

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Ciências
ULisboa

**Biophysical Characterization of Measles Virus Fusion-
Inhibitory Peptides: a Focus on Membrane Interactions and
Self-Assembly**

Diogo Alexandre de Mendonça

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

Versão Pública

Dissertação orientada por:
Professor Doutor Miguel A.R.B. Castanho
Professora Doutora Ana Coutinho

2017

Resumo

O vírus do Sarampo é um dos vírus patogênicos mais contagiosos, que infeta anualmente 20 milhões de pessoas por todo o mundo, apesar da existência de uma vacina eficaz. É, mundialmente, uma das principais causas de morte infantil. O vírus do Sarampo é transmitido através de gotículas de aerossol que entram no trato respiratório ou por contato direto com secreções respiratórias infetadas, causando uma doença infecciosa aguda, a doença do Sarampo, caracterizada por febre e erupção cutânea maculopapular, muitas vezes combinado com tosse, coriza e conjuntivite. As primeiras células a serem infetadas pelo vírus são os macrófagos e células dendríticas que expressam o recetor CD150, presentes no trato respiratório. Após a migração das células infetadas para os tecidos linfáticos, o vírus infeta e prolifera em linfócitos B e T CD150⁺, com a consequente disseminação sistêmica para os restantes órgãos e tecidos, causando uma profunda supressão do sistema imunitário, o que pode levar ao aparecimento de infeções secundárias fatais. O recetor nectina-4 é também reconhecido pelo vírus do Sarampo em células epiteliais, e está associado à transmissão viral em fases posteriores da infeção. Em casos raros de infeção persistente do vírus do Sarampo, podem desenvolver-se doenças neurológicas fatais, nomeadamente encefalomielite disseminada aguda, encefalite por Sarampo com corpos de inclusão e panencefalite esclerosante subaguda.

A ação coordenada das proteínas hemaglutina (H) e de fusão (F) do invólucro viral é essencial para a entrada do vírus nas células alvo. Previamente ao contacto com as células hospedeiras, a proteína F do vírus encontra-se numa estrutura trimérica prefusogénica metaestável. Com a ligação da proteína H do vírus aos recetores, CD150 ou nectina-4 da célula hospedeira, esta sofre uma mudança conformacional que insere o péptido de fusão da proteína F na membrana celular da célula hospedeira. A energia resultante da ativação por parte da proteína H, provoca uma mudança conformacional na estrutura prefusogénica da proteína F, induzindo a reorientação dos trímeros numa estrutura posfusogénica, que aproxima e funde as membranas viral e celular, levando à formação de um poro de fusão. Os componentes do vírus são introduzidos no interior da célula hospedeira, iniciando a replicação viral.

O vírus do Sarampo foi declarado eliminado dos Estados Unidos da América em 2000, contudo, o ressurgimento deste vírus em países desenvolvidos tem vindo a ser verificado, devendo-se principalmente ao aumento de propaganda anti-vacinação, com consequente decréscimo na cobertura de vacinação, que resulta na acumulação de populações suscetíveis à infeção e transmissão deste vírus. O aumento dos casos de infeção pelo vírus do Sarampo e a inexistência de tratamentos para infeções agudas e persistentes do vírus exigem a procura por novas terapias. Na última década, os avanços tecnológicos nas técnicas de síntese de péptidos permitiram o desenvolvimento de uma nova geração de péptidos terapêuticos. Estes péptidos terapêuticos são capazes de se ligar com alta especificidade aos seus alvos *in vivo*, sendo bastante eficientes e com fracos efeitos secundários. Uma das classes destes péptidos são os antivirais inibidores de entrada, que são direcionados para a fase primária de infeção, atuando sobre o reconhecimento, acoplamento e entrada do vírus na célula alvo. Uma vez que inibem o avanço do ciclo viral antes da invasão celular, estes inibidores possuem claras vantagens perante outros antivirais que atuam em estágios tardios. Um dos casos de sucesso desta classe de antivirais é o enfuvirtide, o primeiro péptido sintético a ser aprovado para o tratamento do VIH. Estes péptidos são derivados da região *heptad repeat* do terminal C (HRC) das proteínas de fusão gp41 do VIH, atuando sobre a região *heptad repeat* do terminal N (HRN), impedindo a mudança conformacional que leva à fusão das membranas viral e celular. O desenvolvimento de inibidores de fusão com um modo de ação semelhante ao enfuvirtide, que atuam sobre outros vírus, tem demonstrado resultados promissores.

Péptidos HRC, derivados da região HRC da proteína F do vírus do Sarampo, inibem com eficácia o processo de fusão do vírus. O modo de ação proposto para os péptidos HRC consiste em bloquear as mudanças conformacionais fusogénicas da proteína F do vírus do Sarampo, mimetizando as interações

naturais do HRN e HRC durante a infecção. A estes péptidos foram aplicadas estratégias de dimerização e de conjugação com domínios lipófilos (colesterol e tocoferol) de modo a melhorar a sua eficácia antiviral. Estudos biológicos e biofísicos com estes péptidos demonstraram que a presença dos domínios lipófilos nos péptidos provoca a sua agregação em solução, enquanto que a dimerização aumenta o tamanho e diminui a compactação dos agregados, aumentando a sua capacidade de integração nas membranas, e levando a uma inibição eficaz do processo de fusão do vírus do Sarampo *in vitro* e *in vivo*. Estes resultados sugerem que o equilíbrio entre a agregação e a integração nas membranas, regula a eficácia *in vivo* dos péptidos inibidores de fusão. Com os resultados promissores obtidos para os péptidos HRC, questionou-se a possibilidade de aumentar a eficácia antiviral dos péptidos ao introduzir mutações na cadeia peptídica. Entre os anos de 2009 e 2010, um surto do vírus do Sarampo identificado na África do Sul, levou à infecção de mais de 18 000 indivíduos, tendo vários pacientes desenvolvido encefalite por Sarampo. Uma análise sequencial do vírus do Sarampo presente nos cérebros de 2 dos pacientes que sofreram de encefalite, revela uma mutação U para G na posição 1944 do gene da proteína F do vírus, o que se traduz numa mutação nos aminoácidos de uma leucina para triptofano na posição 454 (L454W) da proteína F. Estudos posteriores revelaram que a mutação L454W na proteína F do vírus do Sarampo aumenta a destabilização do estado prefusogénico metaestável desta proteína, o que promove a sua alteração conformacional para o estado posfusogénico. Verificou-se ainda que o aumento da temperatura, mesmo na ausência de um recetor celular, era suficiente para iniciar a mudança conformacional, facilitando a fusão entre as membranas viral e celular, o que explica a neurovirulência verificada durante o surto. Dado o efeito da mutação L454W na destabilização da proteína F do vírus, aplicou-se essa mesma mutação aos péptidos HRC, sintetizando-se um novo grupo de péptidos inibidores de fusão, denominados péptidos HRC-L454W.

Tal como com os péptidos HRC, os péptidos HRC-L454W foram conjugados com domínios lipófilos nas formas monoméricas e diméricas. O modo de ação proposto é semelhante ao dos péptidos HRC, contudo, colocamos a hipótese que a instabilidade adquirida pela mutação promova uma ligação melhorada dos péptidos à região HRN, tal como se verifica no vírus mutado. Estudos biológicos preliminares revelaram uma eficácia viral *in vitro* promissora, principalmente para o péptido HRC-L454W dimérico conjugado com colesterol. Contudo, a eficácia antiviral *in vivo* não apresenta diferenças significativas entre os péptidos HRC-L454W, revelando também uma eficácia antiviral reduzida em comparação aos péptidos HRC. Neste estudo, em conjunto com o anteriormente descrito para os péptidos de HRC, foram avaliadas propriedades físico-químicas, agregação e cinética de inserção de membrana dos péptidos HRC-L454W inferindo sobre seus efeitos na eficácia antiviral *in vivo*.

Os resultados obtidos sugerem que a presença do triptofano, contribui para o aumento da instabilidade e tamanho nos agregados formados pelos péptidos HRC-L454W. Semelhante aos péptidos HRC, os agregados apresentaram dois tipos organização estrutural. Péptidos monoméricos conjugados, formam agregados menores e compactos, conectados pelos domínios lipófilos formando um núcleo hidrofóbico relativamente estável, mantendo-se em estruturas micelares em solução ao longo do tempo, apresentando uma menor afinidade para a interação com as membranas. Péptidos diméricos conjugados, formam agregados maiores e menos compactos, formados por *clusters* de agregação instáveis. Estes aparentam ser resultantes do aumento das restrições estéricas no seu interior, capazes de se ligar através de interações entre as moléculas dos domínios lipófilos e as cadeias peptídicas de diferentes *clusters*, aumentando o seu tamanho em solução ao longo do tempo, apresentando uma maior afinidade para a interação com membranas. A maior hidrofobicidade das moléculas de colesterol, em relação às moléculas de tocoferol, favorece a formação de mais interações entre *clusters* de agregação, resultando em agregados mais instáveis, menos compactos e maiores. Propomos que, devido ao seu tamanho e natureza química, a presença do resíduo de triptofano eleve as restrições estéricas entre as cadeias peptídicas dentro dos agregados, aumentando significativamente a sua instabilidade. O aumento da

instabilidade e desordem no sistema de *clusters* de agregação aumenta a probabilidade de interações entre moléculas lipófilas e as cadeias peptídicas de péptidos presentes em diferentes *clusters*, o que contribui para o aumento do tamanho e instabilidade dos agregados. A elevada instabilidade e aumento do tamanho dos agregados em solução, principalmente para a péptido HRC-L454W dimérico conjugado com colesterol, induz a perda de suas propriedades como nanopartículas, reduzindo a biodistribuição dos péptidos, e diminuindo a sua eficácia antiviral *in vivo*.

A análise biofísica realizada neste estudo, introduz características relativas à instabilidade na agregação peptídica, que podem ser usadas no *design* eficiente de péptidos antivirais inibidores de fusão. A perda do equilíbrio ideal entre agregação e interação com as membranas, devido à instabilidade elevada nos agregados formados pelos péptidos, afeta negativamente a eficácia antiviral *in vivo*.