

Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro

PLANO DE ENSINO E PESQUISA

Luís Guilherme Mansor Basso

Professor Associado
Laboratório de Ciências Físicas
Centro de Ciência e Tecnologia

Apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PGCN) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte dos requisitos necessários para o credenciamento.

Campos dos Goytacazes, RJ

31/08/2021

SUMÁRIO

1. PROJETO DE PESQUISA: “Aplicações de Ressonância Magnética Eletrônica ao Estudo de Sistemas de Interesse Biológico”	1
1.1. Sistemas biomiméticos de bicamadas lipídicas para estudos de estrutura, dinâmica e função de proteínas de membranas	3
1.2. Mecanismo de ação de proteínas virais de fusão de membranas	9
1.3. Desenvolvimento do projeto de pesquisa – Objetivos gerais, metodologia e colaborações.....	13
2. PLANO DE ENSINO	15
3. REFERÊNCIAS	17

1. PROJETO DE PESQUISA: “Aplicações de Ressonância Magnética Eletrônica ao Estudo de Sistemas de Interesse Biológico”

As membranas biológicas são fundamentais para a existência de praticamente todas as formas de vida. Elas envolvem células, organelas, vesículas de carga e outras estruturas, definindo seus limites e mantendo as diferenças entre os ambientes interior e exterior. Essas biomembranas são estruturas de bicamada lipídica altamente dinâmicas que transportam máquinas proteicas fortemente reguladas, de grande complexidade e diversidade de funções [1]. As biomembranas participam ativamente do ciclo de vida celular, realizando suas atividades em associação com proteínas integrais, àquelas que atravessam a bicamada, ou periféricas, àquelas que residem na superfície, de membranas. Não surpreendentemente, proteínas da membrana são codificadas por aproximadamente 20–30% do genoma de diferentes organismos [2]. Em conjunto, elas desempenham papéis fundamentais em muitos mecanismos biológicos centrais das células vivas, como fornecer energia às células, organizar e regular atividades enzimáticas, providenciar meios para tráfico e homeostase, facilitar a transdução de informações e até o fornecimento de substratos para a biossíntese e sinalização [3–7].

A despeito dessas funções, todas as membranas biológicas têm uma estrutura geral comum: são formadas por um filme hidrofóbico bidimensional muito fino, de aproximadamente 30 Å de espessura, composto, principalmente, por moléculas de lipídios e de proteínas, atuando como barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas. Além disso, são estruturas dinâmicas e fluidas, possuindo alta mobilidade lateral [1]. A bidimensionalidade inerente das membranas produz anisotropia, como evidenciada por suas heterogeneidades transversal e lateral [8]. Tal propriedade, característica da organização das membranas, é essencial estrutural e funcionalmente. Com efeito, as composições de lipídios e de proteínas das faces externa e interna são diferentes umas das outras, refletindo assimetria transversal e as distintas funções realizadas nas duas monocamadas. A bicamada lipídica pode também apresentar heterogeneidade lateral, onde lipídios e proteínas se organizam em domínios ordenados, cujo polimorfismo é essencial para muitas funções celulares que acontecem na membrana [9].

O conhecimento das propriedades biofísicas das membranas é crucial para a compreensão do papel que diferentes lipídios desempenham nos processos vitais nas membranas biológicas, em particular, como afetam estrutural e funcionalmente proteínas de membranas. Em muitos casos, o mau funcionamento das membranas biológicas, desencadeado por alterações nas propriedades físicas ou químicas da bicamada lipídica ou anormalidades funcionais das proteínas da membrana, leva a doenças graves [10]. Propriedades físicas da bicamada lipídica como fluidez, curvatura, espessura da região apolar, área superficial lipídica, carga superficial, grau de ordenamento molecular, *etc.*, são definidas pela composição lipídica da membrana e por sua organização espacial. Tais propriedades desempenham um papel ativo na modulação da função celular. O comprimento e o grau de saturação das cadeias acila lipídicas, por exemplo, definem a espessura e o grau de empacotamento da região hidrofóbica da membrana, podendo modular a função de proteínas mecanossensíveis; o aumento da

densidade de lipídios negativamente carregados em certos locais das membranas pode induzir interações eletrostáticas com regiões catiônicas de proteínas integrais ou periféricas de membranas; a ligação de lipídios específicos como fosfatidilinositol, fosfatidilserina e/ou colesterol a proteínas integrais ou periféricas de membranas pode influenciar a heterogeneidade lateral e até a função das proteínas; entre outros [11]. Desta forma, a compreensão da correlação entre mudanças estruturais, dinâmicas e/ou funcionais de proteínas de membranas com alterações das propriedades biofísicas das bicamadas lipídicas é altamente desejável do ponto de vista mecânico [12–14].

O estudo de membranas biológicas é, no entanto, de difícil execução dada a complexidade de tais estruturas e a sua obtenção não-trivial. Para suplantarmos este problema, faz-se uso das chamadas membranas modelo, cuja composição simples e de fácil controle permite a investigação de propriedades físicas específicas de membranas que mimetizam as das células vivas. A utilização desta estratégia permite ao investigador ter controle de diversos parâmetros físicos das membranas como composição lipídica, curvatura, nível de hidratação, grau de empacotamento molecular, dinâmicas rotacional e translacional, entre outros.

Uma das grandes vantagens do sistema de interesse neste projeto é que tanto a estrutura dinâmica de membranas lipídicas como as interações lipídios-proteínas podem ser estudadas através de uma variedade de técnicas biofísicas, como difração de raios-X, microscopia eletrônica e de força atômica, espalhamento de raios-X a baixo ângulo, calorimetrias de titulação isotérmica e diferencial de varredura, fluorescências estática e resolvida no tempo, ressonância plasmônica de superfície, monocamadas de Langmuir, infravermelho, dicroísmo circular, ressonância magnética nuclear (RMN) e eletrônica (RME), entre outros [15,16]. Cada método físico fornece uma perspectiva diferente do sistema e múltiplos métodos são, em geral, necessários para se obter uma visão completa do sistema de interesse. Há questões que cada técnica pode responder melhor que outras.

Em particular, a técnica de RME aliada ao uso de marcadores de spin tem se mostrado uma ferramenta biofísica poderosa no estudo da dinâmica estrutural de membranas biológicas e de interações lipídios-proteínas [17, 18]. A alta sensibilidade e escala de tempo favorável da técnica de RME, combinada com a disponibilidade de marcadores de spin com estruturas muito similares a de componentes naturais de biomembranas permitem uma caracterização detalhada de diversos parâmetros físicos das bicamadas lipídicas. Adicionalmente, aspectos dinâmicos e estruturais de proteínas de membranas reconstituídas em bicamadas lipídicas podem ser determinados por meio da metodologia de marcação de spin sítio dirigida (SDSL). Nesta metodologia, uma sonda magneticamente ativa é introduzida de forma seletiva em uma região da proteína de interesse através da realização de mutação sítio dirigida, na qual um resíduo nativo é trocado por um de cisteína e submetido à marcação subsequente com a sonda [19]. De posse da proteína marcada, estudos estruturais e funcionais se tornam possíveis pela técnica de RME, cujas contribuições em biofísica/bioquímica de proteínas têm sido fundamentais e das mais variadas [20–23]. No Brasil, o grupo

coordenado pelo Prof. Costa Filho, no qual este professor atuou, tem sido pioneiro na implementação da metodologia SDSL-RME [24, 25].

No entanto, os espectros de RME de marcadores de spin ligados a lipídios ou proteínas de membranas são complexos e podem ser mal interpretados se apenas uma análise superficial é usada. Uma maneira bastante conveniente de suplantar tal problema é a de utilizar modelos teóricos para a dinâmica de spins baseados na equação estocástica de Liouville no regime de movimentos lentos [26], permitindo a quantificação de parâmetros locais que descrevem o entorno da sonda de spin ligada a lipídios ou proteínas [27, 28]. A identificação e caracterização de fases lipídicas, a existência de domínios líquido ordenados em membranas, o comportamento termotrópico dos lipídios, a existência de diferentes conformações proteicas são algumas das contribuições desta metodologia.

Apesar dos grandes avanços das técnicas de ressonâncias magnéticas nos últimos anos, elas ainda não são capazes de fornecer diretamente um quadro atomístico completo da dinâmica e da estrutura de proteínas de membranas e bicamadas lipídicas com resoluções temporal e espacial suficientes. Portanto, métodos que complementam as informações provenientes dessas técnicas são de grande interesse. Métodos computacionais, como as simulações de dinâmica molecular (DM), por exemplo, têm se tornado versáteis e cada vez mais confiáveis, sendo particularmente úteis para auxiliar nas análises de resultados experimentais provenientes de técnicas que não forneçam resolução atômica ou quando estudos experimentais detalhados se tornam difíceis ou até mesmo impossíveis. A habilidade de estudar moléculas em detalhe atomístico fornece um número de vantagens sobre as técnicas experimentais. Com DM, podemos obter *insights* cruciais em muitos problemas de interesse biológico em escalas de tempo da ordem de picossegundos [29]. Em particular, simulações de DM têm sido aplicadas tanto no problema do enovelamento proteico [30], quanto no refinamento das estruturas obtidas por RMN [31], cristalografia de raios-X [32] e RME convencional [33] ou pulsada [34].

O projeto de pesquisa deste professor engloba duas linhas principais de atuação em problemas de interesse biológico que envolvem biomembranas e proteínas integrais ou periféricas de membranas, quais sejam: (1) desenvolvimento de sistemas miméticos de membranas biológicas nativas para estudos de estrutura, dinâmica e função de proteínas de membranas; e (2) investigação do mecanismo de ação de proteínas virais de fusão de membranas. Na seção seguinte, buscamos introduzir de maneira objetiva e sucinta os problemas biológicos a serem estudados, a fim de que se possa entender que tipo de contribuição as técnicas de RME e DM podem vir a oferecer em cada caso. Não é buscado, portanto, uma descrição altamente aprofundada de cada tópico, mas sim uma apresentação básica dos pontos julgados relevantes.

1.1. Sistemas biomiméticos de bicamadas lipídicas para estudos de estrutura, dinâmica e função de proteínas de membranas

Aproximadamente 30% das proteínas expressas no genoma humano correspondem às proteínas da membrana (MP) [2]. Devido à sua localização nas membranas de células, vírus e

organelas, as MPs realizam processos complexos importantes na mediação da interação entre as células e seu ambiente. Entre suas atribuições, proteínas associadas a membranas atuam como canais iônicos, recebem e transmitem sinais através das membranas (receptores), importam ou exportam substratos, incluindo metais, açúcares e lipídios (transportadores), além de participar em processos enzimáticos, entre outros [35, 36]. Proteínas de membranas também estão associadas a grandes complexos dinâmicos, desempenhando papel essencial em processos celulares como a endocitose [37], a divisão celular [38, 39] e a migração. Além de desempenharem uma ampla variedade de funções celulares, MPs são alvos muito atraentes para o desenho racional de drogas, com quase metade de todos os produtos farmacêuticos direcionados a essas proteínas. O interesse farmacológico reside no fato de que muitas MPs estão associadas a doenças neurodegenerativas, endócrinas, câncer e isquemia [40–47]; outras são alvos para a administração eficiente de medicamentos [48] ou à inibição do transporte de drogas [49]. O papel das MPs na resposta imune e resistência a antibióticos também são relevantes para o desenvolvimento de agentes antivirais e antibacterianos [50, 51]. Portanto, adquirir conhecimento detalhado sobre a estrutura e função das proteínas de membranas em nível molecular é de grande importância biomédica.

No entanto, o estudo de proteínas de membrana apresenta vários desafios como o baixo rendimento de sua expressão e a dificuldade de purificação em uma forma química e termicamente estável para estudos subsequentes de caracterização biofísica e funcional. Como resultado, nosso entendimento da estrutura e função das MPs não conseguiu acompanhar o crescente conhecimento de proteínas solúveis, limitando nossa compreensão dos processos biológicos fundamentais e afetando nossa capacidade de tratar doenças.

Um dos aspectos mais complicados no estudo de proteínas de membrana é o de mimetizar a bicamada lipídica nativa com o objetivo de manter intactas a estrutura e a função da proteína. O uso de detergentes é atualmente a primeira escolha na estratégia de purificação de MPs [52, 53] e permitiu que descobertas bioquímicas importantes e pioneiras fossem feitas, principalmente no que concerne à estrutura e função das MPs [54–56]. Contudo, atualmente é sabido que detergentes não se apresentam como um solvente ideal para proteínas de membranas, pois podem afetar dramaticamente sua estrutura, estabilidades química e térmica e função biológica [57–59]. Por serem moléculas altamente dinâmicas, detergentes removem lipídios ligados às MPs durante os processos de extração e purificação das proteínas, podendo gerar instabilidades estrutural e funcional. Desta forma, novos métodos têm sido desenvolvidos para suplantar este problema e com o objetivo de preservar a estrutura e função das MPs.

Uma nova e promissora ferramenta biofísica desenvolvida para mimetizar a bicamada lipídica nativa é a utilização de copolímeros anfipáticos de estireno-ácido maléico (SMA). Este polímero possui partes alternadas de estireno (hidrofóbico) e ácido maléico (hidrofílico) que são capazes de interagir com membranas lipídicas (Figura 1A). Os anéis apolares do estireno se inserem entre as cadeias lipídicas, formando uma espécie de “cinta” polimérica que circunda a bicamada lipídica

evitando, outrossim, exposição ao solvente da região hidrofóbica dos lipídios [60]. Como resultado, são formadas as assim chamadas partículas lipídicas de SMA, ou SMALPs, que são discos de lipídios/polímeros de diâmetros em escala nanométrica. Os polímeros de SMA também são capazes de solubilizar espontaneamente membranas biológicas nativas, formando, assim, SMALPs nativos contendo proteínas de membranas [61–63] (Figura 1B). Estas propriedades levaram a uma rápida expansão da utilização destes polímeros em estudos biofísicos e bioquímicos de proteínas de membranas, visto que tais proteínas poderiam serem estudadas em seus ambientes lipídicos nativos. Desta forma, os polímeros de SMA oferecem um caminho alternativo importante para o isolamento e purificação de proteínas de membrana sem a necessidade de utilização de detergentes tradicionais, contribuindo, pois, para a manutenção da integridade estrutural e funcional da proteína. Proteínas bacterianas, vegetais, fúngicas e de mamíferos foram isoladas, purificadas e estudadas com sucesso usando essa nova tecnologia, em bicamadas lipídicas nativas que nunca entraram em contato com detergentes [64–70]. O sucesso deste método é evidenciado por um número crescente de publicações descrevendo uma variedade de proteínas, podendo ser conferido no site da crescente comunidade SMALP (<http://www.smalp.net/>) e em artigos recentes de revisão [71, 72].

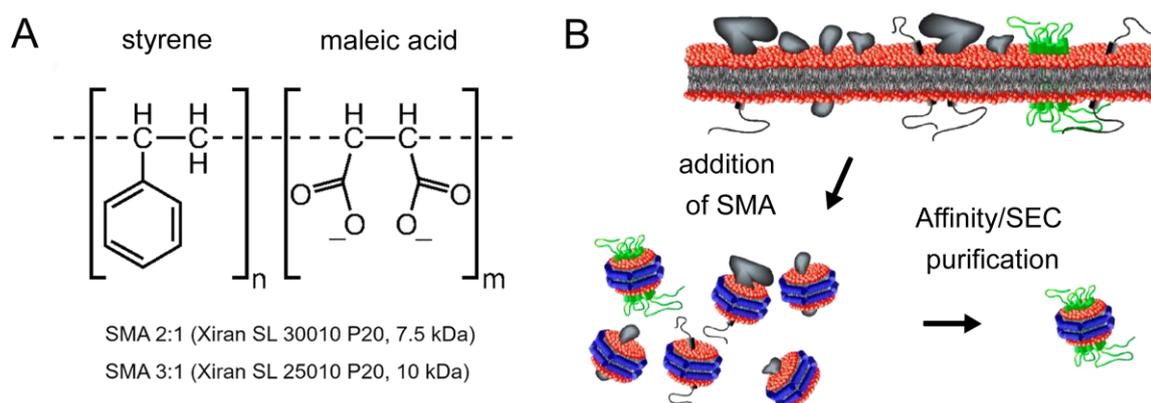


Figura 1. Copolímero de estireno-ácido maléico (SMA) em estudos de proteínas de membranas. (A) A estrutura química do SMA consiste de n grupos hidrofóbicos da molécula de estireno acoplados com m grupos hidrofílicos de ácido maléico. Os copolímeros tradicionais SMA 2:1 e SMA 3:1 da empresa Polyscope são os mais usados para extração de proteínas de membranas devido às suas propriedades intrínsecas como razão molar estireno:ácido maléico apropriada e massa molecular relativamente baixa (7,5 a 10,0 kDa). (B) Solubilização da fração da membrana nativa de células através da adição de SMA. O polímero aniônico adsorve nas membranas, insere-se na região hidrofóbica e espontaneamente forma discos lipídicos de tamanho nanométrico contendo diferentes proteínas de membranas, tendo o SMA circundando os discos e evitando exposição ao solvente da região hidrofóbica das bicamadas lipídicas. As assim chamadas partículas lipídicas de SMA contendo proteínas de membranas (SMALP) são purificadas via cromatografia de afinidade ou de exclusão molecular por tamanho (SEC). Figura adaptada da referência [73].

Outra vantagem da utilização de SMA também reside na possibilidade de preparação de amostras de proteínas de membranas purificadas em lipossomos com composições lipídicas específicas, ou seja, controladas pelo pesquisador. SMALPs nativos ou formados por lipídios sintéticos fornecem um ambiente de bicamada lipídica estável que é bem adequado para estudos biofísicos e funcionais de proteínas de membrana através de diversas técnicas biofísicas, sejam espectroscópicas, calorimétricas, hidrodinâmicas ou de espalhamento.

Vários trabalhos demonstraram o potencial da tecnologia SMA em estudos estruturais de membranas intactas e ilustram sua aplicabilidade na resolução de importantes complexos proteínas/lipídios. A estrutura do transportador multidroga AcrB em SMALPs nativos foi resolvida a 3.0 Å de resolução por crio-microscopia eletrônica (cryo-EM) [74]. A estrutura obtida continha 31 moléculas lipídicas nativas decorando a proteína, ou seja, interações proteína-lipídios nativas foram preservadas e puderam ser elucidadas. A estrutura de um complexo de 464 kDa compreendendo a proteína *Alternative Complex III* (ACIII) embebida em nanodiscos nativos e complexada com a citocromo c oxidase também foi estudada por cryo-EM [75]. A estrutura, determinada a 3.4 Å de resolução, mostrou os resíduos acilados responsáveis pelo transporte de elétrons fotossintéticos, grupos heme, aglomerados ferro-enxofre e fosfolipídios nativos, com o SMALP acomodando 6 unidades da ACIII contendo 48 hélices transmembrana. Aplicações da tecnologia SMA em estudos de cristalografia de raios-X [76], espectrometria de massas [77], transferência ressonante de energia fluorescente e simulações de dinâmica molecular [78], além das espectroscopias de ressonância magnética em suas vertentes eletrônica (RME) [79] e nuclear (RMN) [80], entre outras, também foram realizadas com sucesso.

Uma grande descoberta realizada pelo grupo do Prof. Stanley Opella, da Universidade da Califórnia, San Diego (UCSD), o qual este professor atuou como pós-doutorando por dois anos, foi o da utilização de SMALPs para estudos estruturais de proteínas de membranas através da técnica de RMN no estado sólido de amostras orientadas. O diâmetro dos SMALPs pode ser ajustado pela razão molar lipídio:SMA (q_d). Nanodiscos lipídicos com diâmetro superior a 30 nm, comumente chamados na literatura de macrodiscos, possuem a capacidade de se orientar no campo magnético do espectrômetro de RMN [81]. Alinhamento magnético de moléculas lipídicas é possível graças ao não-nulo tensor de susceptibilidade diamagnética de bicamadas lipídicas [82]. O recente trabalho do grupo publicado na clássica revista *Biophysical Journal* [83] demonstra a viabilidade em se utilizar macrodiscos formados por SMA para estudos de RMN no estado sólido de amostras orientadas. Foi demonstrado que, estabelecidas certas condições de q_d , temperatura e concentração lipídica, macrodiscos de SMA eram estáveis e se alinhavam prontamente com o vetor normal à bicamada orientado paralela ou perpendicularmente à direção do campo magnético estático externo do espectrômetro de RMN. Os resultados foram obtidos na ausência e na presença da Pf1, uma proteína de um bacteriófago constituída por uma hélice transmembrana. A qualidade espectral avaliada pelas larguras de linha do ^{31}P dos lipídios e dos sinais de ^{15}N das amidas da proteína nas amostras orientadas resultou em um conjunto homogêneo de ressonâncias com larguras de linha dos sinais de ^{15}N da ordem de 0,3 ppm, as mais estreitas obtidas até hoje em RMN no estado sólido de amostras orientadas [83]. Isso teve um forte impacto dentro do campo de biologia estrutural e vai certamente contribuir para superar um grande obstáculo que os pesquisadores que utilizam RMN no estado sólido de amostras orientadas enfrentam, que é o de reconstituir, de maneira estável e reprodutível, proteínas de

membrana em dois sistemas prévia e frequentemente usados, quais sejam, bicelas alinhadas magneticamente ou bicamadas lipídicas alinhadas mecanicamente em placas de vidro suportadas.

O grupo do Prof. Opella também conseguiu demonstrar que SMALPs nativos contendo a proteorodopsina (GpR, do inglês *green-absorbing proteorhodopsin*), uma proteína contendo sete hélices transmembrana e que atua como bomba de prótons em bactérias, também foram capazes de se alinhar magneticamente (Figura 2). Apesar destes dados promissores, a adição de lipídios sintéticos nos SMALPs nativos foi necessária para se obter amostras magneticamente orientadas. Contudo, a largura das linhas espectrais das ressonâncias do ^{31}P e ^{15}N ainda estão aquém do desejado para estudos estruturais, em alta resolução, de proteínas de membranas por RMN. O alargamento espectral das linhas de ressonância provavelmente está relacionado à não homogeneidade orientacional dos SMALPs com relação ao campo magnético e da proteína com relação à bicamada lipídica. As possíveis causas para tais problemas podem ser a não homogeneidade do tamanho e da composição dos discos lipídicos, incompatibilidade das propriedades físico-químicas das bicamadas lipídicas com alinhamento magnético, possível interação GpR-SMA, entre outras. Desta forma, faz-se altamente necessária uma investigação mais detalhada das propriedades físicas de SMALPs nativos e constituídos por lipídios sintéticos contendo proteínas de membranas e dos mecanismos de formação de macrodiscos de SMA e de alinhamento magnético. E a espectroscopia de RME aliada ao uso de marcadores de spin pode dar uma contribuição importante e valiosa neste campo.

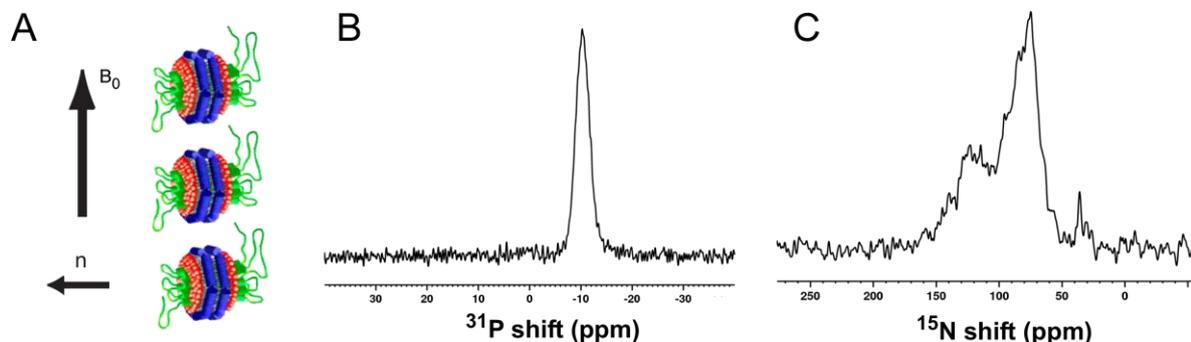


Figura 2. Espectros de RMN no estado sólido de amostras magneticamente orientadas de proteorodopsina uniformemente marcada com ^{15}N e incorporadas em nanodiscos lipídicos nativos. (A) Representação esquemática de uma amostra magneticamente alinhada de SMALP nativo contendo uma proteína de membrana hipotética, no qual o vetor normal à bicamada (n) está orientado perpendicularmente à direção do campo magnético estático externo aplicado (B_0). (B) Espectro unidimensional de deslocamento químico do ^{31}P dos lipídios da amostra de SMALP contendo GpR e obtido na frequência de ressonância de 283 MHz com desacoplamento de ^1H e o correspondente (C) espectro unidimensional de deslocamento químico do ^{15}N da proteína. O pico ao redor de 11 ppm obtido no espectro de fósforo assim como os sinais obtidos no intervalo de deslocamento químico entre 60 e 110 ppm no espectro do ^{15}N são indicativos de alinhamento de n e do eixo da proteína perpendicularmente ao campo magnético externo B_0 , como mostrado no item A.

Aplicações da tecnologia SMALP em RME foram demonstradas com sucesso e têm sido lideradas pelo grupo do Prof. Gary Lorigan, da Universidade de Miami. Seu grupo tem usado os polímeros SMA para caracterização espectroscópica de nanodiscos formados por lipídios sintéticos na ausência e na presença de KCNE1, uma proteína constituída por uma hélice transmembrana que modula a função de canais de potássio operados por voltagem [84]. Contudo, existe pouca informação

a respeito da fluidez e do empacotamento lipídicos nestes sistemas e, principalmente, em SMALPs nativos. Adicionalmente, as interações entre os polímeros de SMA e as bicamadas lipídicas assim como entre os polímeros e as proteínas embebidas nos SMALPs ainda não foram elucidadas.

O grupo do Prof. Lorigan também demonstrou a capacidade de orientação de bicelas de fosfolipídios nos baixos campos magnéticos dos espectrômetros de RME, notavelmente nas bandas X e Q [85–88]. Contudo, ainda não há informação sobre a habilidade dos macrodiscos de SMA de se orientarem nos baixos campos magnéticos das bandas X e Q.

Desta forma, apesar de grandes avanços na área e de resultados promissores, ainda há muito a ser entendido. Em particular, este projeto de pesquisa pretende-se valer dos inúmeros *gaps* existentes e fornecer informações importantes acerca do mecanismo de formação de macrodiscos lipídicos sintéticos e nativos, do mecanismo de alinhamento magnético dos SMALPs, do comportamento termotrópicos dos discos lipídicos e possível coexistência de fases, da dinâmica estrutural de SMALPs de diferentes composições lipídicas e do efeito das interações proteína-lipídios, proteína-polímero e lipídio-polímero nas propriedades físicas dos SMALPs. Para isto, iremos nos valer, principalmente, da técnica de RME aliada ao uso de marcadores de spin e simulações espectrais e, sempre que necessário, de simulações de dinâmica molecular de sistemas proteína/lipídio/polímero para entendermos as interações entre os três componentes do sistema.

Dois sistemas-modelo serão usados:

1) Peptídeos WALP

Trata-se de um peptídeo sintético modelo de hélice transmembrana, composto por resíduos de triptofano (W), alanina (A) e leucina (L), e cuja estrutura primária variável contendo n unidades do dipeptídeo hidrofóbico LA: GWW(LA) $_n$ LWWA [89]. Os resíduos de triptofano flanqueadores da sequência permitem que os extremos N- e C-terminais estejam ancorados na superfície da membrana. Este peptídeo modelo foi planejado para estudar diversas propriedades de proteínas de membranas incorporadas em bicamadas lipídicas, como orientação, extensão da inserção e *mismatch* hidrofóbico. Peptídeos WALP foram extensivamente estudados por diversas técnicas, entre elas RMN [90, 91] e RME [92, 93]. O aminoácido paramagnético TOAC [94] será usado para monitorar as mudanças estruturais e dinâmicas do peptídeo incorporado em SMALPs modelo.

2) Proteorodopsina

Trata-se de uma proteína de membrana de bactérias marinhas que usa um cromóforo para realizar a função de bombeamento de prótons [95]. Possuindo sete α -hélices transmembrana [96], a proteorodopsina faz parte da família dos receptores acoplados a proteína G (GPCR), proteínas de membrana que captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução de sinal no interior da célula. Este receptor é um modelo de proteína de membrana extensivamente estudado por diversos métodos biofísicos, entre eles, simulações de dinâmica molecular [97], RMN [98] e RME [99].

A utilização destes dois modelos de proteínas de membranas, uma constituindo de uma hélice transmembrana e a outra de sete hélices transmembrana, irá nos permitir a realização de estudos detalhados por RME e simulações de dinâmica molecular para entendermos melhor a interação entre os componentes dos SMALPs, assim contribuindo para o avanço do campo de biofísica molecular de proteínas de membrana.

1.2. Mecanismo de ação de proteínas virais de fusão de membranas

Os vírus desenvolveram uma grande variedade de proteínas de membranas que estão envolvidas em uma infinidade de tarefas de seu ciclo de vida. Algumas dessas proteínas estão simplesmente ancoradas à membrana do envelope viral e desempenham funções estruturais simples, outras executam tarefas mais elaboradas como a de modular o equilíbrio eletroquímico no próprio vírus e em compartimentos sub-celulares na célula hospedeira, atuando como canais iônicos [100]. Ainda mais interessante são as proteínas envolvidas no evento inicial do ciclo de vida dos vírus na célula hospedeira, as chamadas proteínas de fusão. Estas proteínas transmembrana são verdadeiras máquinas biológicas altamente especializadas no processo de infecção viral e entrada ao hospedeiro. Elas realizam a difícil tarefa de fundir as membranas celular e viral para acessar o conteúdo citoplasmático. Apesar de termodinamicamente favorável, a fusão de duas bicamadas lipídicas possui uma alta barreira cinética, da ordem de centenas de kcal/mol [101, 102]. Proteínas virais de fusão diminuem essa barreira energética usando a energia livre liberada durante as mudanças conformacionais proteicas, acelerando, consideravelmente o processo de fusão. A determinação das estruturas de proteínas de fusão e de domínios individuais dessas proteínas e seus complexos com proteínas regulatórias e membranas permitiu desvendar os diversos passos desse complexo e orquestrado mecanismo de fusão mediado por proteínas virais [103, 104].

No final de 2002, o aparecimento de uma doença respiratória denominada Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) na província chinesa de Guangdong se espalhou rapidamente pelo mundo até se transformar, em 2003, na primeira epidemia mundial do século XXI. Entre março e julho daquele ano, a eclosão dessa epidemia viral apavorou o mundo ao contaminar mais de 8.000 pessoas e provocar 774 mortes [105]. A taxa de mortalidade foi de 9,6%, sendo superior a 50% em pessoas acima de 60 anos [106]. Como comparação, a taxa de fatalidade do vírus *influenza*, da gripe, gira em torno de 0,6% e também acomete principalmente os idosos.

Após o surto da doença, esforços concentrados de pesquisadores em todo o mundo e coordenados pela Organização Mundial da Saúde resultaram em uma rápida identificação e caracterização do agente etiológico da SARS: um novo coronavírus (CoV) que foi denominado SARS-CoV [107]. Coronavírus são um grupo de vírus de RNA de cadeia simples pertencentes à família *Coronaviridae* e de polaridade positiva, ou seja, que servem diretamente para a síntese proteica. Esse grupo de vírus é capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros, incluindo muitas espécies de mamíferos, além de causar uma variedade de doenças, incluindo doenças respiratórias,

gastrointestinais, hepáticas e neurológicas [108]. Em seres humanos, coronavírus comumente causam resfriado, mas podem provocar pneumonia e gastroenterite.

Atualmente, o reaparecimento da SARS a partir de reservatórios animais é, ainda, um potente risco para futuras ocorrências [109]. Com efeito, uma nova doença respiratória causada por coronavírus, a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), apareceu na Arábia Saudita em 2012 [110]. Possuindo características e sintomas parecidos aos da SARS, a MERS rapidamente se espalhou por 27 países, levando ao óbito cerca de 35% das pessoas infectadas com o MERS-CoV, uma taxa bem superior àquela da SARS [111]. Mais recentemente, em dezembro de 2019, tivemos o surgimento de um novo coronavírus, o SARS-CoV-2, causador da COVID-19, na cidade de Wuhan, China, que provocou uma pandemia sem precedentes [112]. Dada a alta transmissibilidade da doença, o surto inicial evoluiu rapidamente e se espalhou pelo mundo, dando origem a uma crise global de saúde de pública. Até 31 de agosto de 2021, mais de 217 milhões de pessoas em 191 países e territórios do mundo foram contaminadas pelo SARS-CoV-2, levando ao óbito mais de 4,5 milhões de pessoas. Somente no Brasil, os casos confirmados já passam de 20,7 milhões e o número de óbitos é superior a 579 mil (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). Nos três casos, acredita-se que a infecção humana tenha surgido pelo contato com um hospedeiro intermediário que, por sua vez, adquiriu o vírus do reservatório original, presumivelmente morcegos [113].

A base da infecção viral reside principalmente na capacidade da proteína *Spike* (S) de se ligar aos receptores da superfície celular e iniciar o processo de infecção. Ancoradas nas membranas dos coronavírus através de uma porção C-terminal transmembrana, essas proteínas se oligomerizam e formam as espículas do envelope viral (Figura 3A). Essas espículas são responsáveis tanto pela ligação a receptores celulares quanto pela subsequente fusão da bicamada lipídica do envelope viral com a membrana celular do hospedeiro, levando à liberação do genoma do vírus no citoplasma [114]. A glicoproteína S possui duas subunidades, S1 e S2, que desempenham funções distintas no processo de fusão. A subunidade S1 é a responsável pelo reconhecimento de diversos receptores das células do hospedeiro [115–117], enquanto a S2 é responsável diretamente pela fusão das membranas celular e viral [118]. A arquitetura básica desta última subunidade inclui segmentos funcionalmente essenciais para o mecanismo de infecção, entre eles se destacam o peptídeo de fusão (FP), o domínio transmembrana (TM) e duas regiões *heptad* de repetição altamente conservadas (HR1 e HR2) [119] (Figura 3B). Tais domínios são descritos como alvos principais para intervenção terapêutica [120].

Uma característica marcante de qualquer proteína viral de fusão é o chamado peptídeo de fusão, um segmento contendo entre 15 e 30 aminoácidos que tem a capacidade de se ligar a membranas e modificar suas propriedades biofísicas, iniciando, assim, o processo de fusão [121]. Em particular, os FPs promovem mudanças significativas na estrutura, fluidez, curvatura e hidratação da bicamada lipídica das membranas das células hospedeiras e fornecem a energia livre necessária para ativar o renovelamento da proteína S [122]. Até o momento, a localização exata e a sequência dos peptídeos de fusão de coronavírus não são bem conhecidas [123], contudo, por analogia com outras

proteínas virais de fusão de classe I, são preditas pertencerem à região N-terminal do segmento HR1 da subunidade S2 [124, 125] (Figura 3B), altamente conservada na família *Coronaviridae* [126].

No caso do SARS-CoV, um estudo de mutagênese dos resíduos 798–815, combinado com estudos estruturais e de atividade fusogênica de peptídeos isolados, mostrou a importância daquela região como candidato a peptídeo de fusão da proteína S do SARS-CoV [127]. Consistente com seu papel durante a fusão de membranas vírus-hospedeiro, este suposto FP foi capaz de induzir empacotamento lipídico dependente de Ca^{2+} em modelos de membranas [128]. Por outro lado, devido às altas atividades de mistura lipídica e permeabilização, além da habilidade de promover desidratação e curvatura em membranas, mostramos que o segmento 851–888, também conservado, pode representar o domínio mais ativo da glicoproteína S do SARS-CoV [129]. Este candidato a FP está localizado entre a região N-terminal da subunidade S2 e o domínio HR1 (Figuras 3B e 3C). Adicionalmente, diferentes domínios da proteína S do SARS-CoV foram mostrados ser capazes de modificar significativamente as propriedades biofísicas das membranas [130]. A possibilidade da presença de dois ou três domínios ativos em bicamadas com características de FP na proteína S do SARS-CoV é muito intrigante. Como essas moléculas agem para promover a fusão da membrana requer, portanto, uma investigação mais aprofundada. Já para o MERS-CoV, um estudo recente fez uso de alinhamento múltiplo de sequências utilizando estruturas primárias das subunidades S2 de diversos CoVs e identificou o segmento formado pelos resíduos 884–898 da proteína S com propriedades consistentes com as de peptídeos de fusão [131]. Contudo, nenhum estudo biofísico descrevendo os efeitos deste candidato a FP do MERS-CoV foi relatado.

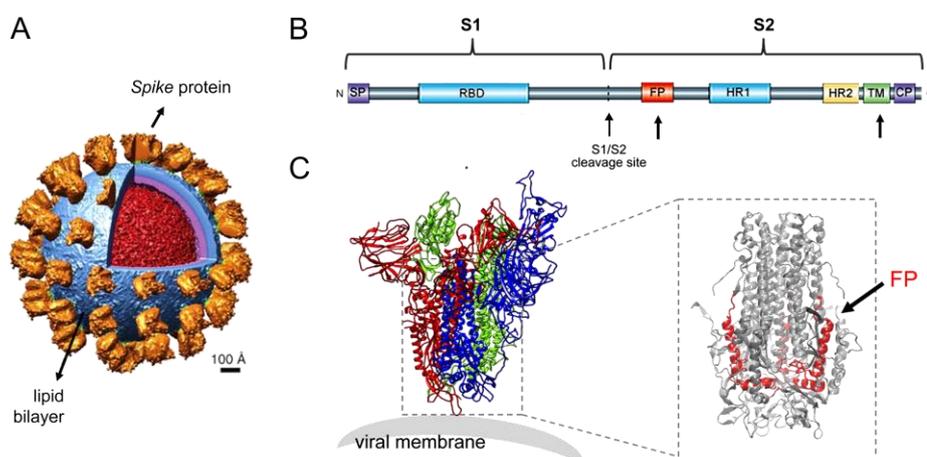


Figura 3. Arquitetura geral da glicoproteína *Spike* de coronavírus e localização dos peptídeos funcionais de membrana. (A) Reconstrução tridimensional do SARS-CoV através de crio-microscopia eletrônica (cryo-EM). As espículas (homotrímeros da proteína *Spike*, em laranja) estão incorporadas no envelope viral (bicamada lipídica, em azul e roxo) através de uma haste fina (verde). No modelo, estão ainda destacados seu interior (nucleocapsídeo, em vermelho) e o espaçamento isotrópico das espículas. Figura adaptada da referência 132. (B) Representação esquemática da estrutura primária da proteína *Spike* de coronavírus, mostrando os domínios relevantes das subunidades S1 e S2. SP e RBD na subunidade S1 representam o peptídeo sinal e o domínio de ligação ao receptor. HR1 e HR2 representam as repetições *heptad* que formam o feixe de seis hélices característico da conformação pós-fusão do trímero da proteína *Spike*. CP corresponde ao domínio citoplasmático. As setas apontando para o peptídeo de fusão (FP) e para o domínio transmembrana (TM) mostram a localização dos domínios que estamos interessados. (C) Estrutura tridimensional da conformação trimérica da proteína *Spike* do SARS-CoV em sua conformação pré-fusão por cryo-EM de partícula única [133] e a localização do peptídeo FP. O domínio transmembrana, não representado aqui por falta de densidade eletrônica, estaria inserido na membrana viral. Figura adaptada das referências [133] and [134].

Embora o mecanismo exato pelo qual CoVs entram nas células do hospedeiro ainda não esteja totalmente elucidado, há evidências que não somente o FP, mas também o domínio transmembrana (TM), região altamente conservada e localizada no C-terminal da proteína S de coronavírus (Figura 3B), participa ativamente do processo de fusão de membranas [135–137]. Ambos FP e TM modificam os parâmetros biofísicos das membranas de tal maneira a promoverem as mudanças topológicas necessárias nas bicamadas lipídicas para a formação de poros. Há evidências substanciais de que o domínio TM é importante não somente para a ancoragem de S2 nas membranas, mas também para a oligomerização [138] e a fusão [139]. A região N-terminal do domínio TM de proteínas virais de fusão de classe I também se mostrou potencial alvo para inibidores virais [140, 141].

Adicionalmente, mostramos que o domínio TM da proteína S do SARS-CoV exibe um motivo CRAC (*cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*) que possibilita ao peptídeo interagir com colesterol supostamente para facilitar o mecanismo de fusão da membrana [142, 143]. Mostramos que o TM se associa a membranas, oligomeriza-se nas bicamadas lipídicas, promove a segregação de colesterol e aumenta o ordenamento local da superfície da membrana. A técnica de RME foi essencial para mostrarmos que o domínio TM induz modificações das propriedades biofísicas apenas de membranas contendo domínios líquido-ordenados (manuscrito em preparação). Esses resultados podem ser relevantes para o mecanismo viral de fusão, já que a coexistência de fases líquido-ordenada (complexos de proteínas e lipídios ricos em colesterol, chamados de *rafts* lipídicos [9]) e líquido-desordenada podem ocorrer em membranas biológicas reais.

Apesar da importância destas duas regiões na estabilização e oligomerização da subunidade S2 da proteína *Spike* do SARS-CoV e na reação de fusão de membranas, nenhuma explicação estrutural foi fornecida para a elucidação da função precisa dos domínios FP e TM. Esforços consideráveis têm sido direcionados na elucidação da estrutura e interação com membranas dos FPs de diferentes vírus, contudo, poucos trabalhos têm focado na importância da correlação estrutura-função tanto dos FPs quanto do TM de coronavírus. Elucidar a natureza das interações entre fosfolipídios e proteínas de membranas, assim como a determinação da estrutura das regiões membranotrópicas dessas proteínas, pode ajudar a compreender o orquestrado mecanismo de fusão dessas máquinas biológicas.

Neste contexto, este projeto de pesquisa tem como objetivo principal o entendimento do mecanismo de ação em membranas biológicas de domínios funcionalmente relevantes ao processo de fusão de membranas induzido pelas proteínas *Spike* dos coronavírus causadores da SARS e da MERS. Apesar de grandes avanços em estudos de FPs e TMs de diferentes vírus, dados sobre coronavírus são escassos. Informações precisas sobre o papel desses domínios no processo de fusão em sistemas complexos são, no entanto, de difícil obtenção. Portanto, peptídeos sintéticos correspondentes aos domínios FP e TM podem ser muito úteis na determinação de características estruturais e dinâmicas quando de suas interações com membranas modelo [144].

O interesse em estudos em nível molecular da interação destes importantes segmentos membranotrópicos com bicamadas lipídicas abrange não somente uma tentativa de elucidação dos

mecanismos da interação, que pode contribuir para um melhor entendimento do processo de fusão em coronavírus, como também a utilização das informações daí obtidas para o desenho racional de drogas inibidoras da fusão de membranas. Com uma abordagem computacional e experimental, procuraremos obter informações dinâmicas, estruturais e funcionais e discutir as implicações das interações peptídeos-membranas no mecanismo de fusão da proteína, alcançando, assim, uma descrição detalhada de tal processo.

1.3. Desenvolvimento do projeto de pesquisa – Objetivos gerais, metodologia e colaborações

Esse projeto de pesquisa está fundamentado em dois objetivos principais, sendo um específico e outro mais geral. Como objetivos específicos (detalhados nas seções anteriores): (1) buscamos o desenvolvimento e caracterização de novos sistemas miméticos de membranas biológicas para estudos biofísicos diversos que tentam contribuir para o entendimento do funcionamento de proteínas de membranas; e (2) visamos a investigação da correlação entre estrutura, dinâmica e função de peptídeos virais de membranas de coronavírus; problemas biofísicos indubitavelmente relevantes.

Como objetivo geral, interessa-nos nuclear um grupo de biofísica molecular dentro do Laboratório de Ciências Físicas (LCFIS), com linhas de pesquisa que permeiam áreas da “Ciência e tecnologia de materiais”, como o desenvolvimento e caracterização de materiais biológicos, e da "Bio-orgânica e bio-inorgânica", como a investigação da estrutura, dinâmica e função de proteínas virais de fusão e na busca de fármacos e metalofármacos capazes de inibir o processo de fusão de membranas mediada por proteínas virais. O “carro-chefe” do potencial grupo, inicialmente, seria a aplicação das técnicas de RME e dinâmica molecular em sistemas de interesse biológico, o que poderia incluir projetos em parceria com docentes que compõem o time de pesquisadores do PGCN e/ou colaborações com outros laboratórios da UENF, como àqueles pertencentes ao Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB). Também atuaremos fortemente para aprovar projetos que permitam a expansão da infraestrutura do LCFIS na forma de compra de equipamentos de interesse geral dos docentes da PGCN/UENF.

A metodologia necessária para a realização dos projetos propostos nas seções anteriores envolve, sumariamente, o estabelecimento de colaborações. A disponibilidade comercial de venda de lipídios e peptídeos, assim como a existência de um protocolo bioquímico para obtenção da proteína de membrana proteorodopsina, estabelecido por mim em meu estágio pós-doutoral na Universidade da Califórnia, foram características levadas em consideração quando da escolha dos projetos. Assim, temos:

Obtenção de materiais: Lipídios e marcadores de spin em diferentes posições da cadeia acil 1-palmitoil-2-(n-doxil stearoil) fosfatidilcolina (n = 5, 7, 10, 12, 14 e 16-PCSL) e na cabeça polar, dipalmitoilfosfatidil tempo (2,2,6,6,-tetrametil-1-oxi) colina (DPPTC), são adquiridos comercialmente da empresa Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) e Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). O

marcador de spin S-(1-oxy-2,2,5,6-tetramethylpyrroline-3-methyl)methanethiosulfonate (MTSSL) é obtido comercialmente da empresa Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada).

Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos: Os peptídeos serão sintetizados pela empresa Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento (Diadema, SP, Brasil), GenScript (Piscataway, NJ, Estados Unidos) ou por nosso colaborador na área de síntese peptídica, o qual será responsável pela marcação de *spin* sítio-dirigida, realizada com os marcadores de *spin* MTSSL ou TOAC.

Medidas de RME: O LCFIS da UENF conta atualmente com um espectrômetro Bruker Elexsys E500 para utilização em modo de onda contínua e que opera em bandas X e Q, com possibilidade de obtenção de dados em temperaturas criogênicas. Sempre que se fizer necessário, medidas de RME no modo pulsado serão realizadas no espectrômetro Bruker Elexsys E580, localizado no Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, através de colaboração com os professores Cláudio José Magon e Otaciro Rangel do Nascimento.

Simulações de Dinâmica Molecular: Estudos iniciais de DM serão realizados em um cluster de computadores localizado no Laboratório de Biofísica Molecular, da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, através de colaboração com o Prof. Antonio José da Costa Filho, com o software NAMD, disponível gratuitamente em <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>.

A utilização de outras técnicas espectroscópicas, calorimétricas, de espalhamento, ou microscopias serão realizadas, sempre que possível, em parcerias com outros laboratórios da UENF. Em praticamente todos os sistemas descritos nas seções anteriores será utilizada uma abordagem inicial em termos de RME e que envolve a caracterização das amostras e a determinação das condições ideais de medida em cada caso. De posse desses resultados e de acordo com o andamento de cada projeto, poderemos planejar experimentos futuros que atendam às necessidades individuais dos sistemas estudados, fornecendo respostas relativas aos problemas em questão.

Colaborações nacionais

Em adição às possíveis colaborações com membros do PGCN e de docentes de outros laboratórios da UENF, **sempre que se fizer necessário**, poderemos contar com a colaboração dos seguintes pesquisadores brasileiros:

- **Prof. Dr. Cláudio José Magon e Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento** – *Universidade de São Paulo*: Ambos os pesquisadores exercem cargos de chefia em seus respectivos laboratórios e disponibilizaram o espectrômetro de RME pulsado e outros equipamentos espectroscópicos e calorimétricos.
- **Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida** – *Universidade Federal do Rio de Janeiro*: O Prof. Almeida é especialista na aplicação de técnicas de RMN nos estados líquido e sólido para estudos estruturais e dinâmicos de proteínas solúveis e de membranas. Ele é responsável pela coordenação do Centro Nacional de RMN Jiri Jonas (CENABIO I), que disponibiliza diversos

espectrômetros de RMN da Bruker para amostras sólidas (400 MHz) e líquidas (600, 800 e 900 MHz). Dependendo da necessidade, poderemos usufruir da infraestrutura do CENABIO I, na forma de colaboração científica com o Prof. Almeida.

- Prof. Dr. Eduardo Festozo Vicente – *Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho*: Especialista em síntese peptídica em fase sólida, a colaboração com o Prof. Vicente será fundamental para a aquisição de peptídeos sintéticos contendo ou não sondas paramagnéticas.
- Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho – *Universidade de São Paulo*: O Prof. Costa-Filho tem liderado a pesquisa nacional em aplicações de RME para entender o funcionamento de sistemas biológicos. O estabelecimento de uma colaboração com o Prof. Costa-Filho dar-se-á, inicialmente, na forma de utilização da infraestrutura computacional de seu grupo para simulações de dinâmica molecular até estabelecermos a infraestrutura adequada

Colaborações internacionais

Com parcerias estabelecidas no passado através de visitas na forma de estágio doutoral ou pós-doutoral, temos portas abertas nos grupos coordenados pelos pesquisadores abaixo, que poderão ser acionados na necessidade de realização de experimentos que exijam os altos campos magnéticos dos espectrômetros de RME em alta frequência e RMN no estado sólido.

- Prof. Dr. Stanley Opella – *Universidade da Califórnia San Diego*: O Prof. Opella possui vasta experiência no desenvolvimento e aplicação de técnicas de RMN nos estados líquido e sólido para caracterização estrutural de peptídeos e proteínas de membranas embebidos em bicamadas lipídicas.
- Prof. Dr. Alex Smirnov – *Universidade do Estado da Carolina do Norte*: o Prof. Smirnov, especialista em RME de alto campo e alta frequência, é um dos líderes mundiais no desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas a estudos estruturais e funcionais de macromoléculas biológicas.

2. PLANO DE ENSINO

As atividades de ensino que serão realizadas por este professor credenciado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PGCN) podem ser divididas em duas partes: (1) ministração de disciplinas específicas já existentes na grade curricular do PGCN como “PCN1722 - Interação da Radiação com a Matéria II”, “FIS1752 - Introdução à Espectroscopia” e “PCN1735 - Ressonância Magnética Eletrônica”; e (2) elaboração de duas disciplinas inéditas em nível de pós-graduação (mestrado e doutorado), de caráter interdisciplinar e compatíveis com a área de atuação do professor:

- Biofísica de membranas biológicas:** Essencial para o desenvolvimento das formas de vida como as conhecemos, as membranas biológicas são fundamentais para a estabilização da

estrutura e da função das células. Nesta disciplina, pretende-se introduzir ao aluno a física de membranas biológicas segundo uma abordagem molecular, proporcionando uma visão básica, porém ampla da biofísica de membranas, incluindo detalhes sobre a estrutura, dinâmica, função e termodinâmica das membranas biológicas. Além disso, será introduzido o conceito de proteínas de membranas e como a interação entre proteínas e lipídios de membranas pode ser estudada. **Ementa reduzida:** 1. Membranas biológicas; 2. Os lipídios das membranas; 3. Detergentes e balsas lipídicas; 4. Modelos de membranas; 5. Estruturas e fases das membranas; 6. Dinâmica dos lipídios nas membranas; 7. O papel do colesterol na estrutura e função das membranas; 8. Proteínas de membranas; 9. Interação proteína-lipídios em membranas; 10. Fusão de membranas. **Bibliografia recomendada:** [1] Yeagle, Philip L. The membranes of cells. 3rd edition. Academic Press 2016. [2] Yeagle, Philip L. The Structure of Biological Membranes. 3rd Edition. Boca Raton: CRC Press, 2012. [3] Nelson, D.L., Cox, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6ª edição São Paulo: Artmed, 2014. [4] Literatura especializada selecionada para cada um dos tópicos.

- (ii) **Técnicas físicas aplicadas ao estudo de biomoléculas:** Esta disciplina visa a discussão sucinta dos fundamentos dos métodos de análise em biofísica molecular e estrutural, com especial ênfase em suas aplicações em pesquisas envolvendo proteínas e membranas biológicas. Serão apresentados os conceitos básicos e diversas aplicações de várias técnicas espectroscópicas, hidrodinâmicas e calorimétricas. Particularmente, as duas primeiras têm sido amplamente usadas no estudo e caracterização física e estrutural de macromoléculas biológicas. Por outro lado, técnicas calorimétricas permitem avaliar uma vasta quantidade de propriedades termodinâmicas envolvidas na estabilização de e na interação entre macromoléculas biológicas. **Ementa reduzida:** 1. Introdução à interação radiação-matéria; 2. Espectroscopia de absorção: Princípios básicos; 3. Espectropolarimetria de dicroísmo circular; 4. Espectroscopia de fluorescência aplicada a proteínas; 5. Espectroscopia de infravermelho; 6. Ressonância magnética eletrônica aplicada a proteínas e lipídios; 7. Macromoléculas como partículas hidrodinâmicas; 8. Eletroforese como técnica hidrodinâmica; 9. Espalhamento dinâmico de luz; 10. Espalhamento de raios X de baixo ângulo: aplicações; 11. Cromatografia de exclusão molecular; 12. Ultracentrifugação analítica; 13. Calorimetria de titulação isotérmica; 14. Calorimetria diferencial de varredura. **Bibliografia recomendada:** [1] Cantor, C. R. and Schimmel, P. R. Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function. San Francisco: W.H.Freeman, 1980. [2] Holde, K.E.; Johnson, W.C. Principles of physical biochemistry. Upper Saddle River, NJ.: Prentice Hall, 1998. [3] Nelson, D.L., Cox, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6ª edição São Paulo: Artmed, 2014. [4] Literatura especializada selecionada para cada uma das técnicas.

As disciplinas serão ministradas utilizando-se métodos tradicionais de ensino como aulas expositivas, utilização de recursos de datashow, apresentação de seminários por especialistas convidados e, quando conveniente, usando-se o método de aprendizagem baseada em problemas, que estabelece uma estratégia pedagógica centrada no aluno.

3. REFERÊNCIAS

- 1 Nicolson GL. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. **Biochim Biophys Acta**. 2014, 1838(6):1451-1466.
- 2 Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J. Mol. Biol.** 305, 567–580
- 3 Gouaux E, Mackinnon R. Principles of selective ion transport in channels and pumps. **Science**. 2005, 310, 1461–1465.
- 4 Busch W, Saier MH Jr. The transporter classification (TC) system, 2002. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 2002, 37, 287–337.
- 5 Hurley JH, Misra S. Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 2000, 29, 49–79.
- 6 Cretel E, Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. How cells feel their environment: a focus on early dynamic events. **Cell. Mol. Bioeng.** 2008, 1, 5–14.
- 7 Delcour AH. Solute uptake through general porins. **Front. Biosci.** 2003, 8, d1055–1071
- 8 van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2008, 9(2):112-124.
- 9 Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**. 2010, 327(5961):46-50
- 10 Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2017, 18(6):361-374.
- 11 Janmey PA, Kinnunen PK. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. **Trends Cell Biol.** 2006, 16(10):538-546.
- 12 Mallikarjunaiah KJ, Kinnun JJ, Petrache HI, Brown MF. Flexible lipid nanomaterials studied by NMR spectroscopy. **Phys Chem Chem Phys.** 2019, 21(34):18422-18457.
- 13 Sonntag Y, Musgaard M, Olesen C, Schjøtt B, Møller JV, Nissen P, Thøgersen L. Mutual adaptation of a membrane protein and its lipid bilayer during conformational changes. **Nat Commun.** 2011, 2:304.
- 14 Arumugam S, Chwastek G, Schwille P. Protein-membrane interactions: the virtue of minimal systems in systems biology. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.** 2011, 3(3):269-80.
- 15 Kleinschmidt, Jörg. (2013). **Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols**. 10.1007/978-1-62703-275-9.
- 16 Fuhrhop, Jürgen-Hinrich. (2002). Book Review: **Drug-Membrane Interactions. Analysis, Drug Distribution, Modelling, Methods and Principles in Medicinal Chemistry**. By Joachim K. Seydel and Michael Wiese. *Angewandte Chemie-international Edition*
- 17 Borbat, P. P., Costa-Filho, A. J., Earle, K. A., Moscicki, J. & Freed, J. H. (2001), 'Electron spin resonance in studies of membranes and proteins', **Science** 291, 266-269.
- 18 Basso LGM, Mendes LFS, Costa-Filho AJ. The two sides of a lipid-protein story. **Biophys Rev.** 2016, 8(2):179-191.
- 19 Hubbell, W. L., Gross A, Langen R, Lietzow MA. Recent advances in site-directed spin labeling of proteins **Current Opinion in Structural Biology**, 8, 5, 649-656, 1998.
- 20 McHaourab HS, Steed PR, Kazmier K. Toward the fourth dimension of membrane protein structure: insight into dynamics from spin-labeling EPR spectroscopy. **Structure**. 2011, 19(11):1549-1561.
- 21 Perozo, E., Cortes DM, Sompornpisut P, Kloda A, Martinac B. Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 942-8, 2002.
- 22 Gandhi, C. S.; Rees, D. C. Biochemistry. Opening the molecular floodgates. **Science**, 321, 5893, 1166, 2008.
- 23 Azarkh M, Singh V, Okle O, Seemann IT, Dietrich DR, Hartig JS, Drescher M. Site-directed spin-labeling of nucleotides and the use of in-cell EPR to determine long-range distances in a biologically relevant environment. **Nat Protoc.** 2013, 8(1):131-147
- 24 Couto, S. G.; Cristina Nonato, M.; Costa-Filho, A. J. **Biochem Biophys Res Commun**, 414, 3, 487-492, 2011.
- 25 Dyszy, F. *et al.* **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60198, 2013.
- 26 Schneider, D. J. & Freed, J. H. (1989) Calculating slow motional magnetic resonance spectra: A user's guide, in L. J. Berliner & J. Reuben, eds, 'Biological Magnetic Resonance', Vol. 8, Plenum Publishing Corp., New York, pp. 1-76.
- 27 Acar, S., Carlson DB, Budamagunta MS, Yarov-Yarovoy V, Correia JJ, Niñonuevo MR, Jia W, Tao L, Leary JA, Voss JC, Evans JE, Scholey JM. The bipolar assembly domain of the mitotic motor kinesin-5. **Nat Commun**, 4, 1343, 2013.
- 28 Bartucci R. (2013) Spin-Labeling EPR of Lipid Membranes. In: Roberts G.C.K. (eds) *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, Berlin, Heidelberg
- 29 Karplus, M. & McCammon, J.A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology** 9, 646-652 (2002).
- 30 Cavalli, A., Ferrara, P. & Caflisch, A. Weak temperature dependence of the free energy surface and folding pathways of structured peptides. **Proteins Struct. Funct. Genet.** 47, 305–314

- 31 Dolenc J, Missimer JH, Steinmetz MO, van Gunsteren WF. Methods of NMR structure refinement: molecular dynamics simulations improve the agreement with measured NMR data of a C-terminal peptide of GCN4-p1. **J Biomol NMR**. 2010 Jul;47(3):221-235.
- 32 A. T. Brunger and P. D. Adams. Molecular Dynamics Applied to X-ray Structure Refinement. **Acc. Chem. Res.**, 2002, 35 (6), pp 404–412
- 33 P. Sompornpisut, B. Roux, and E. Perozo. Structural Refinement of Membrane Proteins by Restrained Molecular Dynamics and Solvent Accessibility Data. **Biophys J**. 95(11): 5349–5361, 2008
- 34 Islam, S. M., Stein, R., Mchaourab, H. and Roux, B. Structural refinement from restrained-ensemble simulations based on EPR/DEER experiments. submitted to the **J. Am. Chem. Soc.** 2012, Manuscript ID: ja2012112466.
- 35 Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1, REVIEWS3003
- 36 De Marcos Lousa, C., van Roermund, C.W., Postis, V.L., Dietrich, D., Kerr, I.D., Wanders, R.J., Baldwin, S.A., Baker, A. and Theodoulou, F.L. (2013) Intrinsic acyl-CoA thioesterase activity of a peroxisomal ATP binding cassette transporter is required for transport and metabolism of fatty acids. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 110, 1279–1284
- 37 Hicke, L. and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 19, 141–172
- 38 Broughton, C.E., Roper, D.L., Van Den Berg, H.A. and Rodger, A. (2015) Bacterial cell division: experimental and theoretical approaches to the divisome. **Sci. Prog.** 98, 313–345
- 39 Rowlett, V.W. and Margolin, W. (2015) The bacterial divisome: ready for its close-up. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 370, 1679
- 40 Lund R, Leth-Larsen R, Jensen ON, Ditzel HJ. Efficient isolation and quantitative proteomic analysis of cancer cell plasma membrane proteins for identification of metastasis-associated cell surface markers. **J. Proteome Res.** 2009, 8, 3078–3090.
- 41 Leth-Larsen R, Lund R, Hansen HV, Laenkholm AV, Tarin D, Jensen ON, Ditzel HJ. Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry. **Mol. Cell. Proteomics.** 2009, 8, 1436–1449.
- 42 Cookson MR. Alpha-Synuclein and neuronal cell death. **Mol. Neurodegener.** 2009, 4, 9.
- 43 Danbolt NC. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.** 2001, 65, 1–105.
- 44 Goedert M, Jakes R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. **Biochim. Biophys. Acta.** 2005, 1739, 240–250.
- 45 Kanai Y, Hediger MA. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. **Eur. J. Pharmacol.** 2003, 479, 237–247.
- 46 Matherly LH, Hou Z, Deng Y. Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. **Cancer Metastasis Rev.** 2007, 26, 111–128.
- 47 Vassart G, Costagliola S. G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases. **Nat. Rev. Endocrinol.** 2011, 7, 362–372.
- 48 Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek- Gliszczynski MJ, Zhang L. Membrane transporters in drug development. **Nat. Rev. Drug Discov.** 2010, 9, 215–236.
- 49 Shukla S, Wu CP, Ambudkar SV. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.** 2008, 4, 205–223.
- 50 Poetsch A, Wolters D. Bacterial membrane proteomics. **Proteomics** 2008, 8, 4100–4122.
- 51 Ramanan P, Shabman RS, Brown CS, Amarasinghe GK, Basler CF, Leung DW. Filoviral immune evasion mechanisms. **Viruses** 2011, 3, 1634–1649.
- 52 Le Maire, M., Philippe, C. and Møller, J.V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochim. Biophys. Acta** 1508, 86–111
- 53 Seddon, A.M., Paul, C. and Booth, P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochim. Biophys. Acta** 1666, 105–117
- 54 Seddon, A.M., Curnow, P. and Booth, P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.** 1666, 105–117
- 55 Moraes, I., Evans, G., Sanchez-Weatherby, J., Newstead, S. and Stewart, P.D.S. (2014) Membrane protein structure determination — the next generation. **Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.** 1838, 78–87
- 56 Birch, J., Axford, D., Foadi, J., Meyer, A., Eckhardt, A., Thielmann, Y. et al. (2018) The fine art of integral membrane protein crystallisation. **Methods** 147, 150–162
- 57 Yang, Z., Wang, C., Zhou, Q., An, J., Hildebrandt, E., Aleksandrov, L.A., Kappes, J.C., DeLucas, L.J., Riordan, J.R., Urbatsch, I.L. et al. (2014) Membrane protein stability can be compromised by detergent interactions with the extramembranous soluble domains. **Protein Sci.** 23, 769–789
- 58 Errey, J.C., Doré, A.S., Zhukov, A., Marshall, F.H. and Cooke, R.M. (2015) Purification of stabilized GPCRs for structural and biophysical analyses. **Methods Mol. Biol.** 1335, 1–15
- 59 Crichton, P.G., Lee, Y., Ruprecht, J.J., Cerson, E., Thangaratnarajah, C., King, M.S. and Kunji, E.R. (2015) Trends in thermostability provide information on the nature of substrate, inhibitor, and lipid interactions with mitochondrial carriers. **J. Biol. Chem.** 290, 8206–8217
- 60 Jamshad, M.; Grimard, V.; Idini, I.; et al. Structural Analysis of a Nanoparticle Containing a Lipid Bilayer Used for Detergent-Free Extraction of Membrane Proteins. **Nano Res.** 2015, 8, 774–789
- 61 T.J. Knowles, R. Finka, et al., M. Overduin. Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. **J. Am. Chem. Soc.** 131 (2009), pp. 7484–7485

- 62 J.M. Dörr, S. Scheidelaar, et al., J.A. Killian. The styrene-maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. **Eur. Biophys. J.** 45 (2016), pp. 3-21
- 63 N.L. Pollock, S.C. Lee, et al., A.J. Rothnie. Structure and function of membrane proteins encapsulated in a polymer-bound lipid bilayer. **Biochim. Biophys. Acta**, 1860 (2018), pp. 809-817
- 64 Orwick-Rydmark, M., Lovett, J.E., Graziadei, A., Lindholm, L., Hicks, M.R. and Watts, A. (2012) Detergent-free incorporation of a seven-transmembrane receptor protein into nanosized bilayer Lipodisq particles for functional and biophysical studies. **Nano Lett.** 12, 4687–4692
- 65 Dorr, J.M., Koorengevel, M.C., Schäfer, M., Prokofyev, A.V., Scheidelaar, S., van der Crujnsen, E.A., Dafforn, T.R., Baldus, M. and Killian, J.A. (2014) Detergent-free isolation, characterization, and functional reconstitution of a tetrameric K⁺ channel: the power of native nanodiscs. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 111, 18607–18612
- 66 Postis, V., Rawson, S., Mitchell, J.K., Lee, S.C., Parslow, R.A., Dafforn, T.R., Baldwin, S.A. and Muench, S.P. (2015) The use of SMALPs as a novel membrane protein scaffold for structure study by negative stain electron microscopy. **Biochim. Biophys. Acta** 1848, 496–501
- 67 Jamshad, M., Lin, Y.P., Knowles, T.J., Parslow, R.A., Harris, C., Wheatley, M., Poyner, D.R., Bill, R.M., Thomas, O.R., Overduin, M. and Dafforn, T.R. (2011) Surfactant-free purification of membrane proteins with intact native membrane environment. **Biochem. Soc. Trans.** 39, 813–818
- 68 Gulati, S., Jamshad, M., Knowles, T.J., Morrison, K.A., Downing, R., Cant, N., Collins, R., Koenderink, J.B., Ford, R.C., Overduin, M. et al. (2014) Detergent-free purification of ABC (ATP-binding-cassette) transporters. **Biochem. J.** 461, 269–278
- 69 Knowles, T.J., Finka, R., Smith, C., Lin, Y.P., Dafforn, T. and Overduin, M. (2009) Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. **J. Am. Chem. Soc.** 131, 7484–7485
- 70 Jamshad, M., Charlton, J., Lin, Y.P., Routledge, S.J., Bawa, Z., Knowles, T.J., Overduin, M., Dekker, N., Dafforn, T.R., Bill, R.M. et al. (2015) G-protein coupled receptor solubilization and purification for biophysical analysis and functional studies, in the total absence of detergent. **Biosci. Rep.** 35 (2), e00188.
- 71 Overduin M, Esmaili M. Native Nanodiscs and the Convergence of Lipidomics, Metabolomics, Interactomics and Proteomics. **Appl. Sci.** 2019, 9(6), 1230.
- 72 Simon KS, Pollock NL, Lee SC. Membrane protein nanoparticles: the shape of things to come. **Biochem Soc Trans.** 2018, 46(6):1495-1504.
- 73 Denisov IG, Sligar SG. Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. **Chem Rev.** 2017, 117(6):4669-4713.
- 74 Qiu, W.; Fu, Z.; Xu, G. G.; et al. Structure and Activity of Lipid Bilayer within a Membrane-Protein Transporter. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2018, 115, 12985–12990.
- 75 Sun, C.; Benlekbir, S.; Venkatakrisnan, P.; et al. Structure of the Alternative Complex III in a Supercomplex with Cytochrome Oxidase. **Nature** 2018, 557, 123–126
- 76 Broecker, J.; Eger, B. T.; Ernst, O. P. Crystallogenesis of Membrane Proteins Mediated by Polymer-Bounded Lipid Nanodiscs. **Structure** 2017, 25, 384–392.
- 77 Rehan, S.; Paavilainen, V. O.; Jaakola, V. P. Functional Reconstitution of Human Equilibrative Nucleoside Transporter-1 into Styrene Maleic Acid Co-Polymer Lipid Particles. **Biochim. Biophys. Acta Biomembr.** 2017, 1859, 1059–1065.
- 78 Prakash, P.; Litwin, D.; Liang, H.; et al. Dynamics of Membrane-Bound G12V-KRAS from Simulations and Single-Molecule FRET in Native Nanodiscs. **Biophys. J.** 2019, 116, 179–183.
- 79 Sahu ID, Zhang R, Dunagan MM, Craig AF, Lorigan GA. Characterization of KCNE1 inside Lipodisq Nanoparticles for EPR Spectroscopic Studies of Membrane Proteins. **J Phys Chem B.** 121(21):5312-5321.
- 80 Bersch, B.; Dörr, J. M.; Hessel, A.; et al. Proton-Detected Solid-State NMR Spectroscopy of a Zinc Diffusion Facilitator Protein in Native Nanodiscs. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2017, 56, 2508–2512.
- 81 Park SH, Berkamp S, Cook GA, Chan MK, Viadiu H, Opella SJ. Nanodiscs versus Macrodiscs for NMR of Membrane Proteins. **Biochemistry.** 2011, 50(42):8983-8985.
- 82 C.R. Sanders, B.J. Hare, K.P. Howard, J.H. Prestegard. Magnetically-oriented phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules. **Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.**, 26 (1994), 421-444
- 83 Radoicic, J.; Park, S. H.; Opella, S. J. Macrodiscs Comprising SMALPs for Oriented Sample Solid-State NMR Spectroscopy of Membrane Proteins. **Biophys. J.** 2018, 115, 22–25.
- 84 Sahu ID, Kroncke BM, Zhang R, Dunagan MM, Smith HJ, Craig A, McCarrick RM, Sanders CR, Lorigan GA. Structural investigation of the transmembrane domain of KCNE1 in proteoliposomes. **Biochemistry.** 2014, 53(40):6392-401.
- 85 Sahu ID, McCarrick RM, Troxel KR, Zhang R, Smith HJ, Dunagan MM, Swartz MS, Rajan PV, Kroncke BM, Sanders CR, Lorigan GA. DEER EPR measurements for membrane protein structures via bifunctional spin labels and lipodisq nanoparticles. **Biochemistry.** 2013, 52(38):6627-6632.
- 86 Inbaraj JJ, Nusair NA, Lorigan GA. Investigating magnetically aligned phospholipid bilayers with EPR spectroscopy at Q-band (35 GHz): optimization and comparison with X-band (9 GHz). **J Magn Reson.** 2004, 171(1):71-79.
- 87 Sahu ID, Zhang R, Dunagan MM, Craig AF, Lorigan GA. Characterization of KCNE1 inside Lipodisq Nanoparticles for EPR Spectroscopic Studies of Membrane Proteins. **J Phys Chem B.** 2017, 121(21):5312-5321.
- 88 Harding BD, Dixit G, Burrige KM, Sahu ID, Dabney-Smith C, Edelmann RE, Konkolewicz D, Lorigan GA. Characterizing the structure of styrene-maleic acid copolymer-lipid nanoparticles (SMALPs) using RAFT polymerization for membrane protein spectroscopic studies. **Chem Phys Lipids.** 2019, 218:65-72.
- 89 Killian J.A., Salemink I., Greathouse D.V. Induction of nonbilayer structures in diacylphosphatidylcholine model membranes by transmembrane α -helical peptides: importance of hydrophobic mismatch and proposed role of tryptophans. **Biochemistry.** 1996, 35:1037–1045.

- 90 Strandberg E, Ozdirekcan S, Rijkers DT, van der Wel PC, Koeppe RE 2nd, Liskamp RM, Killian JA. Tilt Angles of Transmembrane Model Peptides in Oriented and Non-Oriented Lipid Bilayers as Determined by 2H Solid-State NMR. **Biophys J**. 2004, 86(6):3709-3721.
- 91 Rankenber JM, Vostrikov VV, Greathouse DV, Grant CV, Opella SJ, Koeppe RE 2nd. Properties of membrane-incorporated WALP peptides that are anchored on only one end. **Biochemistry**. 2012, 51(50):10066-10074.
- 92 Halbmaier K, Wegner J, Diederichsen U, Bennati M. Pulse EPR Measurements of Intramolecular Distances in a TOPP-Labeled Transmembrane Peptide in Lipids. **Biophys J**. 2016, 111(11):2345-2348.
- 93 Scarpelli F, Drescher M, Rutters-Meijneke T, Holt A, Rijkers DT, Killian JA, Huber M. Aggregation of transmembrane peptides studied by spin-label EPR. **J Phys Chem B**. 2009, 113(36):12257-12264.
- 94 Schreier S., Bozelli J.C., Jr., Nakaie C.R. The spin label amino acid TOAC and its uses in studies of peptides: chemical, physicochemical, spectroscopic, and conformational aspects. **Biophys. Rev**. 2012, 4:45-66
- 95 Fuhrman JA, Schwalbach MS, Stingl U. Proteorhodopsins: an array of physiological roles? **Nat Rev Microbiol**. 2008, 6(6):488-494.
- 96 Reckel S, Gottstein D, Stehle J, Löhr F, Verhoefen MK, Takeda M, Silvers R, Kainosho M, Glaubitz C, Wachtveitl J, Bernhard F, Schwalbe H, Güntert P, Dötsch V. Solution NMR structure of proteorhodopsin. **Angew Chem Int Ed Engl**. 2011, 50(50):11942-11946.
- 97 Feng J, Mertz B. Proteorhodopsin Activation Is Modulated by Dynamic Changes in Internal Hydration. **Biochemistry**. 2015, 54(48):7132-7141.
- 98 Yang J, Aslimovska L, Glaubitz C. Molecular dynamics of proteorhodopsin in lipid bilayers by solid-state NMR. **J Am Chem Soc**. 2011, 133(13):4874-4881.
- 99 S. Hussain, J.M. Franck, S. Han. Transmembrane protein activation refined by site-specific hydration dynamics. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, 52 (2013), 1953-1958
- 100 OuYang B., Dong Y., Chou J.J. (2018) Structural and Functional Properties of Viral Membrane Proteins. In: Cao Y. (eds) **Advances in Membrane Proteins**. Springer, Singapore
- 101 Chernomordik, L.V. & Kozlov, M.M. **Annu. Rev. Biochem.** 72, 175-207 (2003).
- 102 Chernomordik, L.V., Zimmerberg, J. & Kozlov, M.M. **J. Cell Biol.** 175, 201-207 (2006).
- 103 Eckert, D.M., Kim, P.S. **Annu Rev Biochem** 2001, 70, 777-810.
- 104 Brunger AT. **Curr Opin Struct Biol** 2001, 11, 163-173.
- 105 **World Health Organization**, http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html. Agosto de 2019.
- 106 Peiris, J. S. et al. **The New England Journal of Medicine**. v. 2003, p. 2431-2441, 2003.
- 107 Rota, P. A.; Oberste, M. S.; Monroe, S. S. et al. **Science**. v. 300, p. 1394-1399, 2003.
- 108 Coleman, C.M.; Frieman, M.B. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. **J. Virol**. 2014, 88, 5209-5212.
- 109 Kan et al. **J. Virol.**, 2005 79:11892-11900.
- 110 Zaki, A.M.; van Boheemen, S.; Bestebroer, T.M. Osterhaus AD FR. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. **N. Engl. J. Med**. 2012, 367, 1814-1820.
- 111 **World Health Organization**, <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>. Acessado em setembro de 2019.
- 112 Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**, 382, 727-733, 2020.
- 113 Bolles, M.; Donaldson, E.; Baric, R. SARS-CoV and emergent coronaviruses: Viral determinants of interspecies transmission. **Curr. Opin. Virol**. 2011, 1, 624-634.
- 114 Kielian M. Mechanisms of Virus Membrane Fusion Proteins. **Annu Rev Virol**. 2014, 1(1):171-189
- 115 Li, F. Receptor Recognition Mechanisms of Coronaviruses: A Decade of Structural Studies. **J. Virol**. 2015, 89, 1954.
- 116 Li, W. et al. Identification of sialic acid-binding function for the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2017, 114, E8508-E8517.
- 117 Raj, V.S. et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. **Nature** 2013, 495, 251-254.
- 118 Xiao, X. et al. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 312, p. 1159-1164, 2003.
- 119 Howard, M. W. et al. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 581, p. 319-322, 2006.
- 120 Du, L.; Yang, Y.; Zhou, Y.; Lu, L.; Li, F.; Jiang, S. MERS-CoV spike protein: A key target for antivirals. **Expert Opin. Ther. Targets** 2017, 21, 131-143.
- 121 Earp, L.J.; Delos, S.E.; Park, H.E.; White, J.M.; Shirato, K.; Kawase, M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**. 2005, 285, 25-66.
- 122 Apellániz B, Huarte N, Largo E, Nieva JL. The three lives of viral fusion peptides. **Chem Phys Lipids**. 2014, 181:40.
- 123 Bosch, B.J.; Rottier, P.J. Nidovirus entry into cells. In **Nidoviruses**; Perlman, S., Gallagher, T., Snijder, E.J., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2008; pp. 157-178.
- 124 Bosch, B.J.; van der Zee, R.; de Haan, C.A.; Rottier, P.J. **J. Virol**. 2003, 77, 8801-8811.
- 125 Bosch, B.J.; Bartelink, W.; Rottier, P.J.M. Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide. **J. Virol**. 2008, 82, 8887-8890.
- 126 Belouzard, S.; Millet, J.K.; Licitra, B.N.; Whittaker, G.R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses** 2012, 4, 1011-1033.
- 127 Madu, I.G.; Roth, S.L.; Belouzard, S.; Whittaker, G.R. **J. Virol**. 2009, 83, 7411-7421.
- 128 Lai, A.L.; Millet, J.K.; Daniel, S.; Freed, J.H.; Whittaker, G.R. The SARS-CoV Fusion Peptide Forms an Extended Bipartite Fusion Platform that Perturbs Membrane Order in a Calcium-Dependent Manner. **J. Mol. Biol**. 2017, 429, 3875-3892.
- 129 Basso LGM, Zeraik AE, Felizatti AP, Costa-Filho AJ. Membranotropic and biological activities of the membrane fusion peptides from SARS-CoV spike glycoprotein: The importance of the complete internal fusion peptide domain. **Biochim Biophys Acta Biomembr**. 2021, 1863(11):183697. doi: 10.1016/j.bbmem.2021.183697.

-
- 130 Basso, L., Vicente, E., Crusca, E., Cilli, E., Costa-Filho, A. SARS-CoV fusion peptides induce membrane surface ordering and curvature. *Nature Scientific Reports* 6, doi:10.1038/srep37131 (2016)
 - 131 Alsaadi EAJ, Neuman BW, Jones IM. A Fusion Peptide in the Spike Protein of MERS Coronavirus. **Viruses**. 2019, 11(9). pii: E825.
 - 132 D. R. Beniac *et al.* **Nat. Struct.Mol. Biol.**, 13, 751-752, 2006.
 - 133 Yuan et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. **Nat Commun**. 2017, 8:15092.
 - 134 Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV - a target for vaccine and therapeutic development. **Nat Rev Microbiol**. 2009, 7(3):226-36.
 - 135 Sainz, B., Jr.; Rausch, J.M.; Gallaher, W.R.; Garry, R.F.; Wimley, W.C. **Biochemistry** 2005, 44, 947–958.
 - 136 Guillen, *Jet al.* **J. Phys. Chem. B** 2007, 111, 13714–13725.
 - 137 Broer R, Boson B, Spaan W, Cosset FL, Corver J. **J Virol**. 2006, 80, 3, 1302-1310.
 - 138 Arbely E, Granot Z, Kass I, Orly J, Arkin IT. **Biochemistry**. 2006, 45, 38, 11349-11356.
 - 139 Corver J, Broer R, van Kasteren P, Spaan W. **Viro J**. 2009, 6, 230.
 - 140 Lorizate M, Cruz A, Huarte N, Kunert R, Pérez-Gil J, Nieva JL. **J Biol Chem**. 2006, 281, 51, 39598-39606.
 - 141 Purtscher M, *et al.* **AIDS Res Hum Retroviruses**. 1994, 10, 12, 1651-1658.
 - 142 Broer, R., Boson, B., Spaan, W., Cosset, F., Corver, J. Important role for the transmembrane domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein during entry. **Journal of Virology** 80, 1302-1310, 2006.
 - 143 Corver, J., Broer, R., van Kasteren, P. & Spaan, W. Mutagenesis of the transmembrane domain of the SARS coronavirus spike glycoprotein: refinement of the requirements for SARS coronavirus cell entry. **Viro J**. 6, 2009.
 - 144 L.K. Tamm, J. Crane, V. Kiessling, **Curr. Opin. Struct. Biol**. 2003, 13, 453–466.