UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ÉRIKA CHANG DE AZEVEDO

Preparação bioquímica para caracterização molecular e estrutural do
RNA vírus LRV1-4

São Carlos
2015

ÉRIKA CHANG DE AZEVEDO

Preparação bioquímica para caracterização molecular e estrutural do
RNA vírus LRV1-4

Dissertação 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
Mestre em Ciências.

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

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2015

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)

Chang de Azevedo, Érika

Preparação bioquímica para caracterização molecular e estrutural do RNA vírus LRV1-4 / Érika Chang de Azevedo; orientador Otavio Henrique Thiemann - versão corrigida -- São Carlos, 2015.

82 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. LRV. 2. Contraste negativo. 3. Leishmania. 4. Leishmaniovirus. I. Henrique Thiemann, Otavio, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, quem nunca me deixou faltar nada, tanto no âmbito físico quanto no emocional e espiritual.

Ao prof. Dr. Otavio H. Thiemann, pelos anos de auxílio e orientação.

Ao Dr. Rodrigo V. Portugal, pelos conselhos e pela ajuda.

Ao Dr. Alexandre Cassago, pela disposição e paciência.

Aos colegas de laboratório Jéssica Fernandes, Adriano Fernandes, Guilherme Souza, Camila Boralí, Thomás Michelena Santos, Natália Karla Belini, Ma. Ana Laura de Lima, Me. Ivan Rosa e Silva, Me. Paulo Falco Cobra, Dra. Tereza Cristina Jesus, Dr. Marco Túlio Alves da Silva e Dr. Matheus Postigo pela amizade, pelo apoio, pelas conversas, pelas bobagens e pelos conselhos. Em especial ao Me. Vitor Hugo Balasco Serrão, que muito me ajudou em diversos aspectos neste trabalho, pelas caronas, pela paciência e pela amizade.

À aluna de iniciação científica, Paola Barbosa. Só se sabe realmente quando se ensina, por isso quero ter te ensinado muito. Tenha certeza de que aprendi muito com você.

Aos técnicos do Laboratório de Cristalografia, Dra. Susana Andrea Sculaccio, Sra. Norma Bianca Saes e Dr. Humberto de Muniz Pereira e do Laboratório de Biofísica Molecular, Sra. Andressa Patrícia Alves Pinto e Sra. Derminda Isabel de Moraes, pelo auxílio prestado.

Aos meus colegas da Biomol, Tom, Lok, Ila, Kuririm, Pam, Rá, Ju, Mô, Ricardo, Laís, entre tantos outros que me acompanharam nos anos de graduação e que me acompanham até os dias de hoje.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação em Ciências Físicas e Biomoleculares e de Mestrado.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia, por colocar a disposição funcionários e microscópios, sem os quais esta pesquisa não seria possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À minha mãe, Suely da Chang, quem me ensinou quase tudo o que eu sei e quem sempre valorizou minha formação intelectual e pessoal.

Ao meu pai, José Pedro de Azevedo, pela compreensão todas as vezes que não voltei nos feriados e por sempre acreditar no meu sucesso.

À minha avó Wang Lian Tje e aos meus tios Reinaldo Chang, Vânia Regina Chang Bangoim e Jânio de Andrade Bangoim por todo o amor cedido a mim e pela preocupação que sempre tiveram comigo e com o meu bem-estar.

A todos os meus familiares que estiveram de alguma forma me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao Paulo Rogério P. S. Age, por estar do meu lado desde a época da graduação, por me apoiar incondicionalmente, por me acompanhar nas madrugadas de estudo e/ou nas noites no laboratório. Palavras não são suficientes para te agradecer.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho: muito obrigada!

"Não entre em pânico."

O guia do mochileiro das Galáxias – Douglas Adams

RESUMO

CHANG DE AZEVEDO, E. **Preparação bioquímica para caracterização molecular e estrutural do RNA vírus LRV1-4.** 2015. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

O vírus de *Leishmania* 1-4 (do inglês *Leishmania* RNA virus 1-4 ou LRV1-4) é um vírus da família *Totiviridae*, e que possui capsídeo icosaédrico e RNA dupla-fita que codifica duas proteínas (proteína capsidial e RNA polimerase). Dados recentes indicam o envolvimento do LRV1-4 na patogênese de *Leishmania* no hospedeiro humano, tornando seu estudo de fundamental importância para o entendimento dessa doença e de seu papel na relação parasito-hospedeiro. Há relatos sobre a purificação do vírus a partir do seu hospedeiro natural (*Leishmania guyanensis*) e a partir de sistemas de expressão heteróloga. Este trabalho tem por objetivo estabelecer os métodos de purificação para posteriores estudos estruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo (NS-TEM) e por Crio-Microscopia Eletrônica (Cryo-EM). Os estudos aqui propostos irão permitir a construção de um modelo estrutural do capsídeo do LRV1-4 e sua identificação correta dentre os totivírus. Além das contribuições ao conhecimento da biologia/patogenia do LRV1-4 este estudo representa a primeira caracterização estrutural de um capsídeo viral realizada no Brasil, e assim um avanço importante para a área de virologia e biologia estrutural no país. Foram realizadas ultracentrifugações biológicas, utilizando gradientes de sacarose, para a purificação do vírus a partir do extrato celular de *L. guyanensis*. As frações que apresentaram RNA viral foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (Campinas LNNano – CNPEM). Além disso, foram realizadas tentativas de expressar a proteína do capsídeo (ORF2) em *Leishmania tarentolae* e *Escherichia coli*. Foram também realizados esforços para a obtenção de anticorpos a partir de peptídeos sintetizados após análise computacional da sequência de aminoácidos da proteína do capsídeo. As amostras obtidas a partir do hospedeiro natural do vírus se apresentaram heterogêneas quando analisadas por NS-TEM, de modo que não foi possível a realização de uma análise estrutural. Porém, a presença de partículas do tamanho esperado para o vírus em amostras em que foi detectado o RNA viral indicam que são necessários esforços para obtenção de uma amostra de maior pureza e homogênea. Além disso, não foi possível obter a proteína do capsídeo nos sistemas de expressão heteróloga. A presença de 25 resíduos de cisteína pode estar levando a proteína a degradação rápida em bactéria. Os experimentos de expressão em células de *Leishmania* ainda não foram

conclusivos. Foi obtido um anticorpo anti-peptídeo que reconhece a proteína do capsídeo, tornando possíveis experimentos como imunolocalização e imunoprecipitação do vírus.

Palavras-chave: LRV. Contraste negativo. *Leishmania*. *Leishmaniavirus*.

ABSTRACT

CHANG DE AZEVEDO, E. **Biochemical preparation for molecular and structural characterization of the RNA virus LRV1-4.** 2015. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

The *Leishmania* RNA virus 1-4 (LRV1-4) belongs to the *Totiviridae* family. It has an icosahedral capsid and a double-strand RNA encoding two proteins (capsid protein and RNA polymerase). Recent data indicate the involvement of LRV1-4 in the pathogenesis of *Leishmania* in the human host, making their study of fundamental importance for the understanding of this disease and its role in host-parasite relationship. There are reports on the purification of the virus from its natural host (*Leishmania guyanensis*) and from the same heterologous expression systems such as *Escherichia coli*. This work aims to establish purification methods for further structural studies by Negative Stain Transmission Microscopy (NS-TEM) and Cryo-Electron Microscopy (Cryo-EM). The studies proposed here will allow the construction of a structural model of the coat protein of LRV1-4 and their correct identification amongst the *Totiviridae*. In addition to the contributions to the knowledge of the biology and pathogenesis of LRV1-4, this study represents the first structural characterization of a viral capsid held in Brazil and thus an important step forward for the field of virology and structural biology in the country. Sucrose for virus purification gradients were performed from the cell extract of *L. guyanensis*. Fractions that showed viral RNA were analysed by Transmission Electron Microscopy (Campinas LNNano - CNPEM). Furthermore, attempts have been made to express the capsid protein (ORF2) in *Leishmania tarentolae* and *Escherichia coli*. There has also been made efforts to obtain antibodies from peptides synthesized accordingly to the computer analysis of the amino acid sequence of the capsid protein. The samples obtained from the natural host of the virus showed a heterogeneous distribution of particles when examined by NS-TEM so that it was not possible to perform a structural analysis. However, the presence of particles of the size expected for the virus particles in samples where the viral RNA was detected indicate that efforts are necessary to obtain a more homogeneous and pure sample. Moreover, it was not possible to obtain the capsid protein in heterologous expression systems. The presence of 25 cysteine residues could have led to the protein rapid degradation in the bacteria host. The expression experiments in *Leishmania* cells were not yet conclusive. It was also possible to obtain an

anti-peptide antibody recognizing the capsid protein, enabling immunoprecipitation and immunolocalization experiments.

Keywords: LRV. Negative stain. *Leishmania*. *Leishmaniavirus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida da espécie <i>Leishmania</i>	18
Figura 2 - Ilustração da organização dos totivírus.	20
Figura 3 - Comparação dos dendogramas obtidos da ORF3 viral e de <i>Leishmania</i> baseado na análise de RAPD (do inglês Random Amplified Polymorphic DNA). Esta técnica utiliza fragmentos de DNA provenientes de reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, ou <i>Polimerase Chain Reaction</i>) de segmentos randômicos do DNA genômico com primers de sequências de nucleotídeos arbitrárias. A presença ou ausência de bandas de amplificação em um gel de DNA implica em uma maior distância ou proximidade dos organismos no dendograma. (13)	22
Figura 4 - Representação esquemática das possíveis ORFs das espécies LRV1-1 e LRV1-4.....	22
Figura 5 – A) Estrutura do vírus L-A, resolvida por cristalografia a 3,4 Å (Acesso PDB: 1M1C); B) Estrutura do vírus de <i>Trichomonas vaginalis</i> , resolvida por microscopia a 5,5 Å (Acesso EMDB: EMD-2184); C) Estrutura do <i>victorivirus</i> HvV190S, resolvida por microscopia a 7,1 Å (Acesso EMDB: EMD-5725); D) Estrutura do vírus de <i>Giardia lamblia</i> , resolvida por microscopia a 6 Å (Acesso EMDB: EMD-5948).	25
Figura 6 - Esquema representativo geral do método baseado em fragmentação para a resolução tridimensional de proteínas.....	28
Figura 7 - Ilustração da simetria do capsídeo T=2, comum dentre os vírus da família <i>Totiviridae</i> . Na primeira parte, está demonstrado o dímero de proteínas do capsídeo. Após, o pentâmero formado a partir dos dímeros. E, por fim, o capsídeo montado.....	29
Figura 8 - Perfis de densidade de um gradiente contínuo (esquerda) e um gradiente descontínuo (direita).	32
Figura 9 - Ilustração do processo de RT-PCR.	33
Figura 10 - Oligonucleotídeos utilizados para a RT-PCR e o tamanho do produto esperado após a reação.	34
Figura 11 - Ciclo de temperaturas utilizado para a realização da RT-PCR.	34
Figura 12 – Figura ilustrativa da preparação de amostra utilizando a técnica de contraste negativo. A amostra (setas vermelhas) em tampão (em azul) é adsorvida na grade de cobre recoberta com um filme fino de carbono (em preto). Após, é recoberta com metal pesado (em amarelo). Quando a solução contendo o agente contrastante é seca ao ar, a amostra é deixada com uma camada amorfa de metal pesado contendo sais.	36
Figura 13 - Glicosilação de proteínas em diferentes organismos. As glicoproteínas expressas em <i>L. tarentolae</i> são mais similares às expressas em mamíferos, com um complexo tipo de oligossacarídeo.....	38
Figura 14 - Vetor pLEXSY_I-NEO2.....	39
Figura 15 - Mapa do vetor Pet 28a (+).....	40
Figura 16 - Gráfico que analisa os códons dos 750 primeiros pares de base da proteína do capsídeo. 19% dos códons não são usuais para o sistema de expressão <i>E. coli</i> . Em verde, os códons frequentemente empregados e em vermelho, os códons pouco frequentes.....	41
Figura 17 - Gráfico que analisa os códons dos 750 primeiros pares de base da proteína do RpDp. 23% dos códons não são usuais para o sistema de expressão <i>E. coli</i> . Em verde, os códons frequentemente empregados e em vermelho, os códons pouco frequentes.....	41
Figura 18 – Região de clonagem e expressão do vetor pET28. Em verde estão assinalados os sítios utilizados para clonagem e em vermelho, as caudas de histidina.	42

Figura 19- Resultado obtido após análise da sequência de aminoácidos pelo programa PSIPRED.	43
Figura 20 – Gráfico da desordem predita para a proteína. São considerados aminoácidos de regiões desordenadas aqueles que correspondem à linha azul acima da linha de base cinza. Além disso, em laranja estão representados aqueles resíduos desordenados favoráveis à ligação de outras proteínas.	44
Figura 21 - Melhor modelo gerado pelo servidor I-TASSER. As imagens estão rotacionadas 90° com relação à imagem da esquerda.	45
Figura 22 - Diferentes vistas da proteína predita para a ORF2.	45
Figura 23 – Gráfico de Ramachandran onde as regiões em vermelho representam as combinações de ângulos phi e psi mais favoráveis. Os resíduos marcados em vermelho são aqueles que necessitam maior análise, visto que se encontram em regiões generosamente permitidas e não permitidas. Os aminoácidos representados por triângulos são glicinas, as quais não são restritas a regiões apropriadas a outros tipos de cadeias laterais.	46
Figura 24 – Modelo gerado pelo servidor I-TASSER com suas três regiões bem estruturadas em destaque.	47
Figura 25 - Homodímero (amarelo e verde) gerado pelo algoritmo SymmDock, a partir do modelo selecionado e sua unidade assimétrica (azul) e suas superfícies eletrostáticas.	47
Figura 26 - Homopentâmero (amarelo) gerado pelo algoritmo SymmDock, a partir do modelo selecionado e sua unidade assimétrica (azul).	48
Figura 27 – Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da RT-PCR das alíquotas retiradas do gradiente. O número 1 indica o Marcador de DNA. As frações do gradiente em que foi aplicado o lisado de <i>L. guyanensis</i> são as 12 primeiras, sendo 2 o topo e 13 o fundo. As frações do gradiente em que foi aplicado o lisado de <i>L. major</i> são as 12 últimas, sendo 14 o topo e 25 o fundo. O RNA viral foi amplificado nas amostras 3, 9, 10, 12 e 13.	51
Figura 28 - Gel de agarose 2% das amostras de RT-PCR alíquotadas do gradiente de sacarose 15-45%. O número 1 indica o Marcador de DNA. As amostras de 2-24 representam amostras onde foi aplicado material de <i>L. guyanensis</i> , 2 é o topo e 24 é o fundo do gradiente.	52
Figura 29 – Análise obtida pelo programa Lasergene utilizando o método de Jameson-Wolf e as características das regiões selecionadas para síntese dos peptídeos A11 (11 aminoácidos) e A9 (9 aminoácidos).	52
Figura 30 – A) Análise por western blot do anticorpo anti-peptídeo A11 onde: 1) Marcador de massa molecular, 2) Peptídeo A11 conjugado com BSA e 3) Amostra de <i>L. guyanensis</i> ; B) Análise por western blot do anticorpo anti-peptídeo A9 onde: 1) Marcador de massa molecular, 2) Peptídeo A9 conjugado com BSA e 3) Amostra de <i>L. guyanensis</i>	53
Figura 31 – Western Blot para verificação da especificidade do anticorpo primário anti-capsídeo (números 2 a 8) em comparação com os anticorpos do coelho antes da inoculação (números 9 a 15). A titulação dos anticorpos é de 1:300. Na imagem: 1) Marcador de peso molecular; 2), 8), 9) e 15) Peptídeo antigênico conjugado com BSA; 3) a 7) e 10) a 14) Amostras retiradas do topo do gradiente descontínuo de sacarose 15-45%.	54
Figura 32 – Western Blot para verificação da presença do capsídeo viral nas frações retiradas do gradiente de sacarose descontínuo de 15-45%. Na imagem: 1) Marcador de massa molecular; 2-13) Frações do gradiente do topo ao fundo; 14) Peptídeo A11 conjugado com BSA.	55
Figura 33 - Micrografias referentes às preparações: A) Grade com carga negativa, amostra retirada do fundo do gradiente de 15-30%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; B) Grade sem carga, amostra retirada do fundo do gradiente de 15-30%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; C) Grade com carga positiva, amostra retirada do fundo do gradiente de 15-30%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; D) Grade sem	

carga, amostra retirada do topo do gradiente de 15-45%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; E) Grade sem carga, amostra retirada do meio do gradiente de 15-45%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; F) Grade sem carga, amostra retirada do fundo do gradiente de 15-45%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%.	56
Figura 34 – Preparação do plasmídeo pLEXSY_I-NEO2 para a eletroporação. 1) Marcador de DNA; 3) Extração do plasmídeo; 4) Digestão com a enzima SwaI; e 5) Material genético após precipitação e ressuspensão.	57
Figura 35 – Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.	58
Figura 36 - Gel SDS-PAGE 12% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.	58
Figura 37 – Resultados gerados pelo servido PSIPRED de forma gráfica, com a confiabilidade local do dobramento.	69
Figura 38 – Modelos gerados pelo servidor I-TASSER.	73
Figura 39 – Análise da confiabilidade do enovelamento local dos modelos gerados pelo servidor I-TASSER.	74
Figura 40 – Os dez melhores resultados do algoritmo SymmDock quando imposta simetria $n = 2$.	75
Figura 41 - Os dez melhores resultados do algoritmo SymmDock quando imposta simetria $n = 5$.	75
Figura 42 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 0,1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.	77
Figura 43 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.	77
Figura 44 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.	78
Figura 45 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.	78
Figura 46 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.	79
Figura 47 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.	79

- Figura 48 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 0,1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h. 80
- Figura 49 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h. 80
- Figura 50 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h. 81
- Figura 51 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h. 81
- Figura 52 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h. 82
- Figura 53 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h. 82

SUMÁRIO

1	Introdução.....	17
1.2	Família <i>Totiviridae</i>	19
1.3	<i>Leishmaniovirus</i> e LRV1-4.....	21
2	Objetivos	25
3	Materiais e métodos	27
3.1	Análise da proteína do capsídeo através de ferramentas de bioinformática	27
3.1.1	Análise da sequência de aminoácidos e estrutura secundária	27
3.1.2	Modelagem da estrutura terciária	27
3.2	Organismos e Linhagens.....	30
3.3	Ultracentrifugação biológica.....	30
3.4	RT-PCR	33
3.5	Western Blot	35
3.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo.....	36
3.7	Eletroporação em <i>L. tarentolae</i>	37
3.8	Expressão em <i>E. Coli</i>	39
4	Resultados e Discussão	43
4.1	Análise da proteína do capsídeo através de ferramentas de bioinformática	43
4.1.1	Análise da sequência de aminoácidos e estrutura secundária	43
4.1.2	Modelagem das estruturas terciária e quaternária	44
4.2	Ultracentrifugação biológica.....	48
4.3	RT-PCR	51
4.4	Western Blot	52
4.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo.....	55
4.6	Eletroporação em <i>L. tarentolae</i>	57

4.7	Expressão em <i>E. Coli</i>	57
5	Conclusões e perspectivas	61
	Referências.....	63
	Apêndice A - Resultados gerados pelo programa PSIPRED	69
	Apêndice B- Resultados gerados pelo servidor I-TASSER.....	73
	Apêndice C – Resultados gerados pelo programa SymmDock.....	75
	Apêndice D – Géis do teste de expressão em E.coli BL21 (DE3) pLysS.....	77

1 Introdução

1.1 *Leishmania spp.*

A leishmaniose é uma doença causada pelo parasita protozoário hemoflagelado da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*. O gênero possui mais de 30 espécies, das quais 11 possuem importância médica e veterinária (1), sendo considerada uma zoonose.

Endêmica em 98 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento e 13 são países não desenvolvidos, a Leishmaniose é considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (1) e estimada como segundo lugar em mortalidade e quarto em morbidade dentre as doenças tropicais. Mais de 350 milhões de pessoas residem em áreas sujeitas à doença. Anualmente, estima-se que de 1,5 a 2 milhões de pessoas desenvolvem a doença sintomática e aproximadamente 50 mil morrem, em sua maioria crianças. (2)

Os parasitas possuem um complexo ciclo de vida digenético (Figura 1), que requer um hospedeiro mamífero e um inseto vetor. A forma promastigota pode ser encontrada no trato alimentar das fêmeas das espécies *Phlebotomus spp.* e *Lutzomyia spp.* infectadas. Esta é a forma flagelada, móvel e extracelular do protozoário. Dentro do intestino médio do inseto, esta forma sofre várias mudanças que culminam na forma infectiva chamada promastigota metacíclica. No intestino médio do inseto, a forma promastigota metacíclica se reproduz por fissão longitudinal binária, onde a taxa de reprodução é tão rápida que após 1 a 3 semanas tornam seu intestino anterior e a faringe preenchidos por promastigotas. Durante a alimentação do vetor, os promastigotas metacíclicos são liberados na derme do hospedeiro mamífero e rapidamente fagocitados pelos macrófagos. Dentro das células do hospedeiro, os promastigotas metacíclicos se transformam na forma amastigota. (1) A reprodução dos amastigotas por fissão longitudinal binária, seguida pela ruptura das células infectadas, produz grande número de amastigotas, os quais são fagocitados por outros macrófagos, disseminando a infecção. (3) O ciclo é completo quando o inseto vetor se alimenta deste sangue, recuperando amastigotas livres ou macrófagos infectados.

Figura 1 - Ciclo de vida da espécie *Leishmania*.

Fonte: Adaptada de BOGITSH; CARTER; OELTMANN (3)

Das espécies que infectam humanos, três manifestações clínicas são evidentes: cutânea, muco-cutânea e visceral. Seus ciclos de vida e morfologia são indistinguíveis, mas diferem no tipo e na localização das lesões primárias que produzem no hospedeiro humano. (3)

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é causada pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*. Esta é a forma mais severa, e muitas vezes fatal, da doença. Se não tratada, a LV apresenta taxa de mortalidade próxima a 100 por cento. No hospedeiro mamífero, células infectadas por amastigotas são encontradas em vários órgãos, como no baço, fígado, medula óssea, linfonodos e mucosa intestinal. Indivíduos afetados pela LV apresentam hiperplasia e consequente aumento dos órgãos viscerais, com concomitante queda na produção de eritrócitos e leucócitos, levando à anemia e leucopenia, facilitando a infecção bacteriana secundária. (3)

A leishmaniose cutânea (LC) é causada pelas espécies *L. tropica* no “Velho Mundo” e *L. mexicana* no “Novo Mundo”. Neste tipo de manifestação da doença, os parasitas amastigotas são encontrados primariamente em macrófagos próximos às feridas cutâneas. É, portanto, uma doença que acomete a pele dos pacientes infectados, causando ulcerações e granulomas dermais que podem levar vários meses ou anos para se curarem. É a forma mais

comum de leishmaniose e representa 50 a 75 por cento de todos os novos casos, sendo a forma mais estudada da doença. (2)

A leishmaniose muco-cutânea (LM) é causada principalmente pela espécie *L. braziliensis*. Amastigotas são encontrados em macrófagos presentes nas ulcerações em junções mucocutâneas da pele. Uma lesão primária na pele aparece em seguida da picada do inseto vetor infectado do gênero *Lutzomia*. No México e na América Central, onde predomina a espécie *L. mexicana*, a lesão secundária ocorre na orelha. No sul da América Latina, a doença causada pela *L. braziliensis* segue um curso diferente, onde as lesões secundárias ocorrem mais frequentemente nas mucosas nasais e bucais. (3)

Além disso, a doença é considerada uma infecção oportunista e é agrupada junto às doenças que se aproveitam de indivíduos imunocomprometidos, estando muitas vezes associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS). (1)

Atualmente, o tratamento é realizado por quimioterapia, incluindo antimoniais pentavalentes como estibogluconato sódico e antimoniato de meglumina, anfotericina B, miltefosina, paromicina e silamaquina. (4) A classe de fármacos dos antimoniais pentavalentes é utilizada como tratamento de primeira escolha e tem sido recomendada para o tratamento de leishmaniose há mais de 70 anos. Estes fármacos apresentam elevada toxicidade e efeitos colaterais severos, como cefaléia, leucopenia, náuseas, vômito, entre outros. (5) Aliado às características de toxicidade dos fármacos disponíveis soma-se a necessidade de internação dos pacientes e acompanhamento hospitalar durante a terapia, elevando consideravelmente os custos da profilaxia disponível. A prevenção por vacinação se apresenta como uma opção viável, já que infecções anteriores levam à uma robusta imunidade contra o parasita. (1-2)

1.2 Família *Totiviridae*

Os vírus pertencentes à família *Totiviridae* possuem características em comum, tais como um capsídeo icosaédrico, não envelopado, composto por apenas uma proteína, variando de 30 a 40 nm de diâmetro (Figura 2). Os gêneros que compõem a família são:

- *Giardiavirus* (infecta parasitas protozoários);
- *Leishmaniavirus* (infecta parasitas protozoários);
- *Totivirus* (infecta levedura e fungo carvão);

- *Trichomonasvirus* (infecta parasitas protozoários do gênero *Trichomonas* e filogeneticamente distinto dos outros gêneros);
- *Victorivirus* (infecta fungos filamentosos e filogeneticamente diferente dos outros gêneros). (6)

Figura 2 - Ilustração da organização dos totivírus.

Fonte: Adaptada de ExPASy. (7)

O genoma é composto por um RNA linear dupla-fita (dsRNA) de tamanho que varia entre 4-8 kpb. Contém 2 fases abertas de leitura (ORFs) que se sobrepõem, codificando a proteína do capsídeo e a RNA polimerase dependente de RNA (RpRd). Alguns totivirus contêm uma terceira ORF putativa próxima à região 5' do genoma viral. (7)

A polimerase viral sintetiza um RNA mensageiro, o qual é transportado para o citoplasma celular onde é traduzido. A tradução começa em um único sítio interno de entrada ribossomal (IRES, do inglês “internal ribosome entry site”) situado na região 5' não traduzida (5'-UTR, do inglês “5'-untranslated region”). (7) Os transcritos da fita positiva do RNA são flanqueados por uma região 5'-UTR e uma 3'-UTR, direcionando, na maioria dos totivirus, a tradução da proteína do capsídeo (Gag) e uma proteína de fusão Gag-RdRp (Gag-pol) através de uma mudança no quadro de leitura (+1 ou -1). Em outros totivirus, a RdRp é detectada apenas como uma proteína não fusionada e pode ser expressa por um mecanismo de terminação-reiniciação. (7)

A replicação dos vírus desta família é citoplasmática, iniciada pela infecção das células através do reconhecimento das proteínas virais por receptores e consequente endocitose dos vírus. (7) A transcrição do genoma através da polimerase viral ocorre dentro do vírus, de tal forma que o dsRNA nunca está exposto ao citoplasma. Os transcritos da fita positiva de RNA são utilizados como modelo para a tradução. Cópias do (+)RNA são encapsidadas em uma

partícula sub-viral, na qual são transcritas para que sejam geradas moléculas de (-)RNA as quais se pareiam para produzir o genoma dsRNA. Partículas virais maduras são transmitidas para a nova célula durante a divisão celular, esporogênese, fusão celular ou liberadas da célula hospedeira. (7)

A maior parte dos estudos envolvendo os membros da família *Totiviridae* são dos dois vírus de RNA fita-dupla L-A e L-BC, os quais infectam *Saccharomyces cerevisiae*, onde o foco principal é a sua relação com o hospedeiro e a modulação da expressão gênica. (8)

1.3 *Leishmaniavirus* e LRV1-4

O vírus LRV, ou *Leishmainiavirus*, descrito em 1988, atualmente é o único vírus identificado infectando de células de *Leishmania*. A primeira indicação da possível existência do vírus, chamado de LRV1, foi a presença de moléculas de RNA com 6 kpb associadas a partículas icosaédricas de 30-40 nm de diâmetro. (9)

Em uma amostragem de 71 isolados de *Leishmania*, 12 continham RNA viral. (10) Todas as cepas infectadas foram identificadas como pertencentes às espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, em sua maioria isoladas da bacia do rio Amazonas. Elas foram designadas LRV1-1 a LRV1-12. Classificados como sendo parte da família *Totiviridae*, os vírus LRV são compostos por um capsídeo icosaédrico e um genoma de RNA fita dupla, o qual é traduzido em duas proteínas em diferentes quadros de leitura denominados ORF2 e ORF3, codificando proteína capsidial e RNA polimerase, e uma pequena ORF, denominada ORF1, que desempenha papel regulatório na tradução das proteínas virais. A comparação do genoma completo de dois tipos de LRV1 mostrou 77% de similaridade dos nucleotídeos, e 92 e 82% de identidade dos aminoácidos entre a ORF2 e ORF3, respectivamente. Esta alta similaridade da sequência de aminoácidos é reflexo da ocorrência de substituições na terceira base dos genes codificantes. Juntas, as ORFs 2 e 3 compreendem 90% do genoma do LRV, deixando cerca de 50 nucleotídeos na região 3'-UTR, 450 nucleotídeos na região 5'-UTR de LRV1 e 340 nucleotídeos, também na região 5'-UTR, em LRV2, descoberta em uma cepa de *L. major* infectada, na antiga União Soviética. Os vírus LRV1 e LRV2 possuem diferenças em seu RNA tais que sugerem que vírus de cepas distantes de leishmania divergiram mais do que os que se originam de cepas mais relacionadas (Figura 3). (11) Os vírus são transmitidos de forma vertical (12), durante a reprodução assexuada das células de *Leishmania*, o que condiz com a co-evolução entre as cepas do protozoário e os diferentes tipos de LRV.

Figura 3 - Comparação dos dendogramas obtidos da ORF3 viral e de *Leishmania* baseado na análise de RAPD (do inglês Random Amplified Polymorphic DNA). Esta técnica utiliza fragmentos de DNA provenientes de reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, ou *Polymerase Chain Reaction*) de segmentos randômicos do DNA genômico com primers de sequências de nucleotídeos arbitrárias. A presença ou ausência de bandas de amplificação em um gel de DNA implica em uma maior distância ou proximidade dos organismos no dendograma. (13)

Fonte: WIDMER; DOOLEY (11)

Foi observado em LRV1-4, que há uma sobreposição de 71 nucleotídeos entre o final da ORF2 e o início da ORF3, comum aos totivírus, sugerindo uma mudança +1 no quadro de leitura traducional, produzindo uma proteína de fusão tipo Gag-Pol. (14)

Os vírus LRV1-1 e LRV1-4 demonstram diferenças em sua organização molecular (14). O LRV1-4 possui duas ORFs (ORF1 e ORFx) na extremidade 5' no seu RNA viral, enquanto o LRV1-1 possui apenas uma (Figura 4). (15)

Figura 4 - Representação esquemática das possíveis ORFs das espécies LRV1-1 e LRV1-4.

Fonte: PATTERSON (15)

A importância da ORF1 para o vírus foi hipotetizada após a descoberta da função endoribonuclease da proteína do capsídeo. (16) Esta proteína cliva o RNA viral especificamente na região da sequência consenso 5'-GxUCCGxA-3'. A clivagem pode ser importante para a regulação da tradução da proteína do capsídeo, regulando assim a produção do vírus em si. Foram recentemente apresentadas evidências de que a região 5'-UTR do *Leishmaniovirus* pode funcionar como uma IRES para a tradução em *Leishmania*. (17) Além disso, uma deleção em 120 nucleotídeos na região que é removida pela clivagem da proteína Gag reduz a tradução em 10 vezes. Esta regulação da tradução viral abaixo de um nível limiar é o mecanismo utilizado por vírus como o coronavírus como forma de manter sua infecção persistente. (18) Com base nas informações coletadas, foi possível elaborar um modelo para o ciclo de replicação do LRV. A clivagem da 5'-UTR da fita positiva do RNA viral gera grandes transcritos, os quais são incapazes de ser traduzidos e de se replicar. O modelo prediz que, em pequenas densidades virais (isto é, durante a fase exponencial de crescimento do parasita), uma porção do transcrito genômico vai evitar a clivagem, ser traduzido, e, subsequentemente, ser encapsidado. Enquanto a densidade do vírus na célula aumenta, devido ao acúmulo de partículas, (durante o período da fase estacionária de crescimento do parasita), todos os transcritos virais vão encontrar uma endonuclease do capsídeo e serão clivados. Tal mecanismo "suicida" pode servir para regular rigorosamente a quantidade de vírus por célula em um pequeno número, mantendo a infecção persistente. (19)

Recentemente foi sugerido que a presença do vírus contribui para a severidade da leishmaniose em linhagens de *L. guyanensis* (20), tornando-o de interesse clínico e aumentando a importância de seu estudo e entendimento.

Estes vírus também possuem potencial para serem desenvolvidos como vetores para introdução de genes heterólogos e, mais importante, auxiliando a elucidação das vias de processamento e tradução do RNA viral. Por último, há o potencial de que o vírus dê pistas sobre a natureza patogênica de *Leishmania spp.* (15)

2 Objetivos

A estrutura terciária de proteínas está intimamente ligada à sua funcionalidade, tornando seu conhecimento de grande importância para o estudo de processos biológicos. Os estudos estruturais sobre os vírus da família Totiviridae têm surgido com maior frequência nos bancos de dados de estruturas de proteína como PDB (21) e EMDB (22) (Figura 5), devido à evolução das técnicas de resolução estrutural e à crescente descoberta de novos vírus e das descobertas das diversas relações dos mesmos com seus hospedeiros.

Figura 5 – A) Estrutura do vírus L-A, resolvida por cristalografia a 3,4 Å (Acesso PDB: 1M1C); B) Estrutura do vírus de *Trichomonas vaginalis*, resolvida por microscopia a 5,5 Å (Acesso EMDB: EMD-2184); C) Estrutura do *victorivirus* HvV190S, resolvida por microscopia a 7,1 Å (Acesso EMDB: EMD-5725); D) Estrutura do vírus de *Giardia lamblia*, resolvida por microscopia a 6 Å (Acesso EMDB: EMD-5948).

Fonte: PDB, (21) EMDB. (22)

O interesse no estudo dos vírus LRV tem se intensificado ainda mais após a descoberta do aumento na severidade da infecção em pacientes infectados por cepas que possuem o vírus. O *Leishmaniavirus* e suas características estruturais e moleculares ainda são pouco conhecidos, tornando o campo para novas descobertas mais amplo e atrativo. Além disso, a resolução estrutural do capsídeo viral representaria um avanço na área no Brasil, sendo a primeira estrutura viral resolvida no país.

Este trabalho tem como objetivo a preparação bioquímica de amostras do vírus LRV1-4 para posterior resolução estrutural do capsídeo por microscopia eletrônica de transmissão e testes biofísicos e funcionais das proteínas do capsídeo e RNA polimerase. Para tal, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- Purificar o vírus LRV1-4 diretamente de amostras de *Leishmania guyanensis* infectadas;
- Expressar a proteína do capsídeo em *Leishmania tarentolae*;
- Expressar as proteínas do capsídeo e RNA polimerase em *Escherichia coli*;
- Verificar a qualidade das amostras purificadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo e melhorá-la para posterior Crio-Microscopia Eletrônica.

3 Materiais e métodos

3.1 Análise da proteína do capsídeo através de ferramentas de bioinformática

O conhecimento da estrutura de proteínas nos permite investigar processos biológicos mais diretamente, afim de conhecer e interpretar a função de uma dada proteína, a partir de suas interações moleculares. Apenas uma pequena porção de todas as proteínas com sequência de aminoácidos conhecida tem sua estrutura tridimensional resolvida experimentalmente. Neste sentido, diversas metodologias computacionais para análise das sequências e predição têm sido desenvolvidas.

3.1.1 Análise da sequência de aminoácidos e estrutura secundária

A análise teórica dos parâmetros físicos das proteínas do capsídeo e RpRd do vírus LRV1-4 (números de acesso NCBI: NP_619652.1 e NP_619653.1, respectivamente) foi feita, a partir da sua sequência de aminoácidos, com o auxílio da ferramenta PROTPARAM (23), pertencente ao servidor ExPASy.

Para a predição de domínios conservados da proteína do capsídeo, foram utilizadas as ferramentas CDD (do inglês, “Conserved Domain Database”) (24) e SMART. (25) Para a predição da estrutura secundária, foi utilizado o programa PSIPRED (26) .Além disso, foi gerado um gráfico com os ângulos de Ramachandran utilizando-se o programa SAVES. (27)

3.1.2 Modelagem da estrutura terciária

A predição da estrutura terciária da proteína do capsídeo foi feita a partir da sua sequência de aminoácidos, utilizando o servidor online I-TASSER. (28-31) Este realiza os cálculos para predição empregando o método de alinhamento “multi-threading”. Este método é comumente utilizado quando a sequência de interesse não se alinha com nenhuma estrutura conhecida, mas possui fragmentos que podem ser comparados a outras estruturas no banco de dados. Ele se baseia na observação de que quando uma nova estrutura é descoberta, ela é

composta de motivos estruturais comuns ou de fragmentos de estruturas super-secundárias de proteínas com estruturas conhecidas. Portanto, a informação dos fragmentos que se doblam em estruturas semelhantes pode ser utilizada para construir um modelo tridimensional de proteínas, com a avaliação energética dos pontos onde as estruturas se encontram. (32)

O programa primeiramente divide a sequência alvo em fragmentos. Em seguida, ele realiza uma busca de sequências similares para cada fragmento, em um banco de dados de estruturas conhecidas, classificando os fragmentos (“scoring”). O modelo de estrutura tridimensional do fragmento é construído a partir do fragmento molde, utilizando uma combinação de técnicas. Ao final, a conformação é refinada e validada, antes de gerar o resultado final (Figura 6). (32) O I-TASSER utiliza como forma principal para avaliação da confiabilidade da qualidade de seus modelos o parâmetro chamado “C-score”. Este é calculado com base na significância do alinhamento e na convergência de parâmetros da estrutura. Ele está tipicamente no intervalo entre -5 e 2, onde um maior valor de C-score significa um modelo com maior confiança e vice-versa. (28)

Figura 6 - Esquema representativo geral do método baseado em fragmentação para a resolução tridimensional de proteínas.

A predição de interações proteína-proteína e proteína-ligante é um dos problemas mais desafiadores da biologia estrutural. O objetivo é encontrar a correta associação entre duas moléculas dada a representação estrutural de cada molécula separadamente. No caso do ancoramento proteína-proteína uma predição precisa assinalar e analisar a maioria dos contatos resíduo-resíduo envolvidos na interação.

O servidor online SymmDock (33) foi desenvolvido devido ao fato de que muitos homomultímeros são montados em um arranjo ciclicamente simétrico. Este utiliza, portanto, um algoritmo de ancoramento baseado na simetria imposta pelo usuário, dada a estrutura de sua unidade assimétrica. (34) O processo procura a transformação simétrica espacial para transformações que otimizam a forma de complementaridade entre a interface das unidades adjacentes. Este tem 3 estágios principais: 1) representação da superfície; 2) correspondência da superfície; e 3) filtragem e pontuação. (35)

A aplicação foi utilizada para realizar o ancoramento das proteínas do capsídeo, afim de simular a montagem do mesmo. Para tal finalidade, foi utilizado o modelo feito pelo programa I-TASSER que apresentou melhor resultado do parâmetro de confiança “C-value”. Foi imposta uma simetria de ordem 2, visto que a simetria para os vírus da família *Totiviridae* é um capsídeo icosaédrico T=2, composto de 12 dímeros pentaméricos (Figura 7) (7). Além disso, foi também imposta uma simetria de ordem 5 ao mesmo modelo utilizado anteriormente.

Figura 7 - Ilustração da simetria do capsídeo T=2, comum dentre os vírus da família *Totiviridae*. Na primeira parte, está demonstrado o dímero de proteínas do capsídeo. Após, o pentâmero formado a partir dos dímeros. E, por fim, o capsídeo montado.

Os modelos de estrutura terciária foram visualizados e analisados utilizando os programas PYMOL (Delano Scientific LLC) e UCSF Chimera. (36)

3.2 Organismos e Linhagens

Para que fossem feitos experimentos de purificação do LRV *in vivo*, foram cedidas pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) as linhagens de *Leishmania guyanensis* MHOM/BR/75/M4147, a qual é possuidora do vírus LRV1-4 (37), e *Leishmania major* MHOM/SU/1973/5-ASKH, utilizada como controle negativo para a presença do vírus LRV1-4.

3.3 Ultracentrifugação biológica

A ultracentrifugação biológica é uma forma eficiente utilizada para a purificação de células, partículas subcelulares, vírus, proteínas ou ácidos nucleicos. A técnica foi desenvolvida em 1940 por Svedberg e Pedersen como um dos principais métodos de determinação da massa molecular de macromoléculas. Ela tem como princípio básico a sedimentação das diferentes partículas, sob ação de uma aceleração (Equação 1). Nesta equação, v é a velocidade de sedimentação, d é o diâmetro da partícula, ρ_p é a densidade da partícula, ρ_l é a densidade do líquido, μ é a viscosidade do líquido e g é a aceleração gravitacional. Partículas pequenas requerem a imposição de uma força maior do que a gravitacional, por isso a necessidade da ultracentrifugação para realizar a separação. A capacidade da partícula em suspensão de formar um precipitado (pellet) depende não apenas da força g experimentada pela partícula, mas do intervalo de tempo no qual ela sofre ação desta força. Os coeficientes de sedimentação têm unidades de segundos e maioria das macromoléculas têm valor de “s” de $10^{-13} - 10^{-11}$ s, que também pode ser representado em unidades chamadas Svedberg (S), onde $1S = 10^{-13}$ s. A massa molecular pode ser calculada pela equação de Svedberg (Equação 2), a qual relaciona a massa M ao coeficiente de difusão da molécula (D), seu coeficiente de sedimentação (S), a densidade do líquido (ρ), o volume específico parcial da partícula ($\bar{v}$), equivalente à recíproca da densidade da partícula ($1/\rho$), a constante universal dos gases (R) e a temperatura (T). A equação de Svedberg se aplica a uma

situação na qual as partículas são submetidas a uma força centrífuga suficientemente alta para serem sedimentadas. (38)

$$\vartheta = \frac{d^2(\rho_p - \rho_l)g}{18\mu} \quad (1)$$

$$M = \frac{RT_s}{D(1 - \bar{v}\rho)} \quad (2)$$

Gradientes de densidade são utilizados combinados à ultracentrifugação para separação das partículas de acordo com sua densidade. Isto porque quando as densidades da partícula e do líquido forem iguais ($\rho_p = \rho_l$), a velocidade de sedimentação será zero, isto é, a partícula terá atingido sua densidade de equilíbrio (também conhecida como “buoyant” ou densidade isopícnica) e não irá mais se mover no meio. Independente do tamanho das partículas e de seu ponto de partida, todas as partículas de mesma densidade irão se mover para a mesma posição na solução. (38)

Os gradientes podem ser construídos de forma contínua, onde a densidade aumenta de forma suave, mas não necessariamente linear, do topo ao fundo, ou descontínua, onde o gradiente é construído por camadas, com a densidade aumentando em forma de degrau (Figura 8). Um gradiente contínuo pode prover uma maior resolução e ser mais apropriado para um propósito analítico. Por outro lado, pode ser mais vantajoso utilizar um gradiente descontínuo para propósitos preparativos, de tal modo que uma ou mais das partículas possam se agrupar na interface fina do gradiente, que é formada entre duas densidades. Isto normalmente torna o trabalho de coletar as amostras mais fácil (38).

O meio de centrifugação pode variar de acordo com o material a ser separado (Tabela 1).

Figura 8 - Perfis de densidade de um gradiente contínuo (esquerda) e um gradiente descontínuo (direita).

Fonte: GRAHAM (38)

Tabela 1 - Meios de gradiente de densidade e seus principais usos.

Tipo de meio do gradiente	Principais usos
Sacarose	Organelas, membranas de vesículas, vírus, proteínas, ribossomos, polissomos.
Glicerol	Células de mamífero, proteínas.
Sorbitol	Partículas subcelulares não-mamíferas.
Ficoll ®, polissacarose e dextrans	Células de mamífero, partículas subcelulares mamíferas.
CsCl	DNA, vírus, proteínas.
Cs₇SO₄	DNA e RNA.
KBr	Lipoproteínas do plasma.
Diatrizoato	Principalmente como componente do meio comercial para isolamento de linfócitos.
Nicodenz ®	Células de mamífero, organelas, vesículas de membrana, vírus.
Iodixanol	Células de mamífero, organelas, vesículas de membrana, vírus, plasma, lipoproteínas, proteínas, DNA.
Percoll ®	Células de mamífero, organelas, vesículas de membrana.

Fonte: Adaptada de GRAHAM. (38)

Neste trabalho, a lise celular, gradiente de sacarose de 15-35% e ultracentrifugação foram realizados como descrito em (9). Foram testados também protocolos nos quais o gradiente foi modificado para 15-45% e outro no qual 5 mL de lisado celular foram aplicados em dois gradientes diferentes: um descontínuo de 15-45% e outro contínuo de 20-40%.

3.4 RT-PCR

A RT-PCR (do inglês, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) é uma técnica qualitativa para a detecção da presença de RNA. A enzima transcriptase reversa produz DNAs complementares (cDNAs) a partir de amostras de RNA fita simples (ssRNA) e dos primers de DNA adicionados à reação. Após a produção dos cDNAs, estes são amplificados a partir da técnica de PCR, a qual utiliza uma enzima DNA polimerase termoestável e dois primers de DNA para produzir cópias do cDNA molde (Figura 9).

Figura 9 - Ilustração do processo de RT-PCR.

Fonte: Elaborada pela autora.

Primeiramente, foi extraído o RNA total de 500 µL das amostras fracionadas do gradiente utilizando o reagente TRIzol® LS (Life Technologies), segundo as instruções do fabricante. O RNA isolado foi incubado a uma temperatura de 95 °C, juntamente com os oligonucleotídeos comercialmente sintetizados (Figura 10) por 5 minutos.

Figura 10 - Oligonucleotídeos utilizados para a RT-PCR e o tamanho do produto esperado após a reação.

Fonte: SILVA. (39)

Após, foi utilizado o kit AccessQuick® RT-PCR System (Promega) para a realização da reação de RT-PCR, de acordo com as instruções do fabricante e com os ciclos demonstrados na Figura 11.

Figura 11 - Ciclo de temperaturas utilizado para a realização da RT-PCR.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 Western Blot

A técnica de “Western Blot” é uma importante ferramenta utilizada em imunologia que pode também ser aplicada à biologia molecular e celular para identificar proteínas específicas de uma complexa mistura de polipeptídeos extraídas das células. Esta técnica utiliza três elementos principais para efetuar esta tarefa: 1) separação por tamanho, 2) transferência para um suporte sólido, e 3) marcação da proteína alvo utilizando anticorpos primários e secundários apropriados para a visualização. (40)

Os anticorpos policlonais primários foram gerados em coelho pela empresa Célula B imunizados com peptídeos sintetizados pelo Dr. Edson Crusca (Instituto de Química de Araraquara - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, UNESP), de acordo com as regiões indicadas pelo programa DNASTar Lasergene (41), utilizando o algoritmo de Jameson-Wolf (42) para predição de regiões antigênicas da proteína de capsídeo de LRV1-4. Este método prediz regiões antigênicas utilizando informações da estrutura primária da proteína. O programa gera valores para os parâmetros de acessibilidade de superfície e combina esses valores com aqueles obtidos para flexibilidade da cadeia lateral e predição de estrutura secundária para calcular a antigenicidade de regiões da proteína.

Foram realizados os testes para verificação da presença da proteína do capsídeo viral aplicando-se as amostras retiradas do gradiente em SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose Pura Hybond-ECL (GE), utilizando o sistema de transferência Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) por 1 hora a 100V. A membrana foi bloqueada com proteínas do leite e incubada em tampão PBS (do inglês, phosphate saline buffer) contendo 0,1% de TWEEN-20 na presença de anticorpo primário por 16h, a 4 °C. Para visualização da interação, o excesso de anticorpo primário foi lavado também em tampão PBS contendo 0,1% de TWEEN-20. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário Anti-Rabbit IgG - peroxidase (Sigma Aldrich) por 1h no mesmo tampão a 25 °C (temperatura ambiente). A membrana foi então exposta ao substrato quimioluminescente, onde foi possível observar as proteínas interagentes com os anticorpos.

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo

A técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo (do inglês “Negative Stain Transmission Electronic Microscopy” ou NS-TEM), tem como princípio básico o recobrimento de uma fina camada de material biológico por uma camada seca amorfa de metal pesado contendo sais catiônicos ou aniônicos. Uma imagem eletrônica é gerada primariamente pela diferença do espalhamento de elétrons devida à diferença da relação massa-espessura entre o material biológico e a camada de metal pesado (Figura 12).

Figura 12 – Figura ilustrativa da preparação de amostra utilizando a técnica de contraste negativo. A amostra (setas vermelhas) em tampão (em azul) é adsorvida na grade de cobre recoberta com um filme fino de carbono (em preto). Após, é recoberta com metal pesado (em amarelo). Quando a solução contendo o agente contrastante é seca ao ar, a amostra é deixada com uma camada amorfa de metal pesado contendo sais.

Fonte: Elaborada pela autora.

O melhor que se pode obter como resultado desta técnica é que ela deva revelar a superfície sem o solvente e a forma de uma molécula biológica ou outra partícula. Para essa metodologia de preparo, não é necessária a correção do CTF (Contrast Transfer Function), uma vez que o contraste do sal metálico é suficiente para determinação das baixas frequências (espaço recíproco, ou, espaço de Fourier), o que permite que as partículas sejam reconhecidas facilmente. No entanto, com o contrabalanço de perdas excessivas das altas frequências, a obtenção de modelos de alta resolução a partir de dados coletados utilizando esse tipo de preparo de amostra não é possível. Por este motivo, informações intra-moleculares, tais como alfa-hélices ou folhas-beta não seriam reveladas por contraste negativo. (43)

As grades (grids), feitas de cobre recoberto por carbono (Ted Thin Carbon Film – Ted Pella), foram ionizadas com o auxílio do equipamento EasyGlow (Pelco), sendo submetidas ao processo de carga negativa ou positiva luminescente durante 25 segundos a 15 mA. Algumas grades também foram mantidas apolares. Após, 3 µL de amostra são mantidos em contato com a grade por 30 segundos, afim de que haja interação da amostra com a camada de

carbono. Após este passo, foram realizadas lavagens com água ultrapura em algumas amostras e em outras a lavagem foi omitida. Todas as amostras tiveram recobrimento de acetato de uranila 2%, onde os tempos de interação e as quantidades de recobrimentos foram variadas para obter melhor qualidade da visualização da amostra.

As amostras foram analisadas em um microscópio JEM- 2100 (JEOL) (LNNano – CNPEM) operando a 200 kV, com defocus e magnificação variados, com o auxílio dos Dr. Rodrigo V. Portugal, Dr. Alexandre Cassago e Me. Vitor Hugo Balasco Serrão.

3.7 Eletroporação em *L. tarentolae*

Sistemas de expressão heteróloga utilizando o tripanossomatídeo *Leishmania tarentolae*, isolado do lagarto da família dos geckos, *Tarentola mauritanica*, têm sido comercializados pela empresa Jena Biosciences com duas principais formas de expressão: constitutiva e induzível. Os cassetes de expressão episomal (no citoplasma) podem ser mantidos através da seleção por resistência a antibióticos. Em outro sistema comercializado pela empresa, o cassete de expressão pode também ser integrado ao genoma do protozoário de forma estável. Esta expressão constitutiva utiliza a transcrição mediada pela RNA polimerase I no *locus* ribossomal no qual o cassete de expressão é inserido. Esse sistema não é adequado para a expressão de proteínas que são tóxicas ao organismo hospedeiro. (44)

A expressão dos genes pode ser dirigida também por promotores co-integrados de RNA polimerase I ou RNA polimerases heterólogas, tais como T3 e T7. Esta arquitetura depende, portanto, de uma cepa transgênica de *L. tarentolae* que expressa T7 RNA polimerase e o repressor bacteriano de tetraciclina (TET repressor). O cassete de regulação de tetraciclina é integrado ao genoma, e a expressão do gene alvo é induzida pela adição de tetraciclina no meio de cultura. Além de possuir a expressão regulada, esse sistema se propõe a obter taxas de expressão significativamente mais altas do que o sistema constitutivo. Uma limitação de ambas as construções é o número limitado de cópias do cassete a ser expresso por célula de *Leishmania*. (45)

Dentre as vantagens para utilização dos sistemas de *Leishmania*, estão a habilidade de produzir N-glicosilação semelhante àquela dos mamíferos (Figura 13), fácil manipulação

genética se comparado a mamíferos, adaptação direta para produção em maior escala e requerimento nutricional mínimo. (45)

Figura 13 - Glicosilação de proteínas em diferentes organismos. As glicoproteínas expressas em *L. tarentolae* são mais similares às expressas em mamíferos, com um complexo tipo de oligossacarídeo.

Fonte: Adaptada de BASILE; PETICCA (45)

Foram utilizados, para expressão da ORF2 de LRV1-4, o vetor pLEXSY_I-NEO2 (Figura 14) e as células da cepa de expressão T7/TR (Jena Biosciences) (46) do sistema de expressão por indução. O vetor foi obtido em quantidade suficiente para a eletroporação através da sua clonagem em bactérias, previamente transformadas pela aluna de mestrado Ana Laura de Lima. Este foi digerido para que fosse retirada a sequência de manutenção em bactérias pela enzima *SwaI*. (Thermo Scientific) O DNA total foi então precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,6. Esta solução contendo o vetor linearizado foi mantida a -80°C por um tempo mínimo de 10 minutos. A separação do DNA foi realizada centrifugando-se a solução por 15 minutos a 4 °C, 12 000 g. O pellet foi lavado com etanol 70% gelado (-20°C) e secado por 5 minutos pelo método de centrifugação a vácuo. O DNA foi solubilizado em água ultrapura autoclavada.

Figura 14 - Vetor pLEXSY_I-NEO2.

Fonte: JENA (46)

Após este processo, o vetor foi eletroporado em cubetas com $d=2$ mm, em células de *L. tarentolae* a uma D.O. de aproximadamente 3, em meio BHI (do inglês, Brain Heart Infusion), na presença de DNA solubilizado em água ultrapura, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Jena Biosciences – Jena, Alemanha). A quantidade de DNA utilizado variou entre 5-15 μ g por reação.

3.8 Expressão em *Escherichia coli*

As tentativas de expressão das proteínas do capsídeo e RNA polimerase foram realizadas utilizando-se o vetor pET28(+) (Figura 15) em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, a qual possui um plasmídeo para a produção do lisossomo T7, o qual controla o promotor T7, evitando assim a expressão anterior à adição do indutor no meio de cultivo. As ORFs, que apresentam elevadas quantidades de códons raros (Figuras 16 e 17), foram otimizadas para a frequência de códons de *E. coli*, sintetizadas e clonadas no vetor pela empresa GenScript (Piscataway, USA). A otimização substitui códons empregados com pouca frequência em

transcritos de *E. coli* por códons sinônimos de alta frequência. Após, foram realizados a transformação em bactéria e testes de expressão. Estes foram feitos com o auxílio da aluna de iniciação científica Paola Barbosa. Os testes de expressão foram conduzidos em 10 mL de meio LB, adicionados de canamicina (30 µg/mL) e incubados sob agitação de 250 rpm, com diferentes temperaturas (37°C e 18°C) e concentrações do indutor IPTG (0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM). Retirou-se alíquotas antes da indução e após 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 16h. Estas foram centrifugadas a 12000 g, os precipitados de célula foram solubilizados em tampão de amostra (contendo β-mercaptoetanol), fervidos por 10 minutos e aplicados em SDS-PAGE 12%.

Figura 15 - Mapa do vetor Pet 28a (+).

Fonte: ADDGENE (47)

Figura 16 - Gráfico que analisa os códons dos 750 primeiros pares de base da proteína do capsídeo. 19% dos códons não são usuais para o sistema de expressão *E. coli*. Em verde, os códons frequentemente empregados e em vermelho, os códons pouco frequentes.

Fonte: SOUZA (48)

Figura 17 - Gráfico que analisa os códons dos 750 primeiros pares de base da proteína do RpDp. 23% dos códons não são usuais para o sistema de expressão *E. coli*. Em verde, os códons frequentemente empregados e em vermelho, os códons pouco frequentes.

Fonte: SOUZA (48)

As clonagens foram realizadas nos sítios de *NdeI* e *XhoI*, contendo códons de parada na extremidade C-terminal, de modo que não fosse expressa a cauda de histidina localizada no vetor após o sítio da enzima de restrição *XhoI*. Deste modo, seria expressa, juntamente com a enzima, uma cauda de histidina apenas na região N-terminal da proteína (Figura 18), o que permitiria sua purificação por cromatografia de afinidade.

Figura 18 – Região de clonagem e expressão do vetor pET28. Em verde estão assinalados os sítios utilizados para clonagem e em vermelho, as caudas de histidina.

Fonte: ADDGENE (47)

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise da proteína do capsídeo através de ferramentas de bioinformática

4.1.1 Análise da sequência de aminoácidos e estrutura secundária

Segundo a ferramenta ProtParam, a proteína do capsídeo possui uma massa molecular de aproximadamente 82 kDa, um pI teórico de 6,11 e uma composição molecular com 25 cisteínas, o que representa 3,4% do total de resíduos. Esta alta quantidade de cisteínas pode ajudar a proteína a se enovelar e/ou a formar as ligações intramoleculares que formam o capsídeo. A proteína RpRd possui uma massa molecular de aproximadamente 100 kDa e um pI teórico de 8,55, e uma composição molecular com 24 cisteínas, o que representa 2,7% da composição total de aminoácidos da proteína.

A proteína do capsídeo mostrou ter apenas o domínio comum aos capsídeos dos totivírus conservado quando analisada por ambos os servidores CDD e SMART.

A estrutura secundária predita pelo algoritmo PSIPRED mostra cerca de 15 de hélices-alfa na estrutura da proteína do capsídeo e 14 fitas-beta (Figura 19). O resultado completo, incluindo a confiabilidade da predição, encontra-se na seção Apêndice A.

Figura 19- Resultado obtido após análise da sequência de aminoácidos pelo programa PSIPRED.

Fonte: PSIPRED (26)

Foi realizada, utilizando o algoritmo DISOPRED, disponível também no programa PSIPRED, uma predição de regiões desordenadas e de ligação de proteínas (Figura 20). É possível observar que a região em que foi construído o peptídeo A11 é predita como sendo desordenada e como ligante de proteínas.

Figura 20 – Gráfico da desordem predita para a proteína. São considerados aminoácidos de regiões desordenadas aqueles que correspondem à linha azul acima da linha de base cinza. Além disso, em laranja estão representados aqueles resíduos desordenados favoráveis à ligação de outras proteínas.

Fonte: Adaptada de PSIPRED (26)

4.1.2 Modelagem das estruturas terciária e quaternária

O servidor I-TASSER realizou a predição de 5 modelos de estrutura tridimensional para a proteína do capsídeo, dos quais o modelo abaixo (Figura 21) obteve o maior C-score (Apêndice B), demonstrando maior confiabilidade no resultado global da modelagem. Além disso, o gráfico que é fornecido pelo programa e que fornece informações sobre a acurácia do resultado local também apresentou resultados melhores do que os outros modelos (Apêndice B).

Figura 21 - Melhor modelo gerado pelo servidor I-TASSER. As imagens estão rotacionadas 90° com relação à imagem da esquerda.

Fonte: Elaborada pela autora.

Este modelo foi visualizado com o auxílio do programa PyMol , que também oferece a opção de mostrar a densidade eletrostática da proteína (Figura 22). Esta informação é importante para podermos avaliar as interações intermoleculares para a posterior montagem do capsídeo. É possível observar que há regiões com polaridades complementares bem definidas, principalmente nas bordas do modelo, o que possivelmente auxilia as interações proteína-proteína.

Figura 22 - Diferentes vistas da proteína predita para a ORF2.

Fonte: Elaborada pela autora.

Porém, o gráfico dos ângulos de Ramachandran gerado pelo servidor SAVES demonstrou que o modelo não tem a melhor conformação possível, apresentando 58,2% dos resíduos em regiões mais favoráveis, 31,1% em regiões adicionalmente permitidas, 7,5% em regiões generosamente permitidas e 3,3% em regiões proibidas (Figura 23). Estes aminoácidos que apresentam torções estereoquimicamente proibidas estão localizados principalmente nas alças previstas para a proteína.

Figura 23 – Gráfico de Ramachandran onde as regiões em vermelho representam as combinações de ângulos phi e psi mais favoráveis. Os resíduos marcados em vermelho são aqueles que necessitam maior análise, visto que se encontram em regiões generosamente permitidas e não permitidas. Os aminoácidos representados por triângulos são glicinas, as quais não são restritas a regiões apropriadas a outros tipos de cadeias laterais.

Fonte: Adaptada de SAVES. (27)

É possível observar que o modelo apresenta três regiões bem estruturadas ligadas por laços desestruturados, que são regiões problemáticas (Figura 24).

Figura 24 – Modelo gerado pelo servidor I-TASSER com suas três regiões bem estruturadas em destaque.

Fonte: Elaborada pela autora.

O programa SymmDock gerou 10 possíveis resultados para cada um dos ancoramentos de simetria 2 e 5 (Apêndice C). Os melhores resultados, segundo o programa, estão abaixo (Figuras 25 e 26).

Figura 25 - Homodímero (amarelo e verde) gerado pelo algoritmo SymmDock, a partir do modelo selecionado e sua unidade assimétrica (azul) e suas superfícies eletrostáticas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 26 - Homopentâmero (amarelo) gerado pelo algoritmo SymmDock, a partir do modelo selecionado e sua unidade assimétrica (azul).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Ultracentrifugação biológica

Após a ultracentrifugação, as amostras foram separadas em alíquotas de 1 mL. Todas elas foram analisadas com a ajuda de um refratômetro para medição do índice de refração (Tabelas 2 e 3) conferência da integridade do gradiente após o fracionamento (Gráficos 1 e 2). A partir do índice de refração é possível estimar a densidade da solução, e, portanto, a densidade das partículas contidas na fração. É esperado que 30% (w/v) de sacarose em água tenha índice de refração de 1,3811(49) e densidade de $1,1270 \text{ g/cm}^3$ (50). É possível que, na fração que deveria corresponder a 30% de sacarose, existam erros não só do equipamento (erro de $\pm 0,0001$) mas também erros experimentais como de amostragem e devidos ao escorrimento do líquido pelas paredes dos tubos.

Tabela 2 - Correspondência entre as frações retiradas do gradiente contínuo de sacarose 15-30% e seus índices de refração referente ao gradiente no qual foi aplicado o lisado clarificado de *L. guyanensis*.

Fração do gradiente	Índice de refração
1	1,3525
2	1,3550
3	1,3570
4	1,3600
5	1,3625
6	1,3640
7	1,3650
8	1,3675
9	1,3695
10	1,3715
11	1,3745
12	1,3775

Fonte: Elaborada pel a autora.

Tabela 3 - Correspondência entre as frações retiradas do gradiente contínuo de sacarose 15- 30% e seus índices de refração referente ao gradiente no qual foi aplicado o lisado clarificado de *L. major*.

Fração do gradiente	Índice de refração
1	1,3535
2	1,3575
3	1,3595
4	1,3610
5	1,3620
6	1,3640
7	1,3660
8	1,3680
9	1,3700
10	1,3725
11	1,3750
12	1,3775

Fonte: Elaborada pela autora.

Gráfico 1 – Qualidade do fracionamento do gradiente contínuo de sacarose 15- 30% no qual foi aplicado o lisado clarificado de *L. guyanensis*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Gráfico 2 – Qualidade do fracionamento do gradiente contínuo de sacarose 15- 30% no qual foi aplicado o lisado clarificado de *L. major*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 RT-PCR

A partir das amostras retiradas do gradiente de sacarose, foram realizadas reações de RT-PCR para a conferência da presença do RNA viral. O resultado da análise das amostras do gradiente de sacarose 15-30% (Figura 27) está de acordo com os resultados obtidos por CADD, T.L.; PATTERSON, J.L.. (51) Além disso, é possível observar que há a amplificação do RNA apenas nas amostras correspondentes à cepa de *L. guyanensis*, conhecida possuidora do vírus LRV1-4, o que sugere que os primers são específicos para o RNA viral.

Figura 27 – Gel de agarose 2% demonstrando o resultado da RT-PCR das alíquotas retiradas do gradiente. O número 1 indica o Marcador de DNA. As frações do gradiente em que foi aplicado o lisado de *L. guyanensis* são as 12 primeiras, sendo 2 o topo e 13 o fundo. As frações do gradiente em que foi aplicado o lisado de *L. major* são as 12 últimas, sendo 14 o topo e 25 o fundo. O RNA viral foi amplificado nas amostras 3, 9, 10, 12 e 13.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi verificada também a presença do RNA viral no gradiente contínuo de 15-45% (Figura 28). Este gradiente foi fracionado em alíquotas de 500 µL, afim de aumentar a homogeneidade das amostras.

Figura 28 - Gel de agarose 2% das amostras de RT-PCR aliqüotadas do gradiente de sacarose 15-45%. O número 1 indica o Marcador de DNA. As amostras de 2-24 representam amostras onde foi aplicado material de *L. guyanensis*, 2 é o topo e 24 é o fundo do gradiente.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Western Blot

Os peptídeos foram sintetizados de acordo com as recomendações do programa Lasergene, baseadas no método de Jameson-Wolf (Figura 29).

Figura 29 – Análise obtida pelo programa Lasergene utilizando o método de Jameson-Wolf e as características das regiões selecionadas para síntese dos peptídeos A11 (11 aminoácidos) e A9 (9 aminoácidos).

Fonte: DNASTAR. (41)

Para a realização dos western blots, 100 μ L das amostras do gradiente foram diluídas em tampão de amostra contendo beta-mercaptoetanol e 8 M de uréia, pois, de acordo com CADD; PATTERSON (51), mesmo em um gel desnaturante, ainda é possível observar a presença de uma banda de 180 kDa, o que concluiu-se ser um dímero das proteínas do capsídeo.

Dentre os dois anticorpos testados, o que demonstrou melhores resultados foi o anti-peptídeo A11 (Figura 30).

Figura 30 – A) Análise por western blot do anticorpo anti-peptídeo A11 com titulação 1:300, onde: 1) Marcador de massa molecular, 2) Peptídeo A11 conjugado com BSA e 3) Amostra de *L. guyanensis*; B) Análise por western blot do anticorpo anti-peptídeo A9 com titulação 1:300, onde: 1) Marcador de massa molecular, 2) Peptídeo A9 conjugado com BSA e 3) Amostra de *L. guyanensis*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados mostram que o anticorpo reconhece a proteína de interesse, visto que foram realizados testes também com os anticorpos do coelho antes da inoculação do agente antigênico, e estes não interagiram (ou interagiram menos) com as proteínas presentes na amostra (Figura 31).

Figura 31 – Western Blot para verificação da especificidade do anticorpo primário anti-capsídeo (números 2 a 8) em comparação com os anticorpos do coelho antes da inoculação (números 9 a 15). A titulação dos anticorpos é de 1:300. Na imagem: 1) Marcador de peso molecular; 2), 8), 9) e 15) Peptídeo antigênico conjugado com BSA; 3) a 7) e 10) a 14) Amostras retiradas do topo do gradiente descontínuo de sacarose 15-45%.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar também nos resultados, que no primeiro gradiente (descontínuo, 15-45% de sacarose) as amostras que apresentam sinal para a proteína do capsídeo não se encontram nas frações do gradiente, mas nas frações que se referem ao lisado (Figura 32). Uma possibilidade é que nas frações do gradiente em que há a presença do RNA viral a proteína do capsídeo esteja também presente, porém em quantidades abaixo do limite de detecção da técnica (da ordem de picogramas).

Figura 32 – Western Blot para verificação da presença do capsídeo viral nas frações retiradas do gradiente de sacarose descontinuo de 15-45%. Na imagem: 1) Marcador de massa molecular; 2-13) Frações do gradiente do topo ao fundo; 14) Peptídeo A11 conjugado com BSA.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão por Contraste Negativo

As grades de NS-TEM foram feitas em colaboração com o Dr. Rodrigo Portugal (CNPEM), Dr. Alexandre Cassago (CNPEM) e do aluno de doutorado Vitor Hugo Balasco Serrão (IFSC-USP), no Laboratório Nacional de Nanotecnologia – CNPEM. Estas foram preparadas aplicando-se uma carga ionizante (positiva ou negativa) à superfície de carbono ou deixando-as apolares, e variando a quantidade de lavagens e cobertura com o metal pesado.

Os resultados obtidos (Figura 33) mostram que a amostra não se encontra homogênea, mesmo após a separação por densidades nos gradientes ultracentrifugados. Porém, nas amostras que apresentam RNA viral do final dos gradientes, há partículas que apresentam o tamanho esperado para o vírus de RNA LRV1-4, que é de 38 nm segundo CADD, T.L.; PATTERSON, J.L. (51) Os resultados esperados são como os que foram obtidos em (9) e (51).

Figura 33 - Micrografias referentes às preparações: A) Grade com carga negativa, amostra retirada do fundo do gradiente de 15-30%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; B) Grade sem carga, amostra retirada do fundo do gradiente de 15-30%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; C) Grade com carga positiva, amostra retirada do fundo do gradiente de 15-30%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; D) Grade sem carga, amostra retirada do topo do gradiente de 15-45%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; E) Grade sem carga, amostra retirada do meio do gradiente de 15-45%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%; F) Grade sem carga, amostra retirada do fundo do gradiente de 15-45%, sem lavagem, 2 coberturas de acetato de uranila 2%.

4.6 Eletroporação em *L. tarentolae*

Os resultados dos procedimentos de extração do vetor de bactéria, digestão com enzima e precipitação para posterior transfecção são demonstrados na Figura 34. É possível observar que após a digestão, o vetor libera uma banda de aproximadamente 2 kpb, correspondente à parte de manutenção em *E. coli*.

Figura 34 – Preparação do plasmídeo pLEXSY_I-NEO2 para a eletroporação. 1) Marcador de DNA; 2) Plasmídeo não digerido; 3) Digestão com a enzima *SwaI*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Não houve sucesso no procedimento de eletroporação do DNA nas células de *L. tarentolae*, visto que não houve o crescimento de colônias nas placas de BHI-ágar contendo o antibiótico de seleção (Geneticina ou G-418).

4.7 Expressão em *E. Coli*

As tentativas de expressão de ambas as proteínas do capsídeo e RpRd não resultaram em super-expressão (Figuras 35 e 36) em nenhuma concentração de IPTG. Os demais géis se encontram na seção Apêndice D. Também não foi observada expressão, visto que não há novos sinais de proteína próximos ao tamanho esperado para a proteína do capsídeo ou RNA

polimerase, se comparadas as alíquotas de antes e depois da adição do indutor ao meio de cultura.

Figura 35 – Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 36 - Gel SDS-PAGE 12% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram realizados também Western blots com anticorpo monoclonal primário anti-poli-histidina produzido em ratos (Sigma), que reconhece a cauda de histidina expressa em fusão com as proteínas, porém não foi obtido resultado, indicando a ausência das proteínas.

A possível ausência de expressão em ambos os casos pode estar relacionada ao elevado número de cisteínas presente na sequência de aminoácidos, o que pode ter levado a proteína a não se enovelar corretamente e ser degradada pela bactéria, uma vez que o organismo não possui proteínas capazes de reduzir as ligações dissulfeto. (52) Além disso, a otimização de códons pode ter interferido na velocidade do ribossomo, causando um enovelamento incorreto e posterior degradação (53).

Há resultados que mostram que a proteína do capsídeo pode ser expressa em sistemas de bactéria. (54) O gene utilizado (Número de acesso NCBI: JX313126) se alinha com 99% de identidade ao genoma do vírus LRV1-4. Esta expressão pode ser devida a uma diferença nos códons das proteínas e que podem favorecer a expressão da proteína homóloga àquela de LRV1-4.

5 Conclusões e perspectivas

Apesar das tentativas de purificação do vírus a partir da cepa de *L. guyanensis* MHOM/BR/M4147 não resultarem em uma amostra homogênea suficiente para a resolução na estrutura do capsídeo por microscopia, foi possível observar a presença do RNA viral e da proteína do capsídeo em algumas amostras. Os testes e padronização do anticorpo também são importantes para a continuação deste trabalho, possibilitando novos experimentos, como imunolocalização e imunoprecipitação, e facilitando a visualização do vírus em micrografias, uma vez que é possível associá-lo a um anticorpo conjugado com ouro. Restará também refinar a técnica de purificação com dois ou mais gradientes, o que pode aumentar a homogeneidade das amostras e possibilitar a resolução estrutural do vírus.

Além disso, visto que não foi possível obter a proteína do capsídeo nos sistemas de expressão heteróloga em *E. coli* e *L. tarentolae*, novas tentativas podem ser realizadas modificando-se os parâmetros para expressão ou mesmo os organismos utilizados. Os parâmetros utilizados por ZANGGER *et al* (54) podem ser reproduzidos em bactéria. Além disso, foi adquirido o vetor necessário para expressão em *Leishmania major*, como feito por WIDMER (55).

A continuação deste trabalho representa um avanço no Brasil na área de virologia estrutural, além de ser importante para a possível descoberta de novos tratamentos para a leishmaniose e entendimento mais profundo sobre os mecanismos da doença.

REFERÊNCIAS

- 1 CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZES, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; DA SILVA, A.C. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite **Frontiers in Immunology**, v.5, n. 480, p.1-16, 2014.
- 2 KEDZIERSKI, L; EVANS, K.J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis **Parasitology**, v. 141, p. 1544-1562, 2014. doi: 10.1017/S003118201400095X
- 3 BOGITSH, B.J.; CARTER, C.E.; OELTMANN, T.N. **Human parasitology**. 3rd ed. New York: Elsevier, 2005.
- 4 SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R.K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 485-497, 2012.
- 5 TRATAMENTO da leishmaniose tegumentar Americana. Boletim Epidemiológico Paulista. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26_lta.htm> Acesso em: 24 abr. 2015.
- 6 NOTES on family: Totiviridae. Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/notes/showfamily.php?family=Totiviridae>> Acesso em: 30 dez. 2014.
- 7 TOTIVIRIDAE. ExPASy bioinformatics resource portal: Viralzone. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/161.html> Acesso em: 30 dez. 2014.
- 8 HARTLEY, M.; RNET, C.; ZANGGER, H.; BEVERLEY, S.M.; FASEL, N. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 99, p. 1-15, 2012.
- 9 TARR, P.I.; ALINE JUNIOR, R.F.; SMILEY, B.L.; SCHOLLER, J.; KEITHLY, J.; STUART, K. LR1: A candidate RNA virus of *Leishmania* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 9572-9575, Dec. 1988.
- 10 GUILBRIDE, L.; MYLER, P.J.; STUART, K. Distribution and sequence divergence of LRV1 viruses among different *Leishmania* species **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 54, p. 101-104, Apr. 1992.
- 11 WIDMER, G.; DOOLEY, S. Phylogenic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association **Nucleic Acids Research.**, v. 23, n. 12, p. 2300-2304, 1995.
- 12 ARMSTRONG, T.C.; KEENAN, M.C.; WIDMER, G.; PATTERSON, J.L. Successful transient introduction of *Leishmania* RNA virus into a virally infected and an uninfected strain of *Leishmania* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 1736-1740, Mar. 1993.

13 RANDOM Amplified Polymorphic DNA (RAPD). National Center for Biotechnology Information: NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrapd/>> Acesso em: 24 abr. 2015.

14 STUART, K.D.; WEEKS, R.; GUILBRIDE, L.; MYLER, P.J. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 8596-8600, Sept. 1992.

15 PATTERSON, J.L. The current status of *Leishmania* RNA virus I, **Parasitology Today**, v. 9, n. 4, p. 135-136, 1993.

16 MACBETH, K.J.; PATTERSON, J.L. The short transcript of *Leishmania* RNA virus is generated by RNA cleavage. **Journal of Virology**, v. 69, n. 6, p. 3458-3464, 1995.

17 MAGA, J.A.; WIDMER, G.; LEBOWITZ, J.H. *Leishmania* RNA virus 1-mediated cap-independent translation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 9, p. 4884-4889, 1995.

18 HOFFMANN, M.A.; SENANAYAKE, S.D.; BRIAN, D.A. A translation-attenuating intraleader open reading frame is selected on coronavirus mRNAs during persistent infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11733-11737, 1993.

19 MACBETH, K.J.; PATTERSON, J.L. Overview of the *Leishmania* virus endoribonuclease and functions of other endoribonucleases affecting viral gene expression **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, p. 254-260, Mar. 1998.

20 IVES, A.; RNET, C.; PREVEL, F.; RUZZANTE, G.; FUERTES-MARRACO, S.; SCHUTZ, F.; ZANGGER, H.; REVAZ-BRETON, M.; LYE, L.; HICKERSON, S.M.; BEVERLEY, S.M.; ACHA-ORBEA, H.; LAUNOIS, P.; FASEL, N.; MASINA, S. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis **Science**, v. 331, p. 775-778, Dec. 2011.

21 RCBS protein data bank. An information portal to 108263 biological macromolecular structures. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>> Acesso em: 24 abr. 2015.

22 EM resources. The electron microscopy data bank (EMDB) at PDBe. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/>> Acesso em: 24 abr. 2015.

23 PROTPARAM tool: ProtParam is a tool which allows the computation of various physical and chemical parameters for a given protein stored in Swiss-Prot or TrEMBL or for a user entered sequence. Disponível em: < <http://web.expasy.org/protparam/> > Acesso em: 11 jan. 2015.

24 CONSERVED Domain Database (CDD). Search for conserved domains within a protein or coding nucleotide sequence. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>> Acesso em: 11 jan. 2015.

25 SMART. simple modular architecture research tool. Disponível em: <<http://smart.embl-heidelberg.de/>> Acesso em: 11 jan. 2015.

26 PSIPRED. The PSIPRED protein sequence analysis workbench. Disponível em: <<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>> Acesso em: 11 jan. 2015.

27 SAVES: The structure analysis and verification server. Disponível em: <<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>> Acesso em: 15 jan. 2015.

28 I-TASSER online. Protein structure and function predictions. Disponível em: <<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>> Acesso em: 11 jan. 2015.

29 YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; POISSON, J.; ZHANG, Y. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v.12, n. 1, p.7-8, 2015.

30 ROY A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725-738, 2010.

31 ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 40, p. 1-8, 2008.

32 DORN, M.; SILVA, M.B.; BURIOL, L.S.; LAMB, L.C. Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies **Computacional Biology and Chemistry**, v. 53, p. 251-276, 2014.

33 SYMMDOCK. Prediction of complexes with cn symmetry by geometry based docking. Disponível em: <<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/>> Acesso em: 11 jan. 2015.

34 SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p.363-367, 2005.

35 SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. Geometry-based flexible and symmetric protein docking. **Proteins: structure, function and bioinformatics**, v. 60, part B, p. 224-231, 2005.

36 PETTERSEN, E.F. et al. UCFS Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computacional Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

37 WIDMER, G.; COMEAU, A.M.; FURLONG, D.B.; WIRTH, D.F.; PATTERSON, J.L. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 5979-5982, Aug. 1989.

38 GRAHAM, J. **Biological centrifugation**. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 2001.

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

40 MAHMOOD, T.; YANG, P. Western Blot: technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 9, p. 429-434, 2012.

41 DNASTAR Lasergene. Software for life scientists. Disponível em: <<http://www.dnastar.com/t-dnastar-lasergene.aspx>> Acesso em: 11 jan. 2015.

42 JAMESON, B.A.; WOLF, H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. **Computer Applications in the Biosciences**, v.4, n. 1, p.181, 1988.

43 DE CARLO, S.; HARRIS, J.R. Negative staining and Cryo-negative staining of macromolecules and viruses for TEM. **Micron**. v. 42, n. 2, p. 117-131, 2011.

44 KUSHNIR, S.; CIRSTEIA, I.C.; BASILIYA, L.; LUPILOVA, N.; BREITLING, R.; ALEXANDROV, K. Artificial linear episome-based protein expression system for protozoon *Leishmania tarentolae*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 176, p. 69-79, 2011. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.12.002.

45 BASILE, G.; PETICCA, M. Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. **Molecular Biotechnology**, v. 43, p. 273-278, 2009. doi: 10.1007/s12033-009-9213-5.

46 JENA bioscience. Disponível em: < <http://www.jenabioscience.com/>> Acesso em: 19 jan. 2015.

47 ADDGENE: The nonprofit plasmid repository. Disponível em: <
<https://www.addgene.org/>> Acesso em 19 jan. 2015.

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

49 HODGMAN, C.D.; WEAST, R.C.; SHANKLAND, R.S.; SELBY, S.M. **Handbook of chemistry and physics**. 44th ed. Cleveland: The Chemical Rubber Publishing Co., 1962.

50 LANGE, N.A. **Handbook of Chemistry**. 20th ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1961.

51 CADD, T.L.; PATTERSON, J.L. Synthesis of viruslike particles by expression of the putative capsid protein of *Leishmania* RNA virus in a recombinant baculovirus expression system. **Journal of Virology**, v. 68, n. 1, p. 358-365.

52 BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 1399 – 1408, 2004.

53 GOODMAN, D.B.; CHURCH, G.M.; KOSURI, S. Causes and effects of N-terminal codon bias in bacterial genes. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 475-479, 2013.

54 ZANGGER, H.; RNET, C.; DESPONDS, C.; KUHLMANN, F.M.; ROBISON, J.; HARTLEY, M.; PREVEL, F.; CASTIGLIONI, P.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; MÜLLER, N.; PARMENTIER, L.; SARAIVA, N.G.; BERVELEY, S.M.; FASEL, N. Detection of *Leishmania* RNA virus in *Leishmania* parasites. **PLOS Neglected Diseases**, v. 7, n.1, p. 1-11, 2013.

55 WIDMER, G. Suppression of *Leishmania* RNA virus replication by capsid protein over expression. **Journal of Virology**, v. 69, n. 7, p. 4122–4126, 1995.

Apêndice A – Resultados gerados pelo programa PSIPRED.

Figura 37 – Resultados gerados pelo servido PSIPRED de forma gráfica, com a confiabilidade local do dobramento.

Continua

Continuação

Continua

Apêndice B- Resultados gerados pelo servidor I-TASSER.

O servidor I-TASSER gera 5 diferentes modelos de estrutura terciária. Para a proteína do capsídeo, foram gerados os modelos da Figura 40. Os valores de C-score estão listados na Tabela 4. Como é possível observar, o modelo 3 possui maior valor de C-score, portanto, maior confiabilidade do modelo globalmente.

Tabela 4 – Resultado C-score para os modelos gerados pelo servidor I-TASSER.

Nome	C-score
Modelo 1	-2,45
Modelo 2	-1,94
Modelo 3	-1,65
Modelo 4	-3,50
Modelo 5	-4,24

Fonte: I-TASSER (28)

Figura 38 – Modelos gerados pelo servidor I-TASSER.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, o programa fornece informações quanto à confiabilidade no enovelamento local (Figura 41). Neste caso, o modelo 3 também apresenta melhores resultados, visto que em toda a sua extensão os valores encontram-se próximos ou maiores à linha de base traçada pelo próprio programa.

Figura 39 – Análise da confiabilidade do enovelamento local dos modelos gerados pelo servidor I-TASSER.

Fonte: I-TASSER (28)

Apêndice C – Resultados gerados pelo programa SymmDock.

O programa SymmDock gera vários resultados. Há, no próprio site, a opção de fazer o download do número de modelos que o usuário desejar. Em ambos os casos de simetria que foram testados, escolheu-se analisar os 10 melhores modelos (Figuras 42 e 43), segundo o critério de classificação do algoritmo. O primeiro modelo, portanto, é o que possui maior “score”, indicando que este possui maior confiabilidade.

Figura 40 – Os dez melhores resultados do algoritmo SymmDock quando imposta simetria $n = 2$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 41 - Os dez melhores resultados do algoritmo SymmDock quando imposta simetria $n = 5$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apêndice D – Géis do teste de expressão em E.coli BL21 (DE3) pLysS.

Figura 42 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 0,1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 43 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 44 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 45 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 46 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 47 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína RNA polimerase. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 48 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 0,1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 49 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 50 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 18 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 51 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 52 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 0,5 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 53 - Gel SDS-PAGE 10% onde foram aplicadas as amostras do teste de expressão da proteína do capsídeo. O teste ilustrado no gel foi realizado a 37 °C com 1 mM IPTG. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostra antes da adição do indutor; 3) Amostra logo após a adição do IPTG, 4) Após 2h; 5) Após 3h; 6) Após 4h; 7) Após 5h; e 8) Após 16h.

Fonte: Elaborada pela autora.