação na faixa nanomolar.

Como a fluoresceína se liga covalentemente a resíduos de Lys que poderiam ser importantes para a ligação de ácidos nucleicos e formação de NCLPs, adaptamos a metodologia

de marcação de DENVC para garantir menos de 5% de eficiência. Como controle adicional, medimos a anisotropia usando fluorescência intrínseca do Trp (W69) de DENVC, que resultou em um perfil muito semelhante de aumento de anisotropia, embora com um aumento muito menor na anisotropia devido ao curto tempo de vida de fluorescência do Trp.

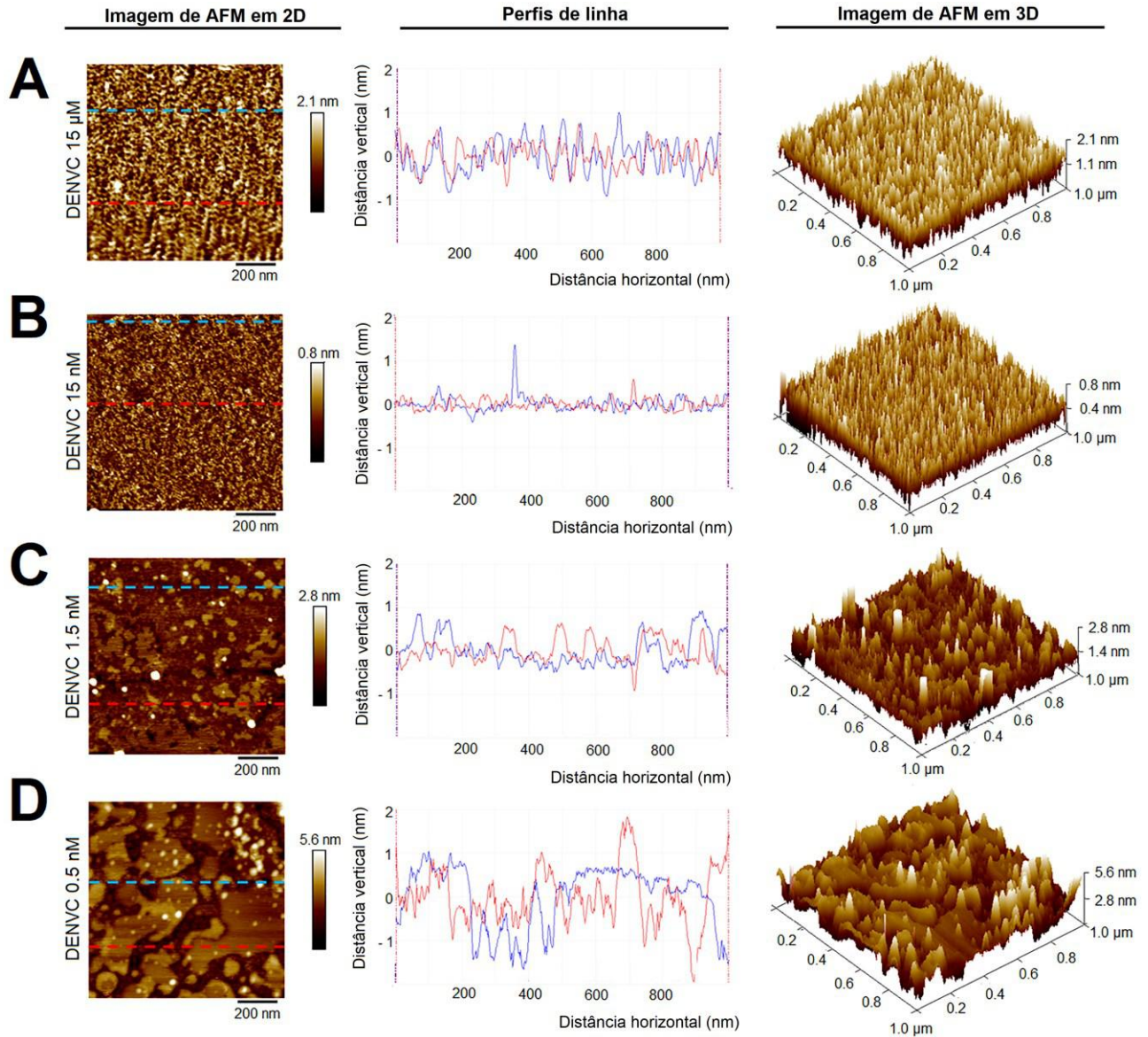
## 5.2 Análise da montagem *in vitro* de NCLPs por técnicas de microscopia

### 5.2.1 Análise de NCLPs por AFM

Os resultados obtidos para a montagem de NCLP em solução mostraram que os oligonucleotídeos 5 e 25-mer desencadearam uma oligomerização de DENVC dependente da concentração. Para obter mais informações sobre o tamanho, forma e homogeneidade das NCLPs obtidas, realizamos experimentos de AFM.

Para isso, utilizamos o método *Tapping Mode*<sup>®</sup> para obter as imagens. Este método em particular fornece informações topográficas ao escanear a amostra com uma ponta oscilante para reduzir o atrito, e têm sido amplamente empregado para estudar vírus e capsídeos virais (DE PABLO, 2018; KUZNETSOV; MCPHERSON, 2011).

Para essa abordagem experimental, a escolha da concentração de DENVC utilizada nas reações de montagem *in vitro* foi limitada por fatores inerentes à técnica de AFM. Em concentrações mais altas, as proteínas formam camadas na superfície da mica (“colchões de proteína”), dificultando a identificação de partículas individuais. Além disso, em concentrações mais altas, DENVC apresentou forte tendência para a formação de agregados amorfos. Assim, para determinar a melhor concentração de proteína para realizar a análise de AFM, adquirimos imagens topográficas com diluições sistemáticas de DENVC, na ausência de oligonucleotídeos, como pode ser observado na **Figura 13**. Dessa forma, imagens topográficas em 2D e 3D obtidas por AFM, em que a proteína foi analisada em concentrações mais altas, mostraram uma camada espessa de proteínas, que foi reduzida à medida que foram analisadas condições com a proteína mais diluída.



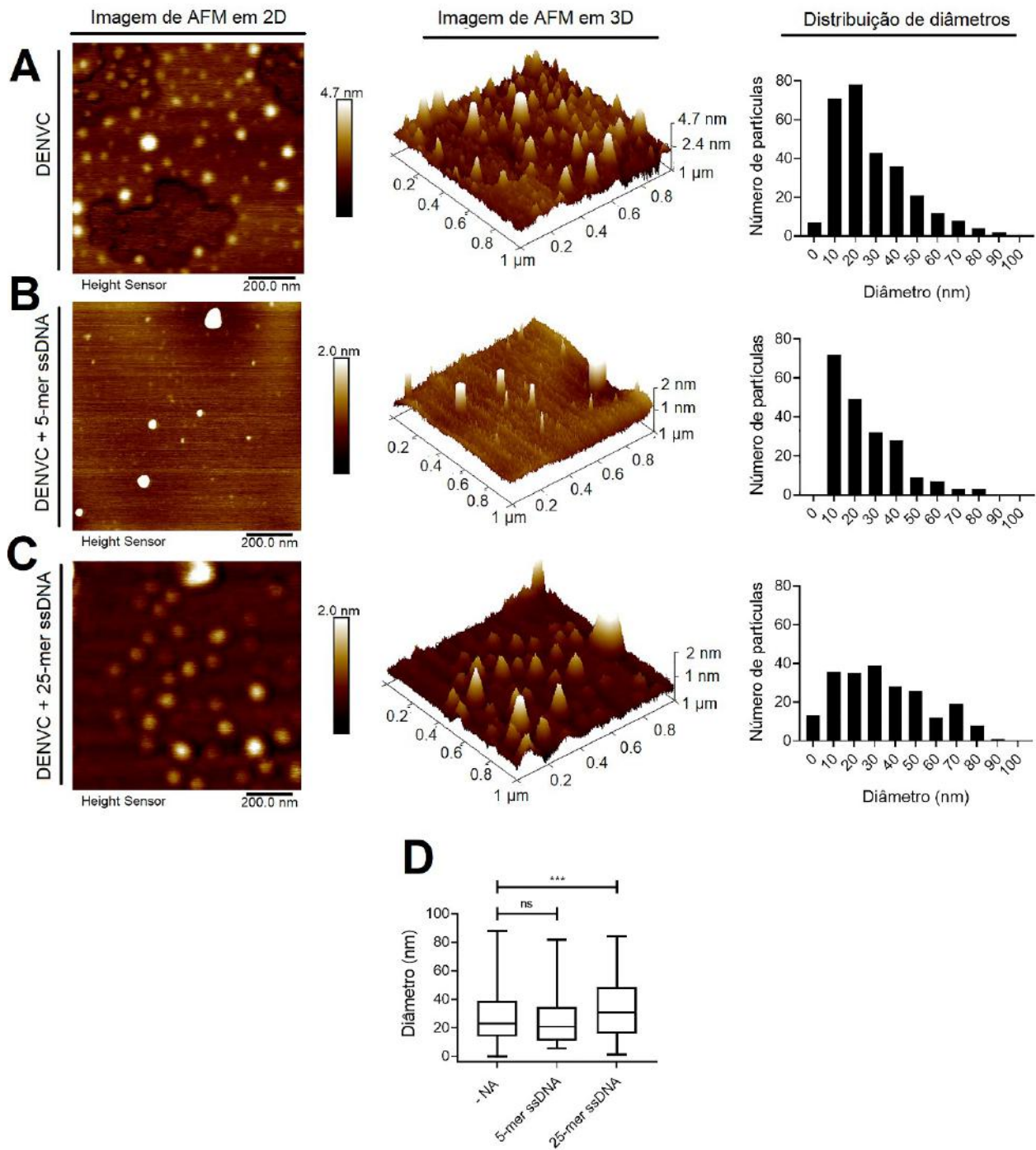
**Figura 13** - Determinação da concentração de DENVC para análise de NCLPs por AFM. Representação de imagens de AFM dos perfis topográficos em 2D ( $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ ; painéis à esquerda), com perfis de linha obtidos a partir de seções específicas de cada imagem em 2D (painéis centrais), e imagens topográficas em 3D (painéis à direita) para as seguintes concentrações de DENVC: (A)  $15\ \mu\text{M}$ , (B)  $15\ \text{nM}$ , (C)  $1,5\ \text{nM}$  e (D)  $0,5\ \text{nM}$ . As linhas tracejadas azuis e vermelhas mostradas nas imagens em 2D correspondem às seções de onde os perfis de linha foram obtidos. A escala de cores nas imagens em 2D e 3D indica as alturas na escala topográfica. Os experimentos de AFM foram realizados em Tapping Mode®, em ar, à temperatura ambiente.

Para fornecer uma comparação mais direta da influência da concentração de proteína na formação dessa camada de proteínas, adquirimos perfis de linha que foram traçados em duas regiões diferentes das imagens topográficas em 2D (linhas vermelhas e azuis na **Figura 13**, painéis centrais). Em baixas concentrações de proteína ( $1,5\ \text{nM}$  e  $0,5\ \text{nM}$ ), são observadas variações na altura da amostra. Essas variações são causadas por uma alternância entre regiões que possuem amostra e regiões vazias, nas quais é possível visualizar a superfície da mica. A análise das imagens topográficas em 2D e 3D, juntamente com os perfis de linha adquiridos,

indicaram que a melhor concentração de proteína para as reações de montagem foi de 0,5 nM de DENVC (**Figura 13D**). Nessa concentração, conseguimos obter um fundo mais limpo que nos permitiu avaliar cada partícula individualmente.

Com base nos resultados anteriores, escolhemos a concentração de 0,5 nM de DENVC para realizar experimentos de montagem de NCLPs. As reações de montagem foram realizadas com os oligonucleotídeos 5 e 25-mer, na razão molar DENVC:oligonucleotídeo de 2:1 e 20:1, respectivamente.

A escolha da razão molar utilizada foi baseada no tamanho dos oligonucleotídeos, nos dados em solução (**Figura 11 e 12**), e em protocolos anteriores de montagem de partículas NCLPs (LÓPEZ *et al.*, 2009; TELLINGHUISEN *et al.*, 1999; WENGLER *et al.*, 1982). Lopez e colaboradores utilizaram oligonucleotídeos de 50 bases e uma relação molar de proteína:oligonucleotídeo de 100:1 em seus experimentos de montagem e análise por MET. De acordo com nossos dados em solução, que sugerem a possibilidade de usar relações maiores para um oligonucleotídeo de 25-mer, estabelecemos uma condição inicial de 20:1, que foi bem-sucedida conforme pode ser observado na **Figura 14**.



**Figura 14** - Imagens de AFM de NCLPs após montagem *in vitro*. (A-C) Representação de imagens topográficas em 2D (painéis à esquerda) e 3D (painéis centrais) ( $1 \times 1 \mu\text{m}$ ), obtidas por AFM, com as distribuições de diâmetros de Feret das NCLPs observadas (painéis à direita), para as seguintes condições de montagem: (A) DENVC (0,5 nM) na ausência de oligonucleotídeos; (B) DENVC e 5-mer, com uma razão molar de 2:1; e (C) DENVC e 25-mer, com uma razão molar de 20:1. A escala de cores nas imagens 2D e 3D indica as alturas na escala topográfica. (D) A distribuição de diâmetros obtida para montagem *in vitro* em cada condição foi representada graficamente em um boxplot. A linha dentro da caixa denota o valor mediano (percentil 50) com delimitações por linhas que marcam os valores mínimo e máximo. Do valor mínimo ao início da caixa, 25% dos dados são representados, e do final da caixa ao valor máximo, os 25% restantes são representados. O diâmetro médio das partículas obtidas para DENVC na ausência de oligonucleotídeos ( $n = 282$ ), DENVC incubada com 5-mer ( $n = 203$ ) e DENVC incubada com 25-mer ( $n = 216$ ) foram  $27,6 \pm 18,02$  nm,  $24,82 \pm 16,93$  nm e  $33,88 \pm 21,88$  nm, respectivamente. A análise estatística foi realizada por meio da análise ANOVA One-Way seguida de análise não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$  (\*\*,  $P < 0,01$ ; ns, não significativo).

A incubação de DENVC com os oligonucleotídeos 5-mer ou 25-mer resultou em NCLPs com uma organização regular (**Figura 14C**). Os NCLPs obtidos com 25-mer pareciam ser mais simétricos do que as partículas obtidas após a interação com 5-mer (**Figura 14B e 14C**). Curiosamente, também encontramos partículas na ausência de oligonucleotídeos (**Figura 14A**).

Uma das principais limitações do AFM é o efeito de achatamento que afeta a resolução do diâmetro das partículas. Este efeito é causado primariamente pela influência do tamanho da ponta da sonda (CANALE *et al.*, 2011; RUGGERI *et al.*, 2019), mas outros artefatos gerados durante a preparação da amostra e/ou secagem na mica, por exemplo, também podem levar a esses efeitos, afetando a precisão dos diâmetros mensurados. Para minimizar esse efeito e realizar uma análise quantitativa do tamanho das partículas, realizamos correções da convolução da ponta da sonda considerando o valor médio do raio da ponta indicado pelo fabricante do cantiléver.

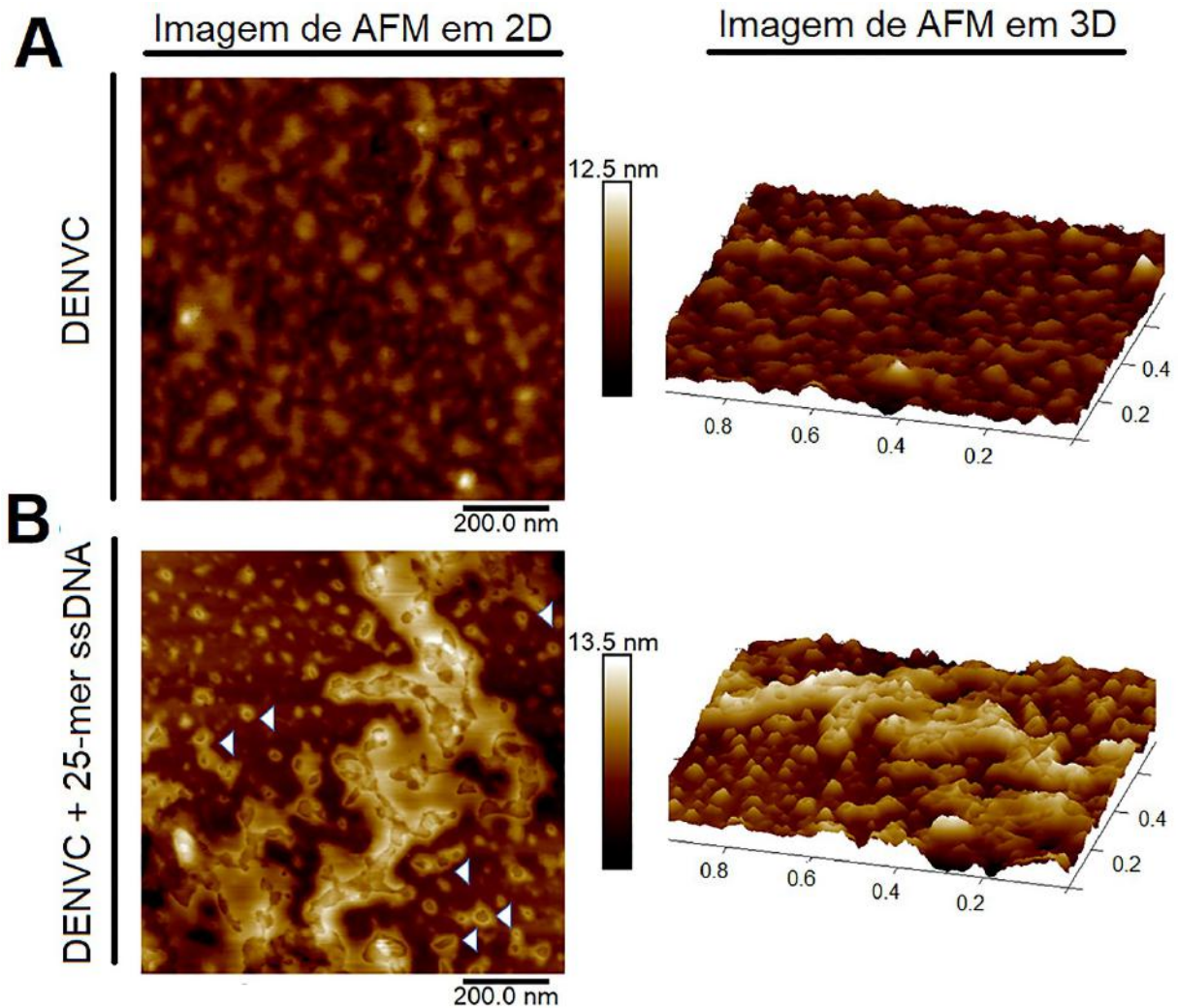
A distribuição de diâmetro das NCLPs formadas na ausência e presença de oligonucleotídeos de 5 e 25-mers está representada na **Figura 14** (painéis à direita). O perfil de distribuição de diâmetros das NCLPs formadas na ausência e presença de 5-mer são semelhantes, com um diâmetro médio de  $27,6 \pm 18,02$  nm e  $24,82 \pm 16,93$  nm, para DENVC (n = 282) (**Figura 14A**) e DENVC com 5-mer (n = 203), respectivamente (**Figura 14B**), enquanto as partículas formadas na presença do 25-mer foram ligeiramente maiores ( $P < 0,01$ ) (**Figura 14C-D**), com um diâmetro médio de  $33,88 \pm 21,88$  nm (n = 216). A representação em boxplot mostra que 50% dos NCLPs formadas na ausência de oligonucleotídeos ou na presença de 5-mer apresentam 10 a 35 nm de diâmetro, enquanto na presença de 25-mer apresentam 15 a 50 nm de diâmetro (**Figura 14D**).

#### 5.2.1.1 Determinação da influência do efeito de superfície para a montagem de partículas NCLPs por AFM

Para avaliar se a superfície negativamente carregada da mica recém-clivada influenciou a formação de NCLPs de DENVC na ausência de oligonucleotídeos, realizamos imagens de AFM aplicando as amostras após neutralizar (*passivating*) essa superfície, revestindo a mica clivada com 3-aminopropil-trietoxi silano (APTES) - AP-mica (MURUGESAPILLAI *et al.*, 2017). Os resultados mostraram que, enquanto para as amostras preparadas na ausência de oligonucleotídeos apenas agregados de proteínas amorfas foram observados (**Figura 15A**), partículas semelhantes às observadas nas imagens obtidas com o substrato não tratado foram visualizadas para as amostras na presença de 25-mer aplicado na superfície neutralizada (**Figura**



15B). Isso indica que a neutralização de cargas de DENVC (seja por superfícies carregadas negativamente ou por ácidos nucleicos) é necessária para a formação de NCLPs de DENV.

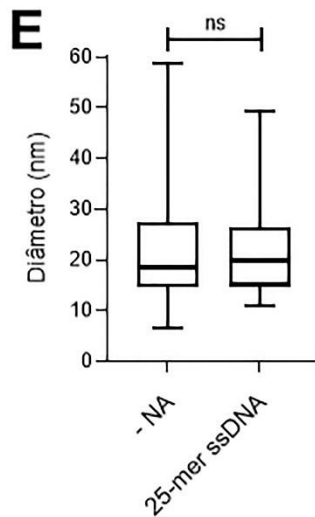
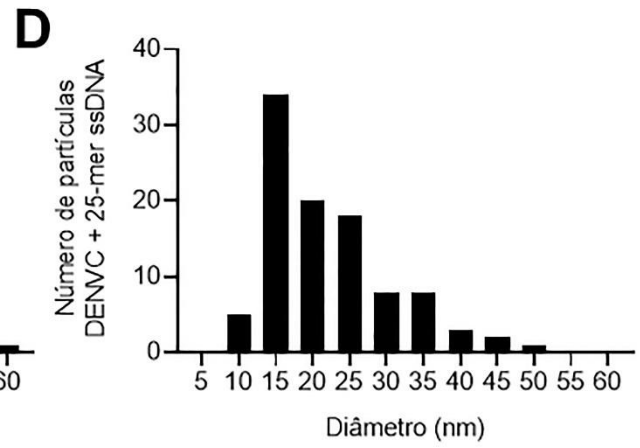
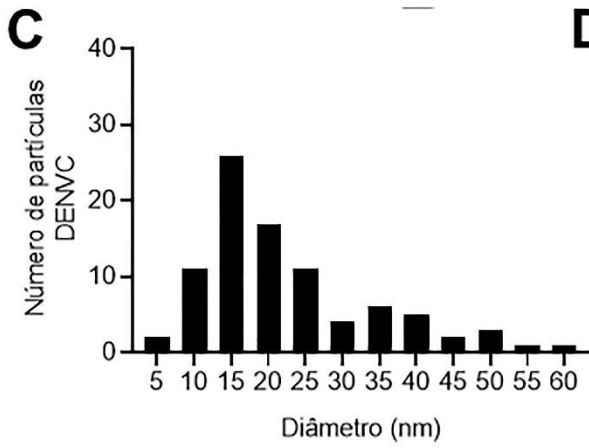
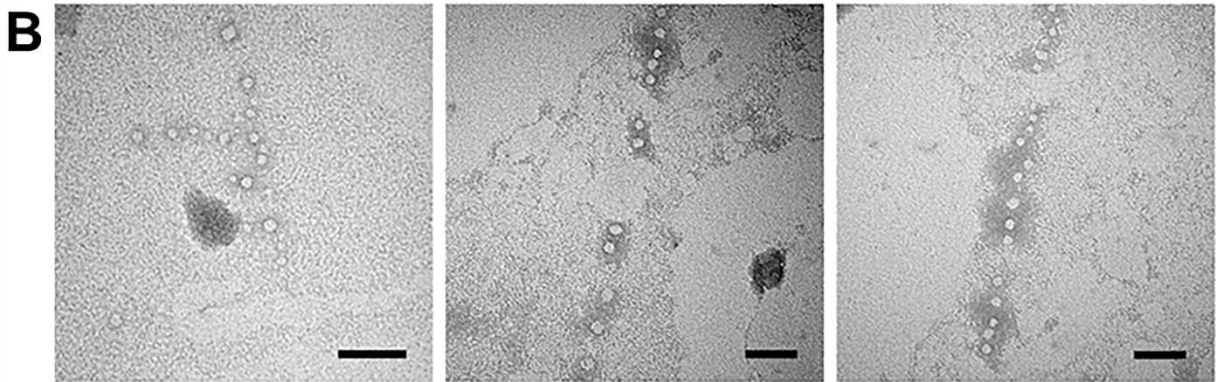
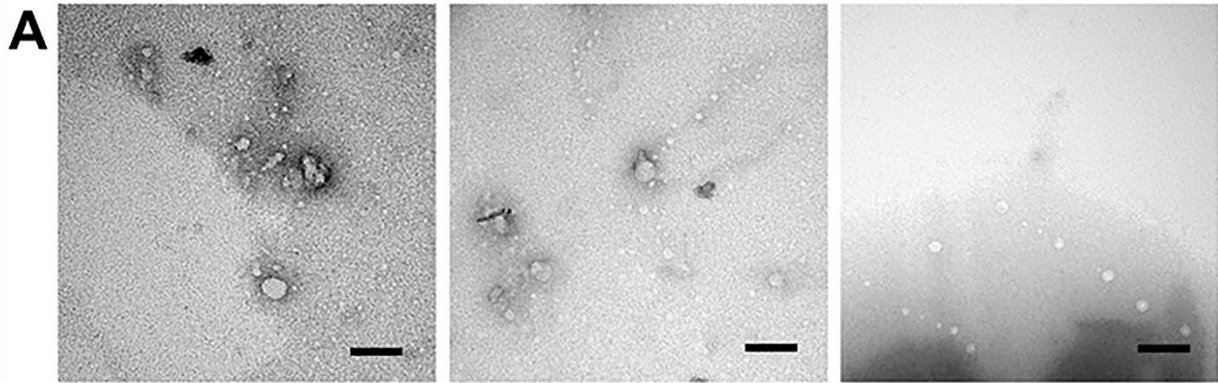


**Figura 15** - Efeito da superfície da mica neutralizada na formação de NCLPs de DENVC. (A-B) As amostras de DENVC (0,5 nM) foram incubadas na ausência (A) ou na presença de 25-mer (na razão molar de 20:1, DENVC:ssDNA) (B), e foram aplicadas na mica, após o tratamento com 3-aminopropil-trietoxissilano (APTES) – AP-mica – para neutralização de cargas superficiais. As pontas de seta (B) indicam as NCLPs formadas na presença de 25-mer. A escala de cores nas imagens de AFM em 2D e 3D (1 x 1  $\mu\text{m}$ ), indicam as alturas na escala topográfica. Os experimentos de AFM foram realizados em Tapping Mode®, em ar, à temperatura ambiente.

### 5.2.2 Análise da montagem *in vitro* de NCLPs por MET

Os experimentos de AFM indicaram a formação de NCLPs organizadas *in vitro*. Para obter mais informações sobre a estrutura das NCLPs montadas a partir de DENVC e ácidos nucleicos, realizamos experimentos de MET. Para isso, a preparação da amostra foi realizada nas mesmas condições estabelecidas para AFM e, em seguida, examinada após contrastação negativa com PTA 0,5% (Figura 16). A observação de NCLPs obtidos após a incubação de DENVC com

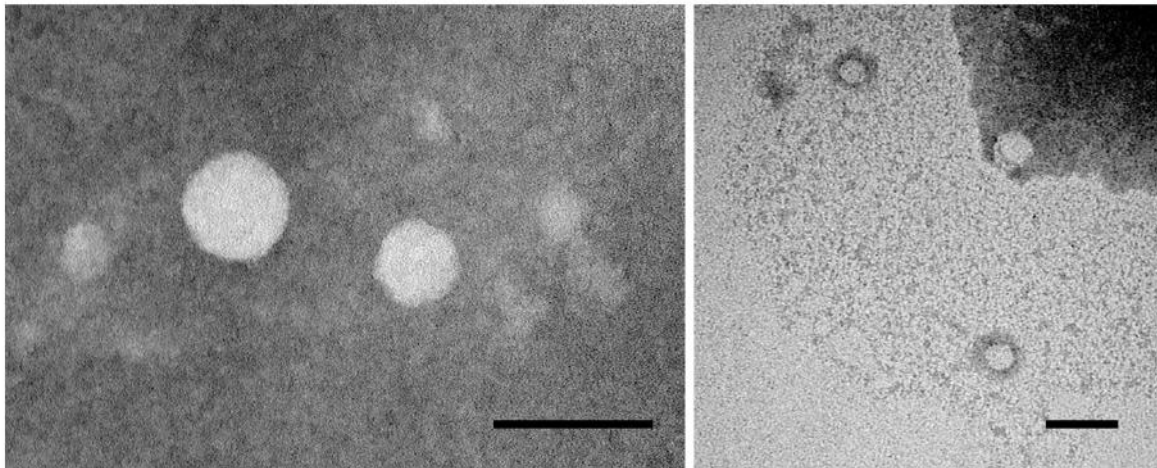
oligonucleotídeo 25-mer mostrou NCLPs homogêneos com uma forma esférica muito regular (**Figura 16B**). É importante enfatizar que os NCLPs não foram visualizados em grades de carbono sem tratamento de *glow discharge*. Esta observação sugere que a presença de uma superfície carregada negativamente é essencial para a obtenção de NCLPs nas condições analisadas.



**Figura 16** - Imagens de MET de NCLPs após montagem *in vitro*. **(A-B)** Micrografias eletrônicas representativas de NCLPs montadas a partir de DENVC na ausência **(A)** e **(B)** presença de 25-mer, na razão molar de 20:1. Todas as barras de escala correspondem a 100 nm. **(C-D)** Os histogramas representam a distribuição de frequência dos diâmetros das NCLPs de DENVC na ausência **(C)** e presença de 25-mer **(D)**. **(E)** Representação gráfica em boxplot para a distribuição de diâmetros obtida para NCLPs montadas *in vitro* em cada condição estudada. O diâmetro médio das partículas obtidas para DENVC (n = 89) e DENVC com 25-mer ssDNA (n = 99) foram  $22,62 \pm 11,59$  nm e  $22,02 \pm 8,75$  nm, respectivamente. A análise estatística foi realizada por meio do teste não paramétrico U de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$  (ns, não significativo).

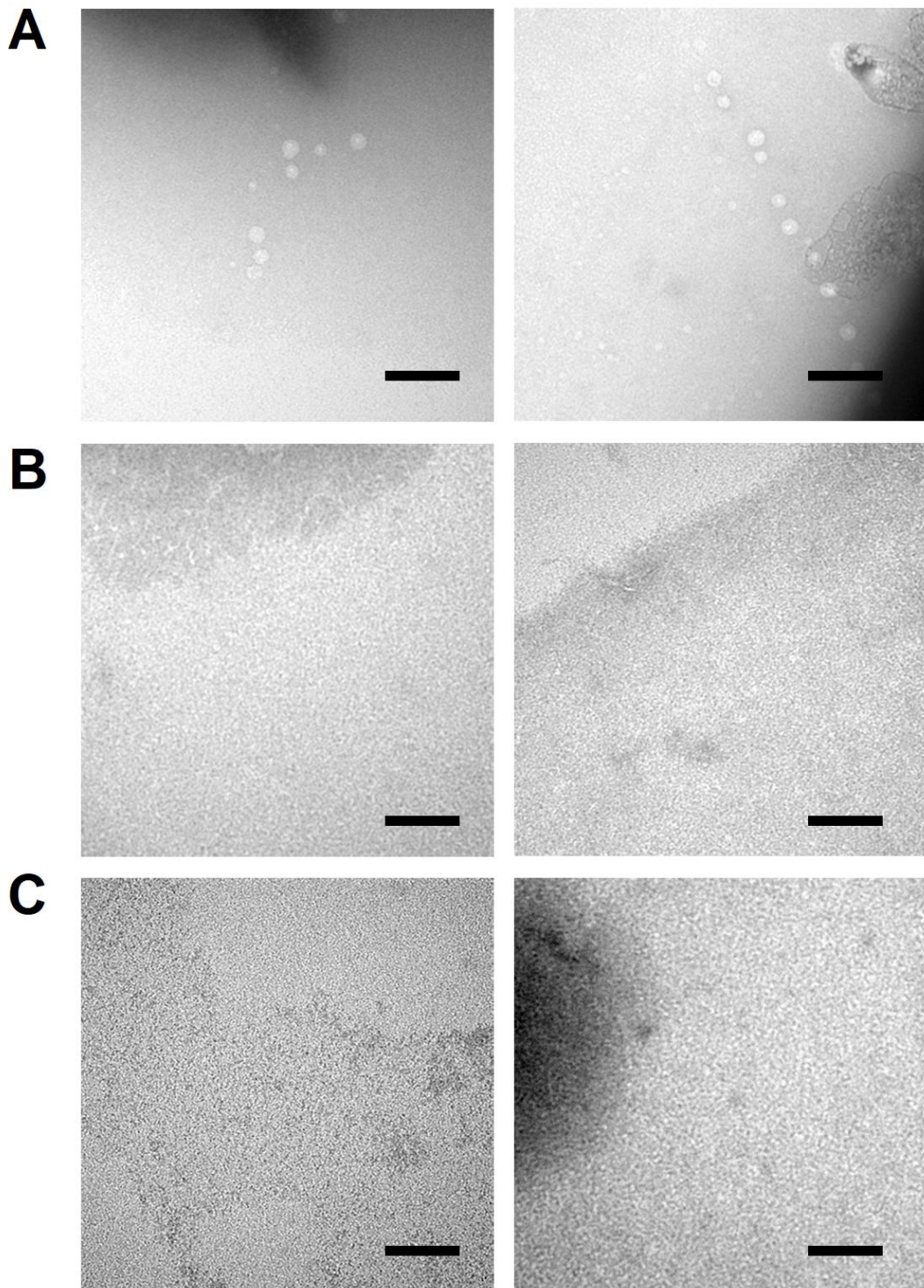
Conforme observado pelo AFM, as imagens de MET também mostraram partículas na ausência de oligonucleotídeos (**Figura 16A**). Os diâmetros medidos para as partículas formadas na presença e ausência de oligonucleotídeo 25-mer foram muito semelhantes, variando de 10 a 60 nm, com um diâmetro médio de  $22,62 \pm 11,59$  nm (n=89) e  $22,02 \pm 8,75$  nm (n= 99) para DENVC na ausência e presença de 25-mer, respectivamente (**Figura 16C-E**). Além disso, 75% dos NCLPs de DENVC formados na presença de 25-mer variaram de aproximadamente 10 a 25 nm (**Figura 16E**).

Apesar da semelhança de tamanho das partículas formadas na ausência ou presença de oligonucleotídeos, diferenças morfológicas importantes entre elas foram evidenciadas pelas imagens MET (**Figura 16A e 16B**). Embora a proteína DENVC sozinha tenha mostrado uma tendência a formar partículas nessas condições de montagem, elas não têm a mesma regularidade e organização observadas na presença de 25-mer. Além disso, partículas maiores e amorfas, e a presença de agregados também foram observadas. A presença de oligonucleotídeos de tamanho ideal parece direcionar as proteínas a se organizarem para formar NCLPs mais semelhantes ao NC de DENV (**Figura 16B**). As NCLPs formadas na presença de 25-mer podem ser visualizadas em mais detalhes na **Figura 17**.



**Figura 17** - Micrografias eletrônicas de NCLPs na presença de oligonucleotídeo 25-mer. Visualização em maior aumento, permitindo observar com mais detalhes as NCLPs, que possuem formato esférico e regular. A imagem à esquerda foi obtida no microscópio Hitachi. As barras de escala correspondem a 50 e 100 nm, respectivamente.

Para confirmar que a automontagem de NCLPs induzida pela superfície é uma propriedade específica de DENVC, experimentos de MET foram realizados sob as mesmas condições usadas para DENVC (DENVC a 0,5 nM, incubada *overnight* em tampão fosfato 55 mM, com NaCl 300 mM, pH 7,4), usando citocromo C (CytC), uma pequena proteína carregada positivamente (MW = 12 kDa; pI = 9,47), que foi utilizada como um controle por possuir características semelhantes a DENVC (pI de aproximadamente 12), e albumina sérica bovina (BSA), uma proteína neutra geralmente usada como controle não específico. Em contraste com os resultados obtidos com DENVC, não foram visualizadas estruturas oligoméricas ou NCLPs para CytC ou BSA (**Figura 18**), apoiando a hipótese da automontagem de DENVC orientada pela superfície.

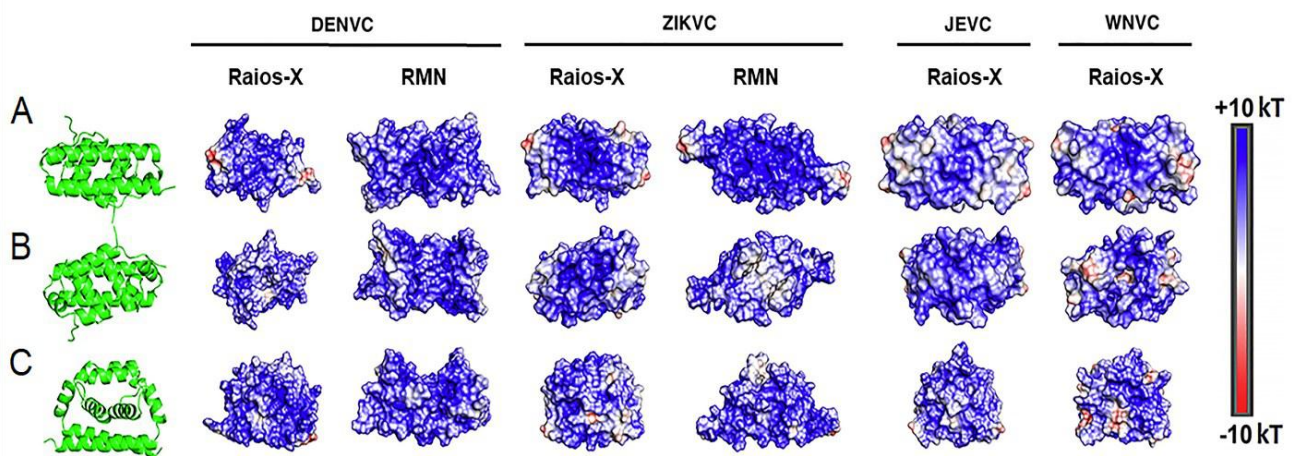


**Figura 18** - Especificidade da montagem de NCLPs de DENVC em superfícies negativamente carregadas. (A-C) Micrografias eletrônicas representativas de (A) DENVC, (B) Cyt C e (C) BSA após incubação *overnight*, em baixa concentração (0,5 nM) e na ausência de oligonucleotídeos. Todas as barras de escala possuem 100 nm.

### 5.3 Análise do potencial eletrostático de superfície de DENVC

A influência do efeito de superfície para a montagem de NCLPs nas condições utilizadas neste trabalho pode ser explicada pela neutralização das cargas positivas de DENVC e negativas das superfícies utilizadas. Para entender como a distribuição de cargas na superfície de DENVC poderia contribuir para o efeito de superfície observado, foi calculado o potencial eletrostático de superfície de DENVC, bem como das proteínas C de outros flavivírus que possuem estruturas resolvidas por RMN ou difração de raios-X. Os valores foram calculados através do *software* APBS, cujos valores de carga e estados de protonação foram determinados pelo servidor PDB2PQR juntamente com o programa PROPKA, em condições semelhantes as utilizadas em nossos experimentos: pH 7,0, 200 mM de NaCl, a 25 °C.

Os resultados obtidos em pH neutro revelaram que toda a superfície do dímero de DENVC é altamente eletropositiva, e que esse resultado é semelhante para as outras proteínas C de flavivírus, especialmente ZIKVC. Na **Figura 19**, as diferentes posições dos dímeros (face das hélices  $\alpha 4/\alpha 4'$ , face do núcleo hidrofóbico e superfície lateral), em que o mapa eletrostático das proteínas foi visualizado, deixam claro que não só as hélices  $\alpha 4/\alpha 4'$ , mas todas as outras hélices apresentaram superfícies positivas em toda extensão da proteína, inclusive as porções que compõem o núcleo hidrofóbico e a superfície lateral.



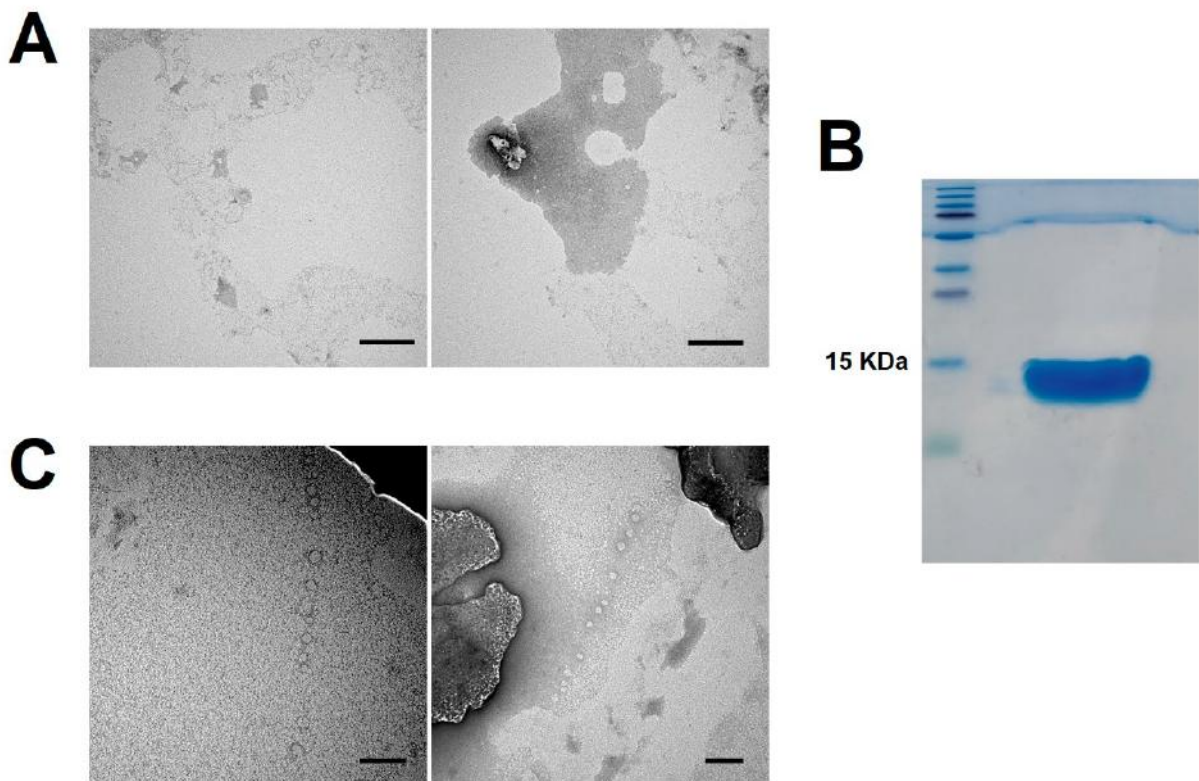
**Figura 19** - Análise do potencial eletrostático de superfície da proteína C de flavivírus. Mapa do potencial eletrostático de superfície do dímero da proteína C de flavivírus, obtido a partir de estruturas determinadas por difração de raios-X e RMN disponíveis para os flavivírus. As diferentes posições da estrutura são representadas em verde: (A) vistas da hélice  $\alpha 4/\alpha 4'$ , (B) fenda hidrofóbica e (C) vista lateral, respectivamente. O potencial eletrostático foi calculado pelos programas APBS-PDB2PQR e seu valor variou de -10 kT (vermelho) a +10 kT (azul). A superfície dos flavivírus representados apresenta potencial eletrostático altamente positivo.

Além da contribuição local de cargas positivas, é importante considerar que a carga positiva de resíduos vizinhos impacta a distribuição eletrostática da superfície como um todo. O potencial eletrostático da superfície de DENVC resulta não só da contribuição de cada carga positiva, mas da soma da contribuição das cargas positivas de resíduos vizinhos. Dessa forma, a concentração de cargas positivas presentes nas hélices  $\alpha 4/\alpha 4'$  parece ser refletida em toda proteína incluindo o núcleo hidrofóbico. Embora os cálculos do potencial eletrostático realizados não levem em consideração uma possível contribuição do N-terminal-IDR, essa região concentra a maior parte dos resíduos positivos da proteína (8 dos 24 resíduos positivos), o que provavelmente influencia ainda mais no potencial eletrostático de superfície.

#### **5.4 Análise de possíveis fatores que contribuem para a obtenção de NCLPs**

Durante as análises da montagem de NCLPs realizadas por TEM, observamos que algumas amostras de DENVC recombinante armazenadas por um longo período, não formavam NCLPs, ou não formavam com a mesma eficiência, apesar da incubação com oligonucleotídeo 25-mer. Para investigar um possível motivo para isso, realizamos uma análise da proteína por SDS-PAGE 18%. A proteína DENVC foi observada no peso molecular esperado, correspondente a ~12 KDa, e não observamos degradação visível no gel que justificasse a perda de sua capacidade de interagir com o DNA. Dessa forma, optamos por testar o protocolo desenvolvido após uma nova purificação de DENVC, e obtivemos novamente a formação de NCLPs (**Figura 20**).





**Figura 20** - Outros fatores podem contribuir para a montagem de NCLPs. (A) Imagens de MET representativas de tentativas de obtenção de NCLPs com DENVC armazenada por meses e submetida a ciclos de congelamento. (B) DENVC foi submetida à análise por SDS-PAGE e a banda correspondente a DENVC (~12 kDa) foi visualizada sem sinais de degradação visíveis por este método. (C) Imagens representativas de NCLPs obtidas por MET, após reação de montagem *in vitro* realizada na presença de DENVC recém-produzida incubada com oligonucleotídeo 25-mer.

Estes resultados nos fizeram pensar que outros fatores podem influenciar na montagem das NCLPs, modificando a estrutura ou alterando o potencial eletrostático da proteína, por exemplo, levando a uma ineficiência na interação com ácidos nucleicos, e conseqüentemente, montagem do NC. A degradação de regiões de DENVC importantes para a interação com ácidos nucleicos, ou ainda, a perda de possíveis PTMs durante o armazenamento e ciclos de congelamento, pela degradação de regiões com resíduos modificados, podem ter levado aos resultados observados na **Figura 20**.

Uma vez que a fosforilação de WNVC foi relacionada com a oligomerização, interação com RNA viral e localização celular (CHEONG; NG, 2011). Nossa hipótese é que PTMs, como a fosforilação, poderiam modificar a superfície eletrostática de DENVC, interferindo nos processos de oligomerização e montagem do NC.

Dessa forma, a próxima seção deste trabalho apresenta resultados preliminares obtidos a partir de abordagens experimentais para identificar a presença de possíveis PTMs em DENVC, que permitirão investigar seu impacto na montagem de NC.

## 5.5 Resultados preliminares da identificação de PTMs em DENVC

### 5.5.1 Identificação de PTMs em DENVC através de análises de bioinformática

Para testar a nossa hipótese, realizamos predições em programas de bioinformática disponíveis em plataformas online. A análise da sequência primária de DENVC por diferentes ferramentas para predição de sítios de PTMs, revelou uma lista de potenciais sítios para PTMs. Os resultados estão disponíveis na **Tabela 1**. A predição mostrou que a maioria dos sítios encontrados tem chance de ser fosforilados, mas também apresentou scores significativos para outras PTMs como metilação, acetilação, SUMOilação e glicosilação.

**Tabela 1.** Predição de sítios de modificações pós-traducionais (PTMs) de DENVC (CAA36004.1)

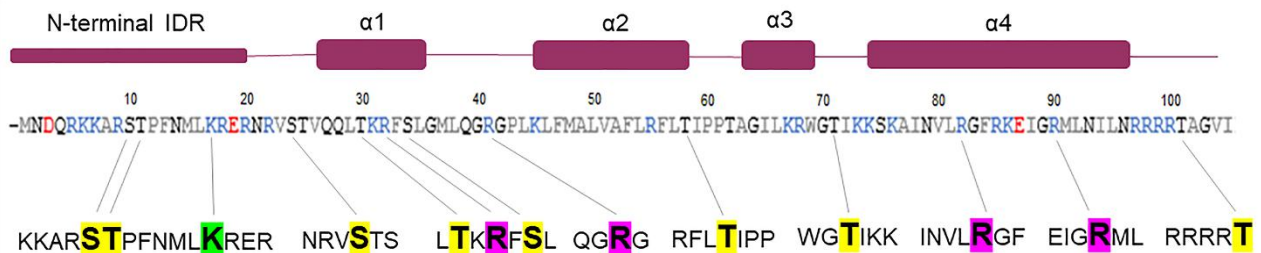
Posição	Aminoácido	PTM	Ferramenta de predição	Score <sup>1</sup>
2	N	N-glicosilação	NetNGlyc 1.0	-
5	R	Metilação	PRmePRed	0,54
6	K	Metilação	Musite	0,521
10	S	Fosforilação	Netphos 3.1/Musite	0,967/0,785
11	T	Fosforilação	Netphos 3.1/Musite	0,906/0,819
17	K	SUMOilação	Musite/SUMOplot	0,752/0,910
22	R	Metilação	PRmePRed	0,540
24	S	Fosforilação	Netphos 3.1	0,950
25	T	Fosforilação/ N-glicosilação	Netphos 3.1/NetNGlyc – 1.0	0,604/ -
30	T	Fosforilação/ N-glicosilação	Netphos 3.1/NetNGlyc – 1.0	0,862/ -
31	K	N-acetilação	Musite	0,51
32	R	Metilação	PRmePRed	0,699
34	S	Fosforilação	Netphos 3.1/ Musite	0,895/0,848
41	R	Metilação	PRmePRed/Musite	0,985/0,503
45	K	SUMOilação	SUMOplot	0,560
55	R	Metilação	PRmePRed	0,522
58	T	Fosforilação	Netphos 3.1	0,823
62	T	N-glicosilação	NetNGlyc 1.0	-
71	T	Fosforilação	Netphos 3.1	0,981

75	S	Fosforilação	Netphos 3.1	0,592
82	R	Metilação	PRmePRed	0,940
90	R	Metilação	PRmePRed	0,698
101	T	Fosforilação	Netphos 3.1/Musite	0,833/0,509

<sup>1</sup> Score é a confiança que o software tem de que o sítio é um verdadeiro sítio de PTM. Valores acima de 0,5 são considerados valores de confiança. Algumas ferramentas utilizadas não apresentam o cálculo do score, que foi substituído por -.

Os scores acima de 0,5 foram considerados valores de confiança e quanto mais próximo de 1, maior a chance de o sítio indicado ser um verdadeiro sítio de uma determinada modificação.

Para obter uma maior confiabilidade em nossas análises, optamos por realizar as análises em diferentes ferramentas online, que avaliam uma única PTM ou um conjunto delas, apresentando diferentes formas de análise, algoritmos e estratégias para predição dos possíveis sítios modificados (RAMAZI; ZAHIRI, 2021). Os resíduos mais prováveis de serem modificados por PTMs estão representados na **Figura 21**.



**Figura 21** - Representação esquemática de possíveis PTMs em DENVC. O N-terminal IDR e as quatro hélices de DENVC são indicadas pelas caixas roxas, cujo tamanho corresponde à sequência primária abaixo delas. Os resíduos de aminoácido estão coloridos na sequência primária de DENVC (CAA36004.1) de acordo com suas características: os resíduos básicos em azul; resíduos ácidos em vermelho; resíduos apolares em cinza; e resíduos neutros em preto. Os resíduos cujo score obtido na predição para PTMs foi aproximadamente 0,7 ou maior do que 0,7 estão destacados como resíduos com grande possibilidade de sofrer PTMs. Os resíduos de Ser e Thr possivelmente fosforilados estão destacados em amarelo (S10, T11, S24, T30, S34, T58, T71, T101). O resíduo de Lys (K17) apresentou alto score para SUMOilação e está destacado em verde. E os resíduos de Arg (R32, R41, R82, R90) possivelmente metilados estão destacados em rosa.

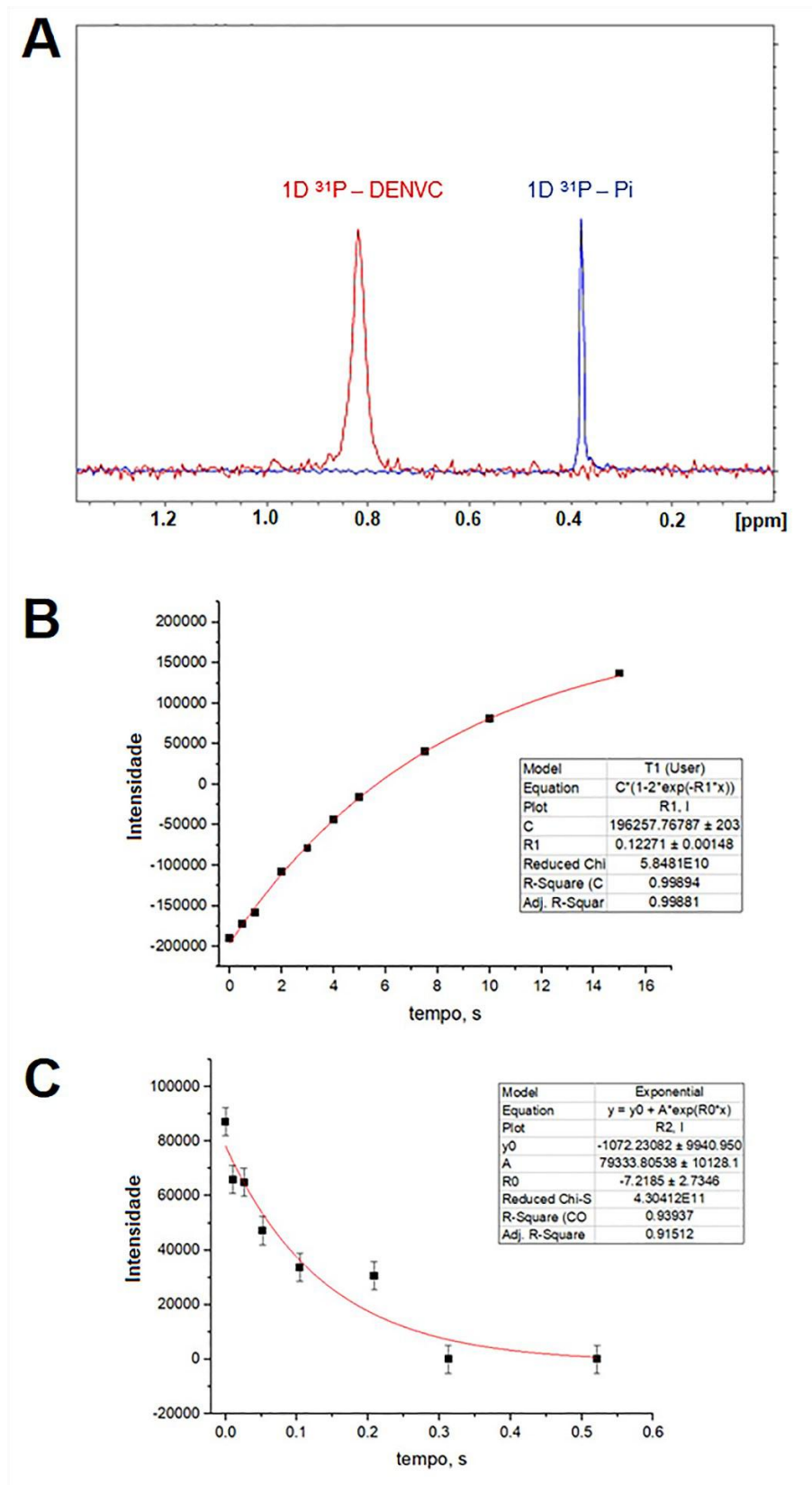
É possível observar que os resíduos possivelmente fosforilados se distribuem ao longo das quatro hélices  $\alpha$ , se concentrando principalmente no N-terminal IDR e na hélice  $\alpha 1$  (**Figura 21**), enquanto os resíduos de Arg, possivelmente metilados, se concentram na hélice  $\alpha 4$ .

Apesar de existirem ferramentas online para a detecção de metilação em lisinas, bem como para outras PTMs, como acetilação, não obtivemos sucesso em usá-las para as presentes análises. Por isso, a presença de metilação e acetilação em lisinas não foi explorada por essa abordagem.

### 5.5.2 Identificação da presença de fosforilação em DENVC recombinante por RMN

Para investigar a presença de fosforilação em DENVC recombinante, foi adquirido um espectro 1D de  $^{31}\text{P}$  por RMN da proteína em tampão contendo 10 mM de Hepes, 200 mM de NaCl, 5 mM de azida, 5 mM de EDTA e 2 mM de PMSF, pH 6,0. Como controle experimental, foi obtido um espectro 1D de um tampão de referência contendo fosfato inorgânico (Pi) (adição de 5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ao tampão descrito).

O espectro 1D de  $^{31}\text{P}$  obtido para DENVC foi comparado com o espectro obtido para o tampão contendo Pi (**Figura 22**). É possível observar a presença de um pico (em vermelho) mais alargado e deslocado para a esquerda no espectro de DENVC. Enquanto, um pico (em azul) mais fino é observado à direita, correspondendo ao sinal obtido para o Pi no espectro do tampão de referência. A comparação dos dois espectros permite observar que na presença da proteína há um sinal de fosfato diferente do sinal encontrado para o Pi no tampão de referência utilizado.



**Figura 22** - Espectros 1D  $^{31}\text{P}$  de DENVC. (A) Espectros 1D  $^{31}\text{P}$  de DENVC (em vermelho) e do tampão de referência contendo Pi (em azul). (B - C) Análise exponencial das intensidades dos picos obtidos nos espectros para obtenção dos parâmetros de relaxação,  $R_1$  e  $R_2$ , correspondentes às taxas de relaxação longitudinal e transversal, representados em B e C, respectivamente.

Foram obtidos então os valores médios das taxas de relaxação (CPMG),  $R_1$  (taxa de relaxação longitudinal) e  $R_2$  (taxa de relaxação transversal) (**Figura 22B-C**). A média das taxas de relaxação  $R_2/R_1$  foi verificada permitindo calcular o tempo de correlação rotacional aparente global do fosfo-aminoácido na proteína ( $\tau_c$ ) a partir da Equação (5) descrita no item 4.2.2. O valor de  $\tau_c^{app}$  obtido ao analisar o pico visualizado para DENVC foi  $9,13 \times 10^{-9} \pm 7,06 \times 10^{-11} \text{s}^{-1}$ . O valor de  $\tau_c$  global para a DENVC é de 13ns (JONES *et al.*, 2003), dessa forma, o valor encontrado é compatível com o esperado para a proteína. Considerando que estamos analisando o espectro  $^{31}\text{P}$ , e o fosfato provavelmente está ligado a resíduos de Ser ou Thr da cadeia lateral de DENVC, que devem possuir maior flexibilidade devido à mobilidade intrínseca, o valor encontrado é compatível com a presença de fosfato ligado a DENVC.

### 5.5.3 Identificação de PTMs em DENVC através de ensaios de western blotting

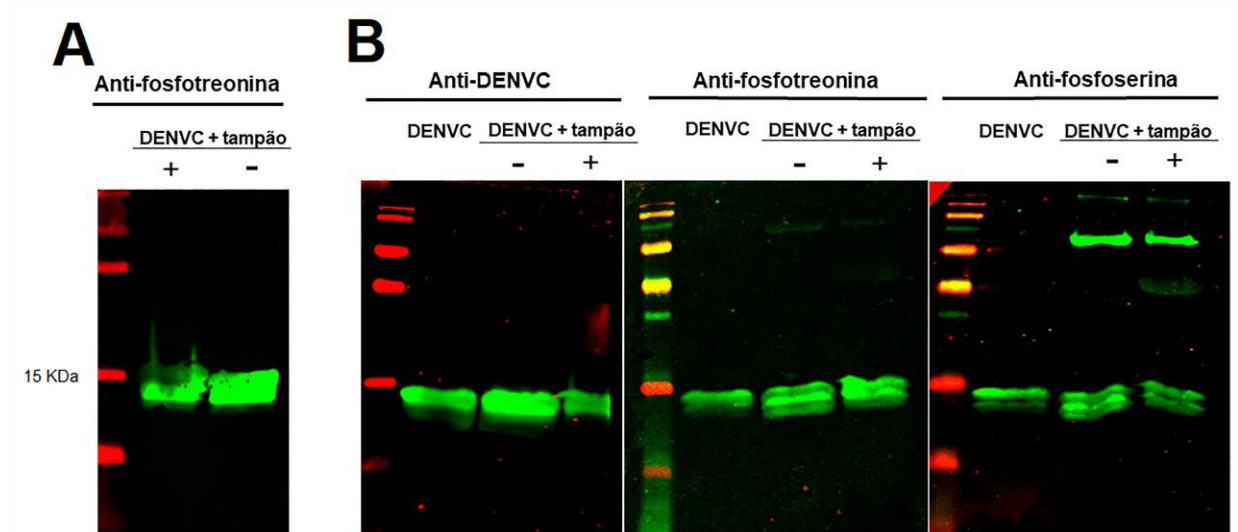
Para explorar mais a presença das PTMs sugeridas pelas análises de bioinformática, realizamos ensaios de western blotting com DENVC. Nestes ensaios, utilizamos tanto DENVC recombinante expressa em *E. coli* quanto DENVC expressa após a infecção em células de mamífero (Huh7) com DENV. Essa abordagem permite a análise de PTMs em DENVC, tanto em condições de expressão iguais às da DENVC utilizada nos ensaios de montagem *in vitro* de NCLPs, quanto no contexto da infecção viral.

#### 5.5.3.1 Ensaios de western blotting com DENVC recombinante

Foram realizados ensaios de western blotting para avaliar a presença de fosforilação em DENVC recombinante. Para isso, DENVC foi preparada em tampão sem fosfato (10 mM de HEPES, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM de azida e 2 mM de PMSF, pH 7,4). Os resultados mostraram bandas correspondentes a DENVC, após o tratamento com ambos os anticorpos utilizados para identificação de fosforilação: anti-fosfoserina e anti-fosfotreonina (**Figura 23**).

Para confirmar se de fato DENVC recombinante possui tal modificação realizamos o tratamento com fosfatase (**Figura 23A**). Inicialmente, realizamos um teste somente com o anticorpo anti-fosfotreonina. Neste teste, 10  $\mu\text{g}$  de DENVC foram tratados com 10 U de fosfatase na presença de um tampão de reação contendo 10 mM de Tris, pH 7,4, 10 mM de NaCl, 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM de ditioneitol (DTT) e glicerol 5%. Os resultados indicaram uma redução na banda correspondente ao tratamento com fosfatase quando comparada com a condição controle,

na qual a proteína foi submetida as mesmas condições de tratamento, porém na ausência de fosfatase, que foi substituída pelo tampão da reação (**Figura 23A**).



**Figura 23** - Western blotting para detecção de fosforilação em DENVC recombinante. **(A)** Ensaio de western blotting realizado com 10  $\mu$ g de DENVC, tratada ou não, com 10 U de fosfatase alcalina, por 3 h a temperatura ambiente, em tampão contendo 10 mM de Tris, pH 7,4, 10 mM de NaCl, 1 mM de  $MgCl_2$ , 0,1 mM de ditioneitol (DTT) e glicérol 5%. Foi realizada marcação apenas com anti-fosfotreonina. **(B)** Ensaio de western blotting após a reação utilizando uma menor quantidade de proteína (2  $\mu$ g) na presença da mesma quantidade de fosfatase (10 U) em tampão apropriado para a fosfatase utilizada (FastAPT<sup>TM</sup> 10X (Thermo Scientific)). Foram realizadas marcações com anticorpos primários: anti-DENVC para identificar a presença de DENVC em todas as condições analisadas (~12kDa); anti-fosfotreonina e anti-fosfoserina para identificar a presença de fosforilações em resíduos de Thr e Ser de DENVC, respectivamente. Para **(A)** e **(B)** a presença de fosfatase está representada na figura com um sinal de +, enquanto a condição controle, na qual a proteína foi submetida as mesmas condições de tratamento, na ausência de fosfatase, está indicada com sinal de -.

Com o objetivo de otimizar o tratamento e observar uma redução mais expressiva, realizamos novamente o tratamento de DENVC com fosfatase, porém com uma concentração menor de DENVC (2  $\mu$ g) e com o tampão específico para uso com a fosfatase utilizada (tampão 1X presente na reação: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 a 37 °C, 5 mM  $MgCl_2$ , 0,1 M KCl, 0,02 % TX-100 and 0,1 mg/mL BSA). Além disso, realizamos três marcações separadas para DENVC, fosfotreonina e fosfoserina. No entanto, neste segundo teste a redução de marcação para DENVC marcada com anticorpo anti-fosfotreonina não foi observada da mesma forma (**Figura 23B**). Além disso, foi observada uma marcação para anti-fosfoserina em banda com peso molecular correspondente a ~70 kDa.

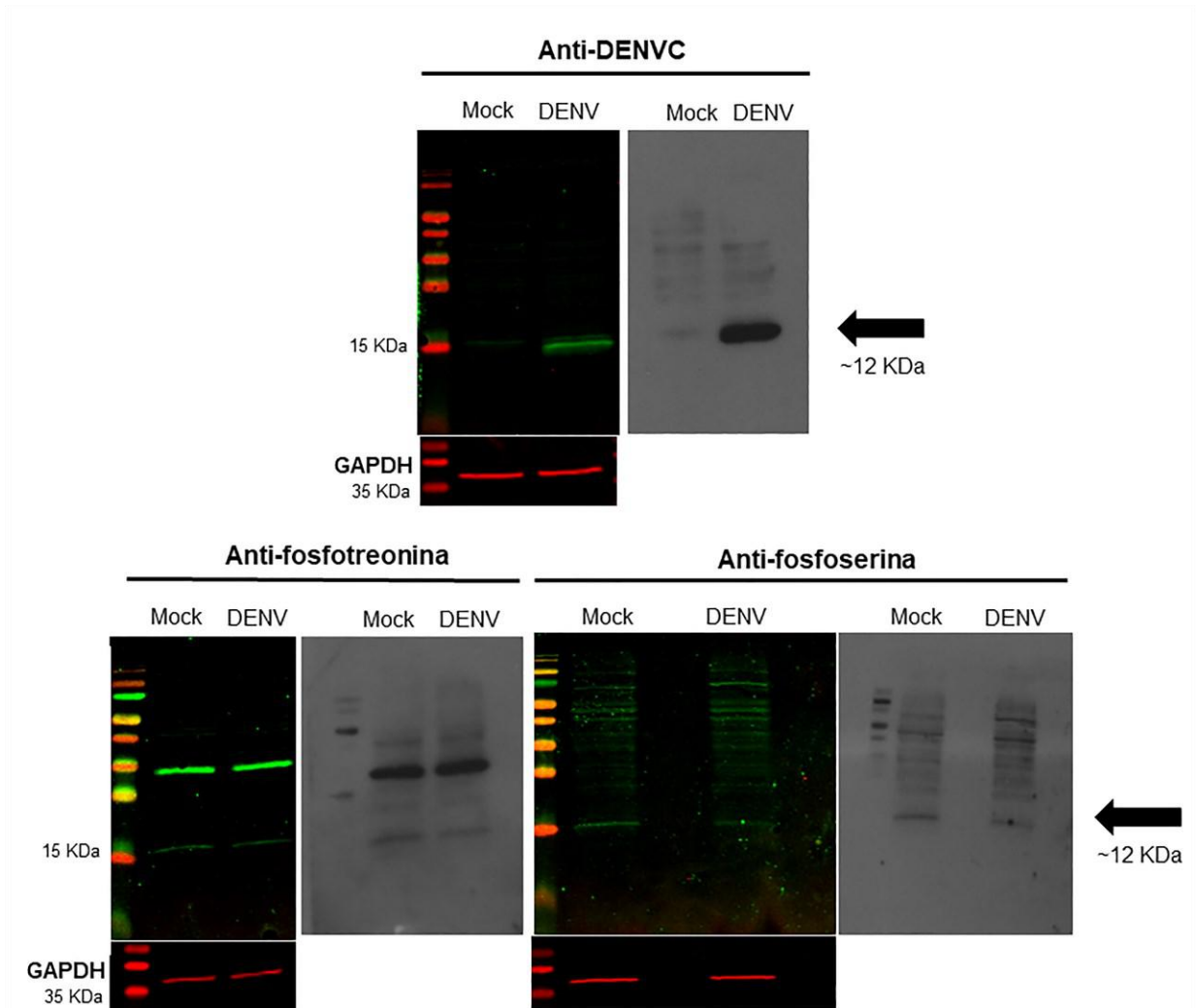
### 5.5.3.2 Ensaio de western blotting com DENVC expressa por células de mamífero

Para avaliar a presença de PTMs em DENVC expressa em células de mamífero, células Huh7 foram infectadas com DENV2, ou tratadas com mock, para obtenção de extratos de proteínas totais. Os extratos foram utilizados em ensaios de western blotting para avaliar: (1) a presença de DENVC no extrato de células infectadas, detectadas com anticorpos anti-DENVC; (2) a fosforilação de resíduos de Ser e Thr, conforme indicado pelos resultados obtidos com as ferramentas de bioinformática e descrito na literatura para WNV (BHUVANAKANTHAM; CHEONG; NG, 2010; CHEONG; NG, 2011); (3) a metilação de resíduos de Lys e Arg.

Os primeiros resultados obtidos para a identificação de fosforilação em DENVC não foram conclusivos (**Figura 24**). Apesar da banda correspondente a DENVC ter sido identificada somente no extrato de proteínas obtidos das células infectadas com DENV, foi possível observar a presença de bandas marcadas com anticorpos antifosfotreonina e antifosfoserina no mesmo peso molecular que corresponde a DENVC, tanto no extrato obtido de células tratadas com mock quanto com DENV.

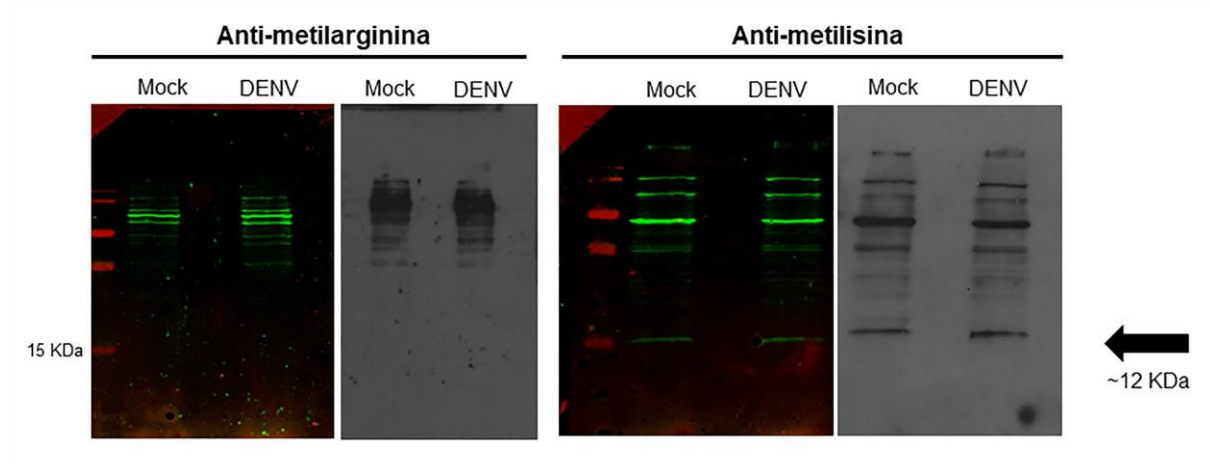
As membranas foram marcadas com anticorpo secundário fluorescente e reveladas no equipamento LI-COR Odyssey, e, em seguida, também foi testado o método de revelação por quimiluminescência, para avaliar qual melhor método de revelação para visualização das bandas de proteína encontradas. No entanto, ambos os métodos resultaram em um perfil de marcações semelhante.





**Figura 24** - Identificação de fosforilação em resíduos de Ser e Thr de DENVC por ensaio de western blotting. Ensaio de Western blotting representativos do perfil de expressão de DENVC em células Huh7 infectadas com DENV2 ou tratadas com mock, e da presença de fosforilação nesta proteína. Foram realizadas marcações com anticorpos primários: anti-DENVC para identificar a presença de DENVC (~12KDa); e anti-fosfotreonina e anti-fosfoserina, para identificar a presença fosforilações em resíduos de Thr e Ser de DENVC. A marcação de GAPDH, uma proteína endógena, também foi realizada. A revelação foi realizada por dois sistemas para comparação. A detecção a partir de anticorpos secundários fluorescentes foi revelada no equipamento Odyssey, enquanto a detecção por anticorpos conjugados a peroxidase foi realizada a partir da reação de quimiluminescência. A seta preta indica a banda correspondente ao peso molecular de DENVC (~12KDa).

Os resultados dos ensaios realizados com os anticorpos primários anti-metilisina e anti-metilarginina também não foram conclusivos. Não houve marcação correspondente ao peso molecular de DENVC quando a membrana foi marcada com metilarginina. No entanto, foram observadas bandas na altura de DENVC, nos extratos obtidos após tratamento com mock e DENV, após marcação com anti-metilisina (**Figura 25**).



**Figura 25** - Identificação de metilação em resíduos de Arg e Lys de DENV2 por ensaio de western blotting. Ensaios de Western blotting do perfil de expressão de DENV2 contendo metilação em resíduos de Arg e Lys em células Huh7 infectadas com DENV2 ou tratadas com mock. Foram realizadas marcações com anticorpos primários anti-metilarginina e anti-metilisina. A revelação foi realizada por dois sistemas para comparação. A detecção a partir de anticorpos secundários fluorescentes foi revelada no equipamento Odyssey, enquanto a detecção por anticorpos conjugados a peroxidase foi realizada a partir da reação de quimiluminescência. A seta preta indica a banda correspondente ao peso molecular correspondente à DENV2 (~12KDa).

A obtenção de resultados não conclusivos era esperada uma vez que o extrato de células infectadas contém muitas outras proteínas que podem ser fosforiladas e/ou metiladas, e podem ter peso molecular compatível com DENV2. A presença de muitas bandas reagindo com os anticorpos utilizados dificultou a identificação de DENV2, além disso, a proporção de DENV2 fosforiladas ou metiladas em relação a todas as proteínas fosforiladas presentes no extrato pode ser muito pequena, dificultando as análises.

Dessa forma, serão necessários ensaios de imunoprecipitação para isolar somente a proteína de interesse, além de ajustes de tempos de infecção que podem facilitar a identificação de possíveis estados modificados da proteína.

## 6 DISCUSSÃO

Embora a proteína C desempenhe um papel essencial na interação e proteção do genoma viral, culminando com a montagem do NC, faltam informações acerca dos mecanismos e aspectos estruturais envolvidos nestes processos durante a infecção por DENV. Com isso, torna-se fundamental estudar esses eventos e possíveis fatores que podem influenciá-los.

Neste trabalho, descrevemos uma metodologia sistemática para montagem *in vitro* de NCLPs, utilizando DENVC recombinante e oligonucleotídeos ssDNA. Utilizando técnicas biofísicas, demonstramos características importantes do processo de montagem em solução, incluindo o tamanho do ácido nucleico necessário para a formação de NCLP, bem como a dependência da concentração e a estequiometria do processo. Além disso, levantamos algumas hipóteses sobre que fatores poderiam interferir nos processos de montagem do NC e exploramos este processo experimentalmente.

Comparando a titulação de DENVC com oligonucleotídeos de diferentes tamanhos (2-, 5- e 25-mer) através de diferentes técnicas como SAXS (**Figura 11**), espalhamento de luz estático (**Figura 12A**) e anisotropia de fluorescência (**Figura 12B-C**), mostramos que um oligonucleotídeo 2-mer é muito pequeno, enquanto 5-mer parece ter sido suficiente para a formação de NCLPs, em solução. Esses dados sugerem uma dependência do tamanho do oligonucleotídeo para a formação de partículas, como já foi descrito para outros vírus, como os alfavírus, por exemplo (MAASSEN *et al.*, 2018; RAYAPROLU *et al.*, 2017; TELLINGHUISEN *et al.*, 1999). Nossos experimentos em solução resultaram em curvas dependentes da concentração, indicando a formação de grandes oligômeros solúveis ao usar concentrações crescentes de ssDNA de 5 e 25-mer. Este comportamento foi confirmado pelos experimentos de anisotropia, revelando que a saturação ocorre a uma razão molar de 1:1 (DENVC:oligonucleotídeo) para ambos os oligonucleotídeos.

Além disso, os experimentos de SAXS, nos quais DENVC foi incubado com diferentes concentrações de oligonucleotídeo 5-mer, demonstraram um perfil de dependência de concentração com a formação de um platô de saturação, indicando um equilíbrio envolvendo o dímero DENVC e NCLPs. O  $R_g$  de ~12,9 nm obtido pela análise de Guinier foi compatível com os tamanhos dos NCLPs observados por AFM e TEM (diâmetro médio de ~ 22 nm; **Figuras 14 e 16**), bem como com o tamanho interno do vírion (~ 30 nm).

Os nossos resultados mostrando a formação de NCLPs na presença do oligonucleotídeo 5-mer, em solução, sugerem que não há necessidade de estrutura secundária de ácido nucleico para desencadear a montagem de NCLPs de DENVC. Isso seria importante no contexto do ciclo

de replicação do vírus, no qual DENVC, como uma proteína multifuncional, pode atuar tanto na encapsidação do genoma quanto como uma proteína chaperona das estruturas secundárias do RNA durante os eventos de circularização do RNA viral necessários para a replicação (YONG *et al.*, 2021). Neste trabalho, optamos por trabalhar com oligonucleotídeos pequenos, para os quais a atividade chaperona de DENVC não é necessária, simplificando o sistema.

Embora a montagem *in vitro* de NCLPs tenha sido bem estabelecida para alfavírus (TELLINGHUISEN *et al.*, 1999; TELLINGHUISEN; KUHN, 2000; WENGLER *et al.*, 1984) e HCV (KUNKEL *et al.*, 2001), para flavivírus como DENV (JONES *et al.*, 2003; LÓPEZ *et al.*, 2009; TEOH *et al.*, 2014) e TBEV (KAUFMAN *et al.*, 2020; KIERMAYR *et al.*, 2004) o mesmo sistema apresentou diferentes resultados.

Os ensaios *in vitro* de montagem de NCLPs utilizados em estudos de flavivírus são baseados nos ensaios criados por Wengler e colaboradores (1982) e aprimorados por Tellinghuisen e colaboradores (1999), para o estudo em alfavírus (TELLINGHUISEN *et al.*, 1999; WENGLER *et al.*, 1982). Para os alfavírus, os primeiros estudos mostraram a necessidade da presença de ácidos nucleicos para a oligomerização e montagem do NC. Essa interação foi descrita como inespecífica e um tamanho mínimo de 14 nucleotídeos foi necessário para a formação de NC. Além disso, DNAs de dupla fita (dsDNAs) não foram capazes de formar NC (TELLINGHUISEN *et al.*, 1999). Tais ensaios são reprodutíveis e forneceram informações acerca das NCLPs formadas, como a organização em uma geometria altamente ordenada, com 240 cópias da proteína C montada com uma simetria icosaédrica T4 (HOLLAND CHENG *et al.*, 1995; MENDES; KUHN, 2018; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002), assim como sua relação com o tamanho da carga utilizada (RAYAPROLU *et al.*, 2017). Já para os flavivírus, não há um consenso sobre o funcionamento dos sistemas de obtenção *in vitro* do NC. Em estudos desenvolvidos por Jones e colaboradores, em 2003, com DENV e YFV, a utilização dos sistemas anteriormente descritos para alfavírus, não foram bem sucedidos (JONES *et al.*, 2003). Por outro lado, alguns trabalhos obtiveram NCLPs de DENV, assim como de TBEV, após a interação com oligonucleotídeos de DNA ou RNA transcrito, utilizando protocolos semelhantes ou estratégias como a utilização de detergente durante o processo de montagem (KIERMAYR *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2009; TEOH *et al.*, 2014).

Diante das dificuldades em estabelecer um sistema de montagem de NCLPs eficiente e reprodutível para flavivírus, desenvolvemos um protocolo para montagem sistemática de NCLPs obtidas a partir de DENVC recombinante diferente dos protocolos descritos anteriormente. Nossos resultados indicaram que DENVC possui uma grande tendência para a formação de agregados amorfos, o que também foi relatado durante as tentativas de montagem *in vitro* de

NCLPs, bem como para o isolamento de NC de partículas virais purificadas de células infectadas por flavivírus (KAUFMAN *et al.*, 2020; KIERMAYR *et al.*, 2004). Isso ocorre provavelmente devido à exposição de superfícies hidrofóbicas da proteína C após interação com ácidos nucleicos (BYK; GAMARNIK, 2016; KIERMAYR *et al.*, 2004).

Em nossa metodologia, superamos o obstáculo da agregação de DENVC em estruturas amorfas realizando experimentos de imagem em uma concentração de proteína muito baixa (**Figuras 13 e 14**). As imagens de AFM e MET mostraram que o uso de concentrações subnanomolares de DENVC foi essencial para a observação de NCLPs de formato regular e homogêneos, com agregação mínima. Os experimentos de anisotropia de fluorescência também nos permitiram trabalhar com DENVC na concentração de 50 nM, para a qual não observamos agregação ou precipitação mesmo em condições com excesso de DNA.

As NCLPs que observamos por MET são semelhantes em diâmetro e forma com as partículas de DENVC obtidas *in vitro* anteriormente (LÓPEZ *et al.*, 2009). Em 2009, Lopez e colaboradores, realizaram a interação de DENVC com oligonucleotídeos de DNA de 50 bases em uma proporção muito baixa (razão molar de 100:1, DENVC:DNA). No entanto, em contraste com os resultados mostrados anteriormente, ou em nossos experimentos realizados em solução (**Figuras 11 e 12**), observamos a formação de NCLPs na ausência de oligonucleotídeos quando as amostras foram preparadas e observadas por AFM ou MET (**Figuras 14A e 16A**).

Embora esses resultados tenham sido diferentes do que esperávamos, acreditamos que eles podem ser explicados pelas condições otimizadas utilizadas para preparação das amostras e aquisição de imagens de AFM ou MET. Especialmente a deposição de DENVC em concentração muito baixa sobre superfícies carregadas negativamente (mica ou superfícies de grade de carbono, respectivamente), que pode contribuir para a automontagem de NCLPs. A montagem de partículas na ausência de ácido nucleico também foi relatada para HCV (ACOSTA-RIVERO *et al.*, 2005; DE SOUZA *et al.*, 2016).

As características únicas das proteínas C dos flavivírus, como seu pequeno tamanho e o potencial eletrostático de superfície altamente positivo (**Figura 19**), podem facilitar ainda mais a interação com o substrato sólido carregado, conduzindo o processo de automontagem. Assim, a presença da superfície de mica do AFM ou da grade de carbono utilizada nos experimentos de MET pode ter fornecido uma plataforma para a formação de NC, mimetizando a presença de interfaces celulares e auxiliando na montagem do NC. A necessidade de associação entre DENVC e LDs para a produção de partículas virais infecciosas, bem como, a necessidade da presença de detergentes nos protocolos utilizados para obtenção de NCLPs de DENV e TBEV,

reforçam a importância da presença de componentes negativamente carregados nestes processos (KIERMAYR *et al.*, 2004; SAMSA *et al.*, 2009; TEOH *et al.*, 2014).

A partir dos nossos resultados formulamos a hipótese de que a automontagem do DENVC é dirigida pela superfície, conforme descrito para outras proteínas, incluindo proteínas virais (KELLER; GRUNDMEIER, 2020; VALBUENA; MATEU, 2015, 2017; WHITEHOUSE *et al.*, 2005). De fato, em solução (ausência de superfície), a proteína DENVC é dimérica e não há oligomerização na ausência de oligonucleotídeos, como foi observado em muitas condições (JONES *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2012), bem como em nossos resultados de SAXS, espalhamento de luz e anisotropia de fluorescência (**Figuras 11 e 12**). Um estudo de AFM demonstrou automontagem rápida e eficiente da proteína do capsídeo do vírus da imunodeficiência humana (HIV) quando uma concentração muito baixa de proteína foi aplicada diretamente sobre um substrato de mica (carregado negativamente), mostrando a necessidade de uma superfície para conduzir o processo nestas condições e reforçando nossa hipótese (VALBUENA; MATEU, 2015, 2017). Força iônica, pH, temperatura, concentração, ou ainda, a sequência da proteína, podem afetar as interações de superfície (KELLER; GRUNDMEIER, 2020; WHITEHOUSE *et al.*, 2005). Nossa hipótese foi sustentada principalmente pelo fato de termos obtido NCLPs na ausência de oligonucleotídeos somente quando usamos superfícies carregadas negativamente (**Figuras 14 e 16**), mas não após neutralização de carga superficial (**Figura 15**), reforçando que uma superfície adequada pode induzir a formação de NCLP em vez de agregados amorfos.

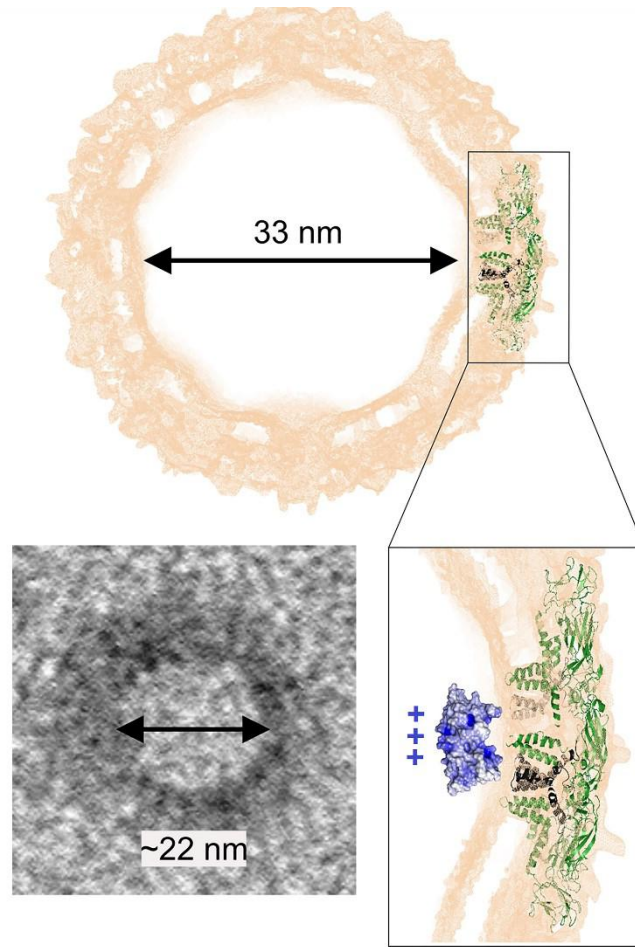
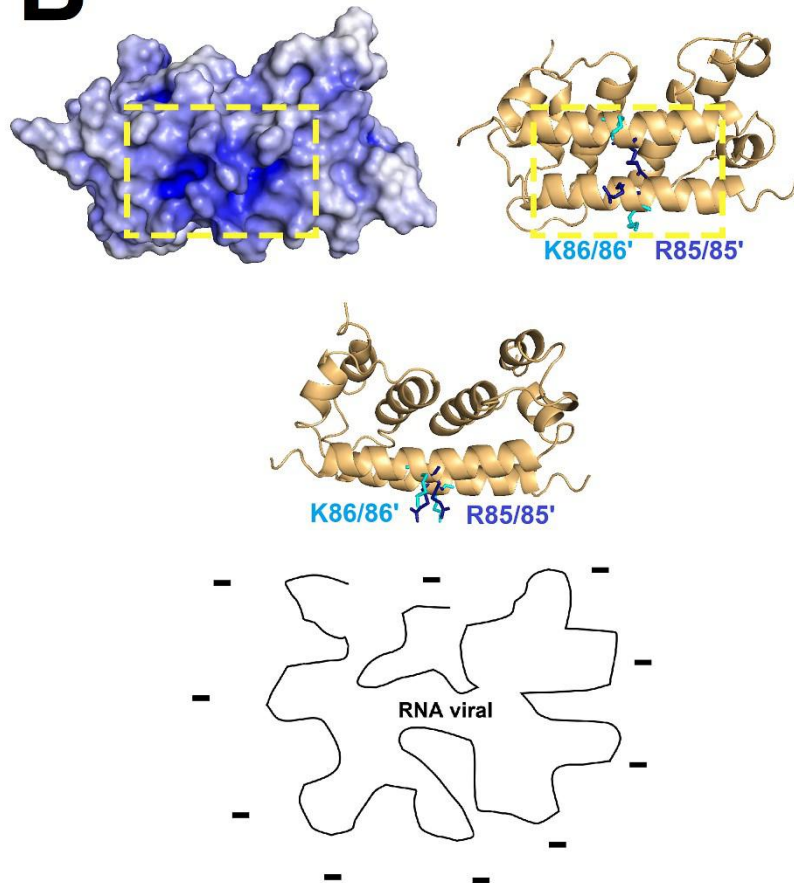
Os resultados obtidos até aqui reforçam a teoria de que a formação do NC de DENV requer a neutralização das cargas positivas da proteína C, seja através da interação com ácidos nucleicos ou com superfícies carregadas negativamente. De fato, esse parece ser o principal evento envolvido na montagem de NC em vírus de ssRNA. Esses vírus geralmente empacotam seus genomas e montam seus NC simultaneamente (TWAROCK *et al.*, 2018). Assim, acredita-se que as cargas negativas e comprimento do RNA genômico podem conduzir a orientação das proteínas C para permitir a interação proteína-proteína e oligomerização.

No entanto, os modelos de neutralização de carga propostos para explicar o processo de montagem do NC de DENV são baseados na presença de uma distribuição assimétrica de cargas ao longo da estrutura de DENVC (BYK; GAMARNIK, 2016; MA *et al.*, 2004). O modelo, inicialmente proposto por Ma e colaboradores (2004) se baseia na existência de uma face formada pelas hélices  $\alpha 4/\alpha 4'$ , altamente básica, que realizaria a interação com ácidos nucleicos, e uma face oposta, hidrofóbica, que realizaria a interação com superfícies de membrana (MA *et al.*, 2004). Recentemente, também foi considerado que além da região positiva composta pelas

hélices  $\alpha 4/\alpha 4'$ , o N-terminal IDR, que concentra a maior quantidade de cargas positivas presentes na proteína, é uma região que pode interagir com o RNA (BYK; GAMARNIK, 2016). Embora essa teoria seja amplamente propagada na literatura, nossas análises estruturais, realizadas a partir da medida do potencial eletrostático de superfície de DENVC, revelaram uma superfície altamente eletropositiva em toda a proteína, e não restrita a  $\alpha 4-\alpha 4'$  (**Figura 19**). Isso se deve, provavelmente, a presença de uma grande porção hidrofílica em torno do núcleo hidrofóbico, composta principalmente pelas hélices  $\alpha 4-\alpha 4'$  que contém numerosos resíduos básicos de Lys e Arg. Além disso, é possível especular que a eletropositividade seria ainda maior caso as cargas positivas presentes no N-terminal IDR fossem levadas em consideração nas análises. Essas observações são verdade não só para DENVC, foco deste trabalho, mas também para as proteínas C de outros flavivírus, como ZIKV, JEV e WNV, que também foram incluídas em nossas análises.

Apesar de mutações na interface do dímero  $\alpha 4/\alpha 4'$  do DENVC afetarem a estabilidade estrutural e prejudicarem a interação com RNA (FIGUEIRA-MANSUR *et al.*, 2019), e de vários estudos mostrarem que DENVC e outras proteínas de flavivírus são capazes de interagir com diferentes ácidos nucleicos, incluindo DNA ou RNA de fita simples ou dupla (BYK; GAMARNIK, 2016; LI *et al.*, 2018; SAMUEL *et al.*, 2016; SHANG *et al.*, 2018; TSENG *et al.*, 2007), os locais específicos envolvidos na ligação a ácidos nucleicos não foram mapeados. Considerando essas particularidades, ressaltamos que a montagem do NC provavelmente envolve mecanismos mais complexos, não apenas baseado na assimetria de distribuição de cargas.

A neutralização de cargas que dirige a montagem do NC deve ser um processo muito coordenado no ambiente celular para evitar agregação inespecífica, explicando a alta tendência da DENVC de formar agregados amorfos *in vitro* em vez de um NC organizado. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, elaboramos um modelo esquemático comparando o tamanho das NCLPs obtidas em nossas análises (~ 22 nm) com o tamanho compatível com NC na estrutura viral de DENV2 (PDB ID: 3J27) (~ 33 nm) (**Figura 26A**). Os dados de potencial eletrostático da superfície de DENVC (**Figura 19**), nos chamaram a atenção para a presença de um ponto muito positivo que na representação hipotética da orientação de DENVC no NC, ficaria voltado para o interior da partícula disponível para interação com o RNA viral (**Figura 26B**). Este modelo nos levou a propor a hipótese de que a formação do NC dependeria da neutralização desse ponto, altamente positivo, composto pelos resíduos de Arg 85 e Lys 86, presentes na hélice  $\alpha 4-\alpha 4'$ . Propomos que este ponto seja o principal sítio de ligação do DENVC ao RNA viral, e que ele deve ser neutralizado primeiro para permitir a oligomerização e formação do NC (**Figura 26B**).

**A****B**



**Figura 26** - Estrutura do DENV e modelo esquemático da montagem dos NCLPs. **(A)** Representação do mapa de densidade (rosa) da estrutura de cryo-EM da partícula madura de DENV2 (PDB ID: 3J27), destacando a posição das proteínas E (verde) e M (cinza escuro), e a região central de 33 nm de diâmetro, compatível com os NCLPs observados neste trabalho por MET, com diâmetro de ~ 22 nm (painel inferior à esquerda). DENVC é representada em uma posição hipotética no NC (painel inferior à direita), com a representação de um ponto altamente positivo (indicado por +++). A representação da superfície de DENVC foi gerada no PyMOL (PDB ID: 1R6R) e colorida de acordo com seu mapa de potencial eletrostático calculado no *software* APBS (200 mM NaCl, pH 7,0, 25 °C) como azul (positivo), branco (neutro) e vermelho (negativo). **(B)** Representação de superfície de DENVC ao lado da estrutura de DENVC (salmão) posicionada com vistas da hélice  $\alpha 4/\alpha 4'$ , ressaltando a existência de um ponto altamente positivo (destacado com quadrado tracejado amarelo). A positividade é conferida pelos resíduos de Arg 85 (resíduo em azul escuro) e Lys 86 (resíduo em ciano) destacados na estrutura de DENVC, que possivelmente correspondem ao principal sítio de ligação de DENVC ao RNA viral, conforme o esquema ilustrado em **B** (painel inferior).

O modelo sugerido foi baseado na existência do ponto positivo evidenciado na **Figura 26**. Embora este deva ser o principal local de interação com RNA viral, outras regiões da proteína devem participar dessa interação, como por exemplo, o N-terminal IDR, como é proposto para outros vírus, como alfavírus e HCV (MAJEAU *et al.*, 2004; MENDES; KUHN, 2018). Por isso, avaliar o efeito de possíveis fatores que modificam o potencial eletrostático ou estrutura de DENVC pode ser importante para compreender os mecanismos de regulação da montagem do NC.

Embora DENVC seja interessante e única do ponto de vista estrutural, a ocorrência de PTMs nesta proteína e eventual papel em suas funções ainda não foram estudados. A presença de PTMs foi descrita apenas para o WNV. Foi demonstrado que WNVC é fosforilada e que esta modificação regula a interação com RNA viral, oligomerização de WNVC, e provavelmente, montagem do NC (BHUVANAKANTHAM; CHEONG; NG, 2010; CHEONG; NG, 2011). Somada aos dados da literatura, nossas análises do potencial eletrostático de superfície (**Figura 19**) e a relação observada do tempo de armazenamento da proteína e eficiência da montagem (**Figura 20**) nos levaram a hipótese de que PTMs, como a fosforilação, poderiam modificar a superfície eletrostática de DENVC, interferindo nos processos de oligomerização e montagem do NC.

Apresentamos aqui alguns resultados de um estudo preliminar acerca da presença de PTMs em DENVC, lançando luz a diversas perspectivas e novas hipóteses. Nossas análises *in silico*, realizadas por meio de ferramentas de bioinformática, sugeriram potenciais sítios que podem ser modificados (**Tabela 1** e **Figura 21**). Tais sítios incluem principalmente resíduos de Ser e Thr, possivelmente fosforilados, e resíduos de Arg possivelmente metilados, sendo importante ressaltar que o resíduo de Lys também foi associado com SUMOilação e acetilação, em nossas análises.

É interessante notar que uma maior quantidade de resíduos sugeridos em nossas análises está localizada no N-terminal IDR e na hélice  $\alpha 1$ , e somente os resíduos Arg 83 e 90 se encontram na hélice  $\alpha 4$ . A presença de PTMs como a fosforilação, SUMOilação ou metilação sugerida em resíduos da região N-terminal IDR e nas hélices  $\alpha 1/\alpha 1'$ , poderia modular diversos papéis desempenhados por DENVC.

Sabe-se que a região N-terminal IDR participa da interação com LDs (MARTINS *et al.*, 2012). Além disso, o N-terminal IDR exerce influência sobre o tamanho e orientação das hélices  $\alpha 1/\alpha 1'$  das proteínas C de flavivírus, modulando a exposição do núcleo hidrofóbico, e consequentemente, sua interação com superfícies intracelulares hidrofóbicas, o que pode ser importante para a montagem do NC (DOKLAND *et al.*, 2004; MORANDO *et al.*, 2019; NEVES-MARTINS *et al.*, 2021; SHANG *et al.*, 2018; XIA *et al.*, 2020). Os resíduos Phe 27, Lys 31 e Arg 32, presentes no *loop* pré- $\alpha 1$  de ZIKVC, são essenciais para a associação desta proteína com membranas (SHANG *et al.*, 2018). Os resíduos Lys 31 e Arg 32 são conservados entre DENV, WNV e JEV, compondo a hélice  $\alpha 1$  dessas proteínas (NEVES-MARTINS *et al.*, 2021). Em nossos resultados, a Arg 32 (**Figura 21**) foi identificada como possivelmente metilada, podendo ser uma PTM importante na modulação da interação com interfaces hidrofóbicas.

A presença de PTMs tanto na região N-terminal IDR quanto nas hélices  $\alpha 1/\alpha 1'$ , poderia ter consequências importantes na modulação da interação com interfaces negativamente carregadas, como membranas do RE ou ácidos nucleicos, sendo interessantes no contexto deste trabalho. Nesse sentido, estudar a presença de PTMs, como a fosforilação, que poderia modificar a carga positiva do N-terminal IDR, por exemplo, pode ser importante.

Neste trabalho realizamos uma abordagem experimental simplificada para analisar fosforilações de proteínas por espectroscopia de RMN de  $^{31}\text{P}$  em combinação com ensaios de western blotting. Experimentos de RMN, em especial a obtenção de espectros 1D de  $^{31}\text{P}$ , são uma importante ferramenta no estudo de fosforilação de proteínas (HIRAI; YOSHIOKA; YAMADA, 2000; HOFFMANN *et al.*, 1994; HUANG *et al.*, 2020). Nossos resultados são promissores e reforçam a possibilidade da presença dessas modificações. Ambas as análises realizadas acerca de DENVC recombinante sugerem que DENVC pode ser fosforilada quando é expressa em *E. coli* (**Figuras 22 e 23**).

Embora preliminares, os resultados obtidos para a presença de fosforilação em DENVC recombinante são interessantes. De fato, a maioria das PTMs ocorrem com baixa frequência em proteínas expressas em células de bactéria em comparação com células eucarióticas, e relatos em proteínas recombinantes produzidas em bactéria são incomuns. No entanto, com o recente avanço dos métodos de identificação de PTMs foram detectadas e caracterizadas diversas PTMs em

bactérias. Não só a fosforilação assim como outras PTMs têm sido descritas em bactérias (DWORKIN, 2015; JONES; O'CONNOR, 2011; MACEK *et al.*, 2019).

Os ensaios realizados a partir de células de mamífero infectadas com DENV2, apesar de muito preliminares e inconclusivos, geraram perspectivas importantes (**Figuras 24 e 25**). Para que possamos confirmar a presença das PTMs avaliadas, iremos testar diferentes tempos de infecção. Além disso, iremos analisar também a fração de proteínas nucleares, uma vez que a proteína C se localiza tanto no núcleo quanto no citoplasma de acordo com o momento da infecção (NETSAWANG *et al.*, 2010; SANGIAMBUT *et al.*, 2008), e a modulação da localização celular da proteína por fosforilação foi descrita para WNVC (CHEONG; NG, 2011). Serão indispensáveis experimentos que permitam a purificação de DENVC por imunoprecipitação, por exemplo, para confirmar a presença dessas PTMs. Adicionalmente, os ensaios com fosfatase utilizando tanto DENVC recombinante quanto DENVC expressa em células infectadas com DENV2, serão realizados utilizando uma fosfatase mais específica para remoção de fosforilação de resíduos de Ser e Thr (SHI, 2009; VOEGTLI *et al.*, 2000).

Em suma, acreditamos que o NC dos flavivírus têm uma natureza altamente dinâmica, que pode ser modulada por diferentes fatores, o que poderia explicar a dificuldade relatada na obtenção de NCLPs e a limitação de informações estruturais em estudos cryo-EM. As condições de formação de NCLP, descritas no presente trabalho, permitiram uma melhor caracterização da dependência da concentração para a formação de NCLPs, estabelecendo a presença de um equilíbrio entre dímeros de DENVC e NCLPs. Além de ressaltar a importância da presença de oligonucleotídeos de tamanho adequado, ou de uma superfície carregada negativamente na montagem do NC.

Nossa metodologia possui limitações quanto a quantidade de NCLPs formadas e heterogeneidade de tamanho obtidas, o que dificultou a realização de análises por cryo-EM e obtenção de informações estruturais do NC. Além disso, serão necessários estudos sobre a estabilidade dessas partículas. Serão avaliadas também as condições para a montagem de NCLPs com oligonucleotídeos maiores, por este método, uma vez que o tamanho da carga pode contribuir para uma neutralização de cargas mais eficiente, refletindo na eficiência do empacotamento do ácido nucleico e montagem do NC.

Além dos fatores necessários para a montagem de NCLPs descritos acima, este trabalho também abordou a presença de fatores como PTMs na modulação desses eventos. Embora preliminares, os resultados apresentados aqui acerca das PTMs levantaram discussões importantes e pertinentes acerca de sua influência na montagem do NC e outros eventos importantes para a eficiência do processo. A avaliação dos impactos de PTMs para o

reconhecimento e interação com ácidos nucleicos, e conseqüente montagem do NC, pode contribuir para a compreensão sobre essas e outras questões que continuam em aberto acerca do ciclo replicativo de DENV.

## 7 CONCLUSÃO

- A montagem de NCLPs em solução é dependente da presença de ácidos nucleicos e ocorre de forma dependente da concentração, estabelecendo um equilíbrio entre dímeros de DENVC e NCLPs.
- O tamanho do oligonucleotídeo utilizado é importante para a formação de NCLPs em solução.
- A presença de superfícies negativamente carregadas dirige a montagem de NCLPs na ausência de ácidos nucleicos em condições específicas, como baixa concentração de DENVC e força iônica adequada.
- Concentrações nanomolares da proteína foram importantes para superar o efeito de agregação apresentado na ausência e na presença de ácidos nucleicos.
- A presença de ácidos nucleicos em tamanho adequado é importante para a formação de partículas com formato regular.
- O potencial eletrostático de superfície de DENVC é altamente positivo e pode contribuir para o empacotamento eficiente do RNA e montagem do NC.
- O mapa do potencial eletrostático de DENVC revelou a presença de um local altamente positivo formado pelos resíduos Arg 85 e Lys 86, que podem ser potenciais sítios de ligação ao RNA viral. A partir disso, formulamos a hipótese de que a ligação do RNA seria dirigida por este local, desencadeando a oligomerização e montagem do NC.
- As análises de bioinformática sugeriram potenciais sítios alvos de PTMs, principalmente fosforilação e metilação, embora outras PTMs, como SUMOilação e acetilação também tenham sido identificadas. Os principais sítios se concentram na região N-terminal IDR e nas hélices  $\alpha 1$  e  $\alpha 4$ , regiões essenciais para a interação com membranas e ácidos nucleicos, e conseqüentemente, montagem do NC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-RIVERO, Nelson *et al.* A C-terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles in vitro into virus-like particles in the absence of structured nucleic acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 3, p. 901-906, 2005.
- ALOOR, Arya *et al.* Site-Specific N-Glycosylation on the AAV8 Capsid Protein. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 644, 2018.
- AMBROGGIO, Ernesto E. *et al.* Dengue and Zika virus capsid proteins bind to membranes and self-assemble into liquid droplets with nucleic acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 3, 2021.
- BARROWS, Nicholas J. *et al.* Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 8, p. 4448 - 4482, 2018.
- BEDFORD, Mark T.; CLARKE, Steven G. Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. **Molecular Cell**, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2009.
- BHUVANAKANTHAM, Raghavan; CHEONG, Yuen Kuen; NG, Mah Lee. West Nile virus capsid protein interaction with importin and HDM2 protein is regulated by protein kinase C-mediated phosphorylation. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 8–9, p. 615–625, 2010.
- BHUVANAKANTHAM, Raghavan; NG, Mah Lee. Analysis of self-association of West Nile virus capsid protein and the crucial role played by Trp 69 in homodimerization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, n. 1, p. 246–255, 2005.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1-42, 2021. **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 52, n. 24, p. 1–20, 2021.
- BRUINSMA, Robijn F.; WUITE, Gijs J.L.; ROOS, Wouter H. Physics of viral dynamics. **Nature Reviews Physics**, v. 3, n. 2, p. 76-91, 2021.
- BYK, Laura A.; GAMARNIK, Andrea V. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. **Annual Review of Virology**, v. 3, n.1, p. 263, 2016.
- CAI, Ting *et al.* Arginine methylation of SARS-Cov-2 nucleocapsid protein regulates RNA binding, its ability to suppress stress granule formation, and viral replication. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 1, p. 100821, 2021.
- CANALE, Claudio *et al.* Recognizing and avoiding artifacts in atomic force microscopy imaging. *In: Atomic force microscopy in biomedical research*. Humana Press, 2011. p. 31-43.
- CAREY, Brian D. *et al.* Protein Kinase C subtype  $\delta$  interacts with Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein and regulates viral RNA binding through modulation of capsid

phosphorylation. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 3, p. e1008282, 2020.

CARVALHO, F. A. *et al.* Dengue Virus Capsid Protein Binding to Hepatic Lipid Droplets (LD) Is Potassium Ion Dependent and Is Mediated by LD Surface Proteins. **Journal of Virology**, v. 86, n. 4, p. 2096-2108, 2012.

CHEN, Longyun *et al.* N-terminal phosphorylation of phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is required for preventing nucleoprotein from binding to cellular RNAs and for functional template formation. **Journal of virology**, v. 87, n. 6, p. 3177–3186, 2013.

CHEN, Qingxin *et al.* SUMOylation Targets Adeno-associated Virus Capsids but Mainly Restricts Transduction by Cellular Mechanisms. **Journal of Virology**, v. 94, n. 19, p. e00871-20, 2020.

CHEONG, Yuen Kuen; NG, Mah Lee. Dephosphorylation of West Nile virus capsid protein enhances the processes of nucleocapsid assembly. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 1, p. 76–84, 2011.

CRUZ-OLIVEIRA, Christine *et al.* Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS microbiology reviews**, v. 39, n. 2, p. 155-170, 2015.

DE PABLO, Pedro J. Atomic force microscopy of virus shells. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2018. p. 199-208.

DE SOUZA, Theo Luiz Ferraz *et al.* Charge neutralization as the major factor for the assembly of nucleocapsid-like particles from C-terminal truncated hepatitis C virus core protein. **PeerJ**, v. 2016, n. 11, p. e2670, 2016.

DOKLAND, Terje *et al.* West Nile virus core protein: Tetramer structure and ribbon formation. **Structure**, v. 12, n. 7, p. 1157–1163, 2004.

DWORKIN, Jonathan. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 24, p. 47, 2015.

FAUSTINO, André F. *et al.* Dengue virus capsid protein interacts specifically with very low-density lipoproteins. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 1, p. 247–255, 2014.

FAUSTINO, André F. *et al.* Structural and functional properties of the capsid protein of dengue and related flavivirus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 3870, 2019.

FAUSTINO, André F. *et al.* Understanding Dengue Virus Capsid Protein Interaction with Key Biological Targets. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2015.

FIGUEIRA-MANSUR, Janaina *et al.* Mutations in the dimer interfaces of the dengue virus capsid protein affect structural stability and impair RNA-capsid interaction. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

- FÜZIK, Tibor *et al.* Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. **Nature Communications** **2018 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018.
- GAZINA, Elena V. *et al.* Core Protein Phosphorylation Modulates Pregenomic RNA Encapsidation to Different Extents in Human and Duck Hepatitis B Viruses. **Journal of Virology**, v. 74, n. 10, p. 4721–4728, 2000.
- GIESE, Sebastian *et al.* Role of influenza A virus NP acetylation on viral growth and replication. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2017.
- GRIGORIEFF, Nikolaus; HARRISON, Stephen C. Near-atomic resolution reconstructions of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy. **Current opinion in structural biology**, v. 21, n. 2, p. 265, 2011.
- GUINIER, André; FOURNET, Gérard; YUDOWITCH, Kenneth L. Small-angle scattering of X-rays. 1955.
- HAN, Q. *et al.* Sumoylation of Influenza A Virus Nucleoprotein Is Essential for Intracellular Trafficking and Virus Growth. **Journal of Virology**, v. 88, n. 16, p. 9379–9390, 2014.
- HARAPAN, Harapan *et al.* Dengue: a minireview. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 829, 2020.
- HIRAI, Hirokazu; YOSHIOKA, Keitaro; YAMADA, Kazuhiro. A simple method using <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy for the study of protein phosphorylation. **Brain Research Protocols**, v. 5, n. 2, p. 182–189, 2000.
- HOFFMANN, RALF *et al.* <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of phosphorylated model peptides. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 44, n. 3, p. 193–198, 1994.
- HOLLAND CHENG, R. *et al.* Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. **Cell**, v. 80, n. 4, 1995.
- HUANG, Biling *et al.* NMR-based investigation into protein phosphorylation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 53–63, 2020.
- ISHIDA, Kotaro *et al.* Functional Correlation between Subcellular Localizations of Japanese Encephalitis Virus Capsid Protein and Virus Production. **Journal of Virology**, v. 93, n. 19, p. e00612-19, 2019.
- JONES, Christopher T. *et al.* Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein. **Journal of Virology**, v. 77, n. 12, p. 7143-7149, 2003.
- JONES, Joshua D.; O’CONNOR, C. David. Protein acetylation in prokaryotes. **PROTEOMICS**, v. 11, n. 15, p. 3012–3022, 2011.
- JUNG, Eun Young *et al.* The repressive activity of hepatitis C virus core protein on the transcription of p21(waf1) is regulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. **Virus research**, v. 79, n. 1–2, p. 109–115, 2001.



KAUFMAN, Filip *et al.* Characterization and in vitro assembly of tick-borne encephalitis virus C protein. **FEBS Letters**, v. 594, n. 12, p. 1989–2004, 2020.

KELLER, Adrian; GRUNDMEIER, Guido. Amyloid aggregation at solid-liquid interfaces: Perspectives of studies using model surfaces. **Applied Surface Science**, v. 506, p. 144991, 2020.

KHAYKELSON, Daniel; RAVIV, Uri. Studying viruses using solution X-ray scattering. **Biophysical Reviews**, v. 12, n. 1, p. 41-48, 2020.

KIERMAYR, Stefan *et al.* Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. **Journal of Virology**, v. 78, n. 15, p. 8078–8084, 2004.

KONDYLIS, Panagiotis *et al.* Analytical Techniques to Characterize the Structure, Properties, and Assembly of Virus Capsids. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 1, p. 622-636, 2019.

KOSTYUCHENKO, V. A. *et al.* Immature and Mature Dengue Serotype 1 Virus Structures Provide Insight into the Maturation Process. **Journal of Virology**, v. 87, n. 13, p. 7700-7707, 2013.

KUHN, Richard J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–725, 2002.

KUMAR, Ramesh *et al.* Role of Host-Mediated Post-Translational Modifications (PTMs) in RNA Virus Pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–26, 2021.

KUNKEL, Meghan *et al.* Self-Assembly of Nucleocapsid-Like Particles from Recombinant Hepatitis C Virus Core Protein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 5, p. 2119–2129, 2001.

KUZNETSOV, Yurii G.; MCPHERSON, Alexander. Atomic Force Microscopy in Imaging of Viruses and Virus-Infected Cells. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 268-285, 2011.

LAKOWICZ, Joseph R. Introduction to fluorescence. In: **Principles of fluorescence spectroscopy**. Springer, Boston, MA, 1999. p. 1-23.

LAURETI, Mathilde *et al.* Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2180, 2018.

LAW, Lok Man J. *et al.* Phosphorylation of Rubella Virus Capsid Regulates Its RNA Binding Activity and Virus Replication. **Journal of Virology**, v. 77, n. 3, p. 1764–1771, 2003.

LI, Ting *et al.* Structural insight into the Zika virus capsid encapsulating the viral genome. **Cell Research**, v. 28, n. 4, p. 497, 2018.

LOBODA, Anna P. *et al.* Lysine-specific post-translational modifications of proteins in the life

cycle of viruses. **Cell Cycle**, v. 18, n. 17, p. 1995-2005, 2019.

LÓPEZ, Carlos *et al.* In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus. **Archives of Virology**, v. 154, n. 4, p. 695–698, 2009.

LU, Shan *et al.* The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.

MA, Lixin *et al.* Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3414-3419, 2004.

MAASSEN, Stan J. *et al.* Oligonucleotide Length-Dependent Formation of Virus-Like Particles. **Chemistry - A European Journal**, v. 24, n. 29, p. 7456–7463, 2018.

MACEK, Boris *et al.* Protein post-translational modifications in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 651–664, 2019.

MAJEAU, Nathalie *et al.* Palmitoylation of Hepatitis C Virus Core Protein Is Important for Virion Production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 49, p. 33915, 2009.

MAJEAU, Nathalie *et al.* The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 4, p. 971–981, 2004.

MARTINS, Ivo C. *et al.* The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. **Biochemical Journal**, v. 444, n. 3, p. 405-415, 2012.

MARTINS, Ana S. *et al.* West Nile Virus Capsid Protein Interacts With Biologically Relevant Host Lipid Systems. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 8, 2019.

MARUŠIČ, Martina Bergant *et al.* Modification of Human Papillomavirus Minor Capsid Protein L2 by Sumoylation. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11585–11589, 2010.

MENDES, Adriano; KUHN, Richard J. Alphavirus nucleocapsid packaging and assembly. **Viruses**, v. 10, n. 3, p. 138, 2018.

MIYANARI, Yusuke *et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 1089–1097, 2007.

MORANDO, Maria A. *et al.* Dynamics of Zika Virus Capsid Protein in Solution: The Properties and Exposure of the Hydrophobic Cleft Are Controlled by the  $\alpha$ -Helix 1 Sequence. **Biochemistry**, v. 58, n. 20, p. 2488-2498, 2019.

MUKHOPADHYAY, Suchetana *et al.* In Vitro-Assembled Alphavirus Core-Like Particles Maintain a Structure Similar to That of Nucleocapsid Cores in Mature Virus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 21, p. 11128-11132, 2002.

MURUGESAPILLAI, Divakaran *et al.* Accurate nanoscale flexibility measurement of DNA

and DNA-protein complexes by atomic force microscopy in liquid. **Nanoscale**, v. 9, n. 31, p. 11327–11337, 2017.

NETSAWANG, Janjuree *et al.* Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. **Virus Research**, v. 147, n. 2, p. 275–283, 2010.

NEVES-MARTINS, Thais C. *et al.* Unique structural features of flaviviruses' capsid proteins: new insights on structure-function relationship. **Current Opinion in Virology**, v. 47, p. 106–112, 2021.

NICHOLLS, Conrad M.R.; SEVVANA, Madhumati; KUHN, Richard J. Structure-guided paradigm shifts in flavivirus assembly and maturation mechanisms. **Advances in Virus Research**, v. 108, n. January, p. 33–83, 2020.

PATKAR, Chinmay G. *et al.* Functional Requirements of the Yellow Fever Virus Capsid Protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 12, p. 6471–6481, 2007.

PETOUKHOV, Maxim V. *et al.* New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 2, p. 342–350, 2012.

PIERSON, Theodore C.; DIAMOND, Michael S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 2020.

POONSIRI, Thanalai *et al.* Crystal structure of the Japanese encephalitis virus capsid protein. **Viruses**, v. 11, n. 7, p.623, 2019.

PRASAD, Vidya Mangala *et al.* Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 24, n. 2, p. 184–186, 2017.

RAMAZI, Shahin; ZAHIRI, Javad. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2021, 2021.

RAMAZI, Shahin; ALLAHVERDI, Abdollah; ZAHIRI, Javad. Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: A review on histone modification defects in developmental and neurological disorders. **Journal of biosciences**, v. 45, n. 1, p. 1–29, 2020.

RAYAPROLU, Vamseedhar *et al.* Length of encapsidated cargo impacts stability and structure of in vitro assembled alphavirus core-like particles. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 29, n. 48, p. 484003, 2017.

RENNER, Max *et al.* Flavivirus maturation leads to the formation of an occupied lipid pocket in the surface glycoproteins. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2021.

RUGGERI, Francesco Simone *et al.* Atomic force microscopy for single molecule characterisation of protein aggregation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 664, p. 134–148, 2019.

SAMSA, Marcelo M. *et al.* Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000632, 2009.

SAMUEL, Gladys Hazitha *et al.* Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 48, p. 13863–13868, 2016.

SANGIAMBUT, Sutha *et al.* Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. **The Journal of general virology**, v. 89, n. Pt 5, p. 1254–1264, 2008.

SHANG, Zifang *et al.* Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 7, p. 948–962, 2018.

SHI, Yigong. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 468–484, 2009.

SHIRAKURA, Masayuki *et al.* E6AP Ubiquitin Ligase Mediates Ubiquitylation and Degradation of Hepatitis C Virus Core Protein. **Journal of Virology**, v. 81, n. 3, p. 1174, 2007.

SIROHI, Devika *et al.* The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 2016.

SMIT, Jolanda M. *et al.* Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p. 160, 2011.

SPIRO, Robert G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, [*s. l.*], v. 12, n. 4, p. 43R–56R, 2002.

SUGAI, Akihiro *et al.* Newly Identified Minor Phosphorylation Site Threonine-279 of Measles Virus Nucleoprotein Is a Prerequisite for Nucleocapsid Formation. **Journal of Virology**, v. 88, n. 2, p. 1140, 2014.

SUN, Zeyu *et al.* Mass Spectrometry Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Reveals Camouflaging Glycans and Unique Post-Translational Modifications. **Infectious Microbes & Diseases**, v. 3, n. 3, p. 149, 2021.

SVERGUN, Dmitri I.; KOCH, Michel H.J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Reports on Progress in Physics**, v. 66, n. 10, p. 1735, 2003.

TAN, Ter Yong *et al.* Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.

TAN, Ter Yong; FIBRIANSAH, Guntur; LOK, Shee-Mei. Capsid protein is central to the birth of flavivirus particles. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 5, p. e1008542, 2020.

TELLINGHUISEN, Timothy L *et al.* In Vitro Assembly of Alphavirus Cores by Using Nucleocapsid Protein Expressed in *Escherichia coli*. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 5309–

5319, 1999.

TELLINGHUISEN, Timothy L; KUHN, Richard J. Nucleic Acid-Dependent Cross-Linking of the Nucleocapsid Protein of Sindbis Virus. **Journal of virology**, v. 74, n. 9, p. 4302-4309, 2000.

TEOH, Pak-Guan *et al.* Maintenance of Dimer Conformation by the Dengue Virus Core Protein  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  Helix Pair Is Critical for Nucleocapsid Formation and Virus Production. **Journal of Virology**, v. 88, n. 14, p. 7998–8015, 2014.

TSENG, Hsi-Nuan *et al.* DNA-binding property of recombinant capsid protein of Japanese encephalitis virus. **Virus Genes**, v. 35, n. 3, p. 483–488, 2007.

TWAROCK, Reidun *et al.* A modelling paradigm for RNA virus assembly. **Current opinion in virology**, v. 31, p. 74-81, 2018.

VALBUENA, Alejandro; MATEU, Mauricio G. Kinetics of Surface-Driven Self-Assembly and Fatigue-Induced Disassembly of a Virus-Based Nanocoating. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 4, p. 663–673, 2017.

VALBUENA, Alejandro; MATEU, Mauricio G. Quantification and modification of the equilibrium dynamics and mechanics of a viral capsid lattice self-assembled as a protein nanocoating. **Nanoscale**, v. 7, n. 36, p. 14953–14964, 2015.

VETTING, Matthew W. *et al.* Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, n. 1, p. 212–226, 2005.

VIRUS PATHOGEN DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE (VIPR) - FLAVIVIRIDAE - GENOME DATABASE WITH VISUALIZATION AND ANALYSIS TOOLS. Disponível em: <https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=flavi>. Acesso em: 19 jul. 2022.

VOEGTLI, W. C. *et al.* Structure of the bacteriophage  $\lambda$  Ser/Thr protein phosphatase with sulfate ion bound in two coordination modes. **Biochemistry**, v. 39, n. 50, p. 15365–15374, 2000.

WALSH, Christopher T.; GARNEAU-TSODIKOVA, Sylvie; GATTO, Gregory J. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 45, p. 7342–7372, 2005.

WANG, Xiangxi *et al.* Near-atomic structure of Japanese encephalitis virus reveals critical determinants of virulence and stability. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2017.

WELSCH, Sonja *et al.* Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 4, p. 365-375, 2009.

WENGLER, Gerd *et al.* Establishment and analysis of a system which allows assembly and disassembly of alphavirus core-like particles under physiological conditions in vitro. **Virology**, v. 132, n. 2, p. 401-412, 1984.

WENGLER, Gerd *et al.* The core protein of the alphavirus sindbis virus assembles into core-like nucleoproteins with the viral genome RNA and with other single-stranded nucleic acids in vitro. **Virology**, v. 118, n. 2, p. 401–410, 1982.

WHITEHOUSE, Conor *et al.* Adsorption and self-assembly of peptides on mica substrates. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 13, p. 1965–1968, 2005.

WILSON, Van G. Introduction to sumoylation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 963, p. 1–12, 2017.

WU, Xianfu *et al.* Both Viral Transcription and Replication Are Reduced when the Rabies Virus Nucleoprotein Is Not Phosphorylated. **Journal of Virology**, v. 76, n. 9, p. 4153–4161, 2002.

XIA, Hongjie *et al.* A cocrystal structure of dengue capsid protein in complex of inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 30, p. 17992–18001, 2020.

YONG, Xin Ee *et al.* Dengue virus 2 capsid protein chaperones the strand displacement of 5'-3' cyclization sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 10, p. 5832–5844, 2021.

ZEIDLER, Julianna D. *et al.* Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 42, 2017.

ZENGEL, James *et al.* Roles of Phosphorylation of the Nucleocapsid Protein of Mumps Virus in Regulating Viral RNA Transcription and Replication. **Journal of Virology**, v. 89, n. 14, p. 7338, 2015.

ZHANG, Xiaokang *et al.* Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 105–110, 2013.

ZHANG, Wei *et al.* Membrane curvature in flaviviruses. **Journal of Structural Biology**, v. 183, n. 1, p. 86–94, 2013.

ZHANG, Ying *et al.* Structure of Immature West Nile Virus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 11, p. 6141–6145, 2007.

ZHANG, Ying *et al.* Structures of immature flavivirus particles. **EMBO Journal**, v. 22, n. 11, p. 2604–2613, 2003.

ZHANG, Wei *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 11, p. 907–912, 2003.

ZHANG, Ying; KOSTYUCHENKO, Victor A.; ROSSMANN, Michael G. Structural analysis of viral nucleocapsids by subtraction of partial projections. **Journal of structural biology**, v. 157, n. 2, p. 356–364, 2007.

ZHAO, Chen *et al.* Influenza B virus non-structural protein 1 counteracts ISG15 antiviral

activity by sequestering ISGylated viral proteins. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2016.

## ANEXOS

Esta seção contém os artigos publicados durante o doutorado.

Os **Anexos I a III** contém os artigos completos cujos dados foram apresentados ou estão diretamente relacionados com a tese:

ANEXO I: “The interaction of dengue virus capsid protein with negatively charged interfaces drives the in vitro assembly of nucleocapsid-like particles”, publicado na PLoS ONE, em 2022. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264643>)

ANEXO II: “Unique structural features of flaviviruses’ capsid proteins: new insights on structure-function relationship”, revisão publicada na Current Opinion in Virology, em 2021. (<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.02.005>)

ANEXO III: Manuscrito relacionado à tese, fruto de uma colaboração direta, submetido na revista iScience (2022), em processo de revisão: “Neutralization of a positively charged spot and restriction of  $\alpha$ 4-helix motion in 2 dengue virus capsid protein trigger the empty capsids self-assembly”.

Os **anexos IV a VIII** contém a primeira página dos artigos que não estão diretamente relacionados à tese.

Os **anexos V a VIII** contém artigos publicados como resultado do trabalho realizado durante à pandemia, frutos da participação no consórcio internacional Covid19-NMR (<https://covid19-nmr.de/>).

ANEXO IV: “Searching for drug leads targeted to the hydrophobic cleft of dengue virus capsid protein”, publicado na Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, em 2021. (<https://doi.org/10.1080/14756366.2021.2004591>)

ANEXO V: “Large-Scale Recombinant Production of the SARS-CoV-2 Proteome for High-



Throughput and Structural Biology Applications”, publicado na *Frontiers in Molecular Biosciences*, em 2021. (<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.653148>)

ANEXO VI: “Insights into the specificity for the interaction of the promiscuous SARS-CoV-2 nucleocapsid protein N-terminal domain with deoxyribonucleic acids”, publicado na *International Journal of Biological Macromolecules*, em 2022.

(<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.121>)

ANEXO VII: “On the caveats of a multiplex test for SARS-CoV-2 to detect seroconversion after infection or vaccination”; publicado na *Scientific Reports*, em 2022.

(<https://doi.org/10.1038/s41598-022-14294-8>)

ANEXO VIII: “Comprehensive fragment screening of the SARS-CoV-2 proteome explores novel chemical space for drug development”, publicado na *Angewandte Chemie*, em 2022.

(<https://doi.org/10.1002/anie.202205858>)

ANEXO I: “The interaction of dengue virus capsid protein with negatively charged interfaces drives the in vitro assembly of nucleocapsid-like particles”, publicado na PLoS ONE, em 2022.

(<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264643>)

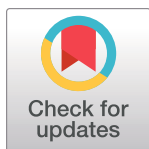
## RESEARCH ARTICLE

# The interaction of dengue virus capsid protein with negatively charged interfaces drives the *in vitro* assembly of nucleocapsid-like particles

Nathane C. Mebus-Antunes<sup>1</sup>, Wellington S. Ferreira<sup>2</sup>, Glauce M. Barbosa<sup>1</sup>, Thais C. Neves-Martins<sup>1</sup>, Gilberto Weissmuller<sup>2</sup>, Fabio C. L. Almeida<sup>1,3\*</sup>, Andrea T. Da Poian<sup>1\*</sup>

**1** Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

\* [dapoian@bioqmed.ufrj.br](mailto:dapoian@bioqmed.ufrj.br) (ATDP); [falmeida@bioqmed.ufrj.br](mailto:falmeida@bioqmed.ufrj.br) (FCLA)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Mebus-Antunes NC, Ferreira WS, Barbosa GM, Neves-Martins TC, Weissmuller G, Almeida FCL, et al. (2022) The interaction of dengue virus capsid protein with negatively charged interfaces drives the *in vitro* assembly of nucleocapsid-like particles. PLoS ONE 17(3): e0264643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264643>

**Editor:** Petri Kursula, Universitetet i Bergen, NORWAY

**Received:** September 24, 2021

**Accepted:** February 15, 2022

**Published:** March 1, 2022

**Copyright:** © 2022 Mebus-Antunes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting information](#) files.

**Funding:** ATDP was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil (<http://www.faperj.br/>) [grant numbers E-26/202.945/2017, E-26/201.316/2016], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (<https://www.gov.br/cnpq/pt-br>) [grant

## Abstract

Dengue virus (DENV) causes a major arthropod-borne viral disease, with 2.5 billion people living in risk areas. DENV consists in a 50 nm-diameter enveloped particle in which the surface proteins are arranged with icosahedral symmetry, while information about nucleocapsid (NC) structural organization is lacking. DENV NC is composed of the viral genome, a positive-sense single-stranded RNA, packaged by the capsid (C) protein. Here, we established the conditions for a reproducible *in vitro* assembly of DENV nucleocapsid-like particles (NCLPs) using recombinant DENVC. We analyzed NCLP formation in the absence or presence of oligonucleotides in solution using small angle X-ray scattering, Rayleigh light scattering as well as fluorescence anisotropy, and characterized particle structural properties using atomic force and transmission electron microscopy imaging. The experiments in solution comparing 2-, 5- and 25-mer oligonucleotides established that 2-mer is too small and 5-mer is sufficient for the formation of NCLPs. The assembly process was concentration-dependent and showed a saturation profile, with a stoichiometry of 1:1 (DENVC:oligonucleotide) molar ratio, suggesting an equilibrium involving DENVC dimer and an organized structure compatible with NCLPs. Imaging methods proved that the decrease in concentration to sub-nanomolar concentrations of DENVC allows the formation of regular spherical NCLPs after protein deposition on mica or carbon surfaces, in the presence as well as in the absence of oligonucleotides, in this latter case being surface driven. Altogether, the results suggest that *in vitro* assembly of DENV NCLPs depends on DENVC charge neutralization, which must be a very coordinated process to avoid unspecific aggregation. Our hypothesis is that a specific highly positive spot in DENVC  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  is the main DENVC-RNA binding site, which is required to be firstly neutralized to allow NC formation.

numbers: 309028/2017-5] and la Caixa Bank Foundation, Spain (<https://fundacionlacaixa.org/en/home>) [grant number: LCF/PR/HR17/52150011]. FCLA was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil (<http://www.faperj.br/>) [grant numbers 204.432/2014 and 239.229/2018] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (<https://www.gov.br/cnpq/pt-br>) [grant numbers: 439306/2018-3]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

In recent decades, several pieces of evidence have suggested that viruses and viral capsids are highly dynamic structures [1]. Analytical techniques such as atomic force microscopy (AFM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction, and cryo-electron microscopy (Cryo-EM), have made important contributions to the understanding of the structure and assembly of viral nucleocapsid (NC) [1, 2], an important and complex event in the viral cycle. This event requires optimal conditions, involves intermediate steps and specific time scales, which make its study challenging [1].

Dengue virus (DENV) is a member of the *Flaviviridae* family, which comprises important human pathogens, including Zika virus (ZIKV), West Nile virus (WNV), Yellow fever virus (YFV), Japanese encephalitis virus (JEV), and Tick-borne encephalitis virus (TBEV). DENV structure consists of a spherical particle of 50 nm diameter formed by a lipid bilayer associated with two structural proteins, the membrane (M) and envelope (E) proteins [3, 4], surrounding viral NC, which is composed of the viral genome, a positive-sense single-stranded RNA, packaged by the capsid (C) protein [4].

Despite Cryo-EM studies revealed structural details of mature flavivirus particles, including the organization of E and M proteins on the virus surface, structural information on the NC is still lacking [4–10]. This led flaviviruses' NC to be considered as an amorphous structure lacking symmetry, unlike alphaviruses' NC, which have a highly ordered geometry with 240 copies of the capsid protein assembled with a T4 icosahedral symmetry [11–13]. Although Cryo-EM studies of the immature ZIKV particles had recently revealed a partially ordered NC [14, 15], further studies are needed. In addition, little is known about the assembly process of flaviviruses' NC [16–18]. Viral genome recognition by C protein as well as its interaction with cellular and viral components seem to be very well coordinated, making it difficult to isolate NC from infected cells [19–21].

DENVC is a small (100 residues) and highly basic protein with very particular structural features [22, 23]. It forms homodimers in solution, containing an N-terminal intrinsically disordered region (IDR), followed by 4 inter-twined  $\alpha$ -helices connected by short loops, with the tridimensional structure maintained mainly by quaternary contacts [22, 23]. Currently, the most accepted packaging model of the DENV genome is based on an asymmetric charge distribution on the DENVC surface. The presence of 11 apolar residues in the helix  $\alpha 2$  generates a hydrophobic cleft in one protein face, while the solvent-exposed region of  $\alpha 4/\alpha 4'$ , rich in basic residues, would act as the RNA binding site [16, 19, 22–24]. However, a more accurate analysis of the electrostatic surface potential of flaviviruses' C proteins reveals a highly electro-positive surface throughout the protein [22]. Thus, considering these particularities, the DENV NC assembly must have a more complex mechanism, not only based on charge asymmetry, with other protein regions being important for assembly.

In this work, we characterized the conditions for an *in vitro* assembly of recombinant DENVC with nucleic acids, a process still very little explored [25]. To our knowledge, this is the first study establishing an efficient *in vitro* assembly of DENV nucleocapsid-like particles (NCLPs) in a systematic way. The assembly protocol established here allowed the visualization of regular particles by AFM and TEM. Using different biophysical techniques, namely small angle X-ray scattering (SAXS), Rayleigh light scattering and fluorescence anisotropy, we characterized the formation NCLPs in solution after incubation of DENVC with small oligonucleotides. Together, these results provided evidence that the formation of stable and complete particles depends on an appropriate surface as well as on the oligonucleotide size length. In addition to contributing to a better understanding of NC assembly, our results also pave the way for future structural investigations.

## Material and methods

### Protein expression and purification

The gene sequence encoding the C protein from DENV serotype 2 (residues 1–100) was cloned into the pET3a by GenScript (Piscataway, NJ, EUA). pET3a-DENVC was transformed into *E. coli* BL21-DE3-pLysS. Recombinant DENVC expression was induced in M9 minimal medium, with 0.5 mM isopropyl-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), overnight, at 30 °C. The cells were centrifuged (~ 5,000 g for 30 min at 4 °C) and the pellets were resuspended in lysis buffer (25 mM HEPES, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, glycerol 5% (v/v) and protease inhibitor cocktail (P8465, Sigma-Aldrich), pH 7.4). Then, cells were disrupted by ultrasonication. After this step, the lysate was incubated with NaCl at a final concentration of 2 M and left on agitation for 60 min, at 4 °C. Next, the lysate was ultracentrifuged at 70,400 g for 50 min at 4 °C. The supernatant was injected onto a HiTrap Heparin HP column and DENVC was purified using a step gradient with an increasing NaCl concentration (0.5–2 M). Fractions containing DENVC protein were confirmed by 18% SDS-PAGE gel, concentrated, and stored at –20 °C.

### DNA fragments

DNA fragments were purchased from Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA, USA). The following single-stranded DNA oligonucleotide (ssDNA) were synthesized: 5'- GG -3' (2-mer ssDNA); 5'- GGG GG -3' (5-mer ssDNA) and 5'- TCC ATG GTA GAC AGA GGA TGG GGG A -3' (25-mer ssDNA). The lyophilized oligonucleotides were resuspended in nuclease-free water to a final concentration of 10 mM. Intermediate stocks of 100 μM were obtained by diluting the initial stock in buffer containing 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4. The concentrations of 2-, 5- and 25-mer ssDNAs were determined spectrophotometrically using the molar extinction coefficients of 21,600; 51,900 and 259,600 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> at 260 nm, respectively.

### Small angle X-ray scattering (SAXS)

SAXS measurements were performed on beamline SAXS1 at the National Synchrotron Laboratory (Campinas, Brazil). This setup covers a range of momentum transfer of  $0.1 < q < 5 \text{ nm}^{-1}$  ( $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$ , where  $2\theta$  is the scattering angle [26]). SAXS experiments were carried out at 25 °C in phosphate buffer (55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, pH 7.4) using a sample volume of 350 μL in a vacuum tight quartz capillary. The exposure time for each frame was 10 s, and a total of 30 frames were collected for each repeat with intervals of 1 s. The protein concentration used was 60 μM (1.4 mg/mL). For interaction experiments, DENVC was incubated with 2-, 5- and 25-mer ssDNAs at followed DENVC:ssDNA molar ratios: 1:0.1; 1:0.3; 1:0.5; 1:0.7; 1:1, for 2- and 5-mer; and 1:0.01; 1:0.03; 1:0.05; 1:0.07, for 25-mer. All sample measurements were subtracted from the buffer measurement (blank). As the quality of the data depends on the monodisperse and non-aggregated samples, the proteins were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min immediately before the incubation. Guinier analysis was carried out using the program PRIMUS/qt, from the ATSAS Suite [27]. The Guinier plot allows the estimation of the radius of gyration (Rg) from the slope in the linear region of a plot of  $\ln(I(q))$  versus  $q^2$ , according to Guinier's relation:  $I(q) \propto \exp(-q^{2R}g^2/3)$  [26, 28]. Rg was calculated in two ranges: range from 1 to the 10<sup>th</sup> experimental point (1–10) and range 30–60 (2-mer) or 40–70 (5-mer). These ranges were setup for analyzing the formation of large soluble oligomers and dimeric DENVC in solution, respectively. The calculated Rg for the data series used for the Guinier analysis are summarized in S1 Table.

## Light scattering

Light scattering measurements were performed using Agilent Technologies Care Eclipse equipment. The scattered light was collected at an angle of 90° to the incident light. The samples were excited at 400 nm and the emission was collected from 390 to 410 nm. A slit of 2.5 nm was used for both excitation and emission. Increasing concentrations of DNA oligonucleotides were added to a 5 μM (0.118 mg/mL) protein solution in 400 μL of phosphate buffer (55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4). The oligonucleotide concentration varied from 0 to 15 μM, and experiments were performed in triplicate. After each addition of oligonucleotides, the solution was completely homogenized before fluorescence measurements. Light scattering intensity values were corrected by the dilution factor and normalized as a function of DENVC intensity in absence of oligonucleotides. All sample measurements were subtracted from the buffer (blank). Experimental data from the light scattering measurements of DENVC titrated with increased concentrations of 2-, 5- and 25-mer, as well as their means and standard deviation are summarized in [S2 Table](#).

## Fluorescence anisotropy

The fluorescence anisotropy measurements were carried out using a Cary Eclipse spectrofluorometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a quartz cell of 1.0 cm optical path length, Peltier temperature controller at 25 °C, and excitation and emission polarizers. For investigating the interaction of ssDNA (5-mer and 25-mer) with DENVC, the protein was labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich). For this, DENVC was dissolved in carbonate-bicarbonate buffer (pH 10) and let to react with FITC (molar ratio FITC: DENVC of 100) for 120 min, in a dark environment at room temperature. Free unreacted fluorophore was separated from the reaction mixture with PD-10 desalting column (GE Healthcare). The labeling efficiency was monitored by absorbance in the regions corresponding to the protein and fluorophore (280 nm for DENVC and 495 nm for FITC). The labeling condition used ensured less than 5% labeling efficiency. This is important since fluorescein binds covalently to protein lysine residues, which would be important for nucleic acid binding and NCLP formation. Fluorescein-labeled DENVC (50 nM solution in phosphate buffer—55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl and 5 mM EDTA, pH 7.4) was titrated with increasing concentrations of ssDNA (0–0.145 μM). Fluorescence anisotropy was measured exciting at 470 nm and collecting fluorescence emission at 520 nm. A slit of 20 nm was used for both excitation and emission. To ensure that FITC labeling does not change the properties of the protein or impact its interaction with oligonucleotides, similar experiments were performed with non-labeled DENVC using the intrinsic fluorescence of its tryptophan residue (W69). These experiments were collected with excitation wavelength at 280 nm and emission at 346 nm. Each anisotropy measure was an average of 12 accumulations. All experiments were performed in duplicate. Experimental data, their means and standard deviations are summarized in [S3](#) and [S4 Tables](#).

## Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM experiments were performed in air at room temperature. First, different DENVC concentrations (15 μM, 15 nM, 1.5 nM or 0.5 nM) in buffer containing 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 7.4) were applied over the mica surface to set the ideal condition for imaging, avoiding protein overaccumulation on the mica support. For NCLPs visualization, DENVC was prepared at a concentration of 0.5 nM (11.8 ng/mL) and the oligonucleotides were added at a DENVC:ssDNA molar ratios of 2:1 for 5-mer ssDNA, and 20:1 for 25-mer ssDNA. After 10 min of incubation, 200 μL of the sample were uniformly dispersed on

the freshly cleaved mica by using a spin coater at speed of 750 rpm for 10 min. Then, three washes with Milli-Q water (200  $\mu$ L) were performed to remove buffer salts from the mica surface. This step was followed by drying under nitrogen gas. For mica surface charge neutralization experiments, freshly cleaved mica was coated with 3-aminopropyl-trietoxy silane (APTES) to yield an AP-mica surface, as previously described [29]. DENVC at 0.5 nM concentration was incubated for 10 min in the absence or presence of 25-mer ssDNA at 20:1 (DENVC:ssDNA) molar ratio and applied over the treated mica (200  $\mu$ L of the sample per mica). After 10 min of incubation, samples were washed five times with Milli-Q water (200  $\mu$ L). The excess liquid was removed with filter paper, followed by drying under nitrogen gas. AFM images were obtained in a Bruker's Dimension Icon using Tapping Mode<sup>®</sup>. R-TESPA-300 cantilever probe (Bruker, MPP-11120-10) (nominal spring constant 40 N·m<sup>-1</sup> and nominal tip radius of 8 nm) were used to scan 1 x 1  $\mu$ m areas of the surface at a resolution of 512 x 512 pixels. Each experiment was performed at least two times. AFM images were processed with Nanoscope Software (Bruker, Karlsruhe, Germany). In the first step of the image processing, polynomial line flattening, and plane fitting were performed. For the analysis of NCLPs' diameter, the Fiji (ImageJ) software was used to create automated macros that were executed on images to measure the Feret's diameter of the particles. The tip convolution was corrected considering the nominal tip radius specified by the manufacturer. The correction was made considering the influence of the tip on the edges of each particle as follows: Feret's diameter—2 (tip radius). Diameter distribution and box plot analysis were performed in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

### Transmission Electron Microscopy (TEM)

For TEM, the *in vitro* assembly was performed as described for the AFM experiments, except that phosphate buffer with 300 mM NaCl was used and an overnight incubation was carried out to allow a better particle stabilization. After incubation, 3.5  $\mu$ L of the samples (DENVC and DENVC:25-mer) were deposited on carbon-coated 400 mesh copper grids (Electron Microscopy Sciences), previously subjected to glow discharge in Pelco Easiglow<sup>™</sup> (at 15 mA and 0.39 mbar air pressure for 25 s). The sample was incubated with the grid for 10 min and then the grid was washed three times with MilliQ water (3.5  $\mu$ L). Next, the excess liquid was removed with filter paper. Particles assembled *in vitro* were negatively stained with 0.5% sodium phosphotungstate (PTA) for 30 s followed by drying with filter paper. Cytochrome C (Cyt C), a small positively charged (MW = 12 kDa; pI = 9.47) protein, and bovine serum albumin (BSA), a neutral protein, were used as experimental controls in similar TEM experiments (0.5 nM protein in 55 mM phosphate buffer, with 300 mM NaCl, pH 7.4). The grids were analyzed under a FEI Tecnai Spirit operated at 100 kV. Image magnification ranged from 120,000 to 180,000 times. Several independent experiments were carried out Fiji (ImageJ) software was used to measure the Feret's diameter of the particles. The contrast and brightness were adjusted for maximal visibility of particles. Diameter distribution and box plot analysis were performed in GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Statistical differences in the diameter of NCLPs obtained from the AFM and TEM experiments were analyzed using non-parametric tests; one-way ANOVA with a Kruskal Wallis test and Mann-Whitney U test, respectively. Probability values (p-values) less than 0.05 were considered significant. Box plot and the statistical analysis for the diameters measured for the NCLPs obtained by AFM and TEM are summarized in S5 and S6 Tables.

## Results

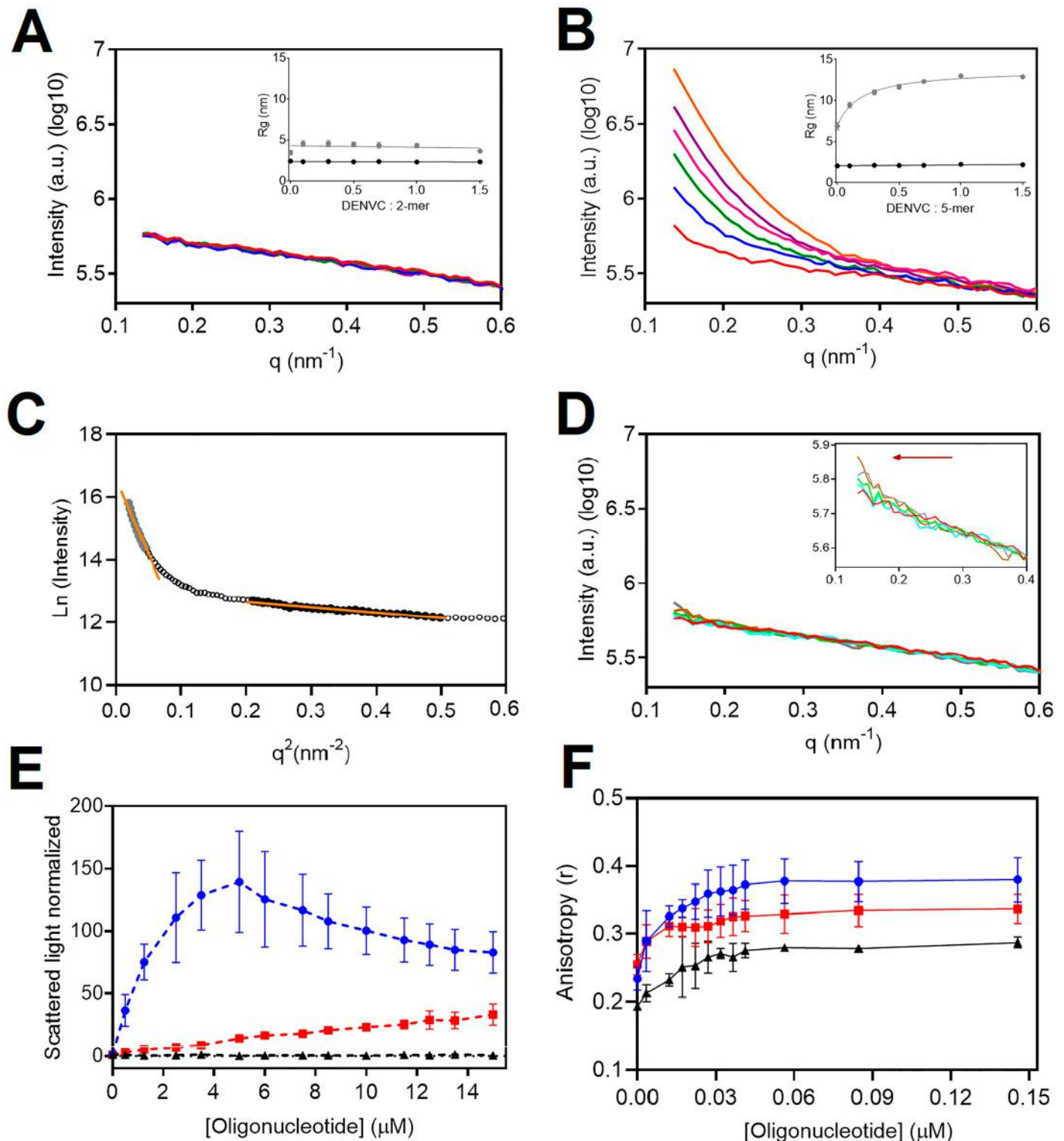
### *In vitro* assembly in solution

To determine the optimal conditions for *in vitro* assembly of DENVC NCLP in solution as well as the effect of the oligonucleotide size in the particles formed, the recombinant DENVC was incubated with ssDNA of different lengths, and the formation of particles was evaluated by SAXS, Rayleigh light scattering, and fluorescence anisotropy (Fig 1). SAXS measurements of DENVC in the absence of DNA yielded a typical profile of a globular protein. The Guinier analysis indicate a  $R_g$  ( $R_g = 2.05 \pm 0.04$  nm) compatible with the DENVC dimer, expanded by the presence of the N-terminal IDR (Fig 1A and 1B). The addition of the oligonucleotides promoted a significant increase of the scattered intensity at low values of the scattering angle ( $q$ ,  $\text{nm}^{-1}$ ) ( $q \rightarrow 0$ ), which indicates the presence of large soluble oligomers. We analyzed the Guinier plot in two regions, as illustrated in Fig 1C. The region 1–10 is sensitive to the formation of large soluble oligomers, while the region 30–60 for 2-mer ssDNA, or 40–70, for 5-mer ssDNA, reports dimeric DENVC in solution without the influence of the soluble oligomers. Note that the  $R_g$  obtained from the oligomeric region is constant with the addition of 2-mer ssDNA (Fig 1A, insert) and increased significantly with the addition of 5-mer ssDNA (Fig 1B, insert), reaching a plateau of  $R_g$  values of  $\sim 12.9$  nm. The Guinier analysis of the dimer region is constant, maintaining the value of  $\sim 2.1$  nm even upon addition of 2-mer and 5-mer ssDNAs (Fig 1A and 1B, insert). We interpreted these data as suggestive of the presence of dimeric and oligomeric DENVC in solution. The addition of 5-mer ssDNA is significantly more efficient to induce oligomerization than the 2-mer. It is important to mention that for the experiment with 5-mer ssDNA we observed a visual precipitation in molar ratios above 1:1. We also measured the SAXS profiles of DENVC upon addition of the 25-mer ssDNA (Fig 1D). This data also indicated a concentration-dependent oligomerization of DENVC triggered by the addition of the oligonucleotide. However, the data were not so clear to analyze as those obtained for the 5-mer (Fig 1B) because the increase of inflexion at low values of the scattering angle ( $q$ ,  $\text{nm}^{-1}$ ) was shifted to the left, toward smaller values of  $q$ . The shift to the left become clear when we note that no effect was observed for  $q > 0.3$  for the 25-mer (Fig 1D) and a significant change was observed for  $q < 0.5$  for the 5-mer (Fig 1B). We believe this result suggest of the formation of soluble oligomers having slightly increased sizes when compared to the oligomers induced by 5-mer. Note that Fig 1D shows the SAXS profiles at low DENVC:25-mer molar ratios. We noticed that at molar ratios higher than 0.1, the curves shifted even more to the left, making them not analyzable with the setup employed. It is also important to mention that visual precipitation is observed at DENVC:25-mer molar ratios higher than 0.1.

To gain more insight on the effect of the ssDNA on DENVC oligomerization, we measured the Rayleigh light scattering upon protein incubation with the oligonucleotides (Fig 1E). The addition of the 5-mer ssDNA led to an increase in light scattering intensity values in a concentration-dependent manner, while this effect was not observed for the 2-mer ssDNA. When using the largest oligonucleotide (25-mer ssDNA), a greater intensity of scattered light was observed even in lower concentrations of oligonucleotide (Fig 1E). This result supports our hypothesis based on the SAXS data (Fig 1D), which showed larger particles (better scatterer) formation in the presence of the 25-mer oligonucleotide.

NCLP formation triggered by 5- and 25-mer was also measured by the increase in the fluorescence anisotropy of fluorescein labeled DENVC (Fig 1F). This experimental approach enables us to work at a 50 nM DENVC concentration, avoiding protein precipitation, as observed in the SAXS and light scattering experiments, which were carried out at the micromolar range. It also allows a better comparison of NCLP formation with 5- and 25-mer oligonucleotides, showing the same stoichiometry of 1:1 (DENVC:oligonucleotide) molar ratio for





**Fig 1. SAXS and light scattering measurements to study oligomerization of DENVC after interaction with ssDNA oligonucleotides.** (A and B) SAXS profiles of DENVC (60  $\mu\text{M}$ ) obtained with the addition of the oligonucleotide 2-mer and 5-mer, respectively. For A and B, the colors indicate the DENVC:ssDNA molar ratio: free DENVC (red line), 1:0.1 (blue line), 1:0.3 (green line), 1:0.5 (pink line), 1:0.7 (purple line), and 1:1 (orange line). The insert shows the Guinier analysis of the SAXS profiles showing the radius of gyration ( $R_g$ ) in two ranges. Range from 1 to the 10<sup>th</sup> experimental point (1–10) corresponds to the SAXS profile region sensitive to the formation of large soluble oligomers (gray circles in A and B). The range 30–60 (2-mer) or 40–70 (5-mer) corresponds to the SAXS region that reports the dimeric DENVC in solution (black circles in A and B). (C) These ranges are exemplified in C. Raw data is represented by white, gray, and black circles. The orange lines

represent a linear fit for the lower (gray circles) and upper (black circles) angle region of the data. (D) SAXS profile of DENVC obtained with the addition of 25-mer. The colors indicate the DENVC:ssDNA molar ratio: free DENVC (red line), 1:0.01 (light blue line), 1:0.03 (light green line), 1:0.05 (gray line), 1:0.07 (brown line). The inserted graph is a close-up at low  $q$ . The red arrow indicates a possible increase in inflection at low  $q$  values which is shifted to the left relative to the 5-mer profile, shown in B. (E) Rayleigh light scattering as a function of ssDNA concentration. DENVC (5  $\mu$ M) was titrated with 2-mer (black dashed line), 5-mer (red dashed line) and 25-mer (blue dashed line) ssDNA oligonucleotides (0 to 15  $\mu$ M final concentration). Light scattering intensity values were normalized as a function of DENVC intensity before the addition of oligonucleotides. (F) Fluorescence anisotropy of fluorescein labeled DENVC as a function of ssDNA oligonucleotide concentration. Fluorescein labeled DENVC (50 nM) was titrated with 2-mer (black line), 5-mer (red line) and 25-mer (blue line) ssDNA oligonucleotides (0 to 0.145  $\mu$ M final concentration). All the experiments were carried out at 25 °C in phosphate buffer (55 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4). The error bars (E and F) represent the standard deviation from duplicate or triplicate measurements. All graphical analyses were performed on GraphPad Prism.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264643.g001>

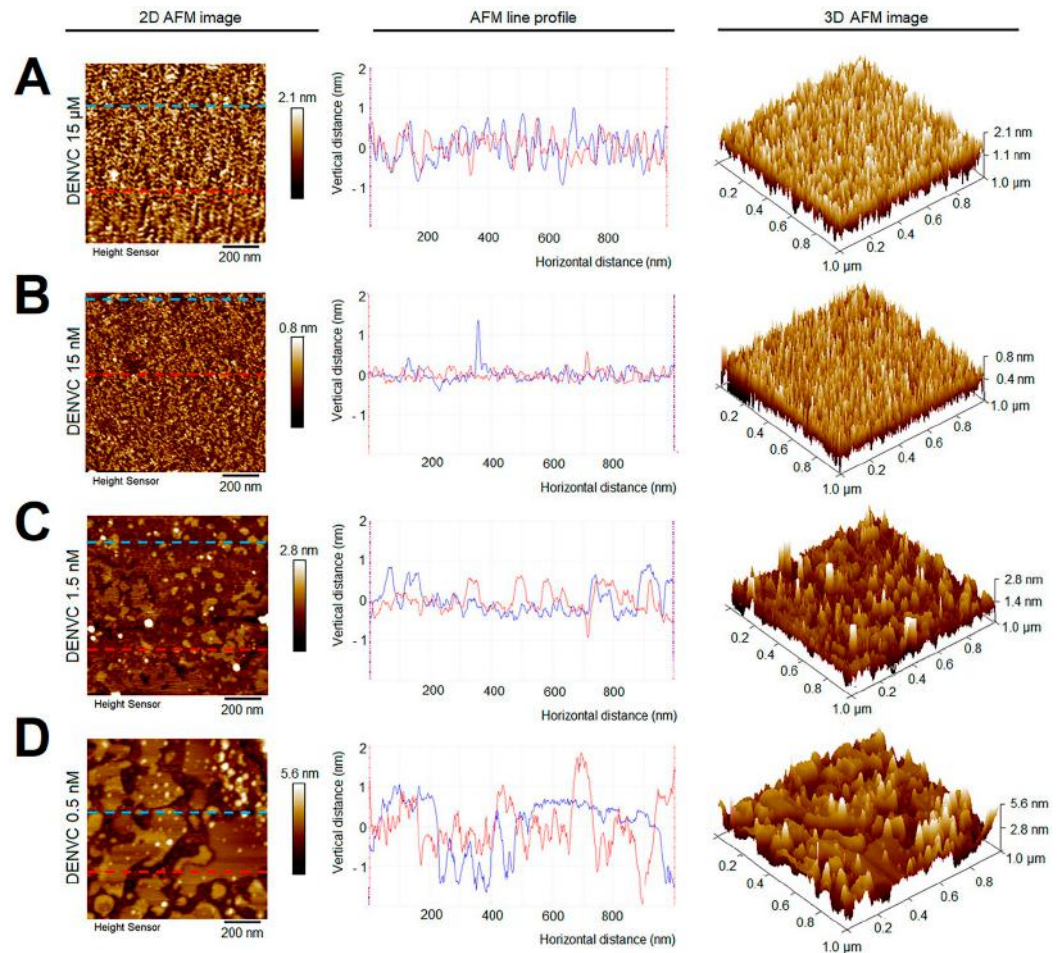
both, with binding affinities in the nanomolar range. Since fluorescein binds covalently to protein lysine residues that would be important for nucleic acid binding and NCLP formation, we used a protein labelling condition that ensure less than 5% labeling. As an additional control, we measured anisotropy using DENVC intrinsic tryptophan fluorescence, which resulted in a very similar profile of anisotropy increase, although with a much smaller increase in the anisotropy due the small tryptophan fluorescence lifetime (S1 Fig).

### ***In-vitro* assembly of NCLPs analyzed by AFM**

The results obtained for NCLP assembly in solution showed that the 5-mer and 25-mer oligonucleotides triggered a concentration-dependent DENVC oligomerization. To get more information on DENVC NCLP size, shape, and homogeneity, we performed AFM experiments. In particular, the Tapping Mode<sup>®</sup> provides topographical information by scanning the sample with an oscillating tip to reduce friction and has been widely employed to study viruses and viral capsids [30, 31].

The choice of DENVC concentration to be used in assembly reactions was limited by factors inherent to the AFM technique. At higher concentrations, proteins form layers on the mica support, making it difficult to identify individual particles. In addition, at higher concentrations, DENVC presented a strong tendency to form amorphous aggregates during the imaging analyses. Thus, to determine the best protein concentration to perform AFM analysis, we acquired topographic images with systematic protein dilutions in absence of oligonucleotides (Fig 2). Indeed, 2D and 3D AFM images at higher DENVC concentrations showed a thick and rough layer of proteins, which was thinned as the protein was diluted. To provide a more direct comparison of the influence of protein concentration in the protein layer formation, we acquired line profiles along the solid lines drawn in two different regions of the 2D topographical AFM images (red and blue lines in Fig 2, central panels). At low protein concentrations (1.5 nM and 0.5 nM), variations in sample height are observed. These variations are caused by an alternation between regions that contain sample and empty regions, in which we observe the mica surface. Analysis of 2D and 3D AFM images along with the line profiles indicated that the best protein concentration for the assembly reactions was 0.5 nM DENVC (Fig 2D). At this concentration, we were able to obtain a cleaner background that allowed us to evaluate each particle.

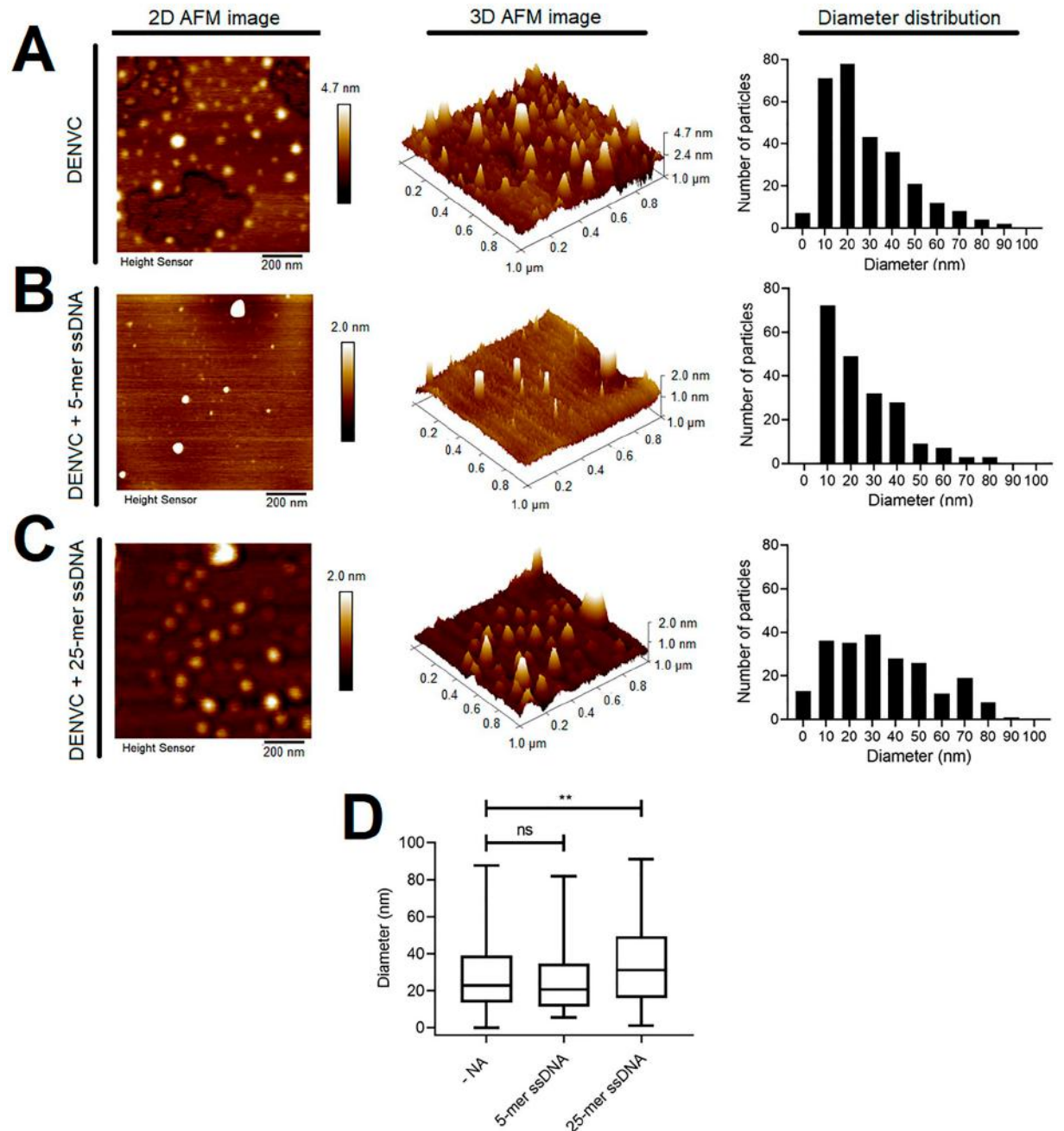
Based on the previous results, we chose 0.5 nM DENVC to perform NCLP assembly experiments. The assembly reactions were carried out with 5- and 25-mer ssDNA, using a DENVC:ssDNA molar ratio of 2:1 and 20:1, respectively. Incubation of DENVC either with the 5-mer or the 25-mer ssDNA resulted in NCLPs showing a regular organization (Fig 3C). The 25-mer-NCLPs appeared to be more symmetrical than the particles obtained after the interaction with the 5-mer (Fig 3B and 3C). Interestingly, we also found particles in absence of oligonucleotide (Fig 3A).



**Fig 2. Determination of DENVC concentration for AFM analysis.** Representative AFM topographical images ( $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ; *left panels*), line profiles at specific section of the 2D images (*central panels*), and 3D images (*right panels*) of DENVC after dilution in 55 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4, to the following concentrations: (A) 15  $\mu\text{M}$ , (B) 15 nM, (C) 1.5 nM and (D) 0.5 nM. The line profile measured in 2D image is shown in the second column. The blue and red dashed lines shown in the 2D images correspond to the sections from where the line profiles were taken. The color scale in the 2D and 3D images indicate the heights in topography. AFM experiments were performed in Tapping Mode<sup>®</sup>, in air, at room temperature. All images and line profiles were acquired with the Nanoscope Analysis software.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264643.g002>

One of the main limitations of the AFM is the lateral broadening effect that affects particle size resolution. This effect is caused by the influence of the probe tip size [32, 33], but other artifacts generated during sample preparation and drying on the mica can also lead to these effects, affecting measurement accuracy. To minimize the lateral broadening effect and perform a quantitative analysis of particle size, we carried out convolution corrections considering the average tip radius value indicated by the cantilever manufacturer. The diameter distribution of NCLPs formed in the absence and presence of 5- and 25-mer ssDNA are represented in Fig 3 (*right panels*). The distribution profile (Fig 3C) formed in the absence and presence of 5-mer ssDNA are similar, with an average diameter of  $27.6 \pm 18.02 \text{ nm}$  and  $24.82 \pm 16.93 \text{ nm}$  for DENVC ( $n = 282$ ) and DENVC with 5-mer ssDNA ( $n = 203$ ), respectively, while particles formed in the presence of the 25-mers ssDNA were slightly larger ( $P < 0.01$ ) (Fig 3D), with an average diameter of  $33.88 \pm 21.88 \text{ nm}$  ( $n = 216$ ). Box plot representation shows that 50% of



**Fig 3. AFM images of recombinant DENVC NCLPs assembled *in vitro*.** Representative 2D (left panels) and 3D (central panels) AFM topographical images ( $1 \times 1 \mu\text{m}$ ), and the Feret's diameters' distributions (right panels), for the following assembly conditions: (A) DENVC (0.5 nM) alone; (B) DENVC and 5-mer ssDNA, in a 2:1 molar ratio; and (C) DENVC and 25-mer ssDNA, in a 20:1 molar ratio. *In vitro* assembly reaction was performed in 55 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH:7.4), at room temperature, during 10 min of incubation. The color scale in 2D and 3D images indicates the heights in topography. AFM experiments were performed in Tapping Mode<sup>®</sup>, in air, at room temperature. (D) Box plot graphical representation for the diameters' distribution obtained for *in vitro* assembly in each condition. The line inside the box denotes the median value (50th percentile) and the whiskers mark the minimum and maximum values. From the minimum value to the beginning of the box, 25% of the data are represented, and from the end of the box to the maximum value, the remaining 25% are represented. The average diameter of particles obtained for DENVC in the absence of oligonucleotides ( $n = 282$ ), DENVC incubated with 5-mer ssDNA ( $n = 203$ ) and DENVC incubated with 25-mer ssDNA ( $n = 216$ ) were  $27.6 \pm 18.02$  nm,  $24.82 \pm 16.93$  nm, and  $33.88 \pm 21.88$  nm, respectively. Statistical analysis was performed using one-way non-parametric ANOVA, followed by Kruskal-Wallis test. Differences were considered significant when  $P \leq 0.05$  (\*\*,  $P < 0.01$ ; ns, not significant).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264643.g003>

NCLPs formed in absence of oligonucleotides or presence of 5-mer ssDNA present 10 to 35 nm-diameter, while in presence of 25-mer ssDNA present 15 to 50 nm-diameter (Fig 3D).

To evaluate whether the highly negatively charged surface of the freshly cleaved mica influenced DENVC NCLP formation, we performed AFM imaging applying the samples after neutralizing (passivating) the AFM surface by coating the cleaved mica with 3-aminopropyl-trietoxy silane (APTES)-AP-mica [29]. The results showed that while for samples prepared in the absence of oligonucleotide only amorphous protein aggregates were observed, particles similar for those observed in AFM images obtained on negatively charged mica were visualized for the samples in the presence of 25-mer ssDNA applied on neutralized surface (S2 Fig). This indicates that DENVC charge neutralization (either by negatively charged surfaces or by nucleic acids) are needed for DENVC NCLPs formation.

### NCLPs characterization by TEM

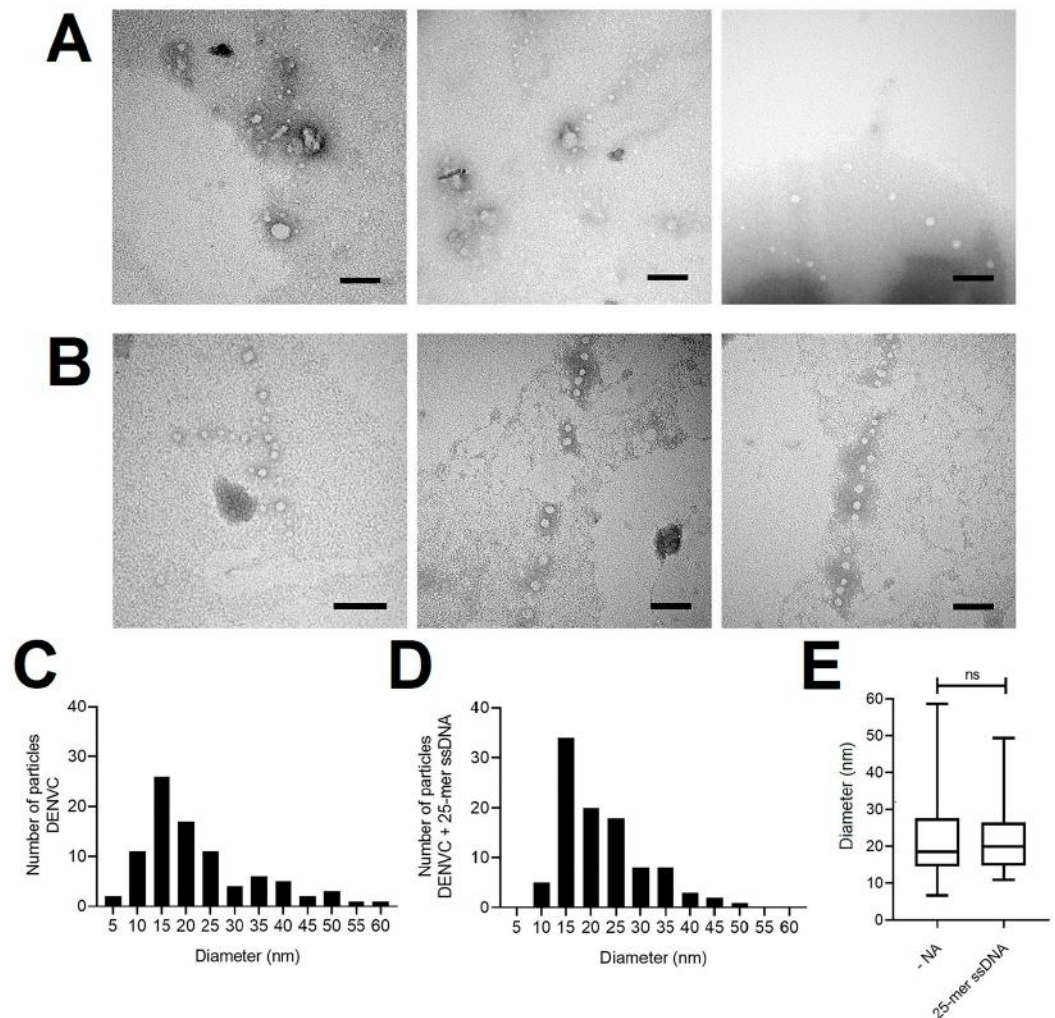
AFM imaging indicated that DENVC forms organized NCLPs *in vitro*. To obtain more information about the DENVC NCLP structure, we used TEM. For this, sample preparation was performed under the same conditions established for AFM and then examined after negative staining (Fig 4). Observation of NCLPs obtained after incubation of DENVC with 25-mer ssDNA showed homogeneous NCLPs with a very regular spherical shape (Fig 4B). It is important to emphasize that NCLPs were not visualized in carbon grids without glow discharge treatment. This observation suggests that the presence of a negatively charged surface is essential to obtain NCLPs under the conditions analyzed.

As observed by AFM, TEM images showed particles in absence of oligonucleotides (Fig 4A). The measured diameters for the particles formed in the presence and absence of 25-mer oligonucleotide were very similar, ranging from 10 to 60 nm, with an average diameter of  $22.62 \pm 11.59$  nm ( $n = 89$ ) and  $22.02 \pm 8.75$  nm ( $n = 99$ ) for DENVC in the absence and presence of 25-mer ssDNA, respectively (Fig 4C–4E). In addition, 75% of DENVC NCLPs formed in the presence of 25-mer ssDNA ranged from approximately 10 to 25 nm (Fig 4E). Despite the particles similarity in sizes formed in the absence or presence of oligonucleotides, important morphological differences among them were evidenced by TEM images (Fig 4A and 4B). Although DENVC alone showed a tendency to form particles under these assembly conditions, they do not have the same regularity and organization observed in presence of 25-mer ssDNA. Furthermore, larger and amorphous particles and the presence of aggregates were also observed. The presence of oligonucleotide of an ideal size appears to direct the proteins to organize themselves to form NCLPs more like authentic DENVC NC (Fig 4B).

To confirm that surface induced NCLPs self-assembly is a specific property of DENVC, we performed similar TEM experiments under the same conditions as used for DENVC (0.5 nM protein in 55 mM phosphate buffer, with 300 mM NaCl, pH 7.4) using cytochrome C (CytC), a small positively charged (MW = 12 kDa; pI = 9.47) protein as DENVC is, and bovine serum albumin (BSA), a neutral protein usually used as a nonspecific control. In contrast to the results obtained with DENVC, no oligomeric structures or NCLPs were visualized for CytC or BSA (S3 Fig), supporting the hypothesis of the surface-driven self-assembly of DENVC.

### Discussion

Flaviviruses' capsid proteins play an essential role in interacting with the viral genome, promoting efficient packaging [16, 18, 19]. However, the process of oligomerization and regulation of RNA incorporation during flaviviruses' nucleocapsid assembly has not yet been described. Although *in vitro* assembly of the recombinant capsid proteins has been well established for alphaviruses [34–36] and hepatitis C virus (HCV) [37], similar systems generated



**Fig 4. TEM images of recombinant DENVC NCLPs assembled *in vitro*.** Representative electron micrographs of NCLPs assembled from DENVC in the (A) absence; and (B) presence of 25-mer ssDNA, in 20:1 molar ratio. *In vitro* assembly reaction of DENVC (0.5 nM) and 25-mer ssDNA (0.025 nM) was performed in buffer containing 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH:7.4), at room temperature and overnight incubation. The grid was stained with 0.5% PTA. Magnification was 120,000 x (except for the first image in B: 150,000 x). All scale bars are 100 nm. The processing of images and measurement of Feret's diameter was performed using Fiji (ImageJ) software. (C and D) Histograms representing the frequency distribution of particle diameters from DENVC in the (C) absence; and (D) presence of 25-mer ssDNA. (E) Box plot graphical representation for the diameters' distribution obtained for *in vitro* assembly in each condition. In the diagram, 50% of the data values are represented inside the box and the line indicates the median of the values. The whiskers mark the minimum and maximum values. From the minimum value to the beginning of the box, 25% of the data are represented, and from the end of the box to the maximum value, the remaining 25% are represented. The average diameter of the particles obtained for DENVC (n = 89) and DENVC with 25-mer ssDNA (n = 99) were 22.62 ± 11.59 nm and 22.02 ± 8.75 nm, respectively. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney U test. Differences were considered significant when P ≤ 0.05 (ns, not significant).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264643.g004>

contradictory results for flaviviruses such as DENV [21, 25, 38] and TBEV [39, 40]. Here we described for the first time a successful methodology for systematically follow recombinant DENVC assembly into NCLPs *in vitro*.

Using biophysical techniques, we demonstrated important features of the assembly process in solution, including the nucleic acid size needed to NCLP formation as well as the concentration dependence and the stoichiometry of the process. Comparing the titration of DENVC

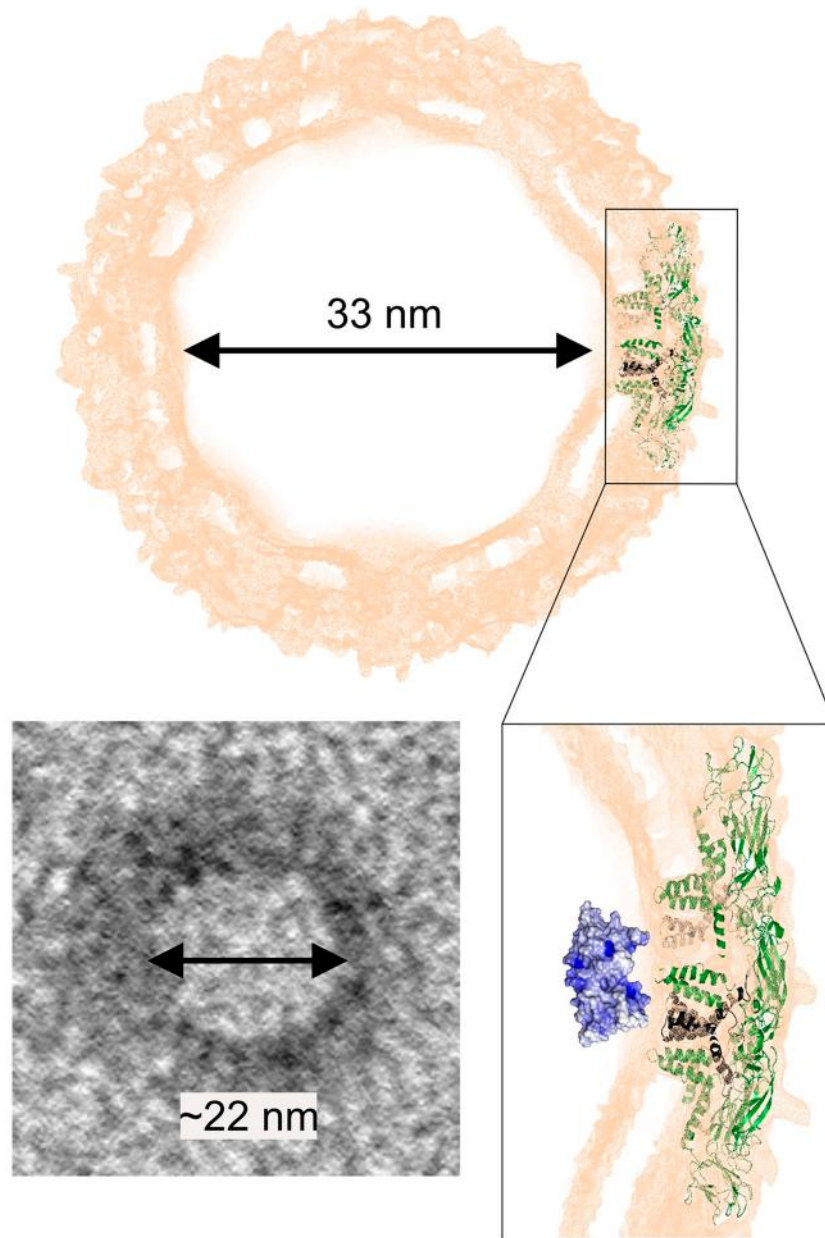
with oligonucleotides of different sizes (2-, 5- and 25-mer) through different techniques (SAXS, Fig 1A and 1B; Rayleigh light scattering, Fig 1E; and fluorescence anisotropy, Fig 1F), we showed that 2-mer is too small and 5-mer is sufficient for the formation of NCLPs. These data suggest an oligonucleotide size-dependence for particle formation, as already described for other viruses [36, 41]. Our experiments in solution also showed concentration-dependent curves, indicating the formation of large soluble oligomers when using increased concentrations of 5- and 25-mer ssDNA. This stochastic behavior was also confirmed by the anisotropy experiments, revealing a stoichiometry of 1:1 (DENVC:oligonucleotide) molar ratio for both oligonucleotides. Additionally, SAXS studies in which DENVC was incubated with different concentrations of 5-mer oligonucleotide demonstrated a concentration dependence profile with a saturation plateau, indicating an equilibrium involving the DENVC dimer and NCLPs. The  $R_g$  of ~12.9 nm obtained by the Guinier analysis is compatible with the sizes of the NCLPs observed by AFM and TEM (average diameter of ~22 nm; Figs 3 and 4), as well as with the internal size of the virion (Fig 5). Finally, the fact that NCLPs are formed with the 5-mer oligonucleotide suggests that there is no need of nucleic acid secondary structure to trigger DENVC NCLP assembly. This would be important in the context of virus replication cycle, in which DENVC, as a multifunctional protein, may act either in genome encapsidation or as a chaperone of RNA secondary structures during viral RNA circularization needed for replication [42]. Here, we chose to work with small oligonucleotides, for which chaperone activity of DENVC is not required, simplifying the system.

DENVC shows a high tendency to form amorphous aggregates, which has been reported for the attempts to *in vitro* assembly of NCLPs as well as for isolation of NCs from viral particles purified from cells infected by flaviviruses [38–40]. This occurs probably due to the exposure of hydrophobic surfaces in capsid proteins after interaction with nucleic acids [19, 39]. In the cellular environment, probably the membrane interfaces work as a chaperone for the assembly of organized particles.

Here we surpassed the obstacle of DENVC aggregation in amorphous structures by performing imaging experiments at a very low protein concentration (Fig 2). AFM and TEM imaging showed that the use of sub-nanomolar concentrations of DENVC was essential for the observation of regular and homogeneous NCLPs with minimum aggregation. Accordingly, fluorescence anisotropy experiments also allowed us to work with DENVC at 50 nM concentration, for which we did not observe any aggregation even in excess of DNA.

The NCLPs we observed by TEM are similar in diameter and shape with the previously described DENVC particles assembled *in vitro* [25], in which the authors used mixture of DNA oligonucleotides of 50 bases in a very low proportion (100:1 DENVC:DNA) molar ratio. However, in contrast to the results shown in this previous report [25], or in our experiments performed in solution (Fig 1), we observed the formation of DENVC NCLPs in the absence of nucleic acid when the samples were prepared either for AFM or TEM (Figs 3A and 4A, respectively). We believe that this different result can be explained by the optimized conditions for sample preparations for AFM or TEM imaging, i.e., drying very diluted DENVC solutions over negatively charged surfaces (mica or grid carbon layer, respectively). Accordingly, self-assembly in the absence of nucleic acid has been also reported for HCV [43, 44]. The unique features of flaviviruses' C proteins, such as its small size and the highly positive surface electrostatic potential [22] (see Fig 5), can further facilitate interaction with the solid charged substrate, driving the self-assembly process. Thus, the presence of the AFM mica surface or the TEM grid carbon surface may have provided a platform for NC formation as it happens in the presence of cellular interfaces [24, 45], helping the NC assembly.

Thus, we hypothesize that DENVC self-assembly is surface-driven, as described for other proteins, including viral proteins [46–49]. In fact, in solution (absence of a surface), DENVC is



**Fig 5. Structure of DENV and schematic model of the assembly of NCLPs.** Representation of the external density map (orange) of the cryo-EM structure of mature DENV2 (PDB ID: 3J27), highlighting the position of E (green) and M (dark gray) proteins, and the 33 nm diameter central region, compatible with the NCLPs observed in the present study by TEM, with ~ 22 nm diameter (left lower panel). DENVC (PDB ID: 1R6R) is represented in its hypothetical position in NC (right lower panel). DENVC surface representation was generated in PyMOL, colored according to its electrostatic potential map calculated in APBS software (pH 7.0, 200 mM NaCl, 25 °C) as blue (positive), white (neutral), and red (negative). Note the highly positive spot in  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  conferred by R85 and K86, which possibly corresponds to the main DENVC-RNA binding site.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264643.g005>

dimeric and does not oligomerize to large particles, as it was observed in many conditions [21, 23, 50]. In agreement with the surface effect, a previous AFM study demonstrated fast and efficient self-assembly of capsid protein from human immunodeficiency virus (HIV) at very low protein concentration when applied directly onto a negatively charged substrate, showing the



need for a surface to drive the process [46, 47]. Ionic strength, pH, temperature, the concentration of molecules, and molecular sequence can affect surface interactions [48, 49]. It is important to mention that we obtained DENVC NCLPs in the absence of oligonucleotide when we used negatively charged surfaces (Figs 3 and 4), but not after surface charge neutralization (S2 Fig), reinforcing that a proper surface can induced NCLP formation rather than amorphous aggregates. In summary, our results suggest that DENV NCLP assembly process depends on a set of factors, such as the low concentration of DENVC, the ionic strength used, the presence of an appropriately sized oligonucleotide, and the presence of a negatively charged surface. The conditions for NCLP formation described here enabled an improved characterization of the concentration dependence for the formation of NCLPs, establishing the presence of an equilibrium between DENVC dimers and NCLPs. Additionally, we believe that flaviviruses' NC have a highly dynamic nature, which could explain the difficulty observed in obtaining NCLPs the limitation of structural information in cryo-EM studies.

Altogether, our results indicate that, as expected, DENV NC formation requires the neutralization of C protein positive charges through interaction either with nucleic acids or with negatively charged surfaces. However, despite DENVC positive charges have been firstly believed to be concentrated in one face of the protein structure [23], being this asymmetric charge distribution model propagated in the literature, our recent structural analyses measuring long range electrostatic potential revealed a highly electropositive surface throughout the whole protein and not restricted to  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  (see Fig 5). This is true for DENVC as well as for capsid proteins of other flaviviruses', such as ZIKV, JEV and WNV [22]. Thus, charge neutralization must be a very coordinated process to avoid unspecific aggregation, explaining the high tendency of DENVC to form amorphous aggregates *in vitro* instead of an organized NC. Our hypothesis is that NC formation depends on neutralization of the highly positive spot conferred by  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  R85 and K86 (see Fig 5), this being possibly the main DENVC-RNA binding site.

## Supporting information

**S1 Fig. Anisotropy measurements of non-labeled DENVC titrated with increased concentrations of 25-mer.** Non-labeled DENVC (2  $\mu$ M) was titrated with 25-mer (blue line) ssDNA oligonucleotide (0 to 1.04  $\mu$ M final concentration). This experiment was carried out at 25 °C in phosphate buffer (55 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.4). <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19140149>.

(TIF)

**S2 Fig. Effect of neutralizing mica surface on DENVC NCLP formation.** DENVC (0.5 nM) samples incubated overnight in the absence (A) or in the presence of 25-mer ssDNA (20:1, DENVC: ssDNA molar ratio) (B) were applied on mica treated with of 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES) for neutralizing surface charges—AP-mica. The color scale in the representative 2D and 3D AFM images (1 x 1  $\mu$ m), indicate the heights in topography. AFM experiments were performed in Tapping Mode<sup>®</sup>, in air, at room temperature. All images were acquired with the Nanoscope Analysis software. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.17838653.v1>.

(TIF)

**S3 Fig. Specificity of DENVC surface-driven NCLPs formation.** Representative electron micrographs of (A) DENVC, (B) Cyt C and (C) BSA were incubated overnight, in low concentration (0.5 nM) in buffer containing 55 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 7.4),

in absence of oligonucleotides, at room temperature. The grids were stained with 0.5% PTA. All scale bars are 100 nm. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.17839265.v1>.  
(TIF)

**S1 Table. Experimental radius of gyration (R<sub>g</sub>) calculated from the Guinier analysis of DENVC: 2- or 5-mer, using the PRIMUS / qt program, from ATSAS Suite.** R<sub>g</sub> was calculated in two intervals: interval from 1 to 10<sup>th</sup> experimental point (1–10) and interval 30–60 (2-mer) or 40–70 (5-mer). Values represent the means and errors are the standard deviation between the SAXS data. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.17839460>.  
(DOCX)

**S2 Table. Experimental data from light scattering measurements of DENVC titrated with increased concentrations of 2-, 5- and 25-mer.** Values represent the means and errors are the standard deviation between three independent experiments. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.17839679>.  
(DOCX)

**S3 Table. Experimental data from anisotropy measurements of fluorescein labeled DENVC titrated with increased concentrations of 2-, 5- and 25-mer.** Values represent the means and errors are the standard deviation between two independent experiments. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.17839850>.  
(DOCX)

**S4 Table. Experimental data from anisotropy measurements of non-labeled DENVC titrated with increased concentrations of 25-mer.** The values represent the mean of 12 accumulations and their standard deviations. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19140140>.  
(DOCX)

**S5 Table. Box plot and the statistical analysis for the diameters measured for the NCLPs obtained by AFM.** <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.17839988>.  
(DOCX)

**S6 Table. Box plot and the statistical analysis for the diameters measured for the NCLPs obtained by TEM.** <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.17840120>.  
(DOCX)

## Acknowledgments

The authors thank the National Center for Structural Biology and Bioimaging (CENABIO), UFRJ, for providing access to the FEI Tecnai Spirit Microscope and Bruker's Dimension Icon Microscope. We gratefully acknowledge Ms Adélia Mara Belém Lima, from CENABIO, UFRJ, for excellent technical assistance. We also thank the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) for support on SAXS experiments.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Nathane C. Mebus-Antunes, Fabio C. L. Almeida, Andrea T. Da Poian.

**Formal analysis:** Nathane C. Mebus-Antunes, Wellington S. Ferreira, Gilberto Weissmuller, Fabio C. L. Almeida.

**Funding acquisition:** Fabio C. L. Almeida, Andrea T. Da Poian.

**Investigation:** Nathane C. Mebus-Antunes, Wellington S. Ferreira, Glauce M. Barbosa, Thais C. Neves-Martins.

**Methodology:** Nathane C. Mebus-Antunes, Fabio C. L. Almeida, Andrea T. Da Poian.

**Project administration:** Fabio C. L. Almeida, Andrea T. Da Poian.

**Resources:** Gilberto Weissmuller, Fabio C. L. Almeida, Andrea T. Da Poian.

**Supervision:** Fabio C. L. Almeida, Andrea T. Da Poian.

**Validation:** Nathane C. Mebus-Antunes.

**Visualization:** Nathane C. Mebus-Antunes, Fabio C. L. Almeida, Andrea T. Da Poian.

**Writing – original draft:** Nathane C. Mebus-Antunes, Fabio C. L. Almeida, Andrea T. Da Poian.

**Writing – review & editing:** Nathane C. Mebus-Antunes, Fabio C. L. Almeida, Andrea T. Da Poian.

## References

1. Bruinsma RF, Wuite GJL, Roos WH. Physics of viral dynamics. *Nature Reviews Physics*. Springer Nature. 2021, 3:76–91. <https://doi.org/10.1038/s42254-020-00267-1> PMID: 33728406
2. Kondylis P, Schlicksup CJ, Zlotnick A, Jacobson SC. Analytical Techniques to Characterize the Structure, Properties, and Assembly of Virus Capsids. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society. 2019, 91:622–636. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04824> PMID: 30383361
3. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015, 39:155–170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004> PMID: 25725010
4. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev S v, Corver J, Lenches E, et al. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell*. 2002, 108: 717–25. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00660-8) PMID: 11893341
5. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural Biology*. 2003; 10:907–12. <https://doi.org/10.1038/nsb990> PMID: 14528291
6. Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2013; 20: 105–110. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2463> PMID: 23241927
7. Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ. Structure of West Nile virus. *Science*. 2003; 302:248. <https://doi.org/10.1126/science.1089316> PMID: 14551429
8. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*. 2016; 352:467–70. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5316> PMID: 27033547
9. Kostyuchenko VA, Zhang Q, Tan JL, Ng T-S, Lok S-M. Immature and Mature Dengue Serotype 1 Virus Structures Provide Insight into the Maturation Process. *Journal of Virology*. 2013; 87:7700–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.00197-13> PMID: 23637416
10. Kostyuchenko VA, Chew PL, Ng T-S, Lok S-M. Near-Atomic Resolution Cryo-Electron Microscopic Structure of Dengue Serotype 4 Virus. *Journal of Virology*. 2014; 88:477–482. <https://doi.org/10.1128/JVI.02641-13> PMID: 24155405
11. Holland Cheng R, Kuhn RJ, Olson NH, Rossmann MG, Choi MG, Smith TJ, Baker TS. Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell*. 1995; 80:621–30. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90516-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90516-2) PMID: 7867069
12. Mukhopadhyay S, Chipman PR, Hong EM, Kuhn RJ, Rossmann MG. In Vitro-Assembled Alphavirus Core-Like Particles Maintain a Structure Similar to That of Nucleocapsid Cores in Mature Virus. *Journal of Virology*. 2002; 76:11128–11132. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.21.11128-11132.2002> PMID: 12368355
13. Mendes A, Kuhn RJ. Alphavirus nucleocapsid packaging and assembly. *Viruses*. MDPI AG; 2018; 10:138. <https://doi.org/10.3390/v10030138> PMID: 29558394

14. Prasad VM, Miller AS, Klose T, Sirohi D, Buda G, Jiang W, et al. Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2017; 24: 184–186. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3352> PMID: 28067914
15. Therkelsen MD, Klose T, Vago F, Jiang W, Rossmann MG, Kuhn RJ. Flaviviruses have imperfect icosahedral symmetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018; 115:11608–11612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809304115> PMID: 30348794
16. Sotcheff S, Routh A. Understanding flavivirus capsid protein functions: The tip of the iceberg. *Pathogens*. MDPI AG. 2020; 9:42. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010042> PMID: 31948047
17. Xie X, Zou J, Zhang X, Zhou Y, Routh AL, Kang C, et al. Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. *Cell Host and Microbe*. 2019; 26:606–622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.015> PMID: 31631053
18. Tan TY, Fibriansah G, Lok SM. Capsid protein is central to the birth of flavivirus particles. *PLoS Pathogens*. 2020; 16:e1008542. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008542> PMID: 32463839
19. Byk LA, Gamarnik A v. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annual Review of Virology*. Annual Reviews Inc.; 2016. 3:263–281. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042334> PMID: 27501261
20. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host and Microbe*. 2009; 5:365–75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007> PMID: 19380115
21. Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ. Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein. *Journal of Virology*. 2003; 77:7143–7149. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.12.7143-7149.2003> PMID: 12768036
22. Neves-Martins TC, Mebus-Antunes NC, Caruso IP, Almeida FCL, da Poian AT. Unique structural features of flaviviruses' capsid proteins: new insights on structure-function relationship. *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V. 2021. 47:106–112. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.02.005> PMID: 33721656
23. Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101: 3414–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101> PMID: 14993605
24. Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, da Poian AT, et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathogens*. 2009; 5: e1000632. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000632> PMID: 19851456
25. López C, Gil L, Lazo L, Menéndez I, Marcos E, Sánchez J, et al. In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus. *Archives of Virology*. 2009; 154: 695–698. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0350-8> PMID: 19305942
26. Svergun DI, Koch MHJ. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Reports on Progress in Physics*. 2003; 66:1735. <https://doi.org/10.1017/s0033583503003871> PMID: 14686102
27. Petoukhov M v., Franke D, Shkumatov A v., Tria G, Kikhney AG, Gajda M, et al. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*. 2012; 45:342–350. <https://doi.org/10.1107/S0021889812007662> PMID: 25484842
28. Guinier A., Fournet G., & Yudowitch K. L. *Small-angle scattering of X-rays*. New York: Wiley. 1955; 24.
29. Murugesapillai D, Bouaziz S, Maher LJ, Israeloff NE, Cameron CE, Williams MC. Accurate nanoscale flexibility measurement of DNA and DNA-protein complexes by atomic force microscopy in liquid. *Nano-scale*. 2017; 9:11327–11337. <https://doi.org/10.1039/c7nr04231k> PMID: 28762410
30. Kuznetsov YG, McPherson A. Atomic Force Microscopy in Imaging of Viruses and Virus-Infected Cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011; 75: 268–285. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-10> PMID: 21646429
31. de Pablo PJ. Atomic force microscopy of virus shells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd. 2018; 73:199–208. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.039> PMID: 28851598
32. Ruggeri FS, Šneideris T, Vendruscolo M, Knowles TPJ. Atomic force microscopy for single molecule characterisation of protein aggregation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2019; 664:134–148. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.001> PMID: 30742801
33. Canale C, Torre B, Ricci D, Braga PC. Recognizing and avoiding artifacts in atomic force microscopy imaging. *Methods in Molecular Biology*. 2011; 736:31–43. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-105-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-105-5_3) PMID: 21660719
34. Wengler G, Wengler G, Boege U, Wahn K. Establishment and analysis of a system which allows assembly and disassembly of alphavirus core-like particles under physiological conditions in vitro. *Virology*. 1984; 132:401–12. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90045-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90045-x) PMID: 6702103

35. Tellinghuisen TL, Kuhn RJ. Nucleic Acid-Dependent Cross-Linking of the Nucleocapsid Protein of Sindbis Virus. *Journal of Virology*. 2000; 74:4302–4309. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.9.4302-4309.2000> PMID: 10756045
36. Tellinghuisen TL, Hamburger AE, Fisher BR, Ostendorp R, Kuhn RJ. In Vitro Assembly of Alphavirus Cores by Using Nucleocapsid Protein Expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*. 1999; 73:5309–5319. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.7.5309-5319.1999> PMID: 10364277
37. Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, Watowich SJ. Self-Assembly of Nucleocapsid-Like Particles from Recombinant Hepatitis C Virus Core Protein. *Journal of Virology*. 2001; 75: 2119–2129. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.5.2119-2129.2001> PMID: 11160716
38. Teoh P-G, Huang Z-S, Pong W-L, Chen P-C, Wu H-N. Maintenance of Dimer Conformation by the Dengue Virus Core Protein  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  Helix Pair Is Critical for Nucleocapsid Formation and Virus Production. *Journal of Virology*. 2014; 88: 7998–8015. <https://doi.org/10.1128/JVI.00940-14> PMID: 24807709
39. Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. *Journal of Virology*. 2004; 78: 8078–8084. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8078-8084.2004> PMID: 15254179
40. Kaufman F, Dostálková A, Pekárek L, Thanh TD, Kapisheva M, Hadravová R, et al. Characterization and in vitro assembly of tick-borne encephalitis virus C protein. *FEBS Letters*. 2020; 594: 1989–2004. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13857> PMID: 32510601
41. Maassen SJ, de Ruiter M v., Lindhoud S, Cornelissen JJLM. Oligonucleotide Length-Dependent Formation of Virus-Like Particles. *Chemistry—A European Journal*. 2018; 24: 7456–7463. <https://doi.org/10.1002/chem.201800285> PMID: 29518273
42. Yong XE, Raghuvamsi PV, Anand G, Wohland T, Sharma K. Dengue virus strain 2 capsid protein switches the annealing pathway and reduces the intrinsic dynamics of the conserved 5' untranslated region. *RNA Biology*. 2021; 18:718–731. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1860581> PMID: 33406991
43. Acosta-Rivero N, Rodriguez A, Mussachio A, Poutu J, Falcon V, Torres D, et al. A C-terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles in vitro into virus-like particles in the absence of structured nucleic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 334:901–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.185> PMID: 16053919
44. de Souza TLF, Barbosa de Lima SM, de Azevedo Braga VL, Peabody DS, Ferreira DF, Lucia Bianconi M, et al. Charge neutralization as the major factor for the assembly of nucleocapsid-like particles from C-terminal truncated hepatitis C virus core protein. *PeerJ*. 2016; 4:e2670. <https://doi.org/10.7717/peerj.2670> PMID: 27867765
45. Faustino AF, Martins IC, Carvalho FA, Castanho MARB, Maurer-Stroh S, Santos NC. Understanding Dengue Virus Capsid Protein Interaction with Key Biological Targets. *Scientific Reports*. 2015; 5:10592. <https://doi.org/10.1038/srep10592> PMID: 26161501
46. Valbuena A, Mateu MG. Kinetics of Surface-Driven Self-Assembly and Fatigue-Induced Disassembly of a Virus-Based Nanocoating. *Biophysical Journal*. 2017; 112: 663–673. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.3209> PMID: 28256226
47. Valbuena A, Mateu MG. Quantification and modification of the equilibrium dynamics and mechanics of a viral capsid lattice self-assembled as a protein nanocoating. *Nanoscale*. 2015; 7: 14953–14964. <https://doi.org/10.1039/c5nr04023j> PMID: 26302823
48. Keller A, Grundmeier G. Amyloid aggregation at solid-liquid interfaces: Perspectives of studies using model surfaces. *Applied Surface Science*. Elsevier B.V. 2020; 506:144991. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144991>
49. Whitehouse C, Fang J, Aggeli A, Bell M, Brydson R, Fishwick CWG, et al. Adsorption and self-assembly of peptides on mica substrates. *Angewandte Chemie—International Edition*. 2005; 44: 1965–1968. <https://doi.org/10.1002/anie.200462160> PMID: 15726554
50. Martins IC, Gomes-Neto F, Faustino AF, Carvalho FA, Carneiro FA, Bozza PT, et al. The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. *Biochemical Journal*. 2012; 444. <https://doi.org/10.1042/BJ20112219> PMID: 22428600

ANEXO II: “Unique structural features of flaviviruses’ capsid proteins: new insights on structure-function relationship”, publicado na *Current Opinion in Virology*, em 2021.  
(<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.02.005>)



# Unique structural features of flaviviruses' capsid proteins: new insights on structure-function relationship

Thais C Neves-Martins<sup>1,4</sup>, Nathane C Mebus-Antunes<sup>1,4</sup>,  
Icaro P Caruso<sup>1,3,4</sup>, Fabio CL Almeida<sup>1,2</sup> and Andrea T Da Poian<sup>1</sup>

The Flaviviridae family comprises important human pathogens, including Dengue, Zika, West Nile, Yellow Fever and Japanese Encephalitis viruses. The viral genome, a positive-sense single-stranded RNA, is packaged by a single protein, the capsid protein, which is a small and highly basic protein that form intertwined homodimers in solution. Atomic-resolution structures of four flaviviruses capsid proteins were solved either in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy, or after protein crystallization by X-ray diffraction. Analyses of these structures revealed very particular properties, namely (i) the predominance of quaternary contacts maintaining the structure; (ii) a highly electropositive surface throughout the protein; and (iii) a flexible helix ( $\alpha 1$ ). The goal of this review is to discuss the role of these features in protein structure-function relationship.

## Addresses

<sup>1</sup> Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis (IBqM), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup> National Center for Structural Biology and Bioimaging (CENABIO), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup> Multiuser Center for Biomolecular Innovation (CMIB) and Department of Physics, Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences (IBILCE), São Paulo State University (UNESP), 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

Corresponding authors: Almeida, Fabio C.L. ([falmeida@bioqmed.ufrj.br](mailto:falmeida@bioqmed.ufrj.br)), Da Poian, Andrea T. ([dapoian@bioqmed.ufrj.br](mailto:dapoian@bioqmed.ufrj.br))

<sup>4</sup> These authors contributed equally to the study.

Current Opinion in Virology 2021, 47:106–112

This review comes from a themed issue on **Virus structure and expression**

Edited by **Adolfo H Moraes** and **Flávio Fonseca**

For complete overview about the section, refer [Virus Structure and Expression \(2021\)](#)

Available online 12th March 2021

<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.02.005>

1879-6257/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Introduction

The canonical function of viral capsid proteins is to protect the viral genome by assembling in symmetric shells. As expected for their main role in binding viral nucleic acid during nucleocapsid assembly, these proteins

contain a high number of positively charged amino acid residues in their sequences, known as arginine-rich motifs, poly-arginine, or arginine-arms [1]. Indeed, an analysis of 270 viral structural proteins revealed that almost exclusively capsid proteins show net charge-molecular mass ratio above +0.75/kDa, being the flaviviruses' capsid (C) proteins those showing the highest values (from +1.07/kDa to +2.30/kDa) [2]. In addition to these common properties, the determination of the atomic-resolution structures of C proteins of four different flaviviruses revealed very particular structural features. Indeed, the uniqueness of the flaviviruses' capsid protein fold is in line with the novel proposal for classifying viruses, which, differently from the traditional classification based on genome features [3], use the three-dimensional structural similarities of viral capsid proteins to define the viral lineages [4]. Using this capsid-centered approach, Bamford *et al.* first pooled the known viral families into four major lineages [4]. Now, with the accumulation of structural data of thousands of viral proteins from more than a hundred viral families, it was possible to confirm the four major capsid-based viral lineages, along with the proposal of some new additions [5,6]. Interestingly, the jellyroll fold (single or double) comprises almost 40% of the icosahedral virus capsid proteins. Despite the existence of few groups gathering a great number of different viruses, it is remarkable that the flaviviruses capsid proteins could not be included in any of those viral lineages [5], reinforcing its uniqueness. The goal of the present review is to provide new insights on the structure-function relationship in flaviviruses' capsid proteins.

## Structural features of flaviviruses' capsid proteins

There are six structures available for the flaviviruses' C proteins, two for Dengue Virus (DENV) [7,8], two for Zika Virus (ZIKV) [9,10], one for West Nile Virus (WNV) [11] and one for Japanese Encephalitis Virus (JEV) [12] (Table S1 in Supplementary material). To allow crystallization and structure determination by X-ray diffraction, the proteins were truncated by removing the N-terminal intrinsically disordered region (IDR). At present, there are crystal structures available for  $\Delta 1-22$ -WNVC [11],  $\Delta 1-20$ -DENVC [7],  $\Delta 1-22$ -ZIKVC [9] and  $\Delta 1-25$ -JEVC [12]. The structures in solution were solved by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) for the full-length proteins of DENV and ZIKV (DENVC and ZIKVC)

[8,10], but it is important to bear in mind that although the N-terminal IDR is present in these proteins, the coordinates are available only for the globular portion.

The flaviviruses' C proteins form homodimers in solution [13]. Each monomer contains ~100 residues, consisting of a N-terminal IDR of variable size, followed by 4 intertwined  $\alpha$ -helices connected by short loops [7–13]. The dimer surface is formed mainly by the antiparallel helices  $\alpha 2/\alpha 2'$  and  $\alpha 4/\alpha 4'$  (Figure 1a), which concentrate most of the interactions that stabilize the dimer [7–13]. The longest helix,  $\alpha 4$ , has no intramolecular tertiary contacts (Figure 1b), but many quaternary contacts with the neighboring subunit, mainly with  $\alpha 2'$ ,  $\alpha 3'$  and  $\alpha 4'$  (Figure 1a). The predominance of quaternary contacts is an interesting particularity of these proteins and justifies the energetic preference for the dimeric state (Figure 1a). In contrast, the tertiary contacts are restricted to the conserved side chains of the hydrophobic core (involving  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$ ), surrounding the conserved tryptophan residue (Figure 1b) [8,14]. These structural features make the flaviviruses' C proteins to occur exclusively as dimers, and most likely, without a folded monomer in solution. They do not depend on the presence of nucleic acid for dimerization, unlike other nucleocapsid proteins, such as those of alphaviruses, for example [15,16]. In any case, structural information about the organization of C proteins as dimers is essential for the understanding of viral genome packaging since dimer formation favors the oligomerization cascade that leads to the nucleocapsid (NC) assembly [17–19].

Tertiary and quaternary salt bridges are also important to stabilize the dimeric structure of DENVC, ZIKVC and

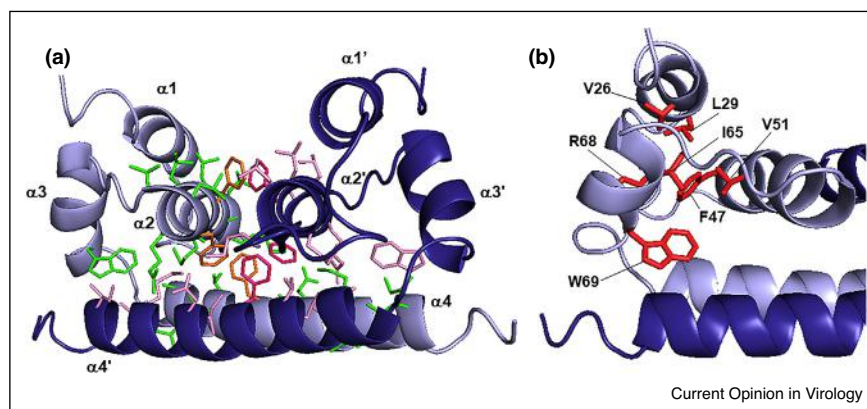
JEVC [8,10,12,20]. WNVC also presents tertiary and quaternary salt-bridges, but some are exposed to the solvent and their role in dimer stabilization is arguable. Another structural feature that contributes for the dimer stabilization is the presence of 3 conserved  $\pi$ -stacking interaction involving conserved phenylalanine residues (F53/F53', F56/F84' and F56'/F84 in DENVC structure, see Figure 1a). Interestingly, these interactions are present in a symmetry axis of the protein.

Although the structure of C protein dimer is well established, information about C protein conformation when forming the NC is still lacking. Several cryo-electron microscopy structures of flaviviruses' particles showed that the surface proteins (envelope and membrane proteins) are arranged with icosahedral symmetry [21–28], but these studies did not show structural resolution for the NC [21–23]. This suggests that the flaviviruses' NC are either poorly ordered, not following the symmetry of the icosahedral external envelope; or ordered but dynamic. Remarkably, a partially ordered NC was observed for immature ZIKV particles [29], suggesting the existence of a dynamic NC capable of reorganizing itself according to the virus life cycle.

### Charge asymmetry and electrostatic potential

Many studies in the literature postulate an asymmetric charge distribution on C proteins' surface [8,13,30–32]. The  $\alpha 2$  is the most conserved helix, containing 11 apolar and two conserved positively charged residues. A concave hydrophobic surface is formed by  $\alpha 2/\alpha 2'$  helices in one face of the protein [4,9,26], which was shown to interact with intracellular hydrophobic surfaces [8,30,33]. The opposite face is occupied by  $\alpha 4/\alpha 4'$ , the largest helices

**Figure 1**



Quaternary and tertiary contacts of flaviviruses' capsid proteins. **(a)** Quaternary contacts are predominant and stabilize the dimer. The side view of the dimeric DENVC (PDB: 1R6R) is shown in ribbon representation, with one monomer ( $\alpha 1$ – $\alpha 4$ ) colored in light blue and the other ( $\alpha 1'$ – $\alpha 4'$ ) in dark blue. The side chains of the residues possibly involved in quaternary contacts are colored in green for the residues of  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , and  $\alpha 4$ ; and in pink for those of  $\alpha 2'$ ,  $\alpha 3'$ , and  $\alpha 4'$ . The side chains of conserved phenylalanine residues involved in  $\pi$ -stacking interactions are highlighted in orange (F53, F56 and F84) and magenta (F53', F84' and F56'). **(b)** Tertiary contacts are restricted to the interactions between the side chains of the  $\alpha 1$  (V26, L29),  $\alpha 2$  (F47, V51) and  $\alpha 3$  residues (I65, R68, W69), shown in red.

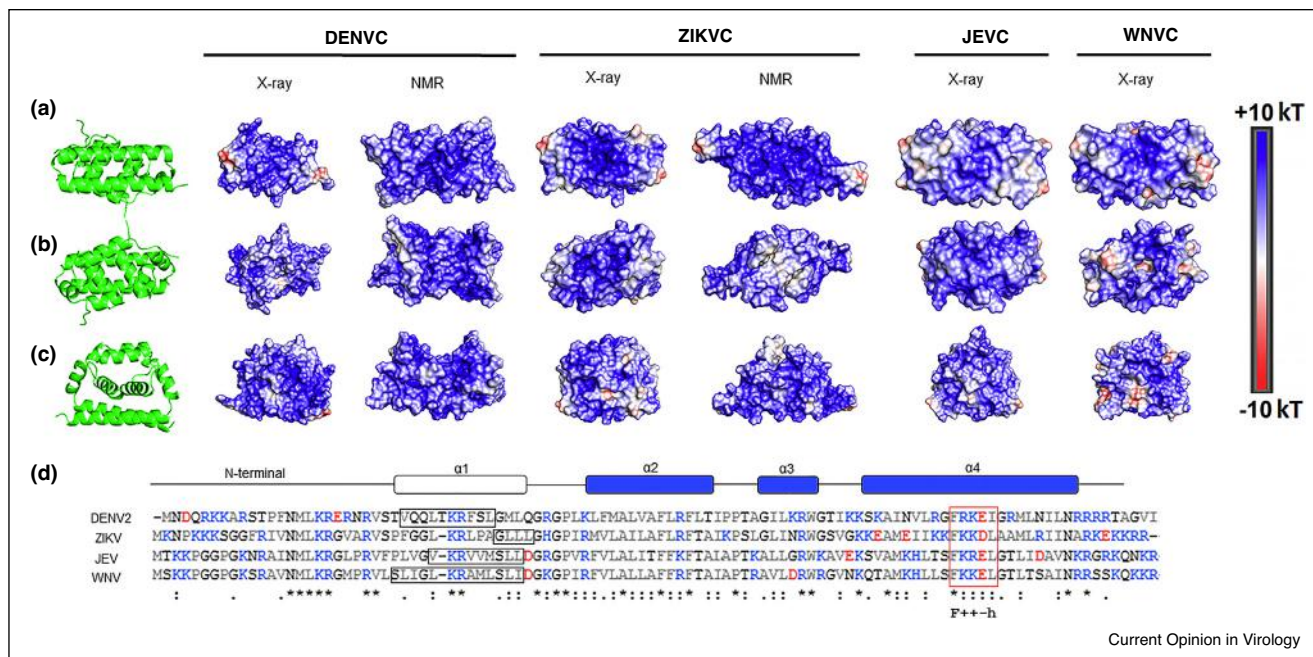


of the structure that anchor  $\alpha 2 / \alpha 2'$  and  $\alpha 3 / \alpha 3'$  through interchain interactions (see Figure 1a). The solvent exposed region of  $\alpha 4 / \alpha 4'$  is rich in basic residues, which are believed to form the putative RNA binding site [1,8,9,34,35]. Indeed, mutations in  $\alpha 4 / \alpha 4'$  dimer interface of DENVC affect both structural stability and protein-RNA interaction [36]. Although the 'asymmetric charge distribution model' is intuitive and, at the first glance, easily acceptable, an accurate analysis of the electrostatic surface potential by measuring long range potential by the Poisson-Boltzmann distribution of charges reveals that the protein is predominantly surrounded by positive charges, a feature shared by the C proteins of DENV, ZIKV, JEV and WNV (Figure 2). This means that, despite the specific residues' charges, which are asymmetrically distributed, the high number and the distribution of the positively charged residues contribute to the overall electrostatic surface potential. However, we believe that some charge asymmetry still exists, but it is tuned by the distance from the charge location. One example is the long-range effect of the charges located at the  $\alpha 4 / \alpha 4'$ . Their electrostatic potential affects the hydrophobic cleft, making it slightly positive, but not as positive as  $\alpha 4 / \alpha 4'$ . Since there is

scarce experimental information on the RNA binding site mapping, it is possible that the  $\alpha 4 / \alpha 4'$  is not the only site for RNA binding in the C protein. The role of  $\alpha 4 / \alpha 4'$  as the C protein RNA binding site was mostly supported by evaluating the effect of mutations introduced in this protein region [30,32]. However, the fact that RNA binding concomitantly elicits protein oligomerization makes the analysis of the separated processes troublesome. The same problem prevents the precise determination of the binding site by NMR. Moreover, the dynamic nature of RNA-protein interaction impairs the determination of the complex structure by X-ray crystallography.

At neutral pH, the dimer electrostatic surface map of DENVC and ZIKVC indicates a highly electropositive surface throughout the protein. Besides  $\alpha 4 / \alpha 4'$  (Figure 2a), all the other helices display positively charged surfaces, including the regions of the concave surface of the hydrophobic cleft (Figure 2b) and the lateral surface (Figure 2c). It is important to mention that the electrostatic surface potential results from a local contribution (each positive charge) summed to a longer-range contribution on the neighboring residues, so that it

Figure 2



Analysis of the electrostatic surface potential in crystal or solution for DENVC, ZIKVC, JEV and WNV, showing (a)  $\alpha 4 / \alpha 4'$ ; (b) the hydrophobic cleft; and (c) the side view. The values were calculated using the APBS software with the charge values and protonation states determined by PDB 2PQR server along with PROPKA program (pH 7.0, 200 mM NaCl, 25°C). The bar denotes the electrostatic potential range from  $-10$  (red) to  $+10$  kT (blue). (d) Alignment of primary sequence of DENVC, ZIKVC, JEV and WNV, depicting the (·) fully conserved residues; (:) conservation between groups of strongly similar properties (scoring >0.5); and (.) conservation between groups of weakly similar properties (scoring  $\leq 0.5$ ). The four helices are indicated at the top:  $\alpha 1$  and its correspondent sequence in each protein are represented by a hollow box; and  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , and  $\alpha 4$  are represented by blue boxes. The F++-h signature was highlighted in the sequences by a red box. Multiple sequence alignment was performed by CLUSTAL OMEGA [46] using sequence IDs CAA36004.1; YP\_009430296.1; NP\_775662.1; and YP\_001527878.1.

reflects the impact of the  $\alpha 4/\alpha 4'$  positive charges on the entire protein (Figure 2a), including the hydrophobic cleft (Figure 2b). Even when the electrostatic potential was calculated for the hydrophobic cleft of a DENVC mutant lacking the conserved Arg and Lys at  $\alpha 2$  (K45Q/R55Q), it remains electropositive (Figure S1 in Supplementary material).

There is a significant conservation of the charge distribution among the flaviviruses' C proteins. Figure 2d shows that the center of  $\alpha 4/\alpha 4'$  region has the sequence signature F++-h: F84 (F) connects  $\alpha 4/\alpha 4'$  with  $\alpha 2/\alpha 2'$ ; R85/K85 (+) and R86/K86 (+) confer the basic character of the helices; E87/D87 (-) contribute to the fold stability by participating in a conserved salt bridge; and I88/L88 (h) links  $\alpha 4$  with  $\alpha 4'$ . This signature region of  $\alpha 4/\alpha 4'$  contributes significantly for the electrostatic potential of the protein, behaving as a conserved potential region. Additionally, a set of interactions ( $\pi$ -stacking, salt bridges, and quaternary core) connects this region to the hydrophobic cleft, indicating that the binding of RNA to  $\alpha 4/\alpha 4'$  would transfer conformational information throughout the protein. DENVC and ZIKVC have 7 basic residues in  $\alpha 4$ , while JEV and WMN have 4, which justifies their lower electropositive potential when compared to DENVC and ZIKVC. In addition, the C terminal region of these proteins is positively charged (Figure 2d), contributing significantly to the positivity of the edges of  $\alpha 4/\alpha 4'$  region.

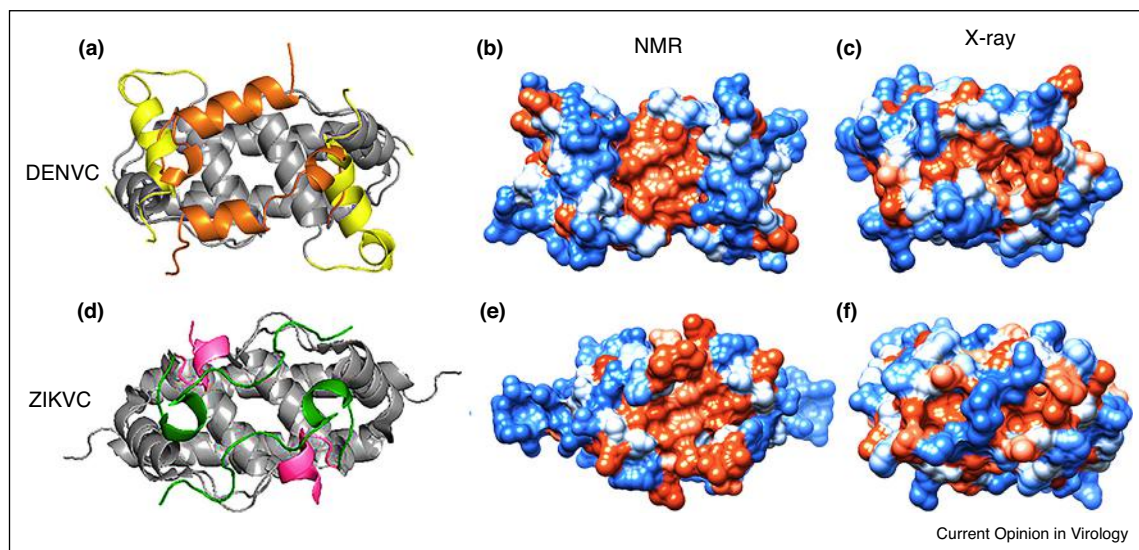
Finally, there is scarce information on the structural propensities of the N-terminal IDR. The conserved sequence motif NMLKR participates in the interaction with LDs in DENV and folds as a helix ( $\alpha 0$ ) in the presence of negatively charged lipid interfaces [37–39]. The IDR region is highly basic and thus also contribute to the positive electrostatic potential.

### Plasticity of $\alpha 1$ modulates interaction with cellular hydrophobic interfaces

DENVC, WNVC, ZIKVC and JEVC structures are particularly similar, forming highly superposable  $\alpha$ -helical homodimers (Figure S2 in Supplementary material), but their crystal and NMR solution structures showed important differences regarding the  $\alpha 1$  size, position and orientation (Figure 3a and d) [7–12]. These differences in  $\alpha 1$  impact in the following structural features: (i) the size of IDR (for example, ZIKVC have shorter  $\alpha 1$  and longer IDR); and (ii) the degree of the exposure of the hydrophobic cleft ( $\alpha 2/\alpha 2'$ ) to the solvent.

In solution, both DENVC and ZIKVC expose the hydrophobic cleft in different degrees, assuming an open conformation (Figure 3a and d) [8,10], which would facilitate protein interaction with intracellular hydrophobic surfaces [8,30,33]. However, when the same structures were solved by X-ray crystallography,  $\alpha 1$  partially occludes the hydrophobic cleft [7,9,11,12]. This partial occlusion also occurs for the crystal structures of WNVC

Figure 3



Position and orientation of  $\alpha 1$  and the exposed hydrophobic surface in DENVC and ZIKVC structures solved in solution or crystal environment. (a) Superposition of DENVC structures highlighting  $\alpha 1$  position and orientation in solution (yellow) and in crystal (orange). (b),(c) Surface hydrophobicity for whole DENVC (solution structure) and  $\Delta 1$ -20 DENVC (crystal structure), respectively. (d) Superposition of ZIKVC structures highlighting  $\alpha 1$  position and orientation in solution (pink) and crystal (green). (e),(f) Surface hydrophobicity for whole ZIKVC (solution structure) and  $\Delta 1$ -22 ZIKVC (crystal structure), respectively. The figures were prepared using UCSF Chimera and the molecular surfaces were colored according to their hydrophobicity with blue, white and orange for the most hydrophilic, neutral and hydrophobic surface, respectively.

and JEV C, where the  $\alpha 1/\alpha 1'$  cover the  $\alpha 2/\alpha 2'$  surface [11,12]. If in one hand the differences observed for the structures in solution and in crystal seem contradictory, on the other hand they reveal the plasticity of  $\alpha 1$  and its susceptibility to changes in protein environment, which would include the recognition of hydrophobic surfaces. Indeed, the mobility of  $\alpha 1$  and the dynamic nature of its structure was also shown for ZIKV C in solution by nuclear spin relaxation measurements [10].

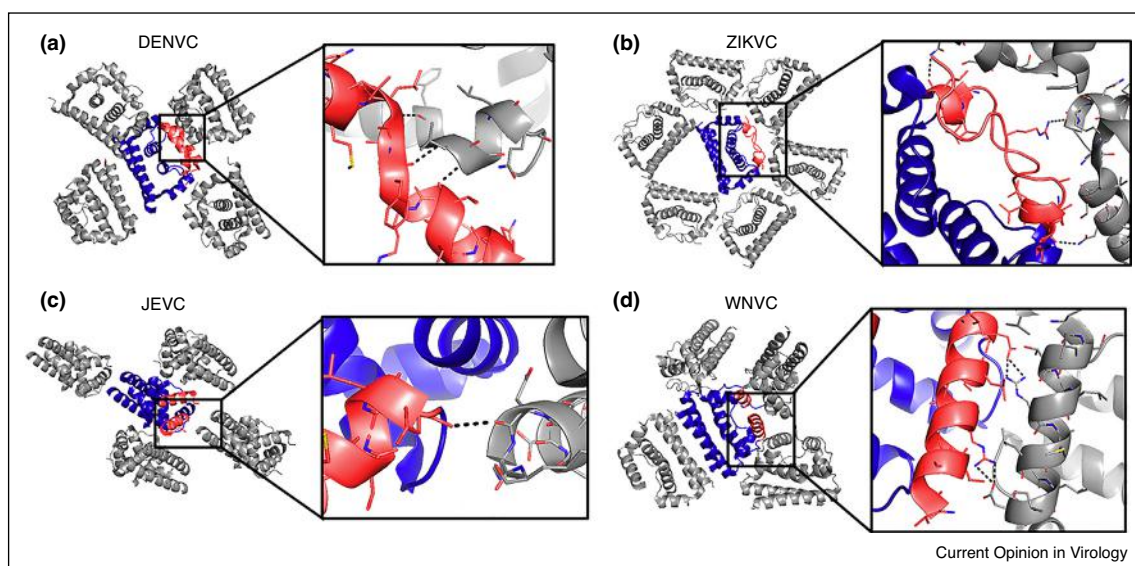
It is noteworthy that the molecular surface area of the structures solved in solution and in crystal are similar. Nevertheless, the solvent accessible area is significantly higher in solution than in the crystal environment, reflecting a more open conformational state in solution: for DENVC, 8.6 nm<sup>2</sup> for crystal and 9.5 nm<sup>2</sup> for solution, considering the range from V23 to R98 for both; and for ZIKVC, 7.1 nm<sup>2</sup> for crystal and 7.6 nm<sup>2</sup> for solution, considering the range from A35 to R98 for both.

The interaction between C proteins and the host lipid interfaces, especially those from the endoplasmic reticulum and LDs, is well documented for DENVC [33,37,40–42], and recently has also been shown for ZIKVC, WNVC and JEV C [9,43–45]. Different studies have shown the importance of  $\alpha 2/\alpha 2'$  residues of the hydrophobic core for this interaction to occur [9,33,34]. In this context,  $\alpha 1$  mobility mediates the opened-closed C protein conformational equilibrium, modulating protein interaction with hydrophobic intracellular surfaces, which might be

necessary for NC assembly. This discussion is especially interesting for ZIKVC, because the presence of a longer IDR and a shorter  $\alpha 1$  seems to have consequences on the hydrophobicity of the protein (Figure 3e and f), and, consequently, to its interaction with membranes [9]. Additionally, mutations in hydrophobic or positively charged residues present in the IDR lead to the loss of the protein ability to accumulate in LDs, suggesting the importance of these residues in the association of ZIKVC with intracellular hydrophobic interfaces [9].

The environment used to solve the structures (solution or crystal) can also reflect on the exposed hydrophobic surface of C proteins, as seen for DENVC (Figure 3b and c) and ZIKVC (Figure 3e and f). For both proteins in solution the hydrophobic cleft is exposed (Figure 3b and e), while in the crystal it becomes occluded (Figure 3c and f). The partial occlusion of the hydrophobic cleft and the decrease in hydrophobicity observed for the crystal structures of DENVC and ZIKVC may be explained by the existence of crystal contacts in these structures (Figure 4a and b), which alter  $\alpha 1$  microenvironment to a more compact structure. The  $\alpha 1$  of DENVC and ZIKVC makes three crystal contacts with the adjacent symmetry (Figure 4a and b). Interestingly, for ZIKVC two of these contacts occur directly on  $\alpha 1$  while a third contact involves the region of the pre- $\alpha 1$  (Figure 4b). For JEV C, there is only one crystal contact that occurs in the last residue of  $\alpha 1$  (Figure 4c) and for WNVC there are two crystal contacts (Figure 4d).

Figure 4



Crystal contacts observed in C proteins. **(a)** Crystal structure of DENVC, highlighting  $\alpha 1$  (red) and its crystal contacts with the adjacent symmetry involving  $\alpha 1$ . **(b)** Crystal structure of ZIKVC, highlighting  $\alpha 1$  (red) and its crystal contacts: two occurring directly on  $\alpha 1$  and a third in the region of the pre- $\alpha 1$ . **(c)** Crystal structure of JEV C, highlighting  $\alpha 1$  (red) and its crystal contacts involving the last residue of  $\alpha 1$ . **(d)** Crystal structure of WNVC, highlighting  $\alpha 1$  (red) and its crystal contacts. The dashed lines show the polar contacts in black. The adjacent symmetries are shown in gray.

It would be interesting to resolve JEVC and WNVC in solution to confirm the hypothesis that the crystal contacts shift the equilibrium to more compact, close conformation. This would support that solution structures shift the conformational equilibrium to the open state, reinforcing the role of the mobility in  $\alpha 1/\alpha 1'$  in conferring to the protein the plasticity required for the molecular recognition in the biological relevant processes such as binding to hydrophobic interfaces and assembly of the NC.

## Conclusion

Proteins involved in interaction with nucleic acids, as the flaviviruses' C proteins, share a highly basic character. The determination of the atomic-resolution structures of DENVC, WNVC, JEVC and ZIKVC revealed additional peculiar features with potential impact in protein structure-function relationship. First, the unusual predominance of quaternary contacts makes flaviviruses' C proteins to occur exclusively as dimers. Second, the highly electropositive surface throughout the protein might enable molecular recognition events beyond the electrostatic interactions mediated by highly positively charged  $\alpha 4/\alpha 4'$  region. Finally, the plasticity conferred by  $\alpha 1$  flexibility might accurately regulate protein binding to intracellular hydrophobic interfaces, controlling essential events of the viral replication cycle.

## Conflict of interest statement

Nothing declared.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.02.005>.

## Acknowledgements

This work was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil [grant numbers 202.945/2017, 204.432/2014 and 239.229/2018], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil [grant numbers: 309028/2017-5 and 439306/2018-3] and la Caixa Bank Foundation, Spain [grant number: LCF/PR/HR17/52150011].

## References

- Requião RD, Carneiro RL, Moreira MH, Ribeiro-Alves M, Rossetto S, Palhano FL, Domitrovic T: **Viruses with different genome types adopt a similar strategy to pack nucleic acids based on positively charged protein domains.** *Sci Rep* 2020, **10**:5470.
- Freire JM, Veiga AS, Conceição TM, Kowalczyk W, Mohana-Borges R, Andreu D, Santos NC, da Poian AT, Castanho MARB: **Intracellular nucleic acid delivery by the supercharged dengue virus capsid protein.** *PLoS One* 2013, **8**:e81450.
- Baltimore David: **Expression of animal virus genomes.** *Bacterial Rev* 1971, **35**:235.
- Abrescia NGA, Bamford DH, Grimes JM, Stuart DI: **Structure unifies the viral universe.** *Annu Rev Biochem* 2012, **81**:795-822.
- Nasir A, Caetano-Anollés G: **Identification of capsid/coat related protein folds and their utility for virus classification.** *Front Microbiol* 2017, **8**:380.
- Krupovic M, Koonin EV: **Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, **114**:E2401-E2410.
- Xia H, Xie X, Zou J, Noble CG, Russell WK, Holthausen LMF, Choi KH, White MA, Shi P-Y: **A cocrystal structure of dengue capsid protein in complex of inhibitor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020, **117**:17992-18001.
- Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB: **Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:3414-3419.
- Shang Z, Song H, Shi Y, Qi J, Gao GF: **Crystal structure of the capsid protein from zika virus.** *J Mol Biol* 2018, **430**:948-962.
- Morando MA, Barbosa GM, Cruz-Oliveira C, da Poian AT, Almeida FCL: **Dynamics of zika virus capsid protein in solution: the properties and exposure of the hydrophobic cleft are controlled by the  $\alpha$ -helix 1 sequence.** *Biochemistry* 2019, **58**:2488-2498.
- Dokland T, Walsh M, Mackenzie JM, Khromykh AA, Ee KH, Wang S: **West Nile virus core protein: tetramer structure and ribbon formation.** *Structure* 2004, **12**:1157-1163.
- Poonsiri T, Wright GSA, Solomon T, Antonyuk SV: **Crystal structure of the Japanese encephalitis virus capsid protein.** *Viruses* 2019, **11**:623.
- Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ: **Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein.** *J Virol* 2003, **77**:7143-7149.
- Bhuvanankantham R, Ng ML: **Analysis of self-association of West Nile virus capsid protein and the crucial role played by Trp 69 in homodimerization.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **329**:246-255.
- Tellinghuisen TL, Hamburger AE, Fisher BR, Ostendorp R, Kuhn RJ: **In vitro assembly of alphavirus cores by using nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*.** *J Virol* 1999, **73**:5309-5319.
- Tellinghuisen TL, Kuhn RJ: **Nucleic acid-dependent cross-linking of the nucleocapsid protein of sindbis virus.** *J Virol* 2000, **74**:4302-4309.
- Dokland T: **Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly.** *Structure* 2000, **8**:157-162.
- Jayaraman B, Smith AM, Fernandes JD, Frankel AD: **Oligomeric viral proteins: small in size, large in presence.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2016, **51**:379-394.
- Perlmutter JD, Hagan MF: **Mechanisms of virus assembly.** *Annu Rev Phys Chem* 2015, **66**.
- Zhan C, Zhao L, Chen X, Lu WY, Lu W: **Total chemical synthesis of dengue 2 virus capsid protein via native chemical ligation: role of the conserved salt-bridge.** *Bioorg Med Chem* 2013, **21**:3443-3449.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG *et al.*: **Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion.** *Cell* 2002, **108**:717-725.
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ: **Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus.** *Nat Struct Biol* 2003, **10**:907-912.
- Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG: **Structures of immature flavivirus particles.** *EMBO J* 2003, **22**:2604-2613.
- Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, Schein S, Hong Zhou Z: **Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution.** *Nat Struct Mol Biol* 2013, **20**:105-110.
- Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ: **Structure of West Nile virus.** *Science* 2003, **302**:248.

26. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, Kuhn RJ: **The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus.** *Science* 2016, **352**:467-470.
27. Wang X, Li SH, Zhu L, Nian QG, Yuan S, Gao Q, Hu Z, Ye Q, Li XF, Xie DY *et al.*: **Near-atomic structure of Japanese encephalitis virus reveals critical determinants of virulence and stability.** *Nat Commun* 2017, **8**:1-9.
28. Zhang Y, Kaufmann B, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG: **Structure of Immature West Nile virus.** *J Virol* 2007, **81**:6141-6145.
29. Prasad VM, Miller AS, Klose T, Sirohi D, Buda G, Jiang W, Kuhn RJ, Rossmann MG: **Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution.** *Nat Struct Mol Biol* 2017, **24**:184-186.
30. Byk LA, Gamarnik AV: **Properties and functions of the dengue virus capsid protein.** *Annu Rev Virol* 2016, **3**:263-281.
31. Tan TY, Fibriansah G, Lok SM: **Capsid protein is central to the birth of flavivirus particles.** *PLoS Pathog* 2020, **16**:e1008542.
32. Sotcheff S, Routh A: **Understanding flavivirus capsid protein functions: the tip of the iceberg.** *Pathogens* 2020, **9**:42.
33. Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV: **Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000632.
34. Teoh P-G, Huang Z-S, Pong W-L, Chen P-C, Wu H-N: **Maintenance of dimer conformation by the dengue virus core protein  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  helix pair is critical for nucleocapsid formation and virus production.** *J Virol* 2014, **88**:7998-8015.
35. Li T, Zhao Q, Yang X, Chen C, Yang K, Wu C, Zhang T, Duan Y, Xue X, Mi K *et al.*: **Structural insight into the Zika virus capsid encapsulating the viral genome.** *Cell Res* 2018, **28**:497-499.
36. Figueira-Mansur J, Aguilera EA, Stoque RM, Ventura GT, Mohana-Borges R: **Mutations in the dimer interfaces of the dengue virus capsid protein affect structural stability and impair RNA-capsid interaction.** *Sci Rep* 2019, **9**:1-14.
37. Martins IC, Gomes-Neto F, Faustino AF, Carvalho FA, Carneiro FA, Bozza PT, Mohana-Borges R, Castanho MARB, Almeida FCL, Santos NC *et al.*: **The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif.** *Biochem J* 2012, **444**:405-415.
38. Faustino AF, Guerra GM, Huber RG, Hollmann A, Domingues MM, Barbosa GM, Enguita FJ, Bond PJ, Castanho MARB, da Poian AT *et al.*: **Understanding dengue virus capsid protein disordered N-terminus and pep14-23-based inhibition.** *ACS Chem Biol* 2015, **10**:517-526.
39. Boon PLS, Saw WG, Lim XX, Raghuvamsi PV, Huber RG, Marzinek JK, Holdbrook DA, Anand GS, Grüber G, Bond PJ: **Partial intrinsic disorder governs the dengue capsid protein conformational ensemble.** *ACS Chem Biol* 2018, **13**:1621-1630.
40. Faustino AF, Carvalho FA, Martins IC, Castanho MARB, Mohana-Borges R, Almeida FCL, da Poian AT, Santos NC: **Dengue virus capsid protein interacts specifically with very low-density lipoproteins.** *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2014, **10**:247-255.
41. Carvalho FA, Carneiro FA, Martins IC, Assuncao-Miranda I, Faustino AF, Pereira RM, Bozza PT, Castanho MARB, Mohana-Borges R, da Poian AT *et al.*: **Dengue virus capsid protein binding to hepatic lipid droplets (LD) is potassium ion dependent and is mediated by LD surface proteins.** *J Virol* 2012, **86**:2096-2108.
42. Faustino AF, Martins IC, Carvalho FA, Castanho MARB, Maurer-Stroh S, Santos NC: **Understanding dengue virus capsid protein interaction with key biological targets.** *Sci Rep* 2015, **5**:1-13.
43. Martins AS, Carvalho FA, Faustino AF, Martins IC, Santos NC: **West Nile virus capsid protein interacts with biologically relevant host lipid systems.** *Front Cell Infect Microbiol* 2019, **9**:8.
44. Ishida K, Goto S, Ishimura M, Amanuma M, Hara Y, Suzuki R, Katoh K, Morita E: **Functional correlation between subcellular localizations of Japanese encephalitis virus capsid protein and virus production.** *J Virol* 2019, **93**:e00612-e00619.
45. Saumya KU, Kumar D, Kumar P, Giri R: **Unlike dengue virus, the conserved 14-23 residues in N-terminal region of Zika virus capsid is not involved in lipid interactions.** *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2020, **1862**:183440.
46. Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato S, Park YM, Buso N, Lopez R: **The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**:580-584.

ANEXO III: Artigo relacionado à tese, fruto de uma colaboração direta. Submetido na revista iScience (2022), em processo de revisão: “Neutralization of a positively charged spot and restriction of  $\alpha$ 4-helix motion in 2 dengue virus capsid protein trigger the empty capsids self-assembly”.

1        **Neutralization of a positively charged spot and restriction of  $\alpha$ 4-helix motion in**  
2                    **dengue virus capsid protein trigger the empty capsids self-assembly**

3

4        Thais C. Neves-Martins<sup>1</sup>, Nathane C. Mebus-Antunes<sup>1</sup>, Carlos H. G. Neto<sup>1</sup>, Glauce M.  
5        Barbosa<sup>1</sup>, Fabio C. L. Almeida<sup>1,2\*</sup>, Icaro P. Caruso<sup>2,3\*</sup> and Andrea T. Da Poian<sup>1\*</sup>

6

7        <sup>1</sup> Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de  
8        Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

9

10        <sup>2</sup> Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem, Universidade Federal do Rio de  
11        Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

12

13        <sup>3</sup> Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular e Departamento de Física, Instituto de  
14        Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual de São Paulo, 15054-000,  
15        São José do Rio Preto, SP, Brazil.

16

17        \*Correspondence: Andrea T. Da Poian (dapoian@bioqmed.ufrj.br), Icaro P. Caruso  
18        (icaro.caruso@unesp.br), Fabio C. L. Almeida (falmeida@bioqmed.ufrj.br)

19

20

21 **SUMMARY**

22 Nucleocapsid (NC) assembly is an essential step of virus replication cycle. It ensures  
23 genome protection and transmission among hosts. Flaviviruses are human viruses for  
24 which envelope structure is well known, whereas no information on NC organization is  
25 available. Here we designed a dengue virus capsid protein (DENVC) mutant in which a  
26 highly positive spot conferred by arginine 85 in  $\alpha 4$ -helix was replaced by a cysteine  
27 residue, simultaneously removing the positive charge and restricting the intermolecular  
28 motion through the formation of a disulfide cross-link. We showed that the mutant self-  
29 assembles into capsids in solution without nucleic acids. Using biophysical techniques,  
30 we investigated capsid assembly thermodynamics, showing that an efficient assembly is  
31 related to an increased DENVC stability due to  $\alpha 4/\alpha 4'$  motion restriction. To our  
32 knowledge, this is the first time that flaviviruses' empty capsid assembly is obtained in  
33 solution, revealing the R85C mutant as a powerful tool to understand NC assembly  
34 mechanism.

35

36



## 37 INTRODUCTION

38 One of the main challenges that viruses face to be perpetuated in nature is to  
39 maintain their genome tightly protected while outside the host cell, but turn it promptly  
40 exposed after reaching the cellular environment where virus replication occurs. Capsid  
41 proteins are the viral components responsible for ensuring this task is properly performed.  
42 For most icosahedral viruses, capsid proteins contain amino acid stretches with highly  
43 positive net charges that are compatible with the charges required to neutralize a nucleic  
44 acid with the size of the respective virus genome (Requião *et al.*, 2020). This supports the  
45 hypothesis that charge neutralization due to electrostatic interactions between those  
46 capsid protein segments and the viral genome are the driving force for viral nucleocapsid  
47 assembly and stability. In this context, of particular interest are the flaviviruses' capsid  
48 proteins, which, among all viruses' capsid proteins, show the highest net  
49 charge:molecular mass ratio (Freire *et al.*, 2013). Although for these viruses the  
50 hypothesis of charge neutralization as the mechanism of capsid assembly is plausible,  
51 information on the flaviviruses' nucleocapsid (NC) assembly is still very scarce (Sotcheff  
52 and Routh, 2020; Tan, Fibriansah and Lok, 2020).

53 The *Flaviviridae* family comprise important human pathogens, including dengue  
54 virus (DENV), Zika virus (ZIKV), West Nile virus (WNV), yellow fever virus (YFV),  
55 Japanese encephalitis virus (JEV) and Tick-born encephalitis virus (TBEV). DENV  
56 infection is a major public health problem worldwide, causing a broad spectrum of  
57 clinical manifestations, from mild symptoms to a severe hypovolemic shock that can be  
58 fatal, with 400 million people estimated to be infected every year (Pierson and Diamond,  
59 2020). DENV is an enveloped spherical particle of 50 nm diameter. In the viral envelope,  
60 two structural proteins associate with the lipid bilayer with icosahedral symmetry, the  
61 envelope (E) and the membrane (M) proteins. Inside the shell, the viral genome, a

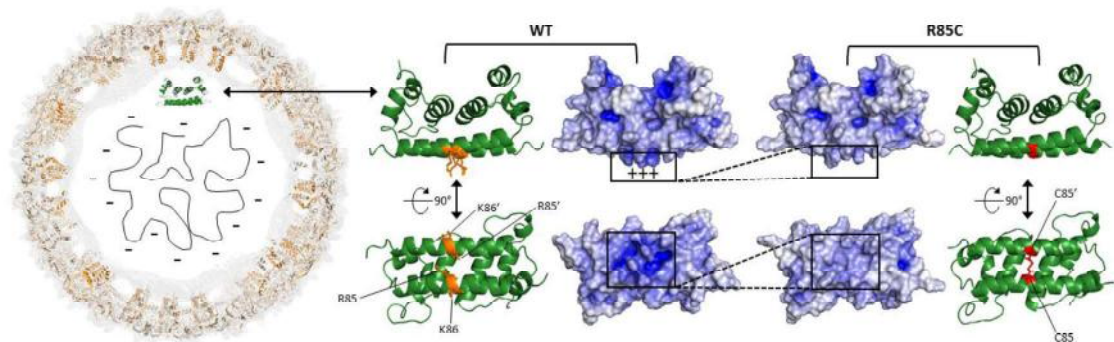
62 positive-sense single-stranded RNA molecule, is packaged by multiple copies of a single  
63 protein, the capsid (C) protein.

64 A number of cryo-EM studies of mature and immature flaviviruses' particles  
65 showed structural details of the organization of E and M proteins on the virus surface  
66 (Kuhn *et al.*, 2002; Y. Zhang *et al.*, 2003; Kostyuchenko *et al.*, 2013, 2014; Zhang *et al.*,  
67 2013; Prasad *et al.*, 2017; Kondylis *et al.*, 2019). However, no information could be  
68 obtained for the NC structure of the mature particles, suggesting either a lack of symmetry  
69 between NC and M and E external shell or a poorly ordered NC structure (Kuhn *et al.*,  
70 2002; Zhang *et al.*, 2013; Kondylis *et al.*, 2019). Another explanation for the low densities  
71 observed in the core of DENV particles would be a highly dynamic behaviour of DENVC  
72 itself, even when forming the NC (Bruinsma, Wuite and Roos, 2021). Interestingly, in  
73 cryo-EM images of the immature particles of ZIKV, a residual density compatible with  
74 the dimeric capsid protein was observed in contact with the transmembrane domains of  
75 the E and M proteins (Prasad *et al.*, 2017). This suggested that C interaction with E and  
76 M proteins was necessary for the initial steps of NC assembly but are lost after virion  
77 maturation.

78 DENVC forms homodimers in solution, with each polypeptide chain containing a  
79 N-terminal intrinsically disordered region (IDR) followed by 4  $\alpha$ -helices connected by  
80 short loops (Jones *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004). As observed for the other flaviviruses' C  
81 proteins, DENVC shows unique structural features, such as the predominance of  
82 quaternary contacts between  $\alpha 2/\alpha 2'$  and  $\alpha 4/\alpha 4'$  maintaining the dimeric structure, a  
83 highly electropositive surface throughout the protein, and flexible  $\alpha 1$  helices (Neves-  
84 Martins *et al.*, 2021). Recent work by our group showed that the *in vitro* assembly of  
85 DENV nucleocapsid-like particles (NCLPs) requires the neutralization of C protein  
86 positive charges through interaction with either size-specific nucleic acids or negatively

87 charged surfaces (Mebus-Antunes et al., 2022). Based on structural analysis of the  
88 electropositive DENVC surface, we hypothesized that a highly positive spot conferred by  
89 arginine 85 (R85) and lysine 86 (K86) residues in DENVC  $\alpha$ 4-helix would be the first  
90 point neutralized by RNA binding, triggering NCLP assembly.

91 To validate this hypothesis, we designed a mutant in which DENVC R85 was  
92 replaced by a cysteine residue (R85C mutant). The rationale behind this mutation is that  
93 it would vanish the  $\alpha$ 4/ $\alpha$ 4' positive spot (Figure 1), as well as restrict the  $\alpha$ 4/ $\alpha$ 4'  
94 intermolecular motion due to the formation of a disulfide cross-link between  $\alpha$ 4 and  $\alpha$ 4'.  
95 Here we show by dynamic light scattering and transmission electron microscopy imaging  
96 that DENVC R85C self-assembles in nucleocapsid-like particles (NCLPs) in solution, in  
97 the absence of nucleic acids, corroborating our hypothesis. Additionally, to gain insights  
98 into the thermodynamics of DENVC/NCLPs dissociation/denaturation process, we  
99 performed differential scanning calorimetry, circular dichroism, and fluorescence  
100 spectroscopy experiments. We found that limiting  $\alpha$ 4/ $\alpha$ 4' motion increases DENVC  
101 stability, which could be associated with a more efficient NCLP assembly. In summary,  
102 this is the first study establishing an efficient *in vitro* self-assembly of DENVC in solution  
103 in the absence of nucleic acids, revealing the R85C mutant as a powerful tool to  
104 understand DENV NC assembly mechanism.



105

106 **Figure 1. DENVC R85C mutant and the rationale of NCLP *in vitro* assembly**  
107 **hypothesis.** (*Left*) Proposed orientation of DENVC in the viral structure: external density  
108 map (light gray) of the cryo-EM structure of mature DENV2 (PDB ID: 3J27),  
109 highlighting the position of E (beige) and M (orange) proteins. DENVC (green; PDB ID:  
110 1R6R) is represented in its hypothetical position in the virion. (*Right*) Ribbon structure  
111 and electrostatic potential surface of DENVC wild-type (WT) and R85C mutant proteins  
112 in two different orientations. The structures were generated with PyMol using mutation  
113 insertion in PDB ID 1R6R, with red sticks highlighting the disulfide bond. The  
114 electrostatic potential values were calculated in APBS software with the protonation  
115 states and charge values determined by the PDB2PQR server along with PROPKA  
116 program (pH 7.0, 200 mM NaCl, 25°C). The electrostatic potential ranges from -10 (red)  
117 to +10 kT (blue). Note that the highly positive spot in  $\alpha 4/\alpha 4'$  is vanished in R85C mutant.

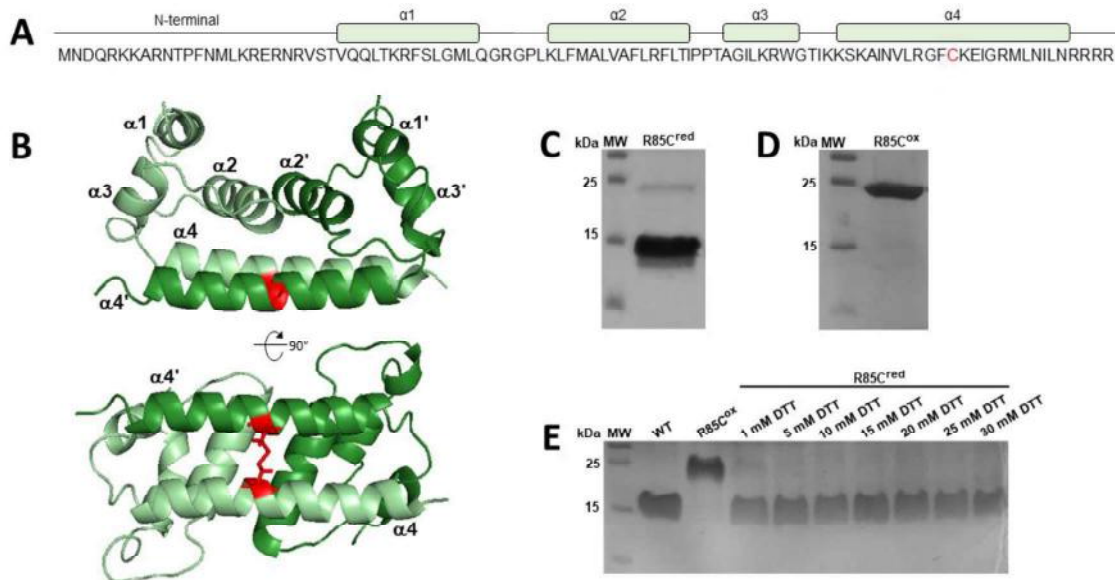
118

## 119 **RESULTS**

### 120 **DENVC R85C mutant**

121 R85C is a DENVC mutant in which the arginine at position 85 in  $\alpha 4$ -helix was replaced  
122 by a cysteine residue (Figure 2A), removing the highly positive spot in the center region  
123 of the  $\alpha 4/\alpha 4'$  helices' (see Figure 1). Additionally, the mutation allows the introduction  
124 of an interchain disulfide bond, linking covalently DENVC monomers (Figure 2B) and  
125 restricting the  $\alpha 4/\alpha 4'$  helices' motion. To ensure the formation of the correct disulfide  
126 bond in the mutant protein, two steps during the protein purification protocol were  
127 necessary: (i) obtaining the purified protein as a non-covalent dimer (reduced R85C,  
128 R85C<sup>red</sup>) by using the reducing agent DTT in all steps of the purification protocol; and  
129 (ii) oxidizing the reduced protein with diamide to promote the disulfide bond formation  
130 (R85C<sup>ox</sup>). The analysis of the protein sample obtained after the first purification step in a  
131 non-reducing SDS-PAGE showed the major presence of R85C<sup>red</sup> (~ 12 kDa) and traces  
132 of R85C<sup>ox</sup>, which runs with the molecular mass of the dimer (~ 25 kDa) (Figure 2C).

133 After incubation with 3 mM diamide, only the band corresponding to R85C<sup>ox</sup> was  
 134 observed, indicating that all the protein was converted into covalently linked dimers  
 135 (Figure 2D). To ensure the efficiency of the covalent dimer formation, we incubated  
 136 R85C<sup>ox</sup> with DTNB to evaluate the presence of remaining free thiol groups by the  
 137 appearance of TNB<sup>-2</sup> signal at 412 nm (Riener, Kada and Gruber, 2002). The absence of  
 138 a 412 nm band confirmed the complete formation of the disulfide bonds (data not shown).  
 139 To return the protein to its reduced form, we titrated R85C<sup>ox</sup> with DTT, establishing that  
 140 the incubation of the protein with 15 mM DTT is the best condition to obtain the fully  
 141 reduced R85C (Figure 2E).



142

143 **Figure 2. Recombinant DENVC R85C mutant in the oxidized (R85C<sup>ox</sup>) and reduced**  
 144 **(R85C<sup>red</sup>) forms.** (A) Amino acid sequence (residues 1-100) of R85C mutant  
 145 highlighting the cysteine residue at position 85 (red). The four helices are indicated in  
 146 boxes at the top. (B) R85C ribbon structure is shown in two orientations, with the  
 147 cysteines colored in red, and the disulfide bond shown with sticks. The structure was  
 148 generated with PyMol introducing the mutation in PDB ID 1R6R. The monomers are  
 149 differentiated in light and dark green. (C) Representative non-reduction SDS-PAGE of  
 150 the sample after the first step of purification. The ~ 12 kDa band corresponds to the  
 151 monomer, indicating that most of the sample consists of a non-covalent R85C dimer. The

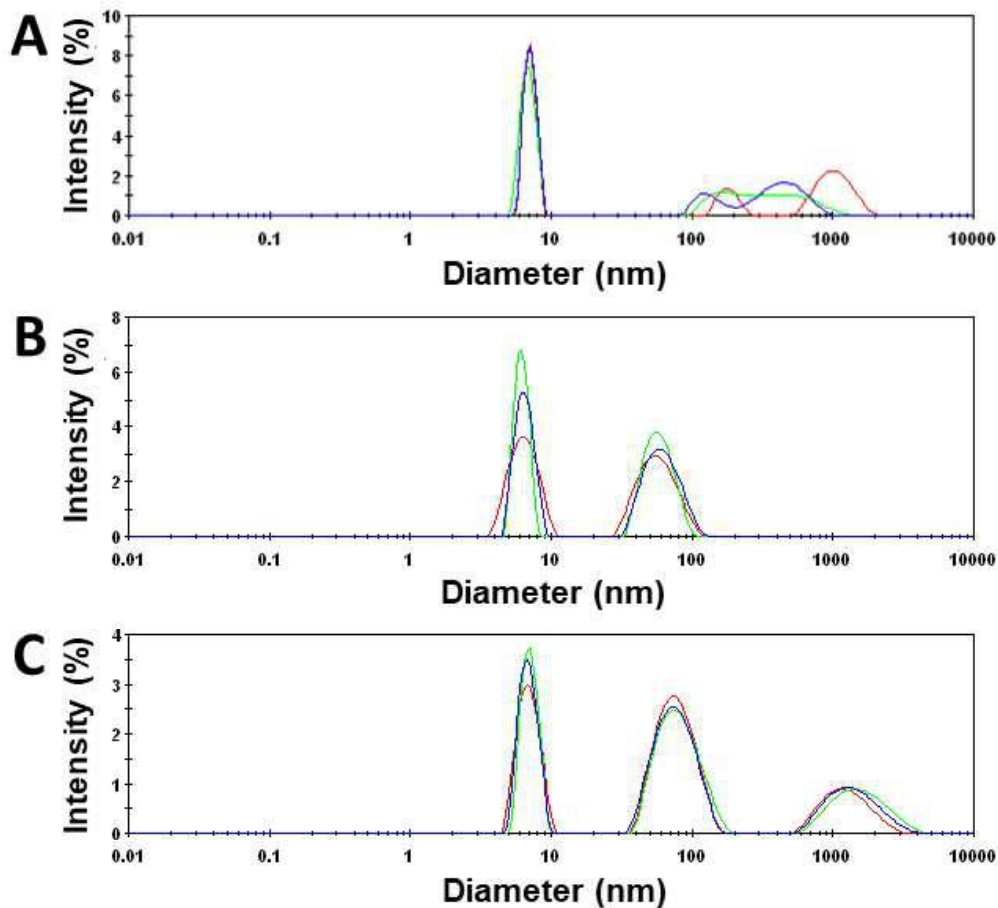
152 ~ 25 kDa band is compatible with the dimeric form of the protein, corresponding to a  
153 R85C dimer linked through a disulfide bond. MW - molecular weight standards. (D)  
154 Representative non-reduction SDS-PAGE of the sample after the second purification step  
155 showing a single band of ~ 25 kDa, corresponding to the covalent dimer R85C<sup>ox</sup>. (E) DTT  
156 concentration necessary for the complete reduction of R85C<sup>ox</sup>. Representative non-  
157 reduction SDS-PAGE of the samples after incubation with the indicated concentrations  
158 of DTT for 40 min.

159

### 160 **R85C assembles in large and homogeneous oligomeric particles in solution**

161 To evaluate whether R85C mutant spontaneously self-assembles in NCLPs, we  
162 performed DLS experiments (Figure 3). The size distribution profile obtained for  
163 DENVC WT, R85C<sup>ox</sup>, and R85C<sup>red</sup> showed a well-defined population with hydrodynamic  
164 diameters of  $7.0 \pm 0.1$  nm,  $6.4 \pm 0.2$  nm, and  $7.0 \pm 0.1$  nm, respectively. This is compatible  
165 with the calculated hydrodynamic diameter for the globular region (~ 4 nm, using the  
166 software HYDROPRO; Ortega et al., 2011), being the difference of 3 nm possibly due to  
167 the intrinsically disordered N-terminal tails. The slightly more compact size observed for  
168 R85C<sup>ox</sup> could be explained by the motion restriction caused by the disulfide bond. For  
169 the WT protein, we also observed a poorly defined population with hydrodynamic  
170 diameters ranging from ~ 100 to ~ 1500 nm, suggesting the presence of high molecular  
171 weight aggregates (Figure 3A). In contrast, for R85C<sup>ox</sup>, a second well-defined population  
172 with a hydrodynamic diameter of  $60 \pm 2$  nm was observed (Figure 3B). Different from  
173 the heterogeneous aggregates observed for the WT protein, the average size, the  
174 distribution profile, and the reproducibility of this population support our hypothesis that  
175 the mutant self-assembles *in vitro*, generating homogeneous oligomers compatible with  
176 NCLPs. For R85C<sup>red</sup>, the second population (hydrodynamic diameter of  $80 \pm 3$  nm) also  
177 indicates NCLPs formation (Figure 3C). Additionally, a third population with a

178 hydrodynamic diameter of  $1459 \pm 169$  nm was also seen. It is interesting to note that the  
179 formation of R85C<sup>red</sup> NCLPs suggests that neutralizing R85 charge is sufficient to drive  
180 capsid self-assembly.



181

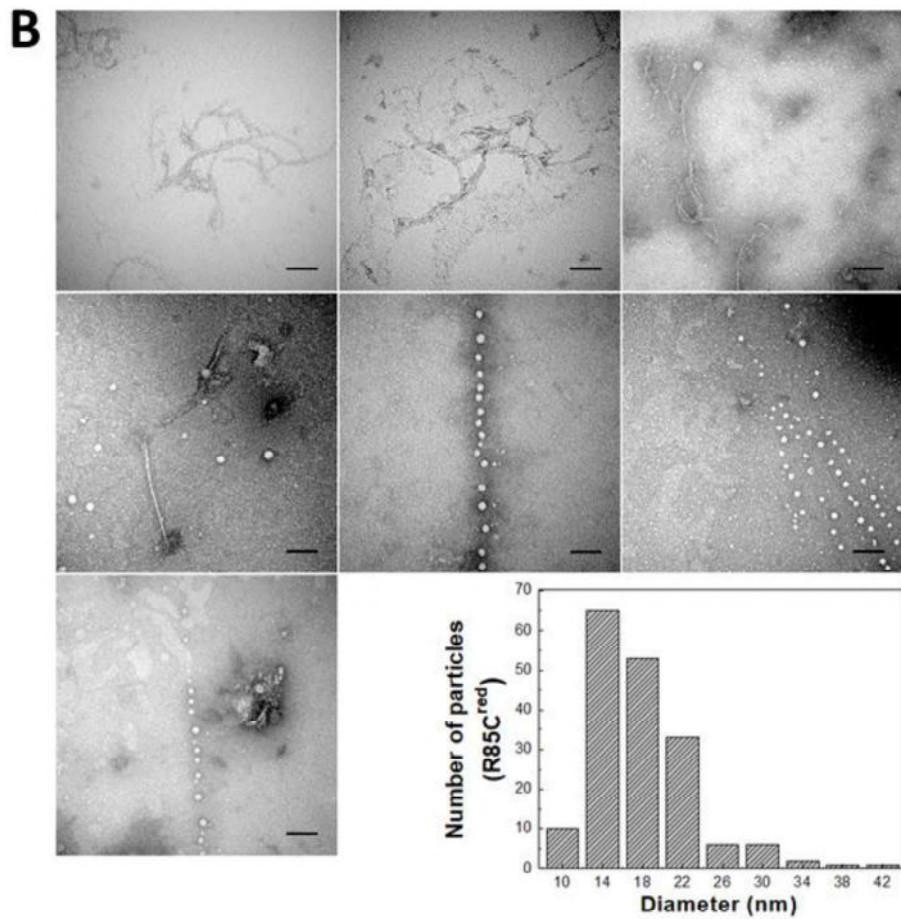
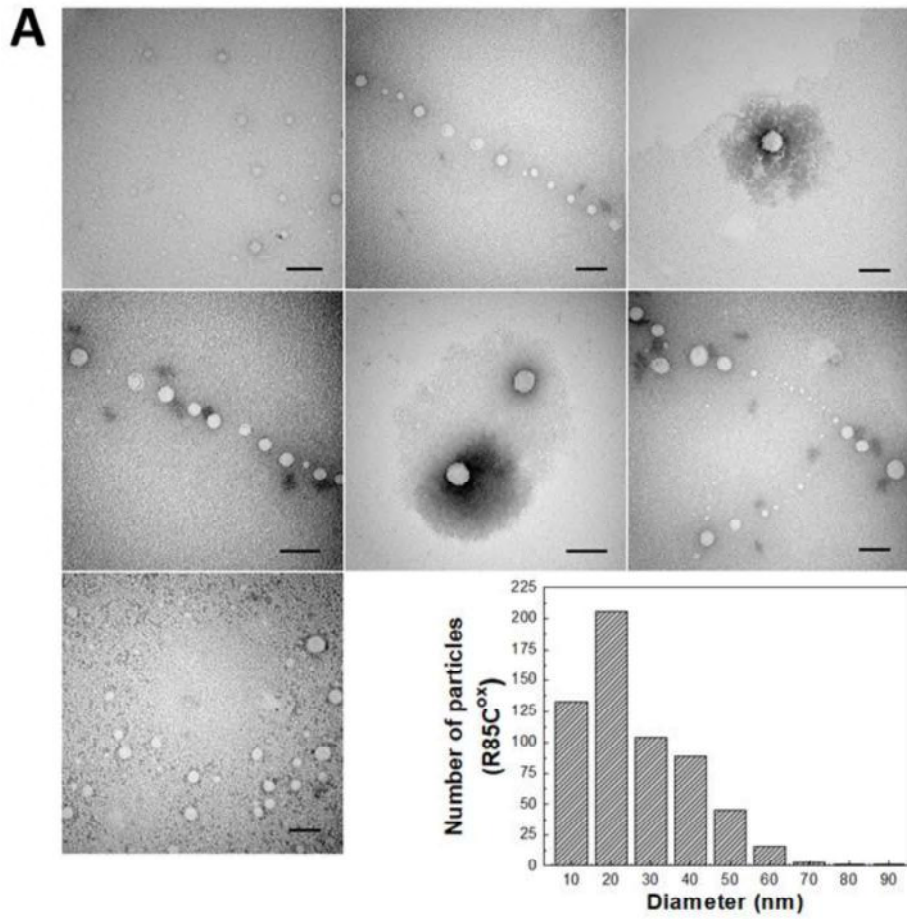
182 **Figure 3. Size distribution profiles of DENVC WT and R85C mutant in oxidized and**  
183 **reduced forms in solution.** Hydrodynamic diameter distribution of (A) WT; (B) R85C<sup>ox</sup>;  
184 and (C) R85C<sup>red</sup> proteins. DLS measurements were performed using proteins at a 200  $\mu$ M  
185 concentration in 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4) containing 200 mM NaCl. The results  
186 are represented as average values from 30 scans by experiment. The colored lines (blue,  
187 red, and green) represent replicates.

188

189 **R85C self-assembles in regular NCLPs**

190 To obtain additional information on R85C self-assembled oligomers, we carried out TEM  
191 imaging experiments. We observed the formation of well-defined structures, compatible  
192 with the size and shape expected for NCLPs, with an average Feret's diameter of  $26 \pm 14$   
193 nm (Figure 4A). This result further supports our hypothesis that the neutralization of R85  
194 positive charge in the DENVC due to RNA binding triggers DENVC NC assembly. In  
195 agreement with DLS results, R85C<sup>red</sup> also formed NCLPs, with an average Feret's  
196 diameter of  $18 \pm 5$  nm, with heterogeneous filamentous structures were also seen (Figure  
197 4B).





199 **Figure 4. TEM images of self-assembled R85C.** *In vitro* assembly reaction was  
200 performed by keeping the proteins at 5 nM concentration in 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH  
201 7.4), 300 mM NaCl, and 5 mM EDTA, for 1 h, at room temperature. Then, samples were  
202 applied to the grids, washed, and stained with 0.5% PTA. (A) Representative images of  
203 R85C<sup>ox</sup> and frequency distribution of particle diameters R85C<sup>ox</sup> NCLPs. The average  
204 diameter of particles (n = 598) was 26 ± 14 nm. (B) Representative images of R85C<sup>red</sup>  
205 and frequency distribution of particle diameters R85C<sup>red</sup> NCLPs. The average diameter  
206 of particles (n = 177) was 18 ± 5 nm. Shown are representative images from independent  
207 experiments, and all scale bars represent 100 nm. Particles' counting and Feret's diameter  
208 measurements were performed using ImageJ software.

209

#### 210 **Thermodynamics and structural stability of DENVC WT and R85C mutant**

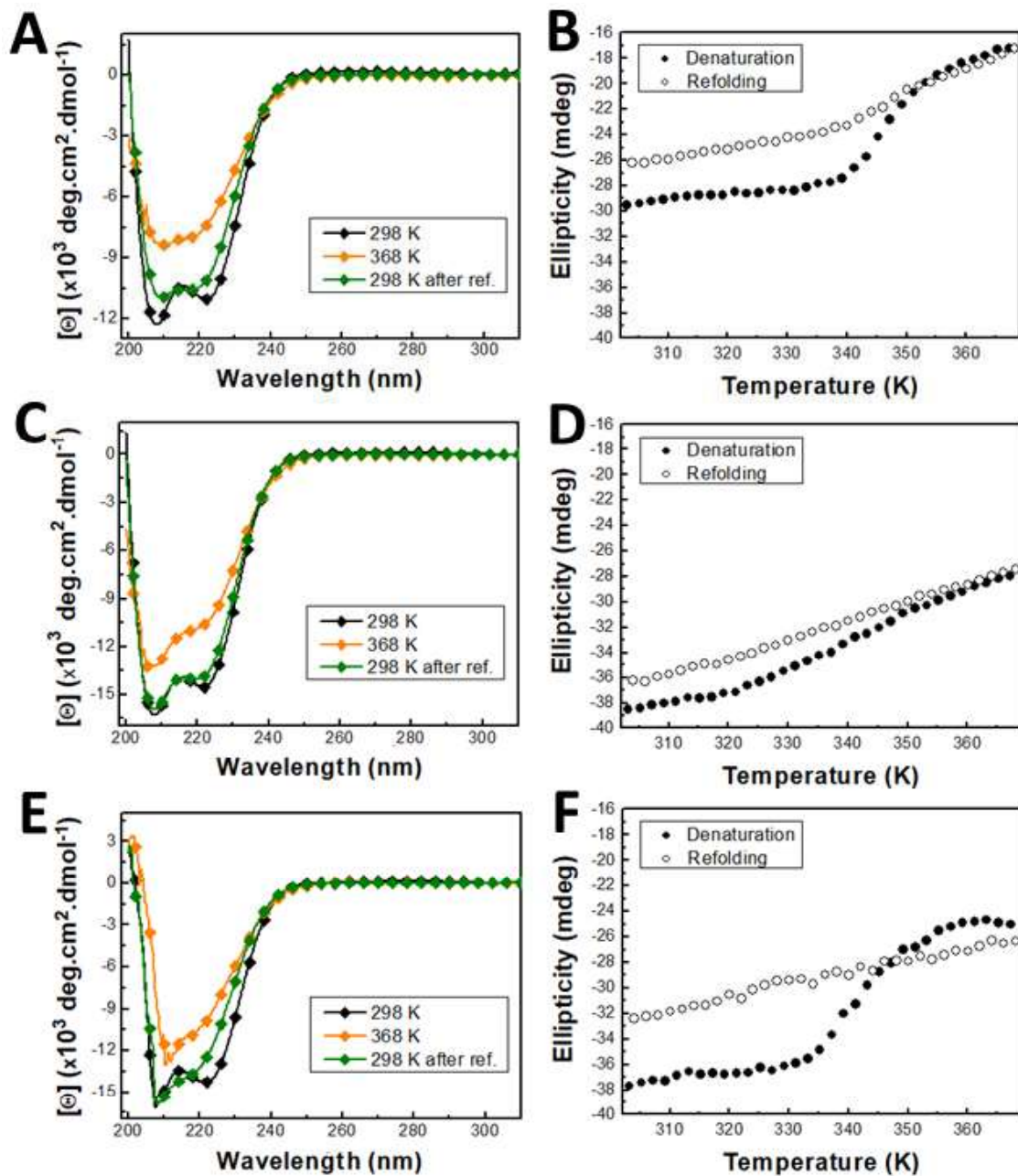
211 The R85C mutant was designed both to remove the positively charged site and to restrict  
212 the intermolecular motion in DENVC α4/α4' helices. DLS and TEM results strongly  
213 support that the neutralization of R85 is crucial for capsid assembly since structures  
214 compatible in size and shape with NCLPs were formed either with R85C<sup>ox</sup> or with  
215 R85C<sup>red</sup>. Nonetheless, when the cysteine residues are not covalently linked (R85C<sup>red</sup>),  
216 assembly seems to be less efficient, with the formation of filamentous structures, possibly  
217 due to less coordinated protein interactions caused by α4/α4' helices' dynamics. Thus, to  
218 investigate the effects of restricting α4/α4' helices motion on DENVC oligomerization  
219 reaction, we performed thermal and chemical denaturation experiments aiming to  
220 characterize the thermodynamics of the dissociation/denaturation processes of DENVC  
221 WT, R85C<sup>ox</sup> and R85C<sup>red</sup>, and the respective NCLPs.

222

223 *Thermal denaturation studies*

224 To analyze the structural stability of DENVC WT and mutant proteins, we used circular  
225 dichroism spectroscopy (CD) to compare their thermal dissociation/denaturation  
226 processes (Figure 5). For the interpretation of the results, it is important to bear in mind  
227 that the flaviviruses' C proteins form intertwined homodimers stabilized predominantly  
228 by quaternary contacts, making very unlikely the existence of a folded monomer in solution  
229 (Neves-Martins *et al.*, 2021). Thus, DENVC dimer dissociation process cannot be  
230 analyzed separately from monomer denaturation, so we should interpret the data as  
231 resulting from the transition from a folded dimer to an unfolded/disordered monomer or  
232 dimer.

233 As expected, at room temperature, WT, R85C<sup>ox</sup>, and R85C<sup>red</sup> showed a typical CD  
234 spectral pattern of  $\alpha$ -helical proteins, with negative bands at 208 and 222 nm (Figures 5A,  
235 C, and E, respectively). Thermal dissociation/denaturation profiles for each protein were  
236 analyzed by following the decrease in ellipticity at 222 nm (i.e., decrease in  $\alpha$ -helix  
237 content) from 298 to 368 K (25 to 95°C). The denaturation curves obtained for WT and  
238 R85C<sup>red</sup> proteins were very similar, reaching a disordered state with remaining residual  
239  $\alpha$ -helix content, as observe at 368 K (Figures 5A and E). Additionally, the curves showed  
240 a sigmoidal profile typical of a cooperative process (Figures 5B and F - filled circles). On  
241 the order hand, for the R85C<sup>ox</sup>, a non-cooperative process (Figure 5D) that did not reach  
242 the same degree of disorder as observed for DENVC-WT and the R85C<sup>red</sup> (Figure 5C)  
243 was observed, indicating that the immobilization of  $\alpha 4/\alpha 4'$  helices stabilize DENVC. We  
244 decided not to calculate the thermodynamic parameters from these data for the following  
245 reasons: (i) we did not reach complete unfolding, (ii) the reversibility was not complete,  
246 and (iii) we did not start from the same conformational state (dimer for WT and a mixture  
247 of dimer and NCLPs for the R85C). We did not observe a complete refolding for any of  
248 the proteins, but upon dilution, the reversibility was improved (Figure S1).



249

250 **Figure 5. CD analysis of DENVC WT, R85C<sup>ox</sup> and R85C<sup>red</sup> thermal**  
 251 **dissociation/denaturation process.** CD spectra of WT (A), R85C<sup>ox</sup> (C), and R85C<sup>red</sup> (E),  
 252 at 298 K (black symbols), 368 K (orange symbols), and after return to 298 K (green  
 253 symbols). Thermal dissociation/denaturation curves of WT (B), R85C<sup>ox</sup> (D), and R85C<sup>red</sup>  
 254 (F) proteins were obtained by collecting the ellipticity at 222 nm from 298 to 368 K (filled  
 255 circles) and return (empty circles). The data were obtained with a scan rate of 1.0°C/min.  
 256 The samples were prepared at 13  $\mu$ M concentration in 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7,4)  
 257 with 200 mM NaCl, and all experiments were performed at least twice.

258

259 To gain more insight into the energetics of the dissociation/denaturation processes of  
260 DENVC WT and mutant proteins, we performed DSC experiments. The thermograms  
261 obtained for DENVC WT, R85C<sup>ox</sup>, and R85C<sup>red</sup> are shown in Figures 6A, B, and C,  
262 respectively. Thermogram deconvolution of R85C mutant was carried out to generate the  
263 Gaussian fits from which the  $T_m$ , the calorimetric enthalpy variation ( $\Delta H_{cal}$ ), and the  
264 Van't Hoff enthalpy variation ( $\Delta H_{VH}$ ) were obtained for each transition (Figure S2).

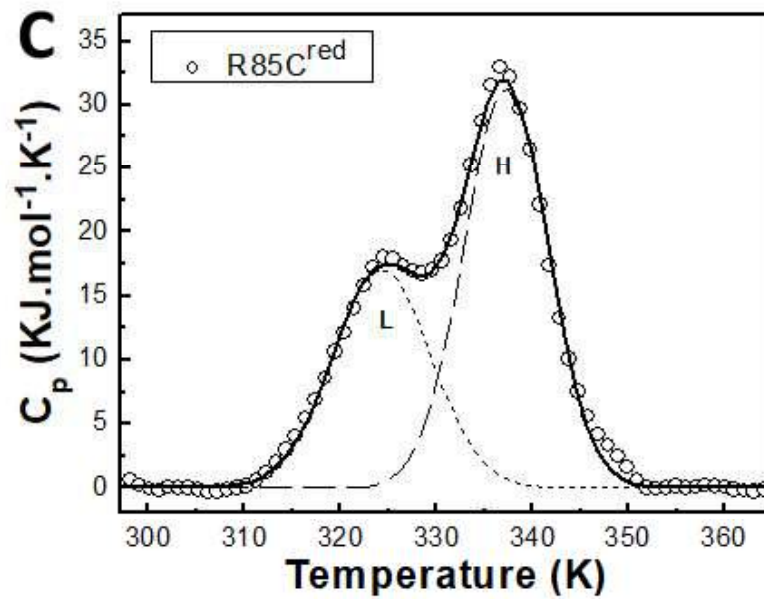
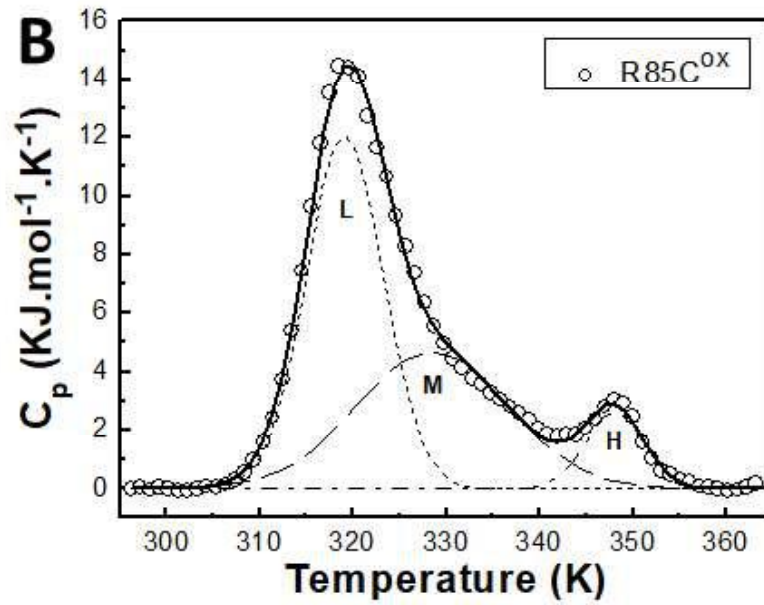
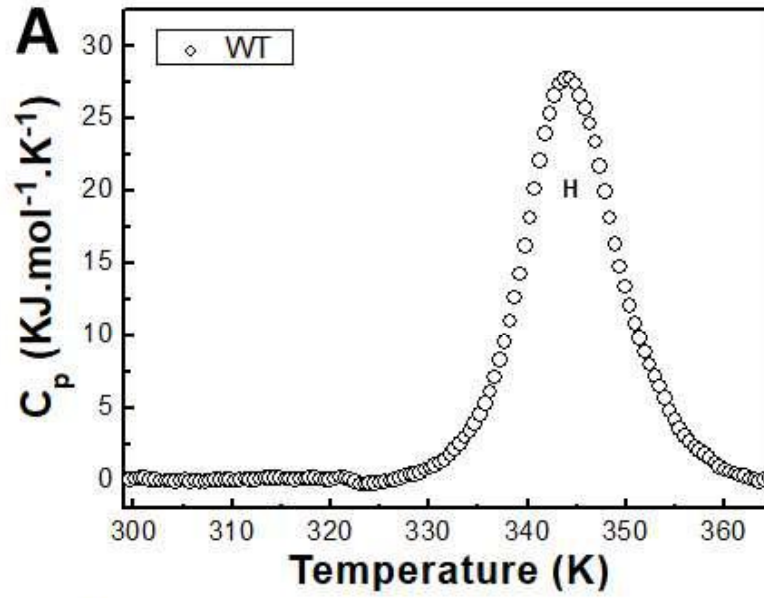
265 The thermogram obtained for WT protein showed a single transition (Figure 6A), which  
266 can be interpreted as the denaturation of the folded dimer ( $D$ ) to a monomer ( $M$ ). The  
267 corresponding transition for R85C<sup>ox</sup>, which in fact is a transition from a folded dimer to  
268 a disordered dimer ( $D^d$ ) due to the covalent bond linking the monomers, showed a  
269 slightly higher  $T_m$  when compared to that of the WT protein ( $347.9 \pm 0.1$  K for R85C<sup>ox</sup>  
270 and  $344.1 \pm 0.2$  K for WT; Table 1), corroborating the increased stability conferred by  
271 the disulfide bond (Figure 6B). Curiously, for R85C<sup>red</sup> this transition occurred at a lower  
272 temperature ( $T_m = 337.19 \pm 0.01$  K), which would be explained by a direct effect of the  
273 R85 substitution on protein stability (Figure 6C). The  $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$  of  $\sim 1$  for WT and  
274 R85C<sup>red</sup> proteins (Table 1) indicates that the transition from ( $D$ ) to ( $M$ ) obeys a two-state  
275 equilibrium, which is not valid for R85C<sup>ox</sup>.

276 Consistent with DLS and TEM results, which showed the formation of NCLPs by the  
277 mutant proteins, R85C<sup>ox</sup>, and R85C<sup>red</sup> thermograms presented an additional transition at  
278 lower temperatures (Figures 6B and C), probably corresponding to NCLP dissociation to  
279 folded species since no changes in the protein structures were observed at the respective  
280 temperature range (see Figures 5 D and F). The comparison of the  $T_m$  of these transitions  
281 ( $319.2 \pm 0.1$  K for R85C<sup>ox</sup> and  $325.0 \pm 0.9$  K for R85C<sup>red</sup>) suggests that the stabilization

282 of the dimer through the immobilization of the  $\alpha 4/\alpha 4'$  helices is an important step in  
283 capsid assembly.

284 Finally, a shoulder in R85C<sup>ox</sup> thermogram indicates the occurrence of an extra  
285 conformational transition at an intermediate temperature range (Figure 6B). The helix  
286 content variation within this temperature range (from 315 to 340 K; see Figure 5D)  
287 suggests that the protein is still folded, so we represented this transition as the equilibrium  
288 between two folded states, an unknown state ( $Un$ ), which could be a dimer of a capsomer  
289 that is in equilibrium with the disordered dimer ( $D^d$ ). Additionally, it is interesting to note  
290 that this extra transition is compatible with the non-cooperative denaturation process  
291 observed R85C<sup>ox</sup> (see Figure 5D).

292



294 **Figure 6. DSC analysis of DENVC WT and R85C mutant thermal**  
 295 **dissociation/denaturation processes.** DSC thermogram of DENVC WT (A), R85C<sup>ox</sup>  
 296 (B), and R85C<sup>red</sup> (C), with the Gaussian fit for each transition shown by the dashed lines.  
 297 The baseline was adjusted using Launch NanoAnalyze software. The samples were  
 298 prepared at a 42.5  $\mu$ M concentration in 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4) with 200 mM  
 299 NaCl, and measurements were performed from 293 to 368 K with a scan rate of 1°C/min.  
 300

301 **Table 1.** Thermodynamic parameters for the thermal dissociation/denaturation of  
 302 DENVC WT, R85C<sup>ox</sup>, and R85C<sup>red</sup>.

Protein	Transition <sup>a</sup>	Interpretation	$T_m$ (K)	$\Delta H_{cal}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{VH}$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$\frac{\Delta H_{VH}}{\Delta H_{cal}}$
WT	H	$D \rightleftharpoons M$	344.1 $\pm$ 0.2	329 $\pm$ 8	326 $\pm$ 4	0.99 $\pm$ 0.5
	L	$NCLP \rightleftharpoons Un$	319.2 $\pm$ 0.1	121 $\pm$ 6	354 $\pm$ 3	2.9 $\pm$ 0.5
R85C <sup>ox</sup>	M	$Un \rightleftharpoons D$	328.2 $\pm$ 0.4	86 $\pm$ 12	192 $\pm$ 11	2.2 $\pm$ 0.9
	H	$D \rightleftharpoons D^d$	347.9 $\pm$ 0.1	17 $\pm$ 6	633 $\pm$ 131	37.2 $\pm$ 21.8
R85C <sup>red</sup>	L	$NCLP \rightleftharpoons D$	325.0 $\pm$ 0.9	221 $\pm$ 4	294 $\pm$ 4	1.3 $\pm$ 1
	H	$D \rightleftharpoons M$	337.19 $\pm$ 0.01	349 $\pm$ 7	362 $\pm$ 3	1.04 $\pm$ 0.4

303 <sup>a</sup>H, L, M stand for transitions at high, low, and medium temperature ranges, respectively; and  $D$ ,  $Un$ ,  
 304  $D^d$ , and  $M$  stand for, dimer, unknown state, disordered dimer and monomer, respectively.

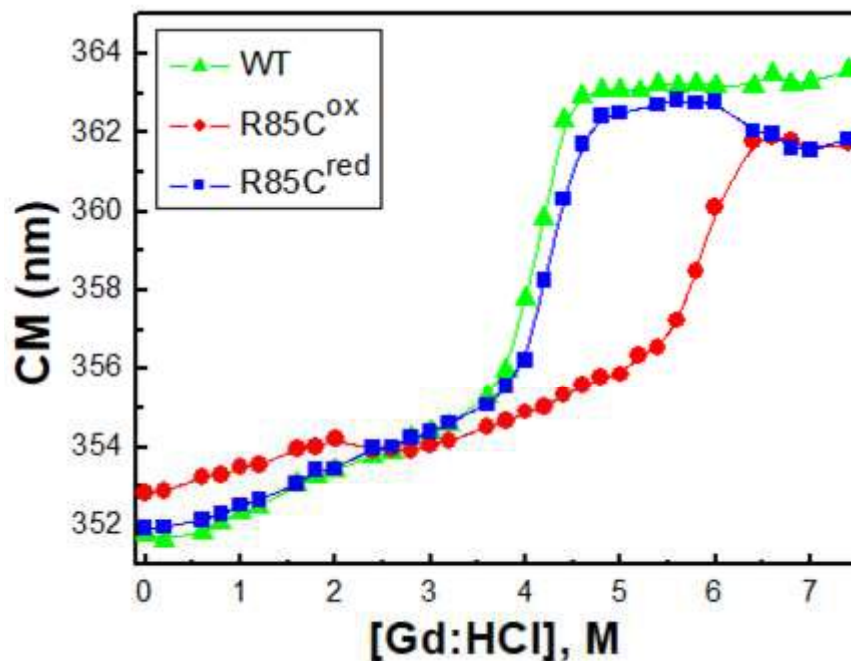
305

### 306 *Chemical denaturation studies*

307 Since it was not possible to completely denature R85C<sup>ox</sup> using temperature, we performed  
 308 a chemical denaturation assay using guanidine hydrochloride (Gd:HCl) within  
 309 concentrations ranging from 0 to 7.4 M (Figure 7). Denaturation was monitored by  
 310 measuring the redshift in the center of mass of proteins' intrinsic fluorescence emission



311 spectra. In agreement with the thermal denaturation results, WT and R85C<sup>red</sup> chemical  
312 denaturation profiles were very similar, both showing sigmoidal curves, confirming the  
313 cooperative nature of the process. The Gd:HCl concentrations that result in 50%  
314 denaturation were 4 and 4.2 M for WT and R85C<sup>red</sup>, respectively. R85C<sup>ox</sup> showed a  
315 different behavior, displaying two transitions, the first occurring between 0 and 3 M  
316 Gd:HCl and the second between 3 and 7.4 M. Furthermore, a considerable increase in  
317 stability was observed for the R85C<sup>ox</sup>, with the denaturation midpoint at 5.6 M Gd:HCl,  
318 confirming that the immobilization of  $\alpha 4/\alpha 4'$  helices plays an important role in DENVC  
319 stabilization.



320

321 **Figure 7. Chemical denaturation of DENVC WT, R85C<sup>ox</sup> and R85C<sup>red</sup>.** Effects of  
322 Gd:HCl on the intrinsic fluorescence spectra of WT (green triangles), R85C<sup>ox</sup> (red  
323 circles), and R85C<sup>red</sup> (blue squares) proteins. The samples were incubated with Gd:HCl  
324 concentrations ranging from 0 to 7.4 M in 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4), containing  
325 200 mM NaCl. Tryptophan fluorescence spectra were run exciting the samples at 280 nm  
326 and collecting fluorescence emissions from 290 to 450 nm, at 25°C. All experiments were  
327 carried out at least twice.

328

## 329 **DISCUSSION**

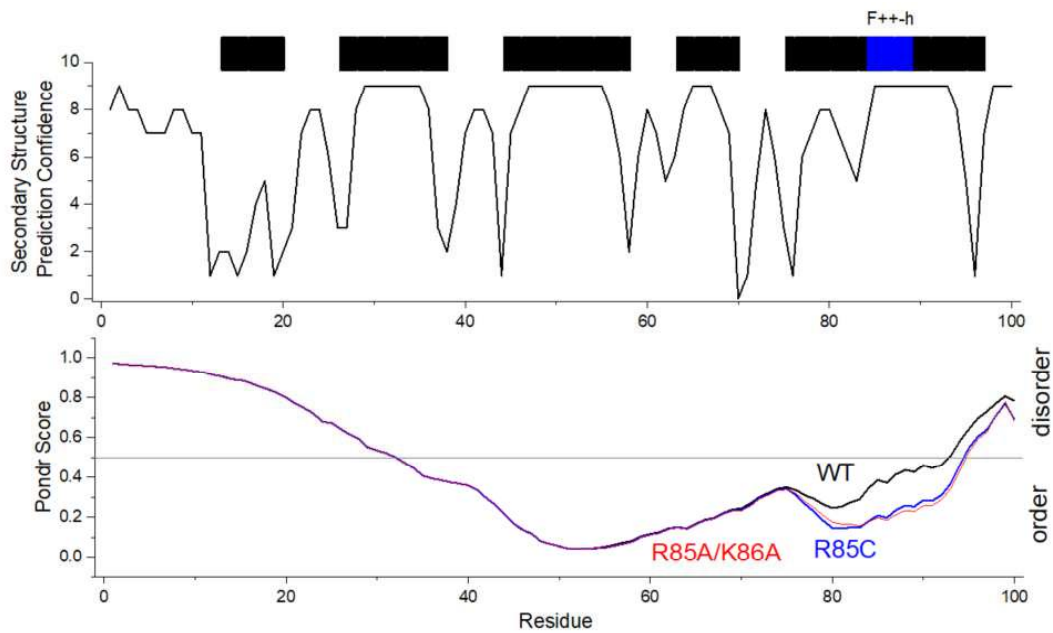
330 Flaviviruses' NC formation is an intriguing issue. Although the steps of virus  
331 morphogenesis and maturation involving E and prM/M proteins are relatively well  
332 understood, there is no information on how C protein recognizes and encapsidate the viral  
333 genome as well as on how NC is structured into de virion, despite dozens of cryo-EM  
334 structures currently available for several flaviviruses', including DENV, ZIKV, WNV,  
335 JEV, TBEV and Spondweni virus (SPOV) (Kuhn *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*,  
336 2003; W. Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2013; Sirohi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017;  
337 Füzik *et al.*, 2018; Sevvana *et al.*, 2018; Renner *et al.*, 2021). To contribute to the  
338 understanding of flaviviruses' NC assembly process, we designed a DENVC mutant that  
339 self-assembles into regular empty capsids. To our knowledge, this is the first time that  
340 flaviviruses capsid assembly is obtained in solution in the absence of any nucleic acid.  
341 Our strategy was to mimic in the mutant (DENVC R85C) two possible effects of RNA  
342 binding to DENVC: specific charge neutralization and protein immobilization. This was  
343 achieved by (i) removing the positively charged spot located in the central region of the  
344  $\alpha 4/\alpha 4'$  helices; and (ii) restricting helices' motion by introducing an interchain  $\alpha 4/\alpha 4'$   
345 covalent bond.

346 The fact that the reduced R85C DENVC mutant (R85C<sup>red</sup>) assembles in empty  
347 capsids suggests that charge neutralization is the major trigger DENV NC formation.  
348 However, as shown by both DLS and TEM, R85C<sup>red</sup> formed large aggregates not  
349 observed for R85C<sup>ox</sup>, suggesting that motion restriction of  $\alpha 4/\alpha 4'$  makes the capsid  
350 assembly process more efficient. Accordingly, our recent observation that DENVC-WT  
351 formed empty NCLPs when the protein was incubated over negatively charged surfaces

352 (Mebus-Antunes et al., 2022) reinforces the importance of restricting local protein  
353 mobility for NC assembly. Here we showed using different approaches that the  
354 immobilization of  $\alpha 4/\alpha 4'$  helices play an important role in DENVC stabilization. Thermal  
355 denaturation experiments revealed an increased  $T_m$  for R85C<sup>ox</sup> dimer denaturation when  
356 compared to the reduced form or the WT protein ( $347.9 \pm 0.1$  K for R85C<sup>ox</sup> compared to  
357  $337.19 \pm 0.01$  K and  $344.1 \pm 0.2$  for R85C<sup>red</sup> and WT proteins, respectively). The same  
358 was found in chemical denaturation experiments (denaturation midpoint at 5.6 M Gd:HCl  
359 for R85C<sup>ox</sup> compared to 4.0 M and 4.2 M Gd:HCl for WT and R85C<sup>red</sup>, respectively).

360 To further address this point, we used JPRED and PONDR VSL2 servers to  
361 simulate the tendencies for secondary structure and order/disorder along with WT and  
362 mutant DENVC sequences (Figure 8). PONDR VSL2 predictions were consistent with  
363 the known ordered regions from the structure of the dimer (Ma *et al.*, 2004). Interestingly,  
364 VSL2 prediction suggested an increased tendency of disorder at  $\alpha 4/\alpha 4'$  when compared  
365 to the  $\alpha 2/\alpha 2'$  hydrophobic cleft, which showed the highest predicted order. Accordingly,  
366 JPRED secondary structure prediction showed lower confidences at its N-terminal  
367 portion, while the highest confidence was observed at its central region, where the  
368 conserved signature F++-h (FRKEI for DENVC-WT) is located (Neves-Martins *et al.*,  
369 2021). Remarkably, when PONDR VSL2 prediction was applied to R85C mutant, a  
370 significant increase in  $\alpha 4/\alpha 4'$  predicted order was found. Thus, one can speculate that,  
371 during the virus replication cycle, the relative mobility in  $\alpha 4/\alpha 4'$  would be essential for C  
372 protein interaction with the viral genome, which increases helices' order and stability,  
373 triggering NC assembly and preventing the formation of empty capsids or defective virus-  
374 like particles. The intrinsic motion of the capsid proteins may also be present in the  
375 assembled virus particle and may contribute to the absence of electron density related to  
376 NC in the cryo-EM reconstructed structures (Kuhn *et al.*, 2002; W. Zhang *et al.*, 2003;

377 Zhang *et al.*, 2013). Curiously, a PONDR VSL2 prediction behaviour similar to that found  
 378 for R85C was observed for the DENVC R85A/K86A double mutant previously  
 379 characterized by Teoh and cols (Teoh *et al.*, 2014), suggesting that the removal of the  
 380  $\alpha 4/\alpha 4'$  positively charged spot itself would be sufficient to restrict  $\alpha 4/\alpha 4'$  mobility.



381

382 **Figure 8.** Prediction of the secondary structure and order degree of DENVC-WT and  
 383 R85C and R85A/K86A mutants. JPRED4 confidence level (Drozdetskiy *et al.*, 2015) (at  
 384 the top) and PONDR VSL2 order/disorder prediction (Dunker *et al.*, 2008; Schiavina *et*  
 385 *al.*, 2021) (at lower).

386

387 Charge neutralization is thought to be the major trigger of NC assembly of RNA  
 388 viruses. In contrast to the double-stranded DNA viruses, which assemble their capsids  
 389 before genome packaging, single-stranded RNA viruses generally package their genomes  
 390 simultaneously to capsid assembly (Twarock *et al.*, 2018). Thus, it is expected that  
 391 genomic RNA elements, namely negative charges, and long length, drive the orientation  
 392 of capsid proteins to allow the protein-protein interaction necessary to build the capsid.

393 Indeed, either for flaviviruses or for alphaviruses, which are also small enveloped  
394 +ssRNA viruses, attempts for reproducing NC assembly *in vitro* required capsid protein  
395 charge neutralization (Teoh *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2016; Rayaprolu *et al.*, 2017;  
396 Button and Mukhopadhyay, 2020).

397 Flaviviruses' NC assembly seems to be a very coordinated process, making it  
398 difficult to reproduce NC formation *in vitro*, as reflected by the few examples described  
399 in the literature. For DENVC and TBEVC, NCLPs could be observed by TEM after  
400 protein incubation with single-stranded nucleic acids (Kiermayr *et al.*, 2004; López *et al.*,  
401 2009; Teoh *et al.*, 2014). The particles were more homogeneous in size and shape for  
402 larger nucleic acids, especially the full-length viral RNA, while no particles were obtained  
403 in the absence of nucleic acid. Recently, we further characterized DENVC NCLP *in vitro*  
404 assembly (Mebus-Antunes *et al.*, 2022). We showed a stoichiometry of 1:1  
405 (DENVC:oligonucleotide) molar ratio for 5-mer or 25-mer oligonucleotides, and that  
406 DENVC empty capsids could be formed in a surface-driven assembly process.  
407 Additionally, we hypothesized that DENV NC formation would require the neutralization  
408 of a specific positively charged spot in  $\alpha 4$ -helix (R85 and K86 residues) instead of an  
409 unspecific electrostatic effect on the entire  $\alpha 4/\alpha 4'$  protein face (Mebus-Antunes *et al.*,  
410 2022). Here we confirmed this hypothesis by showing that the removal of the positive  
411 charge at position 85 in R85C DENVC mutant is to be the major trigger driving to empty  
412 capsid assembly since the reduced protein (R85C<sup>red</sup>) also assembled as empty NCLPs.  
413 Interestingly, a DENV infectious clone expressing the DENVC double mutant  
414 R85A/K86A produced a functional C protein and generated infectious virus particles,  
415 although with decreased infectivity (Teoh *et al.*, 2014). This supports the hypothesis that  
416 the removal of the positively charged spot in DENVC  $\alpha 4/\alpha 4'$  helices doesn't affect the

417 overall protein structure but increases the probability of the generation of viral defective  
418 particles.

419         The assembly process of alphaviruses' NC is much better understood than that of  
420 flaviviruses. In contrast to the observed for the flaviviruses, cryo-EM structures of the  
421 alphaviruses clearly showed icosahedral capsids in which the C-terminal chymotrypsin-  
422 like domain of the capsid proteins (known as core protein, CP) interacts with  
423 neighbouring CPs and with the envelope E2 proteins (Choi et al., 1991; Holland Cheng  
424 et al., 1995; Kostyuchenko et al., 2011; Mancini et al., 2000; Mukhopadhyay et al., 2006;  
425 Tang et al., 2011; Vaney et al., 2013; Wiley and Von Bonsdorff, 1978; Zhang et al., 2011,  
426 2002). The disordered CP N-terminal positively charged domain (about 120 residues, for  
427 which ~ 30 are positively charged) is thought to interact with the viral genome in the  
428 virion core (Mendes and Kuhn, 2018). Alphaviruses' CP assembles into core-like  
429 particles (CLPs) *in vitro* through the interaction with different polyanions, such as single-  
430 stranded DNA or RNA oligonucleotides of at least 14 bases in length, heparan sulfate, or  
431 PEG-coated nanoparticles (Cheng *et al.*, 2013). Remarkably, mutations in Ross River  
432 Virus (RRV) CP disordered N-terminal domain that replaced 4 lysine residues (K104-  
433 107) by aspartic residues (4D mutant) led CP to assemble in empty capsids (Rayaprolu *et*  
434 *al.*, 2017), confirming that CP N-terminal charge neutralization is the trigger for NC  
435 assembly. Additionally, when an anionic RRV CP mutant, in which all the N-terminal  
436 positively charged residues were replaced by negatively charged ones, was mixed with  
437 the WT protein, they assembled into CLPs (Button and Mukhopadhyay, 2020), further  
438 supporting the CP N-terminal charge neutralization mechanism for alphaviruses NC  
439 assembly.

440         As for alphaviruses, flaviviruses' C proteins also contain a disordered positively  
441 charged N-terminal region. Nevertheless, this region has never been considered the main

442 site for viral RNA interaction during NC assembly. This is possibly a consequence of the  
443 excessive emphasis given to the asymmetric charge distribution model for flaviviruses C  
444 protein, which considers that the positive charges are concentrated in the  $\alpha 4$  helix despite  
445 the higher proportion of positively charged residues in the N-terminal region (8 of 24  
446 residues). Interestingly, a TBEVC mutant truncated at the N-terminal end (TBEV- $\Delta 16$ -  
447 C) did not form NCLPs under the same conditions that other flaviviruses' C proteins,  
448 such as full-length DENVC, assemble (Kaufman *et al.*, 2020). Thus, although not  
449 considered so far, a different orientation of flaviviruses' C proteins in the virion so that  
450 their N-terminal region interacts with the viral RNA in the central core cannot be ruled  
451 out.

452

## 453 **LIMITATIONS OF STUDY**

454 We were successful in determining the formation of empty NCLPs, but we do not have  
455 information on the dimer/NCLP equilibrium so far. DLS informed on the coexistence of  
456 NCLP and dimer of R85C<sup>ox</sup> but this technique does not allow to determine the  
457 concentrations of each species. Thus, further studies are necessary to quantify the  
458 NCLP/dimer equilibrium for the mutant without nucleic acid and the wild type DENVC  
459 in the presence of nucleic acids (Mebus-Antunes *et al.*, 2022), which will contribute to  
460 the understanding of capsid dynamics in the context of the virus particle.

461

## 462 **MATERIAL AND METHODS**

### 463 **Recombinant proteins**

464 *Expression and purification*

465 The coding sequences of DENVC (serotype 2; residues 1-100) and its mutant R85C were  
466 cloned into pET3a by GenScript (Piscataway, NJ, EUA). Both proteins were expressed  
467 and purified following a previously published protocol (Mebus-Antunes et al., 2022),  
468 except that, for R85C, to prevent nonspecific disulfide bond formation, 1 mM  
469 dithiothreitol (DTT) was added to all buffer solutions used.

470 *Preparation of the covalent-linked dimer of R85C (R85C<sup>ox</sup>)*

471 To generate a disulfide bond linking R85C subunits, the protein was incubated with 3  
472 mM diamide at 4°C, with agitation, for 40 min, and applied in a HiTrap Heparin HP  
473 column coupled to an AKTA Start instrument (GE Healthcare). The protein was eluted  
474 from the column with a NaCl gradient (0.5 to 2 M) in 25 mM HEPES buffer (pH 7.4),  
475 containing 1 mM EDTA and 5% (v/v) glycerol, without DTT, with a flow of 5 ml/min.  
476 Purified R85C<sup>ox</sup> was concentrated using an Amicon<sup>®</sup> centrifuge filter of 10 kDa cut-off  
477 (Merck-Millipore, USA) at 6,000×g, 4°C, in 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4), 200 mM  
478 NaCl, 2 mM PMSF, 5 mM EDTA, and 5 mM azide, and stored at -20°C. Protein  
479 concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm using the extinction  
480 coefficient of 11,000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

481 *Confirmation of disulfide bond formation*

482 The formation of the disulfide bond covalently linking the mutant monomers (R85C<sup>ox</sup>)  
483 was confirmed by the observation of a ~ 25 kDa band (dimer molecular mass) in a non-  
484 reducing 18% SDS-PAGE. Additionally, to quantify the remaining free sulfhydryl groups  
485 in the sample, 10 μM R85C<sup>ox</sup> in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), was incubated with  
486 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in a final concentration of 10 μM (Riener,



487 Kada and Gruber, 2002). The presence of free sulfhydryl groups was determined by  
488 measuring the absorbance at 412 nm using a BioMATE 3S UV-Vis spectrophotometer  
489 (Thermo Scientific, USA).

#### 490 *Preparation of the reduced (non-covalent dimer) R85C (R85C<sup>red</sup>)*

491 To reduce R85C<sup>ox</sup> disulfide bond, generating the mutant protein in the completed reduced  
492 form (R85C<sup>red</sup>), R85C<sup>ox</sup> was incubated with 15 mM DTT for 40 min.

493

#### 494 **Dynamic light scattering (DLS)**

495 DLS experiments were carried out using a Zetasizer Nano Series S90 (Malvern  
496 Instruments). Just before the experiments, DENVC WT, R85C<sup>ox</sup>, or R85C<sup>red</sup>, at 200 μM  
497 concentration in 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4) containing 200 mM NaCl, were  
498 centrifuged at 28,000×g, for 30 min, at 4°C. The measurements were performed at 25°C,  
499 in a quartz cuvette with an optical path length of 10 mm. The results were represented as  
500 average values obtained from 30 scans by experiment. All experiments were carried out  
501 in triplicate.

502

#### 503 **Transmission electron microscopy (TEM)**

504 R85C<sup>ox</sup> and R85C<sup>red</sup>, at 5 nM concentration in 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4)  
505 containing 300 mM NaCl, and 5 mM EDTA, were kept for 1 hour at room temperature  
506 to allow NCLPs formation. Alternatively, R85C<sup>ox</sup> was incubated with 15 mM DTT after  
507 being maintained in the condition for NCLP assembly (1 h at room temperature at 5 nM  
508 concentration). Then 3.5 μL of the sample was applied on carbon-coated 400 mesh copper

509 grids (Electron Microscopy Sciences), previously subjected to glow discharge in a Pelco  
510 Easiglow™ (15 mA, 0.39 mbar, for 25 sec). After 10 min, samples were washed three  
511 times with 3.5 µL of distilled and filtered MilliQ water, the excess liquid was gently dried  
512 with filter paper, and the grids were stained with 0.5% sodium phosphotungstate (PTA)  
513 for 30 sec. Images were acquired using a FEI Tecnai Spirit microscope operated at 120  
514 kV coupled to a '2k×2k' pixel Veleta C.C.D. Camera (Olympus). Image magnification  
515 ranged from 68,000 to 150,000 times. Particles' counting and their Feret's diameter  
516 measurement were performed using ImageJ software.

517

## 518 **Thermal denaturation studies**

### 519 *Circular dichroism (CD) analysis*

520 CD spectroscopy experiments were performed in JASCO J815 (Tokyo, Japan) equipped  
521 with a Peltier type temperature controller using 0.1 cm path length quartz cuvette with  
522 DENVC WT, R85C<sup>ox</sup>, and R85C<sup>red</sup> proteins at 13 µM concentration in buffer 55 mM  
523 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) containing 200 mM NaCl. Spectra were acquired between 200 and 310  
524 nm at different temperatures, with data pitch of 0.2 nm, bandwidth of 2 nm, scanning  
525 speed of 100 nm/min with a data integration time of 4 seconds and performing 3  
526 accumulations. For thermal denaturation/renaturation curves, ellipticity was acquired at  
527 222 nm, in intervals of 1°C from 25°C to 95°C, and then from 95°C to 25°C. Results were  
528 expressed as molar ellipticity [ $\Theta$ ] (deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>), after buffer and baseline subtractions,  
529 according to:

530 
$$[\Theta]_{\lambda} = \frac{\theta}{c * l * 10 * n}$$

531 where  $\theta$  being the measured ellipticity at wavelength  $\lambda$  (deg),  $c$  is the protein  
532 concentration (mol/L),  $l$  the path length of the cuvette (in cm), and  $n$  the number of amino  
533 acid residues in the protein.

534

#### 535 *Differential scanning calorimetry (DSC)*

536 DSC experiments were performed using an N-DSC III apparatus (TA Instruments, USA)  
537 in the range from 20 to 95°C with scan rates of 1.0°C/min. Initially, both calorimeter cells  
538 were loaded with the buffer solution, equilibrated at 20°C for 10 min, and scanned  
539 repeatedly until the baseline was reproducible and stable. Then, the sample cell was  
540 loaded with the DENVC WT, R85C<sup>ox</sup> or R85C<sup>red</sup> at final concentrations of 42.5  $\mu$ M in  
541 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4) containing 200 mM NaCl. The baseline correction was  
542 obtained by subtracting the buffer scan from the protein scan using the software Launch  
543 NanoAnalyze, supplied by TA Instruments. The thermograms were fitted using a two-  
544 state model with the program Origin 7.0. The Van't Hoff equation was used to calculate  
545 the  $\Delta H_{VH}$  involved in the transition:

$$546 \quad \frac{d}{d\frac{1}{T}} \ln(K_u) = -\frac{\Delta H}{R}$$

547 where  $\Delta H_{VH}$  is the enthalpy change,  $R$  is the universal gas constant, and  $K_u$  is the  
548 denaturation constant at the correspondent temperature,  $T$ .

549 Calorimetric enthalpy change ( $\Delta H_{cal}$ ) was calculated from the thermogram area.  
550 Gaussian fits and the deconvolution analysis were performed using the program Origin  
551 7.0 by adjusting a minimum number of Gaussian curves to the DSC thermograms, and  
552 Gaussian curves were treated as described above.

553

## 554 **Chemical denaturation studies**

### 555 *Fluorescence spectroscopy*

556 The effects of guanidine hydrochloride (Gd:HCl) (Sigma-Aldrich) on the structures of  
557 DENVC WT and R85C proteins were measured by the intrinsic fluorescence of the single  
558 tryptophan residue of DENVC (W69), using a Cary Eclipse (Agilent Technologies)  
559 fluorescence spectrophotometer equipped with a quartz cuvette of 1 cm path length and  
560 excitation and emission slits of 5 nm. The assays were performed at 25°C. The protein  
561 samples at 5 µM concentration in 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4) containing 200 mM  
562 NaCl, were incubated for 5 min with from 0 to 7.4 M Gd:HCl before the fluorescence  
563 analysis. The intrinsic fluorescence was measured by exciting the samples at 280 nm and  
564 collecting the emission spectrum from 290 to 450 nm. Each measurement in the emission  
565 spectrum was an average of 10 scans. The data were corrected by subtracting the  
566 fluorescence values obtained for a buffer solution with the respective Gd:HCl  
567 concentration. The center of spectral mass (CM) of the emission spectrum was quantified  
568 as follows:

$$569 \quad CM = \frac{\sum(v_i \times F_i)}{\sum F_i}$$

570 where  $F_i$  is the fluorescence emission at wavelength  $v_i$ , and the summation is performing  
571 over the range of measured values of  $F$ .

572

## 573 **Secondary structure and order/disorder prediction**

574 Secondary structure prediction was performed using JPRED4 server  
575 (<https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>). JPRED4/JNET assigns a confidence score  
576 varying from 0 (low) to 9 (high). JNET uses a neural network that includes learning and  
577 training algorithms based on the increasing number of known protein secondary  
578 structures. The confidence level of a given prediction gives information on the tendency  
579 of a given residue to be in a secondary structure (Drozdetskiy *et al.*, 2015).

580 Order/disorder content in protein structure was predicted using PONDR server  
581 (<http://www.pondr.com/>). PONDR uses neural networks than can be trained using  
582 different inputs. VSL2 is an PONDR predictor trained by combining two predictors, for  
583 long sequences (> 40 residues) and short 8 to 9 residues sequences (Dunker *et al.*, 2008),  
584 using not only crystallographic structures but also NMR structures and circular dichroism  
585 secondary structure data. VSL2 showed the best match to experimentally determined  
586 structural and dynamical features of DENVC (Ma *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2012;  
587 Faustino *et al.*, 2015).

588

## 589 **ACKNOWLEDGMENTS**

590 ATDP was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do  
591 Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil (<http://www.faperj.br/>) [grant numbers E-  
592 26/201.316/2016, E-26/201.173/2021], and Conselho Nacional de Desenvolvimento  
593 Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (<https://www.gov.br/cnpq/pt-br>) [grant  
594 numbers: 312650/2021-3]. FCLA was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho  
595 de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil  
596 (<http://www.faperj.br/>) [grant numbers 204.432/2014 and 239.229/2018] and Conselho  
597 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil

598 (<https://www.gov.br/cnpq/pt-br>) [grant numbers: 439306/2018-3]. The funders had no  
599 role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of  
600 the manuscript. The authors also thank the National Center for Structural Biology and  
601 Bioimaging (CENABIO/UFRJ), Multiuser Center for Biomolecular Innovation  
602 (CMIB/UNESP) and Department of Physics, Institute of Biosciences, Letters and Exact  
603 Sciences (IBILCE/UNESP) for providing access to the necessary types of equipment. We  
604 gratefully acknowledge Ms. Adélia Mara Belém Lima, from CENABIO/UFRJ, for her  
605 excellent technical assistance.

606

#### 607 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

608 Conceptualization: T.C.N.M., I.P.C., F.C.L.A., A.T.D.P. Methodology: T.C.N.M., I.P.C.,  
609 F.C.L.A., A.T.D.P. Validation: T.C.N.M., I.P.C., F.C.L.A., A.T.D.P. Formal Analysis:  
610 T.C.N.M., N.C.M.A., I.P.C. Investigation: T.C.N.M., N.C.M.A., C.H.G.N., G.M.B.,  
611 I.P.C. Resources: F.C.L.A., I.P.C., A.T.D.P. Writing – Original Draft: T.C.N.M., I.P.C.,  
612 F.C.L.A., A.T.D.P. Writing – Review & Editing: T.C.N.M., I.P.C., F.C.L.A., A.T.D.P.  
613 Visualization: T.C.N.M., I.P.C., F.C.L.A., A.T.D.P. Supervision: F.C.L.A., A.T.D.P.  
614 Project Administration: I.P.C., F.C.L.A., A.T.D.P. Funding Acquisition: F.C.L.A.,  
615 A.T.D.P.

616

#### 617 **DECLARATION OF INTERESTS**

618 The authors declare no competing interests.

619

620 **REFERENCES**

- 621 Bruinsma, R. F., Wuite, G. J. L. and Roos, W. H. (2021) ‘Physics of viral dynamics’,  
622 *Nature Reviews Physics*, 3(2), pp. 76–91. doi: 10.1038/s42254-020-00267-1.
- 623 Button, J. M. and Mukhopadhyay, S. (2020) ‘Removing the polyanionic cargo  
624 requirement for assembly of alphavirus core-like particles to make an empty alphavirus  
625 core’, *Viruses*, 12(8). doi: 10.3390/v12080846.
- 626 Cheng, F. *et al.* (2013) ‘The packaging of different cargo into enveloped viral  
627 nanoparticles’, *Molecular Pharmaceutics*, 10(1), pp. 51–58. doi: 10.1021/mp3002667.
- 628 Choi, H.; Tong, L.; Minor, W.; Dumas, P.; Boege, U.; Rossmann, M.G.; Wengler, G.  
629 (1991) ‘Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine  
630 proteinase and the organization of the virion’, *Nature*, 354, pp. 737–740.
- 631 Drozdetskiy, A. *et al.* (2015) ‘JPred4: a protein secondary structure prediction server’,  
632 *Nucleic Acids Research*, 43(W1), pp. W389–W394. doi: 10.1093/nar/gkv332.
- 633 Dunker, A. K. *et al.* (2008) ‘Function and structure of inherently disordered proteins’,  
634 *Current Opinion in Structural Biology*, pp. 756–764. doi: 10.1016/j.sbi.2008.10.002.
- 635 Faustino, A. F. *et al.* (2015) ‘Understanding dengue virus capsid protein disordered N-  
636 terminus and pep14-23-based inhibition’, *ACS Chemical Biology*, 10(2), pp. 517–526.  
637 doi: 10.1021/cb500640t.
- 638 Freire, J. M. *et al.* (2013) ‘Intracellular nucleic acid delivery by the supercharged  
639 dengue virus capsid protein’, *PLoS ONE*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0081450.
- 640 Füzik, T. *et al.* (2018) ‘Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization  
641 by a monoclonal antibody’, *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–11. doi:  
642 10.1038/s41467-018-02882-0.
- 643 Holland Cheng, R. *et al.* (1995) ‘Nucleocapsid and glycoprotein organization in an  
644 enveloped virus’, *Cell*, 80(4), pp. 621–630. doi: 10.1016/0092-8674(95)90516-2.
- 645 Jones, C. T. *et al.* (2003) ‘Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein’,  
646 *Journal of Virology*, 77(12), pp. 7143–7149. doi: 10.1128/jvi.77.12.7143-7149.2003.
- 647 Kaufman, F. *et al.* (2020) ‘Characterization and in vitro assembly of tick-borne

648 encephalitis virus C protein', *FEBS Letters*, 594(12), pp. 1989–2004. doi:  
649 10.1002/1873-3468.13857.

650 Kiermayr, S. *et al.* (2004) 'Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne  
651 Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles', *Journal of*  
652 *Virology*, 78(15), pp. 8078–8084. doi: 10.1128/jvi.78.15.8078-8084.2004.

653 Kondylis, P. *et al.* (2019) 'Analytical Techniques to Characterize the Structure,  
654 Properties, and Assembly of Virus Capsids', *Analytical Chemistry*, 91(1), pp. 622–636.  
655 doi: 10.1021/acs.analchem.8b04824.

656 Kostyuchenko, V. A. *et al.* (2011) 'The Structure of Barmah Forest Virus as Revealed  
657 by Cryo-Electron Microscopy at a 6-Angstrom Resolution Has Detailed  
658 Transmembrane Protein Architecture and Interactions', *Journal of Virology*, 85(18), pp.  
659 9327–9333. doi: 10.1128/jvi.05015-11.

660 Kostyuchenko, V. A. *et al.* (2013) 'Immature and Mature Dengue Serotype 1 Virus  
661 Structures Provide Insight into the Maturation Process', *Journal of Virology*, 87(13), pp.  
662 7700–7707. doi: 10.1128/jvi.00197-13.

663 Kostyuchenko, V. A. *et al.* (2014) 'Near-Atomic Resolution Cryo-Electron Microscopic  
664 Structure of Dengue Serotype 4 Virus', *Journal of Virology*, 88(1), pp. 477–482. doi:  
665 10.1128/jvi.02641-13.

666 Kuhn, R. J. *et al.* (2002) 'Structure of dengue virus: Implications for flavivirus  
667 organization, maturation, and fusion', *Cell*, 108(5), pp. 717–725. doi: 10.1016/S0092-  
668 8674(02)00660-8.

669 López, C. *et al.* (2009) 'In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified  
670 recombinant capsid protein of dengue-2 virus', *Archives of Virology*, 154(4), pp. 695–  
671 698. doi: 10.1007/s00705-009-0350-8.

672 Ma, L. *et al.* (2004) 'Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another  
673 fold', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,  
674 101(10), pp. 3414–3419. doi: 10.1073/pnas.0305892101.

675 Mancini, E. J. *et al.* (2000) 'Cryo-electron microscopy reveals the functional  
676 organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus', *Molecular Cell*, 5(2), pp.



677 255–266. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80421-9.

678 Martins, I. C. *et al.* (2012) ‘The disordered N-terminal region of dengue virus capsid  
679 protein contains a lipid-droplet-binding motif’, *Biochemical Journal*, 444(3), pp. 405–  
680 415. doi: 10.1042/BJ20112219.

681 Mebus-Antunes NC, Ferreira WS, Barbosa GM, Neves-Martins TC, Weissmuller G,  
682 Almeida FCL, Da Poian, A. T. (2022) ‘The interaction of dengue virus capsid protein  
683 with negatively charged interfaces drives the in vitro assembly of nucleocapsid-like  
684 particles’, *PLoS ONE*, 17(3), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0264643.

685 Mendes, A. and Kuhn, R. J. (2018) ‘Alphavirus nucleocapsid packaging and assembly’,  
686 *Viruses*, 10(3), pp. 1–15. doi: 10.3390/v10030138.

687 Mukhopadhyay, S. *et al.* (2003) ‘Structure of West Nile virus’, *Science*, 302(5643), p.  
688 248. doi: 10.1126/science.1089316.

689 Mukhopadhyay, S. *et al.* (2006) ‘Mapping the structure and function of the E1 and E2  
690 glycoproteins in alphaviruses’, *Structure*, 14(1), pp. 63–73. doi:  
691 10.1016/j.str.2005.07.025.

692 Neves-Martins, T. C. *et al.* (2021) ‘Unique structural features of flaviviruses’ capsid  
693 proteins: new insights on structure-function relationship’, *Current Opinion in Virology*,  
694 47, pp. 106–112. doi: 10.1016/j.coviro.2021.02.005.

695 Ortega, A., Amorós, D. and García De La Torre, J. (2011) ‘Prediction of hydrodynamic  
696 and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models’,  
697 *Biophysical Journal*, 101(4), pp. 892–898. doi: 10.1016/j.bpj.2011.06.046.

698 Pierson, T. C. and Diamond, M. S. (2020) ‘The continued threat of emerging  
699 flaviviruses’, *Nature Microbiology*, 5(6), pp. 796–812. doi: 10.1038/s41564-020-0714-  
700 0.

701 Prasad, V. M. *et al.* (2017) ‘Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution’,  
702 *Nature Structural and Molecular Biology*, 24(2), pp. 184–186. doi: 10.1038/nsmb.3352.

703 Rayaprolu, V. *et al.* (2017) ‘Length of encapsidated cargo impacts stability and  
704 structure of in vitro assembled alphavirus core-like particles’, *Journal of Physics*  
705 *Condensed Matter*, 29(48), p. aa90d0. doi: 10.1088/1361-648X/aa90d0.

706 Renner, M. *et al.* (2021) ‘Flavivirus maturation leads to the formation of an occupied  
707 lipid pocket in the surface glycoproteins’, *Nature Communications*, 12(1), pp. 1–9. doi:  
708 10.1038/s41467-021-21505-9.

709 Requião, R. D. *et al.* (2020) ‘Viruses with different genome types adopt a similar  
710 strategy to pack nucleic acids based on positively charged protein domains’, *Scientific*  
711 *Reports*, 10(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-62328-w.

712 Riener, C. K., Kada, G. and Gruber, H. J. (2002) ‘Quick measurement of protein  
713 sulfhydryls with Ellman’s reagent and with 4,4’-dithiodipyridine’, *Analytical and*  
714 *Bioanalytical Chemistry*, 373(4–5), pp. 266–276. doi: 10.1007/s00216-002-1347-2.

715 Schiavina, M. *et al.* (2021) ‘The highly flexible disordered regions of the SARS-CoV-2  
716 nucleocapsid N protein within the 1–248 residue construct: sequence-specific resonance  
717 assignments through NMR’, *Biomolecular NMR Assignments*, 15(1), pp. 219–227. doi:  
718 10.1007/s12104-021-10009-8.

719 Sevvana, M. *et al.* (2018) ‘Refinement and Analysis of the Mature Zika Virus Cryo-EM  
720 Structure at 3.1 Å Resolution’, *Structure*, 26(9), pp. 1169-1177.e3. doi:  
721 10.1016/j.str.2018.05.006.

722 Sirohi, D. *et al.* (2016) ‘The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus’,  
723 *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(5), pp. 2016–17.

724 Sotcheff, S. and Routh, A. (2020) ‘Understanding flavivirus capsid protein functions:  
725 The tip of the iceberg’, *Pathogens*, 9(1). doi: 10.3390/pathogens9010042.

726 de Souza, T. L. F. *et al.* (2016) ‘Charge neutralization as the major factor for the  
727 assembly of nucleocapsid-like particles from C-terminal truncated hepatitis C virus core  
728 protein’, *PeerJ*, 2016(11), pp. 1–25. doi: 10.7717/peerj.2670.

729 Tan, T. Y., Fibriansah, G. and Lok, S. M. (2020) ‘Capsid protein is central to the birth  
730 of flavivirus particles’, *PLoS Pathogens*, 16(5), pp. 1–8. doi:  
731 10.1371/journal.ppat.1008542.

732 Tang, J. *et al.* (2011) ‘Molecular links between the E2 envelope glycoprotein and  
733 nucleocapsid core in Sindbis virus’, *Journal of Molecular Biology*, 414(3), pp. 442–459.  
734 doi: 10.1016/j.jmb.2011.09.045.

735 Teoh, P.-G. *et al.* (2014) ‘Maintenance of Dimer Conformation by the Dengue Virus  
736 Core Protein  $\alpha 4$ - $\alpha 4'$  Helix Pair Is Critical for Nucleocapsid Formation and Virus  
737 Production’, *Journal of Virology*, 88(14), pp. 7998–8015. doi: 10.1128/jvi.00940-14.

738 Twarock, R. *et al.* (2018) ‘A modelling paradigm for RNA virus assembly’, *Current*  
739 *Opinion in Virology*, 31(Figure 1), pp. 74–81. doi: 10.1016/j.coviro.2018.07.003.

740 Vaney, M. C., Duquerroy, S. and Rey, F. A. (2013) ‘Alphavirus structure: Activation  
741 for entry at the target cell surface’, *Current Opinion in Virology*, 3(2), pp. 151–158. doi:  
742 10.1016/j.coviro.2013.04.003.

743 Wang, X. *et al.* (2017) ‘Near-atomic structure of Japanese encephalitis virus reveals  
744 critical determinants of virulence and stability’, *Nature Communications*, 8(1), pp. 1–8.  
745 doi: 10.1038/s41467-017-00024-6.

746 Wiley, D. C. and Von Bonsdorff, C. H. (1978) ‘Three-dimensional crystals of the lipid-  
747 enveloped Semliki Forest virus’, *Journal of Molecular Biology*, 120(3), pp. 375–379.  
748 doi: 10.1016/0022-2836(78)90425-4.

749 Zhang, R. *et al.* (2011) ‘4.4 Å cryo-EM structure of an enveloped alphavirus  
750 Venezuelan equine encephalitis virus’, *EMBO Journal*, 30(18), pp. 3854–3863. doi:  
751 10.1038/emboj.2011.261.

752 Zhang, W. *et al.* (2002) ‘Aura Virus Structure Suggests that the T=4 Organization Is a  
753 Fundamental Property of Viral Structural Proteins’, *Journal of Virology*, 76(14), pp.  
754 7239–7246. doi: 10.1128/jvi.76.14.7239-7246.2002.

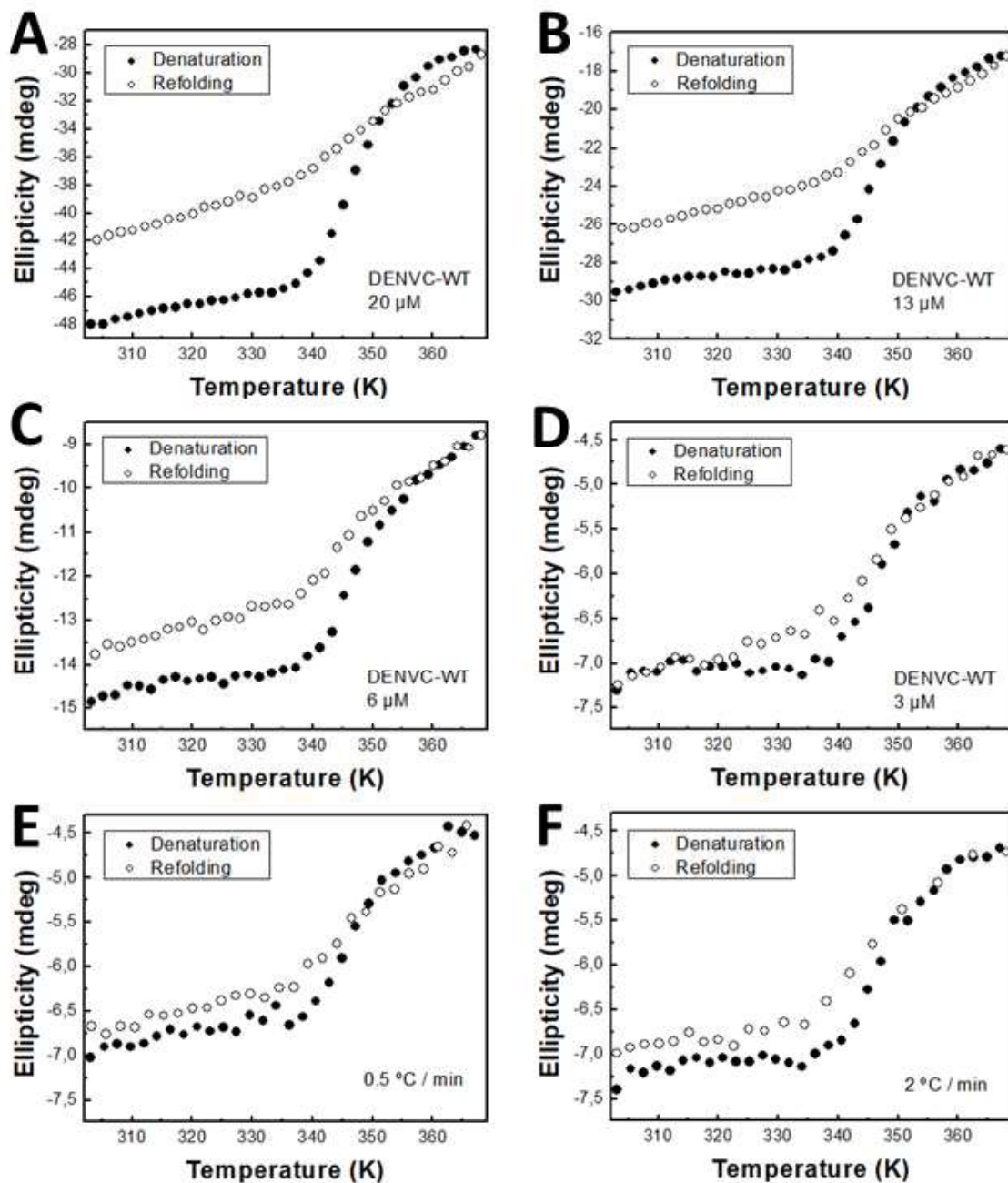
755 Zhang, W. *et al.* (2003) ‘Visualization of membrane protein domains by cryo-electron  
756 microscopy of dengue virus’, *Nature Structural Biology*, 10(11), pp. 907–912. doi:  
757 10.1038/nsb990.

758 Zhang, X. *et al.* (2013) ‘Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å  
759 resolution’, *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(1), pp. 105–110. doi:  
760 10.1038/nsmb.2463.

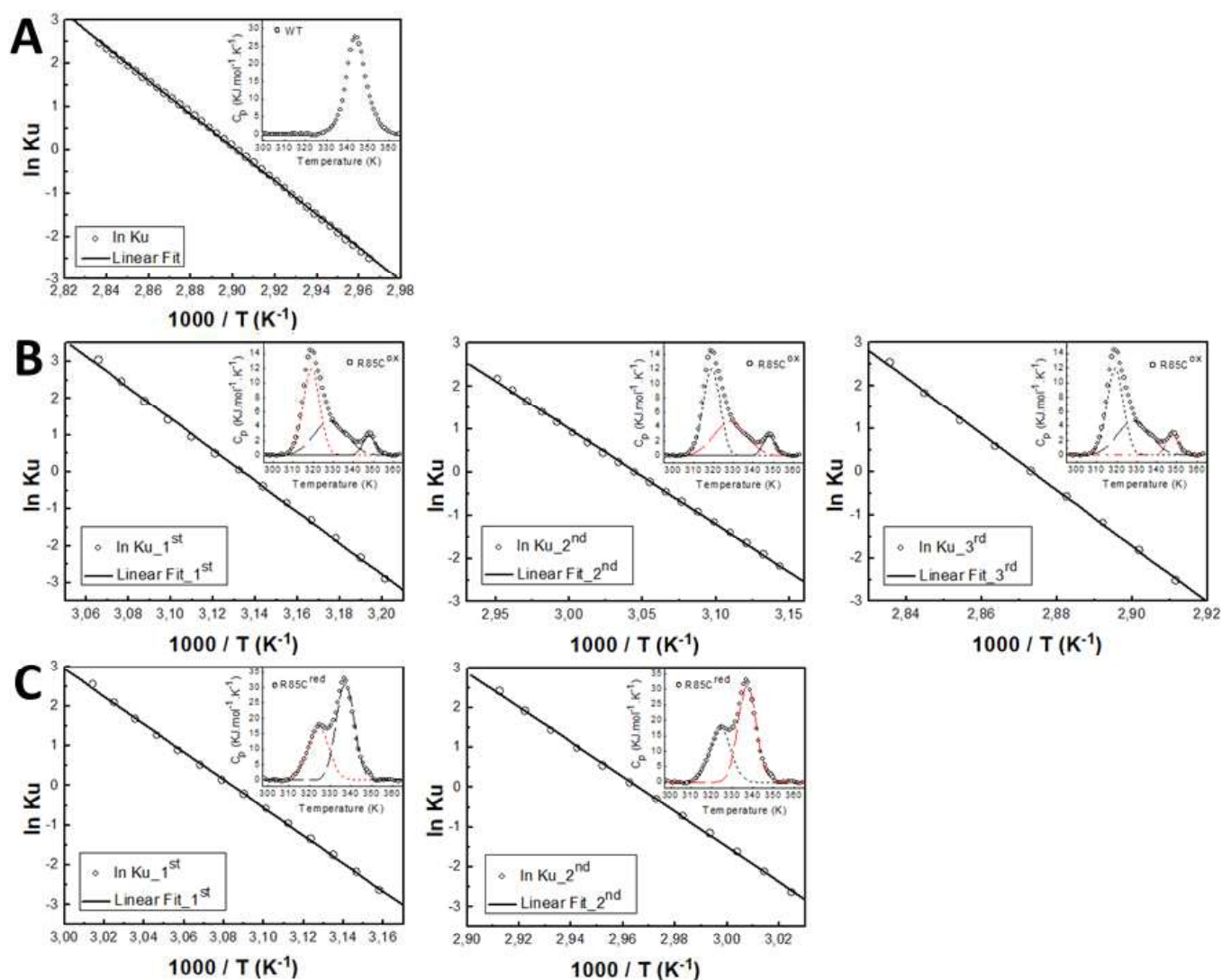
761 Zhang, Y. *et al.* (2003) ‘Zhang et al. - 2003 - Structures of immature flavivirus  
762 particles’, 22(11).

763

## SUPPLEMENTARY MATERIAL



**Figure S1. CD analysis of the thermal dissociation/denaturation process of DENVC WT at different concentrations.** Thermal dissociation/denaturation by collecting the ellipticity at 222 nm from 298 to 368 K (filled circles) and return (empty circles) for DENVC-WT at 20  $\mu\text{M}$  (A), 13  $\mu\text{M}$  (B), 6  $\mu\text{M}$  (C), and 3  $\mu\text{M}$  (D) concentrations. The data were obtained with a scan rate of 1.0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . At 3  $\mu\text{M}$  concentration, thermal dissociation/denaturation process was also analyzed using 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (E) or 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (F). The samples were prepared in 55 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 7.4) with 200 mM NaCl, and all experiments were performed at least twice.



**Figure S2. Thermogram treatment for Van't Hoff enthalpy calculation.** The thermogram treatment was performed using multiple Gaussian adjustments to the experimental data (See Material and Methods).  $\Delta H_{VH}$  (Van't Hoff enthalpy variation) was obtained for DENVC-WT (A), R85C<sup>ox</sup> (B), and R85C<sup>red</sup> (C). The inserts show the thermogram for all proteins and the Gaussian fit for the R85C<sup>ox</sup> (B), and R85C<sup>red</sup> (C) are represented by red dashed lines. Measurements were performed from 293 to 368 K with a scan rate of 1°C/min. All samples were in buffer 55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) with 200 mM NaCl. Measurements were performed at least twice and fittings were obtained using Origin 7.0.

ANEXO IV: “Searching for drug leads targeted to the hydrophobic cleft of dengue virus capsid protein”, publicado na Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, em 2021. (<https://doi.org/10.1080/14756366.2021.2004591>)

ANEXO V: “Large-Scale Recombinant Production of the SARS-CoV-2 Proteome for High-Throughput and Structural Biology Applications”, publicado na Frontiers in Molecular Biosciences, em 2021. (<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.653148>)

ANEXO VI: “Insights into the specificity for the interaction of the promiscuous SARS-CoV-2 nucleocapsid protein N-terminal domain with deoxyribonucleic acids”, publicado na International Journal of Biological Macromolecules, em 2022. (<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.121>)

ANEXO VII: “On the caveats of a multiplex test for SARS-CoV-2 to detect seroconversion after infection or vaccination”; publicado na Scientific Reports, em 2022. (<https://doi.org/10.1038/s41598-022-14294-8>)

ANEXO VIII: “Comprehensive fragment screening of the SARS-CoV-2 proteome explores novel chemical space for drug development”, publicado na Angewandte Chemie, em 2022. (<https://doi.org/10.1002/anie.202205858>)



## Searching for drug leads targeted to the hydrophobic cleft of dengue virus capsid protein

Liliane O. Ortlieb, Ícaro P. Caruso, Nathane C. Mebus-Antunes, Andrea T. Da Poian, Elaine da C. Petronilho, José Daniel Figueroa-Villar, Claudia J. Nascimento & Fabio C. L. Almeida

To cite this article: Liliane O. Ortlieb, Ícaro P. Caruso, Nathane C. Mebus-Antunes, Andrea T. Da Poian, Elaine da C. Petronilho, José Daniel Figueroa-Villar, Claudia J. Nascimento & Fabio C. L. Almeida (2022) Searching for drug leads targeted to the hydrophobic cleft of dengue virus capsid protein, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37:1, 287-298, DOI: [10.1080/14756366.2021.2004591](https://doi.org/10.1080/14756366.2021.2004591)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.2004591>



© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



[View supplementary material](#)



Published online: 11 Dec 2021.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 964



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

OPEN ACCESS



**Edited by:**

Qian Han,  
Hainan University, China

**Reviewed by:**

David Douglas Boehr,  
Pennsylvania State University, United States  
Luis G. Bréba,  
National Polytechnic Institute of Mexico  
(CINVESTAV), Mexico

**\*Correspondence:**

Anja Böckmann  
a.boeckmann@lbcf.fr  
Harald Schwalbe  
schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de  
Martin Hengesbach  
hengesbach@nmr.uni-frankfurt.de  
Andreas Schlundt  
schlundt@bio.uni-frankfurt.de

<sup>†</sup>These authors have contributed equally to this work and share first authorship

<sup>‡</sup>These authors share last authorship

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Structural Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Molecular Biosciences

**Received:** 13 January 2021

**Accepted:** 04 February 2021

**Published:** 10 May 2021

**Citation:**

Altincekic N, Korn SM, Qureshi NS, Dujardin M, Ninot-Pedrosa M, Abele R, Abi Saad MJ, Alfano C, Almeida FCL, Alshamleh I, de Amorim GC, Anderson TK, Anobom CD, Anorma C, Bains JK, Bax A, Blackledge M, Blechar J, Böckmann A, Brigandat L, Bula A, Bütikofer M, Camacho-Zarco AP, Carlomagno T, Caruso IP, Ceylan B, Chaikuad A, Chu F, Cole L, Crosby MG, de Jesus V, Dhamotharan K, Felli IC, Ferner J, Fleischmann Y, Fogeron M-L, Fourkiotis NK, Fuks C, Fürtig B, Gallo A, Gande SL, Gerez JA, Ghosh D, Gomes-Neto F, Gorbatyuk O, Guseva S, Hacker C, Häfner S, Hao B, Hargittay B, Henzler-Wildman K, Hoch JC, Hohmann KF, Hutchison MT, Jaudzems K, Jović K, Kaderli J, Kalniņš G, Kaņepe I, Kirchdoerfer RN, Kirkpatrick J, Knapp S, Krishnathas R, Kutz F, zur Lage S, Lambert R, Lang A, Laurents D, Lecoq L, Linhard V, Lohr F, Malki A, Bessa LM, Martin RW, Matzel T, Maurin D, McNutt SW, Mebus-Antunes NC, Meier BH, Meiser N, Mompeán M, Monaco E, Montserret R, Mariño Perez L, Moser C, Muhle-Goll C, Neves-Martins TC, Ni X, Norton-Baker B, Pierattelli R, Pontoriero L, Pustovalova Y, Ohlenschläger O, Orts J, Da Poian AT, Pyper DJ, Richter C, Riek R, Rienstra CM, Robertson A, Pinheiro AS, Sabbatella R, Salvi N, Saxena K, Schulte L, Schiavina M, Schwalbe H, Silber M, Almeida MoS, Sprague-Piercy MA, Spyroulias GA, Sreeramulu S, Tants J-N, Tars K, Torres F, Töws S, Treviño MA, Trucks S, Tsika AC, Varga K, Wang Y, Weber ME, Weigand JE, Wiedemann C, Wimer-Bartoschek J, Wirtz Martin MA, Zehnder J, Hengesbach M and Schlundt A (2021) Large-Scale Recombinant Production of the SARS-CoV-2 Proteome for High-Throughput and Structural Biology Applications. *Front. Mol. Biosci.* 8:653148. doi: 10.3389/fmolb.2021.653148

# Large-Scale Recombinant Production of the SARS-CoV-2 Proteome for High-Throughput and Structural Biology Applications

Nadide Altincekic<sup>1,2†</sup>, Sophie Marianne Korn<sup>2,3†</sup>, Nusrat Shahin Qureshi<sup>1,2†</sup>, Marie Dujardin<sup>4†</sup>, Martí Ninot-Pedrosa<sup>4†</sup>, Rupert Abele<sup>5</sup>, Marie Jose Abi Saad<sup>6</sup>, Caterina Alfano<sup>7</sup>, Fabio C. L. Almeida<sup>8,9</sup>, Islam Alshamleh<sup>1,2</sup>, Gisele Cardoso de Amorim<sup>8,10</sup>, Thomas K. Anderson<sup>11</sup>, Cristiane D. Anobom<sup>8,12</sup>, Chelsea Anorma<sup>13</sup>, Jasleen Kaur Bains<sup>1,2</sup>, Adriaan Bax<sup>14</sup>, Martin Blackledge<sup>15</sup>, Julius Blechar<sup>1,2</sup>, Anja Böckmann<sup>4\*†</sup>, Louis Brigandat<sup>4</sup>, Anna Bula<sup>16</sup>, Matthias Bütikofer<sup>6</sup>, Aldo R. Camacho-Zarco<sup>15</sup>, Teresa Carlomagno<sup>17,18</sup>, Icaro Putinhon Caruso<sup>8,9,19</sup>, Betül Ceylan<sup>1,2</sup>, Apirat Chaikuad<sup>20,21</sup>, Feixia Chu<sup>22</sup>, Laura Cole<sup>4</sup>, Marquise G. Crosby<sup>23</sup>, Vanessa de Jesus<sup>1,2</sup>, Karthikeyan Dhamotharan<sup>2,3</sup>, Isabella C. Felli<sup>24,25</sup>, Jan Ferner<sup>1,2</sup>, Yanick Fleischmann<sup>6</sup>, Marie-Laure Fogeron<sup>4</sup>, Nikolaos K. Fourkiotis<sup>26</sup>, Christin Fuks<sup>1</sup>, Boris Fürtig<sup>1,2</sup>, Angelo Gallo<sup>26</sup>, Santosh L. Gande<sup>1,2</sup>, Juan Atilio Gerez<sup>6</sup>, Dhiman Ghosh<sup>6</sup>, Francisco Gomes-Neto<sup>8,27</sup>, Oksana Gorbatyuk<sup>28</sup>, Serafima Guseva<sup>15</sup>, Carolin Hacker<sup>29</sup>, Sabine Häfner<sup>30</sup>, Bing Hao<sup>28</sup>, Bruno Hargittay<sup>1,2</sup>, K. Henzler-Wildman<sup>11</sup>, Jeffrey C. Hoch<sup>28</sup>, Katharina F. Hohmann<sup>1,2</sup>, Marie T. Hutchison<sup>1,2</sup>, Kristaps Jaudzems<sup>16</sup>, Katarina Jović<sup>22</sup>, Janina Kaderli<sup>6</sup>, Gints Kalniņš<sup>31</sup>, Iveta Kaņepe<sup>16</sup>, Robert N. Kirchdoerfer<sup>11</sup>, John Kirkpatrick<sup>17,18</sup>, Stefan Knapp<sup>20,21</sup>, Robin Krishnathas<sup>1,2</sup>, Felicitas Kutz<sup>1,2</sup>, Susanne zur Lage<sup>18</sup>, Roderick Lambert<sup>3</sup>, Andras Lang<sup>30</sup>, Douglas Laurents<sup>32</sup>, Lauriane Lecoq<sup>4</sup>, Verena Linhard<sup>1,2</sup>, Frank Lohr<sup>2,33</sup>, Anas Malki<sup>15</sup>, Luiza Mamigonian Bessa<sup>15</sup>, Rachel W. Martin<sup>13,23</sup>, Tobias Matzel<sup>1,2</sup>, Damien Maurin<sup>15</sup>, Seth W. McNutt<sup>22</sup>, Nathane Cunha Mebus-Antunes<sup>8,9</sup>, Beat H. Meier<sup>6</sup>, Nathalie Meiser<sup>1</sup>, Miguel Mompeán<sup>32</sup>, Elisa Monaco<sup>7</sup>, Roland Montserret<sup>4</sup>, Laura Mariño Perez<sup>15</sup>, Celine Moser<sup>34</sup>, Claudia Muhle-Goll<sup>34</sup>, Thais Cristina Neves-Martins<sup>8,9</sup>, Xiamon Ni<sup>20,21</sup>, Brenna Norton-Baker<sup>13</sup>, Roberta Pierattelli<sup>24,25</sup>, Letizia Pontoriero<sup>24,25</sup>, Yulia Pustovalova<sup>28</sup>, Oliver Ohlenschläger<sup>30</sup>, Julien Orts<sup>6</sup>, Andrea T. Da Poian<sup>9</sup>, Dennis J. Pyper<sup>1,2</sup>, Christian Richter<sup>1,2</sup>, Roland Riek<sup>6</sup>, Chad M. Rienstra<sup>35</sup>, Angus Robertson<sup>14</sup>, Anderson S. Pinheiro<sup>8,12</sup>, Raffaele Sabbatella<sup>7</sup>, Nicola Salvi<sup>15</sup>, Krishna Saxena<sup>1,2</sup>, Linda Schulte<sup>1,2</sup>, Marco Schiavina<sup>24,25</sup>, Harald Schwalbe<sup>1,2\*†</sup>, Mara Silber<sup>34</sup>, Marcio da Silva Almeida<sup>8,9</sup>, Marc A. Sprague-Piercy<sup>23</sup>, Georgios A. Spyroulias<sup>26</sup>, Sridhar Sreeramulu<sup>1,2</sup>, Jan-Niklas Tants<sup>2,3</sup>, Kaspars Tars<sup>31</sup>, Felix Torres<sup>6</sup>, Sabrina Töws<sup>3</sup>, Miguel Á. Treviño<sup>32</sup>, Sven Trucks<sup>1</sup>, Aikaterini C. Tsika<sup>26</sup>, Krisztina Varga<sup>22</sup>, Ying Wang<sup>17</sup>, Marco E. Weber<sup>6</sup>, Julia E. Weigand<sup>36</sup>, Christoph Wiedemann<sup>37</sup>, Julia Wimer-Bartoschek<sup>1,2</sup>, Maria Alexandra Wirtz Martin<sup>1,2</sup>, Johannes Zehnder<sup>6</sup>, Martin Hengesbach<sup>1\*†</sup> and Andreas Schlundt<sup>2,3\*†</sup>

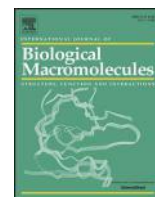
<sup>1</sup>Institute for Organic Chemistry and Chemical Biology, Goethe University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany, <sup>2</sup>Center of Biomolecular Magnetic Resonance (BMRZ), Goethe University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany, <sup>3</sup>Institute for Molecular Biosciences, Goethe University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany, <sup>4</sup>Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, UMR 5086, CNRS/Lyon University, Lyon, France, <sup>5</sup>Institute for Biochemistry, Goethe University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany, <sup>6</sup>Swiss Federal Institute of Technology, Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zurich, Zurich, Switzerland, <sup>7</sup>Structural Biology and Biophysics Unit, Fondazione Ri.MED, Palermo, Italy, <sup>8</sup>National Center of Nuclear Magnetic Resonance (CNRMN, CENABIO), Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>9</sup>Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>10</sup>Multidisciplinary Center for Research in Biology (NUMPEX), Campus Duque de Caxias Federal University of Rio de Janeiro, Duque de Caxias, Brazil, <sup>11</sup>Institute for Molecular Virology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, United States, <sup>12</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>13</sup>Department of Chemistry, University of California, Irvine, CA, United States, <sup>14</sup>LCP, NIDDK, NIH, Bethesda, MD, United States, <sup>15</sup>Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, Grenoble, France, <sup>16</sup>Latvian Institute of Organic Synthesis, Riga, Latvia, <sup>17</sup>BMWZ and Institute of Organic





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijbiomac](http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac)

## Insights into the specificity for the interaction of the promiscuous SARS-CoV-2 nucleocapsid protein N-terminal domain with deoxyribonucleic acids

Icaro Putinhon Caruso<sup>a,b,i,\*</sup>, Vitor dos Santos Almeida<sup>c,i</sup>, Mariana Juliani do Amaral<sup>d,e,i</sup>, Guilherme Caldas de Andrade<sup>a,c,i</sup>, Gabriela Rocha de Araújo<sup>a,c,i</sup>, Talita Stelling de Araújo<sup>a,e,i</sup>, Jéssica Moreira de Azevedo<sup>a,e,i</sup>, Glaucete Moreno Barbosa<sup>a,c,i</sup>, Leonardo Bartkevihi<sup>a,c,i</sup>, Peter Reis Bezerra<sup>a,c,i</sup>, Katia Maria dos Santos Cabral<sup>a,e,i</sup>, Isabella Otênio de Lourenço<sup>b,i</sup>, Clara L.F. Malizia-Motta<sup>f,i</sup>, Aline de Luna Marques<sup>a,g,i</sup>, Nathane Cunha Mebus-Antunes<sup>a,i</sup>, Thais Cristtina Neves-Martins<sup>a,i</sup>, Jéssica Maróstica de Sá<sup>b,i</sup>, Karoline Sanches<sup>b,i</sup>, Marcos Caique Santana-Silva<sup>a,g,i</sup>, Ariana Azevedo Vasconcelos<sup>a,c,i</sup>, Marcius da Silva Almeida<sup>a,e,i</sup>, Gisele Cardoso de Amorim<sup>a,g,i</sup>, Cristiane Dinis Anobom<sup>c,f,i</sup>, Andrea T. Da Poian<sup>a,i</sup>, Francisco Gomes-Neto<sup>c,h,i</sup>, Anderson S. Pinheiro<sup>f,i</sup>, Fabio C. L. Almeida<sup>a,c,i,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Multiuser Center for Biomolecular Innovation (CMIB), Department of Physics, São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, Brazil

<sup>c</sup> National Center of Nuclear Magnetic Resonance (CNRMN), CENABIO, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>e</sup> Protein Advanced Biochemistry (PAB), CENABIO, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>f</sup> Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>g</sup> Multidisciplinary Center for Research in Biology (NUMPEX), Campus Duque de Caxias Federal University of Rio de Janeiro, Duque de Caxias, Brazil

<sup>h</sup> Laboratory of Toxinology, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>i</sup> Rio BioNMR Network, Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

SARS-CoV-2 nucleocapsid protein  
DNA/RNA binding protein  
Binding specificity

## ABSTRACT

The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (N) is a multifunctional promiscuous nucleic acid-binding protein, which plays a major role in nucleocapsid assembly and discontinuous RNA transcription, facilitating the template switch of transcriptional regulatory sequences (TRS). Here, we dissect the structural features of the N protein N-terminal domain (N-NTD) and N-NTD plus the SR-rich motif (N-NTD-SR) upon binding to single and double-stranded TRS DNA, as well as their activities for dsTRS melting and TRS-induced liquid-liquid phase separation (LLPS). Our study gives insights on the specificity for N-NTD(-SR) interaction with TRS. We observed an approximation of the triple-thymidine (TTT) motif of the TRS to  $\beta$ -sheet II, giving rise to an orientation difference of  $\sim 25^\circ$  between dsTRS and non-specific sequence (dsNS). It led to a local unfavorable energetic contribution that might trigger the melting activity. The thermodynamic parameters of binding of ssTRSs and dsTRS suggested that the duplex dissociation of the dsTRS in the binding cleft is entropically favorable. We showed a preference for TRS in the formation of liquid condensates when compared to NS. Moreover, our results on DNA binding may serve as a starting point for the design of inhibitors, including aptamers, against N, a possible therapeutic target essential for the virus infectivity.

\* Correspondence to: I.P. Caruso, Multiuser Center for Biomolecular Innovation (CMIB), Department of Physics, São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, Brazil.

\*\* Correspondence to: F.C.L. Almeida, National Center of Nuclear Magnetic Resonance (CNRMN), CENABIO, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail addresses: [icaro.caruso@unesp.br](mailto:icaro.caruso@unesp.br) (I.P. Caruso), [falmeida@bioqmed.ufrj.br](mailto:falmeida@bioqmed.ufrj.br) (F.C.L. Almeida).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.121>

Received 31 October 2021; Received in revised form 17 January 2022; Accepted 18 January 2022

Available online 22 January 2022

0141-8130/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.



OPEN

# On the caveats of a multiplex test for SARS-CoV-2 to detect seroconversion after infection or vaccination

Lorena O. Fernandes-Siqueira<sup>1,4</sup>, Fabiana A. P. Ferreira<sup>1,4</sup>, Bruna G. Sousa<sup>1</sup>, Nathane C. Mebus-Antunes<sup>1</sup>, Thais C. Neves-Martins<sup>1</sup>, Fabio C. L. Almeida<sup>1,2</sup>, Gustavo C. Ferreira<sup>1</sup>, Didier Salmon<sup>1</sup>, Luciana S. Wermelinger<sup>3</sup> & Andrea T. Da Poian<sup>1</sup>✉

The Covid-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, has resulted in over 6 million reported deaths worldwide being one of the biggest challenges the world faces today. Here we present optimizations of all steps of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based test to detect IgG, IgA and IgM against the trimeric spike (S) protein, receptor binding domain (RBD), and N terminal domain of the nucleocapsid (N-NTD) protein of SARS-CoV-2. We discuss how to determine specific thresholds for antibody positivity and its limitations according to the antigen used. We applied the assay to a cohort of 126 individuals from Rio de Janeiro, Brazil, consisting of 23 PCR-positive individuals and 103 individuals without a confirmed diagnosis for SARS-CoV-2 infection. To illustrate the differences in serological responses to vaccinal immunization, we applied the test in 18 individuals from our cohort before and after receiving ChAdOx-1 nCoV-19 or CoronaVac vaccines. Taken together, our results show that the test can be customized at different stages depending on its application, enabling the user to analyze different cohorts, saving time, reagents, or samples. It is also a valuable tool for elucidating the immunological consequences of new viral strains and monitoring vaccination coverage and duration of response to different immunization regimens.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was first identified in December 2019 in Wuhan, China, and has rapidly spread worldwide, as the causative agent for the current Covid-19 pandemic (CORONA-Virus Disease 2019)<sup>1,2</sup>. This betacoronavirus is an enveloped positive-sense single-stranded RNA virus formed by four structural proteins: nucleocapsid (N), membrane (M), envelope (E), and spike (S). SARS-CoV-2 entry into the target cells involves the binding of a region of S protein, the receptor binding domain (RBD), to the cell surface angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)<sup>3</sup>. Most infected people have cold-like symptoms or are asymptomatic. However, in some individuals, infection may result in a multisystem disease, progressing mainly to an acute respiratory distress syndrome (ARDS). So far, over 6 million deaths have been associated to Covid-19 around the world<sup>4</sup>.

Social distancing, use of masks and immunization are the most effective strategies to control the dissemination of the disease<sup>5-7</sup>. Therefore, populational testing is critical to accurately monitor the course of the disease and drive policies for the mitigation of the disease outcomes<sup>8</sup>. Additionally, there is a latent risk of the emergence of new variants<sup>9</sup> with greater virulence or for which the effectiveness of the vaccines is reduced. These factors pinpoint the importance of customizable tests for the antigens of interest, allowing a quick and effective response in monitoring infection, as well as contributing to the elucidation of the immunological consequences of the new strains.

Serological tests vary in their individual performance characteristics. Currently, they are not recommended to assess for immunity to SARS-CoV-2 following vaccination since some of the tests do not detect the antibodies generated by Covid-19 vaccines<sup>10</sup>. In this context, a wide variety of assays to detect immunological reactivity

<sup>1</sup>Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil. <sup>2</sup>National Center for Structural Biology and Bioimaging (CENABIO), Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil. <sup>3</sup>School of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil. <sup>4</sup>These authors contributed equally: Lorena O. Fernandes-Siqueira and Fabiana Abdalla. ✉email: dapoian@bioqmed.ufrj.br

## SARS-CoV-2

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202205858

International Edition: doi.org/10.1002/anie.202205858

German Edition: doi.org/10.1002/ange.202205858

# Comprehensive Fragment Screening of the SARS-CoV-2 Proteome Explores Novel Chemical Space for Drug Development

Hannes Berg<sup>+</sup>, Maria A. Wirtz Martin<sup>+</sup>, Nadide Altincekic<sup>+</sup>, Islam Alshamleh, Jasleen Kaur Bains, Julius Blechar, Betül Ceylan, Vanessa de Jesus, Karthikeyan Dhamotharan, Christin Fuks, Santosh L. Gande, Bruno Hargittay, Katharina F. Hohmann, Marie T. Hutchison, Sophie Marianne Korn, Robin Krishnathas, Felicitas Kutz, Verena Linhard, Tobias Matzel, Nathalie Meiser, Anna Niesteruk, Dennis J. Pyper, Linda Schulte, Sven Trucks, Kamal Azzaoui, Marcel J. J. Blommers, Yojana Gadiya, Reagon Karki, Andrea Zaliani, Philip Gribbon, Marcius da Silva Almeida, Cristiane Dinis Anobom, Anna L. Bula, Matthias Bütikofer, Ícaro Putinhon Caruso, Isabella Caterina Felli, Andrea T. Da Poian, Gisele Cardoso de Amorim, Nikolaos K. Fourkiotis, Angelo Gallo, Dhiman Ghosh, Francisco Gomes-Neto, Oksana Gorbatyuk, Bing Hao, Vilius Kurauskas, Lauriane Lecoq, Yunfeng Li, Nathane Cunha Mebus-Antunes, Miguel Mompeán, Thais Cristtina Neves-Martins, Martí Ninot-Pedrosa, Anderson S. Pinheiro, Letizia Pontoriero, Yulia Pustovalova, Roland Riek, Angus J. Robertson, Marie Jose Abi Saad, Miguel Á. Treviño, Aikaterini C. Tsika, Fabio C. L. Almeida, Ad Bax, Katherine Henzler-Wildman, Jeffrey C. Hoch, Kristaps Jaudzems, Douglas V. Laurents, Julien Orts, Roberta Pierattelli, Georgios A. Spyroulias, Elke Duchardt-Ferner, Jan Ferner, Boris Fürtig, Martin Hengesbach, Frank Löhr, Nusrat Qureshi, Christian Richter, Krishna Saxena, Andreas Schlundt, Sridhar Sreeramulu, Anna Wacker, Julia E. Weigand, Julia Wirmer-Bartoschek, Jens Wöhnert, and Harald Schwalbe\*

**Abstract:** SARS-CoV-2 (SCoV2) and its variants of concern pose serious challenges to the public health. The variants increased challenges to vaccines, thus necessitating for development of new intervention strategies including anti-virals. Within the international Covid19-NMR consortium, we have identified binders targeting the RNA genome of SCoV2. We established protocols for the production and NMR characterization of more than 80 % of all SCoV2 proteins. Here, we performed an NMR screening using a fragment library for binding to 25 SCoV2 proteins and identified hits also against previously unexplored SCoV2 proteins. Computational mapping was used to predict binding sites and identify functional moieties (chemotypes) of the ligands occupying these pockets. Striking consensus was observed between NMR-detected binding sites of the main protease and the computational procedure. Our investigation provides novel structural and chemical space for structure-based drug design against the SCoV2 proteome.

## Introduction

SARS-CoV-2 (SCoV2) is the cause for the COVID-19 pandemic resulting in more than 5 million deaths across the world and continues to pose serious challenges to public health and safety.<sup>[1]</sup> Countering the continuously evolving virus has not only seen an unprecedented success in the vaccine development but also given birth to several novel campaigns for anti-viral drug discovery,<sup>[2,3]</sup> including the recently approved oral antivirals paxlovid (Pfizer) and molnupiravir (Merck & Co.).<sup>[4-6]</sup>

The extensively mutated and highly infective variant of SCoV2, Omicron,<sup>[7]</sup> is resistant to several therapeutic antibodies,<sup>[8,9]</sup> evades double immunization,<sup>[8,10]</sup> and dominates the pandemic in 2022, calling for the development of new therapeutic strategies in combating the virus, specifically, by exploiting the conserved features.<sup>[11,12]</sup>

The SCoV2 genome consists of an ≈29.9 kb long positive-sense single-stranded RNA,<sup>[13]</sup> two-thirds of which comprises the open-reading frames (ORF) 1a and 1ab. Both ORFs encode polyproteins, which are proteolytically processed into 16 different non-structural proteins (nsp1-

# Curriculum Vitae

- **Nome:** Nathane Cunha Mebus Antunes.
- **Nascimento:** 26/07/1992.
- **Naturalidade:** Brasileira.

## Formação Acadêmica

- **Graduação:** Biomedicina, Universidade Católica de Petrópolis, 2012-2016.
- **Mestrado:** Química Biológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016-2018.
- **Doutorado:** Química Biológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018-2022.

## Orientação de Estudante

1. Maria Luíza Resende Damasceno – 2017 – 2019.
2. Chiara Donnangelo Pimentel – 2022.

## Publicações

1. **Mebus-Antunes, N. C.**, Ferreira, W. S., Barbosa, G. M., Neves-Martins, T. C., Weissmuller, G., Almeida, F. C., & Da Poian, A. T. (2022). The interaction of dengue virus capsid protein with negatively charged interfaces drives the in vitro assembly of nucleocapsid-like particles. *PLoS one*, 17(3), e0264643.
2. Neves-Martins, T. C., **Mebus-Antunes, N. C.**, Caruso, I. P., Almeida, F. C., & Da Poian, A. T. (2021). Unique structural features of flaviviruses' capsid proteins: new insights on structure-function relationship. *Current Opinion in Virology*, 47, 106-112.
3. Ortlieb, L. O., Caruso, Í. P., **Mebus-Antunes, N. C.**, Da Poian, A. T., Petronilho, E. D. C., Figueroa-Villar, J. D., ... & Almeida, F. C. (2022). Searching for drug leads targeted to the hydrophobic cleft of dengue virus capsid protein. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 287-298.
4. Caruso, I. P., dos Santos Almeida, V., do Amaral, M. J., de Andrade, G. C., de Araújo, G. R., de Araújo, T. S., ... & Almeida, F. C. (2022). Insights into the specificity for the interaction of the promiscuous SARS-CoV-2 nucleocapsid protein N-terminal domain with deoxyribonucleic acids. *International journal of biological macromolecules*, 203, 466-480.
5. Altincekic, N., Korn, S. M., Qureshi, N. S., Dujardin, M., Ninot-Pedrosa, M., Abele, R., ... & Schlundt, A. (2021). Large-scale recombinant production of the SARS-CoV-2 proteome for high-throughput and structural biology applications. *Frontiers in molecular biosciences*, 89.
6. Fernandes-Siqueira, L. O., Ferreira, F. A., Sousa, B. G., **Mebus-Antunes, N. C.**, Neves-Martins, T. C., Almeida, F. C., ... & Da Poian, A. T. (2022). On the caveats of a multiplex test for SARS-CoV-2 to detect seroconversion after infection or vaccination. *Scientific reports*, 12(1), 1-14.
7. Berg, H., Wirtz Martin, M. A., Altincekic, N., Alshamleh, I., Kaur Bains, J., Blechar, J., ... & Schwalbe, H. (2022). Comprehensive Fragment Screening of the SARS-CoV-2 Proteome Explores Novel Chemical Space for Drug Development. *Angewandte Chemie*, 61(46):e202205858.