UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARCOS MICHEL DE SOUZA

Expressão, purificação e caracterização do *Leishmania* RNA Virus 1-4 e
da proteína U5-15k do *Trypanosoma brucei*

São Carlos
2012

MARCOS MICHEL DE SOUZA

Expressão, purificação e caracterização do *Leishmania* RNA Virus 1-4 e
da proteína U5-15k do *Trypanosoma brucei*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Marcos Michel

Expressão, purificação e caracterização do
Leishmania RNA Virus 1-4 e da proteína U5-15k do
Tripanosoma brucei / Marcos Michel Souza; orientador
Otavio Henrique Thiemann - versão corrigida -- São
Carlos, 2012.
144 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Leishmania RNA Virus 1-4. 2. U5-15k
Tripanosoma brucei. 3. Expressão de proteínas. I.
Thiemann, Otavio Henrique, orient. II. Título.

Aos meus pais, João e Valdelourdes, que com seu amor incondicional sempre me ajudaram e motivaram.

AGRADECIMENTOS

Muito embora eu entenda que uma universidade pública deva ser laica, assim como o trabalho científico, gostaria de agradecer somente a Deus.

Não quero aqui fazer nenhum tipo de proselitismo religioso, muito longe disso.

Muito embora eu tenha minha fé e não me envergonhe dela (sou cristão protestante) não tenho nenhum interesse em fazer propaganda religiosa, até porque muitas vezes eu não sou muito bem visto entre os cristãos pelo fato de ser a favor de pesquisas com células tronco embrionárias, contra o criacionismo científico, a favor da ordenação feminina ao sacerdócio e a favor do casamento entre pessoas do mesmo sexo. Apenas gostaria de manifestar meus agradecimentos com liberdade de expressão, me perdoem aqueles que se sentirem ofendidos pela minha liberdade de pensamento aqui expressa.

Tenho que dar graças a Deus pela vida do meu Orientador Professor Doutor Otávio Henrique Thiemann, por toda sua ajuda em meu trabalho. Assim como pelos meus pais João Aparecido Imiane e Valdelourdes Rodrigues Imiane e minha família que me deu todo apoio. Dentre os familiares não posso deixar de citar minhas irmãs Liliane Aparecida Imiane Falcochio e Eliane Maria Imiane Ramos, meu irmão José Francisco Imiane, meu cunhado Marcos Falcochio, minha cunhada Ivanilce Ivone Rodrigues Imiane e meus sobrinhos Lincoln Falcochio, Higor Falcochio, Cinthia Imiane Falcochio, Nandra Imiane Ramos e Lorenza Imiane Ramos.

Não posso deixar de agradecer a Deus também aos meus amigos queridos: Daiana E. Martil, Livia R. Manzine, Maria Auxiliadora A. Santos, Kelvin Ulisses, Susana Sculácio, Flávio Rosseto, Heline Hélen, Larissa Romanelo, Gustavo Mercaldi, Fernando Alessandro.

Também dou graças por aqueles que me ajudaram em meu trabalho: Marco Túlio A. Silva, Ana Laura Lima, Marcus Vinicius G. da Silva, Professor Doutor Eurico Arruda Neto, Professora Doutora Angela K. Cruz, Fernanda Cristina Costa, Doutor Jéferson Bettini, Doutor Rodrigo Portugal, Professora Doutora Cláudia Munte.

Fico agradecido por Deus ter me dado queridos colegas de trabalho que muito provavelmente posso não estar lembrando todos: Izaltina, Maria Amélia, Livia Faim, Renata Alves, Malú Voltatódio, Ivan Rosa e Silva, Caio Vinícios, Jaqueline Evangelista, Tereza de Jesus, Heline Helen, Fernanda Batista, Vitor Hugo Serrão.

Devo lembrar-me de agradecer sempre a Deus pelas pessoas que faziam meu dia a dia mais feliz e animado no laboratório: Humberto D'Muniz, Renata Andrincopulo, Wanessa

Altei, Mariana Laureano, Ivani Paulini, Simone Michelin, Bela Sales, César Moisés Camilo,
Lis Mito.

Muito obrigado Deus por ter tantas pessoas queridas por perto durante meu doutorado.

"Nothing in the world is more dangerous than sincere ignorance and conscientious stupidity."

“Almost always, the creative dedicated minority has made the world better.”

Martin Luther King Jr

RESUMO

SOUZA, M.M. **Expressão, purificação e caracterização do *Leishmania* RNA Virus 1-4 e da proteína U5-15k do *Trypanosoma brucei***. 2012. 144 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

O estudo dos protozoários é importante por diversos motivos, entre eles sua diversidade, sua importância evolucionária e impacto na saúde pública. Muitos aspectos tornam o estudo desses seres vivos ainda mais fascinantes, como por exemplo, fenômenos como o *trans-splicing* e a presença de um vírus em algumas espécies de leishmanias. A proteína U5-15k é considerada de grande importância fazendo parte do *spliciossoma*. Neste trabalho tivemos o objetivo de iniciar a caracterização desta proteína empregando ferramentas de bioinformática para analisar sua sequência de aminoácidos, sua estrutura secundária e modelar sua estrutura por homologia, também foi possível otimizar sua expressão, purificação, caracterizar sua autoclivagem e fazer estudos biofísicos de Espalhamento Dinâmico de Luz e Espectroscopia de Dicroísmo Circular. O *Leishmania* RNA vírus 1-4 (LRV1-4) é um vírus da família Totiviridae de capsídeo icosaédrico que codifica duas proteínas (proteína capsidial e RNA polimerase). Sendo pouco estudado tivemos o objetivo de iniciar a caracterização molecular deste vírus com objetivos futuros de empreender estudos estruturais e funcionais. Não foi possível obter expressão recombinante em nenhuma das duas proteínas virais, por isso se optou por se estabelecer um novo protocolo de lise celular e purificação com o qual se obteve imagens inéditas de Microscopia Eletrônica de Varredura, na qual o vírus é purificado ainda envolto em material genético.

Palavras-chave: *Leishmania* RNA vírus 1-4. U5-15k *Trypanosoma brucei*. Expressão de proteínas.

ABSTRACT

SOUZA, M.M. **Expression, purification and characterization of *Leishmania* RNA Virus 1-4 and U5-15k protein of *Trypanosoma brucei*** inglês. 2012. 144 p. Tese de Doutorado em Ciências - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The study of protozoa is important for several reasons, including their diversity, their evolutionary importance and public health impact. Many aspects make the protozoa's study even more exciting, for example, phenomena such as trans-splicing and the presence of virus in some species of *Leishmania*. The U5-15k protein is considered of great importance as part of the spliciosome machinery. In this work we intended to characterize this protein, this using bioinformatics tools to analyze its amino acid sequence, its secondary structure and its structure by homology modeling, it was possible to optimize expression, purification, characterization and make biophysical studies of their self cleavage of Dynamic Light Scattering and Spectroscopy of Circular Dichroism. The *Leishmania* RNA virus 1-4 (LRV1-4) is a virus belonging to the Totiviridae family with an icosahedral capsid structure that encodes two proteins (a capsid major protein and an RNA polymerase). It was not possible to obtain the recombinant expression of any of the two viral proteins, so it was decided to establish a new protocol for cell lysis and purification with which it was obtained unprecedented images of Transmission electron microscopy, in which the virus is further purified wrap on genetic material.

Keywords: *Leishmania* RNA virus 1-4. U5-15k *Trypanosoma brucei*. Protein Expression

SUMÁRIO

Capítulo 1: INTRODUÇÃO	19
Capítulo 2 PROTEÍNA U5-15K DO <i>T. brucei</i>	23
2.1 Introdução	23
2.2 Objetivos	34
2.3 Materiais e Métodos	35
2.4 Resultados e Discussão	49
2.5 Conclusões	80
2.6 Perspectivas	82
Capítulo 3 <i>Leishmania</i> RNA VÍRUS	83
3.1 Introdução	83
3.2 Objetivos	90
3.3 Materiais e Métodos	91
3.4 Resultados e Discussão	107
3.5 Conclusões	125
3.6 Perspectivas	126
REFERÊNCIAS	127
APÊNDICES	135
APÊNDICE A - Artigo no formato de “ <i>short communication</i> ” a ser submetido	135
APÊNDICE B - Texto de Despedida	143

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

Estrutura da Tese

Esta tese está dividida em três capítulos, este capítulo inicial trata a respeito de uma introdução geral ao estudo de protozoários.

Nos dois capítulos seguintes são apresentados os projetos de pesquisa dessa tese: no Capítulo 1 a proteína U5-15k do *Trypanosoma brucei* e no Capítulo 2 o *Leishmania* RNA vírus 1-4. Ambos contendo introdução, materiais e métodos, resultados e discussões e conclusão. Optou-se por se manter os assuntos separados para facilitar a leitura e eventuais consultas.

Por que estudar protozoários?

Muitas são as motivações para o estudo desse tipo de eucarioto, inclusive implicações econômicas e de saúde pública podem ser mencionadas. Um dos motivos a ser destacado para o estudo desses seres vivos é a diversidade dos protistas.

O nível de organização unicelular é a única característica pela qual os protozoários podem ser descritos como um todo. Os Protozoa exibem uma ampla variedade de morfologias, complexidade estrutural e adaptações para todos os tipos de condições ambientais, representam uma grande diversidade filogenética (os protistas representam uma grande parte da diversidade observada no domínio *Eukarya*)¹⁻².

A importância dos protistas não fica restrita somente a sua diversidade. Os estudos desses seres unicelulares tem uma importância fundamental para o entendimento da evolução dos seres vivos eucariotos.

A importância evolucionária dos protozoários pode ser destacada pelo fato de que “a evolução dos protistas é a história da célula eucarionte, e os protistas vivos refletem os diferentes estágios dessa história”¹.

Ainda ressaltando sua importância para a evolução das células eucarióticas, a Figura 1 mostra uma árvore filogenética onde há um destaque para os protozoários do grupo Euglena (grupo do qual pertencem os organismos tratados nessa tese), onde pode ser observada sua origem primitiva quando comparada aos animais, plantas e fungos.

Figura 1 – Árvore filogenética mostrando com destaque o grupo Euglena, grupo do qual fazem parte os organismos tratados nessa tese³.

Outra motivação de grande importância para o estudo dos protozoários são as características únicas de alguns deles, como a presença de organelas e mecanismos

moleculares únicos, podendo ser citada a presença do cinetoplasto, organela típica dos Kinetoplastidae.

Os protistas do grupo euglenozoários incluem os cinetoplastídeos e os euglenídeos. O nome cinetoplastídeo se refere à presença de uma estrutura característica, o cinetoplasto, que consiste de uma massa densa de DNA extranuclear contido dentro da sua mitocôndria única^{2,4}. Dentre os protozoários desse grupo, os tripanosomatídeos, além da sua importância médica, tem versões extremas de várias características não usuais encontradas em cinetoplastídeos, como edição de RNA mitocondrial, geração de mRNA por *trans-splicing*, ou uma complexa estrutura genômica mitocondrial³.

Esta tese trata dos protozoários parasitas *Trypanosoma brucei* e *Leishmania*, ambos cinetoplastídeos.

A Figura 2 mostra uma árvore filogenética dos cinetoplastídeos, onde é possível observar esses protozoários parasitas em questão.

Figura 2 — Árvore filogenética dos cinetoplastídeos onde podem ser observados o *T. brucei* e o as cepas de *Leishmania*, parasitas de interesse desta tese⁵.

Considerada de grande importância econômica e médica, a família *Trypanosomatidae* possui espécies capazes de provocar doenças mutilantes, incapacitantes ou mortais⁷. Podem ser citadas como as parasitoses humanas mais comuns causadas por essa família: Tripanossomíase Africana Humana (também conhecida como doença do sono), causada por infecção por duas subespécies de *Trypanosoma brucei* (*T.b. rhodesiensis* e *T.b. gambiensis*); Leishmanioses Visceral, Cutânea e Mucocutânea, causadas por infecção com diferentes espécies de *Leishmania* e a Doença de Chagas, causada pela infecção com *Trypanosoma cruzi*⁵⁻⁶.

Não bastasse a importância médica, as suas características únicas, sua diversidade e seu papel para entendimento da evolução da célula eucariótica, outro aspecto fascinante dos protistas é sua capacidade de ser hospedeiros de vírus⁷.

Pouco se sabe sobre a interação dos protozoários com os vírus e muito precisa ser estudado ainda, contudo recentemente foi publicada uma importante pesquisa relacionando a presença desses vírus com a resposta do sistema imune do hospedeiro do protozoário, foi observado que a severidade da leishmaniose pode ser afeta pela presença do vírus nas cepas de *Leishmania*⁸.

CAPÍTULO 2 PROTEÍNA U5-15K DO *T. brucei*

2.1 Introdução

2.1.1 O *Trypanosoma brucei*

A tripanosomíase africana, ou doença do sono, é causada por *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, subespécies relacionadas ao *Trypanosoma brucei brucei*, sendo esta espécie encontrada em animais domésticos⁵⁻⁶.

Tripanossomíase humana africana, ou doença do sono, é uma das mais complexas doenças tropicais endêmicas. Transmitida pela picada da mosca tsé-tsé, a doença ocorre em áreas pobres e rurais da África⁹. A Figura 3 mostra a distribuição de casos de tripanossomíase africana humana (*T. b. gambiense*) na África no ano de 2008 indicando a ampla distribuição geográfica dessa doença ao longo do território africano.

Figura 3 — Distribuição de casos de tripanossomíase africana humana (*T. b. gambiense*) na África no ano de 2008¹⁰.

A importância dos estudos bioquímicos e moleculares do *T. brucei* está no fato de que a eficácia da prevenção de doenças parasitárias depende do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia dos parasitos. Assim sendo, com avanços tecnológicos e do conhecimento científico para melhor entendimento dos principais parasitos humanos, pode ser possível a realização de um planejamento racional de fármacos, enfatizando o mecanismo de ação dos mesmos com intuito de atingir alvos moleculares específicos e essenciais dos parasitas, fazendo assim com que sejam minimizados os efeitos deletérios para o homem⁵. Desta forma trabalhos de pesquisa nessa área de atuação podem contribuir para um melhor conhecimento do parasito e diferenciação de suas proteínas e escolha de possíveis alvos moleculares.

O processamento do mRNA em tripanossomatídeos difere dos mecanismos encontrados na maioria dos eucariotos principalmente porque os genes que codificam proteínas são transcritos em uma longa fita de RNA policistrônico⁵.

Alguns dos eventos moleculares mais interessantes no metabolismo de RNA ocorrem por causa do processamento pós-traducional. Uma molécula de RNA recém-sintetizada, (chamada de pré-mRNA) contém em sua sequência **exons** (regiões codificantes) e **introns** (regiões não codificantes). Em um processo chamado *splincing*, acontece a remoção dos *introns* e os *exons* são unidos para formação do RNA maduro, pronto para ser traduzido^{5,10}.

2.1.2 O processamento de RNA

Durante a transcrição no núcleo o RNA é sintetizado como um precursor (pré-mRNA), onde passa uma série de etapas de processamento antes de ser transportado para o citoplasma para servir como modelo para a biossíntese de proteína, e, eventualmente ser degradado¹¹.

O processamento do mRNA em tripanossomatídeos difere principalmente dos mecanismos encontrados na maioria dos eucariotos porque os genes que codificam proteínas são transcritos em uma longa fita de RNA policistrônico (posteriormente à publicação do genoma completo do *T. brucei* estudos sugerem que o cromossomo todo deve ser transcrito em longos trechos que precisam de posterior metabolismo)⁵.

Esses grandes blocos policistrônicos de genes são transcritos pela RNA polimerase II, após a transcrição, os pré-RNA são ligados a diversas proteínas, como as ribonucleoproteínas

nucleares heterogêneas (hnRNP) ou as proteínas SR (proteínas ricas em serina e arginina). Pré-mRNAs, contendo exons e introns, são submetidos ao tratamento por uma gama de ribonucleoproteínas que formam o spliceossoma¹¹. A Figura 4 ilustra esse processo, desde a transcrição no núcleo até a tradução em proteínas.

A maturação do mRNA envolve três processos bastante estudados; (1) *capping* na terminação 5'; (2) *splicing* e (3) poliadenilação da terminação 3'.

Figura 4 — Atividade das ribonucleoproteínas no processamento do RNA em células eucarióticas¹¹.

2.1.3 O *cis-splicing*

O processamento dos mRNAs em mamíferos, é feito por *cis-splicing*, que ocorre em uma única molécula de pré-mRNA. As proteínas do spliceossomo envolvidas fazem parte de uma grande família na qual estão incluídas as proteínas Sm e Sm-like (LSm); definidas pela presença da região Sm conservada⁵.

O *cis-splicing* ocorre em duas etapas, e em cada passo observa-se uma reação de transesterificação, executada pelo spliceossomo⁵.

A reação tem início com a formação do complexo A, resultado da interação entre as snRNP U1 e U2. São adicionados ao complexo A U4/U6 e U5 como um tri-snRNP, formando o complexo B. Este é ainda um complexo catalítico inativo que requer rearranjos conformacionais e de composição para se tornar biologicamente ativo e facilitar a primeira transesterificação do *splicing*. Assim, através da saída de U1 e U4 snRNP, forma-se um spliceossomo catalítico, o complexo B*, que por sua vez sofre novo rearranjo na sua rede de RNPs e agora o complexo C realiza a segunda transesterificação, que em seguida, é completamente dissociado o mRNA maduro e também U2, U5 e U6 para serem reciclados em uma nova via. Esse processo pode ser visualizado em todas as suas etapas na Figura 5.

Figura 5 — Formação dos complexos envolvidos no *cis-splicing* ¹¹.

Em tripanosomas e leishmanias, os RNAs são processados por um mecanismo não usual denominado *trans-splicing*. As regiões de dois transcritos separados (em lugar de um único pré-mRNA) são unidas de modo que todo o mensageiro maduro inicia com a mesma seqüência (aproximadamente 40 nucleotídeos), denominada *spliced leader*.

2.1.4 O *trans-splicing*

Exceto pela natureza intermolecular, o *trans-splicing* e *cis-splicing* apresentam as mesmas etapas, no primeiro passo da reação ocorre a clivagem no sítio doador do *spliced leader* gerando o éxon 5' do *spliced leader* (5' SL éxon); o remanescente do *spliced leader* liga-se à adenosina do íntron no pré-mRNA aceptor para formar o Y intermediário (correspondente ao *lariat* do *cis-splicing*). Na segunda etapa, a clivagem no sítio 3' e ligação do éxon geram os éxon processados e um Y-íntron excisado⁶.

A principal diferença entre os dois processos é que no *cis-splicing* a reação ocorre em uma única molécula e há formação do *lariat*; e no *trans-splicing*, a reação ocorre em moléculas diferentes e formação do Y intermediário como é ilustrado na Figura 6.

Figura 6 — Diferenças dos processos de *cis-splicing* e *trans-splicing*⁶.

2.1.5 O spliceossoma

O *splicing* de RNA é realizada pelo spliceossoma que consiste de cinco partículas de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) U1, U2, U4, U5, e U6, e de algumas proteínas snRNP. No sistema humano, existem 45 proteínas distintas snRNP spliceossomais, e até 170 proteínas foram consideradas associadas com complexos spliceossomais¹².

O ribossomo e o spliceossomo são as mais elaboradas e fascinantes maquinarias moleculares de ribonucleoproteínas existentes, nelas é particularmente mais evidente a interdependência entre RNA e proteínas para a função catalítica¹¹.

Um importante aspecto do spliceossoma é que os seus componentes de proteínas não desempenham apenas papéis importantes na formação das estruturas de RNA e ribonucleoproteínas, mas também são partes íntimas dos sítios ativos e podem participar diretamente na catálise de *splicing*. Este grau de cooperação sem precedentes entre RNA e proteínas faz do spliceossoma um paradigma¹¹.

As ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) U1, U2, U4, U5, e U6, desempenham diversos papéis no reconhecimento do íntron e definição do sítio de *splicing*, além de estarem intimamente envolvidas na catálise spliceosomal. Acredita-se que três das cinco snRNPs (U2, U5 e U6) contribuem funcionalmente durante as duas reações de transesterificações do *splicing*¹³.

2.1.6 A ribonucleoproteína U5

O papel desempenhado por U5 no spliciossoma gradualmente começa a ficar claro com a convergência de dados genéticos e bioquímicos de variados sistemas. Contudo esse papel tem tido dificuldades para ser estudado por causa da perda de informações das reconstruções *in vitro* dos sistemas para U5¹³.

Comparações filogenéticas tem mostrado que U5snRNP carrega uma sequencia invariante de nove nucleotídeos dispostos num *loop* de onze nucleotídeos. Dados bioquímicos mostraram que o loop interage com sequencias do *exon* nos sítios de *splice* 5' e 3'¹³.

Tem sido demonstrado que spliceosomas contendo U5 sem a sequencia do *loop* invariante podem realizar o primeiro passo catalítico de *splicing* eficientemente e com precisão. O segundo passo catalítico, no entanto, é severamente inibido na ausência do *loop*¹³. Isso sugere que as proteínas do U5 podem desempenhar um importante papel na modulação e estabilização dos contatos. A Figura 7 ilustra as interações entre os *exons* e o *loop* da subunidade U5 durante os dois passos catalíticos do *splicing*.

Figura 7 — Interações entre o *loop* da subunidade U5 e os *exons* 3' e 5' no primeiro e segundo passo catalítico do *splicing* ¹³.

2.1.7 Remodelagem das subunidades spliceossomais

Em contraste com as unidades ribossomais, as unidades spliceossomais, em particular o U4/U6 e U5 (tri-snRNP), sofrem massivas remodelagens durante o *splicing*. Após a ativação

de *cis* e *trans-splicing*, o que sugere que a função desta proteína surgiu no início da evolução do processamento de mRNA⁶.

A estrutura da U5-15K humana revelou um enovelamento característico de tioredoxina, caracterizado por quatro fitas betas, compreendendo pares de fita paralelas e antiparalelas flanqueadas por três hélices alfa. Proteínas com esse enovelamento possuem uma incrível diversidade de funções. A U5-15K é a primeira proteína com esse tipo de enovelamento identificada como componente essencial para a maquinaria de *splicing*¹⁴. A Figura 10 apresenta as estruturas da proteína U5-15K humana (a) e a tioredoxina humana (b), deixando clara a grande semelhança estrutural de ambas.

Figura 10 – Estrutura tridimensional da U5-15k humana (a) e estrutura tridimensional da tioredoxina humana (b)¹⁴ mostrando a semelhança estrutural entre ambas.

A proteína U5-15K humana possui 37 resíduos adicionais em comparação com a proteína tioredoxina humana, desses resíduos, 3 deles estão no N-terminal, doze nas outras regiões da proteína e 22 deles estão no C terminal¹⁴⁻¹⁵.

A característica mais proeminente de tioredoxina é o motivo canônico Cys-XX-Cys formando uma ligação dissulfeto funcional no N-terminal da hélice alfa 2. No entanto, na U5-15K humana este motivo é substituído por Asp-XX-Cys. Surpreendentemente, o segundo resíduo de cisteína conservado, Cys38, ainda está envolvido numa ligação dissulfeto, mas com Cys79 no N-terminal de fita beta 3¹⁴.

Uma vez que esta nova ligação dissulfeto, que nunca foi observada em qualquer proteína com enovelamento de tioredoxina até agora, e ocorre em um local semelhante com a ligação dissulfeto da tioredoxina, considerou-se se U5-15kD poderia atuar como um isomerase dissulfeto e catalisar uma mudança conformacional no spliceosomo¹⁴⁻¹⁵.

A U5-15K humana é uma peptidase e tem função de autoclivagem em uma região próxima do C terminal. A proteína purificada pode ser clivada *in vitro* entre os resíduos Glicina 128 e Leucina 129, deixando o núcleo estrutural característico das tioredoxinas¹⁶. A função peptidase da proteína humana pode ser inibida com EDTA, chimioestatina e ácido 6-aminohexanoico¹⁶.

Comparações entre a proteína U5-15k humana clivada e a não clivada usando Ressonância Magnética Nuclear e Espectroscopia de Dicroísmo Circular, indicam que os 14 resíduos do C terminal podem sofrer uma transição de desenovelamento local e assumir conformações alternativas, que parecem desempenhar um papel funcional¹⁴.

2.2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo bioquímico e estrutural da enzima U5-15K de *Trypanosoma brucei*. Os objetivos específicos desse trabalho são:

- Otimizar a expressão e purificação da U5-15K de *Trypanosoma brucei* com objetivo de obter proteína solúvel.
- Estudos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para informações sobre a estrutura quaternária e se há variação nela após a autoclivagem.
- Utilizar a técnica de Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) para verificar possíveis variações na estabilidade térmica da proteína antes e após a autoclivagem.
- Fazer estudos de Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS) da proteína clivada e não clivada para comparações estruturais.
- Realizar rastreamento de condições de cristalização.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Análise da proteína por meio de ferramentas de bioinformática

Torna-se cada vez mais útil, e por vezes até quase indispensável, ter como guia uma predição teórica de suas propriedades da proteína antes de se iniciar um trabalho experimental, essa predição teórica pode ser extremamente útil na investigação funcional da proteína e antever eventuais problemas experimentais.

Uma vez conhecida a sequência de aminoácidos de uma dada proteína é possível que sejam feitas previsões estruturais (seja sobre a estrutura secundária, terciária ou quaternária, modificações pós-tradicionais e até mesmo possíveis interações com outras proteínas)¹⁷.

Análise da sequência de aminoácidos

A análise teórica dos parâmetros físico-químicos da proteína U5-15K de *T. brucei* foi feita no servidor ExPASy através da ferramenta PROTPARAM¹⁸, essa ferramenta permite o cálculo de vários parâmetros físicos e químicos para uma dada proteína. Através dela podem ser calculados o peso molecular, o ponto isoelétrico teórico, composição de aminoácidos, coeficiente de extinção entre outros parâmetros.

Uma superfamília é um conjunto de modelos de domínio conservado que geram anotação sobreposta nas sequências de mesmas proteínas. Estes modelos são assumidos para representar domínios evolutivamente relacionados e que podem ser redundantes um com o outro¹⁹.

Para identificação da superfamília e identificar a conservação dos aminoácidos importantes para manutenção da estrutura e função da proteína foi utilizada a Base de Dados de Domínios Conservados, cuja sigla em inglês é CDD²⁰. Para análise dos domínios também foi utilizado o servidor SMART²¹. Com essas ferramentas é possível se obter informações

sobre domínios de proteína e aminoácidos conservados utilizando somente a sequência de aminoácidos da proteína.

Por meio do servidor *ClustalW* foi gerado um alinhamento múltiplo com sequências homólogas²², e para a predição da estrutura secundária fez-se uso do programa *Jpred 3*²³. *Jpred* é um servidor web que toma uma sequência de proteína e, prevê a estrutura secundária usando uma rede neural chamado *Jnet*. A previsão é a definição de cada resíduo de aminoácido em qualquer estrutura secundárias de hélice alfa ('H'), folha beta ('E') ou *random coil* ('-')²⁴.

Modelagem molecular por homologia

Sabe-se que a função biológica de uma proteína está diretamente relacionada com sua estrutura, tornando assim o estudo estrutural extremamente importante em biologia molecular, diversas técnicas podem ser empregadas para se obter informações estruturais de uma proteína. Dentre as técnicas mais utilizadas e com maior poder de resolução podem ser citadas a Ressonância Magnética Nuclear e a Cristalografia. Contudo, existe uma grande limitação experimental para essas técnicas, desta maneira torna-se de suma importância métodos computacionais para predição da estrutura tridimensional das proteínas¹⁷.

Menos de 15% das proteínas depositadas no banco de dados de proteínas (PDB – sigla em inglês para *Protein Data Bank*) nos últimos anos apresentam um tipo de enovelamento novo. Evidencia-se ainda que a estrutura tridimensional de proteínas é mais conservada evolutivamente do que a sequência de aminoácido²⁵.

No caso da Modelagem Comparativa ou Modelagem por Homologia, a construção do modelo tridimensional para a proteína alvo se inicia com a busca de sequências homólogas à proteína em estudo em banco de dados de sequências de aminoácidos de proteínas cuja estrutura já está resolvida¹⁷, foi utilizada a ferramenta *BLASTp* do servidor *BLAST* para realização dessa etapa²⁶.

A proteína usada para servir como modelo para a estrutura foi a proteína homóloga humana, cuja estrutura foi resolvida por cristalografia e tem código de acesso no PDB é 1QGV.

A construção do modelo foi feita através do servidor SWISS-MODEL²⁷, se trata de uma ferramenta onde os modelos são calculados usando um canal de modelagem por homologia totalmente automatizado.

A modelagem por homologia tipicamente consiste nas seguintes etapas: seleção de um modelo adequado, alinhamento da sequência alvo e estrutura modelo, construção do modelo, minimização de energia e/ou aperfeiçoamento e avaliação da qualidade do modelo. Isso exige um conjunto de ferramentas com *software's* especializados e avançados, a versão mais recente do SWISS-MODEL (versão 8.9) integra estes passos em um fluxo de trabalho totalmente automatizado, combinando os programas necessários²⁷.

A avaliação dos modelos gerados foi feita através do servidor SAVES²⁸. Os modelos de estrutura terciária gerados foram visualizados e analisados utilizando os programas *PYMO*L (DeLano Scientific LLC).

2.3.2 Experimentos iniciais

Obtenção dos plasmídeos

Os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Doutor Marco Túlio Alves da Silva, que os obteve durante seu doutorado intitulado: “Identificação e Caracterização Funcional de Proteínas Específicas do Complexo U5 snRNP em Tripanosomatídeos” no instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” sob a orientação da Professora Doutora Regina Maria Barretto Cicarelli⁹. Durante o desenvolvimento de sua tese, ele clonou o gene da proteína U5-15K de *T. brucei* no plasmídeo pET28a, utilizando oligonucleotídeos construídos para que a clonagem no vetor fosse feita utilizando os sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Xho*I.

Transformação dos plasmídeos em células *E. coli* competentes

A transformação foi feita em células de *E. coli* BL21 pLys preparadas de acordo com o protocolo estabelecido²⁹⁻³⁰. As células passaram pelo protocolo de transformação por

choque térmico: as células previamente descongeladas permaneceram no gelo por 30 minutos na presença do DNA plasmidial de interesse, sendo submetidas em seguida a um choque térmico de 42 °C por um minuto, após foi adicionado 250 µL de meio de cultura Luria-Bertani - LB (1 g de Triptona, 0,5 g de Extrato de Levedura, 1 g de NaCl em 100 mL de água, pH 7,5 ajustado com NaOH 5M), as células permaneceram em agitação por 1 hora a 150 rpm e temperatura de 37 °C, decorrido esse tempo, foram separados volumes de 100 e 200 µL para serem plaqueadas em placas petri contendo meio LB sólido com 30 µg/mL de kanamicina (antibiótico adequado para seleção do plasmídeo pET28a).

Após incubação *overnight* foi observado o aparecimento de diversas colônias, cinco delas foram selecionadas e inoculadas com 5 mL de meio de cultura LB contendo 30 µg/mL de kanamicina a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 14 horas, a partir destes cinco inóculos foram feitos estoques com 20% de glicerol que foram armazenados em 80 °C negativos.

Testes iniciais de expressão

Células de *E. coli*, BL21(pLys), transformadas com o plasmídeo codificante para a U5-15K de *T. brucei*, foram inoculadas em 250 mL de meio de cultura 2XYT (1,6 g de Triptona, 1 g de Extrato de Levedura 5 g de NaCl em 100 mL de água, pH 7,5 ajustado com NaOH 5M) contendo o antibiótico kanamicina (30 µg / mL), para a seleção.

Inicialmente foram feitos testes com dois inóculos, que tiveram sua densidade ótica monitorada no comprimento de luz de 600 nm, ao atingirem a densidade ótica de 0,6 foram induzidas com 0,1 e 1 mM de IPTG, os testes iniciais foram a temperatura de 37 °C e sob agitação de 250 rpm.

Durante a expressão, foram separadas alíquotas da cultura antes da indução e cada trinta minutos após a indução. Essas alíquotas foram analisadas em SDS-PAGE 15%. O gel foi corado com 0.01% de *Comassie brilliant blue* e descorado com ácido acético 10%.

Lise celular e testes com diferentes tampões de lise

Depois de estabelecida a condição inicial para expressão, foram feitos experimentos visando estabelecer o melhor tampão para lise celular. Para isso foi utilizado 1,5 L de cultura de células, crescidas em meio 2XYT, 37 °C, agitação de 250rpm, induzidas na densidade ótica de 600nm com 1mM de IPTG, tempo de crescimento após a indução de 2 horas. Essas células foram alicotadas em seis frações de 200 mL que foram centrifugadas a 12000 rpm por 20 minutos e ressuspensas em 10 mL de sete diferentes tampões.

Todos estes tampões tinham 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, neles se variou a concentração salina (150 e 500 mM de NaCl), e se adicionou 0,1 M de Arginina, ou 500 M de Glicina ou 0,1 % do detergente Triton X-100, (cada um dos tampões são mostrados na sessão de resultados e discussões).

Esse procedimento foi feito para que fossem verificadas quais as condições ótimas para a maior solubilidade e estabilidade da proteína. Uma vez ressuspensos nos seis diferentes tampões, as amostras foram submetidas à ultrassonicação por 10 ciclos, no equipamento 550 *Sonic Dismembrator* (Fisher Scientific). Cada ciclo corresponde a uma sonicação de 1 minuto com intervalo de 30 segundos em gelo. As células lisadas foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 g a 4°C, de modo a separar a fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado). A seguir novamente, foram separadas alíquotas de cada etapa, que foram analisadas por SDS-PAGE 15%. O gel foi corado com 0.010% de *Comassie brilliant blue* e descorado com ácido acético 10%.

Purificação por cromatografia de afinidade

Porath e colaboradores, em 1975 apresentaram uma técnica de purificação de proteínas baseada na afinidade por metais de transição. Esta técnica foi denominada, *Immobilized Metal Affinity Chromatography* - IMAC (cromatografia de afinidade com metal imobilizado)⁵.

O princípio fundamental desta técnica consiste na interação entre as proteínas e os íons metálicos imobilizados num suporte sólido. Estes suportes contendo íons de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+} são usados para o fracionamento de proteínas com base no seu conteúdo relativo de resíduos de histidina, cisteína, cadeias laterais aromáticas de aminoácidos que irão coordenar com o resíduo de histidina que se liga ao metal quelado com grande afinidade⁵.

O fato da proteína U5-15K estar clonada no vetor de expressão pET28a(+) (*Novagen*), leva à expressão de uma proteína em fusão com uma cauda C-terminal de seis histidinas, o que torna possível a utilização da técnica de cromatografia por afinidade a um íon Co^{2+} imobilizado (ver Figura 11). Assim, em pH 8,0, ou próximo, que corresponde à condição experimental, ocorre a interação reversível entre resíduos do aminoácido histidina da cadeia polipeptídica e o íon metálico Co^{2+} imobilizado em coluna TALON™ *Metal Affinity Resin* (BD Biosciences), sendo possível separar a proteína recombinante em solução¹⁷.

Figura 11 – Purificação por afinidade a metal imobilizado, a direita o quelante sefarose com os íons de cobalto a esquerda a proteína enovelada com a cauda de histidina. Adaptado do manual da coluna TALON™ *Metal Affinity Resin*¹⁷

Para eluir a proteína da coluna usa-se um competidor do sítio de ligação com o metal, no caso o imidazol, que em alta concentração irá retirar dos sítios todas as proteínas neles ligadas⁵.

Neste caso, especificamente, a coluna foi empacotada com 2 mL de resina de cobalto, foi previamente lavada com água milli-Q e, em seguida, equilibrada com 10 mL de tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl.

Para um primeiro teste de purificação, foi feita uma cultura 1 L de células em meio 2XYT, crescimento e lise feitos como descrito na sessão anterior.

O sobrenadante (50 mL) proveniente da lise celular de cultura bacteriana descrita foi aplicado à coluna. Em seguida, fez-se uma lavagem com 5 mL (equivalente a 2,5 volumes de coluna) do mesmo tampão que a coluna foi equilibrada. Foram feitas em seguida lavagens sucessivas com 5 mL do mesmo tampão adicionado de quantidades crescentes de Imidazol (10, 25, 50 75 100, 150, 250 e 500 mM de Imidazol), para retirada das proteínas que não se ligaram à resina e padronização do ponto de eluição da proteína.

Para o segundo teste de purificação, foi feita uma cultura 1 L de células em meio 2XYT, exatamente igual como na sessão anterior, porém após a indução as células foram deixadas a 20 °C durante 14 horas (*overnight*).

O sobrenadante (50 mL) proveniente da lise celular de cultura bacteriana descrita foi aplicado à coluna. Em seguida, fez-se uma lavagem com 30 mL do mesmo tampão que a coluna foi equilibrada. Foram feitas duas outras lavagens com 30 mL deste mesmo tampão contendo respectivamente 10 e 15 mM de Imidazol para retirada das proteínas que não se ligaram à resina, a eluição da proteína foi feita com 5 mL do tampão adicionado com 100 mM de Imidazol.

Purificação por cromatografia de exclusão molecular

Espera-se que nessa etapa de purificação as moléculas sejam separadas de acordo com as diferenças em seus tamanhos e nas suas formas moleculares. A coluna de purificação de exclusão molecular tem uma matriz feita de um polímero com poros de tamanhos próprios para que proteínas de menor massa penetrem nos seus poros e migrem de maneira mais lenta, enquanto as proteínas de maior massa molecular possam migrar mais rapidamente, já que tenderiam a passar direto pela matriz sem penetrar nos poros da resina¹⁷.

Foi utilizada uma coluna Superdex 75 HR 10/300 (GE) acoplada ao sistema de cromatografia AKTA Explorer10 (GE) nesta etapa de purificação. A amostra de proteína purificada por cromatografia de afinidade, foi aplicada na coluna previamente equilibrada com tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl. O fluxo de corrida foi de 0,5 mL / min e o andamento da purificação foi monitorado a 280 nm por espectrofotometria. As frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

Caracterização da clivagem

Assim que foi estabelecida a purificação, verificou-se após algumas horas de incubação que a proteína passava a apresentar não uma banda única no SDS-PAGE, mas duas, o que poderia indicar a presença de clivagem proteolítica.

A proteína para esse experimento foi obtida de acordo com o protocolo de expressão descrito na sessão anterior e purificada por cromatografia de afinidade.

O primeiro teste de clivagem foi feito a 37 °C (temperatura utilizada nos testes de clivagem da enzima homóloga humana¹⁶) foi utilizado 0,6 mg de proteína, para cada uma das condições a serem analisadas.

As condições foram: (1) amostra controle, (2) amostra com 61 mM do inibidor EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), (3) com o inibidor PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*), (4) com o inibidor ácido 6-aminohexanoico e (5) com o inibidor chimioestatina. O monitoramento da atividade proteolítica era feito através de da coleta de frações de 50 µL das amostras a cada doze horas.

O segundo e o terceiro testes de clivagem ocorreram exatamente como o anterior porém, com as temperaturas de 8 e 25 °C, onde foram analisadas as seguintes condições: (1) amostra controle, (2) com o inibidor PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*), (3) com o inibidor ácido 6-aminohexanoico e (4) com o inibidor chimioestatina.

Um quarto teste também foi realizado com a mesma quantidade de proteína desta vez passando também pela etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular. Neste teste de clivagem foi utilizada a temperatura de 25 °C com as seguintes condições: (1) amostra controle, (2) amostra com 61 mM do inibidor EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), (3) com o inibidor PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*), (4) com o inibidor ácido 6-aminohexanoico e (5) com o inibidor chimioestatina.

Western Blotting

A técnica de “*Imunoblotting*” (frequentemente nomeada de *Western Blotting*) foi utilizada com o anticorpo monoclonal para a cauda de histidina. Esta é uma técnica utilizada para identificar antígenos específicos reconhecidos por anticorpos mono ou policlonais. Amostras de proteínas são solubilizadas, usualmente com SDS e reduzidas por agentes redutores como o Dithiothreitol (DTT) ou β-mercaptoetanol. O material é separado por SDS-PAGE e os antígenos são transferidos por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose, sendo o processo monitorado pela coloração da membrana com solução Ponceau S⁵.

As proteínas transferidas ficam ligadas à superfície da membrana, fornecendo assim fácil acesso para a reação com reagentes imunodetectores. Os sítios de ligações que não específicos, são bloqueados deixando a membrana imersa em uma solução diluída de uma proteína – tipicamente albumina de soro bovino (BSA) ou leite seco desnatado, com uma pequena quantidade de detergente (como Tween 20). As proteínas imobilizadas reagem com o anticorpo da proteína de interesse (anticorpo primário), em seguida a membrana é lavada e o complexo antígeno-anticorpo reage com um anticorpo secundário, neste caso, anti-IgG de camundongo, que será identificado através da enzima peroxidase que reage com peróxido de hidrogênio emitindo luz ou cor⁵.

As proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE) no equipamento “*Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell*” (BioRad) por 1 hora a 40 mA em tampão de transferência (25 mM Tris base (USB); 192 mM glicina (Amresco); 20% metanol (Synth) gelado, montado como segue: 2 camadas de papel de filtro embebido em tampão, membrana embebida em tampão, gel e novamente 2 camadas de filtro. Após transferência, a membrana foi bloqueada com solução 5% de leite desnatado *overnight*⁵.

Em seguida a membrana foi lavada 3 vezes com PBS/Tween-20 (0,1% Tween-20; PBS [1X] q.s.p.) e incubada à 4°C durante 18 h sob leve agitação com anticorpo primário anti *his tag* comercializado pela empresa QIAGEN. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBS/Tween-20 e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (KPL), por 1 hora a 4°C sob leve agitação. A membrana foi lavada 2X com PBS/ Tween-20 e com Tris 0,05M, pH 7,6. A revelação da reação foi realizada primeiramente com *Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit* (BioRad) para a proteína recombinante e depois com o reagente ECL (“*ECLTM Western Blotting Analysis System*”, Amersham Biosciences) em sala escura⁵.

2.3.3 Caracterização biofísica

Uma vez tendo sido concluídas as etapas de otimização da expressão, lise e purificação, foi possível dar início ao estudo da caracterização biofísica da proteína e se fazer análise das possíveis mudanças das características entre a proteína clivada e não clivada.

Para efeito de comparação nas propriedades biofísicas entre a proteína clivada e a não clivada foram realizados experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular, espalhamento de luz a baixo ângulo e espalhamento dinâmico de luz.

Espalhamento de luz a baixo ângulo - SAXS

Neste experimento um feixe monocromático de raios-X incide sobre a amostra de proteínas em solução e os átomos que a compõem interagem com a radiação incidente. Como a energia dos fótons incidentes é bem menor que a de ligação dos elétrons nos átomos, os elétrons se comportam como se estivessem livres. Partículas carregadas livres e oscilantes produzem ondas eletromagnéticas em todas as direções, coerentes com a onda incidente e com o mesmo comprimento de onda, no caso de espalhamento elástico. A intensidade da radiação espalhada depende do ângulo de espalhamento^{17, 31}. A Figura 12 mostra um esquema simplificado de um experimento de SAXS onde se ilustra a incidência e o espalhamento dos raios X, a detecção deles e a construção dos gráficos com os dados obtidos e os modelos construídos com base nesses dados.

Figura 12 — Esquema simplificado de um experimento de SAXS onde se ilustra a incidência e o espalhamento dos raios X, a detecção deles e a construção dos gráficos com os dados obtidos e os modelos construídos com base nesses dados.

A diferença principal entre espalhamento de luz a baixo ângulo e cristalografia de raios-X é devida ao fato da estrutura cristalina apresentar um arranjo periódico nas três dimensões com um grande número de repetições, enquanto que em solução as partículas estão em movimento browniano^{31, 17}.

Em medidas de sistemas monodispersos e polidispersos é possível a determinação da dimensão das proteínas analisadas, bem como do seu raio de giro, que corresponde à distância quadrática média dos elétrons em relação ao centro de massa da molécula, e da sua forma em solução¹⁷. Para as estimativas de massa da proteína U5 15k de *T. brucei* clivada e não clivada foram feitas através do programa SAXS Mow³².

Espalhamento Dinâmico de Luz – DLS

Esta técnica permite a análise das biomoléculas de interesse em solução, onde as moléculas de interesse encontram-se hidratadas e se calcula o raio a partir do coeficiente de difusão, tendo assim uma estimativa do tamanho aparente da partícula com sua camada de solvatação, denominado assim raio hidrodinâmico, R_H , com o qual também é possível se estimar a massa molecular^{33, 17}.

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz é baseada na incidência de luz monocromática em solução de partículas e monitoramento das flutuações da intensidade de luz espalhada com o tempo. Como as partículas estão em movimento em solução, existe uma correlação forte entre o padrão de espalhamento de luz em um dado instante e em um instante muito próximo, da ordem de nano ou microssegundos. A correlação é reduzida comparando-se intervalos de tempo maiores. Como resultado desse experimento é possível um cálculo do raio hidrodinâmico, sendo possível assim uma estimativa de sua densidade considerando-a como esférica, assim pode se estimar o estado oligomérico em solução^{33, 17}.

Para este experimento, pode-se contar o auxílio do Laboratório de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do Instituto de Física de São Carlos que gentilmente no permitiu realizar o experimento no equipamento Zetasizer μV (Malven). Para realização do experimento foram usadas amostras contendo 0,5 mg/mL de proteína recém purificada (portanto não clivada) e a mesma concentração de proteína já clivada (amostra incubada por 3 dias).

Espectroscopia de Dicroísmo Circular – CD

Quase todas as moléculas sintetizadas pelos organismos vivos são opticamente ativas, de fato a atividade ótica é como um elemento sutil da vida. Feixes de luz circularmente polarizada, quando atingem moléculas opticamente ativas, são absorvidos diferentemente. A Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica que tem por base a interação diferenciada de moléculas assimétricas com feixes de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita^{17, 33}. O dicroísmo circular é amplamente utilizado para caracterizar conformações estruturais de proteínas, ácidos nucleicos e sacarídeos, também pode ser usado para o

monitoramento de mudanças conformacionais nas estruturas de tais moléculas induzidas por temperatura, composição do solvente, entre outros³⁰.

O Dicroísmo Circular (CD) pode ser definido como a diferença entre a absorção das componentes circularmente polarizadas à esquerda e à direita^{17, 30}. Essas diferenças de absorções da luz são de enorme utilidade para análise de biomoléculas por gerarem informações importantes a respeito de suas estruturas secundárias através do espectro³⁰.

A atividade ótica de uma macromolécula está intimamente relacionada à sua conformação. Ao longo das estruturas secundárias das proteínas (hélices- α , folhas- β , voltas- β), estão distribuídos vários centros quirais (como o carbono α , de todos os aminoácidos exceto a glicina, e o carbono β da treonina e isoleucina), essas estruturas podem ser identificadas e quantificadas por meio da técnica de CD. Espectros de Dicroísmo Circular de proteínas apresentam bandas na região de 250-260nm e 180-250nm que correspondem respectivamente a ligações dissulfeto e ligações peptídicas. A Figura 13 mostra os espectros de CD descritos para as estruturas secundárias de uma proteína^{17,30}.

Figura 13 — Espectro de CD no UV distante. (____) α -hélice; (---) folha- β antiparalela; (. . . .) volta- β , (- - - -) estrutura irregular¹⁷.

Foram feitos experimentos envolvendo a desnaturação térmica a fim de monitorar e comparar as mudanças conformacionais frente à variação de temperatura para as amostras de proteína clivada e não clivada.

Para realização desse experimento novamente se pode contar com a gentileza do Laboratório de Biofísica do Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” que

disponibilizou o equipamento para o uso, trata-se de um espectropolarímetro J-715 (JASCO corporation, Japão), equipamento de controle térmico (Peltier), em cubeta de quartzo de 1mm de caminho óptico, num intervalo de 200 a 250 nm.

Para realização do experimento foram usadas amostras contendo 0,1 mg/mL de proteína recém purificada (portanto não clivada) e a mesma concentração de proteína já clivada (amostra incubada por 3 dias).

Ensaio de Cristalização

Para se conseguir resolver a estrutura tridimensional de uma proteína através do método cristalográfico é necessário que sejam obtidos cristais com qualidade e tamanho suficientes para a coleta de dados de difração de raios-X. Mesmo com grandes avanços nas últimas décadas, a taxa de sucesso de cristalização de proteínas ainda continua baixa, na média apenas de 15 a 20% das proteínas que podem ser purificadas cristalizam de forma que possam ter sua estrutura resolvida¹⁷.

O início do crescimento de um cristal de proteína se dá a partir de uma solução supersaturada e prossegue até um estado termodinamicamente estável no qual a proteína está em fase sólida na forma de cristal. O tempo para se atingir o equilíbrio tem uma enorme influência no resultado final, que pode ser micro-cristais, um precipitado amorfo ou até um cristal único e grande. A adição de agentes precipitantes podem levar a obtenção de condições de supersaturação, são exemplos de agentes precipitantes alguns sais, solventes orgânicos e polietilenoglicóis (PEG), as condições de supersaturação também podem ser obtidas modificando os parâmetros físico-químicos da solução, tais como pH e temperatura^{33, 17}.

O princípio da técnica de cristalização por difusão de vapor tem por princípio o processo de equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor num meio fechado, desta forma a solução menos concentrada poderá perder seu solvente volátil até que potenciais químicos das duas soluções sejam iguais. Existem três variações para a técnica de difusão de vapor: a gota suspensa (*hanging drop*), gota apoiada (*sitting drop*) e a gota sanduíche (*sandwich drop*) (Figura 14). A técnica da gota pendurada consiste em “pendurar” uma gota contendo a macromolécula a ser cristalizada, diluída em tampão com o agente de cristalização e aditivos, em uma lamínula e equilibrá-la contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota. O equilíbrio ocorre por

meio da perda de água (da gota para o reservatório), isto leva a uma diminuição do volume da gota e, consequentemente, a um aumento na concentração de todos os constituintes da gota de cristalização³⁴.

Figura 14 – Representação esquemática de (a) gota suspensa (*hanging drop*), (b) gota apoiada (*sitting drop*) e (c) gota sanduíche (*sandwich drop*).

As gotas de cristalização foram feitas, no método de gota apoiada, em robô de cristalização *Honeybee 939 (Molecular Dynamics)*, contendo 0,7 µl de solução de proteína (20 mM TRIS/HCl pH 8,5, 150 mM NaCl) e 0,7 µl de solução precipitante, utilizando o método da gota apoiada (*sitting drop*).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da proteína U5-15K do *Trypanosoma brucei* por ferramentas de bioinformática

A sequência dos aminoácidos já foi previamente descrita pelo Doutor Marco Túlio Alves da Silva durante seu doutoramento, o presente trabalho tratou então de analisar a composição de aminoácidos da proteína e seus parâmetros físico-químicos.

De acordo com os cálculos fornecidos pelo PROTPARAM¹⁸, a proteína U5-15K de *Trypanosoma brucei* na forma monomérica possui 155 aminoácidos e massa molecular de

17,71 kDa, com ponto isoelétrico teórico igual a 6.07, com base nesses cálculos se optou por utilizar a Tris-HCl pH 7,5 como agente tamponante.

Outro dado importante e de extrema utilidade para os experimentos a serem realizados também foi fornecido por esta ferramenta: coeficiente de extinção molar. O valor calculado para o coeficiente de extinção molar foi de 15930 M-1cm-1, assim uma absorbância de 0,899 no comprimento de luz de 280 nm corresponderia a concentração de 1 mg/mL de proteína.

PROTPRAM^{18,35} ainda forneceu dados sobre a composição dos aminoácidos presentes na proteína U5-15K, na Tabela 1 pode-se verificar o número de aminoácidos e a porcentagem correspondente de cada um deles na estrutura primária da proteína.

Tabela 1 - Composição de aminoácidos na proteína U5-15K de *T. brucei* (quantidade de resíduos e percentual no monômero de proteína).

Resíduo	Composição
Ala	14 - 9,0%
Arg	12 - 7,7%
Asn	6 - 3,9%
Asp	7 - 4,5%
Cys	1 - 0,2%
Gln	2 - 5,2%
Glu	15 - 9,7%
Gly	7 - 4,5%
His	3 - 3,9%
Ile	8 - 5,2%
Leu	12 - 7,7%
Lys	7 - 4,5%
Met	4 - 2,6%
Phe	7 - 4,5%
Pro	3 - 1,9%
Ser	9 - 5,8%
Thr	11 - 7,1%
Trp	1 - 0,6%
Tyr	7 - 4,5%
Val	16 - 10,3%
Pyl	0 - 0%
Sec	0 - 0%

Pelos dados mostrados na Tabela 1, é possível constatar que são 22 os resíduos negativamente carregados (Asp+ Glu) e 19 o número de resíduos positivamente carregados (Arg + Lys).

Outro dado interessante a ser mencionado que fica elucidado com esses dados é que há somente um resíduo de cisteína presente na estrutura primária da proteína.

Como dito anteriormente na seção 2.1.8, as proteínas com enovelamento de tioredoxina tem como característica mais proeminente o motivo canônico Cys-XX-Cys formando uma ligação dissulfeto funcional no N-terminal da hélice alfa 2, enquanto a proteína U5-15K humana esse motivo é substituído por Asp-XX-Cys e o segundo resíduo de cisteína conservado, Cys38, ainda está envolvido numa ligação dissulfeto, mas com Cys79 no N-terminal de fita beta 3.

A ligação dissulfeto na proteína U5-15K humana não canônica já é um fato novo para proteínas com enovelamento de tioredoxina, o fato da U5-15K de *T. brucei* não possuir uma segunda cisteína para que a ligação dissulfeto possa ocorrer é ainda mais surpreendente e motivador para estudos sobre a estrutura e função dessa enzima.

Este fato (existência de somente uma cisteína na composição de aminoácidos dessa proteína) dá uma maior importância aos estudos estruturais da estrutura quaternária U5-15K, uma vez que, poderia haver a possibilidade da ligação dissulfeto acontecer entre unidades monoméricas da proteína.

A confirmação que esta proteína assim como sua homóloga humana apresenta um enovelamento característico da superfamília de proteínas tioredoxinas, foi feita através da Base de Dados de Domínios Conservados²⁰ e BLAST²⁶ ambos confirmando esses dados.

Ainda com uso da Base de Dados de Domínios Conservados²⁰ e também do servidor BLAST²⁶ foi possível verificar que a proteína em questão apresenta um domínio único com duas regiões de prováveis sítios ativos. No programa BLAST²⁶ foi previsto o local dos prováveis sítios ativos. Também foi feita uma predição da estrutura secundária com uso do programa Jpred3 através do servidor *on line* Jpred²⁴. Todos esses foram organizados de forma a ficarem ordenados em uma mesma imagem juntamente com a sequência da proteína e são mostrados na Figura 15.

Através dos dados dispostos na Figura 16 é possível observar uma grande conservação dos resíduos que fazem parte da região predita para as regiões de possíveis sítios ativos. Contudo na região onde ocorre a autoclivagem da enzima homóloga humana não é notado um alto grau de conservação como acontece nas regiões de prováveis sítios ativos, isso pode indicar que a U5-15K de *Trypanosoma brucei* pode apresentar um comportamento diferente da enzima humana no que se refere à atividade proteolítica. Ainda sobre as diferenças entre essas duas enzimas, pode-se notar também a presença de uma predição para uma estrutura secundária de folha beta na região para a enzima do *T. brucei* na mesma região onde a proteína humana é clivada.

Sobre a posição de sua única cisteína em relação a sua estrutura secundária, verifica-se que ela aparece anterior ao início de sua segunda fita beta (na proteína humana o primeiro resíduo de cisteína aparece antes da hélice alfa 2 e a segunda cisteína aparece antes da fita beta 3).

Modelagem Molecular por homologia

Como existem estruturas cristalográficas disponíveis de proteínas homólogas a U5-15k do *T. brucei* com identidade sequencial igual ao maior a 30% foi possível aplicar a técnica de Modelagem Molecular por Homologia.

Como primeiro passo para a modelagem foi feito um alinhamento através do servidor BLASTp, que mostrou que dentre as proteínas com estrutura depositada do PDB, a proteína homóloga humana apresentava a maior identidade com a proteína alvo desse trabalho. Como já foi dito na seção de materiais e métodos, o código de acesso no PDB (*Protein Data Bank*) é 1QGV e possui identidade de 41%, por esta razão sua estrutura foi escolhida como molde para resolução da estrutura por homologia.

Através do servidor SWISSMODEL²⁷, a estrutura foi construída de forma automatizada, na Figura 16 é possível ver estrutura obtida, onde é observado um enovelamento parecido com as proteínas da superfamília tiorredoxina.

Figura 16 – Estrutura obtida através da técnica de modelagem molecular por homologia para proteína U5-15k do *T. brucei* através do servidor SWISSMODEL.

Para que fosse feita a validação dos modelos foi feito através do servidor *on line* SAVES²⁸ uma análise estereoquímica do modelo obtido pela modelagem por homologia.

A Figura 17 mostra o gráfico de Ramachandram para a estrutura obtida pela modelagem quanto para a estrutura usada como modelo (U5-15K humana).

Figura 17 – Gráfico de Ramachandran mostrando a distribuições dos o número e o percentual dos resíduos de aminoácidos nas regiões estereoquimicamente mais favoráveis (vermelho) adicionalmente favoráveis (amarelo em destaque) regiões generosamente permitidas (ocre) e regiões não permitidas (branco). O Gráfico de Ramchandran a direita mostra a distribuição para a estrutura modelada e o da esquerda para a estrutura molde (U5-15K humana), os eixos representam os ângulos Phi e Psi.

A disposição dos aminoácidos no gráfico de Ramachandran para a estrutura modelada revela 84,4 % dos aminoácidos em regiões favoráveis, enquanto 14,1 % dos aminoácidos estão em regiões adicionalmente permitidas e apenas 1,5 % está em região generosamente permitida sendo que nenhum aminoácido encontra-se em região não permitida. Este resultado indica um modelo confiável. A comparação com o gráfico de Ramachandran para a estrutura cristalográfica da U5-15K humana mostra-se muito semelhante à estrutura modelada reforçando a confiabilidade do modelo.

Uma vez tendo validado estereoquimicamente o modelo, fez-se uma sobreposição da estrutura gerada com a estrutura humana para comparações de possíveis diferenças estruturais.

A sobreposição das duas estruturas mostrou diferenças nos modelos. É observado no modelo obtido duas fitas betas que não estão presentes na humana e um tamanho e configuração diferente em um dos loops, ver Figura 18.

Figura 18 – Sobreposição da estrutura modelada para U5-15K de *Tripanossoma brucei* (em vermelho) e da proteína homóloga humana usada como modelo para esta estrutura (em azul). A seta verde indica a região onde se observa duas fitas betas adicionais e a seta laranja indica o loop que apresenta diferenças no tamanho e na conformação entre as duas estruturas.

Não se pode afirmar com certeza a presença das duas fitas betas na estrutura da U5-15K de *Tripanossoma brucei* somente com base em uma modelagem molecular por homologia, somente a resolução da estrutura por técnicas experimentais como Ressonância

Magnética nuclear e Cristalografia poderiam elucidar claramente a presença delas, contudo, a predição de estrutura secundária também prevê a presença de 7 fitas beta em sua estrutura.

No que se refere a posição do resíduo de cisteína, é possível se verificar que ele aparece numa região interna e numa região distinta quando comparada com a enzima humana. Este fato novamente evidencia as grandes diferenças estruturais e funcionais que podem existir entre essas duas enzimas, ainda que ambas tenham um grau de identidade bastante alto (41% de identidade). A Figura 19 mostra a localização da ligação dissulfeto na proteína usada como modelo e a posição da cisteína na estrutura modelada.

Figura 19 – Estrutura da U5-15K humana (direita) e a estrutura modelada para U5-15K de *T. brucei* (esquerda), nelas é possível observar em destaque (vermelho) as duas cisteínas da proteína humana formando a ponte dissulfeto e a cisteína presente na proteína modelada.

Sobre as regiões de possíveis sítios ativos das proteínas deste tipo de superfamília que foram mapeadas, é possível observar que os dados da estrutura modelada mostram certo grau de acordo com a predição da estrutura secundária: os resíduos da região Glutamato 20 até Fenilalanina 29 (correspondentes à região marcada como provável primeiro sítio ativo) encontram-se na parte interna da proteína em uma fita beta, os resíduos da região Arginina 49 até Leucina 58 (identificados como possível segundo sítio ativo) estão numa parte exterior da proteína em uma hélice alfa, os resíduos da região entre a Glicina 108 e Asparagina 116

(marcados como potenciais resíduos do primeiro sítio ativo) estão num *coil* na parte externa da proteína. A Figura 20 mostra a estrutura com as regiões de possíveis sítios ativos destacados.

Figura 20 – Estrutura da U5-15K com regiões dos prováveis sítios ativos destacados, o primeiro sítio ativo está marcado em vermelho: Glutamato 20 até Fenilalanina 29 na fita beta e região entre Glicina 108 e Asparagina 116 no *coil*, A região do segundo sítio ativo está marcado em azul (resíduos Arginina 49 até Leucina 58) na hélice alfa.

Testes de expressão

Para os testes de expressão as células de *E. coli* BL21 pLys transformadas com o plasmídeo cedido pelo Doutor Marco Túlio Alves da Silva, foram inoculadas em 250 mL de meio de cultura 2XYT e induzidas a expressar a proteína recombinante a 37 °C com adição de 1 mM de IPTG e tiveram sua expressão monitorada. O resultado pôde ser visualizado em SDS-PAGE 15%, como mostra a Figura 21, onde se nota o ápice de produção de proteína 1,5 horas depois da indução.

Figura 21 – Teste de expressão com células crescidas a 37°C até a densidade ótica de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm e induzidas com 1mM de IPTG. A seta indica a banda de proteína superexpressa.

Foi feito um segundo teste de expressão exatamente igual ao anterior, no entanto se monitorou a expressão celular com uma indução de 0,1 mM de IPTG, como mostra a figura

22, o resultado foi semelhante ao observado nas condições anteriores porem como se esperava com um maior nível de expressão.

Figura 22 – Teste de expressão com células crescidas a 37°C até a densidade ótica de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm e induzidas com 0,1 mM de IPTG. A seta indica a banda de proteína superexpressa.

As culturas de células induzidas a 1 e a 0,1 mM de IPTG foram centrifugadas (12000 rpm por 20 minutos), ressuspendidas em 5 mL de tampão (20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl), sonicadas (dez pulsos de 1 minuto com intervalo de 30 segundos entre elas) e centrifugadas (10000 g por 10 minutos). As frações do pellet e sobrenadante (frações solúveis e insolúveis) foram analisadas por SDS-PAGE.

Em ambas as condições de expressão (induzidas com 1 e 0,1 mM de IPTG) os testes de lise celular mostraram que aproximadamente 10 % da proteína permanecia na fração solúvel, por isso optou-se por padronizar a expressão sendo feita com a indução de 1 mM de IPTG uma vez que neste caso a quantidade de proteína produzida foi maior.

Para se melhorar o rendimento de proteína solúvel foi necessária a realização de novos testes de lise celular.

Testes de Solubilidade:

Foram realizados testes de lise para que se fossem encontradas as melhores condições de solubilidade da proteína em diferentes tampões de lise. Para tanto foi feita uma nova cultura de células, crescidas como descrito anteriormente (37 °C, 250 rpm em 1 L de meio de cultura 2XYT) e induzidas novamente com 1 mM de IPTG na densidade ótica de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm, com tempo de indução de 1,5 horas.

A lise foi feita em sete diferentes tampões para que se fossem analisadas uma possível variação na quantidade de proteína na fração solúvel. O protocolo de lise celular bem como os tampões utilizados já foram previamente descritos em materiais e métodos na sessão 2.3.2, os tampões utilizados podem ser novamente vistos na Figura 23, que mostra em SDS-PAGE as frações solúvel e insolúvel obtidas para cada um dos sete diferentes tampões de lise.

Figura 23 — Teste de solubilidade em diversos tampões, os tampões tem sua composição descrita a esquerda. A seta indica a banda de proteína superexpressa.

Os melhores resultados obtidos foram para as condições com o aminoácido arginina na concentração salina de 150 mM de NaCl e na presença do detergente Triton X-100. Tendo em vista o resultado favorável da fração solúvel e o fato de que uma solução detergente ajudaria no rompimento da membrana celular, foi escolhido para padronização da lise o tampão com 150 mM de NaCl e 0,1 % de Triton X-100.

Purificação por cromatografia de afinidade:

Uma vez estabelecida a expressão e a lise, foram feitos testes de purificação com a fração solúvel da proteína na coluna TALON™ *Metal Affinity Resin* (BD Biosciences), a coluna possuía 2 mL e as lavagens nessa etapa inicial foram de 5 mL (2,5 volumes de coluna), com concentrações crescentes de imidazol, as quais podem ser observadas na Figura 24 que mostra o SDS-PAGE 15%, com as frações purificadas.

Figura 24 — Teste inicial de purificação por afinidade. A seta indica a altura da banda da proteína purificada.

Após esse teste inicial de purificação pode-se verificar as condições de eluição da proteína: concentração entre 25 e 50 mM de Imidazol. Para melhoria no processo de purificação e eluição dos contaminantes, pensou-se que em uma purificação com lavagens em volume maior.

Sendo conhecidas as concentrações de Imidazol para a eluição da proteína, um segundo teste de purificação foi realizado, desta vez com lavagens em volume maior (30 mL, que equivalem a 15 volumes de coluna). Foram feitas três lavagens com tampões com 0, 10 e 15 mM de Imidazol respectivamente.

Para este novo experimento de purificação, no entanto, foi utilizado um novo protocolo de expressão, foram utilizados 2 Litros cultura de células crescidos em meio 2XYT induzidos com 1 mM de IPTG, desta vez, como tentativa de se conseguir uma maior fração solúvel foi utilizado 8 horas de expressão a 20⁰C, a Figura 25 mostra o SDS-PAGE das amostras obtidas na lise e na purificação.

Figura 25 — Novo protocolo de expressão e segundo teste de purificação por afinidade. A seta indica a altura da banda da proteína purificada.

Se optou por passar as amostras por uma etapa adicional de purificação após a eluição da coluna de afinidade, uma vez que se pretendia um grau de pureza maior para os

ensaios de cristalização. Definiu-se a cromatografia de exclusão molecular como nova etapa de purificação da proteína, a Figura 26 mostra o perfil do monitoramento da purificação por gel filtração a 280nm e o gel com as amostras obtidas.

Figura 26 — Perfil da purificação por gel filtração da amostra eluída na purificação por afinidade.

Posteriormente, uma amostra que havia sido purificada por cromatografia de afinidade com o protocolo já estabelecido, permaneceu algumas horas em repouso para que se pudessem ser feitos experimentos de diálise no concentrador. Contudo, quando se aplicou a amostra no gel para se verificar o seu estado após ser concentrada pode-se verificar que não mais havia uma banda única, mas duas bandas, uma delas com o tamanho menor quando comparada com a alíquota feita no dia da purificação, a Figura 27 mostra o resultado observado na amostra que permaneceu em incubação.

Figura 27 – Verificação inicial da autoclivagem numa amostra que havia ficado em repouso a passado por diálise em um concentrador.

As amostras presentes na Figura 27 foram utilizadas também em para a transferência em uma membrana de nitrocelulose para que se fosse feito *Western Blot*, com anticorpo anti *his tag*, e verificou-se que a cauda de histidina era perdida durante a clivagem, ver Figura 28.

Figura 28 – Membrana de *Western Blot* anti *his tag* das amostras clivada e não clivada (mesmas amostras da Figura 27).

O inibidor quimostatina e o ácido 6-aminohexanoico são conhecidos por inibirem algumas serino-proteases. A quimostatina também é conhecida por inibir cisteíno-proteases.

Foi realizado ainda um teste de inibição com o inibidor PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*), trata-se de um inibidor de serino-proteases muito utilizado nos tampões de lise celular, rapidamente degradado em água. O resultado desse teste pode ser visto na Figura 31.

Figura 31 – Teste de inibição com o inibidor PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) (direta) e seu respectivo controle (esquerda) em 8°C (acima) e 25°C (abaixo), o tempo de incubação de cada amostra está indicado na figura.

Pode ser observado que a enzima apresenta grande inibição da sua atividade na presença de PMSF, este inibidor não inibe todas as serino-proteases, nas enzimas que apresenta inibição, atua de forma muito específica se ligando no resíduo serina no sítio ativo das serino-proteases.

Foi novamente feito um *Wester Blot* contra a cauda de histidina para que não restasse nenhuma dúvida acerca da clivagem estar sendo na região do C-terminal. Para tanto, as

amostras utilizadas no teste do inibidor ácido 6-aminohexanoico foram transferidas na membrana onde foi novamente confirmado que a clivagem eliminava a cauda de histidinas como mostra a Figura 32.

Figura 32 – Teste com inibidor ácido 6-aminohexanoico e seu respectivo *Western Blot*.

Para se ter garantias de que não haveria a presença de nenhuma protease junto com a U5-15K, foi feito novo teste de inibição a 25 °C, nesse novo teste a proteína passou por duas etapas de purificação (cromatografia por afinidade e por exclusão molecular). Ao passar por duas etapas de purificação se espera que a proteína esteja com maior grau de pureza, excluindo-se a hipótese de uma protease contaminante poder ser purificada juntamente com a proteína. Para realização do experimento, usaram-se as mesmas quantidades de proteína que nos experimentos anteriores.

Desta vez, no entanto, se utilizou também o inibidor EDTA (sigla do inglês para *ethylenediamine tetraacetic acid* - ácido etilenodiamino tetra-acético), um composto quelante com conhecida atuação como inibidor de metalo-proetases (lembrando que algumas metalo-proteases também são inibidas pelo ácido 6-aminohexanoico). Este teste pode ser observado na figura 33.

Figura 33 – Teste de clivagem a 25 °C feito com proteína purificada por cromatografia de afinidade e por cromatografia de exclusão molecular.

Neste teste pode-se constatar que o inibidor EDTA, inibe a atividade da enzima, retardando sua possível auto-clivagem.

Na literatura, consta que a proteína U5-15K humana é inibida pelos inibidores ácido 6-aminohexanoico, quimostatina e EDTA¹⁶.

A Tabela 2 resume os resultados obtidos nos experimentos de clivagem.

Tabela 2 - Síntese dos resultados obtidos dos testes de clivagem com diferentes inibidores.

Inibidores	Características do Inibidor	Inibição U5-15K humana	Inibição U5-15K <i>T. brucei</i>
Ácido 6-aminohexanoico	Inibidor de serino-proteases, lisinacarboxilpeptidase e metaloproteases	Consta como inibidor na literatura	Inibe a atividade da enzima
EDTA	Inibidor metalo-proteases dependentes de zinco e outras metaloproteases que são estabilizadas por íons metálicos	Consta como inibidor na literatura	Inibe a atividade da enzima
PMSF	Inibidor de serino-proteases (inibe especificamente a serina do sítio ativo)	Nada consta na literatura	Inibe a atividade da enzima com melhores resultados a baixas temperaturas.
Quimostatina	Inibidor de serino-proteases e cisteino-proteases	Consta como inibidor na literatura	Inibe a atividade da enzima completamente

Com base nesses resultados não é possível afirmar com absoluta certeza qual classe de proteases a U5-15K de *Trypanosoma brucei* pertence, porém, a especificidade da inibição feita por PMSF e a inibição por quimostatina dão grande indícios de que se trata de uma serino protease, o que pode ser sustentado pela presença de um resíduo serina perto da região predita para ser o primeiro sítio ativo e outro resíduo de serina próxima da região predita como segundo sítio ativo (resíduos Ser 30 e Ser 47).

Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo - SAXS

A fim de verificar se existia alguma diferença estrutural entre as amostras clivada e não clivada foram realizados experimentos de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS).

Os dados obtidos nas medidas de SAXS não foram satisfatórios e tornam-se necessárias novas medidas, ao que parece a proteína U5-15K não parece se comportar sempre

como monômetro a altas concentrações, todavia mais estudos merecem ser feitos para melhor esclarecer esse comportamento.

Contudo a análise dos dados de SAXS através do programa SAXS MOW³², que possibilita o cálculo da massa molecular da proteína, permitiu-nos ver diferenças entre a amostra clivada e a amostra não clivada.

Na Figura 34 é possível visualizar a janela do programa SAXS MOW³² com os cálculos realizados a partir da coleta de dados feita com a proteína U5-15K não clivada. O valor obtido através desse programa para a massa da proteína que não foi clivada foi de 30,7 kDa.

U5 – 15k não clivada

Figura 34 – Janela do programa SAXS Mow³², mostrando seus resultados para o cálculo da massa molecular para a proteína não clivada.

Da mesma forma como na figura anterior, a Figura 35 mostra os cálculos feitos com os dados coletados para a proteína U5-15K clivada, neste caso o valor de massa obtido foi de 26,4 kDa.

U5 – 15k clivada

Figura 35 – Janela do programa SAXS Mow³², mostrando seus resultados para o cálculo da massa molecular para a proteína clivada.

Mesmo havendo a necessidade de nova coleta de dados de SAXS, somente com os dados obtidos já se pode observar diferenças entre as duas amostras (clivada e não clivada) como era de se esperar. As diferenças obtidas no cálculo para a massa da proteína já evidenciam esse fato.

Espalhamento Dinâmico de Luz - DLS

Uma vez que a ligação dissulfeto é canônica para as proteínas da superfamília de tiorredoxina, e a U5-15K do *Trypanosoma brucei* possui uma única cisteína, existe a possibilidade de ser feita uma ligação dissulfeto entre dois monômeros, desta forma torna-se importante o estudo da estrutura quaternária da proteína. A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) tornou-se uma importante ferramenta para que se fosse elucidada essa questão.

A análise feita por espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), contou com a ajuda da doutoranda Daiana Evelin Martil. Para esses experimentos optou-se por usar a proteína em baixas concentrações, para que se pudesse estar em condições mais próximas que a proteína teria *in vivo*.

Para os experimentos de DLS, foi utilizada proteína em concentração de 0,5 mg / mL. O resultado obtido para a proteína que não sofreu clivagem pode ser visualizado na Figura 36.

Figura 36 – Resultado do experimento de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para a amostra não clivada, pode se observar em destaque os dados do pico que contem 100 % de massa na amostra.

Pode-se observar que para a proteína não clivada o resultado mostrou que se tratava de um monômero, uma vez que o Raio Hidrodinâmico (Raio de Stokes) obtido para a proteína foi de 2,4 nm com erro de 0,34 nm e a massa calculada como se a proteína fosse uma esfera com o Raio de Stokes foi de 27,2 kDa com erro de 4,4 kDa, dados que concordam com as visualizações em SDS-PAGE.

A Figura 37 mostra as análises de DLS para a mesma concentração de proteína (0,5 mg / ml) porém que ficou em encubação e passou pela autoclivagem.

Figura 37 – Resultado do experimento de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para a amostra clivada, pode se observar em destaque os dados do pico que contem 99,2 % de massa na amostra.

Nesse caso, se observa que a proteína clivada tem um Raio Hidrodinâmico de 1,9 nm com erro de 0,18 nm, com base nesse Raio, a massa calculada foi de 15,9 kDa com erro de 2,6 kDa, o que novamente indica se tratar de um monômero em solução.

Desta forma, os experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz mostram que a unidade monomérica da proteína (quando em concentração de 0,5 mg / ml) é um monômero

tanto para a amostra que passou pela autoclivagem quanto para a amostra que ainda não foram autoclivada, ou seja, a clivagem não influencia no estado oligomérico da proteína e nem são feitas ligações dissulfetos entre monômeros.

Dicroísmo Circular

Uma vez que, através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz, pode-se verificar que não havia interferência da clivagem na estrutura quaternária da proteína, pensou-se em usar a técnica de Espectroscopia de Dicroísmo Circular para tentar se verificar possíveis diferenças na estabilidade térmica entre a proteína clivada e a proteína não clivada.

Após sucessivos testes, verificou-se que a concentração que melhor seriam observados os espectros de dicroísmo seria de 0,1 mg / mL de proteína. Após isso, em um primeiro experimento foi feito com sete medidas entre as temperaturas de 10 a 50 °C. Neste primeiro experimento verificou-se que ambas as amostras (clivada e não clivada) começavam a perder a estrutura secundária na região entre 40 e 45 °C, Uma vez estabelecida a região onde a proteína começava a perder sua conformação, foi proposto um segundo experimento, desta vez na região entre 38 e 50 °C com variação de dois graus entre cada medida.

A Figura 38 mostra os espectros produzidos pela proteína não clivada, com mudanças em seu espectro na temperatura de 44 °C.

Figura 38 – Espectros de dicroísmo circular da amostra contendo a proteína não clivada apresentando as mudanças conformacionais em cada uma das sete temperaturas analisadas (as temperaturas, com valores em graus Celsius, são especificadas no canto inferior esquerdo), destaque para a linha vermelha, correspondente a temperatura de 44 °C, onde pode ser observada uma mudança no espectro.

A proteína que passou pelo processo de clivagem, apresentou o mesmo comportamento observado para a proteína que não foi clivada, começando a perder sua estrutura secundária em 44 °C, como pode ser verificado na Figura 39.

Figura 39 – Espectros de dicroísmo circular da amostra contendo a proteína clivada apresentando as mudanças conformacionais em cada uma das sete temperaturas analisadas (as temperaturas, com valores em graus Celsius, são especificadas no canto inferior esquerdo), o comportamento da proteína começa a mudar na temperatura de 44 °C.

As análises por Espectroscopia de Dicroísmo Circular mostraram que a clivagem não parece afetar o comportamento da proteína frente a mudanças de temperatura, uma vez que ambas apresentam diferenças na mesma temperatura (44 °C).

Ensaio de Cristalização

A amostra utilizada para os ensaios de cristalização era expressa de acordo com os protocolos já estabelecidos de expressão a 20 °C, e lisada também de acordo com o protocolo já estabelecido, após a lise celular a amostra passava pela etapa de purificação de cromatografia de troca iônica e permanecia encubada a 8 °C por 3 dias para que pudesse ser

totalmente clivada, após a clivagem a amostra passava por cromatografia de exclusão molecular e era concentrada para poder ser utilizada nos ensaios.

Para a triagem das condições de cristalizações foram testadas 480 condições diferentes nos kits comerciais: *Salt*, *Classic Suit*, *Classic II Suit*, *PEG Suit*, *PEG Suit II* (QIAGEN).

Não foram observados cristais em nenhuma das quase 500 condições testadas, contudo foi possível perceber pequenas nucleações em 3 condições do kit comercial PEG SUIT Classic II.

As condições onde foram encontradas nucleações foram: (i) 0,1 M de Bis Tris pH 5,5 2 M de sulfato de amônio; (ii) 0,1 M de Bis Tris pH 6,5e 3 M de cloreto de Sódio; (iii) 0,1 M Bis Tris pH 8,5 e 3 M de Cloreto de Sódio.

As três condições apresentavam Bis Tris como agente tamponante, e duas delas continham Cloreto de Sódio.

2.5 CONCLUSÕES

Apresentou-se nesse trabalho resultados sobre a proteína U5-15K do *T. brucei*, seu comportamento de auto clivagem e investigações sobre as diferenças que podem haver nessa proteína antes e após a clivagem, e diferenças dela com relação a proteína homóloga humana.

Através das ferramentas de bioinformática se verificou que ela possui um enovelamento característico de tioredoxina, tem grande identidade com a proteína humana (41 %), grande conservação de resíduos nos possíveis sítios ativos, mas, não possui identidade alta na região de auto clivagem. Também verificou-se que a ligação dissulfeto canônica desse tipo de proteína não acontece na U5-15K, uma vez que ela possui somente uma única cisteína.

Ainda com as ferramentas de bioinformática foi possível se obter uma estrutura da proteína através da técnica de modelagem molecular por homologia. Esta estrutura apresenta duas regiões significativamente diferentes da proteína homóloga humana, uma dessas regiões possui duas fitas beta adicionais. Ainda com a estrutura obtida pode-se verificar a posição da

cisteína numa região completamente distinta da proteína humana (que possui duas cisteínas e fazendo uma ligação dissulfeto).

Foram feitos testes para otimização da expressão e da lise celular para que se pudesse ter um maior rendimento da proteína solúvel, no entanto, a maior parte da proteína permanece no pellet celular.

A auto clivagem da proteína acontece em temperatura diferente da humana e apresenta diferenças na sua inibição, isso, juntamente com as grande diferenças na sequencia de aminoácidos das duas proteínas sugere que a clivagem pode ocorrer de forma diferente do que acontece na U5-15K de *Homo sapiens*.

Os dados do experimento de Espalhamento de Raio-X a Baixo Ângulo (SAXS) não foram conclusivos, merecem ser refeitos, contudo neles já é possível observar diferenças entre as amostras de proteína clivada e não clivada.

O Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) comprovou a clivagem observada no SDS-PAGE 15% e forneceu valores da massa molecular da proteína, ainda com o DLS foi possível se verificar que a amostra é monodispersa e que a clivagem não afeta a estrutura quaternária da proteína, que permanece inalterada como monômero antes e após sua clivagem.

No experimento de Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) pode-se verificar que a estabilidade da estrutura secundária da proteína permanece inalterada antes e após a autoclivagem. Deixando claro que a parte clivada da proteína não é fundamental estruturalmente. Também nesse experimento foi verificado que a clivagem não altera a estabilidade térmica da proteína, que começa a perder a estrutura secundária em 44 °C tanto com a amostra clivada, como com a não clivada.

2.6 PERSPECTIVAS

Muitas são questões em aberto existentes para um melhor entendimento da enzima U5-15k de *T. brucei*, este trabalho levantou alguns aspectos que merecem ter um destaque em próximas pesquisas que envolverem esse tema:

- Determinação exata dos aminoácidos clivados por métodos de sequenciamento por Espectrometria de Massa.
- Estudos de mutação nos aminoácidos identificados como presentes no sítio de clivagem e nos possíveis sítios ativos
- Continuação dos testes de cristalização a partir das condições que apresentaram centros de nucleação
- Novas medidas de Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos
- Planejamento de estudos de biologia molecular para se verificar a importância da clivagem no spliceossoma.

CAPÍTULO 3 *Leishmania* RNA VÍRUS

3.1 Introdução

Desde a descoberta em 1960 de vírus no protozoário parasita *Entamoeba histolytica*, pesquisadores passaram a reportar estruturas similares em uma crescente lista de eucariontes unicelulares, mostrando que a vasta maioria, senão todos, os sistemas de vida podem ter uma provável susceptibilidade a uma infecção viral^{36, 6}.

Passaram-se quase trinta anos da descoberta do primeiro vírus de protozoário até a descoberta do vírus de leishmania: o *Leishmania* RNA vírus (LRV) foi primeiramente relatado em 1988, em culturas de *Leishmania braziliensis guyanensis*, como sendo um vírus de RNA fita simples, e medindo aproximadamente 32nm³⁷, que pode possuir fita dupla ou simples de RNA com uma sequência de 5,3kpb³⁸⁻³⁹. Desde então, viroses similares tem sido encontradas em pelo menos 13 culturas diferentes de *Leishmania*, esses vírus são agora designadas como o gênero *Leishmania* RNA vírus (LRV) e classificadas como membros da família de vírus *Totiviridae*⁴⁰.

Mesmo sendo morfologicamente semelhante aos outros vírus de protozoários com fita dupla de RNA, o vírus LRV1 é distinto por vários critérios: LRV1 não está vinculada membrana como o vírus do *T. vaginalis*, nem é encontrado no núcleo como é o vírus da *G. lamblia*⁴¹.

O LRV, porém, tem mostrado similaridade com o vírus de levedura. Ambos os vírus têm RNA genômico de fita dupla não-segmentada que são semelhantes em tamanho e tem o ciclo de replicação semelhante⁴¹⁻⁴². Além disso, a análise da sequência nucleotídica revela que os domínios da conservação RNA polimerase dependente de RNA de LRV1 têm o maior homologia com a do vírus de levedura quando comparada com outras sequências na base de dados⁴¹. A semelhança da organização genômica, do ciclo de replicação, e sequência da RNA-polimerase do LRV1 e o vírus de levedura sugerem uma origem ancestral comum³⁸.

A partícula viral do vírus de levedura é montada a partir da fita de RNA positiva, da proteína capsidial e da fusão RNA-polimerase e proteína do capsídeo. A vertente negativa é sintetizada no interior da partícula, usando a RNA-polimerase dependente de RNA, resultando

Assim, tanto o LRV e vírus de levedura são restritos ao citoplasma, têm genomas não-segmentados, o capsídeo pode conter com fita simples ou fita dupla de RNA com diferentes densidades, têm associado RNA-polimerase dependente da atividade RNA e não parecem produzir partículas que infectam por transmissão extracelular.

Como já mencionado, o *Leishmania* RNA Vírus é da família *totiviridae*, essa família contém vírus com genomas compostos de dupla fita de RNA com comprimento variável entre 4,6 a 7,0Kbp. As partículas de totivirus têm aproximadamente 40 nm de diâmetro com simetria icosaédrica. O genoma codifica uma proteína capsidial e uma RNA-Polimerase dependente de RNA. As espécies de vírus reconhecidos previamente classificadas dentro dessa família são conhecidas por infectar protozoários e fungos⁴³.

Até recentemente, quatro gêneros desta família eram reconhecidos:

(1)*Totivirus*: um exemplo é vírus de *Saccharomyces cerevisiae*, o vírus de levedura;

(2)*Giardiavirus*, são vírus que infectam *Giardia lamblia*;

(3)*Leishmaniavirus* englobando os vírus que infectam diferentes espécies de leishmania;

(4)*Victorivirus*, o *Helminthosporium victoriae* é um exemplo de hospedeiro de vírus desse gênero.

Vírus dos gêneros *Totivirus* e *Victorivirus* podem infectar leveduras e fungos, enquanto os gêneros *Giardiavirus* e *Leishmaniavirus* podem infectar protozoários parasitas⁴³. Atualmente pode-se considerar um quinto gênero: o *Trichomonavirus* (os vírus de *Trichomonas vaginalis*). A Figura 41 mostra uma árvore filogenética mostrando os cinco gêneros de *Totiviridae*.

Figura 41 – Árvore filogenética mostrando os cinco gêneros conhecidos da família *totiviridae*⁴⁴.

Existe ainda uma proposta para mais um gênero dentro da família *Totiviridae*: em 2010, Zhai e colaboradores, propuseram o gênero *Artivirus*, esse gênero englobaria o vírus do mosquito *Armigeres subalbatus* (AsTV), o vírus de *Drosophila melanogaster* conhecido como DTV e o vírus de camarões peneídeos (*Litopenaeus vannamei*), conhecidos como IMNV⁴³.

Até o isolamento do vírus IMNV de camarões peneídeos no nordeste do Brasil em 2005, a família *Totiviridae* continha apenas vírus que infectam protozoários e fungos. O IMNV era, portanto, o primeiro membro da família *Totiviridae* isolado a partir de um artrópode. Um segundo “*Totivirus artrópode*” foi identificado a partir de linhas de células de *Drosophila melanogaster* em 2009, pelo sequenciamento e foi nomeado *Drosophila totivirus* (DTV). Um terceiro *Totivirus artrópode* foi isolado a partir de mosquitos (*Armigeres subalbatus*) em 2006, a sigla para este vírus é AsTV. O vírus de mosquito AsTV é o único

membro da família *Totiviridae* que tem sido replicado em qualquer sistema de mamífero, sugerindo que pode também ser capaz de infectar certas espécies de mamíferos⁴³.

Análises filogenéticas sugerem que o gênero *Artivirius* tenha uma origem mais primitiva que os outros gêneros desta família. A Figura 42 mostra uma árvore filogenética do *Totiviridae*.

Figura 42 – Árvore filogenética baseada na conservação dos aminoácidos da proteína capsidial (a) e na conservação dos aminoácidos da RNA polimerase (b)⁴³. Nessa árvore pode-se observar o novo gênero proposto *Artivirius*.

No que se refere ao *Leishmania* RNA vírus, análises filogenéticas sugerem, (em concordância com o postulado da origem comum persistente dsRNA vírus de protozoários e

fungos), que provavelmente a infecção das cepas de *Leishmania* pelo vírus LRV é anterior a sua divergência em diferentes linhagens. Uma vez que as distâncias genéticas entre os tipos de LRV e cepas de *Leishmania* infectadas com entre esses vírus são compatíveis com a evolução paralela de *Leishmania* e LRV⁴⁵, a Figura 43 mostra uma Comparação das árvores obtidas a partir das sequências de ORF3 virais e uma árvore com espécies de leishmanias.

Figura 43 – Comparação das árvores obtidas a partir das sequências de ORF3 virais e uma árvore de leishamânia⁴⁵.

No genoma do LRV encontram-se pelo menos quatro ORFs, sendo que o genoma codifica tipicamente somente duas dessas ORFs em uma fita, enquanto a fita de polaridade oposta não tem um potencial reconhecível para codificação^{39,36}. As duas grandes ORFs são precedidas por uma região 5' não traduzida (UTR), cujo comprimento varia de 340 nucleotídeos (em LRV2-1-4) e 49 nucleotídeos em (LRV1-4). A 5'UTR codifica a sequência de nucleotídeos mais fortemente conservada no genoma viral e contém um ou

mais ORFs curtos. Não existem relatos de que estes pequenos ORFs codificam produtos de genes³⁶.

A sequência 5' de RNAs mensageiros de *splice líder* de parasitas cinetoplastidas não está presente no RNA do LRV1. Isto sugere que a região 450-bases na extremidade 5' da fita positiva do LRV1, (que contém ORF1 e é altamente conservada entre as estirpes virais e que não codifica proteína) pode ter um papel na iniciação e tradução e/ou estabilidade do RNA³⁸. A Figura 44 mostra um esquema com as ORFs do *Leishmania* RNA Virus 1-4 e do *Leishmania* RNA vírus 1-1.

Figura 44 — Esquema do genoma do LRV1-4, onde ORF2 é a região que codifica para a proteína do capsídeo e ORF3 para a uma polimerase para o LRV1-4 e LRV1-1³⁹.

Em geral, proteínas virais de capsídeo servem exclusivamente para funções que asseguram o êxito da propagação do genoma viral e protegê-lo das nucleases nos ambientes intracelular e extracelular. Contudo, verificou-se que partículas vírus LRV1-4 completamente montadas possuem a atividade endoribonuclease específica para segmentação do seu próprio RNA, sendo sugerida que essa atividade pode controlar o número de cópias virais em células hospedeiras após montagem, provavelmente afetando na taxa de renovação do RNA viral e contribuindo para o controle do número de cópias virais em células hospedeiras⁴⁰.

Não bastassem todas as questões científicas importantes ainda em aberto sobre os vírus de protozoários, outra motivação para o estudo do *leishmaniovírus* seria o fato de que a elucidação de sequências similares de LRV1 pode abrir caminho para o desenvolvimento de novos vetores para a transformação tripanossomatídeos parasitas⁴¹.

Ainda sobre a importância do estudo dos vírus de protozoários, deve-se ressaltar que as interações e a importância do vírus na patologia causada pelo protozoário ainda não estão completamente estabelecidas. No caso do vírus de *leishmania*, em fevereiro de 2011 foi publicado um estudo que mostrava uma diferenciação na resposta do sistema imune do

hospedeiro entre cepas de *leishmania* infectada e não infectada com o vírus, nesse mesmo estudo também foi mostrado que a metástase das lesões acontece devido a presença do vírus⁸.

Foi verificado também que o número de macrófagos infectados por cepas de *Leishmania guyanensis* M41471 tinha um significativo aumento nas culturas com o vírus quando comparadas a culturas sem o vírus no parasita, sugerindo que a presença do vírus aumenta a infectividade⁴⁶.

Por todas as razões apresentadas aqui apresentadas pode-se dizer que o estudo do *Leishmania* RNA Vírus é de suma importância para um melhor entendimento biológico de vírus ainda pouco conhecidos, cujo protozoário de quem é hospedeiro tem enorme importância econômica e na saúde humana.

3.2 OBJETIVOS

Sabendo-se da enorme importância da estrutura para a biologia, e que pouco se sabe a respeito dos vírus de protozoários, este trabalho tem por seu objetivo geral fazer estudos estruturais do *Leishmania* RNA vírus 1-4. É notório que a em biologia molecular estrutura e função estão intimamente ligadas, assim sendo, com base nas suas informações estruturais poderia ser possível conhecer melhor as funções do capsídeo viral na célula hospedeira.

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- Clonar, expressar e purificar as proteínas virais do LRV1-4 (proteína capsidial e RNA polimerase).
- Fazer estudos estruturais de Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS) e de cristalografia com as proteínas do LRV1-5
- Definir um novo protocolo para purificação o *Leishmania* RNA Vírus 1-4 *in vivo*
- Realizar estudos estruturais de microscopia nas amostras *in vivo*.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS - *Leishmania* RNA Vírus

3.3.1 Produção das proteínas recombinantes do LRV

Análise da proteína por meio de ferramentas de Bioinformática e Análise da sequência de aminoácidos

A metodologia empregada nesta etapa do trabalho foi a mesma descrita no capítulo referente à proteína U5-15K de *T. brucei*, já previamente descrita nesta tese.

Amplificação do gene e clonagem

A sequência completa do genoma do LRV 1-4, já transcrita em DNA e clonada no vetor *pBlueScript*, foi gentilmente cedida pela Professora Doutora Jean Patterson (The University of Texas, Department of Microbiology & Immunology).

Com base na sequência de nucleotídeos dos genes contidos no genoma do LRV1-4, (com número de acesso NC_003601.1 no banco de dados do NCBI¹⁹), foram sintetizados oligonucleotídeos com os sítios de clivagem para enzimas de restrição NdeI e XhoI (Tabela 4), de modo que fosse possível a amplificação da fase aberta de leitura (ORF) dos genes codificantes para a RNA polimerase e para a proteína capsidial do LRV1-4.

Nesta etapa, foram utilizados os programas Gene Runner⁴⁷ e BioEdit⁴⁸ para alinhamento dos fragmentos de nucleotídeos, verificação dos sítios de clivagem e cálculo das temperaturas de anelamento.

A amplificação do fragmento de interesse foi feita por meio do método de reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do plasmídeo que continha o genoma total do vírus e dos

oligonucleotídeos descritos na Tabela 3, nas condições de reação recomendadas pelo fabricante (empresa FERMENTAS).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da ORF do gene de interesse por meio de PCR

Sítio de Restrição e gene de interesse	Oligonucleotídeos
<i>Nde</i> I - CATATG Capsídeo	ACG TAC GTC ATA TGG CTG ATA TAC CAA ACT CTG ATA AGA TTG C
<i>Xho</i> I – TCTGAG Capsídeo	CTG ACT CGA GAA TTC AAG CGC AGC CTC CGT TGT CAC CGG TTT CG
<i>Nde</i> I - CATATG Polimerase	ACG TAC GTC ATA TGT CCC ATC ATC TGA TAC AGT ACC CGA ACC CGA ACC AGA GCC
<i>Xho</i> I - TCTGAG polimerase	CTG ACT CGA GTC ATT ATA CAT ATA CAT TAT GTA TTA CTT GTA TAA C

Nesta etapa, devido ao baixo rendimento da PCR, foi feita uma otimização da reação por meio de um gradiente de temperatura onde se estabeleceu as melhores temperaturas de anelamento, sendo elas 45⁰C para o gene codificante para a proteína do capsídeo e 55⁰C para o gene codificante da RNA polimerase, para melhoria do rendimento optou-se por utilizar 40 ciclos, e devido ao grande tamanho do gene o tempo para atividade da polimerase a 72⁰C foi de 3 minutos e 3,5 minutos para o gene codificante para a proteína do capsídeo e o gene codificante para a proteína da RNA polimerase respectivamente. A Figura 45 mostra a representação das condições para PCR.

Figura 45 — Representação esquemática da condição da reação de amplificação dos genes virais.

O resultado foi analisado em gel de agarose com 1 % com brometo de etídio (0,5 µg / mL), em tampão TAE 1X (8 mM Tris-acetato pH 8,0, 0,2 mM EDTA). Os fragmentos do genes amplificados foram então purificados a partir do gel de agarose preparativo utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel Clean-Up System* (PROMEGA), de acordo com as condições do fabricante.

Clonagem dos genes nos vetores pET28a(+) e pET29a(+)

Os genes amplificados foram clonados nos vetores de expressão pET28a(+) e pET29a(+), o desenho dos primes foi feito de modo que no vetor pET28a(+) a proteína deveria ser expressa com uma cauda de histidina para purificação por colunas de afinidade e um sítio de trombina para clivagem dessa cauda, enquanto no vetor pET29a(+) a cauda de histidina não estaria presente.

Para a clonagem dos genes, o produto da PCR purificado do gel de agarose 1%, (descritos na seção anterior) e o vetor pET28a(+) (Novagen) foram digeridos utilizando as endonucleases de restrição Nde I e Xho I (BioLabs) com a reação de acordo com o manual do fabricante.

A reação de digestão foi incubada a 37 °C por 4 horas. Em seguida, os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e então purificados. O produto de digestão purificado foi submetido à ligação em vetor pET28a(+) digerido e purificado, seguindo o protocolo de reação descrito na manual do fabricante da enzima T4 DNA Ligase (Biolabs). A reação foi incubada por 16 horas a 16°C. Os plasmídeos resultantes passaram a serem designados como pET28a_Cap e pET29a_Cap codificantes para os genes do capsídeo em pET28a(+) e pET29a(+) e como pET28_Pol e pET29_Pol para os genes codificantes da RNA polimerase em pET28a(+) e pET29a(+).

Transformação dos plasmídeos em Células *E. coli* competentes

Foram feitas transformações dos quatro plasmídeos obtidos em células de *E. coli* BL21(DE3), BL21 roseta e BL21 *códon plus* preparadas de acordo com o protocolo estabelecido²⁹.

As células previamente descongeladas passaram pelo protocolo de transformação por choque térmico previamente estabelecido e de uso padrão³⁰: células descongeladas e incubadas no gelo por 30 minutos, choque térmico de 1 minuto em 42 °C e incubação em gelo por cinco minutos. Logo em seguida foram plaqueadas em meio sólido LB com os antibióticos adequados de seleção (30 µg / mL kanamicina).

Testes iniciais de Expressão

Células transformadas com os plasmídeos mencionados foram inoculadas, meio de cultura 2XYT (descrito anteriormente) contendo o antibiótico kanamicina na concentração de 30 µg / mL, e induzidas com 0,6 de densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm.

Para que fosse otimizada a expressão, foram analisadas e variadas diversas condições entre elas a tempo de indução (amostras da cultura foram analisadas a partir de 30 minutos até 16 horas), a quantidade de IPTG na indução (foram testadas amostras com variação de 0,1 a 1 mM de IPTG), e a temperatura de indução (variação entre 20 e 37 °C).

Durante a expressão, foram separadas alíquotas de cada etapa, que foram analisadas a SDS-PAGE 15%. O gel foi corado com 0,010% de *Comassie brilliant blue* e descorado com ácido acético 10%.

Otimização dos Códon e nova clonagem

Através do servidor *E. coli Codon Usage Analyzer 2.1*⁴⁹, foi possível fazer uma análise nos genes para verificar se continham códons não usuais para a bactéria *E. Coli*, (entende-se por códons não usuais para *E. coli* aqueles que tem menos de 10% de ocorrência no seu genoma).

Foi necessária então uma otimização dos códons para que a sequência pudesse ser expressa, os plasmídeos já clonados em pET28a(+) com os códons otimizados foram então comprados da empresa *Genscript*.

Já com os plasmídeos otimizados, foi então feita uma nova transformação nas cepas BL21 *Roseta* e BL21 *Artic Express*.

Testes condições de expressão para o aumento na solubilidade

Diversas tentativas de expressão foram feitas na cepa BL21 *Roseta* para que conseguir a proteína solúvel. Dentre as tentativas pode-se citar a mudança de meio de cultura.

Além dos meios LB e 2XYT foram também feitos testes utilizando-se o meio de cultura de autoindução, conhecido como ZYM 5052 (0,5 % de extrato de levedura, 25 mM Na₂HPO₄, 24 mM de KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,5% de Glicerol, 0,05% Glucose e 0,2% Lactose)⁵⁰.

O meio de autoindução foi desenvolvido graças à percepção de que a lactose é a responsável pela indução. A presença de 0,05% de glucose no meio de auto indução bloqueia efetivamente a indução de lactose no estado inicial de crescimento, quando o meio fica empobrecido de glucose, a lactose pode ter uma pequena parte absorvida em células não

induzidas e ser convertida para allolactose, o indutor natural, por β -galactosidase, o produto do lacZ⁵⁰.

Uma estratégia para melhorar o nível de expressão de proteínas recombinantes em forma nativa e solúvel é aumentar a concentração celular de osmólitos e/ou de chaperonas⁵¹.

Uma maneira de aumentar a produção de chaperonas durante um experimento de expressão de proteínas recombinantes é se acrescentar um passo de choque térmico. As *Heat Shock Proteins* (proteínas de choque térmico) são chaperonas moleculares, algumas dessas proteínas dirigem ativamente o processo de enovelamento proteico enquanto outras previnem a agregação proteica. Tem sido demonstrado que a solubilidade de algumas proteínas pode ser melhorada através da aplicação de um choque térmico antes da indução, provavelmente devido a indução de chaperonas⁵¹.

A acumulação de osmólitos nas células também é uma forma de estabilizar as proteínas em seu estado nativo. A acumulação intracelular de osmólitos pode ser através de síntese ou de absorção⁵¹.

Embora o mecanismo de estabilização não seja completamente compreendido, existem evidências mais favorecendo uma “teoria osmofóbica” (*osmophobic theory*): uma interação desfavorável aconteceria entre o osmólito e a proteína desnaturada causando uma desestabilização do estado denaturado ajudando a levar a proteína ao seu estado nativo. Isto resultaria em melhoria da estabilidade da proteína⁵¹.

Tem sido demonstrado com várias proteínas que alguns osmólitos, quando adicionados aos meios de cultura, auxiliam no enovelamento da proteína resultando em uma melhor solubilidade da proteína, a técnica de estresse osmótico pode se utilizar de sorbitol, glicil-betaína e altas concentrações salinas⁵¹⁻⁵².

Para o protocolo de expressão com adição do passo de choque térmico, cresceu-se uma cultura de células em 1 litro de meio LB com 1M de sorbitol, a 37 °C sob agitação de 250 rpm, ao se atingir a densidade ótica de 0,6 no comprimento de luz de 600 nm, foi acrescentado 1 mM de IPTG na cultura e imediatamente a cultura ficou durante 20 minutos a temperatura de 45 °C. Após o choque térmico de 20 minutos a cultura permaneceu por 12 horas (*overnight*) a 20 °C sob agitação de 250 rpm.

Também foi feito experimento com choque térmico e estresse osmótico salino, onde os passos de choque térmico foram feitos como descritos no parágrafo anterior, porém o meio de cultura utilizado foi o meio LB suprido com 0,5 M de NaCl, 1 mM de Glicil-Betaína e 0,2% de Glucose.

Foram realizados testes somente com o estresse osmótico, retirando-se a etapa de choque térmico, utilizando-se de Sorbitol, Glicil-betaína, e altas concentrações de NaCl nos meios de cultura já descritos.

Produção e purificação de proteína em condições desnaturantes para produção de anticorpo

Para a produção de proteínas foram crescidos, dois litros de cultura de células crescidas em meio LB, a 37 °C sob agitação de 250 rpm, induzidas com 1 mM de IPTG, *overnight*, 250 rpm a 20 °C.

As culturas foram centrifugadas (12000 rpm por 20 minutos), ressuspendidas em 100 mL de tampão (20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl e 8M de uréia), foram submetidas à ultrassonicação por 10 ciclos, no equipamento 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific). Cada ciclo corresponde a uma sonicação de 1 minuto com intervalo de 30 segundos em gelo, em seguida as células lisadas foram centrifugadas por 10 minutos a 10000 g a 4°C.

A primeira tentativa de purificação foi com a proteína do capsídeo desnaturada se utilizou o tampão: 10 mM de TrisHCl pH 7,5 e 150 mM de NaCl e a 8 M de uréia, utilizando a mesma concentração de uréia em todos os tampões de eluição. A purificação foi feita através da técnica de cromatografia de afinidade previamente descrita na seção 2.3.2.

Para a produção de anticorpos policlonais, contou-se com a ajuda da doutoranda Fernanda Cristina Costa que realizou as injeções de proteínas nos camundongos. Foram realizadas 4 inoculações com intervalos de 15 dias utilizando-se 100µl de proteína a uma concentração de 100 µg / mL adicionando a mesma quantidade de adjuvante de Freund completo na primeira injeção e incompleto nas inoculações seguintes.

Clonagem, transformação e Expressão da proteína capsidial em *Leishmania tarentolae*

Foi utilizando de um sistema de expressão comercial LEXSY, comercializado pela empresa *Jena Bioscience*, que combina as vantagens do sistema eucariótico (expressão, *folding* e modificações pós traducionais) com a facilidade dos sistemas de expressão bacteriana (promotor T7-TR), utilizando *Leishmania tarentolae*⁵³. A Figura 46 mostra o mapa do vetor pLEXSY-Ineo2, utilizado para clonagem.

Figura 46 – Mapa do vetor pLEXSY-Ineo2, comercializado pela empresa *Jena Bioscience*⁵³.

A amplificação do fragmento de interesse foi feita por meio do método de reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do plasmídeo que continha o genoma total do vírus e dos oligonucleotídeos descritos na Tabela 4, nas condições de reação recomendadas pelo fabricante (empresa FERMENTAS).

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da ORF do gene de interesse por meio de PCR

Sítio de Restrição e gene de interesse	Oligonucleotídeos
<i>Kpn</i> I - GGTAC C Capsídeo	ACG TAC GTC ATA TGG CTG ATA TAC CAA ACT CTG ATA AGA TTG C
<i>Nco</i> I – C CATGG Capsídeo	CTG ACT CGA GAA TTC AAG CGC AGC CTC CGT TGT CAC CGG TTT CG

Foram utilizados os programas Gene Runner⁴⁷ e BioEdit⁴⁸ para alinhamento dos fragmentos de nucleotídeos, verificação dos sítios de clivagem e cálculo das temperaturas de anelamento.

Ficou-se estabelecida a temperatura de anelamento, de 65⁰C, para melhoria do rendimento optou-se por utilizar 40 ciclos, devido ao grande tamanho do gene (2,2 kbp) o tempo de incubação a 72⁰C foi de 3 minutos. A Figura 47 mostra a representação das condições para PCR.

Figura 47 - Representação esquemática da condição da reação de amplificação do gene capsídeo para clonagem no vetor pLESXY_Ineo2.

O produto da PCR foi clonado no vetor pCR™2.1-TOPO® (Novagen) seguindo os protocolos do manual do fabricante⁵⁴. O vetor TOPO agora clonado com o gene do capsídeo, foi transformado em cepas de *E. coli* DH5α, foram selecionados clones e foram feitas reações de digestão para verificar se eram positivos. Após confirmação que se tratavam de clones positivos, foi inoculado 5 mL de meio de cultura LB com os quais foram feitas extração do DNA plasmidial.

O DNA plasmidial obtido foi digerido juntamente com o vetor pLEXSY_Ineo2 com as enzimas de restrição KpnI e NcoI, com protocolo fornecido no fabricante (Biolabs).

Após a digestão, o produto de digestão purificado foi submetido a uma reação de ligação no vetor também purificado a partir do gel de agarose, seguindo o protocolo de reação descrito na manual do fabricante da enzima T4 DNA Ligase (Biolabs). A reação foi incubada por 16 horas a 16°C.

Foram feitas reações de transformação *E. coli* DH5α, foram selecionadas cinco colônias, com as quais foram feitos estoques glicerizados (20 % de glicerol) e armazenados em -80 °C. Com essas colônias, foram crescidos 5 mL de cultura de células, e foi feita nova extração plasmidial, essas amostras passaram novamente por digestão pelas enzimas NcoI e KpnI para que fosse se fosse verificado se eram colônias positivas.

Uma vez verificado que se tratavam de colônias positivas, a colônia 5 foi selecionada. Foi crescida, a partir do estoque glicerizado da colônia 5, 350 mL de cultura de células de onde o plasmídeo foi novamente extraído e linearizado com a enzima de restrição Sma I. A reação foi feita de acordo com o manual do fabricante da enzima (Biolabs). Após sua linearização o DNA foi transformado por eletroporação em *L. tarentolae*, e selecionado por plaqueamento em meio sólido, de acordo com o protocolo contido no manual do fabricante do sistema de expressão pLEXSY (Jena Biosciences)⁵³.

Após quatro tentativas infrutíferas de transformação dos tripanosomas feitas, a aluna de iniciação científica Ana Laura Lima e a doutoranda Fernanda Cristina Costa se deslocaram para os laboratórios da empresa que comercializa este sistema de expressão (Jena Biosciences) na Alemanha onde puderam fazer novamente a transformação e seleção das cepas.

Tendo em mais colônias positivas após a transformação e seleção foram feitos testes iniciais de expressão segundo os protocolos descritos no manual da empresa, e foram

separadas alíquotas de cada etapa, que foram analisadas em SDS-PAGE 15%. O gel foi corado com 0,010% de *Comassie brilliant blue* e descorado com ácido acético 10%.

3.2.2 LRV *in vivo*

Organismos e Linhagens:

Para que fossem feitos experimentos de purificação do LRV *in vivo*, foi generosamente cedido pelo Professor Doutor Eurico Arruda Neto e a Professora Doutora Angela Kayse Cruz a linhagem de *Leishmania (Viannia) guyanensis* MHOM/BR/75/M4147, (M4147), a qual sabidamente é possuidora do vírus LRV1-4. Os promastigotas foram mantidos em meio de cultura M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2% de urina humana (masculina, recém-produzida e esterilizada), adenina [100 mM], hemina [10 mg / mL], HEPES [40 mM] (ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2 etanosulfônico) (pH 7,4), penicilina [50 unidades / mL] e estreptomicina [50 mg / mL].

Dr. Eurico Arruda Neto juntamente com o doutorando Marcus Vinicius Gomes da Silva, além de cederem as cepas de protozoário foram colaboradores nesse projeto e também nos foi ofereceram um clone obtido pelo doutorando Marcus Vinícius durante o seu mestrado a partir da cultura de cepas M4147. Esta cepa denominada clone 40, foi obtida por ele após múltiplas passagens de meio de cultura por um ano e meio de modo que esse clone não possui o *Leshmania* RNA Vírus⁴⁶.

Centrifugação biológica:

Muito embora a centrifugação não seja considerada uma tecnologia moderna tão importante quanto as técnicas aliadas a estudos do genoma humano, proteômica e terapia gênica, é ela, no entanto, que sustenta muitos destes métodos novos e interessantes. Grande

parte dessas novas tecnologias é dependente da capacidade de purificar as células, partículas subcelulares, vírus, proteínas e ácidos nucleicos com eficiência e eficácia⁵⁵.

Há que se destacarem três importantes propriedades de todas as partículas que sedimentam através de um meio líquido em um campo centrífugo: 1 – a taxa de sedimentação da partícula depende do diâmetro da partícula, 2 – a partícula somente sedimentará para um *pellet* estável se o campo gravitacional puder superar o movimento térmico aleatório da partícula, 3 – a viscosidade do líquido retarda a taxa de sedimentação de todas as partículas e 4 – o único outro parâmetro importante da partícula, não tão obvio num experimento simples, é a densidade⁵⁵.

Ao contrário de centrifugação padrão, que, com efeito, pode destruir as partículas contra a parte inferior do tubo de centrifugação, o método de *cushion* de sacarose não causa estresse mecânico e permite a coleta de partículas morfológicamente intactas. Para realização deste experimento a amostra é adicionada em uma solução com concentração de sacarose, em geral acima de 20% a partir de onde é feita a centrifugação diferencial.

Um meio de suspensão de partículas pode ser tomado em camadas sobre um líquido denso, em que a região de partículas se moveria abaixo através do líquido em uma taxa que depende de sua massa e tamanho, essa técnica de separação de moléculas é chamada de centrifugação gradiente. Na prática os gradientes podem ser contínuos (se o aumento é suave, mas não necessariamente de forma linear) ou descontínuos (gradientes construídos com faixas de aumento da concentração de solutos de forma semelhante a passos)⁵⁵. A Figura 48 mostra a diferença entre os gradientes contínuos e descontínuos.

Figura 48 — Perfil dos gradientes de densidade contínuos (esquerda) e de gradiente descontínuo direita⁵⁵.

Um gradiente de densidade, de sacarose descontínuo, por exemplo, é preparado por camadas sucessivas de soluções de densidades de sacarose decrescentes uma sobre a outra, de forma semelhante são feitos os gradientes descontínuos de outras soluções⁵⁶. A Figura 49 mostra um exemplo de montagem de um gradiente descontínuo de sacarose, trata-se de um gradiente com soluções entre 15 a 35% de sacarose, utilizado para purificação de mitocôndrias.

Figura 49 — Gradiente descontínuo de sacarose de 15 a 35% para purificação de mitocôndrias⁵⁷.

Soluções com metais pesados, como Cloreto de Césio, e meios de gradiente de densidade iodados (particularmente o iodixanol) podem formar uma solução de densidade uniforme sobre a influência do campo centrífugo⁵⁵.

Entre as soluções comerciais para o preparo de gradientes podem ser citados Opitiprep™ e o Nycodenz®.

Opitiprep™ é uma solução de 60% de iodixanol em água e Nycodenz® é um derivado tri-iodado do ácido benzóico com 3 cadeias laterais⁵⁷, ver Figura 50.

Figura 50 — Moléculas de Nycodenz® e Opitiprep™⁵⁷.

Durante as tentativas de purificação foram utilizadas *cushion* de sacarose; gradientes descontínuos de sacarose, Cloreto de Césio, Nycodenz® e Opitiprep™, também foram feitos gradientes contínuos de Opitiprep™ e Cloreto de Césio.

Extração de RNA, Reação de Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase

Os experimentos de extração de RNA, Reação de Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), foram feitos no Centro de Pesquisas em Virologia, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com colaboração do Professor Doutor Eurico Arruda Neto e do Doutorando Marcus Vinícius Gomes da Silva.

Os procedimentos de extração de RNA, fez-se uso do reagente TRIzol, comercializado pela empresa Invitrogen®, seguindo exatamente os protocolos descritos no manual do fabricante.

Para que houvesse uma padronização dos procedimentos experimentais entre os dois grupos que trabalhavam com o vírus procurou-se usar sempre os mesmos protocolos, que estão descritos na dissertação de mestrado de Marcus Vinícius Gomes da Silva⁴⁶.

Para a PCR, utilizados foram sintetizados primers com produto da reação de 500 pares de base, a Figura 51 mostra a localização desses *primers* no gene do capsídeo e sua sequência.

Figura 51 – Primers utilizados para reação de PCR após a extração do RNA e o produto esperado.

Também foram usados os mesmos *primers* de uso contínuo do doutorando Marcus Vinícius Gomes da Silva descritos em trabalho de mestrado⁴⁶, tratam-se de oligonucleotídeos na região 5'UTR, cujo produto da reação deve ter 100pb.

Microscopia Eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica é uma excelente ferramenta para estudo estrutural em biologia, na área de virologia, em particular, podem-se ter importantes informações a respeito da morfologia viral através das imagens obtidas por um microscópio eletrônico.

Existem dois tipos de microscópio eletrônico: MET – Microscópio Eletrônico de Transmissão e MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura.

Enquanto no MET o feixe de elétrons passa através das amostras, produzindo imagens bidimensionais, o MEV produz uma imagem tridimensional da superfície da amostra, nesse

caso o feixe de elétrons somente varre a superfície externa do material biológico⁵⁸. A Figura 52 ilustra a diferença entre esses dois tipos de microscopia.

Figura 52 – Imagem ilustrando os princípios da microscopia eletrônica de transmissão (o feixe de elétrons passa através das amostras) e varredura (feixe de elétrons varre a superfície da amostra), imagem adaptada⁵⁹.

Negative staining, é um método estabelecido usado em microscopia de diagnóstico para contrastar uma amostra com um fluido opticamente opaco. Essa técnica tem sido amplamente aplicada ao estudo de partículas biológicas desde final dos anos 1950 e continua a ser um método eficaz e útil nas mãos de numerosos microscopistas para uma ampla gama de amostras biológicas. *Negative staining* é simples, rápido, altamente reprodutível e conduz a nítidas imagens de alto contraste. Recentes melhorias na coloração negativa (*negative*

staining) indicam fortemente que, com o aperfeiçoamento técnico contínuo resoluções um pouco melhores podem ser obtidas⁶⁰.

Amostras de tecidos biológicos em METs podem utilizar pigmentos de alto número atômico para realçar contraste. O pigmento absorve elétrons ou dispersa parte do feixe de elétrons que de outra forma seria projetado sobre o sistema de imagem. Compostos de metais pesados tais como o ósmio, chumbo ou urânio podem ser usados previamente para depositar seletivamente átomos densos em elétrons sobre a amostra em regiões celulares ou proteicas desejadas.

Nesta etapa do trabalho foi contada com o auxílio dos Doutores Rodrigo Villares Portugal e Jéferson Bettini do LNNano em Campinas/SP.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Proteínas recombinantes

Uma análise inicial no servidor PROTPARAM³⁵ mostrou que a proteína do capsídeo do LRV1-4 tem um massa de 81,96 kDa, ponto isoelétrico teórico de 6,11 e um coeficiente de extinção de 97180 (para o caso de todas as cisteínas estarem reduzidas).

A presença de uma grande quantidade de resíduos de aminoácidos de cisteína é uma característica marcante dessa proteína, uma vez que são encontrados 24 resíduos de cisteína, totalizando 3,2% dos aminoácidos dessa proteína, o que poderia ocasionar pontes dissulfeto inespecíficas e dificultar o enovelamento correto da amostra, formação do capsídeo e também por consequência sua solubilidade. E o seu coeficiente de extinção é de 97180 (para o caso de todas as cisteínas estarem reduzidas).

Também se fez uso do servidor PROTPARAM³⁵ para a análise da RNA polimerase viral, verificou-se que sua massa teórica é de 99,1 kDa, seu ponto isoelétrico teórico é de 8,55 e possui 24 resíduos de cisteína, representando assim 2,7% dos aminoácidos presentes na proteína. . E o seu coeficiente de extinção é de 136140 (para o caso de todas as cisteínas estarem reduzidas).

Os produtos da reação em cadeia de polimerase dos genes que codificam as proteínas para o capsídeo e para a polimerase foram clonados nos vetores pET28a(+) e pET29a(+), para que se fosse obtidas com cauda de histidina e sem cauda de histidina respectivamente. Os géis de agarose 1% mostrando as amplificações desses genes são mostrados na Figura 53.

Figura 53 — PCR dos genes do capsídeo (a) e polimerase (b).

Os produtos de PCR clonados nos vetores do sistema pET foram então transformados nas linhagem de *E. coli* BL21(DE3), BL21 *roseta* e BL21 *códon plus*. Foram então feitos testes de expressão variando as condições de temperatura de indução, concentração de IPTG, tempo de indução em cada uma das quatro construções, nas três linhagens diferentes; ao todo foram realizados mais de 40 testes de expressão. Uma vez não sendo verificada superexpressão em nenhuma delas algumas condições foram escolhidas para que fosse verificada se havia uma expressão que não fosse possível de ser verificada a olho nu em gel. Para verificar essa possibilidade foram feitos testes iniciais de purificação na coluna de afinidade e *Western Blot* anti *his tag* (no caso das cepas com cauda de histidina). Não foi verificada nenhuma expressão considerável em nenhum dos casos.

Foi então feita uma análise dos códons raros presentes através do programa *E. coli Codon Usage Analyzer 2.1*⁴⁹. O programa mostrou que para a proteína do capsídeo nos primeiros 750 pares de base 19% dos códons eram não usuais para *E. coli* (considera-se não usuais códon que aparecem com frequência menor que 10% no genoma). A Figura 54 mostra

um gráfico de análise dos primeiros 150 códons do gene codificante do capsídeo com a frequência que esses códons aparecem no genoma da bactéria.

Figura 54 — Análise dos códons raros para *E. coli* no gene codificante para a proteína do capsídeo, em vermelho aparecem os códons considerados raros.

Para o caso do gene codificante para a RNA polimerase a situação foi ainda mais crítica: 23% dos primeiros 750 pares de base são códons raros para *E. coli*, a Figura 55 mostra um gráfico com as frequências dos primeiros 150 códons do gene que codifica para a polimerase viral. O que provavelmente seria um dos fatores dificultadores para a expressão.

Figura 55 — Análise dos códons raros para *E. coli* no gene codificante para a polimerase viral, em vermelho aparecem os códons considerados raros.

Foi então feita uma otimização dos códons e estruturas dos genes pela empresa *Genscript* de modo a otimizar a expressão em *E. coli*, as construções otimizadas foram compradas já clonadas em pET28a(+) tanto para a proteína do capsídeo quanto para a RNA polimerase.

O plasmídeo com construção com o gene codificante para a proteína do capsídeo foi transformado em *E. coli Roseta*, onde foram feitos testes iniciais de expressão, com 250 mL do meio de cultura 2XYT a 37°C, indução com 1 mM de IPTG, tempo de duas horas para expressão. A cultura de células foi centrifugada por 20 minutos em 12000 rpm, ressuspensa em 12,5 mL de tampão de lise (10 mM de TrisHCl pH7,5, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM PMSFe 0,1 % Triton X 100) e lisada por sonicação (10 ciclos sendo cada ciclo 1 minuto de sonicação e 30 segundos de intervalo) e novamente centrifugada 10 minutos 8000 rpm, a Figura 56 mostra o SDS-PAGE 10% das frações do pellet e do sobrenadante resultantes desse teste inicial de expressão.

Figura 56 – SDS-PAGE 10% mostrando as frações solúveis e insolúveis da amostra resultante do teste de expressão com códons otimizados, a seta indica a banda da proteína superexpressa.

Para se conseguir resolver o problema de solubilidade, foram feitos testes para que a proteína chegasse ao enovelamento correto para formação do capsídeo, foram feitos testes de expressão com temperaturas mais baixas, variação de IPTG a partir de 0,1 mM, e variação de tempo de indução variado a partir de 30 minutos até *overnight* (16 horas) nas temperaturas de 20 °C, 30 °C e 37°C.

Além dos testes de expressão convencionais para melhoria da expressão e solubilidade também foram feitos testes de expressão em meio autoindutor, expressão com estresse osmótico de sorbitol, expressão com estresse osmótico de betaína, expressão com estresse

osmótico salino, expressão com choque térmico e estresse osmótico por sorbitol juntos, descritos na seção referente a materiais e métodos.

Foi feita também uma transformação do plasmídeo em BL21 *Artic Express*, já que esta cepa permite expressões em baixíssimas temperaturas (até 12 °C). Foram feitos então novos testes na temperatura de 12 °C 14 °C e 16°C com variações de IPTG (0,1 mM e 1 mM) e tempo de indução (a partir de 30 minutos até *overnight*). Nenhum dos protocolos testados foi capaz de produzir a proteína na fração solúvel.

Não sendo possível a produção da proteína na fração solúvel foi feita uma expressão para que fosse feita uma purificação desnaturante por cromatografia de afinidade a partir da proteína presente no *pellet* celular para produção de anticorpos.

As células foram crescidas em dois litros de meio de cultura 2XYT, até a densidade ótica de 0,6 e induzidas com 1 mM de IPTG e mantidas em 20 °C *overnight*, as células foram centrifugadas por 20 minutos a 12000 rpm. Para ressuspender as células foi utilizado um tampão contendo 10 mM de TrisHCl pH7,5, 150 mM NaCl, 10 mM DTT 0,1 % de Triton X-100 e 8M de ureia, a amostra permaneceu nesse tampão por 16 horas. Após a incubação com o tampão denaturante a amostra foi novamente centrifugada (10 minutos 10000g) e o sobrenatante foi utilizado na purificação denaturante na coluna de afinidade TALON™ *Metal Affinity Resin* (BD Biosciences). A coluna possuía volume de 2 mL e as lavagens foram de 5 mL (2,5 volumes de coluna), com concentrações crescentes de imidazol, as quais podem ser observadas na Figura 57 que mostra o SDS-PAGE 10%, com as frações purificadas.

Figura 57 – SDS-PAGE 10% da purificação denaturante da proteína do capsídeo com lavagens crescentes de imidazol na coluna TALON™ Metal Affinity Resin (BD Biosciences).

A amostra purificada passou por diálise em concentrador com corte de 50 kDa para retirada do imidazol. A amostra em seguida foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais em camundongos, com ajuda da doutora Fernanda Cristina Costa. Os anticorpos produzidos foram testados em *Western Blot* e apresentaram uma titulação ruim e demonstraram ter grande inespecificidade tanto quando testadas em extrato de bactéria quanto em extrato de leishmania.

Os testes de expressão da RNA polimerase com códons otimizados para *E. coli* foram desenvolvidos pela aluna de iniciação científica do curso de Ciências Físicas e Biomoleculares Ana Laura Lima.

O plasmídeo com construção com o gene codificante para a polimerase viral foi transformado na cepa BL21 (DE3), foram feitos testes iniciais de expressão, com 250 mL do meio de cultura 2XYT a 37°C, indução com 1 mM de IPTG, tempo de duas horas para expressão, também foram feitos testes a baixas temperaturas (20 °C), foi variada a quantidade

de IPTG (0,1 mM), foi também monitorado o tempo de indução a partir de 30 minutos até a expressão *overnight*, o resultado observado sempre era morte celular após a indução ou diminuição do número de células, quando não ocorria a morte celular não era observada nenhuma banda superexpressa, nem mesmo o *Western Blot* com anticorpo anti *his tag* mostrou a presença da proteína recombinante.

Para demonstrar a possível letalidade para *E. coli* da proteína recombinante, amostras das cepas BL21 (DE3) foram plaqueadas em meio LB sólido com 50 mg / mL de kanamicina. Foram feitas duas placas, em uma delas, no entanto foi adicionado 1 mM de IPTG, somente a placa que não continha IPTG foi observado o crescimento de colônias.

Foi então feita uma transformação, por protocolo de choque térmico conforme descrito anteriormente, em cepas BL21 pLys. Novas tentativas de expressão foram feitas com 0,1 e 1 mM de IPTG e monitorando a expressão com o tempo (a partir de 30 minutos). Em nenhuma das condições testadas foi possível visualizar a banda superexpressa da proteína em questão em SDS-PAGE 10%, também não foi possível verificar a presença da proteína em *Western Blot* contra a cauda de histidina.

Todos os testes levam a crer que se trata de uma proteína letal para *E. coli*, impossibilitando assim sua expressão. A letalidade desta proteína pode estar ligada a sua atividade polimerase e / ou a sua possível ligação com moléculas de RNA.

Uma vez tendo sido testados os principais protocolos disponíveis para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* passou-se a utilizar o sistema de expressão eucarioto pLEXSY da empresa Jena Bioscience.

Foram feitos novos primers para a clonagem no vetor pLEXSY_Ineo2 e a partir deles foi feita uma PCR com a qual foi possível realizar a clonagem no vetor pCR™2.1-TOPO® (Novagen), uma vez estando com o gene de interesse no vetor de clonagem foi possível obter uma quantidade maior do gene para clonagem no vetor pLEXSY_Ineo2

Tendo já clonado no vetor pLEXSY_Ineo2 foi feita uma digestão com as enzimas NcoI e KpnI para verificação da presença do gene no vetor, a Figura 58 mostra o gel de agarose 1% das colônias 3, 4 e 5 obtidas na transformação do vetor pLEXSY_Ineo2 em *E. coli* DH5α.

Figura 58 – Gel de agarose 1% usado para verificação das colônias obtidas, digestão dos plasmídeos extraídos dos colônias 3, 4 e 5 pelas enzimas NcoI e KpnI.

Já sabido que se tratavam de colônias positivas, passou-se a linearização do plasmídeo (com a enzima Sma I) para transformação por eletroporação em *L. tarentolae*.

Foram realizadas quatro tentativas de transformação por eletroporação sem sucesso.

A aluna de iniciação Ana Laura Lima e a doutora Fernanda Cristina Costa, fizeram então a transformação nos laboratórios da empresa Jena Bioscience, que comercializa os kits de expressão PLEXY. Também nos laboratórios da empresa foram realizados testes de expressão iniciais, contudo nenhuma superexpressão foi observada. Outros testes, no entanto, precisam ser feitos para que seja verificada se há uma expressão pequena de proteínas.

3.4.2 Purificação do Vírus *in vivo*

Uma vez que mais de uma centena de testes de expressão das proteínas recombinantes do capsídeo e a RNA polimerase foram infrutíferas, optou-se pela purificação *in vivo* do vírus.

Há que se lembrar de que um fator dificultador dessa purificação seria a pouca quantidade do vírus presente nas culturas de leishmanias, já que o anticorpo policlonal produzido não possuía uma titulação adequada para verificação da presença da proteína do capsídeo.

Optou-se então por acompanhar os passos de purificação através da extração do RNA total, reação de transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

As cepas de *L. guyanensis* foram cultivadas como descrito na seção de materiais e métodos, até o estado estacionário, onde haveria uma quantidade maior de vírus. A Figura 59 mostra foto das células em cultura.

Figura 59 — Cultura de *L. guyanensis* em meio M 199, esta cepa sabidamente é possuidora do vírus LRV1-4.

Antes de ser iniciada a purificação foi necessário que fosse estabelecida uma nova metodologia para a lise celular dos tripanosomas de modo que evitasse a perda de partículas virais sendo “*pelletadas*” e se garantisse que as células haviam se rompido.

Uma nova lise foi estabelecida. Para o novo protocolo de lise, as células eram crescidas até o pico máximo de carga viral, três dias após o início do estado estacionário (no estado estacionário a cultura era de 10^7 parasitas / mL), após isso eram centrifugadas a 3000g por 10 minutos e ressuspendidas em tampão contendo 10 mM de TrisHCl pH7,5, 150 mM NaCl, 10 mM DTT 0,1 % de Triton X-100, que era armazenada overnight em -20°C . O descongelamento dessa amostra era feito em gelo, passado por sonicação (cada ciclo de 20 segundos com intervalo entre eles de 20 segundos). A amostra era centrifugada a 3000g por 10 minutos, era separado o sobrenadante e novamente centrifugado nas mesmas condições, mais uma vez o sobrenadante era separado e novamente centrifugado da mesma maneira. Para se evitar a presença de material genético que poderiam dificultar a filtragem em filtros de esterilização, a amostra passava por uma filtragem num filtro contendo micro tubos de vidro e após isso era filtrada num filtro com poros de $0,22\text{ }\mu\text{m}$, uma vez filtrada a amostra passava pelo concentrador com corte de 100 kDa. A Figura 60 mostra um organograma com o esquema dessa nova lise.

Figura 60 — Organograma mostrando o esquema da nova lise desenvolvida para um maior rendimento de partículas virais na purificação *in vivo*.

Para que ser estabelecido o primeiro passo de purificação, foram testados diversos métodos de purificação por centrifugação: *culshion*, gradientes auto formados e gradientes descontínuos (sacarose, cloreto de cézio, Opitiprep™ e Nycodenz®), todos esses protocolos foram testados mais de uma vez com variação de tempo e velocidade de ultracentrifugação.

Contudo, o melhor resultado obtido e que passou a ser utilizado foi o gradiente 10% a 50% de Opitiprep™. Esse gradiente era formado com a adição de frações de 400 µL contendo 10, 20, 30 40 e 50% de iodixanol e 200 µL da amostra a ser purificada obtida pelo protocolo de lise, com 3 horas de duração a 350000 g. Ao fim do processo o gradiente era fracionado em 10 frações, com as quais era medido o índice de refração e foi feito o RT-PCR para identificar a presença do vírus. A Figura 61 mostra uma tabela com os índices de refração obtidos no gradiente, o gel de agarose 1% com o resultado do RT-PCR feito a partir da extração de RNA das 10 frações do gradiente e o SDS-PAGE das dez frações.

Figura 61 – Análise das dez frações obtidas no gradiente, com seu índice de refração e o gel de agarose 1% das amostras do RT-PCR, com 30 ciclos, onde c+ e c- são os controles positivos e negativos, abaixo é mostrado o gel SDS-PAGE 10% das frações.

Outro gradiente idêntico foi feito, entretanto, desta vez optou-se por modificar a análise, neste experimento fez-se um RT-PCR semi-quantitativo, no qual foram utilizadas PCR com ciclos de 20, 25 e 30 ciclos. O resultado desse experimento (géis de agarose com as três PCRs, gel de agarose e o índice de refração deste gradiente) é visualizado na Figura 62.

Figura 62 – Análise das dez frações obtidas no segundo gradiente, com seu índice de refração e o gel de agarose 1% das amostras do RT-PCR, com 20, 25 e 30 ciclos, onde c+ e c- são os controles positivos e negativos, acima é mostrado o gel SDS-PAGE 10% das frações.

Uma vez determinado o índice de refração correspondente a densidade que era esperada encontrar o vírus, foi possível fazer uma purificação por cromatografia de exclusão molecular.

A etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular foi necessária para a retirada do Opitiprep™ do tampão, uma vez que a sua retirada não foi possível através de diálise convencional ou diálise por concentrador.

Nessa etapa as 4, 5 e 6 foram submetidas a gel filtração na coluna Superdex 200 HR 10/300 (GE) acoplada ao sistema de cromatografia AKTA Explorer10 (GE)

A amostra de proteína pura, foi aplicada na coluna previamente equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl 10mM de DTT. O fluxo de corrida foi de 0,5 mL / min e o andamento da purificação foi monitorado a 280 nm por espectrofotometria. Foram eluídas frações de 1 mL que tiveram seu RNA extraído e passaram novamente por análises através de RT-PCR. A Figura 63 mostra o perfil cromatográfico da gel filtração e o gel de agarose 1% com o resultado da RT-PCR para da fração 4 do gradiente mostrado anteriormente.

Figura 63 — Perfil comatográfico da gel filtração da amostra 4 do gradiente e o gel de agarose 1% com o RT-PCR das frações eluídas da gel filtração onde c+ e c- são os controles positivos e negativos e PCR- o controle negativo da PCR.

A cromatografia de exclusão molecular foi feita porque o composto Opitiprep™ tem metais pesados na sua composição e impediria a microscopia eletrônica por transmissão com *negative staining*.

Uma vez feita esta a gel filtração, como última etapa de purificação e preparação das amostras para serem utilizadas na microscopia foi feita uma junção das frações 3, 4 e 5 e outra junção das frações 12, 13 e 14 que foram concentradas em um concentrador com corte de 100 KDa e utilizadas para confecção das grades.

As grades para microscopia eletrônica de transmissão foram feitas no LNNano pelo Doutor Rodrigo Villares Portugal e pelo Doutor Jéferson Bettini, que auxiliaram em todos os experimentos de microscopia.

Nas imagens obtidas nas frações 3, 4 e 5 foi possível uma visualização com clareza dos capsídeos virais, que apresentaram forma e tamanho que eram esperados para este *totiviridae* de acordo com a literatura. A Figura 64 e a Figura 65 mostram duas imagens obtidas na microscopia da grade feita com a amostra concentrada das frações 3, 4 e 5.

Figura 64 – Foto da MET das amostras concentradas das frações 3, 4 e 5 eluídas da gel filtração (comprimento da barra 50nm), a seta vermelha indica os capsídeos virais.

Figura 65 — Segunda foto de MET das amostras concentradas das frações 3, 4 e 5 eluídas da gel filtração (comprimento da barra 50nm), a seta vermelha indica o capsídeo.

O mais surpreendente e inédito nesse trabalho, no entanto, trata-se da microscopia das frações 12, 13 e 14 concentradas, onde foi possível ser observado, pela primeira vez, o material genético envolvendo as partículas virais. Isto pode ser observado nas imagens da Figura 66 e 67, que mostram fotos de MET dessas amostras. Também podem ser observadas regiões onde pode-se sugerir a formação de novos capsídeos.

Figura 66 – Fotografia da MET das amostras concentradas das frações 12, 13 e 14 eluídas da gel filtração (comprimento da barra 50nm), as setas vermelhas mostram a localização dos capsídeos, as setas amarelas mostram o ácido nucleico, as setas brancas indicam regiões onde podem ser sugeridas a formação de novos capsídeos.

Figura 67 – Segunda imagem de MET das amostras concentradas das frações 12, 13 e 14 eluídas da gel filtração (comprimento da barra 50nm), as setas vermelhas mostram a localização dos capsídeos, as setas amarelas mostram o ácido nucleico, a seta branca indica uma região onde pode ser sugerida a formação de um novo capsídeo.

O fato de ter sido encontrado fita de material genético juntamente com o vírus é condizente com pelo menos dois dados mencionados na literatura: primeiro, é sabido que o capsídeo viral possui atividade de endoribonuclease, clivando seu próprio RNA, e segundo, o modelo de replicação para vírus de fita simples de RNA prevê que a fita simples de RNA genômico viral seja excretada pelos poros do vírus quando replicada por sua RNA polimerase.

3.5 CONCLUSÕES:

Após mais de uma centena de experimentos de expressão, não foi possível estabelecer uma expressão recombinante de nenhuma das proteínas codificadas pelo *Leishmania* RNA Vírus 1-4, contudo ainda existe a possibilidade de se obter a proteína recombinante no sistema de expressão PLEXY em *L. tarentolae*.

A metodologia empregada na lise celular e o novo protocolo estabelecido para purificação celular permitiram uma façanha inédita: a visualização do vírus envolvido por fita de material genético.

Não se tem notícia na literatura de algum outro *totiviridae* ter sido purificado envolto em fita de material genético, o que torna este trabalho promissor no sentido de confirmar hipóteses anteriores sobre a replicação do vírus de leishmania.

Esse resultado abre portas para que novos experimentos estruturais sejam realizados no futuro de acordo com esses protocolos para uma melhor compreensão estrutural (e por consequência compreensão de suas funcionalidades).

3.6 PERSPECTIVAS

O presente trabalho abre as portas para novas perspectivas de experimentos de microscopia com a presença do RNA, há que se destacar uma nova microscopia com marcação das moléculas de RNA assim como uma crio microscopia eletrônica.

No que se refere a microscopia eletrônica há que se melhorar a quantidade de amostras virais, para isso pode ser necessária grandes quantidades de cultura de protozoários, podendo ser necessário a cultura em fermentadores.

Há também que se fazer outra purificação em condições desnaturantes da proteína capsidial para a produção de um anticorpo de melhor titulação e com maior especificidade, capaz de ser uma ferramenta útil para experimentos de biologia molecular com o LRV1-4.

REFERÊNCIAS

- 1 RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia do invertebrados**. 6a ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 1996.

- 2 MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

- 3 OCEAN EXPLORER. Disponível em:
<http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/06fire/background/microbiology/media/universal_tree2hotbugs.html>. Acesso em: 2 Apr. 2012.

- 4 DESCHAMPS, P. et al. Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that *Trypanosomatids* arose from within *Bodonids*. **Molecular Biology Evolution**, v.28, n.1, p.53-58, 2011.

- 5 DOTTA, M. A. V. O. **Estudos com a poli-A binding protein 1 de Trypanosoma brucei sugerem nova função nos eventos de splicing e exportação nuclear**. 2011. 165p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

- 6 SILVA, M. T. A. **Identificação e caracterização funcional de proteínas específicas do complexo U5 snRNP em Tripanosomatídeos**. 2009. 98p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

- 7 WANG, A. L. & WANG C. C. Viruses of protozoa. **Annual Review of Microbiology**, v.45, p.251-263, 1991. DOI: 10.1146/annurev.mi.45.100191.001343

- 8 IVES, A. et al. Leishmania RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Science**, v. 331, n. 6018, p. 775-778, 2011.

- 9 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - first WHO report on neglected tropical diseases, 2010. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf. Acesso em 5 Apr. 2012.

10 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger** - principles of biochemistry. 5th ed. New York: W. H Freeman and Company, 2010. 1158p.

11 WAHL, M. C.; WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 701-18, 2009.

12 AMBRÓSIO, D.L.; Spliceosomal Proteomics in *Trypanosoma brucei* Reveal New RNA Splicing Factors. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 7, p. 990–1000, 2009.

13 NEWMAN, A.; The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 19, p. 5797-5800, 1997.

14 REUTER, K. et al. Identification, characterization and crystal structure analysis of the human spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kD protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 2, p.515-525, 1999.

15 ZHANG, U. Z. et al. Structure, stability, and function of hDim1 investigated by NMR, circular dichroism, and mutational analysis. **Biochemistry**, v. 42, n. 32, p. 9609-9618, 2003.

16 JIN, T.; GUO, F.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Z. Identification of human dim1 as a peptidase with autocleavage activity. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 68, n. 5, p. 266-272, 2006.

17 SILVA, I. R. **Estudos biofísicos da selenofosfato sintetase de *Escherichia Coli* e investigação de seu papel na via de biossíntese de selenocisteínas**. 2012. 140p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

18 GASTEIGER, E. et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003.

19 NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - . NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 04 Mar. 2012.

20 MARCHLER, A. B. et al. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 281-283, 2002.

21 SCHULTZ, J. et al. SMART, a simple modular architecture research tool. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 5857-5864, 1998.

22 LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X - version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

23 COLE, C.; BARBER, J. D.; BARTON, G. J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research**, v.36, p. W197-W201, 2008. Supplement 2.

24 Jpred 3. University of Dundee. Disponível em: < <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/help.html> >. Acesso em 5 Mar. 2012..

25 KACZANOWSKI, S.; ZIELENKIEWICZ, P. Why similar protein sequences encode similar three-dimensional structures? **Theoretical Chemistry Accounts**, New York, v. 125, n. 3-6, p. 643-650, 2010.

26 BLAST. Basic local alignment search tool. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 10 Mar. 2012.

27 KIEFER F, et al. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**. v. 37, p.D387-D392, 2009.

28 SAVES. Structural analysis and verification server. Disponível em: <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>. Acesso em: 12 Mar. 2012.

29 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, 2000. v. 3.

30 MANZINE, L. R. **Identificação de elementos estruturais no tRNAsecua determinantes da ligação com proteínas**. 2011. 159p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

31 SVERGUN, D. I. Small-angle X-ray and neutron scattering as a tool for structural systems biology. **Biological Chemistry**, v. 391, n. 7, p. 737-743, 2010.

32 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, p. 101-109, 2010.

33 CANTOR, C.R.; SHIMMEL, P.R. **Biophysical chemistry**: part II – techniques for the study of biological structure and function. New York: Freeman and Co., 1980.

34 DUCRUIX, A.; & GIEGÉ, R. **Crystallization of nucleic acids and proteins**. a practical approach. Oxford: IRL Press, 1992.

35 EXPASY. Disponível em: <http://web.expasy.org/protparam/>. Acesso em: 08 de março de 2012.

36 GUPTA, V.; DEEP, A. An insight into the Leishmania RNA virus. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 1, p.7-9, 2007.

37 TARR, P. I. et al. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9572-9575, 1988.

38 STUART, K. D., Weeks, R.; Guilbride L.; Myler P. J. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 18, p. 8596-8600, 1992.

39 SCHEFFTER, S.; WIDMER, G.; PATTERSON, J. L. Complete sequence of Leishmania RNA virus 1-4 and identification of conserved sequences. **Virology**, v.199, n. 2, p.479-483, 1994.

40 RO, Y. T. et al. Evidence that the fully assembled capsid of Leishmania RNA virus 1-4 possesses catalytically active endoribonuclease activity. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 36, n. 2, p. 145-156, 2004.

41 WEEKS, R.; ALINE, R. F.; MYLER JUNIOR, P. J., STUART, K. LRV1 viral particles in *Leishmania guyanensis* contain double-stranded or single-stranded RNA. **Journal of Virology**, v.66, n.3, p. 1389-1393, 1992.

42 WICKNER, R. B. Double-stranded RNA virus replication and packaging. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 6, p. 3797-3800, 1993.

43 ZHAI, Y. et al. Isolation and full-length sequence analysis of *Armigeres subalbatus* totivirus, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (Artivirus) of the family Totiviridae; **Journal of General Virology**, v. 91, n. 11, p. 2836–2845, 2010.

44 GOODMAN, R. P.; GHABRIAL, S. A.; FICHOROVA, R. N.; NIBERT, M. L. Trichomonasvirus: a new genus of protozoan viruses in the family totiviridae. **Archives of Virology**, v. 156, n. 1, p. 171–179, 2001.

45 WIDMER, G.; DOOLEY, S. Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 12, p.2300-2304, 1995.

44 GOODMAN, R. P.; GHABRIAL, S. A.; FICHOROVA, R. N.; NIBERT, M. L. Trichomonasvirus: a new genus of protozoan viruses in the family totiviridae. **Archives of Virology**, v. 156, n. 1, p. 171–179, 2001.

45 WIDMER, G.; DOOLEY, S. Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 12, p.2300-2304, 1995.

46 SILVA, M. V. G. **Estudos sobre a interação de *Leishmania* RNA vírus 1-4 com *Leishmania (Viannia) guyanensis***. 2010. 62p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

47 GENE RUNNER. Molecular biology analysis program. Disponível em: <http://www.uoguelph.ca/~djoosephy/lab/handbook_generunner.html>. Acesso em: 20 May 2010.

48 BIOEDIT. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>>. Acesso em: 22 May 2011.

49 *E. coli* CODON USAGE ANALYZER 2.1 Disponível em:

<<http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm>>. Acesso em: 20 de maio de 2010.

50 SUTIDER, S.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 207-234, 2005.

51 OGANESYAN, N; ANKOUDINOVA, I.; KIM, S. H.; KIM, R. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. **Protein Expression and Purification**. v. 52, p. 280–285, 2007.

52 BLACKWELL, J. R.; HORGAN, R. A novel strategy for production of a highly expressed in an active form. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 295, n. 1.2.3, p. 10-12, 1991

53 Manual: LEXSInduce 2 Expression Kit. Disponível em: <<http://www.jenabioscience.com>>. Acesso em: 10 Apr. 2011.

54 USER GUIDE TOPO® TA Cloning® Kit. Disponível em:

<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf> Acesso em: 20 Apr. 2011

55 GRAHAM, J. **Biological centrifugation**. New York: Bios Publishers Ltd., 2001.

56 SUCROSE GRADIENT SEPARATION PROTOCOL. Disponível em:

<http://www.mitosciences.com/PDF/sg.pdf>. Acesso em: 09 Mar. 2012.

57 AXIS SHIELD DENSITY GRADIENT MEDIA. Disponível em: <<http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/>>. Acesso em: 09 de março de 2012.

58 MELO, R. C. N. **Células & microscopia: princípios básicos e práticas**. Juiz de Fora: Editora UFJF, 2002.

59 DUDKIEWICZ, A. et al. Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 28-43, 2011.

60 ADRIAN, M.; DUBOCHET, J.; FULLER, S.D.; HARRIS, R. Cryo-negative staining. **Micron**, v. 29, n. 2-3, p.145-160, 1998.

APÊNDICE A – Artigo no formato de “*short communication*” a ser submetido

New protocol of lyses and purification of Leishmania RNA virus allowed the first image of TEM of totiviridae with nucleic acid

Marcos Michel de Souza, Livia Regina Manzine, Marcus Vinicius Gomes da Silva, Rodrigo Villares Portugal, Jéferson Bettini, Angela Kaisel Cruz, Eurico Arruda Neto, Otávio Henrique Thiemann

Abstract: *Leishmania* RNA virus is dsRNA viruses, member of the *Totiviridae* family, LRV1 in the metastasizing parasites subverted the host immune response to *Leishmania* and promoted parasite persistence. In this work was development a new protocol of lyses and purification for LRV1-4. The methodology used in cell lyses and new purification protocol established allowed an unprecedented feat: the visualization of the *Totiviridae* virus involved of genetic material, that could be important for understand the auto cleavage activity and replication process.

Leishmania RNA virus is double-stranded (ds) RNA viruses classified as a member of the *Totiviridae* family of viruses (1), 32-nm-diameter (2), the genome size is approximately 5,280 nucleotides (nt), and two large open reading frames (ORFs) are present in both isolates (3).

Fully assembled capsid of *Leishmania* RNA virus 1-4 possesses catalytically active endoribonuclease activity and the cleavage of Leishmanivirus RNA transcripts functions in the maintenance of a low-level persistent infection, the ability to exist as a persistent infection must require a regulatory mechanism that maintains the number of virions per cell within a range compatible with cellular function (3-4). Cleaving the 5' end off of positivesense, genome-length viral transcripts could serve to remove those cleaved RNAs from the replication cycle and therefore reduce the viral load on a cell. Such a cleavage mechanism may be used to maintain a persistent infection (3-4).

The mechanisms involved in lesion development of Mucocutaneous leishmaniasis are poorly understood, however was showed that metastasizing parasites have a high *Leishmania* RNA virus-1 (LRV1) burden that is recognized by the host Toll-like receptor 3 (TLR3) to induce proinflammatory cytokines and chemokines. Paradoxically, these TLR3-mediated immune responses rendered mice more susceptible to infection, and the animals developed an increased footpad swelling and parasitemia (5). Thus, LRV1 in the metastasizing parasites subverted the host immune response to *Leishmania* and promoted parasite persistence (5).

Purification experiments were made of the LRV *in vivo* (generously provided by Professor Eurico Arruda Neto and Professor Angela Kaysel Cruz) strain of *Leishmania* (*Viannia*)

guyanensis MHOM/BR/75/M4147 (M4147), which are known is in possession of the virus LRV1-4. The promastigotes were maintained in M199 medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum, 2% human urine (male, newly produced and sterilized), adenine [100 mM], hemin [10 mg / ml], HEPES [40 mM] (N-2-hydroxyethylpiperazine N-2-ethanesulfonic acid) (pH 7.4), penicillin [50 units / ml] and streptomycin [50 mg / ml].

Was established a new lysis: cells were grown to three days after the start of the steady state (at steady state culture was 10^5 parasites / ml), after which they were centrifuged at 3000g for 10 minutes and resuspended in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH7, 5, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, 0.1% Triton X-100 which was stored overnight at -20°C . The thawing was done on ice, following by sonication (20 seconds each cycle with intervals of between 20 seconds, using *550 Sonic Dismembrator* - Fisher Scientific). The sample was centrifuged at 3000g for 10 minutes, the supernatant was separated and again centrifuged under the same conditions, once again the supernatant was separated and centrifuged again in the same way. To avoid the presence of genetic material that might obstruct the filter sterilizing filtration, the sample passed through a micro filtration through a glass filter and after it was filtered through a filter with pores of 22 mM, since the filtered sample passed concentrator with a cutoff at 100 kDa.

The first step of purification was a 10% to 50% Opiptiprep™'s gradient. This gradient was made by adding fractions of 400 µl containing 10, 20, 30, 40 and 50% iodixanol and 200 µl of sample obtained using the protocol, centrifuged by 3 hours to 350 000 g. At the end of the process the gradient was fractionated into 10 fractions and was measured the refractive index. Also was done a quantitative RT-PCR with 20, 2 and, 30 cycle to identify the presence of virus. The first figure shows a table with the refractive indices obtained in the gradient, the 1% agarose gel with the results of RT-PCR done from the extraction of RNA from 10 fractions of the gradient and SDS-PAGE of this fractions.

The purification step by size exclusion chromatography was necessary to remove the Optiprep™ buffer, once the withdrawal was not possible by conventional dialysis.

In this step the gradient fractions 4 were subjected to gel filtration on Superdex 200 HR 10/300 (GE) connected to AKTA Explorer10 chromatography system (GE)

The pure protein sample was applied on the column previously equilibrated with buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl 10 mM DTT. The flow rate was 0.5 mL / min and the progress of the purification was monitored by spectrophotometry at 280 nm. Were eluted fractions of 1 mL who had their RNA extracted and passed again for analysis by RT-PCR. Figure 2 shows the chromatographic profile of gel filtration, and 1% agarose gel with the result of RT-PCR for the gradient fraction 4.

Finished gel filtration, as the last step of purification and preparation of samples for use in a microscopy was performed junction of fractions 3, 4 and 5 and another junction of fractions 12, 13 and 14 which were concentrated in a concentrator (100 kDa) and used for fabrication of grids, with 1% of uranyl acetate. The grids were visualized by Transmission Electron Microscope (JEM 2100) in the Brazilian Nanotechnology Laboratory (Campinas, Brazil).

In images obtained corresponding to fractions 3, 4 and 5 could be a perfectly clear visualization of viral capsids, which had a size to those expected according to this *Totiviridae* literature.

But the striking fact of this study was observed in the microscopy of the fractions 12, 13 and 14. In this fractions, was possible observe, for the first time, genetic material involving (around) the viral particles.

The observation of genetic material along with the virus is consistent with at least two data mentioned in the literature: at first, it is known that the viral capsid has endoribonuclease activity (cleaving its own RNA), and second, the replication model for virus single-stranded RNA provides that the single stranded viral genomic RNA is excreted through the pores of the virus when replicated by its RNA polymerase.

There are no reports in the literature some other *Totiviridae* was purified surrounded of genetic material, which makes this work promising feeling to confirm previous hypotheses about the replication of the *leishmaniavirus*. This result opens new ways for new structural experiments are performed in the future according to these protocols to better understand the structural (and hence understanding of its functionality).

This new protocol of lyses and purification could allow another's images of capsid formation and/or cleavage of viral RNA, the observation of these images could give more information about *Totiviridae*'s replication.

- (1) TAMARRA L. CADD AND JEAN L. PATTERSON, Synthesis of Virus like Particles by Expression of the Putative Capsid Protein of Leishmania RNA Virus in a Recombinant Baculovirus Expression System, **Journal of Virology**, vol.68 n.1 p. 358-365, 1994.
- (2) WEEKS, R.; ALINE, R. F.; MYLER JUNIOR, P. J., STUART, K. LRV1 viral particles in *Leishmania guyanensis* contain double-stranded or single-stranded RNA. **Journal of Virology**, v.66, n.3, p. 1389-1393, 1992.
- (3) K. J. MACBETH AND J. L. PATTERSON, The Short Transcript of Leishmania RNA Virus Is Generated by RNA Cleavage, **Journal of Virology**, Vol. 69, No. 6 , p. 3458–3464, 1995
- (4) RO, Y. T. et al. Evidence that the fully assembled capsid of Leishmania RNA virus 1-4 possesses catalytically active endoribonuclease activity. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 36, n. 2, p. 145-156, 2004.
- (5) IVES, A. et al. Leishmania RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Science**, v. 331, n. 6018, p. 775-778, 2011.

APENDICE B - Texto de despedida

Houve quem me dissesse que eu iria me arrepender por optar por fazer o doutorado... mas eu não me arrependi.

Pelo contrário estou feliz e realizado, aprendi muito aqui.

Dentre as coisas que aprendi, talvez o mais importante não esteja explícito na minha tese: aprendi outras importâncias para a ciência além daquelas que eu já conhecia.

A ciência para mim sempre esteve ligada a liberdade, acho que o saber científico pode nos libertar de muitos tabus, regras impostas, preceitos e pré-conceitos. Foi assim comigo, na adolescência no ensino médio optei por estudar ciências por ver que poderia ter respostas que ninguém me dava.

Quando tinha uma dúvida a resposta normalmente era: “porque sim!” ou “porque Deus quis assim”. No meio acadêmico quando tinha perguntas eu tinha que observar a natureza, formular uma hipótese e procurar as respostas.

Mas aqui, eu aprendi que a ciência não só tem o papel de libertar as pessoas da ignorância, mas também de dar esperança pra elas.

Uma das cenas mais marcantes que vivi durante meu doutoramento é de um momento numa palestra da Professora Lígia sobre pesquisas com células tronco embrionárias.

Um jovem senhor muito humilde, trabalhador braçal, com o uniforme de serviço estava assistindo a palestra, no final, ele foi o primeiro a levantar a mão para fazer uma pergunta, perguntou sobre o seu filho adolescente que tinha paralisia cerebral, ele disse: “um tratamento com células tronco poderia fazer do meu filho um rapaz normal?”. A esperança daquele senhor na ciência me comoveu, provavelmente ele fez um esforço enorme para estar ali, é provável que ele procurava ali a esperança que não encontrou em outros lugares.

Pouco tempo depois soube de outro senhor que telefona pedindo contato dos professores do instituto, pois soube que estavam fazendo pesquisas envolvendo a doença de chagas, ele queria se oferecer, caso houvesse algum tipo de vacina experimental, porque ele não queria ter a doença, falava que gostaria de ajudar de alguma forma para que ninguém mais tivesse essa doença.

Quando as pessoas perguntavam do meu doutorado, mesmo as mais simples, todas diziam sempre ter esperança em alguma coisa que eles ouviam que estava sendo feito aqui dentro dos muros da universidade. “estão melhorando o biodiesel?”, “como vão ser os computadores do futuro?”, “já foi encontrada a cura da leishmaniose?” “O que é a partícula de Deus?”, ouvi muitas perguntas assim. Foi aqui durante meu doutorado, que pude refletir na importância do nosso trabalho e o quão bem que ele faz as pessoas.

Não me arrependo, não mesmo, nem da escolha pela vida acadêmica, nem do meu trabalho de doutorado. Nem dos experimentos que deram errado, pois com eles eu aprendi muito.

Eu não lamento nem das coisas boas, nem das coisas ruins que me aconteceram.

Parafraseando Edith Piaf na música rien de rien: “não, nada de nada, eu não lamento nada, nem do bem que me fizeram, nem do mal, isso tudo me é igual”.

Muito obrigado por tudo, eu fui muito feliz aqui!