



03062
13
26j
*Universidad Nacional Autónoma
de México*

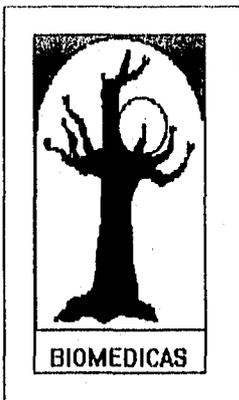
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Análisis Tridimensional de la
Glicoproteína de Envoltura del
Virus del Dengue Mediante
Modelaje Molecular

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A
GUSTAVO JESÚS ORTEGA LULE**



México, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

• Introducción	1
◇ El virus del dengue y la fibrinólisis	4
• Planteamiento	6
• Objetivos	8
• Diseño Experimental	9
• Material y Métodos	10
◇ Bases de Datos	10
◇ Algoritmos	10
◇ Secuencias	11
◇ Análisis Estructural	18
◇ Conformación	19
◇ Modelaje Molecular	20
• Resultados	25
◇ Análisis Filogenético	25
◇ Modelaje Molecular	28
• Discusión	46
• Glosario	48
• Referencias	50

R E S U M E N

El virus del dengue pertenece a la familia Flaviviridae, la cual posee alrededor de 70 miembros. El virus del dengue está compuesto por una nucleocápside formada por la proteína de la cápside y por el ARN viral. Rodeando a la nucleocápside existe una bicapa lipídica en la que se encuentran embebidas dos proteínas de membrana, hacia el interior e interaccionando con la nucleocápside se encuentra la proteína de membrana o M. Orientada al exterior del virus e interaccionando con el medio circundante se encuentra la proteína de envoltura o E. Esta última de 495 aminoácidos de longitud y con un peso molecular de aproximadamente 60 kDa. La proteína de envoltura lleva a cabo la mayor parte de las funciones biológicas en la interacción virus-huésped.

La presente tesis consistió en llevar a cabo un análisis a nivel de estructura primaria y estructura tridimensional de la proteína de envoltura. Por un lado se analizó la filogenia de la familia Flaviviridae, en donde se tomó la secuencia de aminoácidos de la proteína E de las secuencias reportadas en el GenBank hasta 1995. Por otro lado, se llevó a cabo un estudio de modelaje molecular de la proteína de envoltura a partir de las coordenadas cristalográficas del virus de la encefalitis transmitida por garrapata (TBE), de dos aislados de dengue serotipo 2, por un lado estudiamos una cepa aislada de un paciente con dengue clásico en nuestro país durante un brote en 1983 (la que denominamos D2M) y una cepa de un aislado de dengue hemorrágico de un brote ocurrido en Malasia.

Los estudios de filogenia nos mostraron que el aislado mexicano pertenece al subtipo V de los virus del dengue serotipo 2, además de que se encontraron diferencias en cuanto a el orden de las ramas y nodos dentro del serotipo, principalmente en el subtipo III, los resultados obtenidos sugieren que el subtipo III puede ser un grupo en transición evolutiva, ya que, presenta grandes similitudes en secuencia tanto con el subtipo IV y el subtipo V. El modelaje molecular se llevó a cabo a partir de la cristalografía de la fracción soluble de la proteína de la encefalitis transmitida por garrapata (TBE). Se tuvo como principales parámetros, a) la conservación de la estructura secundaria, y b) la conservación de los 6 puentes disulfuros en la proteína. Se encontró que los RMS entre las proteínas de envoltura del virus del dengue y el TBE estuvo dentro de los parámetros de proteínas homólogas. Obtuvimos una serie de 5 grupos de donde se encontraban la mayor parte de las 30 mutaciones entre los dos aislados (clásico/hemorrágico), en ellas se pudo observar por un lado que gran parte de las mutaciones fueron de carácter conservativo, las superficies de solvatación se conservaron en su mayoría tanto en carga como en volumen, solo el grupo 4 presentó diferencias grandes en cuanto a volumen se refiere también presentó un cambio de carga aunque esto no resultó tan evidente como el cambio de posición de la cadena principal como de volumen de las cadenas laterales.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz, en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a mi comité tutorial por sus consejos durante la realización de este trabajo.

- Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz
- Dra. Adela Rodríguez Romero
- Dr. Diego Gonzalez Halphen

Agradezco a mi jurado de tesis por el tiempo que tan generosamente brindaron a la revisión de este trabajo.

- Dr. Carlos F. Arias Ortiz
- Dr. Eduardo Horjales Reboredo
- Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz
- Dra. Luz María López Marín
- Dr. Juan Carlos Almagro.

Agradezco a mi hijo Rodrigo por todas sus sonrisas y por su cariño.

Agradezco a mi esposa María Elena por su apoyo incondicional a mi labor científica.

Agradezco a mi hermano Alejandro y a mi madre Graciela por todo el apoyo que me han proporcionado durante toda mi vida.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio Irma, Verónica, Martha, Georgina, Daphne y Luis, por todo el apoyo y consejos durante todo el tiempo que hemos compartido juntos.

INTRODUCCION

El virus del dengue es miembro de la familia Flaviviridae, la cual comprende más de 60 agentes etiológicos serológicamente relacionados, los cuales presentan estructura, morfogénesis, organización del genoma y estrategia de replicación similares (Westaway, E. G. y col., 1985). Los flavivirus que son transmitidos por mosquito (principalmente por *Aedes aegypti*) han sido clasificados en 6 subgrupos diferentes mediante análisis serológicos (utilizando anticuerpos neutralizantes). Estos son los siguientes (Fig. 1): Dengue, Encefalitis Transmitida por Garrapata (TBE), Tyleniy, Encefalitis Japonesa (JE), Uganda S, Ntaya, Río Bravo y Modoc (Portfield, J. S. 1980; De Madrid, A. T. y Portfield, J. S. 1974). Actualmente, se han identificado 4 diferentes serotipos del virus del dengue (Portfield, J. S. 1980), de los cuales en México circulaban los serotipos 1, 2 y 4 sin embargo, a partir del mes de marzo de 1995 se reportó la presencia de dengue 3 en nuestro país.

Complejos Antigénicos de los Flavivirus Definidos por Ensayos de Neutralización Cruzada con Antiseros Policlinales

Vector		
Garrapata	Mosquito	Sin Vector
Complejo Antigénico		
Encefalitis transmitida por Garrapata (TBE)	Dengue Encefalitis Japonesa Ntaya Uganda S	Río Bravo Modoc
Tyuleniy		

Fig. 1 Complejos antigénicos de los flavivirus.

Las partículas virales miden 60-70 nm de diámetro y están compuestas de una bicapa lipídica externa, en la cual se encuentran embebidas la glicoproteína de envoltura (E) y la proteína de membrana (M) (Monath, T. P. 1990). La nucleocápside es infecciosa y está formada por un ARN de polaridad positiva y por la proteína de la cápside (C). El genoma de los flavivirus consta de aproximadamente 11 000 nucleótidos de longitud, tiene un Cap tipo I en el extremo 5', y carece de poliA en el extremo 3' (Rice, C. M. y col., 1986). El orden de las proteínas codificadas en el ARN es el siguiente 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3'. El ARNm codifica para una sola poliproteína la cual es procesada postraduccionalmente para formar los diferentes polipéptidos virales, en la que participan tanto proteasas celulares como virales (Rice, C. M. y col., 1985; Castle, E. y col., 1986; Coia, G. y col., 1988; Deubel, V. y col., 1988). Actualmente además de que se han secuenciado los genomas completos de algunos aislados del virus del dengue serotipo 2 (Hahn, Y.S. y col., 1988; Deubel, V. y col., 1988; Gruenberg, A. y col., 1988), de dengue-4 (Zhao, B. y col., 1986), y dengue-3 (Osatomi, K. y Suminoshi, H. 1990), también se han clonado y secuenciado un gran número de fragmentos de diferentes serotipos y topotipos. La comparación de estas secuencias ha mostrado en general una conservación de las mismas, tanto en los 4 serotipos del dengue como en los otros miembros del mismo género. Algunos dominios de las proteínas estructurales de dengue, fiebre amarilla y west Nile muestran más del 50 % de amino ácidos idénticos. Además de estas similitudes en secuencia, se encuentran perfectamente conservados los residuos de cisteínas en las proteínas NS1, pr(M) y E, así como dos sitios de glicosilación en la proteína NS1 de todos los flavivirus (Deubel, V. y col., 1988).

La proteína E en los flavivirus es biológicamente muy importante, ya que presenta los epitopes de unión al receptor, fusión a membrana (después de cambios conformacionales inducidos por pH ácido), es el principal antígeno de superficie viral, además de ser la proteína que principalmente interacciona con el medio (huésped) durante el reconocimiento viral (Heinz, F. X. 1990).

En la proteína E del virus de la encefalitis transmitida por garrapata (TBE) se encontraron mediante anticuerpos monoclonales 3 dominios antigénicos no superlapables, los cuales se denominaron A, B y C (Guirakhoo, F. y col., 1989). El dominio A está dividido en dos subdominios A1 y A2. Este último presenta una clara sensibilidad a SDS y a pH's ácidos, lo cual concuerda con su naturaleza discontinua (Heinz, F. X. 1990). En el dominio A1 se encuentra la región más conservada de todos los flavivirus (98-111) localizada en ambos lados del segundo puente disulfuro

(DRGWGNG[H]CGLFGK), en el complejo TBE existe la sustitución de una glicina por histidina. Existen algunas evidencias de que esta secuencia puede estar involucrada en la fusión a membrana por a) cambios conformacionales inducidos por pH ácido, que afectan a los epitopes alrededor de la secuencia conservada, lo que indica un reareglo de la cadena polipeptídica en esta área, lo cual podría ser importante en la exposición del sitio de fusión (Heinz, F. X. 1990), y b) la presencia de la secuencia GLFG después del puente disulfuro con el amino terminal de la hemaglutinina 2 del virus de la influenza, asociada con la fusión a membrana (Wharton, S. A. y col, 1988). Así mismo, se ha reportado que la secuencia inversa FLG se encuentra presente en el amino terminal de la proteína de fusión F1 de los paramixovirus, esta misma secuencia se encuentra repetida tanto en el sitio activo de fusión de la gp41 de los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2, como en el virus de la inmunodeficiencia de monos (Gallager, W. R. 1987). La región 98-111 de la proteína de envoltura del virus del dengue también presenta una secuencia homóloga (con una similitud de 60 %) con la región 759-779 del plasminógeno (cerca del sitio activo), involucrado en la inducción de anticuerpos de reacción cruzada los cuales podrían jugar un papel importante en la patogénesis del dengue hemorrágico (Markoff, L. 1991).

En la enfermedad del dengue se presentan los siguientes síntomas: fiebre, artralgias, mialgias, rash, náusea y/o vómito. El espectro clínico puede ir desde un cuadro febril conocido como **Dengue Clásico** en una infección primaria (en donde los datos de laboratorio prácticamente son normales), hasta las manifestaciones graves como **fiebre hemorrágica por dengue (FHD)** o **síndrome de choque por dengue (SCD)**. En una infección secundaria generalmente se presenta plaquetopenia por plaquetolisis, y disminución de proteínas plasmáticas circulantes tales como C3 y fibrinógeno. Estudios realizados en pacientes con FHD muestran una disminución del plasminógeno e incremento en los productos de degradación del fibrinógeno (PDF) los cuales se elevan conforme se agrava la enfermedad.

Actualmente se desconocen los mecanismos involucrados en la presentación del dengue hemorrágico, sin embargo, se han propuesto 2 hipótesis: la primera postulada por Halstead (Halstead, S. B. 1988), el cual propone que la presencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes es un factor de predisposición de FHD, ya que estos facilitan la infección del fagocito mononuclear ocasionando una activación del macrófago, el cual a su vez activa diferentes sistemas como la coagulación, la fibrinólisis y el complemento presentándose una coagulopatía de consumo.

Aunque la hipótesis anterior es la más aceptada con base en datos epidemiológicos, no explica los casos de dengue hemorrágico en el curso de una primoinfección. Para estos casos León Rosen (Rosen, L. 1977), propuso que la variación genética de las cepas mientras circulan en la naturaleza, es un factor importante en la expresión de la virulencia. Actualmente no existen reportes que demuestren que el virus *per se* tenga participación directa en el establecimiento del proceso hemorrágico, por lo que en nuestro grupo (Monroy, V., Ruiz, B. 1996) se evaluó esta posibilidad, observando que el virus del dengue es capaz de degradar fibrina y/o fibrinógeno.

El Virus del Dengue y la Fibrinólisis

El proceso fibrinolítico comprende la degradación de la fibrina por una proteasa serínica plasmática denominada plasmina la cual es generada en el plasma como un precursor, esta enzima corta específicamente el segmento del estre cruzamiento de 3 cadenas de la fibrina y separa las protuberancias de las cadenas unidas covalentemente. La estructura reticular abierta del coágulo sanguíneo permite un acceso relativamente libre de la plasmina a las moléculas de fibrina polimerizadas, facilitando así la lisis del coágulo (Francis, C. W. & Marder, V. J. 1986). La plasmina se forma mediante el corte proteolítico de un zimógeno de 86 kD, denominado plasminógeno. Existen varias proteasas serínicas que activan el plasminógeno, siendo la más notable la enzima de 54 kD urocinasa (u-PA), la cual es sintetizada por el riñón y aparece, como su nombre implica, en la orina, así como una enzima homóloga llamada activador tisular del plasminógeno (t-PA), que pesa 70 kD, y aparece en los tejidos vasculares (Los activadores del plasminógeno están recibiendo una considerable atención médica, con el propósito de lograr disolver rápidamente los coágulos sanguíneos). Otra molécula capaz de activar al plasminógeno es la estreptocinasa, una proteína de 45 kD producida por algunos estreptococos. A pesar de su nombre, la estreptocinasa no muestra actividad enzimática como la urocinasa (Voet, D. & Voet, J. G. 1992), actúa formando un fuerte complejo 1:1 con el plasminógeno, que activa la cascada de la fibrinólisis de la siguiente manera:

a) Se une de forma específica al extremo carboxilo del plasminógeno, al que le confiere un cambio conformacional.

b) Dicho cambio expone regiones sensibles a lisis por otro plasminógeno (no plasmina), activando de esta manera al plasminógeno y en consecuencia a la fibrinólisis, sin necesidad de un activador como es el caso de la urocinasa (u-PA) o el activador tisular del plasminógeno (t-PA), al substituir esta molécula a los activadores antes mencionados se presenta una degradación de

fibrina exacerbada (un efecto similar podría ser ocasionado por el virus del dengue), produciendo de esta forma problemas hemorrágicos.

En un estudio reciente llevado a cabo por el grupo de Markoff (*Markoff, L., y col., 1991*) se mostró que en el proceso hemorrágico posterior a una infección por el virus del dengue existen anticuerpos dirigidos contra la proteína de envoltura viral que presentan reacción cruzada con el plasminógeno. Dichos estudios mostraron que el sitio de reacción cruzada es una región de 20 aminoácidos similares entre la molécula de plasminógeno (759-779) (el cual corresponde al sitio de unión de la SK en el plasminógeno residuos 562-791) y la región mas conservada en todos los flavivirus (98-111) la cual corresponde un dominio tipo-kringle de la proteína de envoltura viral.

En forma natural existen en el plasma proteínas que neutralizan la actividad producida por la plasmina denominadas antiplasminas, entre las que se encuentran: los inhibidores de la activación del plasminógeno (PAI-1 y PAI-2) y la α -2-antiplasmina (α -2AP); los primeros actúan inhibiendo la activación del zimógeno de la plasmina, mediante la unión de PAI-1 y PAI-2, al dominio kringle de las moléculas activadoras del plasminógeno (se ha reportado que monocitos infectados con el virus del dengue, producen PAI-1 y PAI-2 tanto *in vitro* como *in vivo*). La segunda (α -2AP) (pertenece a la familia de las serpinas y es el inhibidor primario de la plasmina), inhibe específicamente a la molécula activa del plasminógeno (plasmina), mediante un mecanismo que comprende 2 uniones: la primera interacción es de tipo iónico, en la cual se une la molécula de α -2AP al kringle 1 de la plasmina (reacción reversible) y en la segunda, se lleva a cabo la unión covalente de la α -2AP a la serina 740 (residuo catalítico) en la cadena beta de la plasmina (dominio catalítico), esta última es una reacción irreversible. Los dos tipos de inhibidores (PAI-1,2 y α -2AP) son los encargados de regular el mecanismo fibrinolítico.

Por otro lado, se ha reportado que anticuerpos monoclonales anti-dengue y anti-urocinasa, son capaces de bloquear la unión de la α -2AP a la plasmina. Los anticuerpos anti-dengue, como se mencionó anteriormente fueron reportados por Markoff (*Markoff, L., y col., 1991*) y cruzan con el zimógeno específicamente en los aa 759-779 (*Chungue, E y col., 1994*), esta región se encuentra en la parte catalítica de la plasmina y/o plasminógeno, 19 aa cerca de la serina 740. Nosotros previamente demostramos que el virus del dengue modifica la actividad de la α -2AP (*Monroy, V., Ruiz, B.H. 1996*), mediante la competencia del inhibidor con la partícula viral; sin embargo, no sabemos si esta se pueda llevar a cabo en la misma región o en sitios muy cercanos a la serina 740, que le permitiesen bloquear la unión de la α -2AP y de esta manera modificar su

actividad (al bloquear la inhibición, se exagera la fibrinólisis). Así mismo, desconocemos si el virus pudiese bloquear la unión de la α -2AP en presencia de fibrinógeno, ya que se ha reportado que la fibrina protege a la plasmina de la inhibición. Aunque logramos demostrar que existen diferencias en los mecanismos de regulación de la fibrinólisis que dependen del aislado viral (hemorrágico *vs* clásico) con un modelo *in vitro* (Monroy, V. y Ruiz, B. 1996), desconocemos las bases estructurales de este fenómeno.

Con base en lo anterior, nos propusimos analizar la estructura tridimensional de la glicoproteína de envoltura del virus del dengue de 2 diferentes aislados, uno procedente de un caso hemorrágico y otro aislado de un caso de dengue clásico.

PLANTEAMIENTO

A la fecha la fisiopatogenia del dengue hemorrágico aún se desconoce, y las hipótesis que intentan explicar el establecimiento de los casos desafortunados del padecimiento (Fiebre hemorrágica/Síndrome de choque por dengue) están basadas en datos epidemiológicos y favorecen la idea de la participación de los anticuerpos heterotípicos no neutralizantes en el curso de una infección secundaria, (*status* inmunológico del huésped). Sin embargo, se han reportado casos de dengue hemorrágico en el curso de una infección primaria (Rosen, L. 1977) (en la cual no existen anticuerpos previos). Nosotros proponemos que el virus del dengue puede tener participación directa en la instalación del fenómeno hemorrágico, mediante la activación del plasminógeno como una condición previa al desarrollo del proceso fibrinolítico. Con base en este planteamiento llevamos a cabo la evaluación de la actividad biológica de diferentes aislados virales, procedentes de casos hemorrágicos y clásicos en un modelo *in vitro* de fibrinólisis (Monroy, V. y Ruiz, B. 1996). Así mismo se analizó la activación del plasminógeno en presencia de α 2 antiplasmina (cuya función es regular el proceso de fibrinólisis mediante la inhibición de la plasmina).

Observamos que ambos aislados virales fueron capaces de activar al zimógeno independientemente de la presencia de fibrina y/o fibrinógeno. La plasmina generada fue capaz de degradar específicamente a la molécula de fibrina/fibrinógeno. Así mismo, demostramos que existen diferencias en los mecanismos de regulación de la fibrinólisis que dependen del aislado viral, ya que el aislado hemorrágico bloqueo a la α -2 antiplasmina,

favoreciendo la exacerbación de la activación del plasminógeno (*Monroy, V., Ruiz, B.H. 1996*). Sin embargo, desconocemos las bases estructurales de este fenómeno.

Con base en lo anterior, nos propusimos analizar estructuralmente (mediante modelaje molecular, a partir de un cristal de una proteína homóloga) tanto la glicoproteína de envoltura (E) del virus del dengue procedente de un caso fatal de dengue hemorrágico como la proteína E de un caso de dengue clásico y establecer las posibles diferencias a nivel conformacional.

OBJETIVOS

GENERAL

- ◇ Establecer las Diferencias a Nivel de Estructura Tridimensional entre la proteína de envoltura de un Aislado de Dengue Clásico y un aislado de Dengue Hemorrágico.

PARTICULARES

- ◆ Proponer un modelo tridimensional de la fracción soluble de la proteína de envoltura del virus del dengue 2 aislado Mexicano (clásico), mediante modelaje molecular.
- ◆ Proponer un modelo tridimensional de la fracción soluble de la proteína de envoltura del virus del dengue 2 aislado Malasia M1 (aislado hemorrágico), mediante modelaje molecular.

DISEÑO EXPERIMENTAL

ESTRUCTURA PRIMARIA

**Obtención de Secuencias de los
Flavivirus, Mediante el Rastreo de
Bases de Datos**



**Construcción de Alineamientos
Múltiples a Máxima Parsimonia**



**Construcción de Árboles
Filogenéticos a Parsimonia
Variable (Consenso)**

ESTRUCTURA TERCIARIA

**Rastreo del PDB, para Obtener
Coordenadas de Proteínas
Homólogas a la Proteína E**



**Construcción de Confórmers
mediante Modelaje Molecular**

MATERIAL Y METODOS

• BASES DE DATOS

En los análisis tanto de estructura primaria como terciaria se utilizaron las siguientes bases de datos: EMBL (*Kahn, P y Cameron, G., 1990*) (versión 43.0) la cual está especializada en las secuencias nucleotídicas de diferentes sistemas; está dividida en mamíferos, organismos relacionados con mamíferos, fagos, procariontes, y secuencias sintéticas. Utilizamos las divisiones de mamíferos y organismos relacionados con mamíferos, ya que en éstas se encontraban las secuencias de los flavivirus. Por otro lado, se emplearon las secuencias del SwissProt (*Bairoch, A. y Apweiler, R. 1996*) (versión 31.0) que no estaban reportadas en el EMBL, las coordenadas del Protein Data Bank (*Bernstein, F. C. y col., 1977*) (PDB [Versión Abril 1995]), del PIR (*George, D. G. y col., 1996*) versión 45.0 especialmente enfocada a secuencias proteínicas. Además se utilizaron bases de datos cuya principal característica es la actualización continua como el SPUPDATE que presenta una renovación semanal del SwissProt, el GPUPDATE que actualiza su contenido diariamente con las secuencias depositadas en el GenBank (*Burks, C. y col., 1990*), y que traduce a aminoácidos los marcos abiertos de lectura para facilitar el acceso a los programas de escrutinio, de la misma manera que lo hace el EMBLU. Finalmente, en la actualización de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos utilizamos el *Network Entrez* vía Internet, que posee además de las bases de datos antes mencionadas la facilidad de obtención de mayor información de las secuencias. Las bases de datos mencionadas inicialmente (EMBL y SwissProt) fueron utilizadas mediante el programa *Network BLAST* (*Altschul, W. 1990*).

• ALGORITMOS

Los programas de cómputo que se corrieron en una PC IBM compatible fueron; el PC/GENE (*Moore, J. y col., 1988*) y Predict7 (*Carmenes, R. S. 1989*). Del paquete PC/GENE usamos los siguientes algoritmos; FSTNSCAN, FSTPSCAN (*Lipman, D. J. y Pearson, W. R. 1985*), SEQUIN, TRANSL, PROSITE (*Bairoch, A. 1993*), PALIGN (*Myers, E. W. y Miller, W. 1988*), CLUSTAL (*Higgins, D. G. y Sharp, P. M. 1989*) y PICASSO. Del paquete de Predict7 se emplearon todas las variantes para predicción de perfiles fisicoquímicos.

En ambiente Unix (SGI) empleamos los programas; InsightII y sus módulos especializados; Homology, Discover y Analysis (modelaje molecular y dinámica molecular), Rasmol 2.6b (visualización de moléculas), VMD (visualización de moléculas, además de la realización de cálculos de superficies de solvatación), Treealign (construcción de árboles filogenéticos y alineamientos múltiples), Phylip 3.5 (construcción de árboles filogenéticos de parsimonia ponderada), Clustalw (alineamientos múltiples) (Higgins, D. G. y Sharp, P. M. 1989), Network Entrez (NCBI News, 1994), Network BLAST (programa de escrutinio de bases de datos a través de red) (Stephen F. A. y col., 1990) PROCHECK (programa que verifica la calidad estereoquímica de la estructura de proteínas) (Laskowski, R. A. y col., 1993) y las utilerías propias del protocolo TCP/IP.

- SECUENCIAS (Ver tabla 1)

En la Tabla 1 se resume tanto el nombre de los diferentes aislados del virus del dengue como de otros flavivirus, así como el nombre utilizado en las diferentes bases de datos.

No	Virus	Aislado	Nombre	Referencia	Referencias Cruzadas
1	D1	Singapore (S275/90)	A47311	<i>Despres, P., y col., 1993</i>	GI: 476941
	D1		POLG_DEN1S	<i>Fu, J., y col., 1992</i>	GI: 464427 SP: P33478 PIR: A42551 GB: M87512
2	D1	AHF 82-80	DENTAH	<i>Chu, M. C. y col., 1989</i>	GI: 221253
	D1		POLG_DEN1A	<i>Chu, M. C. y col., 1989</i>	GI: 130422 PIR: B32401 SP: P27912 DDBJ: D00502
3	D1	CV1636/77	POLG_DEN1C	<i>Chu, M. C. y col., 1989</i>	PIR: A32401 DDBJ: D00501
4	D1		DENC49	<i>Chu, M. C. y col., 1989</i>	GI: 221241
5	D1	836-1	DENP83	<i>Chu, M. C. y col., 1989</i>	GI: 221251
	D1		POLG_DEN18	<i>Chu, M. C. y col., 1989</i>	GI: 130420 DDBJ: D00503 PIR: C32401 SP: P27910
6	D1	WESTERN PACIFIC	POLG_DEN1W	<i>Mason, P. IV, y col., 1987</i>	GI: 130424 GB: M23027 SP: P17763 PIR: GNWVWP
7	D1	924-1	POLG_DEN19	<i>Chu, M. C. y col., 1989</i>	GI: 130421 SP: P27909 DDBJ: D00504
8	D2 (I)	NUOVA GUINEA	DEN2NGC	<i>Gruenberg, A., y col., 1988</i>	EB: TOGDEN2N

12	D2 (I)	C NOEVA GUINEA C	DEN2CGA	<i>Itic, K., y col., 1989</i>	GI: 323448 PIR: JS0219 GI: 323448
13	D2 (I)	Sri Lanka 1969 SL1050	DENENVH	<i>Blok, J., y col., 1989</i>	PIR: H43496 GI: 323569
14	D2 (I)	Sri Lanka 1968 SL77/69	DENENVG	<i>Blok, J., y col., 1989</i>	PIR: G43496 GI: 323489
15	D2 (II)	Filipinas 1983 2088	DENENVGLPF	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVGL5 GI: 323501
16	D2 (II)	Taiwan 1987 1897	DENENVGLPM	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	GI: 323515
17	D2 (IIIa)	Tailandia 1980 PUO-218	POLG_DEN2U	<i>Gruenberg, A., y col., 1988</i>	PIR: PS0043 GP: DEN2PUO
18	D2 (IIIa)	Tailandia 1964 16681	DENENVVD	<i>Blok, J., y col., 1989</i>	SP: POLG_DEN26 PIR: GNWV16 GP: DENCMEMSB
19	D2 (IIIa)	16681-PDK53	POLG_DEN27	<i>Blok, J., y col., 1992</i>	PIR: GNWV26 GP: DENCMEMSA
20	D2 (IIIa)	Tailandia 1980 D80-100	DENENVB	<i>Blok, J., y col., 1989</i>	PIR: D43496
21	D2 (IIIa)	Tailandia 1980 D80-038	DENENVE	<i>Blok, J., y col., 1989</i>	PIR: B43496
22	D2 (IIIa)	Tailandia 1980 PUO-280	DENENVC	<i>Blok, J., y col., 1989</i>	PIR: C43496
23	D2 (IIIa)	Malasia M1	POLG_DEN21	<i>Samuel, S., y col., 1989</i>	PIR: S06747 GP: TOGDENM1
24	D2 (IIIa)	Malasia M3	POLG_DEN23	<i>Samuel, S., y col., 1989</i>	PIR: S06740 GP: TOGDENM3
25	D2 (IIb)	Malasia M2 M56309	POLG_DEN22	<i>Samuel, S., y col., 1989</i>	PIR: S06741 GP: TOGDENM2 EB: X15433 SP: P14338
26	D2 (IIIb)	Tailandia 1980 D80-141	DENENVA	<i>Blok, J., y col., 1989</i>	PIR: E43496 GI: 323475
27	D2 (IIb)	Brasil 1990 40247	DENENVGLPB	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVGL1 GI: 323493
28	D2 (IIIb)	Jamaica	DENJAMA	<i>Deubel, R. M., y col., 1986</i>	SP: POLG_DEN2J PIR: GNWVJA GP: DENJAMCG GI: 323651
29	D2	TH-36	POLG_DEN2H	<i>Shiu, S. T. W., y col., 1992</i>	GP: DENEP2 DDBJ: D10514 PIR: JQ1404 GI: 266816 SP: P29984
30	D2 (IV)	Sri Lanka 1985 SL975 1592	DENENVGLPA	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	GI: 323491 EB: DENENVGLP
31	D2 (IV)	Burkina Faso 1983 BURKYFS 0190	DENENVGLPC	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVGL2 GI: 323495
32	D2 (IV)	Indonesia 1976 1051	DENENVGLPE	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVGL4 GI: 323499
33	D2 (IV)	Seychelles 1977 SEY-42 S4452	DENENVGLPH	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVGL7 GI: 323505 GB: L10047

334	D2 (IV)	Seychelles 1977 SEY-52 S4452	DENENVGLPI	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVGL8 GI: 323507 GB: L10048
335	D2 (IV)	Sri Lanka 1985 SL629 1583	DENENVGLPK	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVG10 GI: 323511
336	D2 (IV)	Somalia 1984 10	DENENVGLPL	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVG11 GI: 323513
337	D2 (IV)	Sri Lanka 1990 SL206 271235	DENENVGLPJ	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	GI: 323509 GB: L10049
338	D2 (IV)	Sri Lanka 1989 SL235 271235	DENENVGLPO	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVG15 GI: 323519
339	D2 (IV)	Sri Lanka 1990 SL714 206714	DENENVGLPP	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: DENENVG14 GI: 323521
40	D2 (IV)	Sri Lanka 1982 SL767	DENENVF	<i>Blok, J., y col., 1989</i>	GB: M24449 PIR: F43496 GI: 323486
401	D2 (V)	Tonga 1974	FLD2ENVG	<i>Chen, W. B., & Magnico, T., 1990</i>	GB: X54319 SP: POLG_DEN2T PIR: S11482 GI: 59303
402	D2 (V)	India P9-122	DENENVGLPD	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	GB: L10043 EB: DENENVGL3 GI: 323496
403	D2 (V)	Puerto Rico 1969 PR159	DENENVGLPG	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	EB: TOGDENRC GI: 323502 GB: L10046
404	D2 (V)	Trinidad 1953 TR 1751	DENENVGLPN	<i>Lewis, J. A., y col., 1993</i>	GB: L10053 GI: 323516
405	D2 (V)	Puerto Rico PR159/S1	POLG_DEN2P	<i>Hahn, Y. S., y col., 1988</i>	SP: P12823 GB: M19197 PIR: GNWVDP GI: 323655
406	D2	China D2-04	POLG_DEN2D	<i>Yang, P. Y., y col., 1994</i>	PIR: GNWVD2 EB: DEN2ENVG SP: P30026 GI: 266815
407	D2	Mexico 1983 200787	DENPPSP	<i>Ruiz, R. H., y col., 1992</i>	GI: 323652 GB: L04561
408	D3	Puerto Rico 1963 PR6	DENENVGLYL	<i>Lancelotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11433 GI: 323544
409	D3	Filipinas 1983 168 AP-2	DENENVGLYK	<i>Lancelotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11432 GI: 323542
500	D3	Fiji 1992 29472	DENENVGLYA	<i>Lancelotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11422 GI: 323522
501	D3	India 1984 1416	DENENVGLYC	<i>Lancelotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11424 GI: 323526
502	D3	Indonesia 1978 1280	DENENVGLYE	<i>Lancelotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11426 GI: 323530
503	D3	Indonesia 1973 228761	DENENVGLYD	<i>Lancelotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11425 GI: 323528
504	D3		DENENVGLYF	<i>Lancelotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11427 GI: 323532
505	D3	Indonesia 1985 85-159	DENENVGLYG	<i>Lancelotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11428 GI: 323534

596	D3	Malasia 1974 1300	DENENVGLYH	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11429 GI: 323536
597	D3	Mozambique 1985 1559	DENENVGLYI	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11430 GI: 323538
598	D3	Sri Lanka 1981 1326	DENENVGLYJ	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11431 GI: 323540
599	D3	Puerto Rico 1977 1340	DENENVGLYM	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11434 GI: 323546
600	D3	Samoa 1986 1696	DENENVGLYN	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11435 GI: 323548
601	D3	Sri Lanka 1985 1594	DENENVGLYO	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11436 GI: 323550
602	D3	Sri Lanka 1989 260698	DENENVGLYP	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11437 GI: 323552
603	D3	Sri Lanka 1991 2783	DENENVGLYQ	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11438 GI: 323554
604	D3	Tahiti 1989 2167	DENENVGLYV	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11619 GI: 323564
605	D3	Filipinas 1956 H87	DENENVGLYB	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11423 GI: 323524
606	D3	Tahiti 1965 1327	DENENVGLYR	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11439 GI: 323556
607	D3	Tailandia 1962 5987	DENENVGLYS	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11440 GI: 323558
608	D3	Tailandia 1986 D86-007	DENENVGLYT	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11441 GI: 323560
609	D3	Tailandia 1987 MK-315	DENENVGLYU	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11442 GI: 323562
610	D3	Tailandia 1973 CH53489D73-1	DENENVGLYW	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: L11620 GI: 323566
611	D3	H87	POLG_DEN3	<i>Osatomi, K. & Sumiyoshi, II 1990</i>	SP: P27915 GB: M93130 PIR: GNWVD3 GI: 323468 EB: DENCME
612	D3		DENSP5AA	<i>Osatomi, K., y col., 1988</i>	GB: M25277 GI: 323656
613	D3	CH53489 24/28	DENENVVAA	<i>Clemens, D. E., y col., 1992</i>	GI: 323476 GB: M86733
614	D4		POLG_DEN4	<i>Zhao, B., y col., 1986</i>	SP: P09866 GB: M14931 PIR: GNWVDF GI: 323658 EB: DENSTRA
615	D4	H241-P	S66064	<i>Kawano, H., y col., 1993</i>	GI: 432576 PIR: A47666
616	D4	Brasil 1982 1385	DVU18425	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GI: 604441 GB: U18425
617	D4	El Salvador 1994 BC6494	DVU18427	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GI: 604445 GB: U18427
618	D4	Indonesia 1973 30153	DVU18428	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GI: 604446 GB: U18428
619	D4	Indonesia 1976 1036	DVU18429	<i>Lancloth, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18429 GI: 604448

110	D4	México 1984 1492	DVU18431	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18431 GI: 604452
111	D4	Filipinas 1956 H-241	DVU18433	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18433 GI: 604456
112	D4	Filipinas 1964 16589-64	DVU18434	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18434 GI: 604458
113	D4	Filipinas 1984 12123	DVU18435	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18435 GI: 604460
114	D4	Puerto Rico 1986 1650	DVU18436	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18436 GI: 604462
115	D4	Sri Lanka 1978 S-44750	DVU18437	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18437 GI: 604464
116	D4	Tahiti 1979 S-44754	DVU18438	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18438 GI: 604466
117	D4	Tahiti 1985 114-094-85	DVU18439	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18439 GI: 604468
118	D4	Tailandia 1978 D78-01	DVU18441	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18441 GI: 604472
119	D4	Tailandia 1984 D84-024	DVU18442	<i>Lanciotti, R. S., y col., 1994</i>	GB: U18442 GI: 604474
120	JE	SA14-5-3	JEU04521	<i>Ni, H., y col., 1994</i>	GB: U04521 GI: 440195
121	JE	SA14	JEU4522	<i>Ni, H., y col., 1994</i>	GB: U04522 GI: 440197
122	JE	SA-14-2-8	JEU15763	<i>Ni, H., y col., 1995</i>	GB: U15763 GI: 687314
123	JE	pFRL5 KPP034-35CT	JEU03693	<i>Ni, H., & Barrett, A. D. 1995</i>	GB: U03693 GI: 517403
124	JE	pFRL6 P3	JEU03695	<i>Ni, H., & Barrett, A. D. 1995</i>	GB: U03695 GI: 517407
125	JE	pFRL8 826309	JEU03689	<i>Ni, H., & Barrett, A. D. 1995</i>	GB: U03689 GI: 517395
126	JE	pFRL4 DH20	JEU03690	<i>Ni, H., & Barrett, A. D. 1995</i>	GB: U03690 GI: 517397
127	JE	pFRL7 8256	JEU03691	<i>Ni, H., & Barrett, A. D. 1995</i>	GB: U03691 GI: 517399
128	JE	pFRL10 Indonesia	JEU03692	<i>Ni, H., & Barrett, A. D. 1995</i>	GB: U03692 GI: 517401
129	JE	pFRL9 Saigon	JEU03696	<i>Ni, H., & Barrett, A. D. 1995</i>	GB: U03696 GI: 517409
130	JE	Nakayama-o HeLa p6	JEU21057	<i>Cao, J. X., y col., 1995</i>	GI: 694117 GB: U21067
131	JE	826309 HeLa p6	JEU21054	<i>Cao, J. X., y col., 1995</i>	GB: U21054 GI: 694111
132	JE	SA(A)	JEVSAA	<i>Alhara, S., y col., 1990</i>	GB: D90195 GI: 221958
133	JE	SA-14	JEVCMNAA	<i>Nilayaphan, S., y col., 1990</i>	GB: M55506 GI: 331331
134	JE	pFRL3 SA14-2-8	JEU02367	<i>Ni, H., y col., 1994</i>	SP: POLG_JAEV1 PIR: GNWVJS GB: U02367 GI: 476083
135	JE	SA(V)	POLG_JAEV5	<i>Alhara, S., y col., 1991</i>	GB: 130491

106	JE	Bankura 1973 733913	JEVEG2	<i>Paranjpe, S. G.</i>	GB: Z34095 GI: 496908
107	JE	Kamiyama 1	A44055	<i>Hasegawa, H., y col., 1992</i>	GB: 419433
108	JE	JaOArS982	JEV5END	<i>Sumiyoshi, H., y col., 1986</i>	GB: M15337 GI: 331327
109	JE		JEVEG4	<i>Paranjpe, S. G.</i>	GI: 496913
110	JE		JEVCPRMEN	<i>konishi, E., y col., 1991</i>	GB: M73710 GI: 331334
111	JE	JAQARS982	POLG_JAEVJ	<i>Sumiyoshi, H., y col., 1987</i>	SP: P08769 PIR: GNWVJE GB: M18370
112	JE	Nakayama	POLG_JAEVN	<i>Mcada, P. C., y col., 1987</i>	GB: M16574 GI: 130493
113	JE	SA14	JEU14163	<i>Yl, H., y col., 1994</i>	GB: U14163 GI: 537634
114	JE	Goa 1982 82639	JEVEG1	<i>Paranjpe, S. G., 1994</i>	GB: Z340094 GI: 496906
115	JE	Nakayama-RFVL	S75726	<i>Hasegawa, H., y col., 1994</i>	GI: 913060
116	WN		POLG_WNV	<i>Castle, E., y col., 1985</i>	GB: M10103 PIR: GNWVWV SP: P06935
117	SLE	MS1-7	POLG_STEVM	<i>Trent, D. W., y col., 1987</i>	GB: 130516 SP: P09732
118	MVE	Australia 2/1/22	MVEPCG	<i>Dalgarro, L., y col., 1986</i>	GB: M24220 GI: 332283
119	MVE		POLG_MVEV	<i>Dalgarro, L., y col., 1986</i>	SP: P05769 GI: 130496 PIR: GNWVMV EB: X03467
120	KUNJIN	MRM61C	POLG_KUNJM	<i>Cola, G., y col., 1988</i>	GB: 130494 PIR: GNWVKV DDBJ: D00246
121	YF	17D	POLG_YEFV1	<i>Rice, C. M., y col., 1983</i>	SP: P03314 PIR: GNWVY EB: X03700 GI: 130529
122	YF	17D-204	POLG_YEFV2	<i>Dripco, A., y col., 1989</i>	SP: P19901 PIR: GNWVYP EB: X15062 GI: 130530
123	YF	1899/81	POLG_YEFV8	<i>Bullinger, M. E., y col., 1990</i>	SP: P29165 PIR: GNWVY8 DDBJ: D00739
124	YF	17D-213	YFU17067	<i>dos Santos, C. N., y col., 1993</i>	GB: U17067 GI: 829369
125	YF	French neurotropic virus	YFU21055	<i>Wang, E., y col., 1993</i>	GB: U21055 GI: 694113
126	YF	French viscerotropic virus	YFU21056	<i>Wang, E., y col., 1993</i>	GB: U21056 GI: 694115
127	YF	17DD	YFU1766	<i>dos Santos, C. N., y col., 1993</i>	GB: U17066 GI: 829366
128	POWASSAN	LB	POLG_POWVL	<i>Mändl, C. W., y col., 1993</i>	SP: Q04538 GI: 730353
129	KYASANUR		KFDCMEDNA	<i>Vanugopal, K., y col., 1994</i>	GB: 483500

1:30	LANGAT	Yelantsey	POLG_LANVY	<i>Mandl, C. W., y col., 1991</i>	EB: PWARTP GI: 443936 SP: P29838 PIR: B41704 GB: M73835 GI: 266825
1:31	LANGAT	TP21	YFVENVE	<i>Mandl, C. W., y col., 1991</i>	GI: 336195
1:32	LANGAT		POLG_LANVT	<i>Mandl, C. W., y col., 1991</i>	SP: P29837 GB: M73835 PIR: A41704 GI: 464428
1:33	OMSK		OMSKFVEG	<i>Gritsun, T. S., y col., 1993</i>	GB: 396143
1:34	TBE	Sofjin	TBEV1	<i>Yanischikov, F., y col., 1988</i>	GB: 62026
1:35	TBE	Sofjin	POLG_TBEVS	<i>Pletnev, A. G., y col., 1986</i>	GB: 130520 EB: X07755 PIR: GNWVTB
1:36	TBE		TBEENV1	<i>Labuda, M., y col., 1994</i>	GI: 840913
1:37	TBE		S72426	<i>Labuda, M., y col., 1994</i>	GI: 632897
1:38	TBE		TBCVEN2	<i>Labuda, M., y col., 1994</i>	GI: 840910
1:39	TBE	Western	POLG_TBEVW	<i>Mandl, C. W., y col., 1988</i>	SP: P14336 GB: M21498 PIR: GNWVNE
1:40	TBE		FLAVSTRG	<i>Gao, G. F., y col., 1993</i>	GI: 453597
1:41	TBE		TBEENVTURK	<i>Whitby, J. F., y col., 1992</i>	GI: 295278
1:42	EBE		SSEVENV	<i>Martin, M. S., y col., 1995</i>	GB: X77470 GI: 899423
1:43	LOUPING	31	POLG_LIV31	<i>Gao, G. F., y col., 1993</i>	SP: P35764 PIR: JQ1882 DDBJ: D12937
1:44	LOUPING		LIVENVA	<i>Gao, G. F., y col., 1994</i>	GI: 487409
1:45	LOUPING	LI 369/T2	POLG_LIV	<i>Shin, S. Y. H., y col., 1991</i>	GB: M59376 PIR: A38523 SP: P22338
1:46	LOUPING	Negeshi 3248/49/P10	POLG_LIVN1	<i>Venugopal, K., y col., 1992</i>	GB: M94956 PIR: A43383 SP: Q02478
1:47	LOUPING	K	POLG_LIVK	<i>Gao, G. F., y col., 1993</i>	PIR: JQ1883 DDBJ: D12935 SP: P35765
1:48	LOUPING	Norway	POLG_LIVNO	<i>Gao, G. F., y col., 1993</i>	PIR: JQ1884 DDBJ: D12936 SP: P35766
1:49	NEGISHI	SB 526	POLG_LIVSB	<i>Venugopal, K., y col., 1992</i>	GB: M94957 PIR: B43383 SP: Q02012

Tabla 1. Las abreviaturas utilizadas en la presente fueron las siguientes: D1, D2, D3 y D4, son los diferentes serotipos del virus del dengue. Entre paréntesis se muestran los subtipos a los cuales pertenece cada aislado (*Lewis, J. A., y col., 1993*). PIR (PIR), SP (SwissProt), EM (EMBL) y GB (GenBank). Langat; Virus Langat, Powassan; Virus Powassan, Kunjin; Virus Kunjin, Louping; Virus de la Enfermedad de Louping, Kyasanur; Virus de la enfermedad del bosque Kyasanur, OMSK; Virus de la Fiebre Hemorrágica de OMSK, SLE; Encefalitis de San Luis, JE; Encefalitis Japonesa, TBE; Encefalitis Transmitida por Garrapata, WN; Virus del Oeste del Nilo, MVE; Virus de la Encefalitis del Valle de Murray, YF; Virus de la Fiebre Amarilla. Posteriormente, estas secuencias fueron extraídas y editadas de los archivos del Entrez.

- **ANÁLISIS ESTRUCTURAL**

A partir de las bases de datos de estructura primaria (SwissProt, EMBL, *Network* Entrez y GenBank [y las actualizaciones diarias]) obtuvimos las secuencias de los diferentes flavivirus, las cuales se tradujeron a aminoácidos y se editaron las regiones de interés (glicoproteína de envoltura). Posteriormente, se analizaron las secuencias de las proteínas en el siguiente orden (diagrama 1 [pag 19]): a) Se buscaron firmas estructurales y/o funcionales (con PROSITE), las cuales fueron posteriormente analizadas buscando su posible presencia en la proteína fisiológicamente activa. b) Se buscó que las secuencias editadas no fueran idénticas a ninguna otra (con PALIGN). y c) Se llevó a cabo la reconstrucción de historias filogenéticas a partir de las secuencias de aminoácidos (con CLUSTALW, TREEALIGN y PROTPARS [de PHYLIP]) para observar la posible ruta de evolución tanto de las diferentes proteínas, como de las regiones conservadas y variables de la proteína E.

Los análisis de evolución llevados a cabo a partir de la estructura primaria se hicieron inicialmente a máxima parsimonia con el programa CLUSTALW (*Higgins, D. G. y Sharp, P. M. 1989*), utilizando las variables recomendadas por el autor, para este tipo de secuencias, así mismo, utilizamos el programa PROTPARS del paquete Phylip versión 3.5, con el cual se llevaron a cabo los análisis con parsimonia ponderada, obteniendo múltiples dendogramas (en este caso 50) los cuales posteriormente fueron sintetizados en un dendograma consenso mediante el programa CONSENSE. Los análisis de los procesos evolutivos no se pudieron realizar al 100 % con el programa TREEALIGN debido a que presenta limitaciones tanto en la construcción de los mismos como en los alineamientos múltiples cuando se le alimenta con gran cantidad de datos.

Estructura Primaria Programa y Resultado Obtenido	Estructura Terciaria Programa y Resultado Obtenido
<ul style="list-style-type: none"> • FSTNSCAN y FSTNSCAN; Rastreo de las bases de datos del EMBL y SwissProt, para búsqueda de secuencias. • Network BLAST; Rastreo de bases vía red ethernet • Network ENTREZ; Obtención de las secuencias resultantes del escrutinio realizado con el Network BLAST. • SEQUIN; Edición de secuencias de interés. • PALIGN; Alineamiento sencillo de secuencias aminoacídicas. • TRANSL; Traducción de secuencias nucleotídicas a aminoácidos. • PROSITE; Búsqueda de firmas funcionales en las secuencias de interés. • PHYLIP; Construcción de historias evolutivas (Dendogramas) de las secuencias virales. • CLUSTAL; Alineamiento múltiple de secuencias de interés. • CLUSTALW; Alineamiento múltiple de secuencias a máxima parsimonia 	<ul style="list-style-type: none"> • FTP 130.199.144.1; Entrada a las bases de datos del PDB vía login anonymous y obtención de las coordenadas de interés. <p><i>InsightII:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • VIEWER; Visualización de moléculas obtenidas del PDB. • HOMOLOGY; Extracción, obtención y alineamiento de los dominios homólogos, además de la asignación de coordenadas y realización de mutaciones puntuales, en las proteínas. Primeros análisis puntuales de minimización de energía. • DISCOVER; Experimentos de minimización de energía, dinámica molecular y cálculos de área de solvatación. • RASMOL; Visualización de macromoléculas • VMD; Visualización de Macromoléculas y cálculos de superficie de solvatación.

Diagrama 1. Herramientas para el análisis de estructura Primaria y Terciaria

• CONFORMACION

Para determinar la conformación de la proteína de envoltura del virus del dengue (de un aislado clásico y uno hemorrágico) nos basamos en la estructura cristalográfica la proteína de envoltura del virus TBE.

Nombre	Resolución (Å)	Cita
Proteína de Envoltura de TBE	2.0	<i>Rey, F. A. y col., 1995, Nature. 375, 291-298</i>

Tabla 2. Coordenadas utilizadas para la construcción de la proteína de envoltura.

• MODELAJE MOLECULAR

Los sistemas macromoleculares con la complejidad de las proteínas no pueden ser completamente entendidos únicamente en términos de sus propiedades estructurales estáticas. sino que también es necesario analizar sus propiedades dinámicas y termodinámicas. Por lo que en éste análisis se llevó a cabo la determinación de dichas propiedades mediante los métodos de simulación de dinámica molecular, basados en procedimientos desarrollados originalmente para estudios de mecánica estadística de líquidos simples (*Stillinger, F. H. y Rahman, A. 1974*). Los análisis de estos datos se desarrollaron en el programa INSIGHT II V. 2.3.5 (*Biosym, Technologies, Inc*), y la visualización se realizo en el RASMOL 2.5.

El desarrollo de funciones de potencial energético en conjunción con mecánica molecular y dinámica molecular, han hecho posible el estudio de grandes moléculas, aunque su tamaño y complejidad están en el límite de la capacidad de cómputo actual.

Las funciones de potencial energético juegan un papel central y crítico en todos los estudios de proteínas y son calculados generalmente de la siguiente forma:

$$V = V_{\text{enlace}} + V_{\text{ang}} + V_{\text{tor}} + V_{\text{vdw}} + V_{\text{eh}} + V_{\text{ie}}$$

donde V representa el potencial energético total de un sistema molecular como función de un grupo de coordenadas atómicas. El primer término (V_{enlace}) describe los cambios inherentes a la tensión de los enlaces, el segundo (V_{ang}) explica la modificación del ángulo de los enlaces, el tercero (V_{tor}) detalla el movimiento de torsión de los enlaces, y los últimos 3 términos comprenden las llamadas interacciones no enlazadas que describen, tanto las contribuciones al potencial energético debidas a las fuerzas de repulsión de corto alcance como a las fuerzas de atracción London, las también llamadas fuerzas de van der Walls (V_{vdw}), enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas Coulombicas (V_{ie}).

Una característica importante de las funciones de potencial energético (tabla 3), es la existencia de términos armónicos y anarmónicos que son necesariamente debidos a la anarmonicidad inherente a muchas regiones del potencial energético superficial normalmente encontrado en las proteínas. Para alcanzar una descripción exacta de las propiedades dinámicas de términos elásticos en los enlaces anarmónicos de términos de inclinación, así como de términos cruzados que acoplen estos movimientos con movimientos torsionales, se llevó a cabo el análisis de las frecuencias vibratorias útiles de acuerdo con Hagler y colaboradores (*Hagler, A. T. 1985 y*

Hagler, A. T. y col., 1989), particularmente a la descripción exacta de las propiedades dinámicas (frecuencias vibratorias de modo normal).

Tabla 3

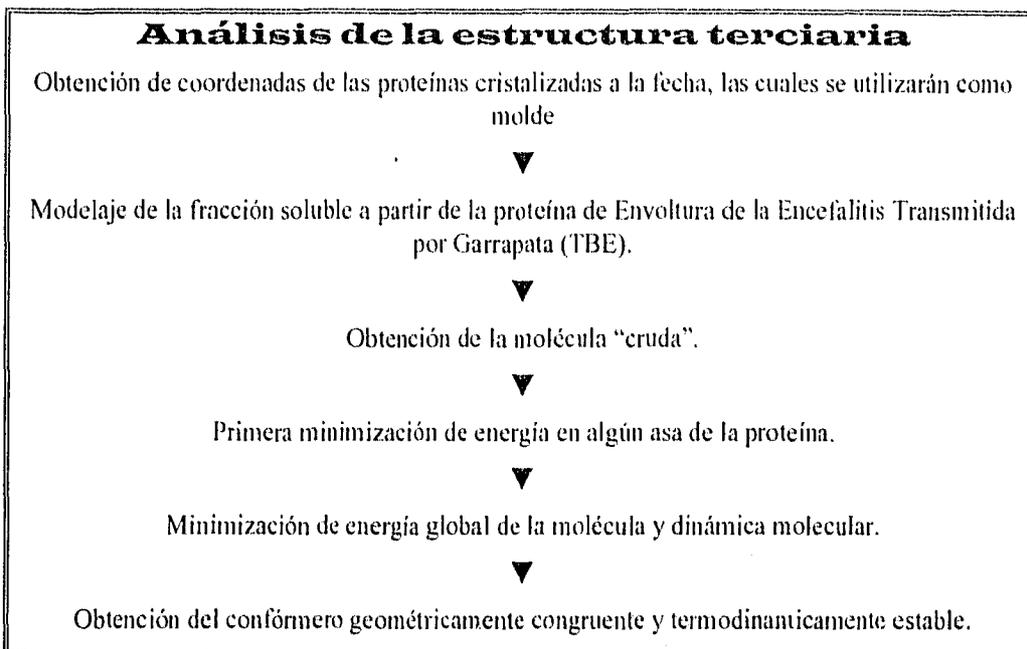
Términos Comumente Encontrados en la Función de Potencial Energético de Proteínas.

Tensión del Enlace	$V_{\text{enlace}} = \sum_{\text{enlace}} K_r (r - r^0)^2$	K_r y r^0 están relacionados a las fuerzas armónicas constantes y con el equilibrio de la distancia de enlace, respectivamente.
Angulo del Enlace	$V_{\text{ang}} = \sum_{\text{ang}} K_q (q - q^0)^2$	K_q y q^0 están relacionadas a las fuerzas armónicas constantes y equilibria del ángulo de enlace, respectivamente.
Torsión	$V_{\text{tor}} = \sum_{\text{dihedrales}} K\phi/2 [1 + \cos(n\phi - \delta)]$	V_n esta relacionado a la barrera energética para rotación donde n es la periodicidad de rotación. Múltiples términos son posibles para cada ángulo dihedral.
van der Waals	$V_{\text{vdw}} = \sum_{i,j>i} (A_{ij}/R_{ij}^{12} - B_{ij}/R_{ij}^6)$	A_{ij} y B_{ij} son parámetros de van der Waals y R_{ij} es la distancia entre los centros interactuantes.
Enlaces H	$V_{\text{ch}} = \sum_{i,j>i} (C_{ij}/R_{ij}^{12} - D_{ij}/R_{ij}^{10})$	C_{ij} y D_{ij} son parámetros de enlaces de H y R_{ij} es la distancia entre centros interactuantes.
Electrostática	$V_{\text{ic}} = \kappa_Q \sum_{i,j>i} Q_i Q_j / \epsilon R_{ij}$	Q_i y Q_j son cargas puntuales, R_{ij} es la distancia entre ellos y ϵ es la constante dielectrica. κ_Q es el termino de conversión unitario.

Los potenciales energeticos junto con la ecuación de Newton y eventualmente las formulas termodinámicas dan como resultado la dinámica molecular de las proteínas.

De esta forma se llevaron a cabo los análisis de modelaje molecular de la proteína de envoltura (E) tanto de un aislado viral de dengue clásico (dengue 2 mexicano) como de dengue hemorrágico (dengue 2 Malasia M1). En ambos casos se construyó la fracción soluble de la proteína E, tomando como modelo el cristal de la fracción soluble de la glicoproteína de envoltura del virus de la Encefalitis Transmitida por Garrapata (TBE) (Rey, F. y col., 1995). En la construcción de ambos modelos se llevaron a cabo tanto diferentes alineamientos múltiples utilizando distintos programas (CLUSTALW, TREEALIGN y HOMOLGY), como diferentes experimentos de minimización de energía y dinámica molecular. Después de 2 000 pasos de minimización a los modelos obtenidos se les aplicó una prueba de calidad estereoquímica utilizando el programa PROCHECK, con lo cual se obtuvieron las gráficas de Ramachandran, las variaciones en la

longitud de enlaces y el análisis de los aminoácidos sobrelapados. La verificación (validación) de las proteínas nos permitió obtener el parámetro o criterio para eliminar los conformeros que no presentaran una estereoquímica congruente.



Diag. 4

Finalmente, los modelos se construyeron a partir de los alineamientos obtenidos mediante el programa HOMOLGY, ya que fueron los únicos que después de la verificación se apegaron a los parámetros previamente propuestos. El principal parámetro tomado en cuenta fue el análisis de las gráficas de Ramachandran (estas consisten en la representación en un plano en donde el eje X son los 360° del ángulo ϕ [$C\alpha-NH_2$] y el eje Y los 360° del ángulo ψ [$C\alpha-COO$]), las cuales nos mostraron la posición de las cadenas principales ($C\alpha$, NH_2 y COO) y su relación con las cadenas laterales ($C\beta$), dándonos un claro indicio de la geometría de la cadena principal de las proteínas. Así mismo utilizamos estas gráficas para analizar la propensión de las cadenas laterales por los diferentes cuadrantes del plano (α , β y α izquierda). Cuando un aminoácido se salió de los cuadrantes previamente definidos fue necesario revisar si las coordenadas de las cadenas laterales se sobreponían a otra cadena lateral vecina. En caso contrario, se analizó si los ángulos del $C\alpha$ presentaban los grados correctos (120°) de un tetraedro. También se verificó si las cadenas principales presentaban efectos de agrupamiento como resultado de las regiones asa construidas e

insertadas en los diferentes conformeros. Finalmente, si no se presentaban problemas estequiométricos se verificó que tanto la cadena lateral como su carga estuviesen orientadas hacia el solvente (se buscaron aminoácidos polares y apolares), o hacia el interior de la proteína.

TBE	:	SRCTHLENRDFVTGTQGTTRVTLVLELGGCVTI TAEGKFSMDVWLDAIYQENPAKTREYC	60
D2MAL	:	MRCIGISNRDLVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRKYC	60
D2MEX	:	MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKSEAKQPATLRKYC	60
		^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	
TBE	:	LHAKLSDTKVAARCPTMGPATLAEEHQGGTVCKRDQSDRGWGNHCGLFGKGSIVACVKAA	120
D2MAL	:	IEAKLTNTTTSRCPTLGEPSLNEEQDKRLVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFT	120
D2MEX	:	IEAKLTNTTDSRCPTQGEPTLNEEQDKRFVCKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFI	120
		^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	
TBE	:	CEAKKKATCHVYDANKIVYTVKVEPHTGDIYVAANETHSGRKTASFTIS==SEKTIITMGE	178
D2MAL	:	CKKNMEGKIVQPENLEYTIVVTPHSGEEHAV=GNDT==GKHGKEIKITpqSSI TEAELTG	177
D2MEX	:	CKKNMEGKVVQKENWKYTIIVTPHSGEEHAV=GIDT==GKHGKEVKITpqSSI TDAELTG	177
		^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	
TBE	:	YGDVSLLCRVASGVDLAQTVILELDKTVHELPTAWQVHRDWFNDLALPWKHE===GAQNW	235
D2MAL	:	YGTVTMECSPRTGLD=FNEMVLLQMEN=====KAWLVHRQWFLDLPPLWPGadtQGSNW	231
D2MEX	:	YGTVTMECSPRTGLD=FNEMVLLQMND=====KARLVHRQWFLDLPPLWPGadtQGRKW	231
		^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	
TBE	:	NNAERLVEFGAPRAVIMDVYNLGDQTVLLKALAGVPAHIEGTYHLKSGHVTCEVGLE	295
D2MAL	:	IQKETLVTFKNRPHAKKQDVVVLGSQEGAIHTALTGATEIQMSSGNL=LFTGHLKCLRMD	290
D2MEX	:	IQKETLVTFKNRHAKKQDVVVLGSQEGTMHTALTGATEIQMSSGNL=LFTGHLKCLRKMD	290
		^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	
TBE	:	KLKMKGLTYTMCDKTKFTWKRAPTDSGHDTVVMVETFSGTK=PCRIPVRAVAHGSPDVNV	354
D2MAL	:	KLQLKGMSSYMSCT=GKFKVVEIAETQHGTIVIRVQYEGDGsPCKIPFEIMDLKRHLV=	358
D2MEX	:	KLQLKGMSSYMSCT=GKFKVVKEIAEKQHGTIVIRVQYEGDGsPCKTPFEIMDLKRHLV=	358
		^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	
TBE	:	AMLITPNPTIE=NNGGGFIEMQLPPGDNIIVG=====ELSHQWFQK	395
D2MAL	:	GRLITVNPIVTeKDSPLNIEAEPFGDSYIIIGv ep gQLKLNWFKK	394
D2MEX	:	GRLITVNPIVTeKDSPLNIEAEPFGDSYIIIGv ep gQLKLDWFKK	394
		^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^	

Figura 2. Alineamiento para la construcción de la fracción soluble de la proteína de envoltura del virus del dengue 2 clásico y hemorrágico. Las letras en minúsculas y resaltadas son los aminoácidos que fueron construidos mediante la inserción de asas y minipéptidos. En la secuencia de TBE las letras resaltadas son hojas β y las resaltadas y con doble subrayado son hélices α .

A partir de los alineamientos estructurales, se inició la asignación de coordenadas de las regiones que presentaban similitud. Las regiones que presentaron espacios (gaps), se manejaron de la siguiente manera:

- Los espacios (gaps) que se encontraban en las secuencias de la proteína E del dengue se deletaron de las regiones de TBE. Y posteriormente se unieron mediante minimizaciones de energía.
- Los espacios que se encontraban en TBE se construyeron de las secuencias faltantes en la siguiente forma:

- ◆ cuando comprendían de 3 a 5 aminoácidos se utilizó la técnica de modelaje de asas (loops), pero en las regiones donde eran menores,
- ◆ se procedió a hacer un escrutinio en el PDB, y/o
- ◆ se buscaron en TBE secuencias similares a partir de las cuales se construyeron lo que denominamos "minipéptidos" y con ellos se modelaron las regiones faltantes.

Una vez construídas las moléculas crudas, se posicionaron los enlaces disulfuro en los diferentes confórmeros y posteriormente se procedió a minimizar su energía total de la molécula, mediante 10 000 pasos de minimización. Junto con la minimización se relizaron 500 pasos de dinámica molecular. Lo anterior se llevó a cabo con el objeto de posicionar correctamente los segmentos que se habían insertado (Fig. 4).

RESULTADOS

Análisis Filogenético

Con el objeto de establecer las relaciones filogenéticas del aislado mexicano del virus del dengue (DEN2M), tanto con los diferentes genotipos del serotipo 2 viral secuenciados a la fecha, así como con los demás serotipos del dengue y otros flavivirus, se construyó un dendograma, utilizando como marcador genético a la glicoproteína E de los flavivirus. Observamos que el DEN2M estaba ubicado dentro del subtipo V (previamente propuesto por Lewis [Lewis, J.A. y col., 1993], que en nuestro árbol se muestra con un número romano entre paréntesis), el cual agrupa cepas americanas de los aislados del serotipo 2 del virus del dengue (diagrama 3). Así mismo, observamos que la agrupación de las secuencias de la proteína E correlacionó con los parámetros de clasificación inmunológica de los diferentes serocomplejos (ver figura 1 [pag 1]) descritos para los flavivirus. Nuestros resultados no correlacionaron totalmente con la clasificación de Lewis para el serotipo 2 en el subtipo III (IIIa y IIIb) ya que observamos varias diferencias en la disposición de las ramas y los nodos, proponiendo que este subtipo podría corresponder a un grupo en transición evolutiva, ya que las secuencias de los aislados presentes en estos, tienen similitudes con las secuencias de los grupos vecinos (ver diagrama 3). Aunque entre los subtipos IIIa y IIIb existe similitud a nivel de secuencia, las diferencias encontradas son lo suficientemente claras para agruparlos en nodos diferentes, formando de esta forma ramas independientes del mismo nodo externo. Así mismo, el subtipo III es vecino del subtipo V, con el cual comparte similitud en estructura primaria siendo esta rama (del subtipo III) mas heterogénea que la vecina del subtipo IV, aunque se encontró una elevada similitud con el subtipo V, ninguno de estos aislados se sobrelapó en los nodos vecinos. Los dos nodos que agrupan al subtipo III de Lewis (Lewis, J. A. y col., 1993) corresponden según nuestros criterios a dos grupos relacionados con los subtipos IV y V.

Para el serotipo 2 del virus del dengue, observamos que el 68.3 % de las secuencias fueron de procedencia asiática, el 14.6 % africanas y el 17.1 de cepas americanas. El subtipo I comprendió tanto aislados asiáticos como del continente australiano (Nueva Guinea), El subtipo II presento únicamente cepas asiáticas. El subtipo III fue una mezcla de cepas asiático-americanas, y como

mencionamos anteriormente, no observamos diferencias ni en la división de IIIa y IIIb, ni en la presencia de un nodo que contuviera todas las secuencias del subtipo III, (ya que este grupo presentó una gran similitud con los subtipos vecinos (IV y V), quedando el grupo dividido en dos). Aún con estas diferencias fue claro que las secuencias se encontraban delimitadas. El subtipo IV comprendió una mezcla de cepas asiático-africanas. Las cepas africanas presentaron gran similitud entre ellas tanto en secuencia como en historia filogenética. El subtipo V fue el grupo donde no predominaron las cepas asiáticas, formándose principalmente por cepas americanas con la presencia de un par de aislados africanos.

Dengue	E. Japonesa	F. Amarilla	TBE
Dengue 1	10	E. Japonesa 26	F. Amarilla 7
Dengue 2	37	West Nile 1	TBE 8
Dengue 3	26	E. St. Louis 1	Powassan 1
Dengue 4	16	E. Valle de Murray 2	Kyasaliu 1
		Kunjin 1	Lamp 3
			OMS 1
			EBE 1
			Loupin 6
			NW 1
	89	31	22

Tabla 4. Resumen de las secuencias utilizadas para la construcción del dendograma de la proteína de envoltura viral de los flavivirus.

En todo el género dengue predominaron las cepas asiáticas, ya que el serotipo 1 comprendió únicamente aislados asiáticos. El serotipo 3 presentó 3 aislados americanos y el resto fueron de procedencia asiática. El serotipo 4 comprendió 6 aislados americanos y el resto fueron asiáticos. Sin embargo, en el subtipo V del serotipo 2 fue en el único grupo en donde predominaron los aislados americanos y africanos.

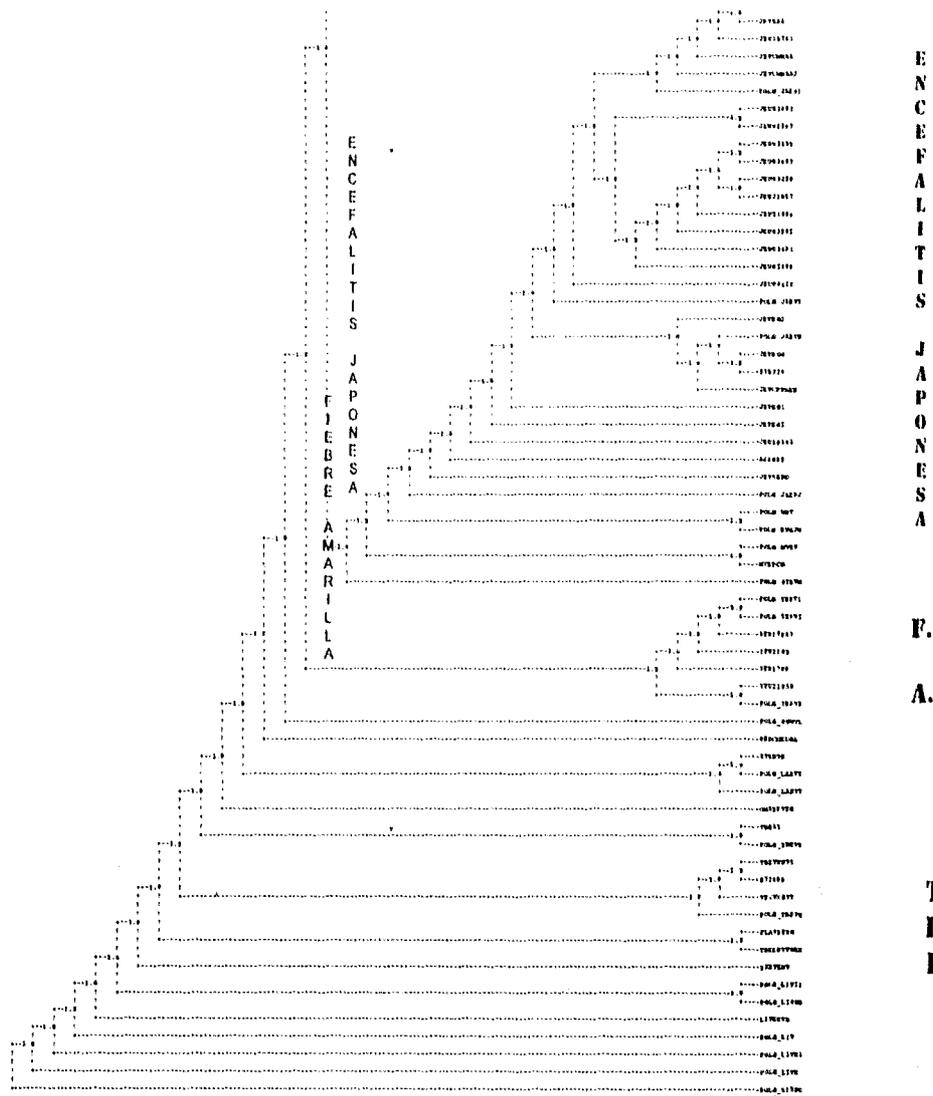


Diagrama 3. Dendograma de 149 secuencias de aminoácidos de la proteína de envoltura (E), de los diferentes flavivirus.

Modelaje Molecular

La construcción de los modelos tridimensionales de la fracción soluble de la proteína de envoltura tanto del virus del dengue 2 aislado Mexicano (L04561) (aislado a partir de un paciente con dengue clásico) como de la proteína de envoltura del virus del dengue 2 aislado Malasia M1 (X15434), procedente de un caso fatal de dengue hemorrágico, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos. Para la fracción soluble de la proteína de envoltura

del aislado de dengue 2 mexicano se obtuvo el conformero con el mínimo de energía, las diferencias en los valores de energéticos entre la molécula cruda y el conformero final se debieron principalmente a las tensiones de los enlaces peptídicos de las secuencias cortadas e insertadas durante la construcción del modelo.

La fracción soluble de la proteína E del virus del dengue Mexicano conservó los 3 dominios estructurales, el dominio I comprendió 3 regiones (1-51, 137-189 y 278-298) con un total de 125 aminoácidos y el siguiente porcentaje de estructura secundaria: hélices α 17 aminoácidos (13.6 %), hojas β 47 aminoácidos (37.6 %) y giros 30 aminoácidos (24 %) con un total de 75.2 % de estructura secundaria en el dominio I. En este dominio están presentes 2 puentes disulfuro (en TBE y dengue), y un barril de 8 hojas β el cual forma el núcleo del dominio. La principal función asociada a esta región de la proteína es la de bisagra, la cual es funcional cuando la molécula pasa de su forma dimérica a trimérica.

El dominio II está formado por 2 regiones (52-136 y 190-277) con un total de 173 aminoácidos y presenta una estructura secundaria del siguiente tipo, hojas β ; 41 aminoácidos (23.70 %), giros; 37 aminoácidos (21.39 %). El dominio II no presenta hélices α y contiene un 42.09 % de estructura secundaria total. En este dominio están presentes el 50 % de los puentes disulfuro de la proteína (3), los cuales se ha propuesto que den rigidez a esta región de la proteína siendo la pieza clave en la formación de los trímeros al momento de presentarse un cambio conformacional inducido por cambios en el pH del medio.

El dominio III está compuesto de 95 aminoácidos el cual presenta una forma característica de dominio de inmunoglobulina, y contiene un puente disulfuro (de los 6 de la molécula). Su estructura secundaria está formada únicamente por hojas β de 25 aminoácidos (26.31 %) y giros 25 aminoácidos (26.31 %). Este dominio tipo inmunoglobulina se ha propuesto que sea el responsable del reconocimiento al receptor viral, ya que es aquí donde se han encontrado que cambios puntuales en la secuencia pueden producir cambios en la penetración celular y el tropismo (*Hasegawa, H. y col., 1992, Holzmann, H. y col 1990, Pletnev, A. y col., 1992 y Lobigs, M. y col., 1990*).

En resumen la fracción soluble de la proteína de envoltura del virus del dengue 2 aislado Mexicano, presenta el siguiente porcentaje de estructura secundaria total en sus 394 aminoácidos: hélice α (13.6 %), hoja β (28.68 %) y giros (23.35 %).

Dominio I (1-51), (137-189), (278-298)

Hélices α (83-85, 101-103, 210-214, 258-263)

Hojas β (12-14, 20-26, 33-35, 41-42, 45-46)
(137-142, 158-162, 168-171, 180-186)
(282-288)

Giros (3-7, 16-17, 27-28, 36-38)
(150-152, 155-156, 164-165, 173-178, 187-189)
(297-298)

Dominio II (52-136), (190-277)

Hojas β (58-66, 62-66, 69-73, 90-99, 119-121, 124-126)
(238-240, 250-252)

Giros (51-54, 75-77, 86-89, 106-107, 132-134)
(201-204, 224-226, 229-230, 236-237, 245-246, 265-267, 274-278)

Dominio III (299-394)

Hojas β (306-308, 324-326, 333-341, 350-351, 357-358, 376-378, 389-391)

Giros (309-310, 316-319, 328-329, 331-332, 342-344, 352-355, 360-362, 381-386)

La fracción soluble de la proteína E del virus del dengue Malasia M1 al igual que el confórmero anterior, estuvo compuesta por 3 dominios estructurales denominados I, II y III de 125, 173 y 95 aminoácidos respectivamente. El dominio I comprende 3 regiones en las que se encuentran 1 hélice α , 8 hojas β y 12 giros. La hélice α contiene 3 aminoácidos, lo que corresponde al 2.4 % del dominio, 43 aminoácidos se encuentran en las hojas β y estas constituyen el 34.4 % del dominio. Los giros fueron menos abundantes que las hojas β , y correspondieron al 28 % del dominio con 35 aminoácidos en esta conformación.

El dominio II presenta 2 regiones que contienen 4 hélices α , 13 hojas β y 11 giros los cuales están constituidos por 18, 52 y 41 aminoácidos respectivamente, conteniendo 10.40 % de hélices α , 30.05 % de hojas β y 23.70 % de giros en todo el dominio.

El dominio III está formado por una sola región, y no posee ninguna hélice α , está constituido por hojas β con 26 aminoácidos que corresponden al 27.37 % del dominio y por giros con 25 aminoácidos que forman el 26.3 % del dominio.

La fracción soluble de la proteína de envoltura de la proteína E del dengue 2 Malasia M1 tiene la siguiente estructura secundaria: hélices α , 21 aminoácidos (5.33 %), hojas β , 121 aminoácidos (30.71 %) y giros, 101 aminoácidos (25.63 %).

Dominio I (1-51), (137-189), (278-298)

Hélices α (289-291)

Hojas β (20-26, 45-48,)

(135-141, 158-162, 168-171, 181-186)

(282-288, 300-301)

Giros (3-7, 16-17, 27-28, 36-37, 50-53)

(145-146, 149-152, 155-156, 163-166, 175-177, 187-189)

(297-298)

Dominio II (52-136), (190-277)

Hélices α (132-134, 210-214, 234-237, 258-263)

Hojas β (54-55, 57-60, 63-66, 69-73, 95-99, 109-116, 118-121, 124-129)

(196-199, 238-240, 250-252, 271-273, 276-277)

Giros (75-77, 83-89, 101-104, 106-108)

(201-205, 222-227, 232-233, 245-246, 256-257, 265-266, 274-278)

Dominio III (299-394)

Hojas β (306-308, 323-326, 333-334, 337-341, 357-358, 376-380, 387-391)

Giros (316-318, 328-329, 331-332, 342-344, 352-355, 360-362, 364-365, 381-386)

La comparación de las desviaciones RMS (Root Medium Square, es una medida de diferencias entre macromoléculas expresan en Å) entre los aislados del virus del dengue (Mexicano y Malasia) y la molécula molde (TBE) son los siguientes:

TBE	Dengue 2 Mexicano	Dengue 2 Malasia
Dominio 1	1.36	1.64
Dominio 2	0.94	1.15
Dominio 3	2.79	2.49

Estas similitudes muestran que en promedio la desviación RMS entre el TBE y el virus del dengue 2 Mexicano fue de 1.697 Å. Para la fracción soluble del virus del dengue 2 Malasia fue de 1.76 Å, lo cual nos mostró el grado de similitud entre estas moléculas tanto a nivel de estructura primaria como terciaria (Figura 4).

Estructura Secundaria de la Fracción Soluble de las Proteínas de Envoltura del Virus del Dengue 2 Mexicano y Dengue 2 Malasia

		Hélices α	Hojas β	Giros	Total
DEN2MEX	Dominio I	17 (13.6 %)	47 (37.6 %)	30 (24 %)	94 (75.2 %)
	Dominio II		41 (20.70 %)	37 (21.39)	78 (45.08 %)
	Dominio III		25 (26.31 %)	25 (26.31 %)	50 (52.63 %)
Total	Proteína E	17 (4.31 %)	113 (28.68 %)	92 (23.35 %)	222 (56.34 %)
DEN2MAL	Dominio I	3 (2.4 %)	43 (34.4 %)	35 (28 %)	81 (64.8 %)
	Dominio II	18 (10.40 %)	52 (30.05 %)	41 (23.70 %)	111 (64.16 %)
	Dominio III		26 (27.31 %)	25 (26.3 %)	51 (53.68 %)
Total	Proteína E	21 (5.33 %)	121 (30.71 %)	101 (25.63 %)	243 (61.67 %)

Tabla 5. Resumen de la estructura secundaria de los conformeros construidos mediante modelaje y dinámica molecular para las proteínas de envoltura del virus del dengue 2 Mexicano y dengue 2 Malasia. Se muestran los aminoácidos que forman cada estructura secundaria y el porcentaje (entre paréntesis) que representan tanto en el dominio como en la proteína completa.

En los estudios comparativos de las conformaciones de los dominios de las proteínas de envoltura de ambos virus del dengue 2, nos encontramos que en general las similitudes conformacionales concuerdan con los parámetros de similitud en proteínas homólogas. En el dominio I (figura 5) la desviación de RMS fue de 1.64 Å, lo cual implica una similitud muy elevada (en general se consideran que las similitudes entre proteínas homólogas no deben tener desviaciones RMS mayores de 2). La mayor similitud presente en la proteína fue la registrada para el dominio II en donde encontramos que la desviación RMS fue menor de 1 (0.96 Å), el dominio III o dominio tipo inmunoglobulina presentó una desviación RMS de 1.39 Å, presentándose un valor total RMS en la proteína de 1.33 Å, el cual se consideró indicativo de similitud estructural, ya que estos valores de desviación solo se encuentran en moléculas homólogas donde la identidad es mayor al 60 %, teniendo una identidad entre las proteínas de envoltura del dengue 2 (mexicano y Malasia) y de envoltura del virus de la encefalitis transmitida por garrapata de aproximadamente 36 %, complementándose con el 36 % de similitud entre ellas, dando como resultado que la proteína E del virus del dengue y TBE presenten más del 75 % de similitud global.

Estructura Secundaria de las Proteínas de Envoltura de los Virus del Dengue 2 Mexicano y Malasia M1

	1	10	20	30	40	50	60	70																																																														
D2MEX :	M	R	C	I	G	I	S	N	R	D	F	V	E	G	V	S	G	G	S	W	V	D	I	V	L	E	H	G	S	C	V	T	M	A	K	N	K	P	T	L	D	F	E	L	I	K	S	E	A	K	Q	P	A	T	L	R	K	Y	C	I	E	A	K	L	T	N	T	T	T	
D2MAL :	M	R	C	I	G	I	S	N	R	D	L	V	E	G	V	S	G	G	S	W	V	D	I	V	L	E	H	G	S	C	V	T	M	A	K	N	K	P	T	L	D	F	E	L	I	K	S	E	A	K	Q	P	A	T	L	R	K	Y	C	I	E	A	K	L	T	N	T	T	T	
		80	90	100	110	120	130	140																																																														
D2MEX :	D	S	R	C	P	T	Q	G	E	P	T	L	N	E	E	Q	D	K	R	F	V	C	K	H	S	M	V	D	R	G	W	G	N	G	C	G	L	F	G	K	G	I	V	T	C	A	M	F	I	C	K	K	N	M	E	G	K	V	V	O	K	E	N	W	K	Y	T	I	V	
D2MAL :	E	S	R	C	P	T	L	G	E	P	S	L	N	E	E	Q	D	K	R	L	V	C	K	H	S	M	V	D	R	G	W	G	N	G	C	G	L	F	G	K	G	I	V	T	C	A	M	F	T	C	K	K	N	M	E	G	K	I	V	O	P	E	N	L	E	Y	T	I	V	
		150	160	170	180	190	200	210																																																														
D2MEX :	I	T	P	H	S	G	E	E	H	A	V	G	I	D	T	G	K	H	G	K	E	V	K	I	T	P	Q	S	S	I	T	D	A	E	L	T	G	Y	G	T	V	T	M	E	C	S	P	R	T	G	L	D	F	N	E	M	V	L	L	Q	M	N	D	K	A	R	L	V	H	R
D2MAL :	V	T	P	H	S	G	E	E	H	A	V	G	N	D	T	G	K	H	G	K	E	I	K	I	T	P	Q	S	S	I	T	E	A	E	L	T	G	Y	G	T	V	T	M	E	C	S	P	R	T	G	L	D	F	N	E	M	V	L	L	Q	M	E	N	K	A	W	L	V	H	R
		220	230	240	250	260	270	280																																																														
D2MEX :	Q	W	F	L	D	L	P	L	P	W	L	P	G	A	D	T	Q	G	R	K	W	I	Q	K	E	T	L	V	T	F	K	N	R	H	A	K	Q	D	V	V	L	G	S	Q	E	G	T	M	H	T	A	L	T	G	A	T	E	I	Q	M	S	S	G	N	L	L	F	T		
D2MAL :	Q	W	F	L	D	L	P	L	P	W	L	P	G	A	D	T	Q	G	S	N	W	I	Q	K	E	T	L	V	T	F	K	N	P	H	A	K	Q	D	V	V	L	G	S	Q	E	G	A	I	H	T	A	L	T	G	A	T	E	I	Q	M	S	S	G	N	L	L	F	T		
		290	300	310	320	330	340	350																																																														
D2MEX :	G	H	L	K	C	R	L	R	M	D	K	L	Q	L	K	G	M	S	Y	S	M	C	T	G	K	F	V	V	K	E	I	A	E	K	Q	H	G	T	I	V	I	R	V	Q	Y	E	G	D	G	S	P	C	K	T	P	F	E	I	M	D	L	E	K	R	H	V	L	G	R	
D2MAL :	G	H	L	K	C	R	L	R	M	D	K	L	Q	L	K	G	M	S	Y	S	M	C	T	G	K	F	V	V	E	I	A	E	T	Q	H	G	T	I	V	I	R	V	Q	Y	E	G	D	G	S	P	C	K	I	P	F	E	I	M	D	L	E	K	R	H	V	L	G	R		
		360	370	380	390	400																																																																
D2MEX :	L	T	V	N	P	I	V	T	E	K	D	S	P	L	N	I	E	A	E	P	P	F	G	D	S	Y	I	I	I	G	V	E	P	G	Q	L	K	L	D	W	F	K																												
D2MAL :	L	I	T	V	N	P	I	V	T	E	K	D	S	P	V	N	V	E	A	E	P	P	F	G	D	S	Y	I	I	I	G	V	E	P	G	Q	L	K	L	N	W	F	K																											

Figura 3. En negritas se representan las hojas β , con subrayado sencillo los giros, y con doble subrayado las hélices α .

Una vez llevado a cabo el refinamiento de las moléculas procedimos con un análisis de las mismas mediante modelaje molecular, con el propósito de encontrar diferencias en conformación estructural, para lo cual decidimos realizar la búsqueda de las mismas en la estructura primaria. Se localizaron un total de 30 diferencias distribuidas de la siguiente manera: 6 (20 %) en el dominio I, 17 mutaciones en el dominio II (la mayor parte 56.7 %), y 7 en el dominio III (23.3 %). La región donde se presentaron el mayor número de cambios fue en el dominio II (donde la desviación de RMS fue menor), probablemente debido a que las mutaciones encontradas fueron conservativas en cuanto a su característica fisicoquímica. Una vez localizadas las mutaciones en la estructura primaria decidimos analizar cuáles y cuántos aminoácidos estaban formando agrupamientos cuyas distancias oscilaban alrededor de los 10 Å, y de esta manera poder observar las diferencias en cuanto a la superficie de solvatación de las regiones en donde las cadenas laterales de estos aminoácidos estaban presentes. Encontramos lo siguiente:

Número	Mutación D2M ▶ DHF	Tipo de Cambio	Número	Mutación D2M ▶ DHF	Tipo de Cambio
11 (I)	F ▶ L	Conserva Hf	203 (II)	D ▶ N	Cambia - ▶ ± (+)
48 (I)	S ▶ T	Conserva ±	206 (II)	R ▶ W	Cambia + ▶ Hf
71 (II)	D ▶ E	Conserva -	229 (II)	R ▶ S	Cambia + ▶ ± (±)
77 (II)	Q ▶ L	Cambia ± (±) ▶ Hf	230 (II)	K ▶ N	Cambia + ▶ ± (±)
81 (II)	T ▶ S	Conserva ±	243 (II)	R ▶ P	Cambia + ▶ Hf
90 (II)	F ▶ L	Conserva Hf	259 (II)	T ▶ A	Conserva Hf
120 (II)	I ▶ T	Cambia Hf ▶ ± (±)	260 (II)	M ▶ I	Conserva Hf
129 (II)	V ▶ I	Conserva Hf	288 (I)	K ▶ R	Conserva +
132 (II)	K ▶ P	Cambia + ▶ Hf	310 (III)	K ▶ E	Cambia + ▶ -
135 (II)	W ▶ L	Conserva Hf	315 (III)	K ▶ T	Cambia + ▶ ± (±)
136 (II)	K ▶ E	Cambia + ▶ -	335 (III)	T ▶ I	Cambia ± (±) ▶ Hf
153 (I)	I ▶ N	Cambia Hf ▶ ± (+)	352 (III)	T ▶ I	Cambia ± (±) ▶ Hf
162 (I)	V ▶ I	Conserva Hf	365 (III)	L ▶ V	Conserva Hf
172 (I)	D ▶ E	Conserva -	367 (III)	I ▶ V	Conserva Hf
202 (II)	N ▶ E	Cambia - ▶ ± (+)	390 (III)	D ▶ N	Cambia - ▶ ± (+)

Tabla 6. Se muestran las mutaciones encontradas en la fracción soluble de las proteínas de envoltura de los virus del dengue 2 Mexicano y Malasia M1. En la primer y cuarta columna se presenta el número del aminoácido en la proteína, en la segunda y quinta se muestra el cambio de aminoácido en código de una letra, en la tercer y sexta columna un comentario acerca del tipo de mutación encontrada. Las abreviaciones fueron las siguientes: ±, Neutro el signo que está entre paréntesis y se refiere a los aminoácidos polares sin carga; -, negativos; +, positivos; Hf, hidrofóbicos.

Se localizaron 5 grupos de aminoácidos que posiblemente estuviesen participando en las diferencias conformacionales entre los virus hemorrágicos y el virus de dengue clásico. Los agrupamientos estaban constituidos por los siguientes aminoácidos (también se indica el dominio en el que se localizan):

- a) 71, 77, 81, localizados en el dominio II (según nomenclatura de Rey, [Rey, F. Y col., 1995]), muy cerca del asa cd
- b) 90, 120, 229 y 230, localizados también en el dominio II
- c) 202, 203, 206, 259 y 260, localizados en el dominio II
- d) 48, 135, 136 y 162, localizados en el dominio central (I)
- e) 310, 335, 352, 365 y 367, localizados en el dominio III

Positivo	288								
Negativo	136		71	172					
	310								
Hidrofóbico	206	132			90	11			
		243			260	129			
					135				
					162				
					365				
					367				
Neutro	229	315	202	390	77	153	81		
	230		203		120		48		
					259				
					335				
					352				
	Positivo		Negativo		Hidrofóbico		Neutro		

Tabla 7. Se muestran los cambios de las fracciones solubles, separadas por su característica fisicoquímica (Positivo, Negativo, Neutro e hidrofóbico). Los cuadros sombreados muestran las mutaciones conservativas. Los números en la izquierda estuvieron localizados en agrupamientos, los de la derecha son los que no se encontraron en agrupamientos.

De las 30 mutaciones observadas entre ambos aislados del virus del dengue 2 (Mexicano y Malasia) más del 40 % (zonas sombreadas de la tabla 7) fueron conservativas en cualquiera de sus características fisicoquímicas. Se encontró que las mutaciones presentaban las proporciones descritas en la tabla 8. Aunque la mayoría de las mutaciones se localizaron en 5 agrupamientos (21 aminoácidos), hubo 9 aminoácidos que se encontraron dispersos desconociendo su participación en los cambios de la superficie de solvatación; sin embargo, es posible que alguno de ellos estén involucrados en la especificidad de unión a otra molécula como el aminoácido 390 o aminoácidos equivalentes en diferentes flavivirus (TBE, Encefalitis del Valle de Murray, Encefalitis Japonesa o virus quiméricos TBE/Dengue 4), el residuo 390 está asociado con cambios en el tropismo viral (Plenev, A. G. y col., 1992), modificación de la entrada a las células en cultivo (Hasegawa, H. y col., 1992),

además de encontrarse involucrado en la atenuación de las cepas virales en un modelo murino (Holzmann, H. y col., 1990, Lobings, M. y col., 1990). En nuestros conformeros el aminoácido 390 estaba mutado pero no presente en los agrupamientos analizados. Anteriormente se ha demostrado en diferentes aislados del virus del dengue 2 (Blok, J., y col., 1992), en el que la mayoría de las mutaciones a nivel de nucleótidos son conservativas. En el presente trabajo se comprobó que las mutaciones en la secuencia de aminoácidos también son conservativas en cuanto a su característica fisicoquímica.

Mutaciones	No. de Aminoácidos	Porcentaje (%)
Conservativas	13	43.3
Neutro ↔ Hidrofóbicos	6	20.0
Cargado ↔ Hidrofóbicos	3	10.0
Cargado ↔ Neutro	6	20.0
Positivo ↔ Negativo	2	6.7

Tabla 8. Tipos de mutaciones encontradas en las secuencias de dengue 2 Mexicano (Clásico) y dengue 2 Malasia (hemorrágico).

Las diferencias entre el los aislados Mexicano y Malasia a nivel de superficie se pueden observar claramente en las figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Figura 4. Se presentan las regiones que se cortaron de la fracción soluble del virus de la encefalitis transmitida por garrapata (TBE), y las regiones que se construyeron para los conformeros del virus del dengue 2 Mexicano y dengue 2 Malasia M1. En listón azul claro se muestra la fracción soluble del TBE, las regiones azul marino corresponden a los residuos que fueron cortados durante la construcción de los conformeros de Dengue 2 Malasia y Mexicano. En listón amarillo se muestra la proteína de envoltura del virus del dengue 2 mexicano. Las regiones en verde corresponden a los aminoácidos construidos ya sea por mInipéptidos o por generación de asas. El listón rojo corresponde a la proteína de envoltura del dengue 2 Malasia M1 y las regiones en carmesí oscuro son los aminoácidos construidos para el conformero Malasia. Se muestran las caras interna y externa de las proteínas, la cara interna se refiere a la que esta en contacto con la superficie viral y externa se refiere a la que interacciona con el huésped.



Vista Interna

Proteínas de Envoltura de TBE, Dengue 2 Mexicano y Dengue 2 Malasia

TBE
Mexicano



Vista Externa

Figura 5. Se muestran los 3 dominios estructurales de la fracción soluble de las proteínas de envoltura del Virus del dengue 2 Mexicano y Malasia. Además se presentan las desviaciones de RMS entre los diferentes dominios, así como los enlaces disulfuro en esferas.

Dominio I

Dominio III



MI (Hemorrágico)

**Proteínas de Envoltura del Virus del Dengue 2
se muestran los 3 dominios estructurales**

Dominio III

Dominio I

RMS 1.64

Dominio II

RMS 0.96

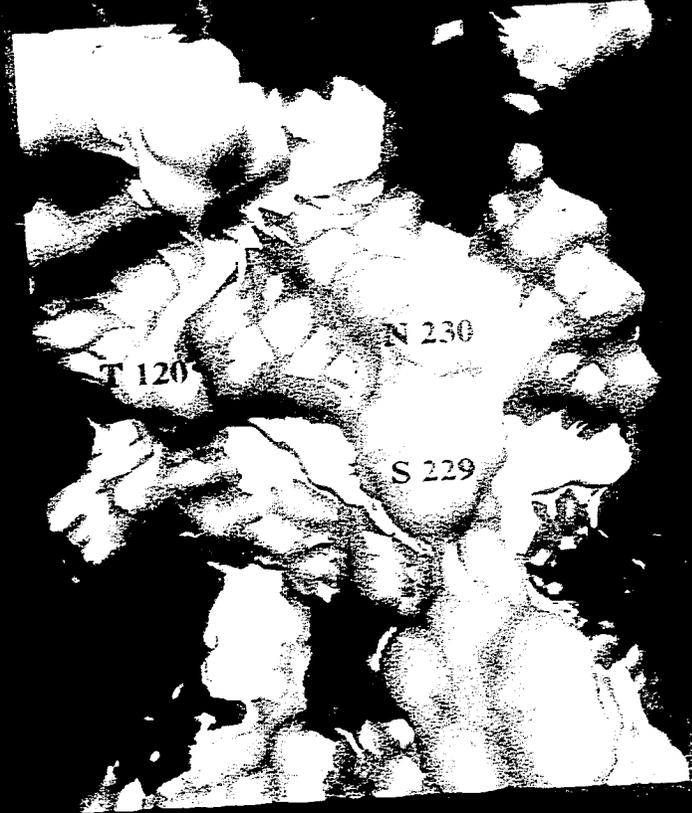
Dominio III

RMS 1.39

Figura 6. Presenta la región 1 de las 5 agrupaciones de aminoácidos, la cual esta formada por los residuos 71, 77 y 81. Se pueden observar las diferencias de las superficies de solvatación, ocasionadas por los cambios en estas posiciones. En color verde se encuentran los aminoácidos neutros, en blanco los hidrofóbicos, en rojo los polares negativos y en morado los polares positivos. Los residuos son identificados por su nombre en código de una letra y el número de aminoácido en la estructura primaria. Esta región se encuentra en el dominio II de la proteína E.

Figura 7. En esta figura se puede apreciar la región 2 formada por los residuos 90, 120, 229 y 230 todos localizados en el dominio II. Como se puede observar el aminoácido 90 no contribuye a la superficie de la molécula, ya que este residuo quedó oculto en el interior de la proteína. Los aminoácidos 229 y 230 en el virus del dengue 2 Malasia son neutros comparados con los polares positivos que presenta la proteína del virus del dengue 2 mexicano en la misma posición. La proteína de envoltura del virus del dengue 2 Malasia se vuelve mucho más hidrofóbica en esta región en particular de la proteína. El código de colores es el mismo que en la figura 6.

Proteína de Envoltura del Virus del Dengue 2 Mexicano y Malasia Superficie



Malasia

Figura 8. La región 3 está compuesta por 5 aminoácidos, en ésta todos los residuos están involucrados en la formación de superficies de solvatación. En la parte superior izquierda se conserva la característica hidrofóbica de la molécula, pero hacia la parte inferior derecha se aprecian varios cambios siendo el más evidente la mutación del residuo 206 donde la arginina presente en la proteína de envoltura del virus del dengue 2 mexicano es substituida por un triptofano en el dengue 2 Malasia. En este caso al igual que la figura anterior, parte de la superficie de esta región también se vuelve muy hidrofóbica.

Proteina de Envoltura del Virus del Dengue 2, Aislado Mexicano y Malasia.
Superficie de la

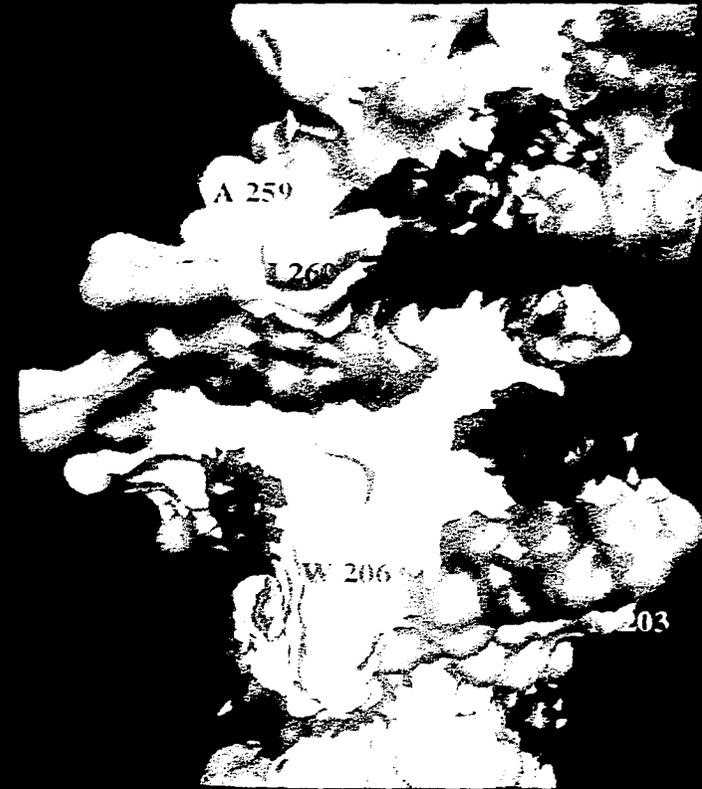
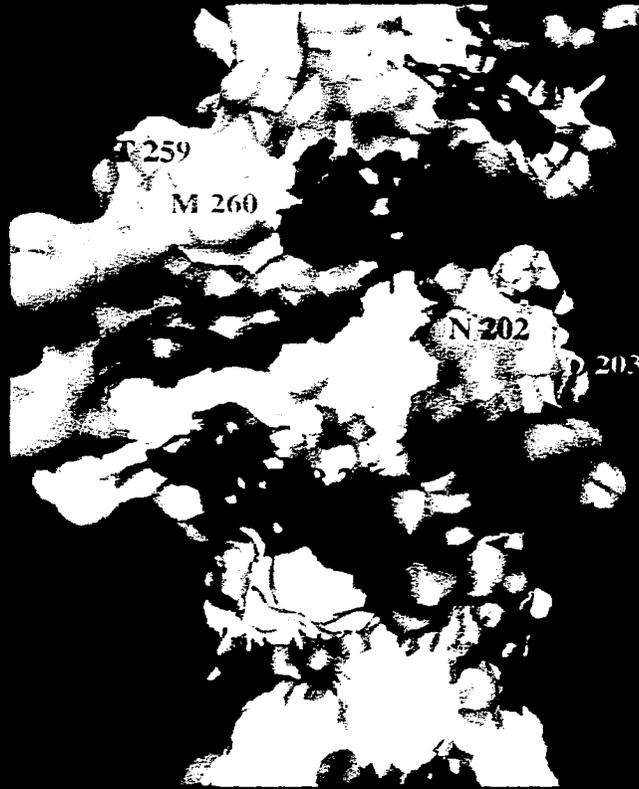
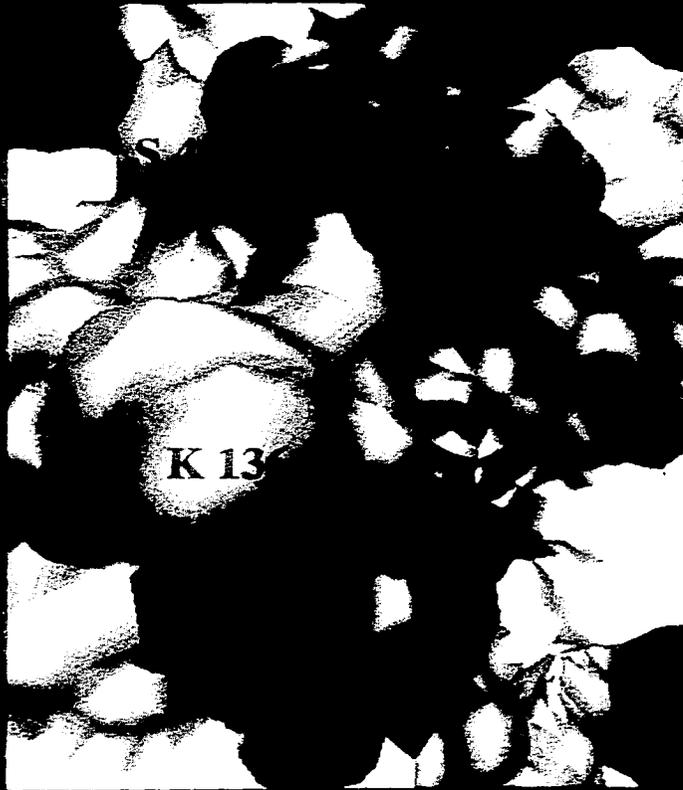


Figura 9. La región 4 está compuesta de los siguientes 4 residuos el 48, 135, 136 y 162. La región presenta solo 2 aminoácidos que contribuyen a la superficie de la proteína y son el 48 y el 136. Algo muy característico del residuo 48 es el cambio de posición de su cadena lateral con respecto al 136. En la proteína de envoltura del virus del dengue 2 mexicano el residuo 48 está prácticamente sobre el 136, pero en la proteína de dengue 2 Malasia la cadena lateral se orienta hacia la izquierda con respecto al 136, los otros 2 residuos quedan completamente ocultos y orientados hacia el centro de la molécula. Esta región se encuentra en el dominio II de la proteína

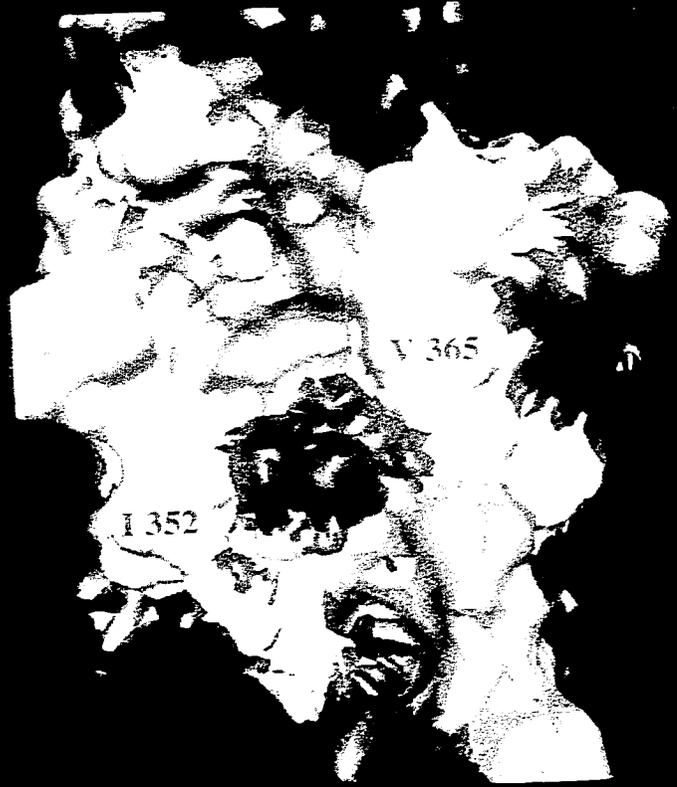
Proteína de Envoltura del Virus del Dengue 2 Aislado Mexicano y Malasia
Superficie



Malasia

Figura 10. La región 5 estuvo compuesta por 5 residuos: 310, 335, 352, 365 y 367. Esta zona se encuentra muy cerca de la región de interacción entre los monómeros, y solo son evidentes 3 de los aminoácidos. Lo mas notable es un cambio de carga en el residuo 310, siendo evidente (como en la protelna de envoltura del dengue 2 Malasia) que la superficie hidrofóbica es mayor. Otro cambio evidente es el acomodo de las cadenas laterales en el dominio III, esto es debido a que este dominio es el que presenta mayor desviación RMS de toda la molécula con alrededor de 2.5 Å. Esta diferencia se vuelve conspicua si se observa la zona superior de la imagen.

Proteína de Envoltura del Virus del dengue 2 Mexicano y Malasia Superficie



Malasia

Figura 11. En esta imagen se muestran las mutaciones entre las diferentes regiones. En listón azul claro se muestra la cadena principal de la molécula, las cadenas laterales amarillas corresponden a la proteína de envoltura del virus del dengue 2 Malasia M1, las cadenas laterales en azul plúmbago corresponden a la proteína de envoltura del virus del dengue 2 Mexicano y los números en verde señalan la posición en estructura primaria así como su nombre en código de una letra.

E
S
L

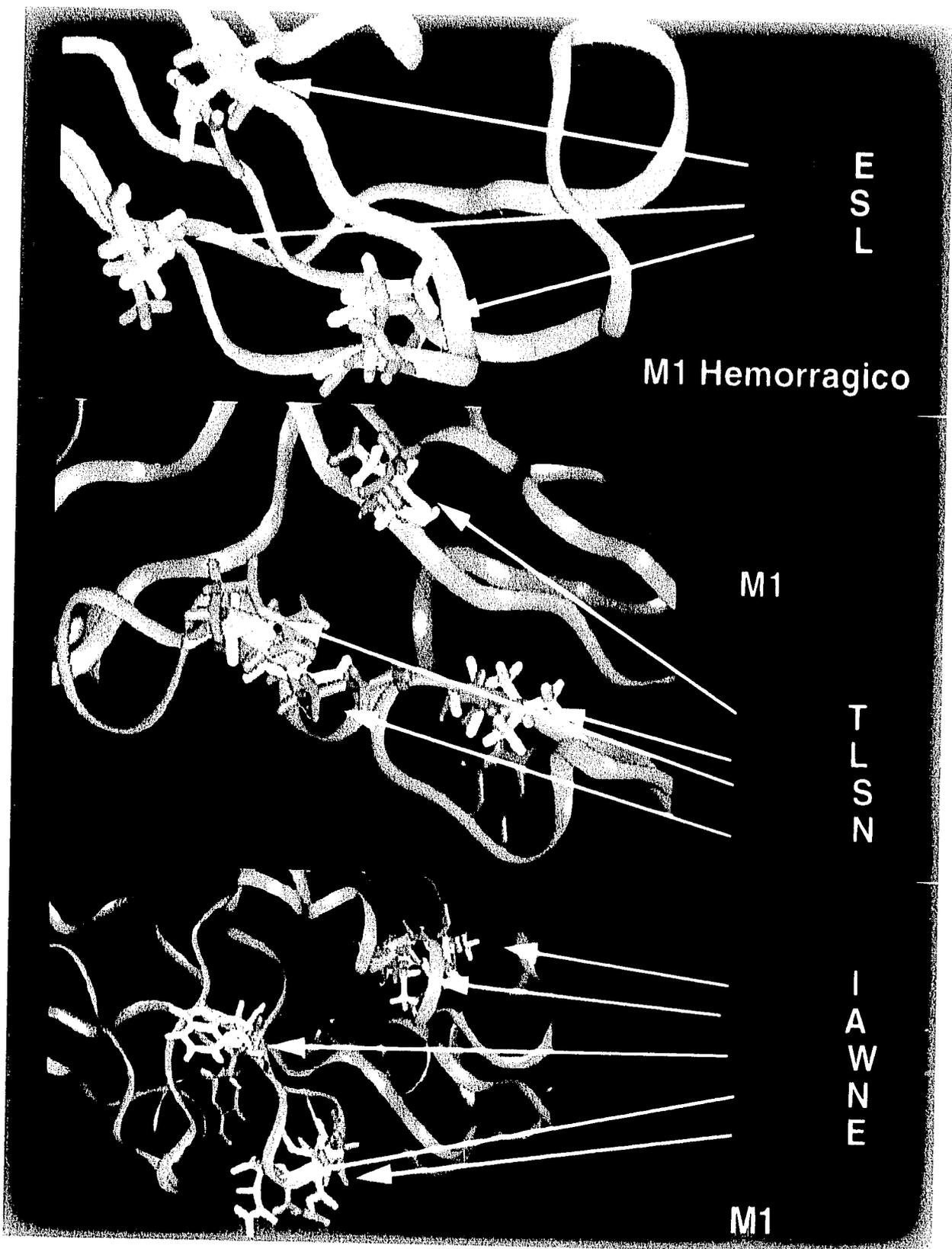
M1 Hemorragico

M1

T
L
S
N

I
A
W
N
E

M1



S T 48
K E 136
W L 137
V I 138

Mex
M1

K E
I V
I V
I

Mex
M1



DISCUSIÓN

Las diferencias de estructura primaria de la proteína de envoltura de los flavivirus nos mostró un panorama global de como se ha diversificado esta familia en la naturaleza.

El cladograma (diagrama 3) sugiere que la primer divergencia de los flavivirus se dio entre los virus transmitidos por garrapata y los transmitidos por mosquito. El dengue 1 estuvo relacionado únicamente con aislados asiáticos. El dengue 3 presentó una segregación en 4 líneas genéticas (IV subtipos) relacionadas, mostrando una evolución genética independiente. El subtipo I agrupó a los virus de Indonesia, Malasia, Filipinas e islas del Pacífico Sur. El subtipo II virus de Tailandia. El subtipo III a las cepas de Sri Lanka, India y África, y el subtipo IV a los aislados de Puerto Rico y Tahití. Análisis de la distribución mundial de dengue 3 han permitido la identificación de diferentes patrones epidemiológicos sugiriendo que algunos genotipos estén asociados con diferentes formas de la enfermedad del dengue (Lanciotti, R. S. y col., 1994).

Los virus del dengue 2 presentaron un cuadro más complejo, ya que en este serotipo se observó un incremento en la diversidad genética (quizá las poblaciones humanas favorecen un intervalo de expansión de las cepas virales). El 68 % de los aislados fueron de origen asiático, el 14.6 % de origen africano y el 17.1 % fueron cepas americanas. Lewis, anteriormente (Lewis, J. y col., 1993) propuso la presencia de 5 diferentes subtipos representando distintas líneas evolutivas del dengue 2, mediante análisis filogenéticos de la estructura primaria de la proteína de envoltura del virus del dengue serotipo 2 (en nuestro árbol, el número de subtipo de acuerdo a Lewis esta en paréntesis). Nuestros datos no confirmaron la definición del subtipo III propuesto por Lewis, ya que observamos grandes similitudes de este grupo con aislados del subtipo IV y V, aunque los métodos utilizados por Lewis son fundamentalmente los mismos algoritmos (Máxima Parsimonia y Parsimonia variable), los programas no fueron los mismos, seguramente ésta es una variable para una diferenciación de nodos. Los análisis de las secuencias de las proteínas E, en especial los alineamientos múltiples nos mostraron que la similitud de algunas de las firmas de subtipo con los miembros del subtipo III con los subtipos IV y V, por lo tanto, nosotros proponemos que este subtipo (el cual incluye una mezcla de cepas asiático-americanas) es un grupo que se encuentra en transición evolutiva. Sin embargo, nuestros resultados para los subtipos I, II, IV y V (con algunas diferencias) concuerdan con Lewis. El subtipo I incluyó cepas asiático-australianas. El subtipo II

DISCUSIÓN

Las diferencias de estructura primaria de la proteína de envoltura de los flavivirus nos mostró un panorama global de como se ha diversificado esta familia en la naturaleza.

El cladograma (diagrama 3) sugiere que la primer divergencia de los flavivirus se dio entre los virus transmitidos por garrapata y los transmitidos por mosquito. El dengue 1 estuvo relacionado únicamente con aislados asiáticos. El dengue 3 presentó una segregación en 4 líneas genéticas (IV subtipos) relacionadas, mostrando una evolución genética independiente. El subtipo I agrupó a los virus de Indonesia, Malasia, Filipinas e islas del Pacífico Sur. El subtipo II virus de Tailandia. El subtipo III a las cepas de Sri Lanka, India y África, y el subtipo IV a los aislados de Puerto Rico y Tahití. Análisis de la distribución mundial de dengue 3 han permitido la identificación de diferentes patrones epidemiológicos sugiriendo que algunos genotipos estén asociados con diferentes formas de la enfermedad del dengue (*Lanciotti, R. S. y col., 1994*).

Los virus del dengue 2 presentaron un cuadro más complejo, ya que en este serotipo se observó un incremento en la diversidad genética (quizá las poblaciones humanas favorecen un intervalo de expansión de las cepas virales). El 68 % de los aislados fueron de origen asiático, el 14.6 % de origen africano y el 17.1 % fueron cepas americanas. Lewis, anteriormente (*Lewis, J. y col., 1993*) propuso la presencia de 5 diferentes subtipos representando distintas líneas evolutivas del dengue 2, mediante análisis filogenéticos de la estructura primaria de la proteína de envoltura del virus del dengue serotipo 2 (en nuestro árbol, el número de subtipo de acuerdo a Lewis esta en paréntesis). Nuestros datos no confirmaron la definición del subtipo III propuesto por Lewis, ya que observamos grandes similitudes de este grupo con aislados del subtipo IV y V, aunque los métodos utilizados por Lewis son fundamentalmente los mismos algoritmos (Máxima Parsimonia y Parsimonia variable), los programas no fueron los mismos, seguramente ésta es una variable para una diferenciación de nodos. Los análisis de las secuencias de las proteínas E, en especial los alineamientos múltiples nos mostraron que la similitud de algunas de las firmas de subtipo con los miembros del subtipo III con los subtipos IV y V, por lo tanto, nosotros proponemos que este subtipo (el cual incluye una mezcla de cepas asiático-americanas) es un grupo que se encuentra en transición evolutiva. Sin embargo, nuestros resultados para los subtipos I, II, IV y V (con algunas diferencias) concuerdan con Lewis. El subtipo I incluyó cepas asiático-australianas. El subtipo II

consistió únicamente de cepas asiáticas; el subtipo III por asiático-americanas; el subtipo IV representó una mezcla de cepas asiáticas y africanas y el subtipo V fue el único donde no se presentaron aislados asiáticos, sino cepas americanas y africanas. El DEN2M se encontró ubicado en el subtipo V, siendo el aislado con mayor disimilitud de todo el serotipo.

Finalmente, debe de ser mencionado que se han llevado a cabo análisis filogenéticos en flavivirus utilizando tanto proteínas estructurales como no estructurales que muestran resultados similares, lo cual valida a la glicoproteína E como marcador filogenético. Nuestro dendograma sugiere que los flavivirus transmitidos por mosquito están evolucionando más rápido que los flavivirus transmitidos por garrapata. Esta distinción probablemente refleje las diferentes formas de dispersión, propagación y rango de huésped en las diversas cepas virales.

Los resultados estructurales muestran que los conformeros de las dos proteínas modeladas del virus del dengue 2 a partir de su homólogo TBE, conservan la conformación general de la molécula, así como gran parte de su estructura secundaria. Los alineamientos de estructura primaria y terciaria mostraron varias regiones cuya similitud fue mayor al 80 %, presentes en los dominios I y III, y aunque el dominio II fue la parte de la proteína viral donde se presentaron la mayor parte de las diferencias en estructura primaria este dominio fue el más conservado conformacionalmente (posiblemente debido a las pocas deleciones/inserciones que se llevaron a cabo en esta región). El dominio III fue la región de la proteína viral donde se presentaron el mayor número de inserciones/deleciones y donde se observó una desviación RMS mayor con respecto a la proteína molde. Aunque ambos modelos mostraron una gran similitud conformacional se presentó un 7.61 % de diferencias en aminoácidos. Como se apreció en algunas de las regiones, la superficie de solvatación y la presencia de residuos hidrofóbicos se incrementó.

Nosotros proponemos que la proteína E juega un papel importante en la relación huésped parásito durante el proceso infeccioso. En nuestro laboratorio se evaluó el papel del virus del dengue en un modelo *in vitro* de fibrinólisis observando un comportamiento diferencial entre las cepas clásicas y hemorrágicas, a nivel del reconocimiento, entre el plasminógeno/plasmina y moléculas inhibitoras de la cascada de la fibrinólisis. El presente trabajo sienta las bases estructurales para futuros análisis en los eventos de reconocimiento de las diferentes proteínas involucradas en el mecanismo de la fibrinólisis durante la infección por el virus del dengue.

G L O S A R I O

- Algoritmo:** Grupo de reglas para resolver un problema independientemente del software o hardware.
- Aminoácido:** Ácidos carboxílicos con sustitución amina en posición α , son los sillares de las proteínas.
- Angstrom:** (Å) unidad de longitud utilizada en la medición de dimensiones atómicas. Es igual a 10^{-10} m.
- Anticuerpo:** Proteína producida como respuesta a la presencia de una sustancia extraña en la sangre o los tejidos.
- Árbol Filogenético:** Un diagrama ramificado que representa las líneas genealógicas y secuencia de los eventos históricos que unen organismos individuales, poblaciones o taxá
- Arbovirus:** Término usado para describir cualquier virus de vertebrados que es transmitido por un vector artrópodo.
- Bicapa:** Doble capa de moléculas de lípido anfipáticas, las colas de hidrocarburo se encaran hacia el interior para formar una fase no polar continua.
- Cap:** Secuencia de bases metiladas unidas al 5'-terminal de un ARNm que interacciona factores proteínicos involucrados en la iniciación de la síntesis de proteínas.
- Cápside:** Cubierta proteínica de un virión o partícula viral.
- Cladograma:** Un diagrama ramificado que contiene entidades donde la ramificación está basada en las conexiones históricas inferidas entre las entidades por sinapomorfias. Esto es, un cladograma es un dendograma histórico o filogenético.
- CLUSTAL:** Programa de alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos y nucleótidos, entre sus datos calcula un dendograma analizando con máxima parsimonia y una matriz de mutaciones.
- Codon de Inicio:** Trinucleótido en un ARNm en el cual un ribosoma inicia el proceso de traducción, por lo tanto establece el marco de lectura. Usualmente AUG, pero puede ser GUG en procariontes.
- Conformación:** La disposición tridimensional o forma de una macromolécula.
- Cristalografía de Rayos X:** Empleo de la difracción de rayos X por los cristales de un compuesto para determinar su estructura tridimensional.
- Dalton:** Peso de un átomo de hidrógeno (1.67×10^{-24} gr).
- Dendograma:** Un diagrama ramificado que contiene entidades unidas por algún criterio.
- Dominio:** Regiones continuas compactas de la molécula, que son especialmente diferentes entre ellas. Los dominios están conectados por la cadena polipeptídica que corre a través de toda la molécula. Múltiples dominios son comunes en proteínas globulares de gran tamaño. Muy frecuentemente los dominios tienen diferentes funciones o desempeñan la misma función de manera independiente.
- Enlace Peptídico:** Enlace covalente entre dos aminoácidos en el cual el grupo α -amino de un aminoácido se une al grupo α -carboxilo de otro, con la eliminación de H_2O .
- Enlace Covalente:** Enlace químico por compartición de pares de electrones.
- Enlaces de Hidrógeno:** Son aquellos que se forman entre las cadenas laterales de los aminoácidos donadores y/o aceptores de protones. Fuerza débil, de naturaleza electrostática, existente entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un segundo átomo electronegativo.
- Entropía:** Aleatoriedad o dispersión de un sistema.
- Estructura Secundaria:** La conformación resto a resto del esqueleto de una cadena polipeptídica.
- Estructura Terciaria:** Conformación tridimensional de la cadena polipeptídica de una proteína globular en su estado nativo plegado.
- Estructura Primaria:** La estructura del esqueleto covalente de una proteína incluyendo la secuencia aminoácídica y los enlaces por puente disulfuro inter e intracatenarios.
- FSTNSCAN Y FSTPSCAN:** Programas diseñados para el rastreo de bases de datos, para la búsqueda de secuencias (PC/GENE).
- GenPept:** Traducciones de los marcos abiertos de lectura del GenBank para facilitar los escrutinios a la base de datos.
- GpuPdate:** Actualizaciones acumulativas diarias del GenBank y del GenPept, tienen la misma utilidad que el SPUPDATE.
- Grupo Amino:** Grupo químico característicamente básico porque tiende a unir protones para formar $-NH_3^+$. El amino terminal de un polipéptido es el extremo con un grupo α amino libre.
- Hélice α :** Conformación helicoidal arrollada de la cadena polipeptídica con un máximo de enlaces de hidrógeno intracatenarios.
- Hojas plegadas:** Disposición de las cadenas polipeptídicas laterales, unidas por enlaces de hidrógeno, adoptando la conformación β extendida.
- Interacciones de van der Waals:** Interacciones débiles entre grupos moleculares no cargados que pueden ser contribuidores importantes a la estabilidad de las proteínas. Fuerzas de atracción débiles que actúan solamente a distancias muy cortas y que son resultantes de la atracción entre dipolos inducidos.

Interacciones Electroestáticas: Son las que se presentan entre grupos de cadena lateral cargados positiva o negativamente. En algunas ocasiones forman una sal dentro de la proteína y por esta razón son ocasionalmente llamados puentes salinos.

KabatPro: Base de datos Kabat especializada en secuencias de proteínas de interés inmunológico.

Kringle: Dominio formado por una triada de asas sostenidos por 3 puentes disulfuro, los cuales les dan una conformación característica

Ligando: Molécula o ion que se une a una proteína.

Network ENTREZ: Programa que a través de una red ethernet explora las bases de datos para obtener secuencias aisladas o familias de secuencias relacionadas, incluyendo referencias y referencias cruzadas con otras bases de datos.

Network BLAST: Algoritmo cuya función es escrudinar las bases de datos a través de una red ethernet, presenta la particularidad de explorar de forma no redundante 8 bases de datos de proteínas y 8 de ácidos nucleicos.

PALIGN: Programa de alineamiento de estructuras primarias de proteínas (1:1) (PC/GENE).

Parsimonia: (Principio de simplicidad) Hipótesis que propone la utilización del menor número de cambios evolutivos para la inferencia de relaciones filogenéticas

PDB: Banco de datos de proteínas (Brookhaven Protein Data Bank) base de datos especializada en conformaciones (3D) de biomoléculas.

Peso Molecular: Suma de los pesos moleculares de los átomos constituyentes de una molécula.

PICASSO: Visualización y edición de dendogramas y gráficas (PC/GENE).

PIR: (Protein Identification Resource) Base de datos especializada en estructuras primarias de proteínas, presenta la característica de tener a las proteínas en forma jerárquica (superfamilias, familias, etc.)

Primera Ley de la Termodinámica: En todos los procesos la energía total del universo permanece constante.

PROSITE: Rastreador de secuencias de aminoácidos involucradas con las firmas funcionales y estructurales de las proteínas.

Proteína: Macromolécula compuesta de una o más cadenas polipeptídicas cada una de las cuales posee una secuencia aminoácida característica y peso molecular.

Puente Disulfuro: Enlace covalente transversal formado entre dos polipéptidos mediante un residuo de cistina.

RMS: Root Medium Square, Desviación que equivale a la raíz cuadrada de la distancia entre dos átomos (generalmente C α), utilizada para medir el grado de similitud o diferencia entre dos moléculas

Segunda Ley de la Termodinámica: La Entropía del universo tiende a aumentar

SEQUIN: Editor de secuencias nucleotídicas y aminoácidas (PC/GENE).

spupdate: Actualización acumulativa del SwissProt, utilizada principalmente para tener la información más reciente.

SwissProt: Base de datos de estructuras primarias de proteínas, del EMBL

TFD: (transcription factor protein) Base de datos enfocada a las proteínas involucradas como factores de transcripción.

TRANSL: Traducción de secuencias de nucleótidos a aminoácidos.

Virión: Partícula viral infecciosa o no infecciosa.

Virulencia: La capacidad de un agente infeccioso, como un virus, para producir una enfermedad.

Virus: Agentes infecciosos causantes de enfermedades, más pequeños que las bacterias, que necesitan para su replicación células huésped intactas y que contienen como componente genético ADN o ARN.

Zimógeno: Precursor inactivo de una enzima; por ejemplo plasminógeno.

R E F E R E N C I A S

- Aihara, S., Rao, C., Yu, Y. X., Lee, T., Watanabe, K., Sumiyoshi, H., Hashimoto, H. & Nomoto, A. (1990). Identificación de mutaciones ocurridas en el genoma de la enfermedad japonesa del cerebro durante el proceso de atenuación. *unpublished*.
- Aihara, S., Rao, C., Yu, Y. X., Lee, T., Watanabe, K., Komiya, T., Sumiyoshi, H., Hashimoto, H. & Nomoto, A. (1991). Identificación de mutación que ocurrió en el genoma de la enfermedad japonesa del cerebro durante el proceso de atenuación. *Virus genes* 5, 95-109.
- Almagro, D., González, I., Cruz, Y. y Castañeda, M. (1984). Estudio hemostático en el dengue hemorrágico. *Rev. Cub. Med. Trop.* 36, 352-359.
- Altschul, Stephen, F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Bairoch, A. (1993). The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucleic. Acids. Res.* 21 (13), 3097-3103.
- Bairoch, A. & Apweiler, R. (1996). The Swiss-Prot protein sequence data bank and its new supplement trEMBL. *Nucleic. Acids Res.* 24, 21-25
- Ballinger-Cratree, M. E. and Miller, B. R. (1990). Partial nucleotide sequence of South American yellow fever virus strain 1899/81: structural proteins and NS1. *J. Gen. Virol.* 71, 2115-2121.
- Berntein, F. C. Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F., Brice, M. D. Rodger, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: A computer based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112, 535-542.
- Blok, J., McWilliam, S. M., Butler, H. C., Gibbs, A. J., Weiler, G., Herring, B. L., Hemsley, A. C., Aaskov, J. G., Yoksan, S. & Bhamarapavati, N. (1992). Comparison of a dengue-2 and its candidate vaccine derivative: sequence relationships with the flaviviruses and other viruses. *Virology.* 187, 573-590.
- Blok, J., Samuel, S., Gibbs, A. J. and Vitrana, U. T. (1989) Variation of the nucleotide and encoded amino acid sequences of the envelope gene from eight Dengue-2 viruses. *Arch. Virol.* 105, 39-53.
- Blundell, T. L., Sibanda, B. L., Sternberg, M. J. E. & Thornton, J. M. (1987). Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature.* 326, 347-352.
- Blundell, T. L., Carney, D., Gardner, S., Hayes, F., Howlin, B., Hubbard, T., Overington, J., Singh, D. A., Sibanda, B. L. & Sutcliffe, M. J. (1988). Knowledge-based protein modelling and design. *Eur. J. Biochem.* 172, 513-520.
- Brünger, A. T., Kuriyan, J. and Karplus, M. (1987). Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science.* 235, 458-460.
- Brünger, A. T., Clore, A. M., Gronenborn, A. M. and Karplus, M. (1986). Three-dimensional structure of proteins determined by molecular dynamics with interproton distance restraints: Application to crambin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 3801-3805.
- Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1994). *Nature.* 371, 37-43.
- Burks, C., Cinkosky, M. J., Gilna, P., Hayden, J. E. D., Abe, Y., Atencio, E. J., Barnhouse, S., Benton, D., Buenafe, C. A., Cumella, K. E., Davison, D. B., Emmert, D. B., Faulkner, M. J., Fickett, J. W., Fischer, W. M., Good, M., Horne, D. A., Houghton, K., Kelkar, P. M., Kelley, T. A., Kelly, M., King, M. A., Langan, B. J., Lauer, J. T., Lopez, N., Lynch, C., Lynch, J., Marchi, J. B., Marr, T. G., Martinez, F. A., McLeod, M. J., Medvick, P. A., Mishra, S. K., Moore, J., Munk, C. A., Mondragon, S. M., Nasser, K. K., Nelson, D., Nelson, W., Nguyen, T., Reiss, G., Rice, J., Ryals, J., Salazar, M. D., Stelsts, S. R., Trujillo, B. L., Tomlinson, L. J., Weiner, M. G., Welch, F. J., Wiing, S. E., Yudin, K., & Zins, L. B. (1990). GenBank: Current status and future directions. *Methods Enzymol.* 183, 3-22.
- Byeon, I. J., Kelley, R. F. & Llinas, M. (1991). Kringle-2 domain of the tissue-type plasminogen activator. 1H-NMR assignments and secondary structure. *Eur. J. Biochem.* 197, 155-165.
- Carmenes, R.S. (1989) A program for protein structure prediction. *Biophys. Res. Commun.* 159, 687-693.
- Castellino, F. J. and Beals, J. M. (1987). The genetic relationship between the kringle domain human plasminogen, prothrombin, tissue plasminogen activator, urokinase and coagulation factor XII. *J. Mol. Evol.* 26, 358-369.
- Castle, E., Leidner, U., Nowak, T., Wengler, G. and Wengler, G. (1986). Primary structure of the west Nile flavivirus genome region coding for all nonstructural proteins. *Virology* 149, 10-26.
- Cao, J. X., Ni, H., Sil, B. K., Campbell, G. A., Ryman, K. D., Kitchen, I. & Barrett, A. D. (1995). Passage of Japanese encephalitis virus in HeLa cells results in attenuation of virulence in mice. *Unpublished*
- Chen, W. and Maguire, T. (1990). Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein gene of a dengue-2 virus isolated during an epidemic of benign dengue fever in Tonga in 1974. *Nucleic. Acids. Res.* 18, 5889-5889.
- Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.
- Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A. (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature.* 342, 877-883.

- Chu, M. C., O'Rourke, E. J. & Trent, D. W. (1989). Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains. *J. Gen. Virol.* 70, 1701-1712.
- Chungue, E., Poli, L., Ruche, C., Gestas, P., Glaziou, P. & Markoff, L. J. (1994). Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *J. Inf. Dis.* 170, 1304-1307.
- Clements, D. E., Henschel, E. A. and Ivy, J. M. (1992). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of Dengue type 3 virus CH53489 clone 24/28. *Unpublished*.
- Coia, G., Parker, M. D., Speight, G., Hyrne, M. E. & Westaway, E. G. (1988). Nucleotide and complete amino acid sequences of Kunjin virus: definitive gene order and characteristics of the virus-specified proteins. *J. Gen. Virol.* 69, 1-21.
- Collins, J. F. & Coulson, A. F. W. (1987). Molecular Sequence Comparison and Alignment. In *Nucleic Acid and Protein Sequence Analysis a Practical Approach*. (Bishop, M. J & Rawlings, C. J. eds). pp. 323-358. IRL Press. Washington, USA.
- Dalgarno, L., Trent, D. W., Strauss, J. H. & Rice, C. M. (1986). Partial nucleotide sequence of the Murray Valley encephalitis virus genome - Comparison of the encoded polypeptides with yellow fever virus structural and non-structural proteins. *J. Mol. Biol.* 187, 309-323.
- de Vos, A. M., Utsch, M. H., Kelley, R. F., Padmanabhan, K., Tulinsky, A., Westbrook, M. L. & Kussiakoff, A. A. (1992). Crystal structure of the kringle 2 domain of tissue plasminogen activator at 2.4-Å resolution. *Biochemistry*, 31, 270-279.
- De Madrid, A. T. and Porterfield, J. S. (1974). The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J. Gen. Virol.* 23, 91-96.
- Despres, P., Freinkel, M. P. & Deubel, V. (1993). Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 196, 209-219
- Deubel, V., Kinney, R. M. & Trent, D. W. (1986). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of Dengue type 2 virus, Jamaica genotype. *Virology*, 155, 365-377.
- Deubel, V., Kinney, R. M. and Trent, D.W. (1988). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica: comparative analysis of the full-length genome. *Virology* 165, 234-244.
- dos Santos, C. N., Post, P. R., Carvalho, R., Ferreira, I. J., Rice, C. M. & Galler, R., (1995). Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res.* 35 (1), 35-41.
- Duangchanda, S., Tanaka, M., Morita, K., Rojanasuphot, S. & Igarashi, A. (1994). Comparative nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope glycoprotein gene among three dengue 2 strains isolated from patients with different disease severities in Malta Sakhom, northeast Thailand. Southeast. *Asian. J. Trop. Med. Public Health.* 25 (2), 243-251.
- Dupuy, A., Despres, P., Caltour, A., Girard, M. and Bouloy, M. (1989). Nucleotide sequence comparison of the genome of two 17D-204 yellow fever vaccines. *Nucleic Acids Res.* 17, 3989-3989.
- Eisner R. (1992). Finding out how a viral hitchhiker snags a ride [news; comment]. *Science* 255: 1647
- Francis, C. W. & Marder, V. J. (1986). Concepts of clot lysis. *Annu. Rev. Med.* 37, 187-204.
- Friezner Degen, S. J., Stuart, L. A., Han, S. and Jamison, C. S. (1991). Characterization of mouse cDNA and gene coding for hepatocyte growth factor-like protein: Expression during development. *Biochemistry*, 30, 9781-
- Fu, J., Tan, B. H., Yap, E. H., Chan, Y. C. & Tan, Y. H. (1992). Full-length cDNA sequence of dengue type 1 virus (Singapore strain S275/90). *Virology* 188, 953-958.
- Fujinaga, M., Gros, P. and van Gunsteren, W. F. (1989). Testing the method of crystallographic refinement using molecular dynamics. *J. Appl. Crystallogr.* 22, 1-8.
- Furie, B. & Furie, B. C. (1986). The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, 53, 505-518.
- Gallager, W. R. (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell*, 50, 327-328.
- Gao, G. F., Hussain, M. H., Reid, H. W. & Gould, E. A. (1993). Classification of a new member of the TBE flavivirus subgroup by its immunological, pathogenetic and molecular characteristics: identification of subgroup-specific pentapeptides. *Virus res.* 30 (2), 129-144.
- Gao, G. F., Hussain, M. H., Reid, H. W. & Gould, E. A. (1994). Identification of naturally occurring monoclonal antibody escape variants of louping ill virus. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 3), 609-614.
- Gao, G. F., Jiang, W. R., Hussain, M. H., Venugopal, K., Gritsin T. S., Reid, H. W. & Gould, E. A. (1993). Sequencing and antigenic studies of a Norwegian virus isolated from encephalomyelitic sheep confirm the existence of louping ill virus outside Great Britain and Ireland. *J. Gen. Virol.* 74, 109-114.
- Gau, G. F., Hussain, M. H., Reid, H. W. & Gould, E. A. (1993). Classification of a new member of the TBE flavivirus subgroup by its immunological, pathogenetic and molecular characteristics: identification of subgroup-specific pentapeptides. *Virus Res.* 30, 129-144.
- GenBank: Easy, unlimited withdrawals, high interest. *NCBI News* 3 (1), 7 (August).
- George, D. G., Barker, W. C., Mewes, H. W., Pfeiffer, F. & Tsugita. (1996). The PIR-International Protein Sequence Database. *Nucleic. Acids Res.* 24, 17-20.
- Greer, J. (1981). Comparative model-building of the mammalian serine proteases. *J. Biol. Mol.* 153, 1027-1042.
- Greer, J. (1985). Protein Structure and Function by comparative Model building. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 439, 44-63.

- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A. & Gould, E. A. (1993). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope glycoprotein of Omsk haemorrhagic fever virus: comparison with other flaviviruses. *J. Gen. Virol.* **74**, 287-
- Gruenberg, A., Woo, W. S., Biedrzycka, A. and Wright, P. J. (1988) Partial Nucleotide Sequence and Deduced Amino Acid Sequence of the Structural Proteins of Dengue Virus Type 2, New Guinea C and PUO-218 Strains. *J. Gen. Virol.* **69**, 1391-1398
- Guirakhoo, F., Heinz, F.X. and Kunz, C. (1989). Epitope model of tick borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain, and conformational changes occurring at acidic pH. *Virology*. **169**, 90-99.
- Hagler, A. T., Maple, J. R., Tacher, T. S., Fitzgerald, G. B. and Dinur, U. (1989). In *Computer Simulation of Biomolecular Systems*. (van Gunsteren, W. F. & Weiner, P. K. eds.) pp 149-167. ESCOM, Leiden.
- Hagler, A. T. (1985) In *The Peptides*. (Udenfriend, S. & Meienhofer, J. eds.) pp 213-299. Vol 7. Academic Press.
- Hahn, Y. S., Galler, R., Hunkapiller, T., Dalrymple, J. M., Strauss, J. H. and Strauss, E. G. (1988). Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses. *Virology*. **162**, 167-180.
- Hall, B. K. (1984). Developmental mechanisms underlying the formation of atavisms. *Biol. Rev.* **59**, 89-124.
- Halstead, S. B. (1988). Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. *Science* **239**, 476-481.
- Hasegawa, H., Yoshida, M., Shiosaka, T., Fujita, S. & Kohayashi, Y. (1992). Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology*. **191**, 158-165.
- Heinz, F. X., Mandl, C., Holzmann, H., Guirakhoo, F., Tuura, W. and Kunz, C. (1990). Antigenic structure and function of the flavivirus envelope protein E. In *New aspects of positive-strand RNA viruses* (M. A. Brinton & F. X. Heinz, eds). pp 294-300. A.S.M. Washington, D.C.
- Higgins, D.G. and Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*. **73**, 237-244.
- Holzmann, H., Heinz, F. X., Mandl, C. W., Guirakhoo, F. & Kunz, C. (1990). A single amino acid substitution in envelope protein E of tick borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *J. Virol.* **64** (10), 5156-5159.
- Hoover, G. J., Menhart, N., Martin, A., Warder, S. & Castellino F.J. The amino acids of the recombinant kringle 1 domain of human plasminogen that stabilize its interaction with ω -amino acids. *Biochemistry*. **32**, 10936-10943.
- Ikeo, K., Takahashi, K. and Gojobori, T. (1991). Evolutionary origin of numerous kringles in human and simian apolipoprotein (a). *FEBS Lett.* **287**, 146-148.
- Irie, K., Mohan, P. M., Sasaguri, Y., Putnak, R. and Padmanabhan, R. (1989). Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). *Gene* **75**, 197-211.
- Johnson, M. S., Srinivasan, N., Sowdhamini, R., Blundell, T. L. (1994). Knowledge-based protein modeling. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29** (1): 1-68.
- Jones, T. A. (1985). Interactive computer graphics FRODO. *Methods Enzymol.* **115**, 157-170.
- Jones, E. Y., Harlos, K., Bottomley, M. J., Robinson, R. C., Driscoll, P. C., Edwards, R. M., Clements, J. M., Dudgeon T. J. & Stuart, D. I. (1995). Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1.8 Å resolution. *Nature* **373**: 539-544
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure pattern recognition of hydrogen-bounded and geometrical features. *Biopolymers*. **22**, 2577-2637.
- Kahn, P. & Cameron, G. (1990). EMBL data library. Methods
- Kaptein, R., Zuiderweg, E. R. P., Scheek, R. M., Boelens, R. and van Gunsteren, W. F. (1985). A protein structure from nuclear magnetic resonance data lac repressor head piece. *J. Mol. Biol.* **182**, 179-182.
- Karplus, M. and McCammon J. A. (1983). Dynamics of proteins: Elements and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 263-300.
- Karplus, M. and McCammon J. A. (1981). *CRC Crit Rev Biochem.* **9**, 293-349.
- Kawano, H., Rostapshov, V., Rosen, L. and Lai, C. J. (1993). Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. *J. Virol.* **67**, 6567-6575.
- Konishi, E., Pincus, S., Fonseca, B. A. L., Stope, R. E., Paoletti, E., & Mason, P. W. (1991). Comparison of protective immunity elicited by recombinant vaccinia viruses that synthesize E or NS1 of Japanese encephalitis virus. *Virology* **185**, 401-410.
- Labuda, M., Jnig, W. R., Kaluzoba, M., Kozuch, O., Nuttall, P. A., Weismann, P., Elickova, E., Zuffova, E. & Gould, E. A. (1994). Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in Ixodes ricinus ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein. *Virus Res.* **31** (3), 305-315.
- Lanciotti, R. S., Gubler, D. J. & Trent, D. W. (1994). Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *Unpublished*
- Lanciotti, R. S., Lewis, J.G. Gubler, D.J. & Trent, D.W. (1994). Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J. Gen. Virol.* **75**, 65-75.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). Procheck: A program to check the stereochemical quality of protein structure coordinates. *Protein.* **12**, 345-364.
- Levitt, M. (1982). Protein conformation, dynamics, and folding by computer simulation. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **11**, 251-271.
- Levy, R. M., Perahia, D. and Karplus, M. (1982). Molecular dynamics of an helical polypeptide: Temperature dependence and deviation from harmonic behavior. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 1346-1350.
- Lewis, J. A., Chang, G. J., Lanciotti, R. S., Kinney, R. M., Mayer, L. W. and Trent, D. W. (1993). Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology* **197**, 216-224.

- Li, X., Smith, R. A. & Dobson, C. M. (1992). Sequential ¹H NMR assignments and secondary structure of the kringle domain from urokinase. *Biochemistry*, **31**, 9562-9571.
- Lipman, D. J. and Pearson, W. R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*, **227**, 1435
- Lohigs, R., Usha, R., Nestorowicz, A., Marshall, I. D., Weir, R. C., & Dalgarno, L. (1990). Host cell selection of Murray Valley Encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. *Virology* **176**, 587-595.
- Luie, B. V., Brownlie, P. D., Lambert, R., Cooper, J. P., Blundell, T. L., Woods, S. P., Warren, M. J., Woodcock, S. C., and Jordan, P. M. (1992). Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. *Nature* **359**, 33-43.
- Luie, B. V. (1993). Porphobilinogen deaminase and its structural similarity to the biotin domain binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 401-410.
- Maggiora, G. M., Mezey, P. G., Mao, B. and Chou, K. C. (1990). A new chiral feature in α -helical domains of protein. *Biopolymers*, **30**, 211-214.
- Mandl, C. W., Iacono-Connors, L., Wallner, G., Holzmann, H., Kunz, C. & Heinz, F. X. (1991). Sequence of the genes encoding the structural proteins of the low-virulence tick-borne flaviviruses langat TP21 and yelantsev. *Virology* **185**, 891-895.
- Mandl, C. W., Holzmann, H., Kunz, C. & Heinz, F. X. (1993). Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses. *Virology*, **194**, 173-184.
- Mandl, C. W., Heinz, F. X., & Kunz, C. (1988). Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses. *Virology* **166**, 197-205
- Mandl, C. W., Heinz, F. X., Stoekli, E. & Kunz, C. (1989). Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of structural proteins with other flaviviruses. *Virology*, **173**, 291-301.
- Mandl, C. W., Iacono-Connor, L., Wallner, G., Holzmann, H., Kunz, C., & Heinz, F. X. (1991). Sequence of the genes encoding the structural proteins of the low-virulence tick-borne flaviviruses langat TP21 and yelantsev. *Virology* **185**, 891-895.
- Markoff, L., Innis, B. L., Houghten, R. y Henchal, L. S. (1991). Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Inf. Dis.* **164**: 294-301.
- Marin, M. S., McKensie, J., Gao, G. F., Reid, H. W., Antoniadis, A. & Gould, E. A. (1995). The virus causing encephalomyelitis in sheep in spain: a new member of the tick-borne encephalitis group. *Res. Vet. Sci.* **58** (1), 11-13.
- Martin, A. C. R., Cheetham, J. C. & Rees, A. R. (1989). Modeling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 9268-9272.
- Mason, P. W., McAda, P. C., Mason, T. L. & Fournier, M. J. (1987). Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology* **161**, 262-267.
- Mcada, P. C., Wason, P. W., Schmaljohn, C. S., Dalrymple, J. M., Mason, T. L. & Fournier, M. J. (1987). Partial nucleotide sequence of the japanese encephalitis virus genome. *Virology* **158**, 348-360.
- Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. and Kitamura, N. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth. *J. Biol. Chem.* **268**, 10024-10028.
- Monath, T. P. (1990). Flaviviruses. In *Virology* (B. N. Fields and D. N. Knipe, eds.), pp. 763-814. Raven Press. New York.
- Monroy, V. & Ruiz, B. H. (1996). The participation of the dengue virus in fibrinolytic process. *J. Inf. Dis.* accepted for publication 5-960666.
- Moore, J., Engelberg, A. y Balroch, A. (1988). Using PC/GENE for protein and nucleic acid analysis. *Biotechniques*, **6**, 566-572.
- Mulichak, A. M., Tulinsky, A. & Ravichandran, K. G. (1991). Crystal and molecular structure of human plasminogen kringle 4 refined at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*, **30**, 10576-10588.
- Myers, E. W. and Millers, W. (1988). Optimal alignments in linear space. *CABIOS* **4**, 11-17.
- Ni, H., Burns, N. J., Chang, G. J., Zhang, M. J., Wills, M. R., Trent, D. W., Sanders, P. G. & Barrett, A. D. (1994). Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequence of the 5' non-coding region and structural protein genes of the wild-type japanese encephalitis virus strain SA14 and its attenuated vaccine derivatives. *J. Gen. Virol.* **75** (Pt 6), 1505-1510
- Ni, H., Chang, G. J., Xie, H., Trent, D. W. & Barrett, A. D. (1995). Molecular basis of attenuation of neovirulence of wild-type japanese encephalitis virus strain SA14. *J. Gen. Virol.* **76** (Pt 2), 409-413.
- Ni, H. & Barrett, A. D. (1995). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the structural protein genes of japanese encephalitis viruses from different geographical locations. *J. Gen. Virol.* **76** (Pt 2), 401-407.
- Nilsson, L., Clore, A. M., Gronenborn, A. M. and Karplus, M. (1986). Structure refinement of oligonucleotides by molecular dynamics with nuclear overhauser effect interproton distance restraints: application to 5fd(C-G-T-A-C-G)₂. *J. Mol. Biol.* **188**, 455-475.
- Nitayaphan, S., Grant, J. A., Chang, G. J. J. & Trent, D. W. (1990). Nucleotide sequence of the virulent SA-14 strain of japanese encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative. *Virology* **177**, 541-552
- Novotny, J., Bruccoleri, R. E. & Karplus, J. (1984). An analysis of incorrectly folded proteins models. Implications for structure predictions. *J. Mol. Biol.* **177**, 787-818.
- Osatomi, K., Fuke, I., Tsuru, D., Shiba, T., Sakaki, Y. & Sumiyoshi, Y. (1988). Nucleotide sequence of Dengue type 3 virus genomic RNA encoding viral structural proteins. *Virus Genes*, **2**, 99-108.

- Osatami, K. & Sumiyoshi, H. (1990). Complete sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology*, **176**, 643-647.
- Paranjpe, S. G. (1994). Thesis.
- Park, C. H., Tulinsky, A. (1986). Three-dimensional structure of the kringle sequence: Structure of prothrombin fragment 1. *Biochemistry*, **25**, 3977.
- Pathy, L. (1985). Evolution of proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*, **41**, 657-633.
- Pletnev, A. G., Bray, M., Huggins, J. & Lai, C.-J. (1992). Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10532-10536.
- Pletnev, A. G., Yamshchikov, V. F. & Blinov, V. M. (1986). Tick-borne encephalitis virus genome - The nucleotide sequence coding for virion structural proteins. *FEBS Lett.* **200**, 317-321.
- Porterfield, J. S. (1980). In *The Togaviruses* (R. W. Schlesinger, ed.), pp. 13-16. Plenum Press, New York.
- Post, C. B., Brooks, B. R., Dobson, C. M., Artymiuk, P., Cheetham, J., Phillips, D. C. and Karplus, M. (1986). Molecular dynamics simulation of native and substrate bound lysozyme. *J. Mol. Biol.* **190**, 455-479.
- Post, C. B., Dobson, C. M. and Karplus, M. (1989). Proteins: Struct. Funct. *Gene*, **5**, 337-354.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. & Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from Tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, **375**, 291-298.
- Rice, C. M., Strauss, E. G. and Strauss, J. H. (1986). Structure of the flavivirus genome. In *The Togaviridae and Flaviviridae* (S. Schlesinger and M. Schlesinger, eds.), pp. 279-326. Plenum Press, New York.
- Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Ship, S. J., Sheets, R. L. & Strauss, J. H. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, **229**, 726-733.
- Richardson, J. S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein. Chem.* **34**, 167-339.
- Rosen, L. (1977). The emperor's new clothes revised or reflection on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **26**, 337-343.
- Ruiz, B. H., Sanchez, I., Ortega, G. J., Lopez, I. and Ortiz-Ortiz, L. (1992). Nucleotide sequence and deduced amino-acid sequence of the structural proteins of Dengue type 2 virus Mexican genotype. *J. Gen. Virol.* *accepted for publication* **12586/96**.
- Ruoslahti, E. (1988). *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 375-413.
- Samuel, S., Koh, C. L., Blok, J., Pang, T. & Lam, S. K. (1989). Nucleotide sequence of the envelope protein gene of a Malaysian dengue-2 virus isolated from a patient with dengue haemorrhagic fever. *Nucleic. Acids. Res.* **17**, 8875.
- Samuel, S., Koh, C. L., Blok, J., Pang, T. & Lam, S. K. (1989). Nucleotide sequence of envelope protein gene of a Malaysian dengue-2 virus isolated from a patient with dengue fever. *Nucleic. Acids Res.* **17**, 8887.
- Samuel, S., Koh, C. L., Blok, J., Pang T. & Lam, S. K. (1989). Nucleotide sequence of the envelope protein gene of a Malaysian dengue-2 virus isolated from a patient with dengue shock syndrome. *Nucleic. Acids Res.* **17**, 8888.
- Seshadri, T. P., Tulinsky, A., Skrzypczak-Jankun, E. & Park, C. H. (1991). Structure of bovine prothrombin fragment I refined at 2.25 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **220**, 481-94.
- Shekin, P. S., Yarmush, D. L., Fine, R. M., Wang, H. & Levinthal, C. (1987). Prediction antibody hypervariable loop conformation. I. Ensembles of random conformations for ringlike structures. *Biopolymers*, **26**, 2053-2085.
- Shiu, S. Y. W., Jiang, W. R., Porterfield, J. S. & Gould, E. A. (1992). Envelope protein sequences of dengue virus isolates TH-36 and TH-Sman, and identification of a type-specific genetic marker for dengue and tick-borne flaviviruses. *J. Gen. Virol.* **73**, 207-212.
- Shiu, S. Y. W. (1993). Data Submission:
- Shiu, S. Y., Ayres, M. D. & Gould, E. A. (1991). Genomic sequence of the structural proteins of louping ill virus: comparative analysis with tick-borne encephalitis virus. *Virology*, **180**, 411-415.
- Stephen A. F., Gish, W., Miller W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-10.
- Stillinger, F. H. and Rahman, A. (1974). Improved simulation of liquid water by molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **60**, 1545-1557.
- Sumiyoshi, H., Morita, K., Mori, C., Fuke, I., Shiba, T., Sakaki, Y. & Igarashi, A. (1986). Sequence of 3000 nucleotides at the 5' end of Japanese encephalitis virus RNA. *Gene* **48**, 195-201.
- Sutcliffe, M. J., Haneef, I., Carney, D. & Blundell, T. L. (1987). *Protein Eng.* **1**, 377-384.
- Thornton, J. M. & Gardner, S. (1989). Protein motifs and data-base searching. *TIBS*, **14**, 300-304.
- Tramontano, A., Chothia, C. & Lesk, A. M. (1989). Structural determinants of conformations of medium-sized loops in proteins. *Proteins*, **6**, 382-394.
- Trent, D. W., Kinney, R. M., Johnson, B. J. B., Vorndam, A. V., Grant, J. A., Deubel V., Rice, C. M. & Hahn, C. (1987). Partial nucleotide sequence of St Louis encephalitis virus RNA: structural proteins NS1, NS2a and NS2b. *Virology*, **156**, 293-304.
- Tulinsky, A., Park, C. H., Krzypczak-Jankun, E. S. (1988). Structure of prothrombin fragment I refined at 2-2.8 angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* **202**, 885.
- Venugopal, K., Buckley, A., Reid, H. W. & Gould, E. A. (1992). Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein of negeshi virus shows very close homology to louping ill virus. *Virology* **190**, 515-521

- Venugopal, K., Gritsun, T., Lashkevich, V. A. & Gould, E. A. (1994). Analysis of the structural gene sequence shows Kyasanur forest disease virus as a distinct member in the tick-borne encephalitis virus serocomplex. *J. Gen. Virol.* **75**, 227-232.
- Voet, D. & Voet, J. G. (1992). La coagulación de la sangre. En *Bioquímica*. pp 1174-1183. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España.
- Wang, E., Ryman, K. D., Jennings, A. D., Wood, D. J., Taffs, F., Minor, P. D., Sanders, P. G. & Barrett, A. D. (1995). Comparison of the genomes of the wild-type french viscerotropic strain of yellow fever virus with vaccine derivative french neurotropic vaccine. Unpublished
- Warthon, S. A., Martin, S. R., Ruigrok, W. H., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (1988). Membrane fusion by peptide analogs of influenza virus hemagglutinin. *J. Gen. Virol.* **69**, 1847-1857.
- Wengler, G., Castle, E., Leidner, U., Nowak, T. & Wengler, G. (1985). Sequence analysis of the protein V3 of the flavivirus West Nile virus of its gene. *Virology*, **147**, 264-274.
- Westaway, E.G., Brinton, M.A., Gaidamovich, S., Horzinek, M.C., Igarashi, A., Kaarainen, L., Lvov, D. K., Porterfield, J. S., Russell, P. K. and Trent, D. W. (1985). Flaviviridae. *Intervirology* **24**, 183-192.
- Whitby, J. E., Whitby, S. N., Jennings, A. D. & Barrett, A. D. T. (1992). Sequence of the envelope protein of the tick-borne flavivirus, turkish tick-borne encephalitis. *J. Gen. Virol.* in press.
- White, J., Helenius, A. & Gething, M. J. (1982). Haemagglutinin of influenza virus expressed from a cloned gene promotes membrane fusion. *Nature* **300**: 658-659.
- Yamshchikov, V. & Pletnev, A. G. (1988). Nucleotide sequence of the genome region encoding the structural proteins and the NS1 protein of the tick borne encephalitis virus. *Nucleic Acids. Res.* **16**, 7750-7750.
- Yang, P. Y., Kautner, I. M., Koh, C. L. & Lam, S. K. (1994). Nucleotide and deduced amino acid sequences of genes encoding the structural and nonstructural NS1 proteins of a dengue-2 virus isolated in china. *Virus genes.* **8**, 71-74.
- Zhao, B., Mackow, E., Buckler-White, A., Markoff, L., Chancock, R. M., Lai, C. J. & Makino, Y. (1986). Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequences: analysis genes coding for structural proteins. *Virology*. **155**, 77-88.