

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

GABRIELA ROCHA DE ARAÚJO

**USANDO ESTADOS INVISÍVEIS PARA A
DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS
DA PROTEÍNA NUCLEOCAPSÍDICA DO VÍRUS DENGUE
SOROTIPO 2 LIGADA A ÁCIDO NUCLEICO**

INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA LEOPOLDO DE MEIS

RIO DE JANEIRO

2021

GABRIELA ROCHA DE ARAÚJO

**USANDO ESTADOS INVISÍVEIS PARA A
DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS
DA PROTEÍNA NUCLEOCAPSÍDICA DO VÍRUS DENGUE
SOROTIPO 2 LIGADA A ÁCIDO NUCLEICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Fabio Ceneviva Lacerda Almeida

Coorientadora: Andrea Thompson Da Poian

RIO DE JANEIRO

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

A663u Araújo, Gabriela Rocha de
 Usando estados invisíveis para a determinação das
propriedades estruturais da proteína nucleocapsídica
do vírus Dengue sorotipo 2 ligada a ácido nucleico /
Gabriela Rocha de Araújo. -- Rio de Janeiro, 2021.
 74 f.

 Orientador: Fabio Ceneviva Lacerda Almeida.
 Coorientadora: Andrea Thompson Da Poian.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica
Leopoldo de Meis, Programa de Pós-Graduação em Química
Biológica, 2021.

 1. Dengue. 2. RMN. 3. Dinâmica. 4. Proteína
Nucleocapsídica. 5. Estados Invisíveis. I. Ceneviva
Lacerda Almeida, Fabio, orient. II. Thompson Da
Poian, Andrea, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

USANDO ESTADOS INVISÍVEIS PARA A DETERMINAÇÃO DAS
PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA NUCLEOCAPSÍDICA DO
VÍRUS DENGUE SOROTIPO 2 LIGADA A ÁCIDO NUCLEICO

Gabriela Rocha de Araújo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Rio de Janeiro, 22 de outubro de 2021.

Aprovada por:

Dr. Fabio Ceneviva Lacerda Almeida
Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica/ CCS/ UFRJ

Dr^a Andrea Thompson Da Poian
Professora Titular do Instituto de Bioquímica Médica/ CCS/ UFRJ

Dr^a Russolina Benedeta Zingali
Professora Titular do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/ UFRJ

Dr^a Andrea Cheble de Oliveira
Professora Associada do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/ UFRJ

Dr. Jarbas Magalhães Resende
Professor Associado do Departamento de Química/UFGM

Dr. Julio Alberto Mignaco
Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/ UFRJ

Dr. Roberto Kopke Salinas
Professor Doutor do Departamento de Bioquímica/IQ/USP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, por me acolher e amparar nos momentos de desespero. Agradeço aos meus pais, o apoio e paciência mesmo quando a minha falta. Vocês nunca deixaram de acreditar em mim.

Às minhas avós, que não estão mais aqui e não puderam participar deste momento comigo, mas que me viram entrar na graduação e sei o quanto estariam orgulhosas de ver o quanto conquistei e amadureci. Elas sempre foram minhas grandes incentivadoras, e sempre me apoiaram para que eu fizesse o que gosto.

Ao meu namorado, Felipe, e sua paciência quase inesgotável, que vem me acompanhando por esse quase último ano e tem sido de apoio, ajuda e incentivo excepcional, seja entendendo minhas ausências na escrita ou me acompanhando nessas horas e tornando este momento mais leve, sempre vibrando junto à cada conquista, por menor que seja.

Ao meu orientador, Fabio, pela confiança que deposita em mim a cada dia, pela empolgação com cada experimento, cada resultado, e por todo o auxílio e conhecimento que transmite com tanta boa vontade.

À minha coorientadora, Andréa, por todas as discussões de experimentos, por toda a visão e experiência que, sem dúvida alguma, enriquecem mais a cada dia este trabalho e meu senso crítico.

Aos meus amigos do CNRMN e do Laboratório de Bioquímica de Vírus, que tornaram a rotina muito mais prazerosa e divertida, além de todo o acolhimento no início e da ajuda por todo o percurso até aqui. Sem vocês isso seria impossível.

Agradeço especialmente à Christine, que me orientou no início do projeto, e à Glauce, que me acompanha desde então, e que participaram ativamente da construção dos dados neste projeto. Agradeço também à Thaís e à Nathane, que também são parte deste grupo da proteína C e sempre estavam disponíveis pra tirar uma dúvida ou me ceder um pouquinho de tampão, rs.

Agradeço especialmente ao Peter e à Aline, que vêm trabalhando comigo no projeto de covid desde o início da pandemia, na hora que todos estavam em casa e nós já estávamos no laboratório pesquisando sobre o vírus. O que começou como uma parceira de trabalho com pessoas até então desconhecidas se tornou uma grande amizade, e hoje posso dizer que posso contar com eles pra muito mais. Agradeço também à Ariana e Aléxia, que se juntaram ao grupo mais tardiamente, mas se tornaram amizades muito especiais.

Não posso deixar também de agradecer à minha grande amiga Juliana, que esteve comigo desde o primeiro período da faculdade, desde o primeiro laboratório, e mesmo durante uma pandemia. Senti muita falta no convívio do dia-a-dia e estou adorando ter voltado com nossos almoços e fugidinhas pro cafezinho no lanche da tarde. Pena que escolheu outra área e não quer ser minha parceira de bancada, rs

Agradeço por ter tido a oportunidade de participar do grupo COVID19-NMR pela rede RMN-Rio. O projeto, além de grande importância prática, ajudou muito no meu crescimento como cientista. Muito mais do que aprender sobre as técnicas, entendi na prática como o trabalho em grupo e colaborações fazem a ciência muito mais interessante.

Agradeço a todos os outros que colaboraram de alguma forma para que este trabalho fosse possível e não foram citados, assim como às agências de fomento.

Muito obrigada!

RESUMO

ARAÚJO, Gabriela Rocha de. **USANDO ESTADOS INVISÍVEIS PARA A DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DA PROTEÍNA NUCLEOCAPSÍDICA DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 2 LIGADA A ÁCIDO NUCLEICO**. Rio de Janeiro, 2021. Dissertação de Mestrado - Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A estrutura do vírus Dengue (DENV) sorotipo 2 (DENV2) foi determinada por criomicroscopia eletrônica (Crio-EM), demonstrando a estrutura icosaédrica do envelope viral com 180 cópias das proteínas E e M. Não há, porém, resolução estrutural do nucleocapsídeo (NC), pois o mesmo apresenta densidade eletrônica consideravelmente mais reduzida em relação às outras proteínas estruturais. Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a falta de densidade eletrônica do NC nos dados de Crio-EM: (i) o NC apresenta estrutura organizada, mas seus eixos de simetria não se alinham com o envelope; (ii) o NC tem estrutura assimétrica com orientação aleatória dentro do envelope icosaédrico; ou (iii) há um equilíbrio dinâmico, com a existência de um estado intermediário, no processo de formação do NC. A proteína do capsídeo do DENV2 (DENV2C2), de ~12 kDa, apresenta 100 resíduos, forma um dímero estável composto por quatro hélices α e uma região N-terminal flexível intrinsecamente desordenada (IDR). Ela também interage com o RNA viral, tendo papel crucial no empacotamento do genoma e formação do NC. Nosso grupo vem trabalhando no estudo da montagem do NC *in vitro*, demonstrando por microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura a formação de um nucleocapsídeo-*like* (NC-*like*) organizado, mas bastante dinâmico, a partir da adição de oligonucleotídeos como o 5' GGG GG 3' (5G). Nosso objetivo é

compreender o equilíbrio entre dímero e oligômeros na montagem do capsídeo. Neste trabalho, abordamos o desafio de medir as propriedades da forma ligada a ácidos nucleicos da DENVC2. A grande dificuldade é que a ligação com ácido nucleico é o gatilho para a oligomerização e precipitação. Usamos uma relação molar 5G:DENVC2 < 0,5, na qual apenas oligômeros solúveis são formados. Usando Ressonância Magnética Nuclear em solução mostramos que a intensidade dos sinais da proteína diminui com a adição de 5G, levando à formação de espécies invisíveis (estados de maior energia, excitados) em solução, oligoméricas ou intermediárias da oligomerização. Para caracterizar as propriedades destas espécies, medimos as propriedades de relaxação ($^{15}\text{N}-R_2$) e a exposição dos grupos amídicos (NH) ao solvente, usando um composto de coordenação paramagnético de gadolínio. Os dados de dispersão de relaxação via CPMG (Método de Carr-Purcell-Meiboom-Gill) permitiram caracterizar as propriedades do estado ligado ao 5G. A forma ligada apresenta mudanças significativas no esqueleto aromático localizado no eixo de simetria da DENVC2, se estendendo da hélice α_4 até a α_1 . Estes dados mostram a presença de um equilíbrio dímero/oligômero rápido, e mostram que esta abordagem pode ser usada para revelar estados transitórios da estrutura nucleocapsídica não detectados por outras metodologias.

Palavras-Chave: Dengue, Ressonância Magnética Nuclear, dinâmica, proteína nucleocapsídica, estados invisíveis.

ABSTRACT

The structure of Dengue virus (DENV) serotype 2 (DENV2) was determined by cryomicroscopy (Cryo-EM), demonstrating the icosahedral structure of the viral envelope with 180 copies of E and M proteins. However, there is no structural resolution of the nucleocapsid (NC), as it has a considerably lower electron density compared to other structural proteins. Some hypotheses were raised to explain the lack of electronic density of the NC in the Cryo-EM data: (i) the NC has an organized structure, but its symmetry axes do not align with the envelope; (ii) the NC has an asymmetric structure with random orientation within the icosahedral envelope; or (iii) there is a dynamic equilibrium, with the existence of an intermediate state in the NC formation process. The capsid protein of DENV serotype 2 (DENV C2), of ~ 12 kDa, has 100 residues, forms a stable dimer composed of four α -helices and an intrinsically disordered flexible N-terminal region (IDR). It also interacts with the viral RNA, playing a crucial role in genome packaging and NC formation. Our group has been working on the study of NC assembly in vitro, demonstrating by atomic force microscopy and scanning electron microscopy the formation of an organized but very dynamic nucleocapsid-like (NC-like) by the addition of oligonucleotides such as 5'GGG GG 3' (5G). Our goal is to understand the balance between dimer and oligomers in the capsid assembly. In this work, we address the challenge of measuring the properties of the nucleic acid-bound form of DENV C2. The great difficulty is that binding with nucleic acid is the trigger for oligomerization and precipitation. We use a 5G:DENV C2 molar ratio <0.5 , in which only soluble oligomers are formed. Using Nuclear Magnetic Resonance in solution we showed that the intensity of protein signal decreases with the addition of 5G, leading to the formation of invisible species (higher energy, excited states) in solution, oligomeric or intermediates of oligomerization. To characterize the properties of these species, we measured the relaxation properties (^{15}N - R_2) and the exposure of the amide groups (NH) to the solvent, using a gadolinium paramagnetic coordination compound. The relaxation dispersion data via CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill method) allowed us to characterize the properties of the bound state of 5G. The bound form presents significant changes in the aromatic skeleton located in the

symmetry axis of DENVC2, extending from the $\alpha 4$ to the $\alpha 1$ helix. These data show the presence of a rapid dimer/oligomer balance, and show that this approach can be used to reveal transient states of the nucleocapsid structure not detected by other methodologies.

Keywords: Dengue, Solution Nuclear Magnetic Resonance, dynamics, nucleocapsid protein, invisible states.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral da estrutura do DENV por Crio-EM na resolução de 3,5 Å.....	2
Figura 2. O ciclo de infecção por DENV.	5
Figura 3. Estrutura da DENVC2 por RMN em solução.	7
Figura 4. Interações no dímero de DENVC2.....	8
Figura 5. Modelo de interações moleculares entre os componentes estruturais da DENVC2.	9
Figura 6. Estrutura da DENV por Crio-EM.....	10
Figura 7. Escala de tempo acessível para experimentos de RMN.	13
Figura 8. Visão geral esquemática da espectroscopia de RMN de dispersão de relaxação por CPMG.	14
Figura 9. Esquema do processo de formação do NC-like.	15
Figura 10. Estrutura do composto paramagnético de Gadolínio (Gd-dietilenotriamina ácido pentacético-bismetilamida, Gd-DTPA-BMA).	21
Figura 11. Espectro 1D ^1H-^{15}N-HSQC de 50 μM de DENVC2 na presença de concentrações crescentes de 5G (de 1:0 a 1:1, do mais ao menos intenso em 8,16 ppm) em pH 6,0.....	25
Figura 12. Intensidade relativa (I/I_0) do sinal de RMN do dímero da DENVC2 na presença de concentrações crescentes de 5G em pH 6,0.....	25
Figura 13. Intensidade relativa (I/I_0) do sinal de RMN do dímero da DENVC2 (^1H-^{15}N-HSQC unidimensional) na presença de concentrações crescentes do ácido nucleico 5G em pH 7,4.	26
Figura 14. Intensidade relativa (I/I_0) do sinal de RMN do dímero da DENVC2 (^1H-^{15}N-HSQC unidimensional) em diferentes concentrações de NaCl na presença de concentração crescente do ácido nucleico 5G em pH 6,0....	27
Figura 15. Intensidade do sinal de cada resíduo de aminoácido ao longo da titulação com a sonda solúvel Gd-DTPA-BMA, na presença ou ausência do	

ácido nucleico 5G, em pH 6,0, por alargamento paramagnético em solução (sPRE).	28
Figura 16. Estrutura da DENVC2 em visão lateral, colorida de acordo com a exposição dos resíduos ao solvente após titulação com a sonda solúvel Gd-DTPA-BMA na presença e ausência do ácido nucleico 5G, em pH 6,0, por sPRE.	29
Figura 17. $^{15}\text{N-R}_2$ de DENVC2 em pH 6,0, à temperatura de 298 K (A) ou 308 K (B), na presença e ausência de 20 % de oligonucleotídeo 5G.	30
Figura 18. R_2^{eff} de DENVC2.	31
Figura 19. $\Delta\omega$ de DENVC2 nas frequências de ressonância 600,03 MHz e 800,4 MHz na presença (vermelho) e ausência (azul) de 10 % de oligonucleotídeo 5G.	32
Figura 20. Perfis individuais de $\Delta\omega$ dos resíduos Q4, V26 e F84 de DENVC2.	32
Figura 21. $ \Delta\Delta\omega $ de DENVC2 nas frequências de ressonância 600,03 MHz e 800,4 MHz na presença e ausência de 10% de oligonucleotídeo 5G.	33
Figura 22. Estrutura da DENVC2 apresentada em visão lateral e inferior, colorida de acordo com os valores de $ \Delta\Delta\omega $, de menor (azul) a maior (vermelho).	33
Figura 23. $^{15}\text{N-CSP}$ obtido a partir de deslocamentos químicos ^1H e ^{15}N em espectros de 2D [$^1\text{H-}^{15}\text{N}$] HSQC adquiridos em pH 6,0 na temperatura de 293 K, na presença e ausência de 10 % de 5G, em função do número do resíduo de DENVC2.	34
Figura 24. Estrutura da DENVC2 apresentada em visão lateral e superior, colorida de acordo com os valores de $^{15}\text{N-CSP}$, de menor (azul) a maior (vermelho).	35
Figura 25. Perfis de CEST para os resíduos L44, A63, I78 e R82 da proteína DENVC2 na presença e ausência de 5 % de 5G (DENVC2 1:0,05 5G).	36
Figura 26. Partícula imatura de ZIKV por Crio-EM.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹⁵ N-CSP	Perturbação do Deslocamento Químico do ¹⁵ N
5G	5' GGG GG 3'
AFM	Microscopia de Força Atômica
CcpNmr	“Collaborative Computing Project for NMR”
CEST	“Chemical Exchange Saturation Transfer”
CL	Corpúsculos Lipídicos
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
Crio-EM	Criomicroscopia Eletrônica
DENV	Vírus Dengue
DENV1 a DENV4	Vírus Dengue sorotipos 1 a 4
DENVC	Proteína do Capsídeo do DENV
DENVC2	Proteína do Capsídeo do DENV sorotipo 2
DI	Domínio central da glicoproteína E
DII	Domínio II da glicoproteína E
DIII	Domínio de ligação ao receptor da glicoproteína E
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidade Ótica em 600 nm
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
Gd-DTPA-BMA	Gd-dietilenotriamina ácido pentacético-bismetilamida
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfônico
HSQC	“Heteronuclear Single-Quantum Coherence”
IDR	Região Intrinsecamente Desordenada
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
LB	Meio de Cultura Luria-Bertani
M9	Meio Mínimo para Cultura
NC	Nucleocapsídeo
NC-like	Nucleocapsídeo do DENV2 produzido <i>in vitro</i>

NOE	“Nuclear Overhauser Effect”
NS	Proteínas Não-Estruturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
pET	Plasmídeo para Expressão de T7 RNA Polimerase
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
Proteína C	Proteína do Capsídeo
Proteína E	Proteína do Envelope
Proteína M	Proteína da Membrana Madura
Proteína prM	Proteína Precursora da Proteína de Membrana
RE	Retículo Endoplasmático
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RMN	Ressonância Magnética Nuclear em solução
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
siRNA	RNA interferente pequeno
sPRE	Alargamento de Relaxação Paramagnética em Solução
ssDNA	DNA de fita simples
ssRNA	RNA de fita simples
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGN	Rede Trans-Golgi
VLPs	Partículas Semelhantes a Vírus
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Vírus Dengue (DENV)	1
1.1.1. Estrutura do DENV	1
1.1.2. Entrada, Replicação e Montagem do DENV	3
1.2. Proteína C do DENV (DENVC)	6
1.2.1. Estrutura e Função da Proteína C	6
1.2.2. Formação do Nucleocapsídeo de Flavivírus	9
1.3. Técnicas para Estudos Estruturais de Capsídeos	11
1.3.1. Ressonância Magnética Nuclear em solução (RMN)	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Expressão e purificação da proteína DENVC2	17
3.1.1. Expressão da proteína isotopicamente marcada com ¹⁵ N.....	17
3.1.2. Purificação da proteína	18
3.1.3. Separação de proteínas por SDS-PAGE	19
3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	19
3.2.1. Alargamento Paramagnético em solução (sPRE).....	20
3.2.2. Propriedades de relaxação transversal (¹⁵ N- <i>R</i> ₂) da DENVC2..	21
3.2.3. Dispersão de relaxamento por Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).....	22
3.2.4. Transferência de saturação por troca química (“Chemical Exchange Saturation Transfer”, CEST).....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Titulação de DENVC2 em diferentes concentrações e pHs com oligonucleotídeo 5G.	24

4.2. Titulação de DENVC2 em diferentes concentrações de NaCl com oligonucleotídeo 5G	26
4.3. Alargamento paramagnético em solução (sPRE) com a sonda solúvel Gd-DTPA-BMA	27
4.4. Propriedades de Relaxação transversal ($^{15}\text{N-R}_2$) da DENVC2	29
4.5. Dispersão de Relaxação via CPMG	30
4.6. Perturbação do Deslocamento Químico do ^{15}N ($^{15}\text{N-CSP}$) no estado fundamental	34
4.7. Transferência de saturação via troca conformacional (CEST)	35
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS	45
ANEXO I	51
ANEXO II	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Vírus Dengue (DENV)

O vírus dengue (DENV) é o patógeno viral transmitido por artrópodes mais significativo em humanos, estimando-se que cause cerca de 390 milhões de infecções por ano (BHATT et al., 2013); suas epidemias colocam um pesado fardo sobre a saúde pública e tem enorme impacto econômico nos países afetados. Membro do gênero *Flavivirus*, que inclui outros patógenos humanos emergentes e reemergentes importantes, como o vírus Zika (ZIKV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV), o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus da febre amarela (YFV), o DENV é um arbovírus que circula na natureza entre os vetores do mosquito *Aedes* (principalmente *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*) e os humanos (MUSSO, 2015).

1.1.1. Estrutura do DENV

O DENV possui quatro diferentes sorotipos (DENV1 a DENV4), que circulam em regiões tropicais e subtropicais do globo e diferem uns dos outros em 25 a 40 % na sequência de aminoácidos, havendo evidência de que os sorotipos 2 e 3 poderiam contribuir para quadros mais graves (GUZMAN; ISTÚRIZ, 2010; HALSTEAD, 2007). A doença é geralmente autolimitante, mas pode tornar-se letal no caso de evolução para dengue hemorrágica (HASAN et al., 2016). A incidência da doença está crescendo à medida que o mosquito vetor se espalha devido à urbanização, ao crescimento populacional, às viagens internacionais, aos esforços insuficientes de controle do mosquito e ao aquecimento global (BYK; GAMARNIK, 2016).

A estrutura da partícula do DENV foi resolvida por uma combinação das técnicas de criomicroscopia eletrônica (Crio-EM), reconstrução de imagem e cristalografia de raios-X, nas resoluções de 24 Å (KUHN et al., 2002), 9,5 Å (ZHANG et al., 2003a) e 3,5 Å (**Figura 1**), respectivamente, (ZHANG et al., 2013). A partícula, com 50 nm de diâmetro, compreende um núcleo denso de elétrons rodeado por uma bicamada lipídica, à qual 180 cópias das proteínas do envelope (E) e da membrana (prM / M) estão associadas (BYK; GAMARNIK, 2016; CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015). Este envelope abriga um nucleocapsídeo (NC) formado pela proteína do capsídeo (C) ligada ao genoma positivo de RNA de fita simples (ssRNA). Além das três proteínas estruturais, o DENV apresenta

outras sete proteínas não estruturais (NS), chamadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (KUHNS et al., 2002; ZHANG et al., 2003a).

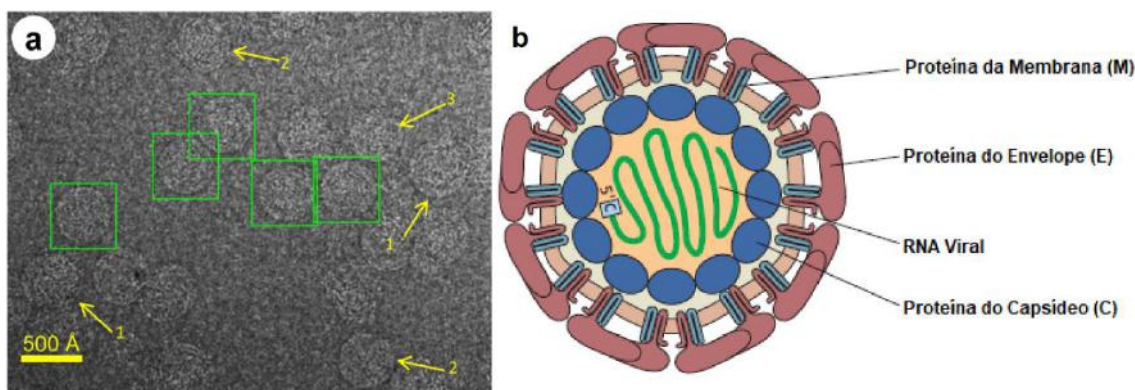


Figura 1. Visão geral da estrutura do DENV por Crio-EM na resolução de 3,5 Å. (a) Partículas nas caixas verdes foram escolhidas para processamento após a exclusão das partículas apontadas pelas setas marcadas como: 1) imaturas; 2) de formato irregular; ou 3) incompletas. Reproduzido de ZHANG et al., 2013. **(b)** Reconstrução por Crio-EM das partículas do vírus da dengue com indicação das proteínas estruturais (M, E e C) e do RNA viral. Adaptado de FLINT et al., 2015.

A proteína E possui 53 kDa e está ancorada ao envelope viral através de duas hélices transmembrana antiparalelas localizadas na extremidade C-terminal. Sua estrutura em cristal revelou que ela compreende três domínios: DI, DII e DIII, sendo DI uma estrutura central de barril β , DII um domínio de dimerização alongado, em formato de dedo, que compreende uma alça de fusão (à membrana endossomal), e DIII uma estrutura de barril β , semelhante à imunoglobulina, que é exposta na superfície de DENV e contém epítomos e motivos de ligação celular (MODIS et al., 2004; ZHANG et al., 2003b, 2004). A flexibilidade estrutural da proteína é conferida por uma dobradiça de quatro fitas entre DI e DII e uma sequência de ligação entre DI e DIII (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015; MODIS et al., 2004).

A proteína M é sintetizada como uma precursora (prM, com cerca de 21 kDa). A prM está presente na partícula imatura de DENV, e sua maturação ocorre na via secretora celular, onde uma protease celular cliva o prM, dando origem à proteína M (8 kDa) e o peptídeo 'pr' (ZHANG et al., 2003a). O ambiente ácido da via secretora induz mudanças conformacionais no heterodímero formado por prM:E e, desse modo, expõe um sítio de clivagem; o prM interage e estabiliza o DII da proteína E, protegendo sua alça de fusão com a estrutura de barril β da sequência pr e evitando alterações conformacionais que poderiam

ativar sua atividade fusogênica durante o transporte (YU et al., 2008). Ao que o DENV recém-formado alcança o endossoma tardio, três resíduos de histidina sensíveis a alteração de pH localizados no segmento N-terminal da proteína M são protonados. Esta reação promove a dissociação do prM:E, permitindo a exposição da alça de fusão da proteína E para a membrana endossomal (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015; GE; ZHOU, 2014; PERERA; KUHN, 2008).

A proteína C, que inicialmente consiste de 114 resíduos de aminoácidos, reduzidos a 100 resíduos na proteína madura, forma um homodímero estável em solução, e tem peso molecular de aproximadamente 12 kDa. Cada monômero contém quatro hélices α (α_1 , α_2 , α_3 e α_4) conectadas por *loops* curtos e uma região N-terminal flexível considerada uma região intrinsecamente desordenada (IDR). A região IDR é composta por 20 resíduos e interage com gotículas lipídicas, organelas às quais a proteína C se associa durante o ciclo de replicação (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015; MARTINS et al., 2012; SAMSA et al., 2009). A proteína C interage com o RNA viral, resultando em um NC e desempenhando um papel crucial no empacotamento do genoma viral. Inesperadamente, a estrutura da proteína C dentro do NC não é discernível por Crio-EM. A falta de densidade eletrônica sugere desordem ou movimentação do NC dentro da partícula do vírus, podendo sugerir uma arquitetura diferenciada do núcleo de NCs de flavivírus em relação à organização estrutural de vírus morfologicamente relacionados, como alfavírus. Nestes, que possuem um nucleocapsídeo bem definido, o núcleo obtém sua simetria icosaédrica do arcabouço de glicoproteínas externas durante o brotamento da célula e formando contatos específicos com o c-terminal das glicoproteínas E2, interação específica que não foi demonstrada para flavivírus. (KUHN et al., 2002; MA et al., 2004).

1.1.2. Entrada, Replicação e Montagem do DENV

O ciclo de infecção por DENV se inicia com a fixação do vírus à célula-alvo por meio da interação entre a proteína E da superfície viral e o receptor na superfície celular. Essa interação permite a internalização da partícula viral, geralmente envolvendo endocitose mediada por receptor, o qual até o momento não foi identificado para o DENV; sabe-se que o vírus entra principalmente por

endocitose mediada por clatrina (ACOSTA; CASTILLA; DAMONTE, 2009, 2012; SCHAAR et al., 2008).

Após a internalização do vírus e acidificação do endossoma, a liberação do genoma viral para o citoplasma – a partir da dissociação do NC – depende do processo de fusão do DENV, que ocorre nos endossomos e demanda uma série de mudanças conformacionais na proteína E, que são induzidas por baixo pH. Primeiro, o homodímero de proteína E se dissocia e se reorganiza em trímeros, nos quais a alça de fusão se torna acessível para se inserir no folheto externo da membrana endossomal (MODIS et al., 2004; ZHANG et al., 2004). Na sequência, a proteína E se dobra sobre si mesma, formando um trímero de estruturas semelhantes a grampos que conduzem a região transmembrana em direção à membrana endossomal, na qual o peptídeo de fusão está ancorado, com a subsequente formação de um poro por onde o genoma viral passa para o citoplasma da célula (BYK; GAMARNIK, 2016; CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015; PIERSON; KIELIAN, 2013).

O genoma viral é um ssRNA senso-positivo, o qual funciona como um RNA mensageiro, sendo usado diretamente para a tradução da poliproteína viral. A síntese desta proteína ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER), e seu processamento nas membranas do retículo endoplasmático (RE) (BYK; GAMARNIK, 2016; CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015). A poliproteína viral é clivada durante e após a tradução em dez proteínas maduras: três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A maioria das proteínas NS são multifuncionais, executando atividades enzimáticas e criando o ambiente adequado para a replicação do RNA viral, incluindo a remodelação das membranas celulares, como a indução de hipertrofia, que fornece estruturas nas quais o genoma é amplificado, e a supressão das respostas antivirais do hospedeiro (GILLESPIE et al., 2010; WELSCH et al., 2009).

A replicação do RNA é catalisada pela NS5 em um processo que requer reconhecimento de promotor específico e ciclização do genoma. Este genoma recém-sintetizado se associa à proteína C para formar o NC, que brota no lúmen do RE, adquirindo a bicamada lipídica, juntamente com as proteínas virais E e prM (BYK; GAMARNIK, 2016; YU et al., 2008). As partículas virais imaturas são então transportadas através da rede Trans-Golgi, na qual a proteólise de prM

mediada por furina desencadeia o rearranjo, homodimerização de E e formação de partículas virais maduras, que são subsequentemente secretadas (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015; YU et al., 2008). Todo o processo está esquematizado simplificada na **Figura 2** abaixo.

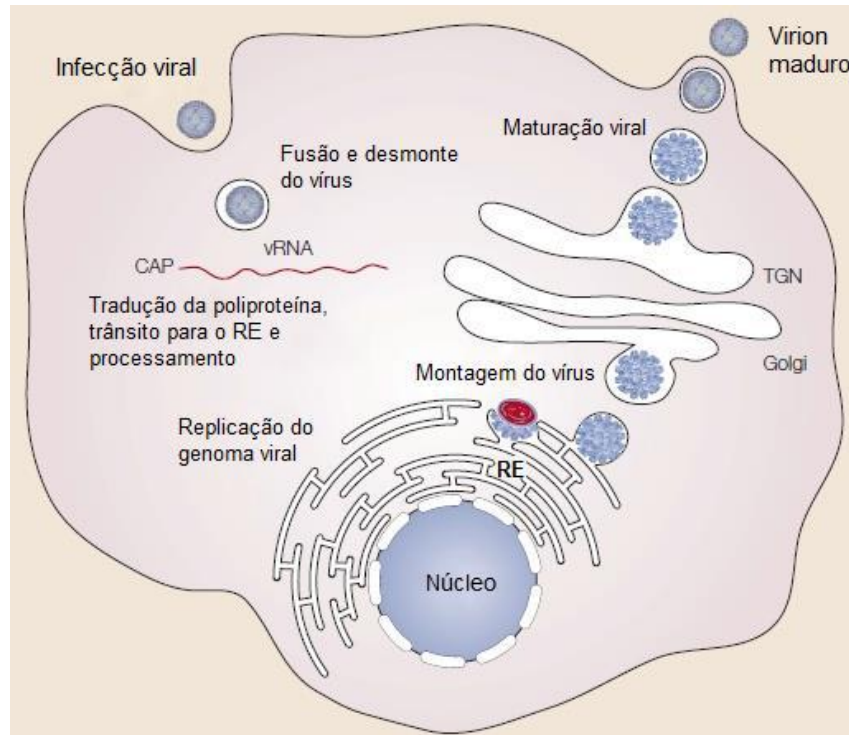


Figura 2. O ciclo de infecção por DENV. O ciclo de infecção por DENV se inicia com a fixação do vírus na superfície de uma célula hospedeira e, subsequentemente, entrada na célula por endocitose mediada por receptor. Após a internalização do vírus, a acidificação do endossoma desencadeia mudanças conformacionais no vírion, fusão das membranas viral e celular, e dissociação do NC, liberando o genoma viral para o citoplasma. No citoplasma, o RNA de fita simples senso-positivo é traduzido em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e do hospedeiro. A replicação do genoma ocorre nas membranas intracelulares. A montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE), quando o genoma recém-sintetizado se associa à proteína C para formar o NC, que brota no lúmen do RE, adquirindo a bicamada lipídica, juntamente com as proteínas estruturais. As partículas virais imaturas resultantes são transportadas através da rede Trans-Golgi, na qual a prM é clivada por furina e se desencadeia o rearranjo, homodimerização de E e formação de partículas virais maduras, que são subsequentemente secretadas. Adaptado de MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005.

Apesar do mecanismo de endocitose descrito, experimentos de rastreamento de partícula única realizados com flavivírus mais recentemente apontaram que a mistura de lipídios entre as membranas virais e celulares era independente da maturação endossomal, e a liberação do genoma viral no citosol só ocorria vários minutos após a mistura dos lipídios. Esses resultados sugerem que a fusão da membrana e a transferência do nucleocapsídeo para o citoplasma podem ser eventos distintos na entrada do vírus. Outros dados recentes apoiam a hipótese do acesso do genoma de DENV ao citoplasma não

ser exclusivamente dependente da fusão mediada pela proteína E induzida por pH (FREIRE et al., 2013; NOUR et al., 2013). Estes dados suportam uma participação adicional da proteína C de DENV na internalização do genoma do vírus, dado que sua forma recombinante, bem como dois peptídeos sintéticos da mesma, compreendendo os resíduos 45-72 e 67-100, foram capazes de transportar sequências curtas de oligonucleotídeos (ssDNA e siRNA) através das membranas celulares, indicando que a infecção por DENV poderia ocorrer por meio de um mecanismo que envolve a penetração direta através da membrana plasmática da célula hospedeira (FREIRE et al., 2013, 2014).

1.2. Proteína C do DENV (DENVC)

1.2.1. Estrutura e Função da Proteína C

A proteína C do DENV é essencial à montagem do vírus para garantir a encapsidação específica do genoma viral. Seu papel crítico é evidente, pois, durante a infecção por flavivírus, a produção e liberação no meio extracelular de partículas semelhantes a vírus (VLPs) é comum, porém, estas VLPs que são liberadas não possuem a proteína C e o RNA viral, o que as torna não infecciosas. Deste modo, a capacidade de E, na presença de prM, de formar um envelope esférico fechado é uma propriedade intrínseca dessas duas proteínas, independente da formação do NC. A produção de partículas infecciosas, no entanto, requer a formação do capsídeo; o mecanismo pelo qual a encapsidação ocorre não é compreendido, mas pode exigir a participação de proteínas virais não estruturais, e sugere que um estágio inicial da montagem do vírus envolve a interação da proteína C com o RNA do genoma (JONES et al., 2003; MA et al., 2004; NEVES-MARTINS et al., 2021).

A forma madura da proteína C do DENV sorotipo 2 (DENVC2) é uma proteína altamente básica, de 12 kDa, que forma homodímeros simétricos em solução, com afinidade tanto para ácidos nucleicos quanto para membranas lipídicas (JONES et al., 2003; SAMSA et al., 2009). O monômero, de 100 resíduos de aminoácidos, contém 26 resíduos básicos e apenas 3 resíduos ácidos, e em sua forma dimérica tem carga líquida global de +46. Essa propriedade, em conjunto a seu tamanho reduzido, confere à DENVC2 uma relação carga/peso molecular (MW) muito alta (+1,97 kDa⁻¹), permitindo sua inclusão na família das proteínas supercarregadas. Como membro dessa família,

a DENVC2 atuaria como um peptídeo de penetração celular, entregando macromoléculas através das membranas, com sua capacidade de translocar ácidos nucleicos já tendo sido descrita por nosso grupo (FREIRE et al., 2013, 2014). O dímero mostra distribuição de carga assimétrica, com os resíduos básicos se acumulando em uma face da molécula e uma superfície apolar côncava no lado oposto (BYK; GAMARNIK, 2016).

Estruturalmente, o monômero se organiza na forma de quatro α -hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 4$), com seu domínio N-terminal se comportando como IDR em solução (JONES et al., 2003). As hélices $\alpha 2$ e $\alpha 4$ de um monômero são antiparalelas às hélices $\alpha 2'$ e $\alpha 4'$ do monômero vizinho, respectivamente; sua estrutura dimérica está representada na **Figura 3**. A região N-terminal não é representada em nenhuma das estruturas desta dissertação, pois a estrutura utilizada (PDB 1R6R) não possui esta região incluída no cálculo. Estes dois pares de hélice formam a maior parte da superfície de contato do dímero, sendo estabilizadas por extensa interação hidrofóbica. A interação entre as hélices $\alpha 4$ – $\alpha 4'$ é crucial para a formação do dímero, estabilidade da proteína e produção de partículas infecciosas, e está representada na **Figura 4a** (BYK; GAMARNIK, 2016; NEVES-MARTINS et al., 2021; TEOH et al., 2014).

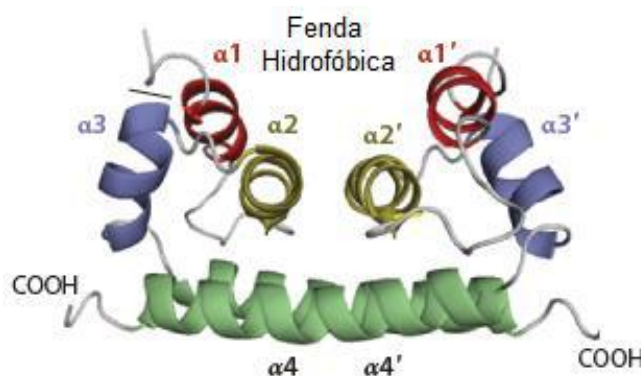


Figura 3. Estrutura da DENVC2 por RMN em solução. O homodímero é representado e as quatro hélices α são indicadas: hélices $\alpha 1$ (vermelho), $\alpha 2$ (amarelo), $\alpha 3$ (azul) e $\alpha 4$ (verde). Uma das duas subunidades de dímero é designada por $\alpha 1'$, $\alpha 2'$, $\alpha 3'$ e $\alpha 4'$. A fenda hidrofóbica é indicada. PDB:1R6R. Adaptado de BYK; GAMARNIK, 2016.

Além disso, foi proposto que a região $\alpha 4$ – $\alpha 4'$, que é rica em resíduos básicos, interage com o RNA viral (JONES et al., 2003). Do mesmo modo, os resíduos básicos na região N-terminal do DENVC2 também contribuiriam para a ligação do RNA e a formação de partículas virais (SAMSA et al., 2012). Podemos

observar diversas interações na interface $\alpha 2 - \alpha 4$, que está representada na **Figura 4b**. A única interação de carga envolve um ácido glutâmico (E87) da $\alpha 4$ interagindo com uma lisina (K45) e uma arginina (R55') da $\alpha 2'$. Podemos observar também os resíduos L46, L57 e F53, na hélice $\alpha 2$, que se encontram externalizados e formam uma superfície hidrofóbica curiosamente exposta ao solvente, e uma interação do tipo empilhamento π entre os resíduos F56 e F84, formando contatos de dímero importantes para a estabilização (MA et al., 2004; NEVES-MARTINS et al., 2021). As hélices $\alpha 1$ a $\alpha 3$ compõem o núcleo do monômero, que apresenta caráter hidrofóbico. Já a hélice mais longa, $\alpha 4$, se estende para longe deste e tem resíduos básicos na superfície acessível ao solvente.

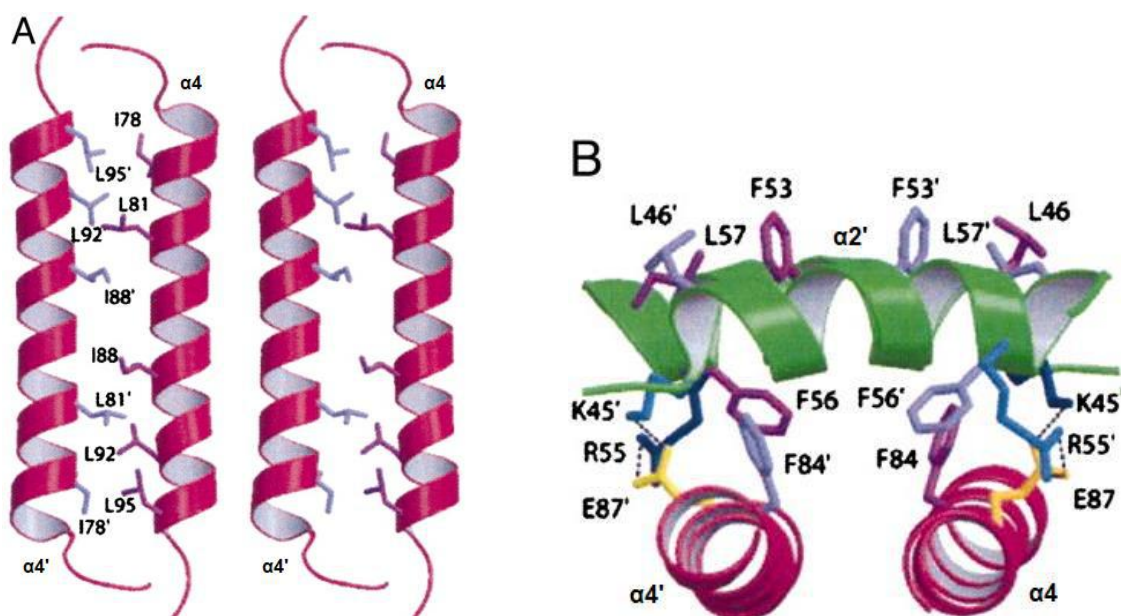


Figura 4. Interações no dímero de DENVC2. (A) Visão estereoscópica das interações da cadeia lateral que formam a interface hidrofóbica $\alpha 4 - \alpha 4'$. **(B)** Visão estereoscópica da interface do dímero formada pelo par de hélices $\alpha 2 - \alpha 2'$ (verde) e as interações entre $\alpha 2$ e $\alpha 4'$ (magenta), que são equivalentes a $\alpha 2'$ e $\alpha 4$. A subunidade $\alpha 2'$ está na frente e $\alpha 4'$ à esquerda. As interações iônicas envolvendo o único resíduo ácido, E87 (em amarelo), com K45 (azul escuro) e R55' (ciano) são indicadas com linhas pontilhadas. Os resíduos L46, F53 e L57 (roxo) de ambas as subunidades (vista superior) são expostos ao solvente e formam uma superfície hidrofóbica contínua. Os resíduos internalizados F56 e F84 (roxo) formam contatos do dímero. Estrutura por RMN em solução, PBD 1R6R. Adaptado de (MA et al., 2004).

No lado oposto, a superfície composta pelas seções $\alpha 2 - \alpha 2'$ e $\alpha 1 - \alpha 1'$ é amplamente não-carregada, com a fenda hidrofóbica formada interagindo com as membranas; o modelo de interação está representado na **Figura 5**, com a face $\alpha 4 - \alpha 4'$ do dímero se ligando ao RNA viral e a fenda hidrofóbica interagindo com a membrana lipídica do RE (MA et al., 2004). Foi feita uma descrição desta

região hidrofóbica interna conservada abrangendo os resíduos 45 a 65 para a proteína C de DENV sorotipo 4, na qual é também mostrado que a proteína C madura permanece associada às membranas do RE por meio dessa região, que é conservada em uma ampla gama de flavivírus transmitidos por mosquitos e carrapatos (MARKOFF; FALGOUT; CHANG, 1997).

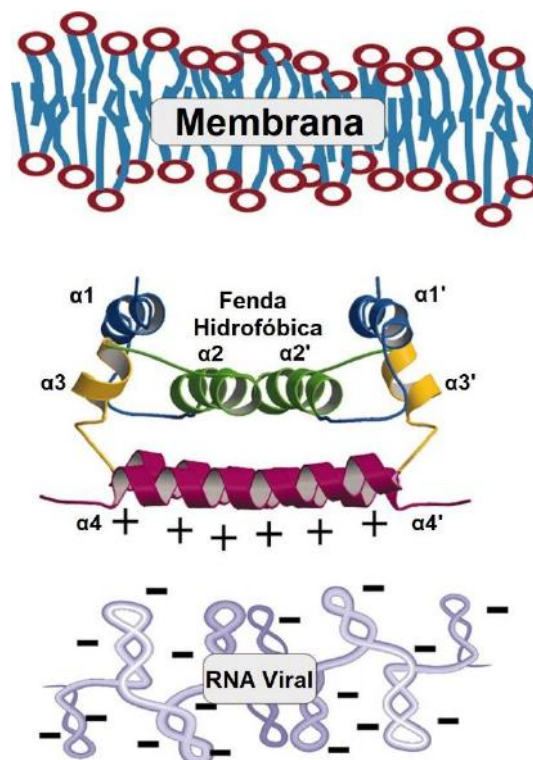


Figura 5. Modelo de interações moleculares entre os componentes estruturais da DENVC2. A membrana viral é representada em cima, perto da fenda hidrofóbica, e o RNA viral é mostrado na parte inferior, próximo à superfície carregada positivamente da DENVC2. Estrutura por RMN em solução, PBD 1R6R. Adaptado de MA et al., 2004.

1.2.2. Formação do Nucleocapsídeo de Flavivírus

Ao observar uma microscopia por Crio-EM da partícula viral de DENV, podemos perceber que, ao contrário dos NCs de alfavírus e da maioria dos vírus, não há uma definição clara entre os limites do NC e o RNA viral. Na **Figura 6**, observamos que a densidade do NC de DENV é apenas cerca de metade da que é encontrada para a camada lipídica, não havendo evidência de contato entre o NC e as proteínas E e M (ZHANG et al., 2003a). Este achado se repete em outros flavivírus, como o WNV (MUKHOPADHYAY et al., 2003) e o ZIKV (SIROHI et al., 2016). Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a falta de densidade dos NCs nestes dados, entre elas que o capsídeo apresente uma

estrutura organizada, mas seus eixos de simetria não se alinham com o envelope, ou ele teria estrutura assimétrica com orientação aleatória dentro do envelope icosaédrico (ZHANG et al., 2003b; ZHANG; KOSTYUCHENKO; ROSSMANN, 2007). Acrescentamos ainda a hipótese de que exista um processo de equilíbrio dinâmico, ou pseudoequilíbrio, entre a proteína C e o RNA viral com uma ou mais espécies intermediárias e o NC formado.

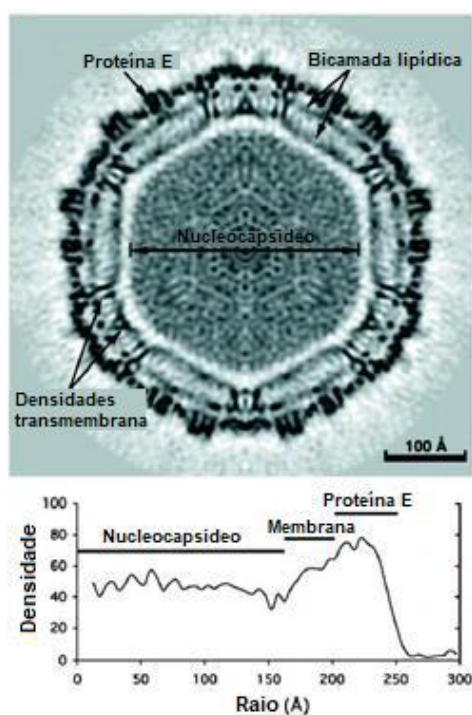


Figura 6. Estrutura da DENV por Crio-EM. Seção transversal central de um eixo triplo com simetria icosaédrica visto de cima, evidenciando a forma poligonal da membrana. A intensidade do sombreamento escuro é proporcional à densidade por Crio-EM. Os componentes virais são rotulados e os valores de densidade máxima estão plotados abaixo em uma escala relativa em função do raio. Adaptado de ZHANG et al., 2003a.

Por esta difícil visualização, entre outras questões, há pouca informação disponível sobre o processo de encapsidação viral dos flavivírus. Sabe-se, porém, que a síntese do RNA do DENV ocorre em estruturas denominadas pacotes de vesículas, que funcionam como fábricas do genoma viral e estão em estreita associação com a formação da partícula viral na membrana do RE. Nesse processo, a DENV C é responsável por recrutar o genoma viral, formando um NC que brota a partir do lúmen do RE, adquirindo membranas e as proteínas estruturais E e M (IGLESIAS et al., 2015; WELSCH et al., 2009). Evidências de

que a replicação e montagem dos flavivírus ocorrem simultaneamente dificultam o estudo da montagem individualmente, portanto, ainda não há uma informação clara sobre esse importante aspecto do ciclo de infecção desses vírus. Também por este acoplamento, há uma limitação das técnicas disponíveis para o estudo dos NCs, dado que se torna inviável o isolamento a partir de células infectadas.

Embora ainda haja muito a revelar, estudos indicam que o processo de formação dos NCs possa estar associado aos corpúsculos lipídicos (CL), pois, durante a infecção, a DENVC2 se acumula progressivamente em torno dos CL por meio de resíduos hidrofóbicos da hélice $\alpha 2$ (SAMSA et al., 2009) e da porção N-terminal da proteína (MARTINS et al., 2012); o local exato e o mecanismo deste recrutamento do RNA viral e organização do NC pela DENVC2 ainda não foram completamente elucidados, com os sinais de encapsidação de RNA do DENV e outros genomas de flavivírus ainda sem identificação.

Por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e tomografia eletrônica de células infectadas por DENV, relata-se que os complexos de replicação (nos quais os RNAs virais são sintetizados) estão fisicamente ligados a membranas do RE que contêm NCs (WELSCH et al., 2009); porém, o brotamento das partículas virais no RE é independente da formação dos NCs, uma vez que, com uma superexpressão de prM e E, são produzidas VLPs, que, por não possuírem a proteína C e o RNA viral, são não-infecciosas (BYK; GAMARNIK, 2016).

Há muitas perguntas ainda a serem respondidas, mas, atualmente, o modelo mais bem aceito para a ligação da DENVC ao RNA viral é de que esta ocorreria de forma inespecífica, impulsionada principalmente por ligações eletrostáticas. Deste modo, o estudo estrutural da interação da DENVC2 com ácidos nucleicos pode somar à descoberta do mecanismo exato e sítios de ligação da proteína ao RNA viral e subsequente formação do NC.

1.3. Técnicas para Estudos Estruturais de Capsídeos

No começo dos estudos estruturais sobre vírus, as técnicas de microscopia eletrônica (MATTHEWS; HORNE; GREEN, 1956) e cristalografia de raio X (GRIMES et al., 1997) foram responsáveis por grandes avanços na descrição de vírus icosaédricos e helicoidais e no entendimento da organização de capsídeos e da distribuição de subunidades proteicas em suas superfícies. A

Crio-EM, mais recentemente, permitiu que as partículas virais, inclusive sua arquitetura, fossem analisadas em condição mais próxima à fisiológica (GRIGORIEFF; HARRISON, 2011). Também foi descoberto que a microscopia eletrônica de partículas virais poderia ser usada na reconstrução da estrutura tridimensional viral a partir de análise computacional (CROWTHER et al., 1970), o que foi de imensa importância no estudo estrutural dos capsídeos.

Somada a estas, outra técnica que vêm sendo bastante empregadas no estudo de estruturas virais, em especial quanto à determinação das dimensões de partículas virais, é a microscopia de força atômica (AFM); embora seja uma tecnologia de varredura por sonda, a AFM foi capaz de determinar arranjos de NCs e a distribuição de proteínas capsídicas dentro dos NCs (KISELYOVA et al., 2003; KUZNETSOV et al., 2001; ORTEGA-ESTEBAN et al., 2013).

Apesar dos grandes avanços, vimos anteriormente que, devido a características únicas dos flavivírus no tocante da organização de seus NCs, estas técnicas ditas tradicionais apresentam limitações, como a baixa densidade eletrônica constatada na Crio-EM (MUKHOPADHYAY et al., 2003; SIROHI et al., 2016; ZHANG et al., 2003a) e a impossibilidade de isolamento eficiente do NC a partir de células infectadas (BYK; GAMARNIK, 2016).

1.3.1. Ressonância Magnética Nuclear em solução (RMN)

Apesar do limite de tamanho, a RMN é uma técnica versátil, pois além de ser compatível com medições em temperatura ambiente, o que é uma grande vantagem sobre técnicas de alta resolução como cristalografia de raios-X e Crio-EM, a técnica fornece informações sobre a dinâmica da proteína em solução, por meio da medida de diferentes escalas de tempo de movimento macromolecular, com experimentos sensíveis à escala de milissegundos (FAUSTINO et al., 2019; KLECKNER; FOSTER, 2011). Por abranger diversas escalas de tempo (**Figura 7**), é possível estudar a dinâmica e obter informações estruturais de estados conformacionais que são transitoriamente formados e povoados em níveis muito baixos, designados como estados conformacionais "invisíveis" ou excitados que, dado à característica da DENVC2, poderiam estar no caminho de formação do NC-like.

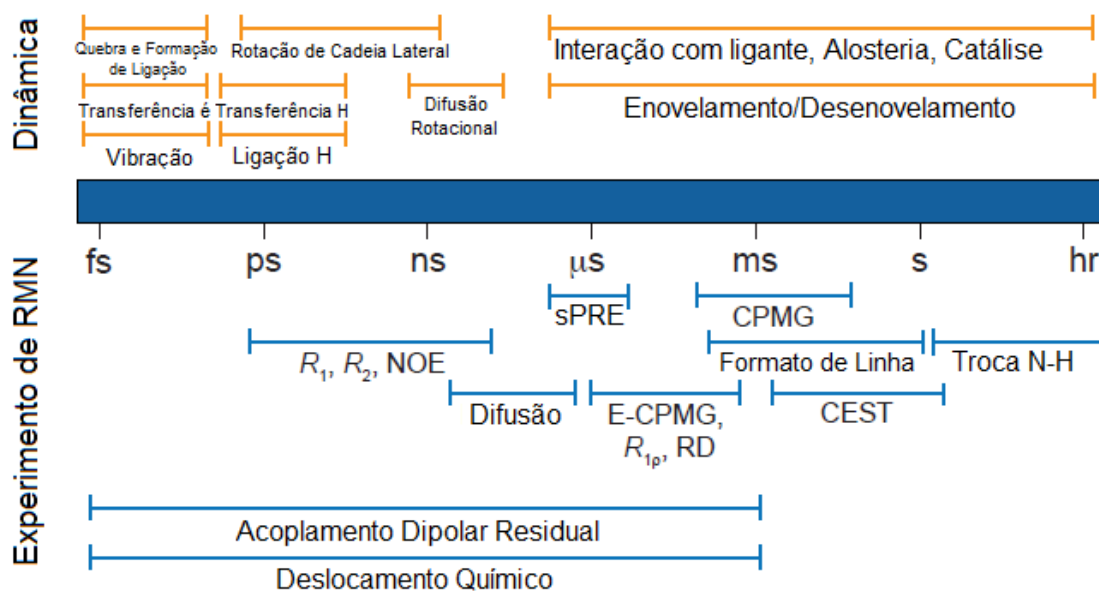


Figura 7. Escala de tempo acessível para experimentos de RMN. Escala de tempo de movimentos retrata a dinâmica de proteínas (laranja) e as diversas metodologias de espectroscopia de RMN pelas quais são mensuráveis (azul). Adaptada de KHAGO; FUCCI; BYRD, 2020.

Neste sentido, nesta dissertação foram usadas as técnicas de alargamento de relaxação paramagnética em solução (sPRE), que se baseiam no aumento das taxas de relaxação nuclear (CLORE; IWAHARA, 2009); na dispersão de relaxação por “Carr-Purcell-Meiboom-Gill” (CPMG) (CARR; PURCELL, 1954; HANSEN; VALLURUPALLI; KAY, 2008b; MEIBOOM; GILL, 1958), na qual ocorre uma modulação da diferença de deslocamento químico entre os diferentes estados de troca (estado fundamental e excitado, na **Figura 8**), a partir da qual é possível extrair a cinética e a termodinâmica do processo de troca, bem como os valores de $|\Delta\omega|$ para cada sistema (desde que o sistema esteja em troca rápida e a população do estado excitado seja superior a 0,5 % do total); e na Transferência de Saturação por Troca Química (“Chemical Exchange Saturation Transfer”, CEST), que consiste na transferência de saturação por troca química ou conformacional, e, diferente do CPMG, é utilizada em casos em que a troca química ocorre em uma taxa mais lenta (VALLURUPALLI; BOUVIGNIES; KAY, 2012), além de técnicas mais básicas, como a análise de 1D e 2D ^1H - ^{15}N -HSQC, variação do deslocamento químico (^{15}N -CSP) e ^{15}N - R_2 .

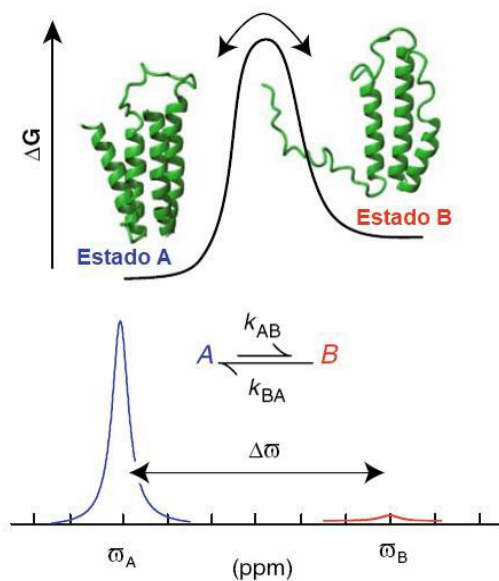


Figura 8. Visão geral esquemática da espectroscopia de RMN de dispersão de relaxação por CPMG. Interconversão entre um estado fundamental altamente povoado (A) e um estado excitado pouco povoado e invisível (B) e população e mudanças químicas entre os dois estados. Adaptado de HANSEN; VALLURUPALLI; KAY, 2008b.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação foi determinar a dinâmica do NC do DENV2 produzido *in vitro* (NC-*like*) a partir da ligação de DENV2 com o oligonucleotídeo 5' GGG GG 3' (5G) (GenScript), analisando a dinâmica de formação entre o dímero e o NC-*like*, observando o equilíbrio entre estes estados, a velocidade do processo e a termodinâmica envolvida no mesmo.

O estado NC-*like* é invisível por RMN, por conta do tamanho da partícula formada (maior que ~30 nm), portanto, decidimos focar os estudos em um estado intermediário, que poderia estar no caminho para a formação desta partícula.

Nos deparamos, porém, com uma questão: como determinar parâmetros termodinâmicos de um estado invisível? Para tal, passamos a explorar técnicas que seriam capazes de mapear e confirmar a existência de um (ou mais) estado(s) intermediário(s) no processo de formação da partícula NC-*like* a partir do dímero.

Nossos objetivos específicos foram, portanto:

1. Demonstrar a existência do equilíbrio entre dímero e NC-*like* a partir da interação com o oligonucleotídeo 5G (**Figura 9**);

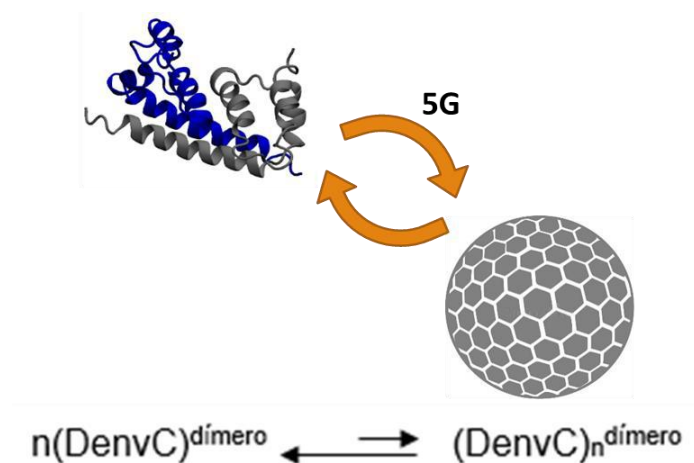


Figura 9. Esquema do processo de formação do NC-*like*. Equilíbrio entre dímero e o estado oligomérico no processo de montagem do NC-*like*.

2. Analisar o perfil de exposição dos resíduos na presença de oligonucleotídeo;
3. Medir o efeito da concentração de NaCl no equilíbrio dímero-NC-*like*;

4. Demonstrar a existência de um ou mais estados intermediários na formação do NC-*like*;
 - 4.1. Usar o método de “Carr-Purcell-Meiboom-Gill” (CPMG) para caracterizar estados excitados em troca rápida (entre 200 e 2500 s⁻¹).
 - 4.2. Usar o método de Transferência de Saturação por Troca Química (“Chemical Exchange Saturation Transfer”, CEST) para caracterizar estados excitados “invisíveis” em troca lenta (~50 a 400 s⁻¹).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Expressão e purificação da proteína DENVC2

3.1.1. Expressão da proteína isotopicamente marcada com ¹⁵N

O protocolo de expressão e purificação de DENVC2 foi descrito em 2003, por Jones e colaboradores (JONES et al., 2003), e neste trabalho apresentamos algumas adaptações.

A proteína DENVC2 foi expressa em *Escherichia coli* BL21(DE3)plysS (New Guinea) transformadas com o gene (codificando para os aminoácidos 1 a 100 de DENVC2) e clonado no plasmídeo pET-3A (Novagen). O protocolo empregado foi adaptado de INSTRUCTION MANUAL - BL21(DE3) Competent Cells, BL21(DE3)plysS Competent Cells, and BL21 Competent Cells (AGILENT TECHNOLOGIES, 2010). As células foram cultivadas em um shaker por 4 horas, a 37 °C, sob agitação a 200 rpm em 5 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB) (Sigma Aldrich) na presença de 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol.

Após este período, 1 mL da solução de bactérias foi transferido para 100 mL de meio mínimo M9 enriquecido com ¹⁵N, composto por Na₂HPO₄ 48 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 8,6 mM, pH 7,35; MgSO₄ 2 mM; Glicose 400 mg/mL; CaCl₂ 100 µM; Tiamina 0,01 mg/mL e NH₄Cl 1 mg/mL na presença dos mesmos antibióticos citados anteriormente. Esse meio foi então incubado em um shaker, sob agitação a 200 rpm e 37 °C *overnight*, para crescimento das células BL21(DE3)plysS.

Após esse tempo, a cultura foi transferida para 1 L do mesmo meio mínimo M9 contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol; essa cultura foi mantida sob agitação a 200 rpm e 37 °C, até alcançar uma densidade óptica de 0,6 a 600 nm (DO₆₀₀). Uma vez alcançada a DO, foi feita a indução da expressão da proteína com 0,5 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As bactérias foram então, mantidas a 200 rpm e 30 °C, *overnight*, por cerca de 16 h.

O conteúdo foi centrifugado a 3000 g por 30 minutos a 4 °C, em rotor 12500 – H, da centrífuga SIGMA 6-16K. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuspendido em tampão de lise 0,2 M de NaCl (25 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA e 5 % glicerol) e coquetel inibidor de proteases (P8465 – Sigma-Aldrich) conforme instrução do fabricante.

Após ressuspender as células bacterianas com o tampão de lise, a amostra foi mantida em banho de gelo e submetida a 20 ciclos de sonicação de 30 segundos cada, com intervalos de 30 segundos entre os ciclos, em um processador celular ultrassônico de 130 watts (SONICS - Vibra cell VCX130), a uma potência de 55 %.

Após a sonicação, a concentração de NaCl do lisado foi ajustada para 2 M por adição do sal e mantida sob agitação a 4 °C durante 1 hora. Em seguida, o conteúdo foi ultracentrifugado a 70400 x *g* durante 50 minutos. Ao final desta etapa, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante filtrado com membrana de 0,45 µm. Após filtração, o sobrenadante teve novamente sua concentração de sal diluída para 0,5 M de NaCl pela adição de tampão sem sal, para eluição em processo de cromatografia.

3.1.2. Purificação da proteína

A eluição das amostras foi feita utilizando duas colunas de heparina “HiTrap® Heparin High Performance” de 5 mL (GE Healthcare) conectadas em série, para aumentar a superfície de contato, utilizando o aparelho Akta Start (GE Healthcare) com o software Unicorn Start, utilizando o fluxo de 5 mL/min. Todas as soluções aplicadas na coluna foram previamente filtradas em membrana de poro 0,45 µm e deaeradas em banho sonicador (Unique – MaxiClean 700).

Primeiramente, a coluna foi lavada com 20 volumes de água milliQ. Em seguida, 10 volumes (100 mL) de tampão Hepes 25 mM, NaCl 2 M, EDTA 1 mM, glicerol 5 %, pH 7,4 foram usados para ativar a coluna e remover qualquer ligação inespecífica. Posteriormente, 10 volumes (100 mL) de tampão Hepes 25 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 1 mM, glicerol 5 %, pH 7,4 foram utilizados para equilibrar a coluna que, então, estava preparada para receber a amostra.

Após a entrada da amostra, foi utilizada como fase móvel 10 volumes (100 mL) de quatro soluções contendo tampão Hepes 25 mM, EDTA 1 mM, glicerol 5 %, pH 7,4, nas seguintes concentrações crescentes de NaCl: 0,5 M; 1 M; 1,5 M e 2 M. O “flow through” e cada uma das frações foi coletada, e a presença de proteína nas diferentes frações da purificação foi observada pelo cromatograma e por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 18 % (SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970)), para identificação das frações que correspondem à proteína

purificada e posterior dosagem de sua concentração, a partir de seu coeficiente de extinção molar a 280 nm ($\epsilon = 11.000$ para a proteína em forma de dímero).

A proteína DENVC2 foi eluída na fração correspondente a 1,5 M de NaCl. Uma vez identificada, a fração contendo a proteína foi dessalinizada e concentrada em Amicon® Ultra (Merck Millipore) com *cutoff* de peso molecular de 10 kDa. Foram feitas três lavagens por centrifugação, de 1 volume cada, a 6000 *g* e 4 °C, com tampão NaH₂PO₄ 55 mM, NaCl 200 mM, PMSF 2 mM, EDTA 5 mM, Azida 5 mM, a pH 6,0 ou pH 7,4, dependendo do experimento; no qual a proteína foi armazenada em freezer a -20 °C para uso experimental. A confirmação da pureza da proteína em estado dimérico foi feita por análise em SDS-PAGE 18 %.

3.1.3. Separação de proteínas por SDS-PAGE

A pureza da DENVC2 foi analisada a partir de separação em gel desnaturante de poliacrilamida 18 %. As amostras foram diluídas em tampão de amostra desnaturante para proteína (Tris-Cl 40 mM, pH 6,8; glicerol 8 %; SDS 2 %; DTT 100 mM; azul de bromofenol 0,1 %) e incubadas a 96 °C por 5 minutos antes de serem aplicadas no gel. O gel foi submetido à voltagem de 200 V em tampão de corrida (Tris-Cl 25 mM; glicina 250 mM; SDS 0,1 %) e revelado com solução corante de azul de Coomassie (50 % metanol, 40 % água, 10 % ácido acético, Coomassie Brilliant Blue G 250 2,5 g/L) (LAEMMLI, 1970). Após a corrida, observamos a proteína pura por uma banda de ~12 kDa, peso compatível com o monômero.

3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As concentrações de DENVC2 utilizadas variaram entre 20 μ M e ~321 μ M da proteína dimérica. Os espectros de RMN foram adquiridos a 293 K (20 °C), 298 K (25 °C) e 308 K (35 °C) em espectrômetros Bruker Avance III (Bruker BioSpin) operando a frequências de ressonância do ¹H de 600,03 MHz ou 800,4 MHz e usando as sequências de pulso fornecidas no espectrômetro.

Experimentos de 1D ¹H-¹⁵N-RMN foram realizados utilizando um espectrômetro Bruker Avance III (Bruker BioSpin) operando a frequência de ressonância do ¹H de 600,03 MHz, equipado com sonda de tripla ressonância

TCI. Os espectros foram coletados a 25 °C, nas titulações de oligonucleotídeo 5G (GenScript), ou a 35 °C, na titulação de NaCl.

Os espectros de RMN foram processados com Topspin 3.6.0 (Bruker) e NMRPipe v10.9 e analisados com CcpNmr Analysis v2.5.1 (WIN et al., 2005) e utilizando o NMRBox (MACIEJEWSKI et al., 2017). Os gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism v7 e as análises das estruturas foram feitas no programa PyMOL v1.7.4.5 (Schrodinger, LLC).

3.2.1. Alargamento Paramagnético em solução (sPRE)

Em contraste com o efeito NOE, no qual as interações são relativamente mais fracas e, portanto, limitadas a interações de curto alcance ($< 6 \text{ \AA}$) entre os prótons, o efeito PRE é muito grande, devido ao grande momento magnético de um elétron desemparelhado, permitindo distâncias de até 35 \AA (dependendo do grupo paramagnético a ser detectado). A chave para usar o PRE para estudar estados pouco povoados se encontra na descoberta de que as taxas de PRE observadas no regime de troca rápida são médias ponderadas da população dos PREs para as espécies principais e secundárias. Assim, desde que as distâncias centro-próton paramagnéticas sejam mais curtas nas espécies menores do que nas maiores, a impressão das espécies menores será visível nas taxas de PRE observadas, permitindo a extração de informações estruturais sobre as espécies menores (CLORE; IWAHARA, 2009). Por este princípio, para identificar interfaces de ligação em complexos macromoleculares, os valores de sPRE para os estados livre e complexado são comparados.

Alguns compostos de coordenação ganharam popularidade como cossolutos paramagnéticos, entre eles o composto de gadolínio (Gd-dietilenotriamina ácido pentacético-bismetilamida, ou Gd-DTPA-BMA), que optamos por usar no experimento. Uma vez que é uma molécula neutra, sem carga líquida, sua distribuição espacial em relação a uma macromolécula em solução é geralmente considerada uniforme.

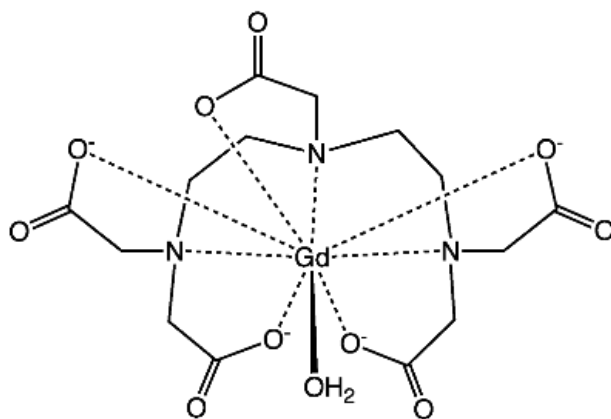


Figura 10. Estrutura do composto paramagnético de Gadolínio (Gd-dietilenotriamina ácido pentacético-bismetilamida, Gd-DTPA-BMA). Reproduzido de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gd\(DTPA\)\(aq\)2-.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gd(DTPA)(aq)2-.png).

Para esta análise, os dados foram coletados em um espectrômetro Bruker Avance III operando a frequência de ressonância do ^1H de 600,03 MHz, equipado com sonda de tripla ressonância TCI, à temperatura de 308 K, usando experimentos de 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC. Para o sPRE, foram utilizadas amostras com concentração crescente de Gd-DTPA-BMA (de 0, 0,5, 1, 2, 3 e 4,5 mM), na presença ou ausência de 5G numa relação de 40 % (DENVC2 1:0,4 5G). O estoque de Gd-DTPA foi preparado no mesmo tampão em que a proteína C se encontrava.

A intensidade de cada resíduo (I_{NH}) foi plotada em função da concentração de Gd-DTPA. A partir de uma regressão linear, foi obtido o coeficiente angular ($I_{\text{NH}}[\text{Gd}]^{-1}$) para cada resíduo. O ponto com 0 mM de Gd-DTPA (usado como referência) e os que apresentaram intensidade próxima a zero foram excluídos da análise, devido à ausência de linearidade.

3.2.2. Propriedades de relaxação transversal (^{15}N - R_2) da DENVC2

Experimentos de relaxação de ^{15}N foram utilizados para mapear a dinâmica molecular da cadeia principal da DENVC2. As taxas de relaxação transversal R_2 foram obtidas a partir de experimentos realizados em espectrômetro Bruker Avance III operando a frequência de ressonância do ^1H de 600,03 MHz, equipado com sonda de tripla ressonância TCI, nas temperaturas de 298 e 308 K. Para o cálculo das taxas de relaxação foram utilizados experimentos coletados com tempos de evolução de 16,96, 33,92, 50,88, 67,84

e 271,36 ms. Os parâmetros de relaxação foram ajustados de acordo com a equação $y = ax + b$.

3.2.3. Dispersão de relaxamento por Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)

Alterações nas flutuações intramoleculares de uma proteína que contribuem com as taxas de relaxação são grandes o suficiente para modular o componente isotrópico do deslocamento químico (AKKE; BRUESCHWEILER; PALMER, 1993). Essa perturbação tem origem na mudança de ambiente magnético experimentado por um determinado spin. Utilizamos a sequência de pulso com desacoplamento do hidrogênio via spin lock durante o período de CPMG (HANSEN; KAY, 2007; HANSEN; VALLURUPALLI; KAY, 2008a).

Em experimentos de CPMG, a taxa de relaxação transversal, R_2 , é monitorada durante a aplicação de uma série de pulsos de 180° (pulsos π). A taxa de relaxação transversal efetiva, R_2^{eff} pode ser decomposta, em relação aos mecanismos de relaxação envolvidos, como $R_2^{\text{eff}} = R_2 + R_{\text{ex}}$, onde R_2 é a taxa de relaxação por interação dipolo-dipolo e pela anisotropia de deslocamento químico do ^{15}N ponderada pela população dos estados A e B em troca química. A componente R_{ex} inclui a contribuição da troca química entre os estados e a diferença de deslocamento químico (k_{ex} e $\Delta\omega$, respectivamente). Os pulsos π refocam a evolução por diferença de deslocamento químico.

Em experimentos de CPMG, pulsos π são aplicados durante o período de evolução da magnetização transversal, modulando a relaxação via deslocamento químico. A taxa de relaxação experimental é calculada a partir da intensidade obtida de espectros de correlação ^1H - ^{15}N adquiridos com diferentes frequências de aplicação de pulso π . R_2^{eff} obtidos são escritos em função dos valores de frequência de CPMG utilizados (SILVA, 2014).

A dinâmica molecular da DENVC2 em escala de tempo de μs -ms foi mapeada usando experimentos de CPMG de ^{15}N . As taxas de relaxação, R_2^{eff} (s^{-1}), foram obtidas a partir de espectros de correlação de ^1H - ^{15}N adquiridos em campos magnéticos cujas frequências de ressonância do ^1H são de 600 e 800,4 MHz, e com frequências de CPMG iguais a 33,3, 66,7, 100, 133,3, 166,7, 200, 233,3, 266,7, 300, 333,3, 400, 500, 566,7, 666,7, 833,3, 900 e 1000 Hz, com tempo de evolução da magnetização transversal igual a 30 ms.

A otimização do modelo teórico para R_2^{eff} experimental foi feita tanto de forma individual, para resíduos selecionados, quanto global, assumindo os parâmetros cinéticos e termodinâmicos comuns para todos os resíduos analisados e o parâmetro estrutural $\Delta\omega$ como individual.

3.2.4. Transferência de saturação por troca química (“Chemical Exchange Saturation Transfer”, CEST)

Os experimentos de CEST foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III operando a frequência de ressonância do ^1H de 800,4 MHz a 293 K (VALLURUPALLI; KAY, 2013). Para estes experimentos, foi usado um campo B_1 ^{15}N de 20,0 Hz durante o período $T_{\text{EX}} = 0,1$ s. O *carrier* ^{15}N foi definido para 116 ppm com uma largura espectral de 32 ppm, e os *offsets* de ^{15}N variaram de -1378.93 a 1378.93 Hz, com espaçamento de 40 Hz.

4. RESULTADOS

4.1. Titulação de DENVC2 em diferentes concentrações e pHs com oligonucleotídeo 5G.

O primeiro objetivo para este trabalho foi determinar a existência de um equilíbrio dinâmico entre dímeros e oligômeros (aqui colocados genericamente como *NC-like*, baseado em trabalhos do grupo de pesquisa) formados pelo processo de adição de oligonucleotídeos como o 5' GGG GG 3' (5G). O 5G foi selecionado a partir de trabalhos anteriores do grupo, que demonstraram sua capacidade de formação de partículas *NC-like* organizadas e de tamanho regular, além de uma ligeira preferência da DENVC2 pelas bases de guanina (MEBUS, 2018). Por conter apenas cinco bases, ele se torna também mais simples de trabalhar, pois diminuí a tendência à precipitação do *NC-like* concomitante a ligação.

Para testar a hipótese do equilíbrio dinâmico, fizemos uma titulação com 20, 50 ou 100 μM do dímero da proteína C com concentrações crescentes do oligonucleotídeo 5G em pH 6,0. A intensidade relativa do sinal de RMN em função da presença do 5G foi acompanhada a partir do ponto de maior intensidade em espectros de 1D ^1H - ^{15}N -HSQC (exemplificado na **Figura 11** para 50 μM de DENVC2) e está indicado no eixo y para cada concentração de DENVC2, mostrando que a intensidade dos sinais da proteína diminui com a adição do oligonucleotídeo (**Figura 12**). Este desaparecimento do sinal ocorre de forma linear e é proporcional à concentração do dímero, sugerindo a formação de espécies invisíveis em solução. Tal comportamento dependente da concentração é típico de processos reversíveis, e valida um equilíbrio químico envolvendo o estado dimérico e um estado oligomérico.

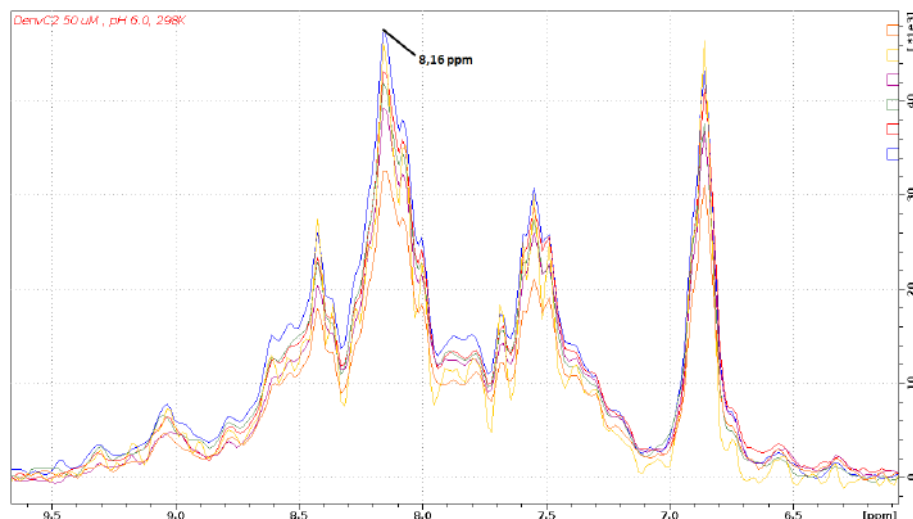


Figura 11. Espectro 1D ^1H - ^{15}N -HSQC de 50 μM de DENVC2 na presença de concentrações crescentes de 5G (de 1:0 a 1:1, do mais ao menos intenso em 8,16 ppm) em pH 6,0.

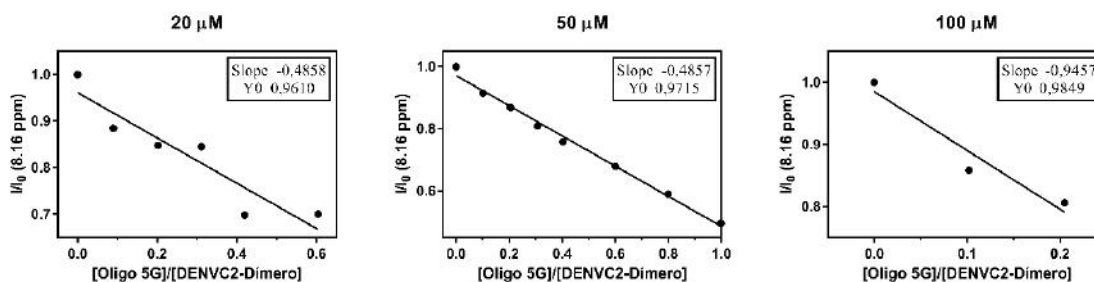


Figura 12. Intensidade relativa (I/I_0) do sinal de RMN do dímero da DENVC2 na presença de concentrações crescentes de 5G em pH 6,0.

A mesma titulação com 20, 50 ou 100 μM do dímero da proteína C com concentrações crescentes de 5G foi feita também em pH 7,4. A intensidade relativa do sinal de RMN em função da presença de 5G mostra que a intensidade dos sinais da proteína diminui com a adição de 5G, com o mesmo comportamento linear e proporcional à concentração do dímero (**Figura 13**); porém, observando a inclinação das retas, podemos notar que valores menos negativos ocorrem com o aumento da concentração de DENVC2, em comparação com a titulação feita em pH 6,0.

Tal comportamento indica que a interação de DENVC2 com o ácido nucleico é favorecida em pH 6,0 em relação ao pH 7,4. Não sabemos ao certo ainda o motivo deste comportamento, mas durante o processo de infecção e posteriormente de maturação, o vírus DENV é exposto a pHs mais baixos durante a acidificação do endossoma e mais básicos ao fim da maturação dos

víriões para liberação da partícula. Sabendo que o NC é parte essencial no processo de replicação viral, maior ou menor predisposição à formação do complexo, com deslocamento do equilíbrio para o estado dimérico ou oligomérico, pode ter papel biológico importante durante a infecção e ciclo viral.

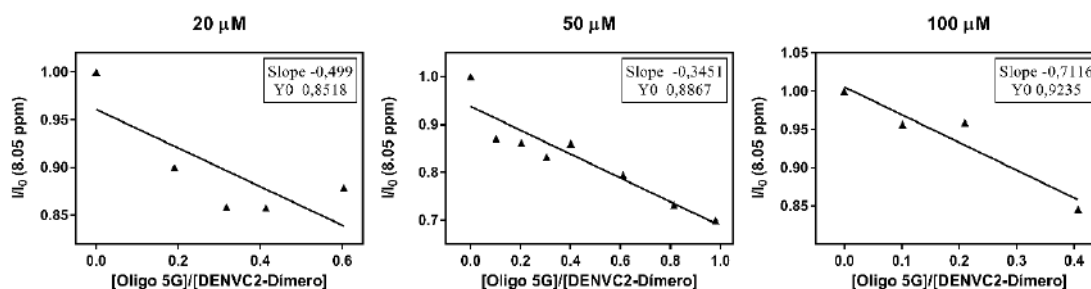


Figura 13. Intensidade relativa (I/I_0) do sinal de RMN do dímero da DENVC2 (^1H - ^{15}N -HSQC unidimensional) na presença de concentrações crescentes do ácido nucleico 5G em pH 7,4.

4.2. Titulação de DENVC2 em diferentes concentrações de NaCl com oligonucleotídeo 5G

A DENVC2 é uma proteína ligadora de RNA e possui carga líquida positiva, especialmente na região N-terminal, que é desordenada. Como a quantidade de sal presente em um sistema interfere na força iônica do mesmo, decidimos testar se a concentração de íons do sal na qual a amostra se encontra teria algum efeito no pseudoequilíbrio, visto que poderia alterar algumas das interações eletrostáticas na proteína. Para tal, foi feita a titulação de 50 μM do dímero da DENVC2 com concentrações crescentes (0 a 44 μM , até a concentração relativa de 1:1 de DENVC2, considerando a diluição da amostra) do oligonucleotídeo 5G, em pH 6,0, com a concentração de NaCl do tampão para RMN (NaH_2PO_4 55 mM, PMSF 2 mM, EDTA 5 mM, Azida 5 mM, pH 6,0) variando de 100 a 400 mM, e os resultados são apresentados na **Figura 14**. Observa-se, pela comparação entre os gráficos, que não houve diferença significativa com a mudança de concentração de NaCl, o que pode ser observado também pelos valores de inclinação da reta, que se encontram na mesma faixa em todas as condições.

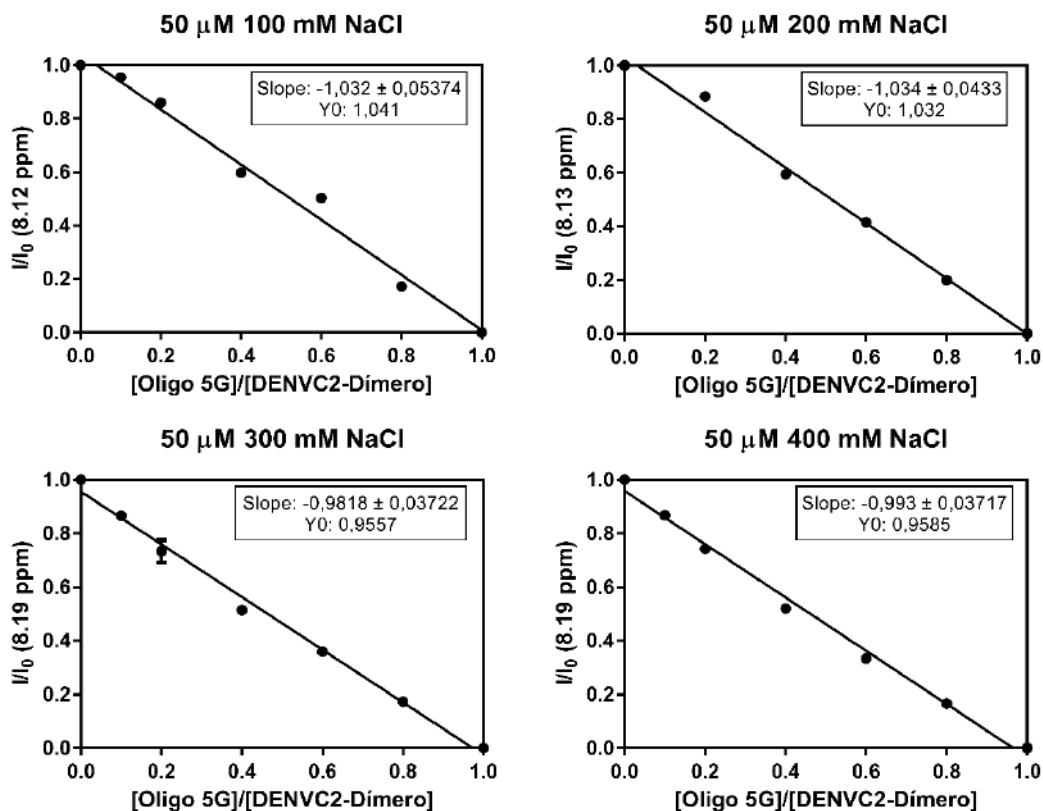


Figura 14. Intensidade relativa (I/I_0) do sinal de RMN do dímero da DENVC2 (^1H - ^{15}N -HSQC unidimensional) em diferentes concentrações de NaCl na presença de concentração crescente do ácido nucleico 5G em pH 6,0.

4.3. Alargamento paramagnético em solução (sPRE) com a sonda solúvel Gd-DTPA-BMA

Podemos observar a acessibilidade de um resíduo de aminoácido ao solvente a partir de experimentos de “Solvent paramagnetic relaxation enhancement” (sPRE). Utilizamos a sonda paramagnética Gd-dietilenotriamina ácido pentacético-bismetilamida (Gd-DTPA-BMA) para analisar a conformação da DENVC2, resíduo a resíduo, comparando 200 μM da proteína livre com condição similar na presença de 40 % de 5G (DENVC2 1:0,4 5G). Foram utilizadas concentrações crescentes de Gd-DTPA-BMA, de 0, 0,5, 1, 2, 3 até 4,5 mM (Figura 15).

Pelas suas propriedades paramagnéticas, com a proximidade dos resíduos mais expostos à sonda hidrossolúvel Gd-DTPA-BMA, observa-se a adição de um novo mecanismo de relaxação paramagnética, levando ao aumento da relaxação transversal, alargamento de linha (alargamento paramagnético) e consequente diminuição da intensidade de sinal. Assim, a

dependência da intensidade de cada resíduo em função da concentração de Gd-DTPA-BMA tem uma declividade negativa que é proporcional à exposição do resíduo à superfície. Observamos valores de declividade mais negativos em alguns resíduos, especialmente na região pré- $\alpha 1$, final da $\alpha 3$ e final da $\alpha 4$, o que indica uma maior acessibilidade dos aminoácidos nestas regiões ao solvente a partir da interação com o 5G. Observamos também valores menos negativos em alguns pontos na região de $\alpha 2$ - $\alpha 3$, indicando internalização de alguns resíduos. A ocorrência desta modificação no perfil de intensidade confirma a existência de um equilíbrio dinâmico, pois, apesar da formação do estado invisível, a agregação/precipitação (ausência de reversibilidade) por si removeria este sinal de solução sem alterar o perfil de exposição das moléculas restantes.

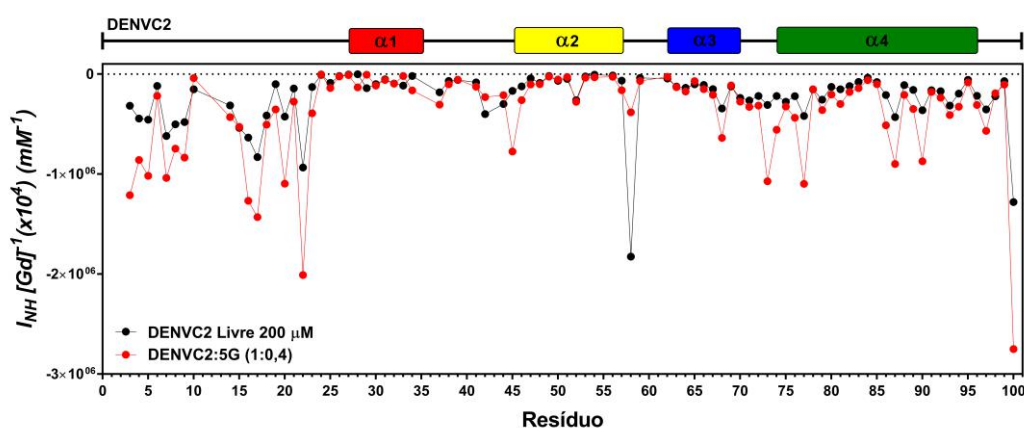


Figura 15. Intensidade do sinal de cada resíduo de aminoácido ao longo da titulação com a sonda solúvel Gd-DTPA-BMA, na presença ou ausência do ácido nucleico 5G, em pH 6,0, por alargamento paramagnético em solução (sPRE).

As maiores alterações encontradas foram coloridas na estrutura da DENV2, com tons de rosa identificando os resíduos que aumentaram sua exposição ao solvente e azul identificando os resíduos que se internalizaram (Figura 16).

Estas modificações indicam uma contribuição mista dos dois efeitos desencadeados pela presença do 5G: (i) interação direta do dímero com o 5G e (ii) da consequente oligomerização da proteína. O aumento de exposição do N-terminal desordenado pode ser explicado pela indução de uma dinâmica rápida na região. Vale salientar uma alteração no meio da $\alpha 4$, em uma região de interação com a $\alpha 2$; acreditamos que este aumento de exposição se deve a via ponte salina (E87/K45' e E87'/K45) e empilhamento π . A quebra desta ligação

entre os resíduos E87 e K45 (na estrutura em rosa claro), poderia explicar o maior acesso do solvente a esta região.

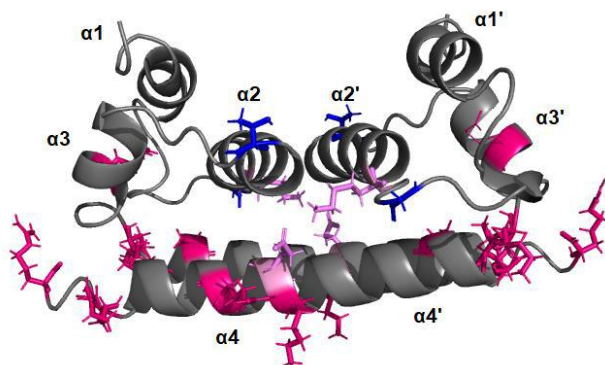


Figura 16. Estrutura da DENV C2 em visão lateral, colorida de acordo com a exposição dos resíduos ao solvente após titulação com a sonda solúvel Gd-DTPA-BMA na presença e ausência do ácido nucleico 5G, em pH 6,0, por sPRE. Resíduos em rosa apresentaram aumento de exposição e resíduos em azul se internalizaram. Resíduos E87 e K45 (rosa claro) se externalizaram, provavelmente pela quebra da ligação entre ambos a partir da ligação com 5G.

4.4. Propriedades de Relaxação transversal ($^{15}\text{N-R}_2$) da DENV C2

Medimos $^{15}\text{N-R}_2$ da DENV C2 livre e na presença de 5G (DENV C2 1:0,2 5G), nas temperaturas de 298 e 308 K (**Figura 17**). A 298 K não foi possível observar modificações significativas no R_2 , porém, a 308 K, observamos um decréscimo global na taxa de relaxação, à exceção da região N-terminal, que permaneceu praticamente inalterada. A presença de 5G levou a variações importantes, principalmente para os resíduos F84 e V26.

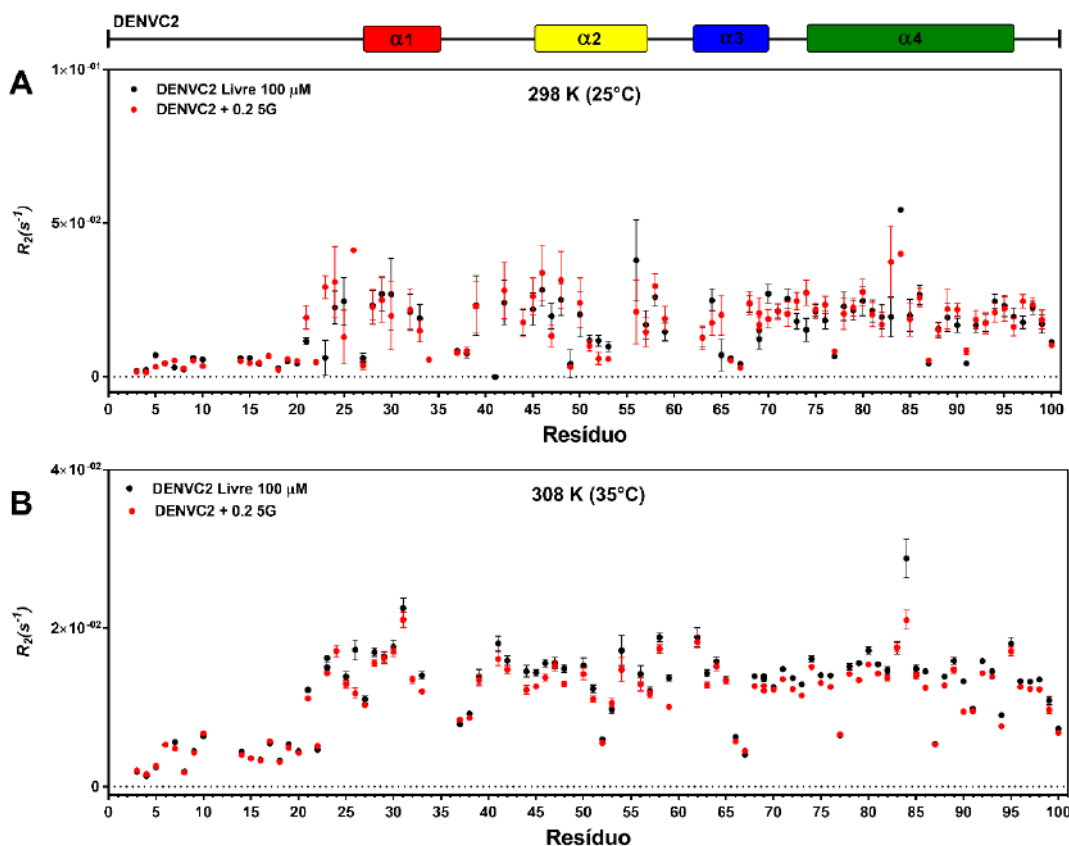


Figura 17. ^{15}N - R_2 de DENVC2 em pH 6,0, à temperatura de 298 K (A) ou 308 K (B), na presença e ausência de 20 % de oligonucleotídeo 5G.

4.5. Dispersão de Relaxação via CPMG

Para quantificar e descrever melhor o equilíbrio conformacional e a cinética de troca observados pelo R_2 , experimentos de CPMG de ^{15}N foram coletados e serão apresentados a seguir. Os espectros foram adquiridos nos campos 14,1 T (600,03 MHz) e 18,8 T (800,4 MHz), na temperatura de 293 K, na presença e ausência de 10 % de 5G (DENVC2 1:0,1 5G).

As taxas de relaxação efetiva, R_2^{eff} (s^{-1}), obtidas na temperatura de 293 K, usando frequência de CPMG igual a 33,3 Hz (mínima) e em campos magnéticos de 14,1 e 18,8 T estão apresentadas a seguir (**Figura 18**). Estes valores representam o R_2 devido às relaxações por mecanismo dipolar (^{15}N - ^1H) e pela anisotropia do deslocamento químico do ^{15}N , somado à contribuição da troca conformacional (R_{ex}). Os resíduos que apresentaram maior diferença de R_2^{eff} entre a condição na presença e ausência de 5G, tiveram aumento no valor de R_2^{eff} com a adição de 5G. Estes resíduos estão presentes principalmente nas regiões pré- α_1 , entre as α_2 e α_3 e do meio ao fim da α_4 .

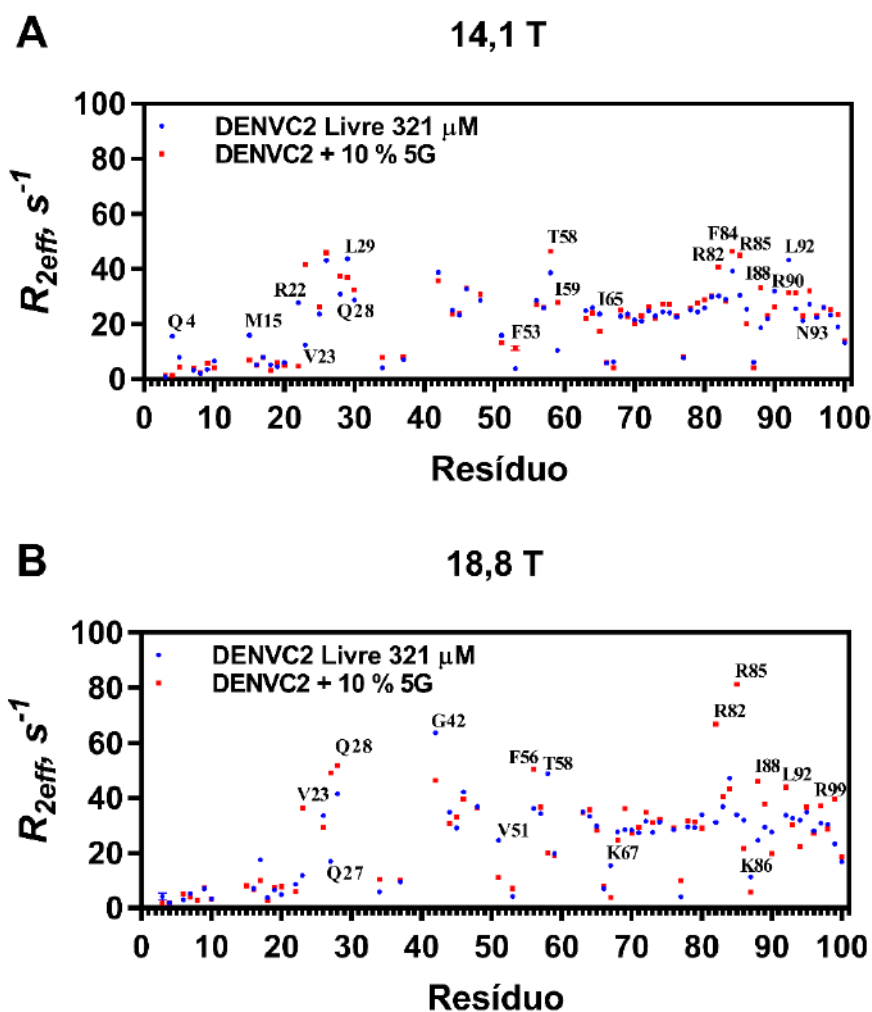


Figura 18. $R_{2\text{eff}}$ de DENVC2. Campos 14,1 T (600,03 MHz) (A) e 18,8 T (800,4 MHz) (B) na presença (vermelho) e ausência (azul) de 10 % de oligonucleotídeo 5G.

A partir do ajuste dos valores experimentais de $R_{2\text{eff}}$ é possível obter o valor de $\Delta\omega$, que reflete variações estruturais da proteína, uma vez que o deslocamento químico é sensível ao ambiente químico do núcleo. Os valores obtidos a partir do ajuste global das taxas de relaxação estão apresentados na **Figura 19**.

O $\Delta\omega$ é o valor que representa a variação do deslocamento químico isotrópico entre um estado de menor energia (fundamental) e um estado de maior energia (excitado). Observamos que a região N-terminal apresentou diminuição do $\Delta\omega$ com a presença de 5G, o que poderia indicar a ocorrência de uma seleção conformacional, com estabilização de um único estado conformacional, ou indicar que a ligação ao 5G levou a uma quebra de interações

internas do N-terminal com a região globular, levando a dinâmica rápida. A segunda hipótese seria a mais adequada, dada a evidência no experimento de sPRE do aumento de exposição dos resíduos na região. Os perfis individuais de cada resíduo nos campos 14.1 e 18.8 T estão disponíveis no **Anexo I**, e alguns exemplos com a diferença do estado ligado para o estado livre na **Figura 20**.

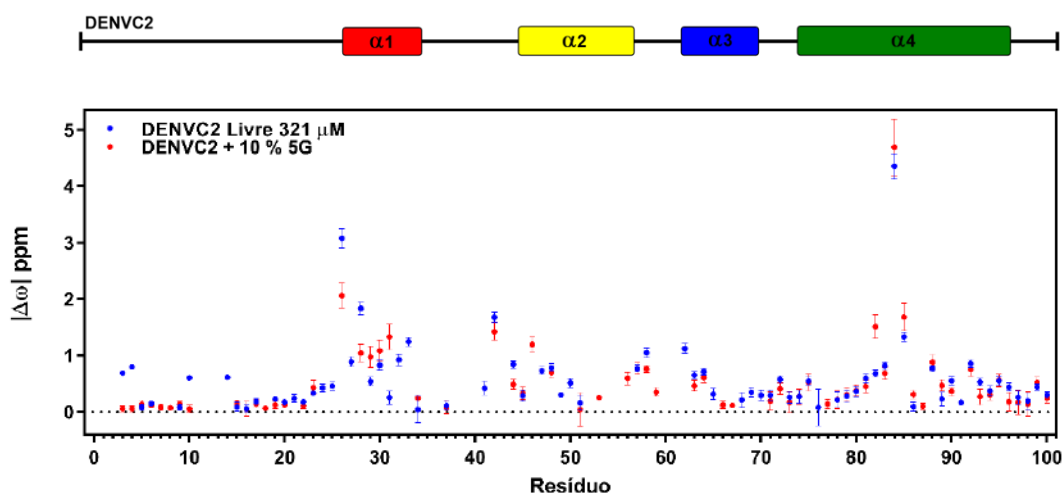


Figura 19. $\Delta\omega$ de DENVC2 nas frequências de ressonância 600,03 MHz e 800,4 MHz na presença (vermelho) e ausência (azul) de 10 % de oligonucleotídeo 5G.

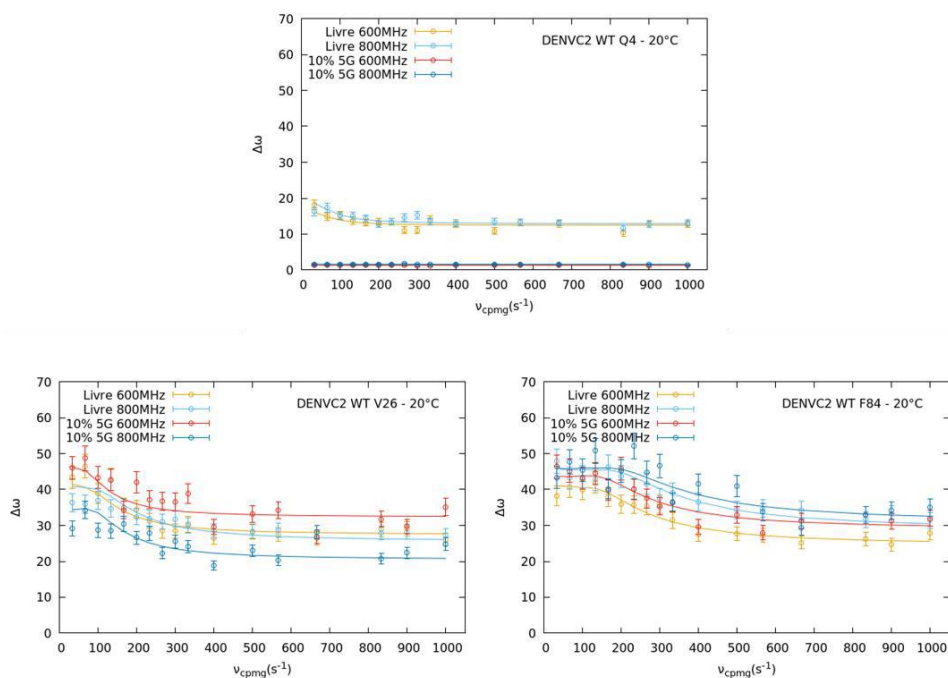


Figura 20. Perfis individuais de $\Delta\omega$ dos resíduos Q4, V26 e F84 de DENVC2. Perfis nas frequências de ressonância de 600,03 MHz e 800,4 MHz, na presença e ausência de 10 % de oligonucleotídeo 5G de acordo com legenda nas figuras. Gráficos de $\Delta\omega$ por frequência de CPMG (ν_{CPMG}) em Hz.

Foi feito também o $|\Delta\Delta\omega|$, a partir da diferença entre os valores de $\Delta\omega$ da proteína livre e na presença de 5G. Este parâmetro reflete principalmente o efeito do 5G no estado excitado da proteína (**Figura 21**).

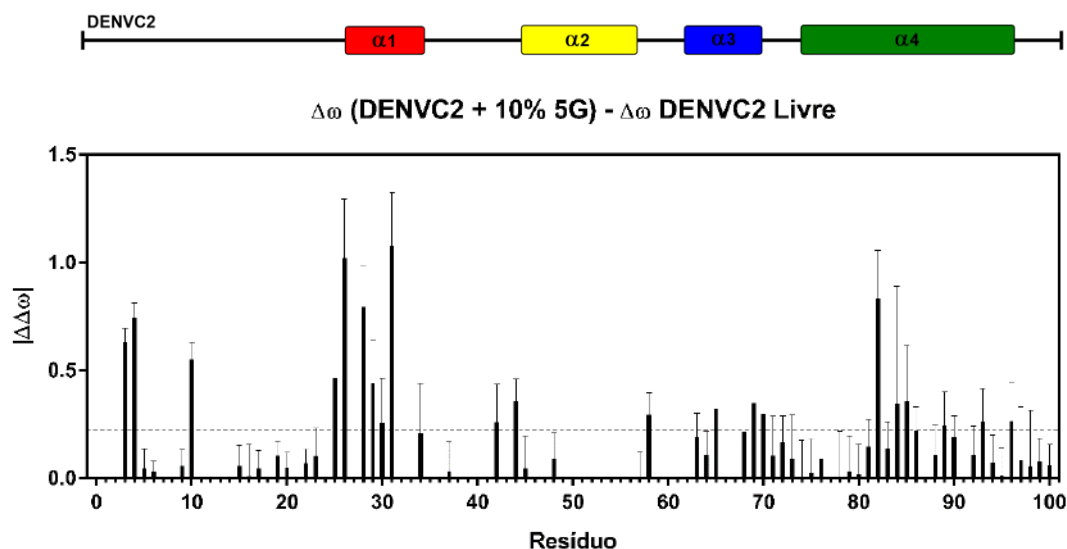


Figura 21. $|\Delta\Delta\omega|$ de DENVC2 nas frequências de ressonância 600,03 MHz e 800,4 MHz na presença e ausência de 10% de oligonucleotídeo 5G.

Os dados do gráfico anterior foram coloridos na estrutura da DENVC2, apresentada abaixo na visão lateral e inferior, colorida de acordo com os valores de menor (azul) a maior (vermelho) (**Figura 22**). Observamos que as regiões pré- $\alpha 1$, $\alpha 1$, final da $\alpha 3$ e $\alpha 4$ sofrem grande influência do 5G, indicando novamente uma contribuição mista da interação direta, oligomerização e possíveis efeitos alostéricos a partir da ligação com o oligonucleotídeo. Neste momento, ainda não é possível discernir os efeitos da interação direta do 5G dos efeitos alostéricos e subsequentes, podendo incluir inclusive a oligomerização.

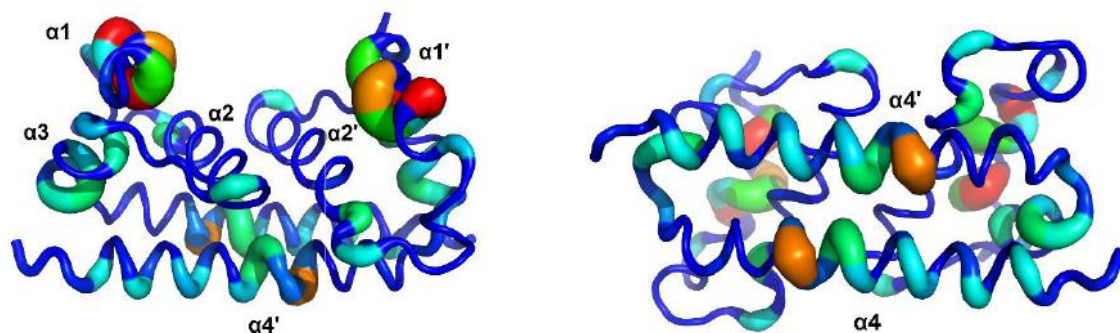


Figura 22. Estrutura da DENVC2 apresentada em visão lateral e inferior, colorida de acordo com os valores de $|\Delta\Delta\omega|$, de menor (azul) a maior (vermelho).

4.6. Perturbação do Deslocamento Químico do ^{15}N (^{15}N -CSP) no estado fundamental

A formação do NC-*like* induz uma perturbação do deslocamento químico do ^{15}N (^{15}N -CSP), pela ocorrência de modificações conformacionais seguindo a interação com o oligonucleotídeo. As mudanças estruturais causadas pela adição de 5G (DENVC2 1:0.1 5G) foram monitoradas pelo ^{15}N -CSP em experimentos de 2D [^1H - ^{15}N] HSQC realizados em pH 6,0 na temperatura de 293 K (**Figura 23**). A análise do ^{15}N -CSP indica que os resíduos na região pré- $\alpha 1$ e $\alpha 1$, possível região de interação com o RNA viral, são os mais afetados pela adição do ácido nucleico. Observamos também alteração no meio da $\alpha 4$, em uma região de possível interação com a $\alpha 2$ (dados não publicados), na qual também observamos uma alteração na região interna à proteína. As informações da análise foram representadas também na estrutura de DENVC2, colorida de acordo com os valores de ^{15}N -CSP, de menor (azul) a maior (vermelho) (**Figura 24**). É interessante enfatizar que os valores de ^{15}N -CSP são consideravelmente mais baixos que os valores de $|\Delta\Delta\omega|$ (**Figura 21**). Esta é uma clara indicação de que as alterações que são observadas acontecem majoritariamente no estado de maior energia (excitado), denotando nossa capacidade de obter informação deste estado intermediário a partir da interação do 5G com o dímero de DENVC2.

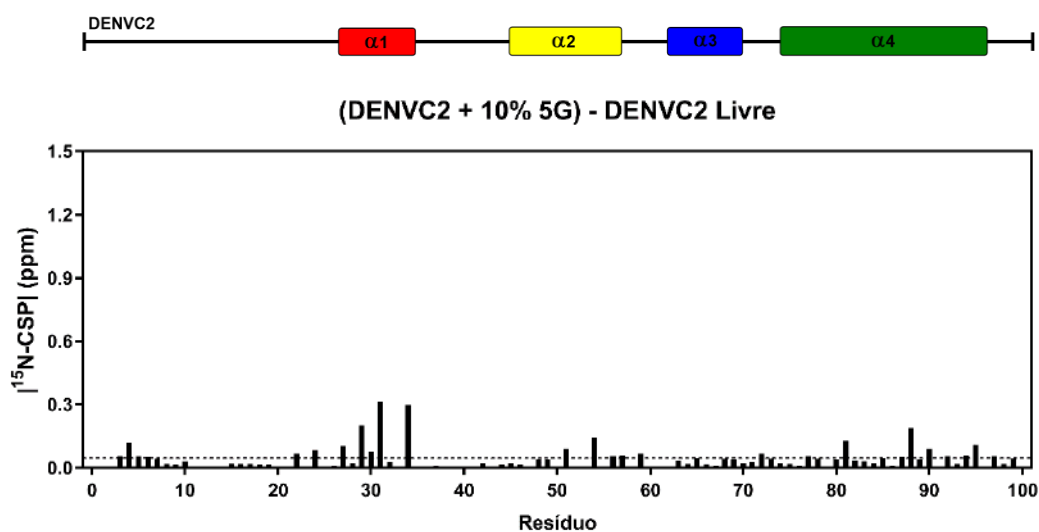


Figura 23. ^{15}N -CSP obtido a partir de deslocamentos químicos ^1H e ^{15}N em espectros de 2D [^1H - ^{15}N] HSQC adquiridos em pH 6,0 na temperatura de 293 K, na presença e ausência de 10 % de 5G, em função do número do resíduo de DENVC2.

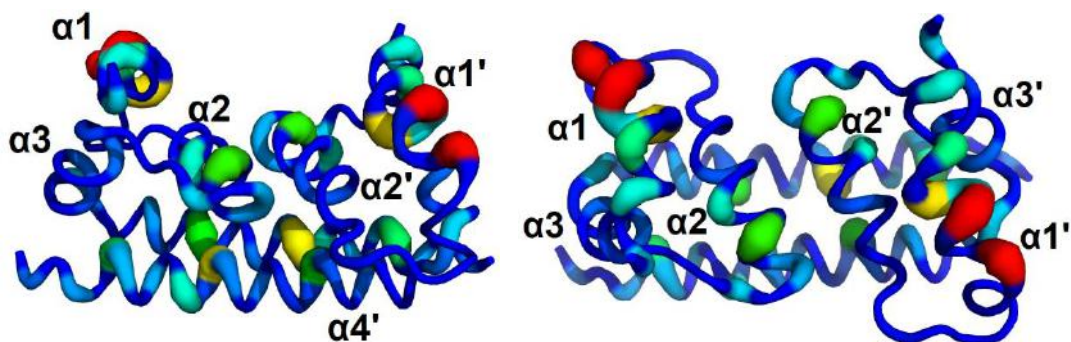


Figura 24. Estrutura da DENVC2 apresentada em visão lateral e superior, colorida de acordo com os valores de $^{15}\text{N-CSP}$, de menor (azul) a maior (vermelho).

4.7. Transferência de saturação via troca conformacional (CEST)

Os experimentos de CEST (*conformational exchange saturation transfer*) foram realizados no campo 18,8 T, na temperatura de 293 K, na presença e ausência de 5G (DENVC2 1:0,05 5G). Enquanto os experimentos de dispersão de relaxação via CPMG são sensíveis à troca conformacional em escala de tempo de 200 a 2500 s^{-1} (regime de troca intermediária), os experimentos de CEST são sensíveis à troca conformacional em regime lento, tipicamente entre 50 e 400 s^{-1} .

O conjunto completo de perfis obtidos se encontra no **Anexo II** deste documento. Observamos no conjunto de perfis selecionado como exemplo (**Figura 25**), na presença (vermelho) ou ausência (preto) de 5G, que obtivemos perfis de CEST para os resíduos em questão, porém, há ainda um alto erro experimental; não há clara indicação da presença de troca lenta a partir dos mesmos, porém, em I78 e A63 há uma sugestão da presença destes estados a partir dos valores mais negativos em 115 ppm e 120 ppm, respectivamente. Há ainda a necessidade de otimização dos parâmetros para este experimento. Podemos, porém, supor que este experimento não é o ideal para acompanhar as modificações que observamos no estado excitado; as variações conformacionais observadas ocorrem principalmente em regime de troca intermediária, acessível por meio dos experimentos de dispersão de relaxação via CPMG.

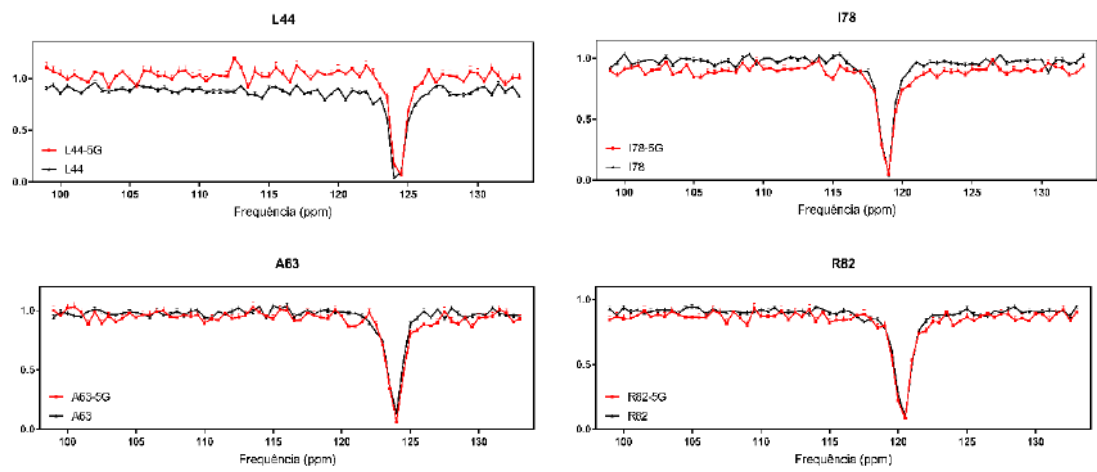


Figura 25. Perfis de CEST para os resíduos L44, A63, 178 e R82 da proteína DENVC2 na presença e ausência de 5 % de 5G (DENVC2 1:0,05 5G).

5. DISCUSSÃO

O vírus Dengue (DENV) é considerado pela OMS um desafio em saúde pública (HALSTEAD, 1988; WHO/TDR, 2009), causando doença geralmente autolimitante, mas com risco de agravamento e para a qual não há terapia antiviral disponível, com tratamento sintomático e anti-inflamatório (HASAN et al., 2016); é uma doença onerosa sobre os países afetados, com alto impacto econômico nos mesmos (BHATT et al., 2013).

As estruturas obtidas por Crio-EM do DENV (KUHNS et al., 2002; ZHANG et al., 2013, 2003b) e outros flavivírus, exceto muito recentemente para o ZIKV (TAN et al., 2020), revelaram a estrutura icosaédrica do envelope viral com 180 cópias das proteínas E e M, mas não foram capazes de demonstrar resolução estrutural no nucleocapsídeo (NC), por causa da baixa densidade eletrônica apresentada, descrevendo apenas uma aparente falta de ordenação do complexo.

As hipóteses colocadas para esta falta de densidade foram a possível existência de um capsídeo organizado, mas com eixos de simetria que não se alinham com o do envelope, ou de uma estrutura assimétrica com orientação aleatória dentro do envelope icosaédrico (ZHANG et al., 2003b; ZHANG; KOSTYUCHENKO; ROSSMANN, 2007), ou ainda, também sugerido por nosso grupo (MARTINS, 2018), da existência de um processo de equilíbrio dinâmico entre a DENVC e o RNA viral, com uma ou mais espécies intermediárias e o NC formado.

Nossa hipótese da existência de um equilíbrio dinâmico se fortalece ainda mais a partir da estrutura publicada do ZIKV, pois, ao estabilizar a proteína C no ZIKV imaturo com um anticorpo (Fab) que se liga entre as proteínas E e prM, a ligação do Fab teria causado redução da dinâmica/flexibilidade inerente das proteínas do capsídeo, e o grupo foi capaz de obter densidade eletrônica consideravelmente melhorada da proteína dentro da partícula viral. Deste modo, conseguiram obter informações iniciais sobre a organização quaternária da proteína C, sua orientação relativa em relação à membrana lipídica viral e ao RNA genômico, e suas interações com as regiões transmembrana das proteínas prM e E (**Figura 26**) (TAN et al., 2020). É importante salientar, porém, que a presença do Fab poderia causar alterações no modo de ligação da proteína C para além de uma estabilização, o que não é possível identificar neste trabalho.

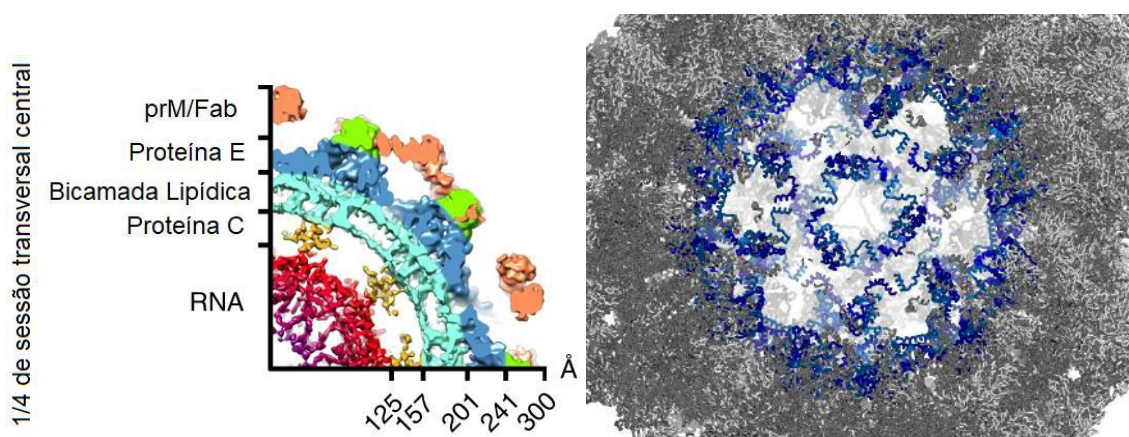


Figura 26. Partícula imatura de ZIKV por Crio-EM. 1/4 de uma sessão transversal central dos mapas da partícula imatura de ZIKV complexado a Fab. A sessão mostra que a proteína C do ZIKV faz a ponte entre o RNA e o folheto interno da membrana lipídica (**esquerda**), Adaptado de TAN et al., 2020. Estrutura do complexo viral completo (cinza), evidenciando o arranjo em trímero de dímeros da proteína C (azul), representada no Pymol (**direita**).

A DENVC2 interage com o RNA viral e parece contribuir em um processo coordenado entre o recrutamento do genoma e brotamento do NC formado (KUHN et al., 2002; MARTINS, 2018; MEBUS, 2018). Por este motivo, o estudo do processo de montagem e determinação da estrutura do NC a partir de células infectadas, como é feito para a maioria dos vírus, é inviável. Neste sentido, o estudo da interação da DENVC2 com oligonucleotídeos pode contribuir para o conhecimento do mecanismo de ligação da proteína com o RNA na formação do NC.

O grande desafio em se estudar a interação da DENVC2 com ácido nucleico é que este leva à agregação e precipitação, pois a formação do complexo proteína-ácido nucleico é um gatilho para a oligomerização. Nosso grupo optou por estudar a formação de um NC-like *in vitro*, para o qual foi estabelecido um protocolo que utiliza oligonucleotídeos de diferentes tamanhos, incluindo o oligonucleotídeo 5' GGG GG 3' (5G), que foi selecionado para este trabalho, dados estes corroborados pelo grupo de López et al. em 2009 (LÓPEZ et al., 2009). Nossos dados mostram que quando a razão molar 5G:proteína é menor que 0,5 há formação de oligômeros solúveis, sendo que dados de TEM e AFM mostram a formação de oligômeros organizados compatíveis com partículas NC-like obtidos com este protocolo (MEBUS, 2018).

A partir da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em solução, neste trabalho pudemos focar na observação indireta da formação do NC-like e,

com isso, em conformações transitórias e povoadas em níveis muito baixos, designados por isso como estados conformacionais "invisíveis" ou excitados que ocorrem no processo. Inicialmente, a partir das titulações de DENVC2 com concentrações crescentes de 5G (**Figuras 12 e 13**), pudemos confirmar a existência do equilíbrio dinâmico entre a DENVC2 dimérica e oligomérica a partir do desaparecimento de sinal, linear e proporcional à concentração, gerado pela formação de um complexo NC-*like*. A partir da inclinação da reta, pudemos observar também que este equilíbrio é favorecido para formação do complexo em um ambiente em pH 6,0 se comparado a meio com pH 7,4. Isso indica que a oligomerização é maior com o aumento da concentração de DENVC2 e em pH 6,0, ou seja, neste pH menos quantidade de ácido nucleico é necessária para formar a mesma quantidade de complexo.

Esta característica pode ser fisiologicamente relevante, pois no ciclo viral, no momento da entrada dos vírus na célula por endocitose, as partículas virais inicialmente precisam liberar o material genético no citoplasma, que tem pH mais próximo do neutro, fazendo sentido que o NC se rearranje deslocando o equilíbrio para a forma dimérica ao invés da forma de capsídeo. Já, no processo de encapsidação, a maturação ocorre ao longo da rede Trans-Golgi, sendo influenciada pela acidificação do meio, que é um gatilho conhecido para o rearranjo da proteína E (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015; YU et al., 2008). Neste momento, o deslocamento do equilíbrio para a forma de complexo também seria factível, para terminar a maturação e proteger o RNA viral.

Outra questão importante seria determinar que tipo de interação seria mais relevante para a manutenção do estado oligomérico. Investigamos, portanto, se a força iônica do meio iria interferir na dinâmica de formação do NC-*like*, repetindo os experimentos de titulação com 5G para concentração de DENVC2 constante, mas variando a concentração de NaCl (**Figura 14**), o que interferiria nas interações eletrostáticas da proteína. Como resultado, não foi possível observar interferência nestas condições, pois o desaparecimento de sinal se manteve com inclinação similar, indicando que não houve favorecimento em nenhuma das condições propostas.

Durante os ensaios de titulação, nas condições com maior quantidade de 5G, foi possível observar turbidez causada por precipitação dentro do tubo de ressonância. Para nos certificar de que a perda de intensidade não era

relacionada à formação de agregados, e certificar-nos da existência do equilíbrio dinâmico, foi feito um ensaio de sPRE (**Figura 15**). Neste experimento, foi titulada uma concentração crescente de uma sonda paramagnética hidrossolúvel (no caso, escolhemos o Gd-DTPA-BMA) na proteína. O campo magnético do centro paramagnético interage com os spins nucleares da amostra levando ao aumento na relaxação. Como o complexo Gd-DTPA-BMA é solúvel em água e não interage com a proteína, o efeito de sPRE é maior em resíduos mais expostos ao solvente. Foi possível notar uma maior acessibilidade dos aminoácidos na região pré- $\alpha 1$, final da $\alpha 3$ e final da $\alpha 4$, e internalização de alguns resíduos na região de $\alpha 2$ - $\alpha 3$ quando foi feita a adição de 5G, indicando que houve mudança estrutural e provando, novamente, a existência de um equilíbrio, dado que a agregação/precipitação por si removeria o sinal de solução sem alterar o perfil de exposição das moléculas restantes, indicando ausência de reversibilidade. Além de provar a existência do equilíbrio, o aumento de acessibilidade na região pré- $\alpha 1$ com a adição de 5G também é um indicativo de indução de dinâmica rápida, sugerindo que o sinal que estamos observando é de um intermediário no processo de formação do NC-like; os resíduos E87 e K45, que estão envolvidos em uma ponte salina na proteína em sua conformação nativa, se mostram mais acessíveis ao solvente, indicando uma quebra total ou parcial desta ligação. Este resultado está de acordo com o observado pela diferença de $\Delta\omega$ (diferença entre os estados fundamental e intermediário) na região central da hélice $\alpha 4$ (G83 e F84). Esta alteração conformacional pode contribuir com o deslocamento do equilíbrio para a forma oligomérica, sendo, portanto, uma interação que inspira nossa atenção.

Uma vez confirmada a existência do equilíbrio, partimos para a caracterização do(s) estado(s) invisíveis. Iniciamos pela medida de propriedades de relaxação transversal (**Figura 17**). Nesta, observamos um decréscimo global na taxa R_2 com a adição de 5G na temperatura de 308 K, à exceção da região N-terminal que permaneceu praticamente inalterada. Este decréscimo em ^{15}N - R_2 sugere o que poderia ser uma diminuição na troca conformacional, possivelmente ocasionada pela estabilização de uma conformação interagindo com 5G. Observamos, porém, pelo experimento de sPRE, que possivelmente ocorre uma dinâmica rápida, ao invés de estabilização, o que causaria efeito similar, dado não ser possível observar este fenômeno na escala de tempo do

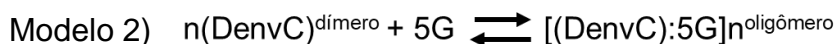
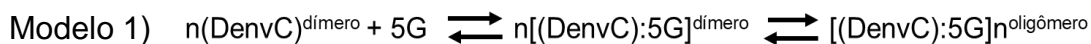
R_2 . Foram coletados também o R_2^{eff} (**Figura 18**) e $\Delta\omega$ (**Figura 19 a 22**) a partir do CPMG, que representa trocas em uma escala de tempo rápida, nos quais observamos aumento e diminuição dos valores, respectivamente, na presença de 5G. É importante frisar que no experimento de CPMG, dado sua escala de tempo, observamos principalmente a proteína em seu estado de maior energia. O R_2^{eff} é relacionado à troca conformacional, portanto, indica que houve aumento neste tipo de interação com a adição do ligante, enquanto o $\Delta\omega$ se refere muito mais ao componente conformacional e, portanto, corrobora os dados de R_2 e sPRE, sobre indução de dinâmica rápida.

Ainda sobre o $\Delta\omega$, na **Figura 21** é representado um gráfico evidenciando a diferença da conformação entre a DENVC2 ligada e livre ($|\Delta\Delta\omega|$), mapeando majoritariamente o que seria a contribuição da interação com o 5G com o estado excitado. Observamos que as regiões com maiores valores de $|\Delta\Delta\omega|$ se localizam na $\alpha 1$, na qual há uma sugestão na literatura de possível atividade de chaperona de RNA (BYK; GAMARNIK, 2016), e no meio da $\alpha 4$. Esta última é a região de maior interação para manutenção do estado dimérico da proteína, contendo uma ponte salina e interações π (esqueleto aromático) e é implicada como possível base do movimento de “abre e fecha” que envolve a quebra total ou parcial no meio da $\alpha 4$, que poderia ser responsável pelo equilíbrio conformacional entre as hélices da mesma (FAUSTINO et al., 2019; MARTINS, 2018).

Continuando a observar as mudanças estruturais, monitoramos por perturbação do deslocamento químico (^{15}N -CSP) as modificações causadas pela adição de concentração muito baixa de 5G (**Figuras 23 e 24**). A análise do ^{15}N -CSP considera a proteína em seu estado fundamental; nela, houve indicação de que os resíduos na região pré- $\alpha 1$, possível região de interação com o RNA viral, são os mais afetados pela adição do ácido nucleico, e observamos alteração também no meio da $\alpha 4$, em uma região de possível interação com a $\alpha 2$ (dados não publicados), na qual também observamos uma alteração na região interna da proteína por sPRE, corroborando as observações anteriores. É importante salientar que o ^{15}N -CSP apresentou valores globais mais baixos em comparação ao $|\Delta\Delta\omega|$, o que, novamente, indica que a maior parte das mudanças conformacionais ocorre no estado excitado, com menos modificação no estado fundamental da DENVC2. A adição de 5G possivelmente desloca o equilíbrio em

direção ao estado excitado. Como sabemos que o 5G leva à formação de oligômeros, supomos que o estado excitado seja o próprio NC-*like* ou um estado intermediário.

O equilíbrio proposto está representado abaixo:



O modelo 1 representa um equilíbrio cujo estado excitado seria um intermediário para a formação do NC-*like*. No modelo 2, de 2 estados, o estado excitado é o próprio oligômero. No momento, não temos como diferenciar entre os 2 modelos. Será necessário melhor caracterizar o estado excitado. Para se diferenciar um estado excitado dimérico ou oligomérico temos como perspectiva fazer as medidas de dispersão de relaxação em função da concentração. O estado oligomérico mostraria alta dependência de concentração. É interessante notar que o perfil de $\Delta\omega$ do estado livre, que caracteriza um estado excitado que existe na ausência de ácido nucleico, é muito similar ao do equilíbrio na presença de 5G. Isto sugere que estes estados são os mesmos e que a presença de 5G apenas desloca o equilíbrio. Para melhor entender o equilíbrio que leva à formação do NC-*like*, pretendemos medir a formação de NC-*like* e a dinâmica de diversos mutantes, alterando os principais pontos de mudança conformacional mapeados, como a ponte salina e o esqueleto aromático.

Por fim, foram realizados também experimentos de CEST (**Figura 25 e Anexo II**), que mapeariam uma escala de tempo mais lenta no regime de trocas. A concentração escolhida foi novamente de 10 % de 5G, pois evidenciaria efeitos extremamente sutis, visíveis mesmo em baixíssima população do estado intermediário. Observamos no conjunto de perfis selecionado na **Figura 25** que, devido ao alto erro experimental, não há clara indicação da presença de estados intermediários a partir dos mesmos; há, porém, em I78 e A63 uma sugestão da presença destes estados a partir dos valores mais negativos em 115 ppm e 120 ppm, respectivamente. A existência de estados em troca rápida também não anula a existência de estados em troca lenta, que podem coexistir.

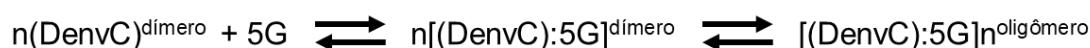
Em função dos resultados apresentados, pudemos confirmar que a técnica de RMN possibilita a detecção de estados intermediários formados na

complexação da DENVC2 a RNA, e que esta abordagem quiçá permitirá um estudo *in vitro* mais aprofundado, que poderá contribuir com informações importantes sobre o processo de montagem do nucleocapsídeo.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, fomos capazes de mapear a existência de estados intermediários no processo de formação do NC-*like* formado pela DENVC2 na presença do oligonucleotídeo 5G, concluindo que:

- Existe um equilíbrio entre um estado fundamental e excitado para a proteína livre
- A presença do 5G gera mudanças nos mesmos resíduos que estão em troca conformacional na proteína livre, sugerindo (1) o estado excitado participa da interação; (2) a presença do 5G altera esse equilíbrio
- O $\langle |\Delta\Delta\omega| \rangle$ é maior do que $\langle {}^{15}\text{N-CSP} \rangle$, indicando que as maiores alterações ocorrem no estado excitado; possivelmente o estado excitado (invisível) é o estado que liga ao DNA e inicia o processo de oligomerização
- A presença de troca conformacional ($\Delta\omega > 0$) na região IDR N-terminal indica a presença de alguma ordem, possivelmente através da interação do N-terminal com a região globular.
- A presença de 5G deu maior liberdade rotacional e translacional para o IDR.
- Ainda não sabemos se o estado invisível é um estado apto a ligar ao DNA ou um intermediário de oligomerização.
- Mostramos que o método proposto vai nos mostrar o caminho da ligação e engatilhamento da oligomerização
- É possível afirmar a existência de estados excitados intermediários, que são transitórios e podem ser parte de um caminho de formação do NC-*like*, sendo este intermediário $n[(\text{DenvC}):5\text{G}]^{\text{dímero}}$ ou o equilíbrio diretamente com o oligômero $[(\text{DenvC}):5\text{G}]^{\text{oligômero}}$ dado o seguinte esquema:



A metodologia estabelecida para observação dos complexos deverá ser aplicada a outros trabalhos do grupo, assim como à sequência da caracterização da DENVC2 que pretendo realizar na continuação deste projeto em meu doutorado, com o uso de mutantes como:

- Δ 1-19, remoção da região N-terminal desordenada
- G83A, remoção da glicina e consequente estabilização da hélice α 4. Deslocamento do equilíbrio de oligomerização para o estado fundamental (dimérico)
- E87Q, que remove uma ponte salina com o resíduo 55, deslocamento do equilíbrio para o estado excitado.

Pretendemos explorar a determinação específica dos sítios de ligação, focando principalmente na conformação do estado intermediário mapeado, bem como seu papel na oligomerização e importância das alterações na α 4 e no N-terminal IDR, identificando seus papéis.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 1533–1549, out. 2009.
- ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Differential Requirements in Endocytic Trafficking for Penetration of Dengue Virus. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44835, 7 set. 2012.
- AGILENT TECHNOLOGIES, I. BL21, BL21(DE3) & BL21(DE3)pLysS Competent Cells User Manual. v. 21, p. 14, 2010.
- AKKE, M.; BRUESCHWEILER, R.; PALMER, A. G. I. NMR order parameters and free energy: an analytical approach and its application to cooperative calcium(2+) binding by calbindin D9k. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 21, p. 9832–9833, 1 out. 1993.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.
- BYK, L. A.; GAMARNIK, A. V. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 263–281, 29 set. 2016.
- CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physical Review**, v. 94, n. 3, p. 630–638, 1954.
- CLORE, G.; IWAHARA, J. Theory, practice, and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes. **Chemical reviews**, v. 109, n. 9, p. 4108–4139, 9 set. 2009.
- CROWTHER, R. A. et al. Three Dimensional Reconstructions of Spherical Viruses by Fourier Synthesis from Electron Micrographs. **Nature**, v. 226, n. 5244, p. 421–425, 1970.
- CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p. 155–170, 2015.
- FAUSTINO, A. F. et al. Fast NMR method to probe solvent accessibility and disordered regions in proteins. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1647, 7 dez. 2019.
- FLINT, S. J. et al. **Principles of Virology, 4th Edition**. [s.l: s.n.].

FREIRE, J. M. et al. Intracellular nucleic acid delivery by the supercharged dengue virus capsid protein. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 81450, 2013.

FREIRE, J. M. et al. Nucleic acid delivery by cell penetrating peptides derived from dengue virus capsid protein: Design and mechanism of action. **FEBS Journal**, v. 281, n. 1, p. 191–215, jan. 2014.

GE, P.; ZHOU, Z. H. **Chaperone fusion proteins aid entropy-driven maturation of class II viral fusion proteins***Trends in Microbiology* NIH Public Access, , fev. 2014.

GILLESPIE, L. K. et al. The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10438–10447, 15 out. 2010.

GRIGORIEFF, N.; HARRISON, S. C. Near-atomic resolution reconstructions of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 21, n. 2, p. 265–273, 1 abr. 2011.

GRIMES, J. M. et al. An atomic model of the outer layer of the bluetongue virus core derived from X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. **Structure**, v. 5, n. 7, p. 885–893, 1997.

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. S40–S42, nov. 2010.

HALSTEAD, S. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476–481, 29 jan. 1988.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **The Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644–1652, 10 nov. 2007.

HANSEN, D. F.; KAY, L. E. Improved magnetization alignment schemes for spin-lock relaxation experiments. **Journal of biomolecular NMR**, v. 37, n. 4, p. 245–55, abr. 2007.

HANSEN, D. F.; VALLURUPALLI, P.; KAY, L. E. An Improved ¹⁵N Relaxation Dispersion Experiment for the Measurement of Millisecond Time-Scale Dynamics in Proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 19, p. 5898–5904, 1 maio 2008a.

HANSEN, D. F.; VALLURUPALLI, P.; KAY, L. E. Using relaxation dispersion NMR spectroscopy to determine structures of excited, invisible protein states. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 41, n. 3, p. 113–120, jul. 2008b.

HASAN, S. et al. Dengue virus: A global human threat: Review of literature.

Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry, v. 6, n. 1, p. 1, 2016.

IGLESIAS, N. G. et al. Dengue Virus Uses a Non-Canonical Function of the Host GBF1-Arf-COPI System for Capsid Protein Accumulation on Lipid Droplets. **Traffic**, v. 16, n. 9, p. 962–977, 1 set. 2015.

JONES, C. T. et al. Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein. **Journal of Virology**, v. 77, n. 12, p. 7143–7149, 2003.

KHAGO, D.; FUCCI, I. J.; BYRD, R. A. **The Role of Conformational Dynamics in the Recognition and Regulation of Ubiquitination Molecules (Basel, Switzerland)** Molecules, , 15 dez. 2020.

KISELYOVA, O. I. et al. AFM study of potato virus X disassembly induced by movement protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 332, n. 2, p. 321–325, 1 set. 2003.

KLECKNER, I. R.; FOSTER, M. P. An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 8, p. 942–968, 1 ago. 2011.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–225, 8 mar. 2002.

KUZNETSOV, Y. G. et al. **Imaging of viruses by atomic force microscopy** **Journal of General Virology** J Gen Virol, , 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LÓPEZ, C. et al. **In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus** **Archives of Virology**. [s.l: s.n.].

MA, L. et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3414–3419, mar. 2004.

MACIEJEWSKI, M. W. et al. NMRbox: A Resource for Biomolecular NMR Computation. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 8, p. 1529–1534, abr. 2017.

MARKOFF, L.; FALGOUT, B.; CHANG, A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. **Virology**, v. 233, n. 1, p. 105–117, 1997.

MARTINS, I. 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, 15 jun. 2012.

MARTINS, T. C. N. **Expressão e Caracterização Estrutural da Proteína Mutante L81C/L92C do Capsídeo do Vírus Dengue**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

MATTHEWS, R. E. F.; HORNE, R. W.; GREEN, E. M. Electron microscope observations of periodicities in the surface structure of tobacco mosaic virus. **Nature**, v. 178, n. 4534, p. 635–636, 1956.

MEBUS, N. C. **Obtenção in vitro de partículas nucleocapsídeo-like do sorotipo 2 do vírus Dengue**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments**, v. 29, n. 8, p. 688–691, 1958.

MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313–319, 22 jan. 2004.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Structure of West Nile virus. **Science**, v. 302, n. 5643, p. 248, 10 out. 2003.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 1 jan. 2005.

MUSSO, D.; MAI CAO-LORMEAU, V.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? . 18 jul. 2015, p. 243–244.

NEVES-MARTINS, T. 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.

NOUR, A. M. et al. Viral Membrane Fusion and Nucleocapsid Delivery into the Cytoplasm are Distinct Events in Some Flaviviruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003585, set. 2013.

ORTEGA-ESTEBAN, A. et al. Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 13 mar. 2013.

PERERA, R.; KUHN, R. J. **Structural proteomics of dengue virus** **Current Opinion in Microbiology** Elsevier Current Trends, , 1 ago. 2008.

PIERSON, T. C.; KIELIAN, M. Flaviviruses: Braking the entering. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 1, p. 3–12, 2013.

SAMSA, M. M. et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. 1000632, 2009.

SAMSA, M. M. et al. Uncoupling cis-Acting RNA Elements from Coding Sequences Revealed a Requirement of the N-Terminal Region of Dengue Virus Capsid Protein in Virus Particle Formation. **Journal of Virology**, v. 86, n. 2, p. 1046–1058, 15 jan. 2012.

SCHAAR, H. M. VAN DER et al. Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells. **PLOS Pathogens**, v. 4, n. 12, p. e1000244, 2008.

SILVA, A. H. DE M. **Desenvolvimento racional de vacinas: uma abordagem dinâmica e estrutural da interação proteína-anticorpo por RMN.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 22 abr. 2016.

TAN, T. Y. et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

TEOH, P.-G. 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, 15 jul. 2014.

VALLURUPALLI, P.; BOUVIGNIES, G.; KAY, L. E. Studying “invisible” excited protein states in slow exchange with a major state conformation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 19, p. 8148–8161, 16 maio 2012.

VALLURUPALLI, P.; KAY, L. E. Probing Slow Chemical Exchange at Carbonyl Sites in Proteins by Chemical Exchange Saturation Transfer NMR Spectroscopy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 15, p. 4156–4159, 8 abr. 2013.

WELSCH, S. 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, 23 abr. 2009.

WHO/TDR. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control** **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.** [s.l.: s.n.].

WIN F., V. et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. **Proteins**, v. 59, n. 4, p. 687–696, 1 jun. 2005.

YU, I.-M. et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 28 mar. 2008.

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

ZHANG, X. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 105–110, 16 jan. 2013.

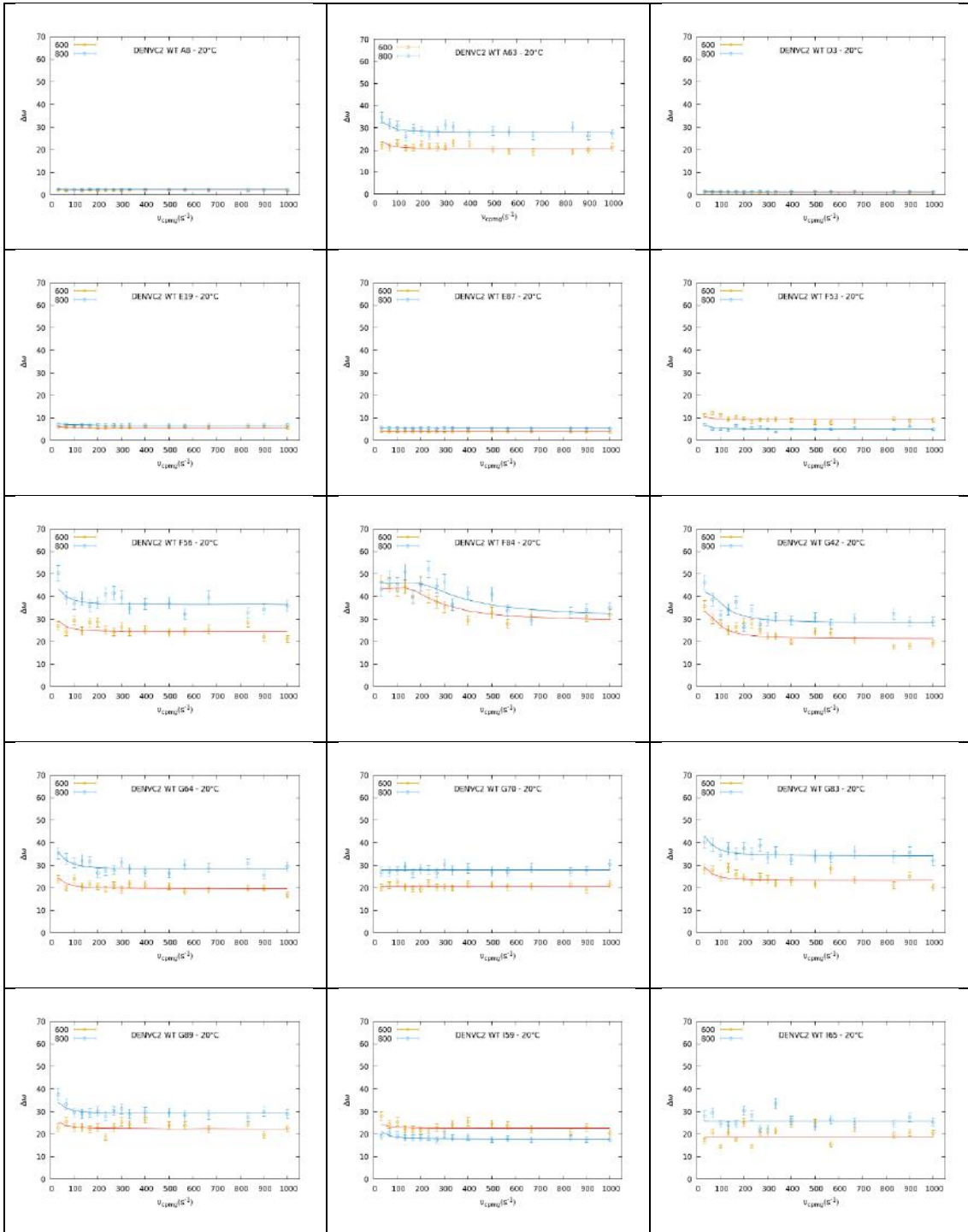
ZHANG, Y. et al. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO journal**, v. 22, n. 11, p. 2604–13, 2 jun. 2003b.

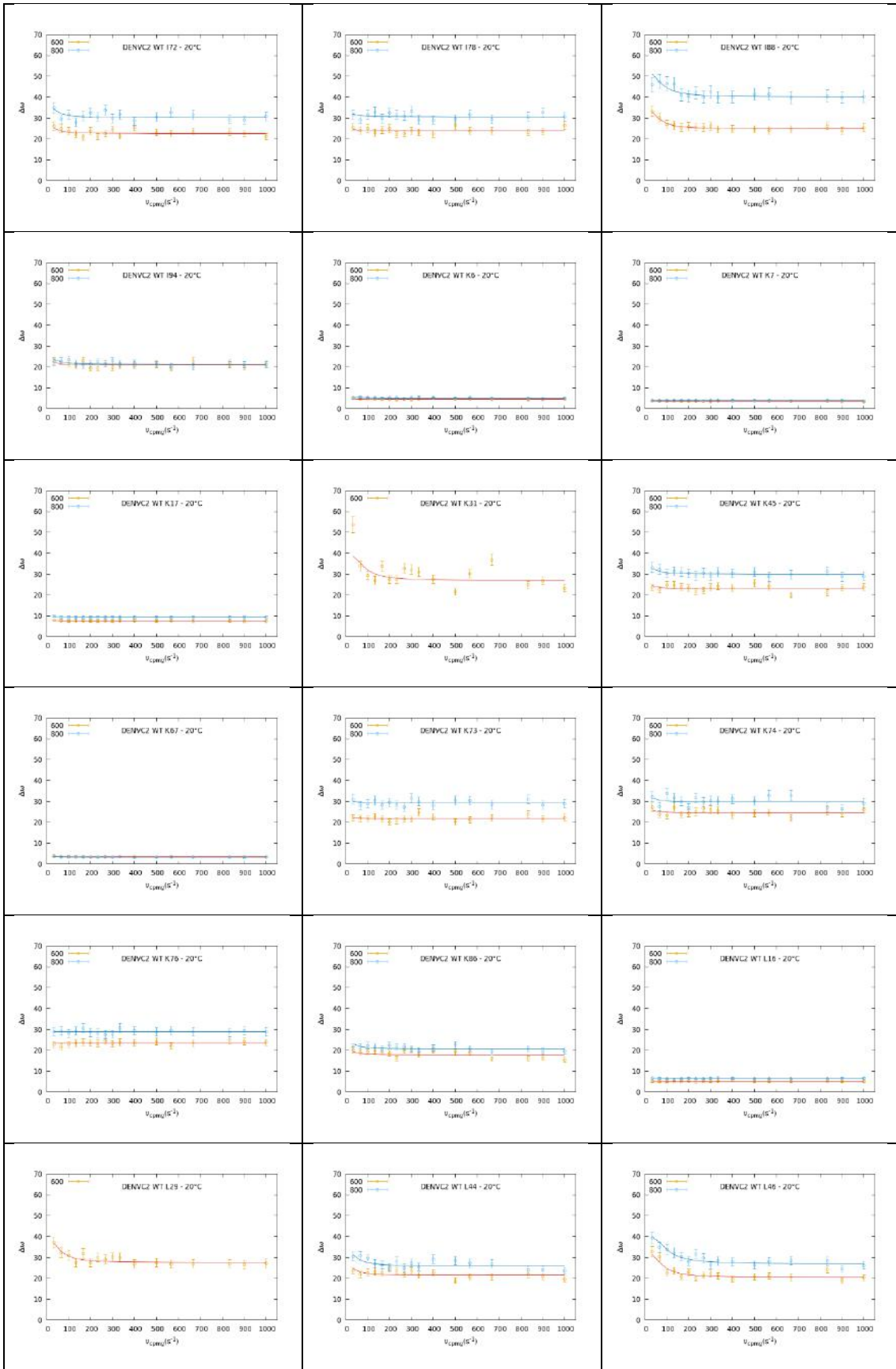
ZHANG, Y. et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, v. 12, n. 9, p. 1607–1618, set. 2004.

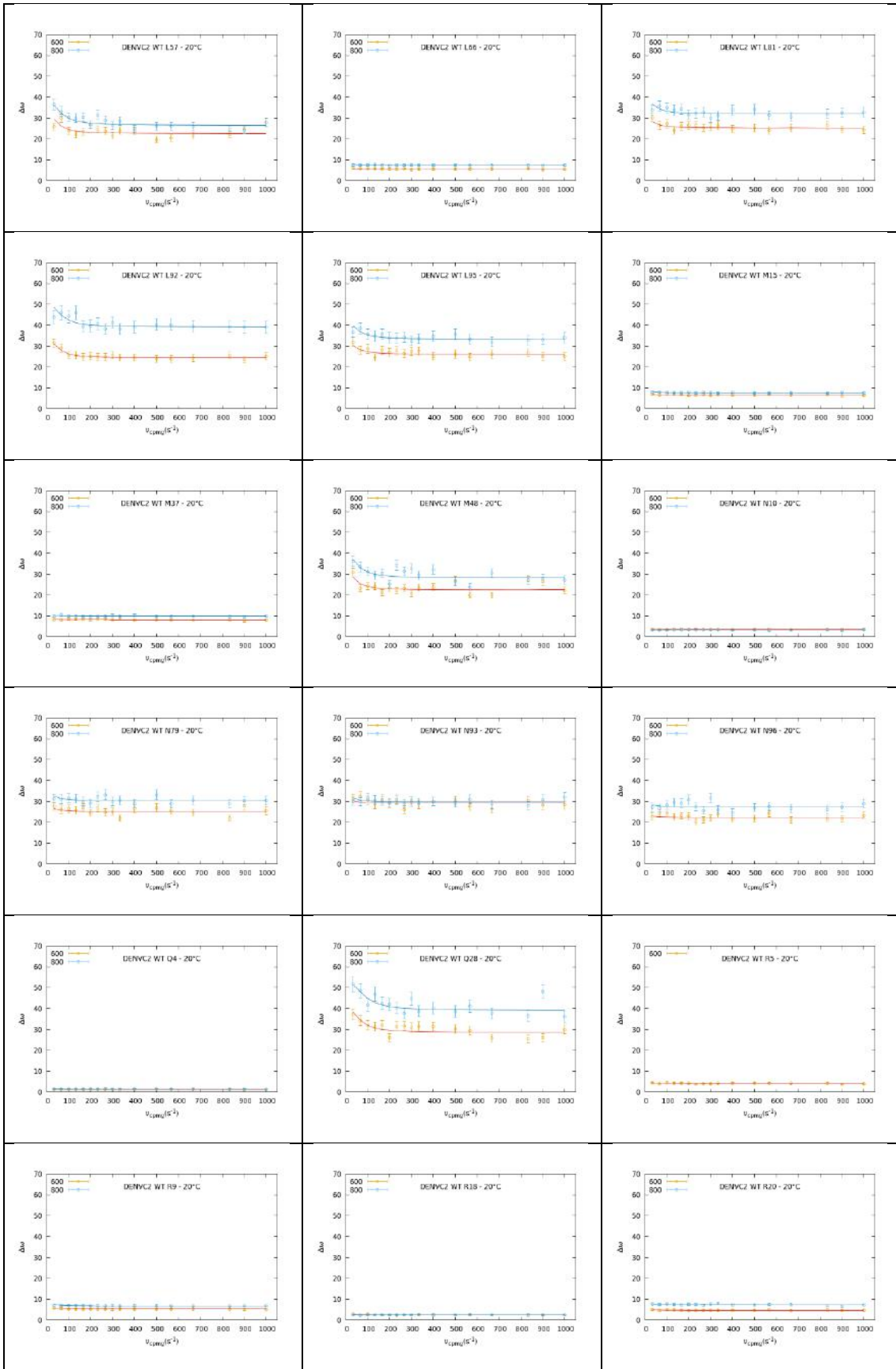
ZHANG, Y.; KOSTYUCHENKO, V. A.; ROSSMANN, M. G. Structural analysis of viral nucleocapsids by subtraction of partial projections. **Journal of Structural Biology**, v. 157, n. 2, p. 356–364, 2007.

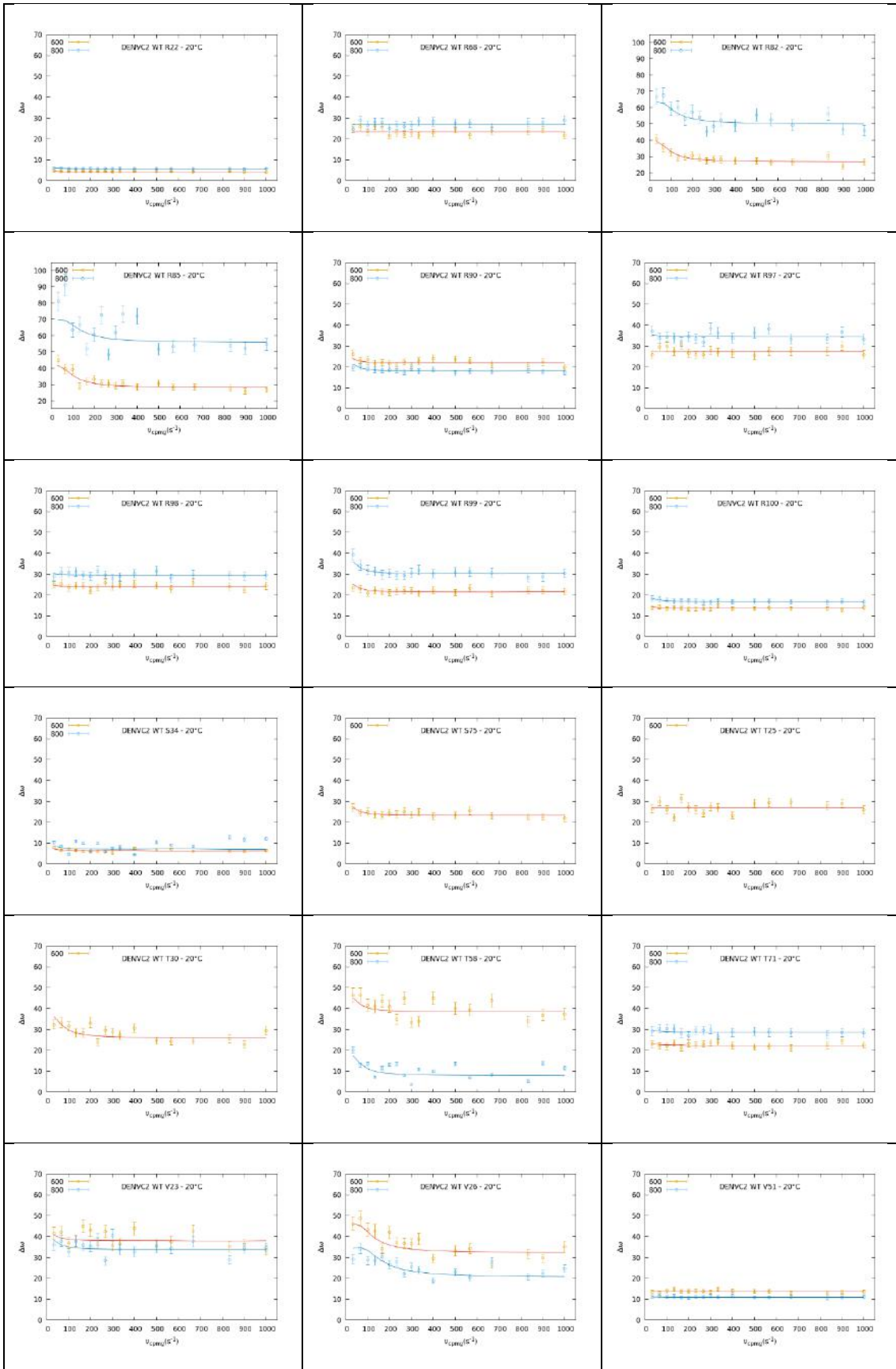
ANEXO I

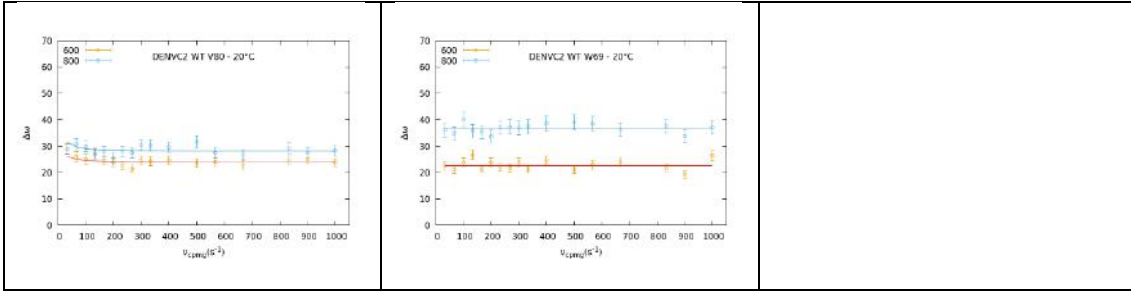
$\Delta\omega$ DENVC2 WT + 10 % 5G







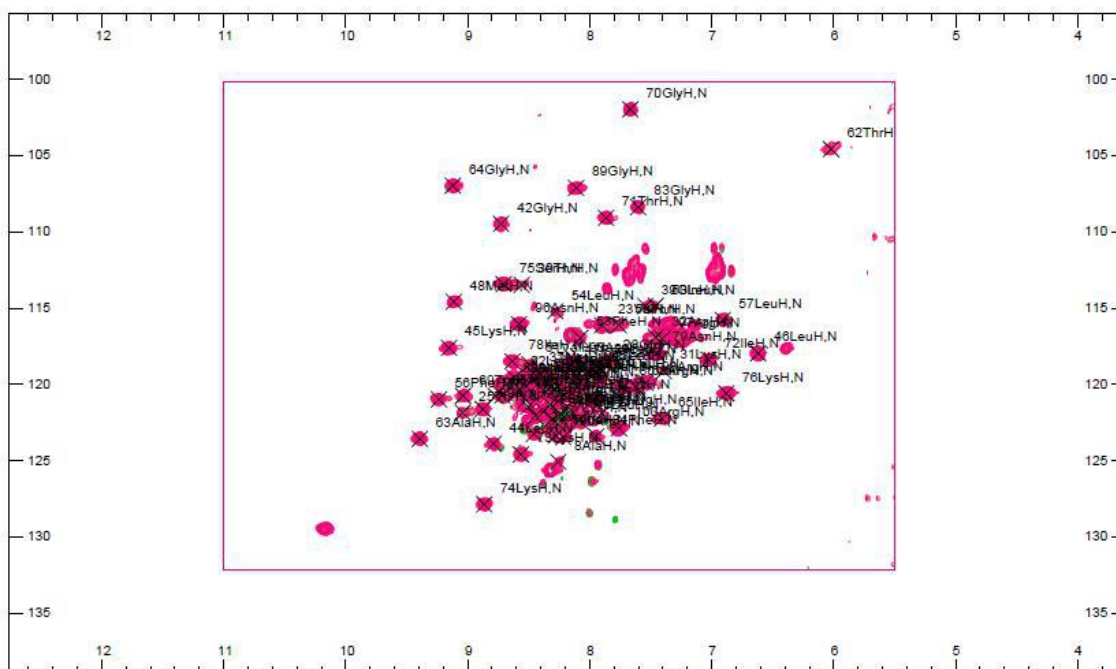




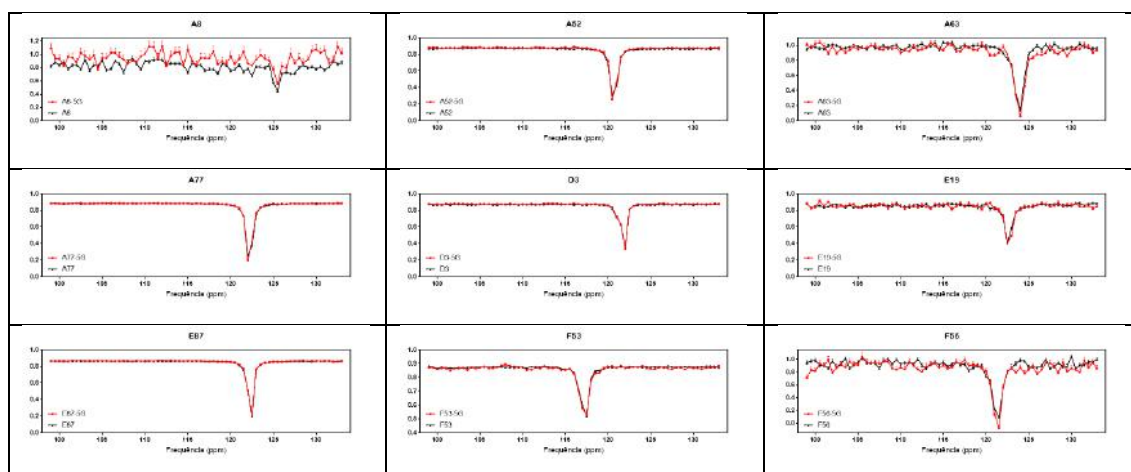
ANEXO II

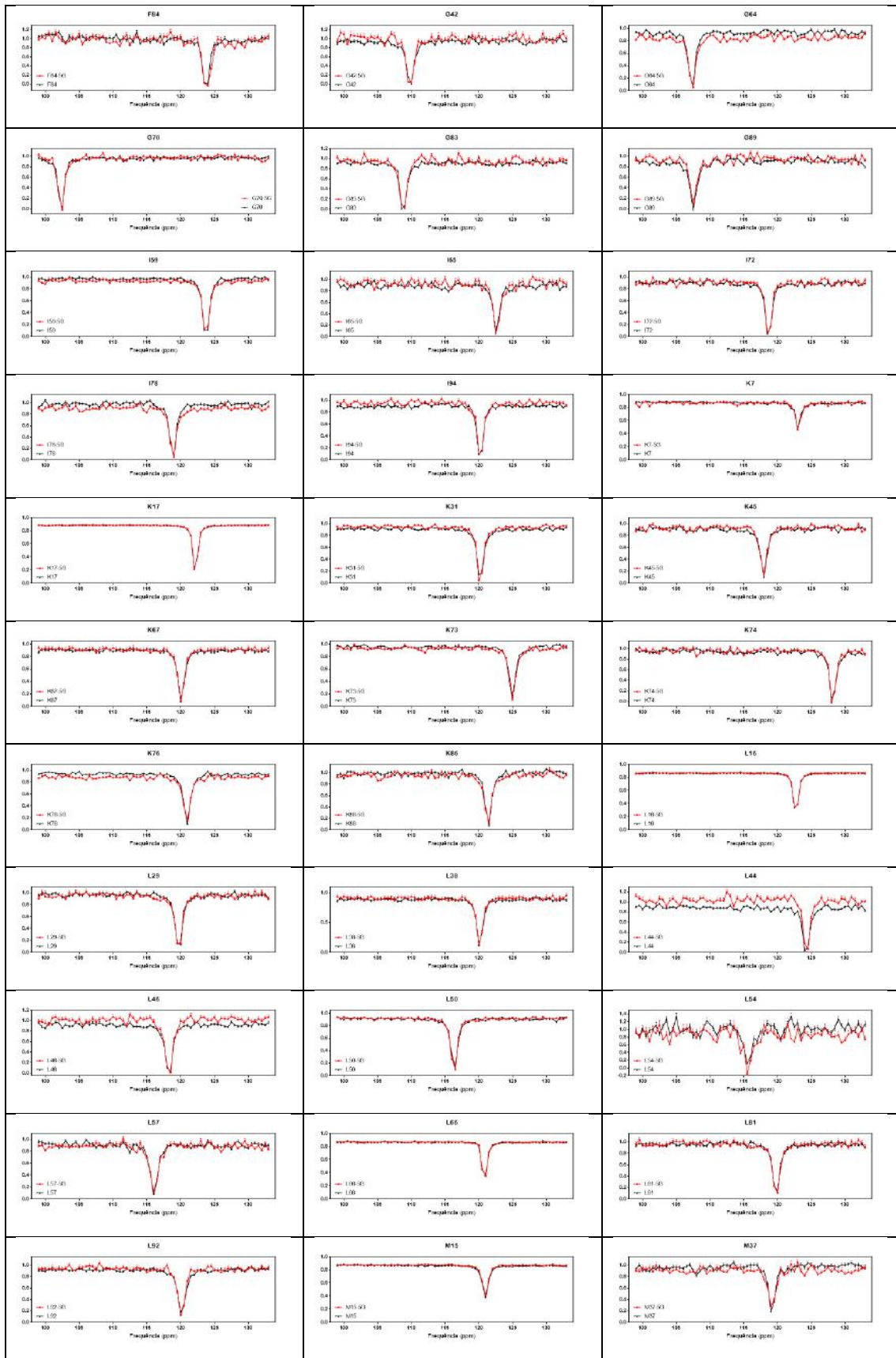
Perfil de CEST da DENVC2

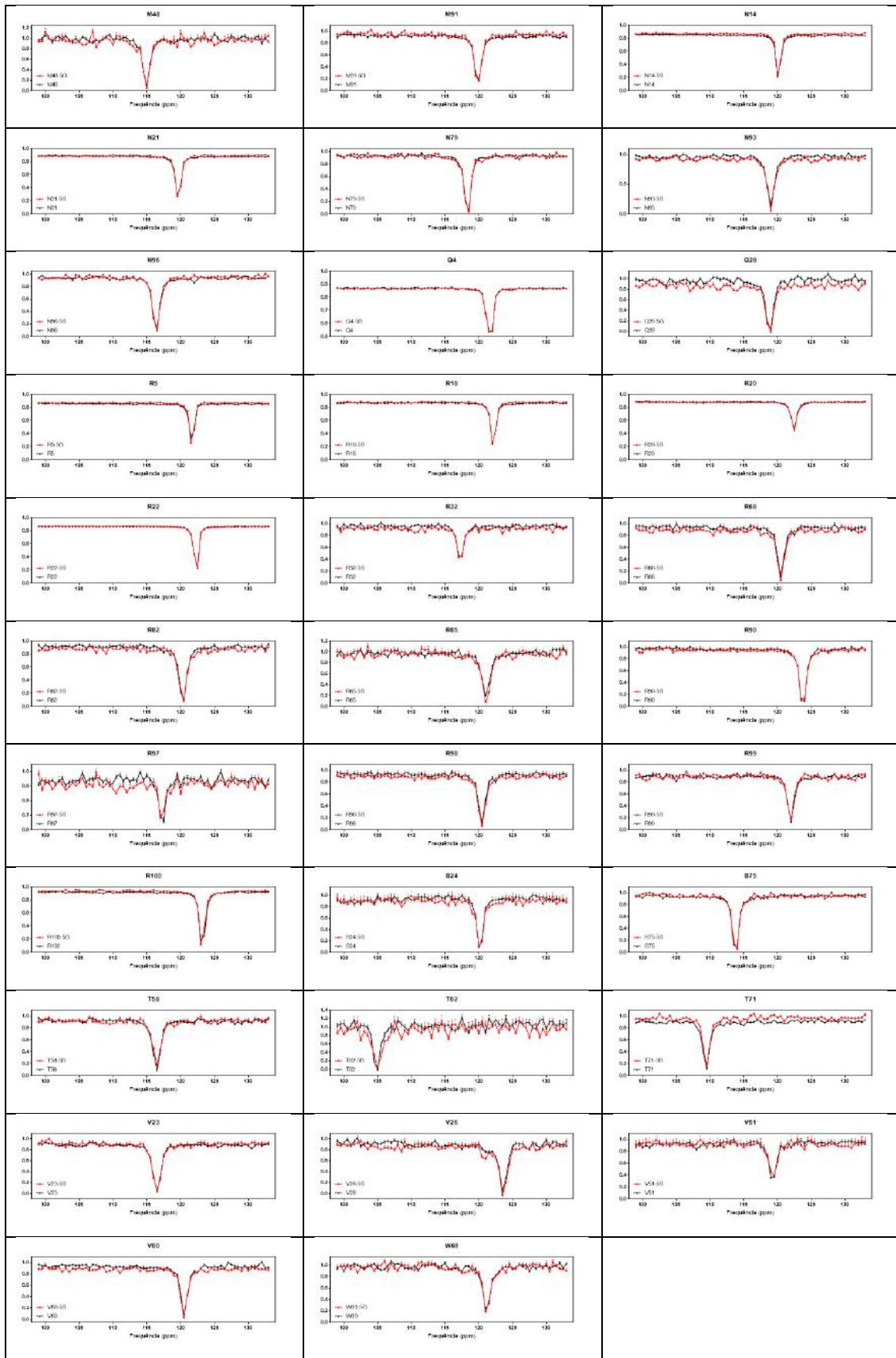
Espectro de experimento CEST na presença (verde) ou ausência (rosa) de 5 % de 5G (DENVC2 1:0.05 5G) com identificação do assinalamento dos resíduos de DENVC2.



Perfil de CEST de cada aminoácido localizado no espectro da DENVC2, pH 6,0, temperatura de 293 K. Perfis na presença (vermelho) ou ausência (preto) de 5 % de oligonucleotídeo 5G.







Curriculum Vitae

- Nome: **Gabriela Rocha de Araújo**
- Nascimento: **13/01/1995**
- Naturalidade: **Brasileira**

Formação Acadêmica

- Graduação: Ciências Biológicas: Modalidade Médica; Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ; 2013-2019.
- Mestrado: Química Biológica; Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ; 2019-2021.

Orientação de Estudante

--

Orientação de Monografia

--

Publicações

de Luna Marques, A., Caruso, I.P., Santana-Silva, M.C. *et al.* ^1H , ^{15}N and ^{13}C resonance assignments of the N-terminal domain of the nucleocapsid protein from the endemic human coronavirus HKU1. *Biomol NMR Assign* 15, 153–157 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12104-020-09998-9>.

Albert K, Raymundo DP, Panhelainen A, et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor reduces α -synuclein aggregation and propagation and alleviates behavioral alterations in vivo. *Mol Ther.* 2021;29(9):2821-2840. <https://doi:10.1016/j.ymthe.2021.04.035>.

Icaro Putinhon Caruso; Vitor dos Santos Almeida; Mariana Juliani do Amaral; Guilherme Caldas de Andrade; Gabriela Rocha de Araújo; Talita Stelling de Araújo; Jéssica Moreira de Azevedo; Glauce Moreno Barbosa; Leonardo Bartkevihi; Peter Reis Bezerra et al. Structure insights, thermodynamic profiles, dsDNA melting activity, and liquid-liquid phase separation of the SARS-CoV-2 nucleocapsid N-terminal domain binding to DNA. *bioRxiv* 2021.07.21.453232; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.07.21.453232>.