ROSELANE PAIVA GOMES

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE CAPSÍDEO RECOMBINANTE DO
VÍRUS *SEMLIKI FOREST* E SUA ASSOCIAÇÃO *IN VITRO* COM RNA
AUTO REPLICATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para do Título de Mestre em Biotecnologia.

SÃO PAULO

2018

ROSELANE PAIVA GOMES

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE CAPSÍDEO RECOMBINANTE DO
VÍRUS *SEMLIKI FOREST* E SUA ASSOCIAÇÃO *IN VITRO* COM RNA
AUTO REPLICATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Renato Mancini Astray

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gomes, Roselane Paiva

Expressão da proteína de capsídeo recombinante do
vírus Semliki Forest e sua associação in vitro com
RNA auto replicativo / Roselane Paiva Gomes;
orientador Renato Mancini Astray. -- São Paulo,
2018.

83 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Proteína de Capsídeo. 2. Vírus Semliki Forest.
3. SFV. 4. RNA auto replicativo. 5. Complexo
Proteína-RNA. I. Mancini Astray, Renato ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Roselane Paiva Gomes

Titulo da Dissertação: Expressão da proteína de capsídeo recombinante do vírus *Semliki Forest* e sua associação *in vitro* com RNA auto replicativo

Orientador: Dr. Renato Mancini Astray

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB)

Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 20 de março de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Expressão da proteína de capsídeo recombinante do vírus Semliki Forest e sua associação *in vitro* com RNA auto replicativo", protocolo nº. **I-1373/15**, sob a responsabilidade de Renato Mancini Astray, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

This is to certify that the proposal "Recombinant expression of Semliki Forest virus capsid protein for *in vitro* association with self replicating RNA", protocol nº **I-1373/15**, under the responsibility of Renato Mancini Astray, has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee, and that it does not involve breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata, in scientific research.

Dra. Wale H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

A Deus
Sem Ti eu não sou nada.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos nesta página não serão suficientes para expressar a imensa gratidão que sinto por todos que aqui serão citados.

A Deus, porque foi Ele quem planejou tudo isso antes mesmo que eu tivesse sonhado e sempre esteve ao meu lado em todos os momentos dessa trajetória.

Ao meu esposo Leandro, meu eterno namorado e companheiro de todas as horas. Por ter apostado em mim, por fazer parte da minha vida, pela paciência ao me ouvir falar sobre assuntos totalmente desconhecidos.

Aos meus filhos Giovanna e Marcelo, por serem meus maiores presentes e terem tido a paciência de ter uma mãe estudante, que muitas vezes precisou estar ausente.

Aos meus familiares: mãe, pai, minha avó Dona Dalva, minhas segundas mães Mirtes e Dona Mercês, meus segundos pais Tony e Sr. Luiz (*in memorian*), meus irmãos Wesley, Gui, Kevin e Ká, por acreditarem no meu sonho e sonharem junto comigo.

A Lúcia, que me apresentou o laboratório de Imunologia Viral e fez parte diretamente deste novo ciclo da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Renato Astray, por acreditar e confiar em mim, pelo exemplo de pessoa, pela orientação e até mesmo aconselhamentos pessoais.

A Dra. Soraia Jorge pelas diversas contribuições em meu trabalho.

A todos os colaboradores do laboratório de Imunologia Viral, os que ainda estão e os que já se foram após uma bela trajetória, quero agradecer imensamente pelo acolhimento, carinho, bagunça... Vocês são realmente especiais em minha vida, cada um com sua particularidade.

A minha amiga Flávia Barbosa, que me auxiliou e faz parte diretamente dessa conquista.

Aos laboratórios de Bacteriologia, Biologia Celular, Anticorpos Monoclonais, Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto Butantan e ao laboratório de Células Animais da Universidade de São Paulo por toda colaboração, seja com equipamentos ou com materiais.

Ao Instituto Butantan e ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia-USP.

A CAPES pela bolsa concedida, pelo apoio financeiro.

A todos vocês o meu: MUITO OBRIGADA por tudo!

Quem pensa conhecer alguma coisa
ainda não conhece como deveria.
1 Coríntios 8:2

RESUMO

GOMES, R. P. **Expressão da proteína de capsídeo recombinante do vírus *Semliki Forest* e sua associação *in vitro* com RNA auto replicativo** 2018. 81 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Vacinação contra doenças virais e bacterianas tem sido uma das histórias de sucesso da medicina humana e veterinária. Vacinas genéticas são constituídas apenas de DNA (como plasmídeos) ou RNA (como mRNA), que são entregues às células alvo. Esta abordagem proporciona uma vantagem significativa, pois essas preparações em geral apresentam facilidade de construção genética, baixo custo, rapidez de produção em massa, estabilidade elevada e um perfil de segurança atraente. Vacinas baseadas em RNA recentemente receberam maior atenção porque, ao contrário de vacinas de DNA, são processadas no citoplasma, excluindo a necessidade de entrada no núcleo celular. O vírus *Semliki Forest* (SFV, *Alphavirus*, *Togaviridae*) possui um RNA genômico, auto replicativo, de simples fita e polaridade positiva, protegido em uma nucleocápside icosaédrica, composta pelo próprio RNA e pela proteína de cápside viral (C), de 267 aminoácidos. A nucleocápside contém 180 cópias da proteína C e é coberta por uma membrana lipoprotéica contendo as glicoproteínas virais. Para realizar a entrega de moléculas de RNA com fins de imunização é fundamental que o material esteja protegido da ação de enzimas. Assim, o objetivo deste trabalho foi expressar a proteína C recombinante de SFV em *E.coli*, associá-la *in vitro* com RNA auto replicativo, contendo gene repórter e fazer entrega deste complexo à célula alvo. Para isso, o gene da proteína C foi obtido de forma sintética e clonado em um vetor de expressão em bactérias, pET-28a(+). Para a expressão da proteína C recombinante foram utilizadas bactérias *E. coli* BL21(DE3) e testadas diferentes temperaturas após indução com IPTG. A proteína obtida foi purificada por cromatografia de afinidade e a amostra foi dialisada utilizando coluna de dessalinização. Após a purificação, a proteína recombinante foi submetida a uma associação *in vitro* com RNA, obtido através de transcrição *in vitro*. A eficiência de formação do complexo Proteína-RNA foi medida pela quantidade diferencial de RNA livre antes e após o procedimento por eletroforese em gel de agarose e pela análise através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. A entrega do complexo Proteína-RNA foi realizada de forma eficiente à célula alvo. Desta forma, de maneira geral, a proteína de capsídeo do vírus SFV é capaz de se associar *in vitro* com RNA auto replicativo,

trazendo proteção e estabilidade ao mesmo, bem como realizar a entrega desse material à célula alvo, através da desmontagem da nucleocápside no interior da célula hospedeira.

Palavras-chave: Proteína de capsídeo. Vírus *Semliki Forest*. SFV. RNA auto replicativo. Complexo Proteína-RNA.

ABSTRACT

GOMES, R. P. **Expression of Semliki Forest virus recombinant capsid protein and its in vitro association with auto amplify RNA** 2018. 81 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Vaccination against viral and bacterial diseases has been one of the success stories of human and veterinary medicine. Genetic vaccines consist only of DNA (such as plasmids) or RNA (such as mRNA), which are delivered to target cells. This approach provides a significant advantage as these preparations generally have ease of genetic engineering, low cost, fast mass production, high stability and attractive safety profile. Unlike DNA vaccines, RNA-based vaccines are processed into the cytoplasm, excluding the need for entry into the cell nucleus. The Semliki Forest virus (SFV, *Alphavirus*, *Togaviridae*) has a positive-strand and auto amplify RNA, protected in an icosahedral nucleocapsid, composed of viral RNA and the 267 amino acid capsid protein (C). The nucleocapsid contains 180 copies of protein C and is covered by a lipoprotein membrane containing the viral glycoproteins. In order to carry out the delivery of RNA molecules for immunization purposes, it is essential that the material is protected from the action of enzymes. Thus, the objective of this work was to express recombinant SFV C protein in *E.coli*, to associate it in vitro with auto replicative RNA, containing reporter gene and to deliver this complex to the target cell. For this, the protein C gene was synthesized and cloned into a bacterial expression vector, pET-28a (+). For expression of recombinant protein C, *E. coli* BL21 (DE3) bacteria were used and different temperatures tested after IPTG induction. The obtained protein was purified by affinity chromatography and the sample was dialyzed using desalting column. After purification, the recombinant protein was subjected to an in vitro association with RNA, obtained by in vitro transcription. The efficiency of formation of the Protein-RNA complex was measured by the differential amount of free RNA before and after the procedure by agarose gel electrophoresis and by the analysis through images obtained by transmission electron microscopy. Delivery of the Protein-RNA complex was efficiently performed on the target cell. Thus, in general, the SFV virus capsid protein is able to associate in vitro with auto amplify RNA, providing protection and stability to it, as well as delivering this material to the target cell, by disassembling the nucleocapsid in the interior of the host cell.

Keywords: Capsid protein. Semliki Forest Virus. SFV. Auto amplify RNA. Protein-RNA complex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Genoma dos <i>Alphavirus</i> – RNA auto replicativo	23
Figura 2.	Estrutura do vírus <i>Semliki Forest</i>	24
Figura 3.	Mapa do vetor pET-28a(+) mostrando as regiões de clonagem e expressão	32
Figura 4.	Desenho da sequência do gene da proteína de capsídeo - gBlock® Gene Fragments, IDT Technologies	33
Figura 5.	Mapa do vetor SFV com inserção do gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) ou a glicoproteína do vírus da raiva (GPV)	43
Figura 6.	Mapa do vetor MAYV com inserção do gene que codifica a E2 do vírus Mayaro	43
Figura 7.	Digestão por enzimas de restrição dos vetores pET-C – Colônia 5 e pET28a(+) – Novagem	46
Figura 8.	Expressão da proteína de capsídeo em bactéria <i>E. coli</i> BL21 (DE3) a 28 °C	47
Figura 9.	Digestão por enzimas de restrição dos vetores pET-C – Colônia 12 e pET28a(+) – Novagem	48
Figura 10.	Seleção clonal e expressão da proteína de capsídeo em bactéria <i>E. coli</i> BL21 (DE3) a 30 °C	49
Figura 11.	Seleção clonal e expressão da proteína de capsídeo em bactéria <i>E. coli</i> BL21 (DE3) a 28 °C	50
Figura 12.	Seleção clonal e expressão da proteína de capsídeo em bactéria <i>E. coli</i> BL21 (DE3) a 37 °C	50
Figura 13.	Purificação da proteína de capsídeo por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA	52
Figura 14.	Purificação da proteína de capsídeo – Troca de tampão com coluna HiTrap™ Desalting	52
Figura 15.	Obtenção de RNA através de transcrição <i>in vitro</i> dos vetores pSFVGFP e pMAYV(E2)	53
Figura 16.	Análise do complexo Proteína-RNA por eletroforese em gel de agarose	54
Figura 17.	Nova seleção clonal e expressão da proteína de capsídeo em bactéria <i>E. coli</i> BL21 (DE3) a 28 °C	55
Figura 18.	Expressão da proteína de capsídeo em bactéria <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) a 28 °C	56
Figura 19.	Expressão da proteína de capsídeo em bactéria <i>E. coli</i> Rosetta pLyss a 28 °C	57
Figura 20.	Expressão da proteína de capsídeo em bactéria <i>E. coli</i> BL21 (DE3) a 28 °C com concentrações variadas de indutor	58
Figura 21.	Purificação da proteína de capsídeo por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap™	59
Figura 22.	Troca de tampão da proteína de capsídeo - HiTrap™ Desalting	60
Figura 23.	Obtenção de RNA através da transcrição <i>in vitro</i> dos vetores pSFVGFP e pSFVGFP	61

Figura 24.	Análise do complexo Proteína-RNA por gel de agarose após aquecimento da proteína	62
Figura 25.	Análise do complexo Proteína-RNA em contrastação negativa por microscopia eletrônica de transmissão	63
Figura 26.	Análise da entrega do complexo Proteína-RNA por microscopia de fluorescência	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento do clone	35
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney cells</i>
CHIKV	Chikungunya vírus
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eVLP	<i>Enveloped virus like particle</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPV	Glicoproteína do vírus da raiva
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IMAC	Cromatografia de afinidade com íon metálico imobilizado
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
J774A1	Linhagem celular de sangue de camundongo
LB	Meio para cultura de bactéria Luria Bertani
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
PBS	Solução Buferada Salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	<i>Fluoreto fenil metano sulfonil</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RPRD	RNA polimerase RNA-dependente
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SFV	<i>Semliki Forest vírus</i>
SINV	Sindbis virus
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
TAE	Tris-Acetato-EDTA
VC	Volume de coluna
VEEV	Vírus da encefalite equina venezuelana
α MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> – Modificação Alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Vacinas de ácidos nucleicos.....	20
2.2 RNA auto replicativo.....	22
2.3 Proteína de capsídeo do vírus Semliki Forest.....	23
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Linhagens de bactérias.....	29
4.2 Linhagem de células.....	29
4.3 Meios de cultura.....	29
4.4 Antibióticos.....	30
4.5 Manutenção das bactérias	30
4.6 Manutenção das células	30
4.7 Vetor para clonagem e expressão	31
4.9 Digestão de DNA com enzimas de restrição para clonagem	33
4.10 Purificação dos produtos de digestão	34
4.11 Reação de ligação	34
4.12 Confirmação de clonagem	34
4.13 Sequenciamento e amplificação do plasmídeo.....	34
4.14 Eletroforese em gel de SDS-PAGE	36
4.15 Análise por Western blot	36
4.16 Anticorpos para imunensaio	36
4.17 Seleção clonal e expressão da proteína recombinante	36
4.17.1 Teste de temperatura para expressão da proteína recombinante	37
4.17.2 Teste de concentração do indutor para expressão da proteína recombinante	37
4.18 Obtenção da proteína recombinante	38
4.19 Tampões para ensaio de purificação	38

4.20 Lise bacteriana.....	39
4.21 Coluna para ensaio de purificação	40
4.22 Purificação da proteína recombinante.....	40
4.22.1 Purificação da proteína recombinante – troca de tampão	41
4.23 Obtenção do RNA de interesse.....	42
4.24 Associação da Proteína C com RNA de interesse	43
4.25 Análise da associação da proteína de capsídeo com RNA de interesse por eletroforese em gel de agarose	44
4.26 Análise da associação da proteína de capsídeo com RNA de interesse por Microscopia Eletrônica.....	44
4.27 Entrega do complexo Proteína-RNA às células BHK-21 e macrófagos J774A1	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Clonagem do gene da proteína de capsídeo do SFV no vetor pET28a(+)	46
5.2 Sequenciamento e amplificação do plasmídeo.....	48
5.3 Seleção clonal e expressão da proteína recombinante	48
5.3.1 Expressão da proteína de capsídeo em bactérias <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	49
5.4 Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel imobilizado Ni-NTA – batch.....	51
5.5 Obtenção do RNA de interesse.....	53
5.6 Associação da proteína de capsídeo com RNA de interesse	53
5.7 Nova seleção clonal e expressão da proteína recombinante	55
5.7.1 Expressão da proteína de capsídeo em cepas de bactéria <i>E. coli</i> BL21(DE3)	55
5.7.2 Expressão da proteína de capsídeo em cepas de bactéria <i>E. coli</i> Rosetta.....	56
5.7.3 Avaliação de concentração do indutor para expressão da proteína recombinante.....	57
5.8 Purificação da proteína de capsídeo por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap TM	58
5.8.1 Purificação da proteína de capsídeo – troca de tampão	60
5.9 Obtenção do RNA de interesse.....	61
5.10 Associação entre a proteína de capsídeo e o RNA de interesse	61
5.11 Entrega do complexo Proteína-RNA as células BHK-21 e a macrófagos J774A1	64
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS*	73
ANEXOS	79

1. INTRODUÇÃO

O progresso da ciência sempre foi motivação para o desenvolvimento de vacinas eficazes com novas tecnologias. A primeira geração dessas vacinas foi estabelecida pela imunização com patógenos atenuados ou inativados e toxinas inativadas (toxóides). Estas abordagens se mostraram atraentes porque a resposta imune induzida é geralmente robusta, de amplo alcance, de longa duração e o desenvolvimento dessas vacinas não requer um conhecimento a priori dos antígenos imunogênicos do patógeno (GEALL et al., 2013). A segunda geração veio pela consequente inovação nas tecnologias de cultura celular, na metade do século 20, onde foi permitido o desenvolvimento de vacinas eficazes e mais seguras, como a poliomielite, caxumba, rubéola, sarampo, rotavírus e varicela. Com o progresso na área da microbiologia, vacinas de polissacarídeos contra algumas cepas de pneumococo e meningococo também foram estabelecidas (DELANY et al., 2014).

As vacinas genéticas, que compõe a terceira geração de vacinas, têm sua composição baseada em ácidos nucleicos (DNA ou RNA) cuja sequência codifica o antígeno de interesse (ULMER et al., 2012). Além de desencadear uma resposta humoral completa, a vacinação com ácidos nucleicos é uma grande promessa porque possui algumas vantagens, tais como a facilidade de construção genética, baixo custo, rapidez de produção em massa, estabilidade elevada e um perfil de segurança atraente (LØVÅS et al., 2014; SAXENA et al., 2008). No entanto, a imunogenicidade deve ser melhorada, especialmente em animais de grande porte e seres humanos. Para isso, já estão sendo trabalhados métodos de otimização na entrega desses materiais, entre os principais contribuintes podem ser apontadas tecnologias como biobalística (*gene-gun*), eletroporação, lipossomas, nano partículas e cápsides virais (LØVÅS et al., 2014).

Para fins de imunização, a utilização de RNA viral auto replicativo é uma abordagem especialmente vantajosa, já que não leva à integração de material genético no genoma das células do indivíduo vacinado, garantindo uma expressão transiente e controlada do antígeno de interesse. Atualmente essa abordagem é realizada pela utilização do vetor viral, porém há algumas dificuldades nesse processo como a quantificação do RNA, transfecção de células de mamíferos e purificação do vetor viral (ULMER et al., 2012). Além disso, a imunização com vetores virais sempre encontra críticas relacionadas à existência de imunidade prévia ao veículo de entrega no organismo a ser vacinado, o que levaria à sua inativação parcial ou total (ULMER et al., 2012).

Uma alternativa ideal seria a de entregar o RNA auto replicativo diretamente às células do hospedeiro, sem a intermediação do vetor viral. Isso pode ser realizado por meio da proposição dos veículos adequados. Alguns reagentes químicos têm sido utilizados para fazer esse processo *in vitro* para fins de pesquisa (TransMessenger[®]), porém se apresentam muito tóxicos para a utilização *in vivo*.

No laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, estudos têm sido realizados para expressão de proteínas recombinantes, como por exemplo a glicoproteína do vírus da raiva (GPV), que é responsável pela indução de anticorpos neutralizantes no organismo exposto ao vírus, utilizando diferentes estratégias, como a expressão transiente dessa e outras proteínas recombinantes em linhagens celulares de inseto e mamíferos, utilização de vetores virais (SFV, Pseudopartículas e Baculovírus) para entrega da proteína em estudo às células alvo (PATIÑO, 2016; BERNARDINO, 2015; MONTEIRO-VENTINI, 2014; ASTRAY et al., 2017; ASTRAY et al., 2014; ASTRAY et al., 2008; YOKOMIZO, 2007).

Com intuito de explorar as técnicas que já estão bem estabelecidas no laboratório para expressão e purificação de proteínas recombinantes, uso do RNA auto replicativo de SFV, manipulação e manutenção de linhagens celulares, bem como a utilização da proteína repórter GFP e também a GPV em novas estratégias, neste trabalho é buscada uma associação entre a proteína recombinante de capsídeo (C) do vírus *Semliki Forest* (SFV) e o RNA auto replicativo do SFV, fora do ambiente celular, com a finalidade de formar um complexo Proteína-RNA e fazer a entrega deste complexo à célula alvo, permitindo o desempacotamento do RNA e a expressão da proteína de interesse.

A escolha da proteína C para essa função deve-se ao fato dessa proteína se associar naturalmente com o RNA do SFV, através de um sinal de encapsidação localizado na proteína não estrutural nsP2 do genoma deste vírus. Desta forma, a expectativa é de que essa proteína exerça funções protetora e estabilizadora ideais para a preservação do RNA.

A abordagem de expressão dessa proteína C em bactérias se deu pelo fato de outras proteínas de capsídeo de *Alphavirus* já terem sido obtidas com sucesso por esse sistema de expressão recombinante. Tellinghuisen et al. (1999), com intuito de analisar as interações da proteína de capsídeo do *Alphavirus* Sindbis com ácidos nucleicos, utilizou *E. coli* BL21(DE3) e verificou que a proteína não perdia sua estrutura funcional, além de não possuir modificações pós traducionais, como por exemplo glicosilações. Portanto, aliado ao fato de que a expressão de proteínas recombinantes em bactérias possui vantagens em comparação a outros sistemas, como o tempo de trabalho, facilidade na manipulação e alto rendimento do

material de interesse, optou-se por utilizar o sistema *E. coli* BL21 (DE3) para expressar a proteína C de SFV.

Após as etapas de clonagem e verificação das melhores condições de expressão, a proteína C do SFV foi purificada por técnicas cromatográficas e utilizada em ensaios de associação com RNAs auto replicativos do SFV. Utilizando recursos analíticos como a microscopia eletrônica e o ensaio de mobilidade em gel de agarose, foi possível comprovar a associação da proteína C recombinante com o RNA auto replicativo. Através de ensaio de entrega a macrófagos murinos J774A1, observamos que o RNA permaneceu ativo após sua associação, tendo eficazmente se dissociado da proteína C quando atingiu o interior das células.

Embora os resultados sejam preliminares para indicar o real potencial de uso desse sistema para futuros testes de imunização, o conjunto dos dados mostra que a proteína C pode ser um importante componente para o estabelecimento de uma vacina utilizando o RNA do SFV, pois sua associação com o RNA em um formato típico de capsídeo pode ter um efeito estabilizador, ao mesmo tempo em que possivelmente libera o RNA auto replicativo no lugar apropriado dentro das células.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vacinas de ácidos nucleicos

Vacinação contra doenças virais e bacterianas tem sido uma das histórias de sucesso da medicina humana e veterinária. Provavelmente o exemplo mais notável da vacinação é a erradicação da varíola (WALKER; RAPLEY, 2009). Atualmente existem vacinas seguras e eficazes que se baseiam em agentes vivos atenuados, cuja inoculação resulta em uma infecção leve, sem causar doença. Esta abordagem tem sido atraente porque a resposta imune induzida pela vacina é geralmente robusta, de amplo alcance e de longa duração. Além disso, muitas vezes o desenvolvimento da vacina não requer um conhecimento a priori dos antígenos imunogênicos patógeno e a atenuação do agente patogênico pode muitas vezes ser conseguida, por exemplo, por uma série de passagens em células (GEALL, 2013).

Por outro lado, em alguns casos pode ser desejável focar a resposta imune em apenas um ou alguns antígenos, como por exemplo, o antígeno de superfície da hepatite B ou a toxina tetânica, ao invés de todo o repertório de antígenos no organismo. Nestes casos opta-se pela utilização de vacinas de subunidades, que podem ser recombinantes ou obtidas através da purificação da proteína imunogênica a partir do microrganismo alvo (GEALL, 2013).

Como um meio para combinar as características positivas de ambos: vírus atenuado e vacinas de subunidade, vacinas à base de ácidos nucleicos estão sendo desenvolvidas, podendo ser baseadas em vetores virais, DNA plasmidial ou RNA (LIU, 2010; LEITNER, 1999; TANG et al., 1992). Para expressar seu efeito, ao serem entregues tais vacinas devem acessar o núcleo, no caso das vacinas baseadas em DNA, ou o citoplasma celular, para as vacinas baseadas em RNA, e promover a expressão do antígeno *in vivo*. Essas vacinas envolvem eficientemente tanto vias de apresentação baseadas em MHC-I como de MHC-II que permitem a estimulação de linfócitos T CD4, T CD8 e B, desencadeando tanto resposta humoral como celular, o que representa uma das grandes possibilidades de estabelecer essa estratégia vacinal (JOHANSSON et al., 2012; LI; SAADE; PETROVSKY, 2012; LIU et al., 2011; FLEETON et al., 2001).

Já se passaram mais de três décadas após a prova de conceito de que a entrega de um mRNA poderia conferir imunidade mediante a expressão de um antígeno *in vivo*, entretanto não houve um número expressivo de vacinas dessa natureza avançando para testes em humanos (WOLFF et al., 1990). Até o momento, somente três vacinas baseadas em RNA

estão ou foram testadas em ensaios clínicos, unicamente em abordagem terapêutica para tratamento de câncer (www.clinicaltrials.gov). Isso decorreu em parte da grande dificuldade de se trabalhar com essa molécula, por sua natureza mais instável em relação a outros candidatos vacinais, bem como por se desacreditar em sucessos clínicos com essa abordagem (DEERING et al., 2014).

Já foi demonstrado que o RNA é capaz de induzir imunogenicidade *in vivo* mesmo quando inoculado nu, ou seja, não associado a outras moléculas (KREITER et al., 2010). Estudos em modelos animais mostraram que a utilização de vacinas baseadas em RNA foi capaz de induzir títulos de anticorpos específicos, bem como produção de interferons do tipo I (BORREGO et al., 2013). Além disso, o RNA pode atuar estimulando a resposta imune, mediante a ligação a receptores TOLL tipo 7 e 8, e ativar diretamente vias inflamatórias que são necessárias para melhorar a apresentação de antígenos (KARIKÓ et al., 2005). Com isso, essa abordagem vacinal combina vantagens de patógenos atenuados somadas à propriedade de ser mais segura. Apesar dos benefícios, muitos problemas como a baixa expressão de antígeno, purificação em larga escala e estabilidade da molécula foram fatores que impediram o andamento dessa tecnologia, ficando como última opção para prevenção e tratamento de doenças (KALLEN et al., 2013).

A primeira abordagem vacinal utilizando RNA foi voltada à entrega da mensagem pronta sem nenhum mecanismo adicional de *delivery* e adjuvantes (WOLFF et al., 1990). Posteriormente, foi demonstrado que mRNA codificando a nucleoproteína do vírus influenza associado à lipossomas estimulava uma potente resposta de linfócitos T citotóxico antígeno-específico, o que não foi observado com o RNA nu (MARTINON et al., 1993). De fato, os avanços de otimização das vacinas de DNA, contribuíram para as melhorias das estratégias com RNA, na tentativa de induzir proteção imune, principalmente para doenças como malária, HIV (vírus da imunodeficiência humana) e câncer, nas quais as vacinas convencionais não foram suficientes.

Por outro lado, a nova geração de vacinas de RNA auto replicativo se demonstra uma estratégia promissora para o uso clínico. Este RNA tem a característica de aumentar a quantidade de antígeno, diminuindo assim, as doses requeridas para ativação de uma resposta imune (LJUNGBERG; LILJESTRÖM, 2015; LUNDSTROM, 2014).

A utilização de RNA do Vírus da Encefalite Equina Venezuelana como RNA auto replicativo expressando o gene GAG de HIV demonstrou estimular uma forte e potente resposta de células TCD8 específicas, após *prime* com DNA, quando foi testado em modelo murino (PERRI et al., 2003). Posteriormente essa técnica foi aprimorada para diminuir a

degradação por ribonucleases. A associação a lipossomas aumentou expressivamente a expressão da fosfatase alcalina, mesmo com o uso de uma dose 10 vezes menor do RNA nu. Além disso, essa plataforma conseguiu induzir imunidade específica contra RSV (vírus sincicial respiratório) e HIV com títulos de anticorpos similares aos induzidos por vetor viral ou DNA associado à eletroporação (GEALL et al., 2012).

Estudos subsequentes confirmaram a atividade imunogênica eficaz dessa plataforma associada a lipossomas em testes em ensaios pré-clínicos, induzindo imunogenicidade para influenza aviária ou HIV em animais de pequeno, médio e grande porte (BOGERS et al., 2015; BRITO et al., 2014; HEKELE et al., 2013). Portanto, é possível afirmar que vacinas baseadas em RNA auto replicativo recentemente receberam maior atenção, porque além de serem eficazes no estímulo de resposta imune humoral e celular específica para o antígeno de doenças infecciosas e não infecciosas em animais de grande porte, podem oferecer certas vantagens sobre vetores virais e DNA plasmidial, como a auto replicação *in vivo* (GEALL, 2013; GEALL et al., 2012; ULMER et al., 2012). Esses resultados demonstram que esta técnica é promissora, evidenciando uma nova estratégia que pode revolucionar o futuro das vacinas de RNA.

2.2 RNA auto replicativo

O genoma dos *Alphavirus* é constituído por um RNA positivo, auto replicativo, simples fita não segmentado, que funciona como um RNA mensageiro e está dividido em duas ORF's (*open Reading frames*), codificando nove proteínas no total. A tradução da primeira ORF (2/3 do RNA viral) gera uma poliproteína que posteriormente é clivada em quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), dentre elas, a enzima RNA polimerase RNA-dependente (RPRD) – complexo replicase. Este complexo tem a função de iniciar a replicação das fitas completas do RNA negativo, estas fitas anti senso servem de molde para gerar múltiplas cópias de RNA positivo do genoma completo (promotor 42S), assim como permitem a síntese do RNA subgenômico (promotor 26S), que corresponde ao último terço do genoma e contém a sequência das cinco proteínas estruturais (cápside, p62 – E2 e E3, 6K e E1), que formam a proteína do capsídeo e as proteínas do envelope viral (Figura 1A) (HENAO; CORTÉS; NAVAS, 2007; RIEZEBOS-BRILMAN et al., 2006).

O RNA subgenômico é gerado até 10 vezes mais que o RNA genômico, graças ao forte promotor 26S. Esta região estrutural pode ser substituída pela sequência do antígeno

alvo (Figura 1B) que proporciona um RNA não infeccioso capaz de auto amplificar (KUJALA et al., 2001).

Figura 1. Genoma dos *Alphavirus* – RNA auto replicativo

(A) Apresenta um promotor genômico (42S) que gera cópias de RNA positivo do genoma completo, um promotor subgenômico (26S), que gera cópias das proteínas estruturais, ORF 5' correspondente à região das proteínas não estruturais, ORF 3' correspondente à região das proteínas estruturais e sinal de encapsidação, localizado na nsP2, reconhecido pela proteína de capsídeo no momento do empacotamento do RNA viral. (B) Utilização do RNA auto replicativo para vacinas baseadas em *Alphavirus*. Apresenta um promotor genômico (42S) que gera cópias de RNA positivo do genoma completo, um promotor subgenômico (26S), que gera cópias da proteína de interesse – antígeno alvo, ORF 5' correspondente à região das proteínas não estruturais, ORF 3' correspondente à região da proteína de interesse e sinal de encapsidação, localizado na nsP2, reconhecido pela proteína de capsídeo no momento do empacotamento do RNA viral. Adaptado de Rupp et al (2015).

2.3 Proteína de capsídeo do vírus *Semliki Forest*

O vírus *Semliki Forest* (SFV) é um dos vírus de RNA melhor caracterizado, pertencente à família *Togaviridae*, que inclui muitos membros patogênicos. SFV consiste em uma nucleocápside icosaédrica que é composta por 180 cópias de uma única proteína de capsídeo (C), que é envolvida por um envelope lipídico, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, com as glicoproteínas virais E1 e E2 ancoradas que são essenciais para ligação e penetração do vírus na célula hospedeira e um RNA genômico de simples fita com polaridade positiva (Figura 2) e um genoma com tamanho de cerca de 12kb (FULLER, 1985; ELGIZOLI et al., 1989).

Figura 2. Estrutura do vírus *Semliki Forest*

Vírus *Semliki Forest*: Composto por nucleocápside icosaédrica que contém 180 cópias da proteína de capsídeo, que é envolvida por um envelope lipídico, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, com as glicoproteínas virais E1 e E2 ancoradas e um RNA genômico de simples fita com polaridade positiva. Fonte: viralzone.expasy.org.

A proteína de capsídeo tem cerca 33.000 kDa e consiste de 267 resíduos de amino ácidos com um N-terminal bloqueado (BOEGE, 1983). É uma proteína que possui múltiplas interações com componentes celulares e virais, sendo que as seguintes funções têm sido atribuídas à proteína C: (I) a proteína C do SFV e vírus Sindbis contém atividade autoproteolítica (HAHN, 1985; MELANCON, 1987); (II) sua nucleocápside altamente purificada exibe atividade fosfoquinase (BOEGE, 1983); (III) a proteína da nucleocápside interage transitoriamente com locais de ligação na maior subunidade ribossômica durante a montagem e desmontagem (ULMANEN, 1976; WENGLER et al., 1984); (IV) moléculas da proteína C interagem com o complexo da polimerase do vírus e tem sido proposto que esta interação conduz a um mecanismo de retroalimentação na síntese do mRNA subgenômico 26S (BRZESKI et al., 1978); (V) é responsável pela sinalização do transporte das demais proteínas estruturais ao complexo de Golgi (FAVRE et al., 2013); (VI) dados de experimentos *in vitro* (VAN STEEG et al., 1984) sugerem que a proteína C é o componente responsável pelo desligamento da síntese de proteínas do hospedeiro em células infectadas com SFV. Estas observações dão suporte à hipótese de que moléculas da proteína C do SFV podem atuar na célula infectada de um modo semelhante ao de um regulador pleiotrópico (ELGIZOLI et al., 1989).

Esta proteína consiste em dois domínios principais, o domínio N-terminal, rico em aminoácidos básicos que exercem funções durante a encapsidação do RNA genômico viral e o

domínio C-terminal, que possui atividade *cis*-autoproteolítica (FORSELL; SUOMALAINEN; GAROFF, 1995).

Estudos mostram que o domínio N-terminal da proteína de capsídeo do vírus Sindbis (SINV) pode ser subdividido em Região I e Região II e esta abordagem pode ser aplicada aos outros *Alphavirus*, incluindo SFV. A Região I (aminoácidos de 1 a 80) possui uma natureza altamente básica que tem implicado na ligação não específica com RNA (PEREIRA et al., 2001). A Região II desta proteína (aminoácidos 81 a 113) está envolvida na encapsidação do RNA genômico viral através de uma ligação específica entre a proteína e uma região do RNA genômico previamente localizada no nucleotídeo 132, dentro do gene da proteína não estrutural nsP2 (LINGER et al., 2004; OWEN; KUHUN, 1996; WEISS; GEIGENMULLER-GNIRKE; SCHLESINGER, 1994).

Já na Região III (aminoácidos 114 a 264), localizada no C-terminal desta proteína, está presente a interação entre proteína-proteína dentro do capsômero que é extremamente importante para a montagem da nucleocápside (HONG et al, 2006), nesta região também está localizado o domínio da protease.

A atividade autoproteolítica é inativada após clivagem da ligação peptídica entre os últimos resíduos Triptofano (Trp) e Serina (Ser), que são conservados entre todas as proteínas C de *Alphavirus* (FORSELL; SUOMALAINEN; GAROFF, 1995; SKOGING; LILJESTROM, 1998). Este domínio é independente do restante da proteína, da qual os aminoácidos do N-terminal, até a posição 112, podem ser eliminados sem afetar a atividade da protease (FORSELL; SUOMALAINEN; GAROFF, 1995). Entretanto, o trabalho de Choi et al, 1997 mostra que o aminoácido Trp encontra-se localizado em um local ativo, sugerindo que a autoclivagem é independente dos resíduos de aminoácidos seguintes e que desta forma sua expressão pode ser realizada sem a presença das outras proteínas estruturais presentes na poliproteína. Porém, a presença do aminoácido Trp é crucial para dobragem correta da proteína e essa dobragem é fundamental para a solubilidade de proteína intracelular (MORILLAS et al., 2008). O domínio C-terminal também participa do processo de brotamento, interagindo com as glicoproteínas através de uma região hidrofóbica que se encontra sobre a superfície da cápside (OWEN; KUHUN, 1996).

Outra função importante da proteína de capsídeo de *Alphavirus* do “novo mundo”, por exemplo, o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), é a atividade *shutoff* que promove o desligamento da síntese de proteínas da célula hospedeira. Esta característica depende da translocação nuclear da proteína C (GARMASHOVA et al, 2007). Em *Alphavirus* do “velho mundo”, por exemplo, Chikungunya vírus (CHIKV), este desligamento é regulado pela

proteína não estrutural nsP2 e não pela proteína de capsídeo (FROS et al, 2013). Porém, durante a replicação, esta proteína ainda transloca-se para o núcleo e sua função dentro do núcleo ainda é desconhecida (JAKOB, 1994; MICHEL et al., 1990)

Atualmente a proteína de capsídeo tem sido usada, juntamente com as outras proteínas estruturais, na obtenção de partículas de vírus envelopadas (eVLPs). Nesta abordagem, a poliproteína recombinante é expressa em células animais e seu sistema de montagem *in vitro* se assemelha ao *in vivo*, porém sem o RNA genômico. Essas partículas são facilmente purificadas, mostrando que podem conferir uma promissora plataforma para o desenvolvimento de vacinas de nanopartículas (HIKKE et al, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Realizar a associação *in vitro* da proteína recombinante de capsídeo (C) do vírus *Semliki Forest* (SFV) com um RNA de interesse.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Clonar e expressar a proteína C em sistema procarioto.
- Purificar a proteína C recombinante.
- Associar a proteína C recombinante com um RNA auto replicativo para a expressão de uma proteína repórter (GFP).
- Entregar o complexo Proteína-RNA às células alvo.

ESQUEMA DE TRABALHO

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens de bactérias

Foram utilizadas quatro linhagens de bactérias:

- *Escherichia coli* DH5 α
- *Escherichia coli* BL21 (DE3)
- *Escherichia coli* Rosetta (DE3)
- *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS

Linhagens Rosetta (DE3) e Rosetta (DE3) pLysS foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas.

Bactérias contendo a designação (DE3) indicam que o hospedeiro é um lisógeno do fago λ DE3, portanto carrega uma cópia do gene T7 RNA polimerase em seu cromossomo sob o controle do promotor lacUV5, induzível por *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG).

As cepas bacterianas Rosetta são derivadas de BL21 projetadas para aumentar a expressão de proteínas que contém códons raramente usados em *E. coli*, também possuem gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol.

Bactérias contendo a designação pLysS suprimem a expressão basal da T7 RNA polimerase antes da indução, estabilizando assim os recombinantes que codificam proteínas alvo que afetam o crescimento e a viabilidade celular.

4.2 Linhagem de células

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram BHK-21[C-13] (aderente) - fibroblastos, procedente de banco celular de nosso laboratório e macrófagos murinos J774A1, gentilmente cedidos pelo laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

4.3 Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para manutenção e crescimento das bactérias foi o LB (Luria-Bertani – BD Biosciences), 1,5% de ágar e antibiótico.

O meio de cultura utilizado para manutenção e crescimento das células BHK-21 foi o *Minimum Essential Medium* – Modificação Alfa (α MEM - Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab).

Para manutenção dos macrófagos J774A1 foi utilizado meio de cultura RPMI (Gibco), suplementado com 10% de SFB.

4.4 Antibióticos

O antibiótico utilizado para seleção das bactérias das linhagens DH5 α e BL21 (DE3), contendo o plasmídeo de interesse, foi canamicina (INLAB), na concentração de 50 μ g/mL. Os Antibióticos utilizados para seleção das bactérias da linhagem Rosetta, contendo o plasmídeo de interesse, foram cloranfenicol (INLAB), na concentração de 34 μ g/mL e canamicina (50 μ g/mL).

4.5 Manutenção das bactérias

A competência das linhagens de bactérias utilizadas foi realizada de acordo com o protocolo descrito no Anexo A.

Para o cultivo de bactérias em placas de petri foram acrescidos ao meio LB 1,5% de ágar e o antibiótico necessário para cada linhagem. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C, variando o período de incubação conforme o experimento realizado.

Para o cultivo de bactérias em frasco *erlenmeyer*, foi acrescido ao meio o antibiótico necessário para cada linhagem. As células foram mantidas em shaker, sob agitação de 240 rpm a 37 °C, até atingir a densidade óptica (DO) esperada de 0,6 em comprimento de onda a 550 nm.

4.6 Manutenção das células

As células BHK-21 e macrófagos J774A1 foram cultivadas em frascos T de 25 cm² com volume de trabalho de 5 mL de meio de cultura a 37 °C em incubadora contendo 5% de CO₂. As células BHK-21 foram subcultivadas duas vezes por semana, utilizando tripsina

diluída em PBS (Solução de Fosfato de Sódio), na proporção 1:1. Os macrófagos J774A1 foram subcultivados três vezes por semana, com auxílio de *cell scraper*.

Para realizar os ensaios, as células foram incubadas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, dependendo do experimento, com inóculo de 5×10^4 células por cm^2 .

4.7 Vetor para clonagem e expressão

O vetor utilizado para clonagem e expressão da proteína recombinante foi:

- pET28a(+) - Novagem: Vetor de 5.369 pb (Figura 3), que contém gene de resistência a canamicina, possui promotor T7, que permite a expressão da proteína recombinante fusionada a 6 resíduos de histidina na extremidade amino (N-terminal). A expressão do gene clonado neste vetor fica sob o controle do promotor do fago T7, que é induzível por IPTG (Thermo).

Figura 3. Mapa do vetor pET-28a(+) mostrando as regiões de clonagem e expressão

Apresenta uma origem de replicação bacteriana (ori), um centro múltiplo de clonagem ou *polylinker* que contém os sítios de restrição enzimática, gene que confere resistência a canamicina (kan) e promotor T7lac (fundido ao operador do gene *lac*) o que possibilita a indução da expressão da proteína recombinante por *isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG). Fonte: site Novagen.

4.8 Obtenção do inserto contendo gene da proteína de capsídeo do vírus Semliki Forest

A sequência do gene que codifica a proteína de capsídeo foi extraída do banco de dados GenBank® (NC_003215.1). Essa sequência foi obtida de forma sintética após otimização de códons para a expressão em *E. coli* na plataforma on-line para solicitação de síntese de fragmentos dupla fita de DNA (gBlocks® Gene Fragments, IDT Technologies). O fragmento de DNA dupla fita foi desenhado para conter sítios de restrição e sequências

específicas reconhecidas por oligonucleotídeos já disponíveis no laboratório (Figura 4). No desenho desta sequência foram inseridos sítios de restrição enzimática que possibilitassem a clonagem no vetor pET28a(+), a sequência para os *primers* T7 *promoter* e T7 *reverse* para amplificação do fragmento por PCR e a sequência de seis histidinas após o sítio da enzima de restrição *Nco* I, pois esta sequência seria descartada do *polylinker* do vetor com uma clonagem utilizando este sítio de restrição.

Figura 4. Desenho da sequência do gene da proteína de capsídeo - gBlock® Gene Fragments, IDT Technologies

```

AGGTAATACGACTCACTATAGGGACCATGGGCATGAAAAGAAAATTATTGGCGTTAGCCTTGTTAGCGTTATTGTTTA
ACGGCGCGCAGGTCATGCGCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGATCCCATATGGCTAGG
ATGAACTATATCCGACCCAGACCTTTATGGTCGTCGTTGGCGTCCGCGTCCGGCAGCACGTCCTTGGCCTCTGCAG
GCAACTCCGGTTGCACCGGTTGTTCCGGATTTCAGGCACAGCAGATGCAGCAGCTGATTAGCGCAGTTAATGCACTG
ACCATGCGTCAGAATGCCATTGCACCGGCACGTCCGCCTAAACCGAAGAAAAAACCACCAACCGAAACCGA
AAACCCAGCCGAAAAAATCAATGGTAAAACGCAGCAGCAAAAAAAGACAAACAGGCCGATAAGAAAAA
AAAAACCGGGTAAACGTGAGCGCATGTGCATGAAAATTGAAAACGATTGCATCTTTGAAGTGAAACACGAAGGTAA
AGTTACCGGTTATGCATGTCTGGTTGGTGACAAAGTTATGAAACCGGCACATGTTAAAGGCGTGATTGATAATGCAG
ATCTGGCAAACTGGCCTTCAAAAAAGCAGCAAAATATGATCTGGAATGTGCCAGATTCCGGTTCATATGCGTAGT
GATGCAAGCAAATACACCCATGAAAAACCGGAAGGTCATTATAACTGGCATCATGGTGCAATTTCAGTATAGCGGTGG
TCGCTTTACCATTCGACCGGTGCAGGTAACCGGGTGATAGCGGTCGTCGGATTTTGATAATAAAGGTCGTGTTGT
TGCCATTGTTCTGGGTGGTGCAAATGAAGGTAGCCGTACCGCACTGAGCGTTGTTACCTGGAATAAAGATATGGTTAC
CCGTGTTACTCCGGAAGGTAGCGAAGAATGGTAATCTGCGGCGCGCACTCGAGCCGCTGAGCAATAACTAGCTCC

```

TAATACGACTCACTATAGGG: T7 promoter primer
CCGCTGAGCAATAACTAGC: T7 reverse primer site
 Sequencia do gene de interesse: Proteína do Capsídeo

Desenho da sequência da proteína de capsídeo - Em vermelho a sequência da proteína; sítios de restrição marcados em rosa, amarelo, cinza, verde e azul escuro; em azul claro sequência de seis histidinas; nas extremidades sublinhados sítios dos *primers* T7 *promoter* e T7 *reverse* para amplificação por PCR.

4.9 Digestão de DNA com enzimas de restrição para clonagem

Para a subclonagem do inserto em pET-28a(+), os fragmentos de DNA dupla fita e o vetor foram digeridos com enzimas de restrição *Nco*I e *Eco*RI. Para a digestão foram utilizados 400 ng de vetor (feito em triplicata) e 200 ng inserto; 5 U de *Nco*I; 5 U de *Eco*RI; tampão Tango 2x (Thermo) e água ultrapura em quantidade suficiente para 10 µL cada reação. Essa reação foi incubada a 37 °C por 3 horas. Em seguida as enzimas foram inativadas a 65 °C por 20 minutos. O produto da digestão do vetor foi confirmado em gel de agarose 0,6%, diluído em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e corado com reagente GelRed™ (Uniscience) para visualização em trans-iluminador UV (ultravioleta).

4.10 Purificação dos produtos de digestão

O produto da digestão do vetor foi cortado do gel de agarose e posteriormente purificado. O produto da digestão do inserto foi purificado diretamente da reação, para maior rendimento de material. Para purificação dos materiais foi utilizado o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com protocolo do fabricante. Após purificação, o material foi quantificado por fluorimetria através do equipamento Qubit (Thermo), utilizando kit comercial Quibit® dsDNA BR Assay (Thermo), para realização do cálculo de ligação.

4.11 Reação de ligação

A reação de ligação foi realizada utilizando uma concentração de DNA (vetor : inserto) a uma razão molar de 1:1,5 devido ao baixo rendimento de material após purificação; tampão 1x; 7U de enzima T4 DNA ligase (Thermo) água ultrapura em quantidade suficiente para 35 µL. Incubado por 2 horas a temperatura ambiente e posteriormente 16 horas a 4 °C. A enzima foi inativada a 70 °C por 5 minutos.

O produto da ligação foi usado para transformar células competentes *E. coli* DH5α, seguindo protocolo de choque térmico descrito por Sambrook e Russel (2001).

4.12 Confirmação de clonagem

Foram selecionadas, aleatoriamente, 15 colônias para extração dos vetores através de mini preparações de plasmídeos por lise alcalina como descrito por Sambrook e Russel (2001). O produto extraído foi submetido à digestão contendo enzima de restrição *EcoRI*; tampão *EcoRI* 1x (Fermentas) água ultrapura em quantidade suficiente para 10 µL, para verificação da subclonagem.

Os produtos das digestões foram confirmados em gel de agarose 1% diluído em tampão TAE e corado com reagente GelRed™ (Uniscience) para visualização em transiluminador UV.

4.13 Sequenciamento e amplificação do plasmídeo

Os clones considerados positivos por digestão enzimática foram sequenciados utilizando oligonucleotídeos padronizados (Tabela 1), pelo método de Sanger. As reações de sequenciamento foram realizadas com um kit comercial BigDye® Terminator versão 3.1 Cycle Sequencing, equipamento 3.500 – Applied Biosystems, no laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan.

Em paralelo à confirmação da clonagem por sequenciamento, uma das amostras foi selecionada de forma aleatória para ampliação do plasmídeo e dar continuidade ao trabalho.

Para isso, células competentes *E. coli* DH5α foram transformadas, seguindo protocolo de choque térmico. Para extração do DNA plasmidial foi utilizado kit comercial *Maxiprep Plasmid* (Qiagen), de acordo com protocolo do fabricante. Após extração e quantificação do plasmídeo a amostra foi submetida a duas digestões para confirmação da amplificação do plasmídeo, a primeira contendo as enzimas de restrições *Nco* I e *Eco* RI; tampão *Fast Digest* (Fermentas) e água ultrapura em quantidade suficiente para 10 µL e a segunda contendo enzimas de restrição *Xba* I e *Nde* I; tampão *Fast Digest* 1x (Fermentas) e água ultrapura em quantidade suficiente para 10 µL. Posteriormente foi verificado que a expressão da proteína provinda deste vetor estava comprometida por um *stop códon*.

Após verificar a sequência correta, células competentes *E. coli* DH5α foram transformadas, seguindo protocolo de choque térmico, para ampliação do plasmídeo. A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando kit comercial, de acordo com protocolo do fabricante. Após extração do plasmídeo a amostra foi submetida a duas digestões, a primeira contendo as enzimas de restrições *Nde* I e *Eco* RI; tampão *Fast Digest* (Fermentas) e água ultrapura em quantidade suficiente para 10 µL e a segunda contendo enzimas de restrição *Nde* I e *Cla* I; tampão *Fast Digest* 1x (Fermentas) e água ultrapura em quantidade suficiente para 10 µL.

Oligonucleotídeo	Sequência do Oligonucleotídeo
Senso T7	5' – TAATACGACTCACTATAGGG – 3'
Reverso T7	5' – GCTAGTTATTGCTCAGCGG – 3'

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento do clone

4.14 Eletroforese em gel de SDS-PAGE

Para análises da proteína de capsídeo expressa de forma recombinante foram realizados ensaios em gel de SDS-PAGE 12% (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). A migração das proteínas foi realizada em voltagem constante de 150v e o gel corado com PageBlueTM Protein Staining Solution (Thermo).

4.15 Análise por Western blot

Para confirmação da expressão da proteína de capsídeo ensaios de imunodeteção foram realizados utilizando a técnica de *Western blot* (Anexo B). Para isso, as proteínas migradas em gel de acrilamida 12% foram submetidas à transferência para membrana de nitrocelulose Amersham Protran 0.45 NC nitrocelulose Western blotting membranes (GE Healthcare) por 1 hora/12v.

4.16 Anticorpos para imunoensaio

Os anticorpos utilizados para os ensaios de confirmação da expressão da proteína de capsídeo foram:

- anticorpo primário *Mouse anti-Histidina*, diluição 1:4000 (Cusabio).
- anticorpo secundário *Goat anti-Mouse* conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP), diluição 1:5000. (Sigma).

4.17 Seleção clonal e expressão da proteína recombinante

Para realizar os ensaios de seleção clonal, os plasmídeos pET-28a(+) contendo o inserto da proteína de capsídeo, denominados agora como pET-C, foram utilizados na transformação de células competentes de *Escherichia coli* das linhagens BL21 (DE3), Rosetta (DE3) e Rosetta pLyss, por choque térmico, como descrito por Sambrook e Russel (2001).

Os clones obtidos nas transformações foram crescidos em 5 mL de meio LB com adição de antibiótico necessário para cada cepa, a temperatura de 37 °C sob agitação de 240 rpm, até atingir a DO de 0,6 em comprimento de onda a 550 nm, induzida a expressão da proteína recombinante com 1 mM de IPTG e a temperatura ajustada ou não para cada

parâmetro testado nos ensaios. As amostragens de cada ensaio foram realizadas após cálculo, para retirada de concentração celular igual para todos os clones.

As células foram coletadas por centrifugação a 2600g por 5 minutos, ressuspendidas em 50 µL de tampão de lise (62,5 mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol e 5% β mercaptoetanol) e aquecidas a 100 °C por 10 minutos. Os resultados foram observados em gel de SDS-PAGE e também por *Western blot*.

Para obtenção do banco de trabalho, as células foram crescidas até atingir DO de 0,6 em comprimento de onda a 550 nm, realizadas amostragem de 1 mL de cada clone, centrifugadas a 2600g por 5 minutos e o pellet ressuspendido em meio LB com adição de 20% de glicerol. As amostras foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido (N₂) e armazenadas em freezer -80, em alíquotas de 100 µL.

4.17.1 Teste de temperatura para expressão da proteína recombinante

Bactéria *E. coli* BL21 (DE3) foram utilizadas neste ensaio. Os clones obtidos na transformação foram inoculados em 5 mL de meio LB líquido contendo canamicina e incubados à temperatura de 37 °C sob agitação de 240 rpm. A cultura foi monitorada até atingir uma DO de 0,6 em comprimento de onda a 550 nm e foi induzida a expressão da proteína com adição de 1 mM de IPTG. Após a indução, as culturas foram submetidas à expressão da proteína de interesse em três temperaturas diferentes (28, 30 e 37 °C).

As células foram coletadas por centrifugação a 2600g por 5 minutos, ressuspendidas em 50 µL de tampão de lise (62,5 mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol e 5% β mercaptoetanol) e aquecidas a 100 °C por 10 minutos. Os resultados foram observados em gel de SDS-PAGE e também por *Western blot*.

4.17.2 Teste de concentração do indutor para expressão da proteína recombinante

Para realizar os ensaios de teste com variação na concentração do indutor de expressão da proteína recombinante foi utilizado o clone 2, que apresentou melhores resultados durante a seleção clonal à temperatura de 28 °C.

As células foram incubadas em 5 mL de meio LB líquido contendo canamicina, a 37 °C até atingir DO de 0,6 em comprimento de onda a 550 nm, a expressão da proteína foi

induzida com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, após indução as amostras foram mantidas à temperatura de 28 °C.

Foram realizadas as coletas antes da adição do indutor, caracterizada como tempo 0 h e após indução da expressão da proteína foram coletadas amostras com 1, 2, 3, 4 e 5 horas de expressão.

As células foram coletadas por centrifugação a 2600g por 5 minutos, ressuspensas em 50 µL de tampão de lise (62,5 mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol e 5% β mercaptoetanol) e aquecidas a 100 °C por 10 minutos. Os resultados foram observados por ensaio de *Western blot*.

4.18 Obtenção da proteína recombinante

Após verificar os parâmetros testados nos experimentos de seleção clonal, dois clones (2 e 4) foram utilizados para expressar a proteína de interesse, desta forma foram realizados ensaios para obter a proteína de capsídeo em quantidade suficiente para purificação com resina quelante de níquel.

Para isso, os clones armazenados a -80 °C (banco de trabalho) foram inoculados em 30 mL de meio LB líquido (pré inóculo), suplementado com 50 µg/mL de canamicina e incubados a 37 °C, sob agitação de 240 rpm, por um período de 16 horas. Em seguida, o pré inóculo foi adicionado a 500 mL de meio LB líquido (inóculo), suplementado com 50 µg/mL de canamicina. A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 240 rpm até atingir DO de 0,6 em comprimento de onda a 550 nm e foi induzida a expressão da proteína recombinante com adição de 1 mM de IPTG. Após indução, a cultura contendo o clone 2 foi submetida à expressão da proteína de interesse a 28 °C por 6 horas e a cultura contendo o clone 4 foi submetida a expressão da proteína a 37 °C por 3 horas.

Após o período de expressão as culturas foram armazenadas de duas formas: o volume de 500 mL, de cada cultura, foi centrifugado por 5 minutos a 2600g e o pellet foi armazenado a -20 °C ou cada cultura foi dividida em dois tubos (250 mL em cada), centrifugada por 5 minutos a 2600g e o pellet foi armazenado a -20 °C. O armazenamento dos pellets permaneceu por um período de no máximo sete dias.

4.19 Tampões para ensaio de purificação

Para os ensaios de padronização da purificação por cromatografia de afinidade foram testados tampões a base de NaH_2PO_4 pH 6.8 e PBS pH 7.4, com ou sem adição de ureia 8 M, como agente redutor de proteínas. A purificação se deu em três etapas e de acordo com os resultados, foram selecionados os seguintes tampões:

- Tampão de lise pH 7.4
PBS 1x; NaCl 500 mM; Imidazol 10 mM; 1 mM PMSF (*Fluoreto de fenil metano sulfonil*)
- Tampão de ligação pH 7.4
PBS 1x; NaCl 500 mM; Imidazol 10 mM
- Tampão de lavagem pH 7.4
PBS 1x; NaCl 500 mM; Imidazol 50 mM ou
PBS 1x; NaCl 500 mM; Imidazol 70 mM
- Tampão de eluição pH 7.4
PBS 1x; NaCl 500 mM; Imidazol de 800 e/ou
PBS 1x; NaCl 500 mM; Imidazol de 1200 mM
- Tampão de limpeza da resina pH 7.4
PBS 1x; NaCl 500 mM; Imidazol 1500 mM

Para troca de tampão após purificação foram testados tampões a base de HEPES, dentre as formulações testadas foi escolhido o seguinte tampão:

- Tampão HEPES pH 7.4
HEPES 25 mM; NaCl 133,6 mM; MgCl 1,7 mM

4.20 Lise bacteriana

As células foram rompidas por dois mecanismos diferentes: química, a base de tampão e mecânica com auxílio de beads ou sonicador. Neste trabalho a forma mais adequada para lise bacteriana foi mecânica, por sonicação intermitente – amplitude de 60% com pulso de 4 segundos e intervalo de 4 segundos entre cada pulso com aparelho Branson Sonifier 250A.

4.21 Coluna para ensaio de purificação

Foram utilizados dois tipos de colunas nos ensaios de purificação:

- Coluna (batch) com adição de resina Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel)
- HisTrap™ FF – 1 mL (GE Healthcare)

Nos ensaios com coluna (batch) e resina Protino® Ni-NTA Agarose a separação dos componentes foi realizada apenas pela força da gravidade. Para coluna HisTrap™ FF foram utilizados equipamentos de cromatografia líquida ou bomba peristáltica com vazão de 0,5 mL por minuto.

4.22 Purificação da proteína recombinante

Para desempenhar a etapa de purificação por cromatografia de afinidade com íon metálico imobilizado (IMAC) de maneira rápida e confiável, foi realizado um trabalho inicial de padronização da concentração ideal de imidazol necessária para eluição da proteína que interage com o níquel presente na coluna através da cauda de histidina, localizada no N-terminal. Tal procedimento foi desenvolvido em equipamento AKTA (GE Healthcare) - *fast protein liquid chromatography* (FPLC), utilizando coluna HisTrap™ FF. As concentrações de imidazol variaram de 10 mM a 1 M.

Os pellets bacterianos dos clones 2 e 4, previamente armazenado a -20 °C, provindos de um volume de cultura celular de 500 mL, foram ressuspensos em 30 mL de tampão de ligação e lisados por sonicação, em banho de gelo. Os lisados foram centrifugados a 7600g, por 5 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram filtrados utilizando filtro 0,45 µm. As amostras foram aplicadas na coluna após ser equilibrada com tampão de ligação. Foram coletadas 20 frações de eluição com 1 mL de volume para cada amostra de partida e analisadas por SDS-PAGE e *Western blotting*.

Após esta padronização, novas amostras provindas dos clones 2 e 4 foram cultivadas em 500 mL de meio LB líquido com adição de canamicina. As amostras foram centrifugadas, ressuspensas com 30 mL de tampão de lise cada, passadas pelo mesmo processo de lise por sonicação e depois filtradas. Então o sobrenadante foi submetido à purificação da proteína recombinante utilizando coluna (batch), com adição de 2 mL de resina previamente equilibrada com tampão de ligação. A seguir foi realizada uma primeira retirada dos contaminantes com 10 mL de tampão de ligação (5 volumes de coluna - VC), seguida de outra lavagem com 10 mL (5 VC) de tampão de lavagem com 50 mM de imidazol e posteriormente

aplicou-se 6 mL (3 VC) de tampão de eluição com 1200 mM de imidazol. Por fim, foi realizada a limpeza da resina com 10 mL (5 VC) de tampão de limpeza, seguido de 10 mL (10 VC) de água ultrapura. Para armazenamento, a resina foi mantida a 4 °C, em 2 mL de etanol 20%. A separação dos componentes foi realizada pela força da gravidade. As frações coletadas foram submetidas à análise por gel de SDS-PAGE 12% sob condições redutoras.

Uma terceira etapa de padronização foi necessária neste trabalho, novas amostras providas apenas do clone 2 foram cultivadas em 500 mL de meio LB líquido com adição de canamicina, divididas em dois tubos com 250 mL de cultura cada. A amostra foi centrifugada, ressuspendida com 30 mL de tampão de lise, passada pelo mesmo processo de lise por sonicação e depois filtrada. Então o sobrenadante foi submetido à purificação da proteína recombinante utilizando coluna HisTrapTM FF – 1 mL, previamente equilibrada com tampão de ligação. A seguir foi realizada uma primeira retirada dos contaminantes com 10 mL de tampão de ligação (10 VC), seguida de outra lavagem com 2 mL (2 VC) de tampão de lavagem com 70 mM de imidazol e posteriormente aplicou-se 2 mL (2 VC) de cada tampão de eluição, com duas concentrações diferentes de imidazol – 800 mM e 1200 mM, respectivamente. Foi efetuada a medição do pH das duas frações de eluição para garantir a estabilidade da proteína após o processo de purificação. Esta etapa da purificação foi realizada com auxílio de bomba peristáltica a uma vazão de 0,5 mL por minuto.

Todas as frações coletadas providas de purificações foram submetidas à análise por gel de SDS-PAGE 12% sob condições redutoras.

4.22.1 Purificação da proteína recombinante – troca de tampão

Para realizar a troca de tampão foram aplicadas as técnicas de ultrafiltração, utilizando coluna AMICON ULTRA 10 KDa (Merck Millipore), diálise com Cassette Slide-A-Lyzer Dialysis 20 KDa (Thermo) e por cromatografia de exclusão por peso molecular, usando coluna HiTrapTM Desalting 5 mL (GE Healthcare), que apresentou melhores resultados.

Quando necessário, as amostras de eluição foram concentradas em coluna Vivaspin 2 (Sartorius) a um volume final de 2 mL e posteriormente submetidas à troca de tampão. Para troca de tampão foi utilizando coluna HiTrapTM Desalting 5 mL (GE Healthcare) de acordo com protocolo do fabricante. A proteína de capsídeo ficou armazenada em tampão HEPES a 4 °C. A quantificação da proteína foi determinada por espectrofotometria, utilizando kit

comercial PierceTM BCA Protein Assay, conforme instruções do fabricante. A amostra foi submetida à análise em gel de SDS-PAGE 12% sob condições redutoras.

4.23 Obtenção do RNA de interesse

Com intuito de obter o RNA de interesse, plasmídeos pSFVGFP e pSFVGPV (gentilmente cedido pelo doutor Renaud Wagner da Universidade de Strasbourg, França), vetores que contêm o gene das proteínas não estruturais do vírus SFV, juntamente com o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) ou a glicoproteína do vírus da raiva (GPV) respectivamente, sob o controle do promotor subgenômico SFV 26s (Figura 5), também o plasmídeo pMAYV(E2), vetor que contém o gene que codifica a proteína E2 do vírus Mayaro (Figura 6), foram digeridos com enzima de restrição *Nru* I (para vetores pSFV) e *Sca* I, para vetor pMAYV(E2). Para isso, foram utilizados 8 µg de DNA; 10U de enzima de restrição; tampão e água ultrapura em quantidade suficiente para 20 µL de reação. Após linearização, o DNA foi quantificado, precipitado com 1/20 volume de EDTA 500 mM; 1/10 volume de Acetato de Sódio 3M; 2 vezes o volume de etanol absoluto, incubado por 15 minutos a -20 °C, centrifugado por 15 minutos à 14000 rpm e ressuspensionado com água ultrapura para que ficasse a uma concentração de 1 µg/µL.

Estes DNAs linearizados foram usados como molde para geração do RNA, através de um processo de transcrição *in vitro*, utilizando kit *MegaScript SP6* (Thermo), conforme instruções do fabricante modificando a temperatura de incubação para 40 °C e com a adição de inibidor de RNase *Ribolock* (Thermo). Ao término da transcrição do RNA, foi adicionada 4U de enzima para degradação do DNA molde (Turbo DNase - Thermo), incubada por 15 minutos a 37 °C.

Figura 5. Mapa do vetor SFV com inserção do gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP) ou a glicoproteína do vírus da raiva (GPV)

Apresenta uma origem de replicação bacteriana (ori), gene que confere resistência a ampicilina (AmpR), promotor subgenômico 26s, sítio de reconhecimento para início transcrição *in vitro* (Sp6), gene que codifica as proteínas não estruturais do vírus SFV (Nsp1, Nsp2, Nsp3 e Nsp4), gene que codifica a glicoproteína do vírus da raiva ou proteína verde fluorescente (GPV ou GFP).

Figura 6. Mapa do vetor MAYV com inserção do gene que codifica a E2 do vírus Mayaro

Vetor pGEM®-T Easy. Apresenta uma origem de replicação bacteriana (ori), gene que confere resistência a ampicilina (AmpR), sítios de reconhecimento para início transcrição *in vitro* (Sp6 e T7), centro múltiplo de clonagem, gene que codifica a proteína E2 do vírus Mayaro.

4.24 Associação da Proteína C com RNA de interesse

Neste ensaio foram utilizados os RNAs transcritos MAYV(E2), SFVGFP, SFVGPV e a proteína de capsídeo recombinante, após purificação. Após transcrição, quantificação e ajuste para uma concentração de 200 ng/μL, o RNA de interesse foi colocado em contato, *in vitro*, com a proteína de capsídeo. Para isso, foi estabelecida a proporção de 400 moléculas de proteína para cada molécula de RNA. A determinação da concentração molecular (número de

moléculas por volume de amostra) da proteína ou do RNA foi realizada com base na equação 1:

$$a = \frac{b}{c} \quad \text{Equação 1}$$

Onde a é a concentração molecular (mol/L), b é a concentração da proteína ou do RNA (g/L) e c é o peso molecular (g/mol).

Esta proporção molecular em valores de concentração ficou o mesmo que:

- 12,8 µg de proteína de capsídeo para 1 µg de RNA MAYV(E2);
- 4,13 µg de proteína de capsídeo para 1 µg de RNA SFVGFP;
- 18,12 µg de proteína de capsídeo para 1 µg de RNA SFVGPV.

Cada formulação contendo proteína e RNA foi incubada a 30 °C por 30 minutos e em seguida a formação de complexo Proteína-RNA foi analisada por gel de agarose 0,8% ou microscopia eletrônica de transmissão.

A formação do complexo também foi avaliada em gel de agarose após a proteína de capsídeo ser submetida ao aquecimento de 70 e 100 °C por um período de 10 minutos, com intuito de desfazer as possíveis interações com RNAs inespecíficos.

4.25 Análise da associação da proteína de capsídeo com RNA de interesse por eletroforese em gel de agarose

Para análise da associação entre a proteína de capsídeo e o RNA de interesse por eletroforese em gel de agarose 0,8%, diluído em tampão TAE, as amostras foram aplicadas juntamente com reagente GelRedTM (Uniscience) para visualização em trans-iluminador UV.

4.26 Análise da associação da proteína de capsídeo com RNA de interesse por Microscopia Eletrônica

Para análise da associação entre a proteína de capsídeo e o RNA de interesse por microscopia eletrônica as amostras foram preparadas utilizando técnica de contrastação negativa com acetato uranila, que possui afinidade por ácido nucleico.

O complexo Proteína-RNA (5 µL) foi aplicado sobre a tela de cobre, em seguida 1 µL de uranila foi adicionado e incubado por 1 minuto. As amostras foram analisadas em

microscópio eletrônico de transmissão modelo: LEO 906E, Zeiss, Alemanha, que fica localizado no laboratório de Biologia Celular – Instituto Butantan.

4.27 Entrega do complexo Proteína-RNA às células BHK-21 e macrófagos J774A1

Antes de entregar o complexo Proteína-RNA às células BHK-21 e macrófagos J774A1, foi realizado um ensaio de citotoxicidade da proteína junto às células. Para isso, as células foram cultivadas em microplaca de 96 poços e foi feita uma diluição seriada da proteína de capsídeo, partindo de 25 µg/mL. Como controle foi utilizado o tampão onde a proteína está suspensa (HEPES), em diferentes concentrações. As amostras ficaram incubadas durante 24h, em incubadora 37 °C, com 5% de CO₂. Após este período, as placas foram coradas com Naftol Blue Black (Sigma) por 30 minutos, lavadas com água e foi realizada leitura a 450 nm em leitor de microplacas.

A entrega do complexo Proteína-RNA foi realizada a células BHK-21 aderentes e macrófagos J774A1, cultivadas em placa com inóculo celular de 5×10^4 células por cm². Os complexos (8,26 µg de proteína de capsídeo para 2 µg de RNA SFVGFP) foram suspensos em meio de cultura livre de SFB e incubados junto às células por 3 horas, em incubadora 37 °C, com 5% de CO₂. Como controle positivo o RNA SFVGFP foi entregue utilizando kit de transfecção TransMessenger (Qiagen), de acordo com protocolo descrito no Anexo C.

5. RESULTADOS

5.1 Clonagem do gene da proteína de capsídeo do SFV no vetor pET28a(+)

Para realizar a clonagem, tanto o fragmento de DNA (gBlock), contendo a sequência da proteína de capsídeo, quanto o vetor pET28a(+) foram digeridos com as enzimas de restrição *Nco* I e *Eco* RI, e posteriormente ligados, dando origem ao vetor pET-C. Esta construção foi utilizada para transformar bactérias *E. Coli* DH5α quimicamente competentes. Desta transformação foram obtidas 15 colônias após a seleção com canamicina, que possivelmente continham a construção desejada. As colônias foram cultivadas e os plasmídeos purificados a partir delas foram linearizados utilizando enzima de restrição *Eco* RI. Todos os plasmídeos linearizados apresentaram o tamanho esperado de 6131 pb. Foi selecionada aleatoriamente uma colônia para ampliar a quantidade de vetor e confirmar a clonagem por padrão de digestão com enzimas de restrição (Figura 7).

Figura 7. Digestão por enzimas de restrição dos vetores pET-C – Colônia 5 e pET28a(+) – Novagem

Gel Agarose 1% - M: Marcador 1 Kb; 1: pET-C (Colônia 5) *Nco* I + *Eco* RI; 2: pET-C (Colônia 5) *Xba* I + *Nde* I; 3: pET-C (Colônia 5) circular; 4: pET28a(+) *Nco* I + *Eco* RI; 5: pET28a(+) *Xba* I + *Nde* I; 6: pET28a(+) circular. A digestão do vetor pET-C (Colônia 5) com enzimas *Nco* I + *Eco* RI deve apresentar os fragmentos de 5265 bp, e 866 bp e a digestão com as enzimas *Xba* I + *Nde* I deve apresentar os fragmentos 5501 bp, 537 bp e 93 bp. Para digestão do vetor pET28a(+) com enzimas *Nco* I + *Eco* RI deve apresentar os fragmentos de 5265 bp e 104 bp e a digestão com as enzimas *Xba* I + *Nde* I deve apresentar os fragmentos 5270 bp e 99 bp. Fragmentos menores que 250 pb não foram visíveis neste gel.

Uma vez verificado o padrão de restrição esperado, o plasmídeo foi utilizado para transformar bactérias quimicamente competentes *E. coli* BL21 (DE3). Devido à clonagem ter

sido realizada de forma direta, sem amplificação por PCR, foi decidido dar andamento ao trabalho antes da confirmação da clonagem por sequenciamento.

Dois clones obtidos da transformação foram submetidos ao ensaio de expressão da proteína de interesse à temperatura de 28 °C, determinada através de informações obtidas na literatura como temperatura ideal para expressar a proteína C de vírus *Sinbdis*, um *Alphavirus* muito próximo geneticamente ao SFV (TELLINGHUISEN et al, 1999). As amostras foram coletadas 4, 6 e 8 horas após indução da expressão com 1 mM IPTG (Figura 8).

Figura 8. Expressão da proteína de capsídeo em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) a 28 °C

SDS-PAGE 12% - M: Marcador *ProteinRuler*® II; 1: Controle negativo *E. coli* DE3 não transformada – 4h; 2: Clone 1 – 4h; 3: Clone 2 – 4h; 4: Controle negativo – 6h; 5: Clone 1 – 6h; 6: Clone 2 – 6h; 7: Controle negativo – 8h; 8: Clone 1 – 8h; 9: Clone 2 – 8h. Seta: indicação da proteína recombinante.

Neste resultado foi possível observar a expressão da proteína de capsídeo com tamanho abaixo de 20 kDa, o que não condiz com o tamanho esperado que deveria ser de aproximadamente 35 kDa, devido a inserção da cauda de histidina no N-terminal, o que altera o tamanho da proteína C de 33 kDa para 35 kDa.

Ao analisar o resultado do sequenciamento, foi observado que o plasmídeo presente na colônia inicialmente escolhida possuía uma mutação na região onde existem 12 bases de adenina (ver região sublinhada em vermelho na Figura 1 – Materiais e Métodos), com a inserção de uma base de adenina, totalizando 13 bases de adenina e gerando um *stop códon* logo em seguida.

Após verificar junto à empresa IDT Technologies, foi obtida a informação de que há 20 % de chance de ocorrer mutações em fragmentos dupla fita do tipo gBlock, onde contêm sequências de bases repetidas. Desta forma, esta colônia foi desprezada.

5.2 Sequenciamento e amplificação do plasmídeo

Após análise do resultado do sequenciamento de 15 colônias inicialmente positivas, foram encontradas seis colônias contendo a sequência correta, mostrando que para a construção em estudo a taxa de sequências corretas na síntese de gBlock provavelmente foi menor que 80 % (em relação às construções obtidas: 6 em 15 estavam corretas, ou 40 %). Foi selecionada uma colônia com a sequência correta para ampliar a quantidade de vetor, que foi quantificado e submetido à confirmação através do padrão de digestão com enzimas de restrição (Figura 9).

Figura 9. Digestão por enzimas de restrição dos vetores pET-C – Colônia 12 e pET28a(+) – Novagem

Gel Agarose 1% - M1: Marcador λ HindIII; 1: pET-C (Colônia 12) *Nde* I + *Eco* RI; 2: pET-C (Colônia 12) *Nde* I + *Cla* I; 3: pET-C (Colônia 12) circular; 4: pET28a(+) *Nde* I + *Eco* RI; 5: pET28a(+) *Nde* I + *Cla* I; 6: pET28a(+) circular; M2: Marcador 1 Kb. A digestão do vetor pET-C (Colônia 12) com enzimas *Nde* I e *Eco* RI deve apresentar os fragmentos de 5319 bp, 537 bp e 275 bp e a digestão com as enzimas *Nde* I e *Cla* I deve apresentar os fragmentos 3873 bp, 1721 bp e 537 bp. Para digestão do vetor pET28a(+) com enzimas *Nde* I e *Eco* RI deve apresentar os fragmentos de 5325 bp e 44 bp e a digestão com as enzimas *Nde* I e *Cla* RI deve apresentar os fragmentos 3879 bp e 1490 bp.

5.3 Seleção clonal e expressão da proteína recombinante

Para realizar a seleção do clone que posteriormente foi utilizado na expressão da proteína de capsídeo recombinante, diferentes temperaturas foram avaliadas. Dados da literatura científica mostram que a temperatura ótima para a expressão de proteínas de capsídeo de *Alphavirus* pode variar (TELLEGUISSEN et al., 1999). Por esse motivo, além da

expressão a 28 °C, foram testadas outras duas temperaturas, visando garantir um melhor padrão de expressão da proteína de interesse.

5.3.1 Expressão da proteína de capsídeo em bactérias *E. coli* BL21 (DE3)

Bactérias *E. coli* BL21 (DE3) quimicamente competentes foram transformadas com o plasmídeo pET-C. Os quatro clones que cresceram foram submetidos ao teste de expressão em três temperaturas diferentes: 28, 30 e 37 °C. O clone 1 foi avaliado apenas a 30 °C e descartado por não apresentar expressão (Clone 1, Figura 10). As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12%, transferidas para membrana e analisadas por imunoenensaio utilizando anticorpos anti-6xhis tag (Figuras 10, 11 e 12).

Figura 10. Seleção clonal e expressão da proteína de capsídeo em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) a 30 °C

(A) SDS-PAGE 12% e (B) *Western Blot* - M: Marcador *ProteinRuler*® II; 1: Clone 1 – T0; 2: Clone 1 – 3h; 3: Clone 2 – T0; 4: Clone 2 – 3h; 5: Clone 3 – T0; 6: Clone 3 – 3h; 7: Clone 4 – T0; 8: Clone 4 – 3h; 9: Controle negativo – 3h. Seta: indicação da proteína recombinante.

Figura 11. Seleção clonal e expressão da proteína de capsídeo em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) a 28 °C

(A) SDS-PAGE 12% e (B) *Western Blot* - M: Marcador *ProteinRuler*® II; 1: Clone 2 – T0; 2: Clone 2 – 6h; 3: Clone 3 – T0; 4: Clone 3 – 6h; 5: Clone 4 – T0; 6: Clone 4 – 6h; 7: Controle negativo – T0; 8: Controle negativo – 6h. Seta: indicação da proteína recombinante.

Figura 12. Seleção clonal e expressão da proteína de capsídeo em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) a 37 °C

(A) SDS-PAGE 12% e (B) *Western Blot* - M: Marcador *ProteinRuler*® II; 1: Clone 2 – T0; 2: Clone 2 – 3h; 3: Clone 3 – T0; 4: Clone 3 – 3h; 5: Clone 4 – T0; 6: Clone 4 – 3h; 7: Controle negativo – T0; 8: Controle negativo – 3h. Seta: indicação da proteína recombinante.

Como pode ser observado, os clones 2, 3 e 4 apresentaram expressão da proteína recombinante, porém em análise qualitativa através da intensidade da banda marcada no imunoensaio, os clones 2 e 4 apresentaram melhor expressão e desta forma foram selecionados para produção da proteína em maior quantidade. Após os testes de temperatura foram selecionados o clone 2 para expressar a proteína a 28 °C e o clone 4 para a expressão a 37 °C.

Em todas as amostras em que houve a detecção da proteína de capsídeo em seu tamanho esperado (35 kDa), também foram detectados produtos de baixo peso molecular, que provavelmente correspondem a formas truncadas ou degradadas da proteína recombinante

(menores que 20 kDa) e que, portanto, possuem a cauda de histidina em sua porção N-terminal. Em seguida, foi realizada a purificação da proteína C.

5.4 Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel imobilizado Ni-NTA – batch

Para o procedimento de purificação da proteína de capsídeo foi realizada uma etapa preliminar em FPLC na Escola Politécnica – USP, com intuito de determinar a concentração de imidazol necessária para a eluição da proteína recombinante. Além da concentração de imidazol, foi testada a composição do tampão de lise, com ou sem agente redutor o que, no entanto, não resultou em um perfil de purificação distinto. Portanto o uso deste agente foi descartado para os ensaios futuros.

Os dados obtidos na purificação preliminar foram explorados na purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel imobilizado. Para isso, 500 mL de cultura dos clones 2 e 4 foram induzidos para a expressão da proteína de capsídeo a 28 °C ou 37 °C, respectivamente. O pellet bacteriano foi ressuspendido com 30 mL de tampão de lise e as células foram rompidas por sonicação. A amostra foi submetida ao processo de clarificação por centrifugação e filtração. O sobrenadante foi aplicado à coluna e a eluição da proteína foi realizada com tampão de eluição contendo 1200 mM de imidazol. O procedimento de purificação foi analisado em SDS-PAGE e o gel corado com *Page Blue* (Figura 13).

Figura 13. Purificação da proteína de capsídeo por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA

SDS-PAGE 12% (A) Clone 2 (28 °C) e (B) Clone 4 (37 °C) – M: Marcador *PageRuler™ Prestained*; Fração 1: pellet celular lisado por sonicação diluído 2x; Fração 2: sobrenadante do pellet lisado após centrifugação diluído 2x; Fração 3: sobrenadante clarificado após filtração diluído 2x; Fração 4: *flowthrough* diluído 2x; Fração 5: lavagem com tampão de ligação; Fração 6: lavagem com 50 mM de imidazol; Fração 7: eluição com 1200 mM de imidazol; Fração 8: limpeza da resina com 1500 mM de imidazol.

As frações 6 e 7 de cada clone apresentaram uma boa quantidade da proteína C com considerável remoção de contaminantes. Em seguida, essas frações foram concentradas para um volume final de 2 mL e submetidas à troca de tampão utilizando coluna HiTrap™ Desalting. Foram realizadas seis coletas de eluição que foram analisadas em gel SDS-PAGE (Figura 14). Nesse caso, a maior parte da proteína foi eluída na fração 2 em tampão HEPES.

Figura 14. Purificação da proteína de capsídeo – Troca de tampão com coluna HiTrap™ Desalting

SDS-PAGE 12% (A) Clone 2 (28 °C) e (B) Clone 4 (37 °C) – M: Marcador *PageRuler™ Prestained*; Numeração equivalente às frações recolhidas.

A concentração proteica das frações de número 2 de ambos os clones foi determinada por espectrofotometria, sendo de 239 $\mu\text{g/mL}$ para a amostra do Clone 2 e de 82 $\mu\text{g/mL}$ para a amostra do Clone 4. As amostras foram armazenadas a 4 °C para ensaios posteriores.

5.5 Obtenção do RNA de interesse

Os plasmídeos utilizados para obtenção do RNA de interesse - pSFVGFP e pMAYV(E2), foram linearizados e submetidos ao processo de transcrição *in vitro*, utilizando kit *MegaScript SP6* (Thermo) (Figura 15). A presença de bandas bem definidas em gel de agarose demonstra a qualidade do RNA gerado, sem a ocorrência de degradação do material. O RNA obtido foi quantificado por fluorimetria e ajustado para uma concentração de 200 ng/ μL .

Figura 15. Obtenção de RNA através de transcrição *in vitro* dos vetores pSFVGFP e pMAYV(E2)

Gel Agarose 0,8% - M: Marcador λ HindIII; 1: pMAYV(E2) circular; 2: RNA MAYV(E2) transcrito; 3: pSFVGFP circular; 4: RNA SFVGFP transcrito.

5.6 Associação da proteína de capsídeo com RNA de interesse

Para obter o complexo Proteína-RNA, foi realizado um ensaio com base em referência bibliográfica (TELLINGHUISEN et al, 1999), contendo 400 moléculas de proteína para cada molécula de RNA.

Neste ensaio, a proteína de capsídeo (expressa a 28 °C ou a 37 °C) foi incubada por 30 minutos à temperatura de 30 °C com RNA de SFVGFP (11716 nucleotídeos) ou de MAYV(E2) (4632 nucleotídeos). Para observar a formação de complexos Proteína-RNA, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (Figura 16).

Figura 16. Análise do complexo Proteína-RNA por eletroforese em gel de agarose

Gel Agarose 0,8% - M: Marcador λ HindIII; 1: Proteína C (28 °C) purificada; 2: RNA SFVGFP ; 3: Proteína C (28 °C) purificada + RNA SFVGFP; 4: RNA MAYV(E2) ; 5: Proteína C (28 °C) purificada + RNA MAYV(E2); 6: Proteína C (37 °C) purificada; 7: RNA SFVGFP; 8: Proteína C (37 °C) purificada+ RNA SFVGFP; 9: RNA MAYV(E2); 10: Proteína C (37 °C) purificada + RNA MAYV(E2).

Neste resultado é possível visualizar que quando os RNAs foram incubados com as proteínas expressas a 28 °C ou a 37 °C, houve associação entre as moléculas, resultando em retenção do ácido nucleico juntamente com a proteína no poço utilizado para o carregamento do gel. A associação entre a proteína de capsídeo e o RNA MAYV(E2) mostrou que a proteína pode se associar com RNAs que não sejam do vírus SFV. Isso de certa forma justifica a contaminação da proteína expressa pelo clone 2 (poço 1 – Figura 16), que possivelmente está se associando de forma inespecífica ao ácido nucleico da própria bactéria. Confirmando assim, o que foi descrito por Wengler e colaboradores (1984), que a proteína de capsídeo do vírus SFV possui a capacidade de se associar com outros RNAs. No entanto, quando exposta à presença desses RNAs juntamente com RNA do próprio SFV, essa interação inespecífica diminui e a afinidade para o RNA do SFV é maior quando comparado com outros RNAs (TELLINGHUISEN et al, 1999).

Tendo concluído a possibilidade da formação do complexo desejado entre proteína de capsídeo e RNA auto replicativo, houve a necessidade de explorar a diminuição de subproduto expresso para obter a proteína com maior grau de pureza possível e testar a possibilidade de entrega deste complexo Proteína-RNA à célula alvo. Para isso, outras cepas bacterianas e outros métodos de purificação foram testados.

5.7 Nova seleção clonal e expressão da proteína recombinante

Para realizar uma nova seleção clonal foram testadas outras duas cepas de bactérias para a expressão, bem como a variação na concentração do indutor. Foi estabelecida também a temperatura de 28 °C para a expressão da proteína de capsídeo devido aos resultados anteriores, onde o rendimento da proteína de interesse expressa nestas condições foi maior.

5.7.1 Expressão da proteína de capsídeo em cepas de bactéria *E. coli* BL21(DE3)

Para avaliar se a presença desses subprodutos de baixo peso molecular estava relacionada com os clones obtidos em uma transformação específica, foi realizada uma nova transformação e seleção clonal em bactérias BL21 (DE3), utilizando o vetor pET-C. Após a indução da expressão, os pellets bacterianos foram lisados e analisados por *Western blotting* (Figura 17).

Figura 17. Nova seleção clonal e expressão da proteína de capsídeo em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) a 28 °C

Western Blot - M: Marcador *PageRuler*; 1: Clone 5 - T0; 2: Clone 5 - 6h; 3: Clone 6 - T0; 4: Clone 6 - 6h; 5: Clone 7 - T0; 6: Clone 7 - 6h; 7: Clone 8 - T0; 8: Clone 8 - 6h; 9: Clone 9 - T0; 10: Clone 9 - 6h; 11: Clone 10 - T0; 12: Clone 10 - 6h; 13: Clone 11 - T0; 14: Clone 11 - 6h; 15: Clone 12 - T0; 16: Clone 12 - 6h.

Para alguns clones foi observado que na fase de expressão basal da proteína de capsídeo (tempo 0 h, não induzida) não há presença do subproduto de 20 kDa. Por outro lado, em todos os casos a indução por 6 h resultou no aparecimento do subproduto, de maneira que, quanto maior a quantidade da proteína de interesse, maior também é a presença do subproduto. Vale notar que no caso do clone 9 (linhas 9 e 10 do gel Figura 17), parece não haver subproduto, porém a quantidade de proteína expressa é muito baixa. Para buscar uma alternativa em que bons níveis de proteína de interesse fossem obtidos, na ausência de subproduto, duas outras cepas de bactérias foram transformadas.

5.7.2 Expressão da proteína de capsídeo em cepas de bactéria *E. coli* Rosetta

Bactérias *E. coli* Rosetta (DE3) e *E. coli* Rosetta pLyss, quimicamente competentes, foram transformadas com o plasmídeo pET-C. Para uma avaliação rápida, os clones obtidos foram submetidos ao teste de expressão à temperatura de 28 °C por apenas três horas. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12%, transferidas para membrana e analisadas por imunoenensaio utilizando anticorpos anti-6xhis tag (Figuras 18 e 19).

Figura 18. Expressão da proteína de capsídeo em bactéria *E. coli* Rosetta (DE3) a 28 °C

Western Blot - M: Marcador *PageRuler*; 1: Controle negativo - T0; 2: Controle negativo - 3h; 3: Clone 13 - T0; 4: Clone 13 - 3h; 5: Clone 14 - T0; 6: Clone 14 - 3h; 7: Clone 15 - T0; 8: Clone 15 - 3h.

Figura 19. Expressão da proteína de capsídeo em bactéria *E. coli* Rosetta pLyss a 28 °C

Western Blot - M: Marcador *PageRuler*; 1: Controle negativo - T0; 2: Controle negativo - 3h; 3: Clone 16 - T0; 4: Clone 16 - 3h; 5: Clone 17 - T0; 6: Clone 17 - 3h; 7: Clone 18 - T0; 8: Clone 18 - 3h; 9: Clone 19 - T0; 10: Clone 19 - 3h; 11: Clone 20 - T0; 12: Clone 20 - 3h; 13: Clone 21 - T0; 14: Clone 21 - 3h; 15: Clone 22 - T0; 16: Clone 22 - 3h; 17: Clone 23 - T0; 18: Clone 23 - 3h; 19: Clone 24 - T0; 20: Clone 24 - 3h.

Conforme resultados apresentados nas figuras 16 e 17, o subproduto continuou presente em grandes quantidades nas duas cepas de bactérias testadas (total de 12 colônias), não se diferenciando dos perfis apresentados nos resultados anteriores, demonstrando que a presença da forma truncada ou degradada da proteína expressa provavelmente não está relacionada com a cepa bacteriana. Desta forma, foi decidido dar continuidade ao trabalho com a cepa de bactéria BL21 (DE3), por se tratar de uma cepa mais simples e que exige menos manuseio, e utilizar o clone 2 (28 °C) já testado anteriormente, em uma avaliação da concentração do indutor, visando diminuir a intensidade de expressão desse subproduto.

5.7.3 Avaliação de concentração do indutor para expressão da proteína recombinante

Ainda no intuito de diminuir o subproduto expresso pela bactéria, um teste com a variação da concentração de IPTG foi realizado. Para isso, o clone 2 foi submetido à expressão da proteína a 28 °C com 0,01 mM e 0,5 mM de indutor e coletadas amostras antes da indução (Tempo 0) e a cada uma hora depois da indução (p. i.). Bactérias BL21 (DE3) sem o vetor pET-C foram utilizadas como controle negativo. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12%, transferidas para membrana e analisadas por imunoenensaio utilizando anticorpos anti-6xhis tag (Figura 20).

Figura 20. Expressão da proteína de capsídeo em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) a 28 °C com concentrações variadas de indutor

Western Blot – Marcador PageRuler. Amostras coletadas em Tempo 0; 1 hora pós indução; 2 horas pós indução; 3 horas pós indução; 4 horas pós indução e 5 horas pós indução. C- 0,01 e C- 0,5: Bactérias BL21 (DE3) sem vetor pET-C induzidas com 0,01 e 0,5 mM de IPTG, respectivamente; P 0,01: Clone 2 com indução de 0,01 mM de IPTG; P 0,05: Clone 2 com indução de 0,05 mM de IPTG.

É possível observar uma expressão basal da proteína de capsídeo e do subproduto no tempo 0 h, sem a presença de indutor, e que não existe uma diferença visível entre a quantidade dessa expressão basal e a expressão até 3 h após a indução, mesmo com a variação da concentração de IPTG. Nas coletas realizadas em quatro e cinco horas após a indução, é possível notar um aumento discreto na expressão da proteína em relação aos tempos anteriores. De acordo com este resultado, é possível concluir que diferentes concentrações de IPTG não modificaram a característica da expressão, sendo constante a presença do subproduto. Com isso, foi decidido dar continuidade aos procedimentos, produzindo a proteína sob indução de 1 mM de IPTG, pois esse valor já vinha sendo utilizado nos ensaios anteriores.

5.8 Purificação da proteína de capsídeo por cromatografia de afinidade em coluna HisTrapTM

Com o intuito de eliminar ou diminuir a presença da forma truncada da proteína C, foram realizados alguns testes de padronização, incluindo: a utilização de coluna com resina de níquel imobilizado Ni-NTA – batch ou coluna comercial HisTrapTM; variações no volume de amostra aplicada e volume da eluição; separação dos componentes apenas pela força da gravidade ou com auxílio de bomba peristáltica.

Todos os dados preliminares foram utilizados na obtenção do procedimento aplicado para a purificação a seguir, onde o clone selecionado (Clone 2) foi inoculado em 250 mL de meio de cultura e a expressão foi induzida com 1 mM de IPTG por 6 horas para a produção da proteína. Após a lise das bactérias e clarificação, o sobrenadante foi submetido ao processo de purificação por cromatografia de afinidade em coluna comercial HisTrap™, com auxílio de bomba peristáltica, a uma vazão de 0,5 mL/minuto.

A amostra foi aplicada à resina já equilibrada em tampão de ligação, sendo posteriormente lavada com tampão de ligação e com tampão contendo 70 mM de imidazol para a retirada de contaminantes. A eluição da proteína foi realizada em duas etapas com tampões de eluição contendo 800 e 1200 mM de imidazol, que mantiveram pH estável em 7,4. O procedimento de purificação foi analisado em SDS-PAGE (Figura 21).

Figura 21. Purificação da proteína de capsídeo por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap™

SDS-PAGE 12% - Clone 2 – M: Marcador *PageRuler™ Prestained*; 1: Pellet após lise e clarificação diluído 4x; 2: lisado diluído 4x; 3: clarificado diluído 4x; 4: filtrado diluído 4x; 5: *flowthrough* diluído 4x; 6: lavagem com tampão de ligação; 7: lavagem com 70 mM de imidazol; 8: eluição com 800 mM de imidazol; 9: eluição com 1200 mM de imidazol; 10: eluição com 800 mM de imidazol diluído 4x; eluição com 1200 mM de imidazol diluído 4x. Gel corado com *Page Blue*.

É possível observar que uma grande quantidade de proteína foi eluída com 800 mM de imidazol juntamente com o subproduto, além de outros contaminantes de maior e menor peso molecular. A fração de eluição com 1200 mM de imidazol apresentou a proteína de capsídeo com um bom grau de pureza. As duas frações da proteína de capsídeo foram utilizadas para realizar a próxima etapa de purificação, onde foi feita a troca de tampão.

5.8.1 Purificação da proteína de capsídeo – troca de tampão

Para realizar a troca de tampão das frações de proteína purificada por IMAC, foram aplicadas as técnicas de ultrafiltração, diálise e ou coluna de dessalinização que também possui uma propriedade de separação por peso molecular.

Na abordagem de ultrafiltração, após a análise em SDS-PAGE, foi verificado que a proteína foi perdida durante o processo, provavelmente por ter ficado retida na membrana. Quando utilizado o cassete de diálise, a proteína ficou muito concentrada a ponto de precipitar, ainda que o tampão utilizado na troca fosse o mesmo utilizado para a técnica de exclusão.

A abordagem mais promissora para a troca de tampão foi através da utilização da coluna HiTrapTM Desalting. Foi inserido o volume de 1,5 mL de amostra e foram separadas seis frações de 1,5 mL após a introdução de 7,5 mL de tampão HEPES. As frações foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 22).

Figura 22. Troca de tampão da proteína de capsídeo - HiTrapTM Desalting

SDS-PAGE 12% (A) Proteína de capsídeo eluição 800 mM e (B) Proteína de capsídeo eluição 1200 mM – M: Marcador PageRulerTM Prestained; Numeração correspondente às frações.

Quando aplicada a amostra previamente eluída com 800 mM de imidazol, todas as frações obtidas após a passagem na coluna de dessalinização continham a proteína C (Figura 22A). As frações 5 e 6 apresentaram menos contaminantes e uma quantidade de proteína similar às frações 3 e 4. Mesmo com a presença de subproduto, essas frações foram nomeadas como amostra “Proteína C”, que foi utilizada em análises futuras.

Por outro lado, quando a amostra de proteína de capsídeo previamente eluída com 1200 mM de imidazol foi aplicada à coluna, foram obtidas frações com maiores graus de

pureza, apresentando boa quantidade de proteína e poucos contaminantes na fração 3. Esta fração foi nomeada neste trabalho como “Proteína C pura”, sendo utilizada para a realização de experimentos de associação de RNA.

As três frações coletadas foram quantificadas por técnica de BCA, onde as concentrações foram de 250, 160 e 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As amostras foram armazenadas a 4 °C.

5.9 Obtenção do RNA de interesse

Os plasmídeos pSFVGPV e pSFVGFP, vetores que contêm o gene que codifica a glicoproteína do vírus da raiva (GPV) e a proteína verde fluorescente (GFP) respectivamente, foram linearizados com enzima de restrição e submetidos ao processo de transcrição *in vitro* para obtenção do RNA de interesse, que foi quantificado por fluorimetria. A concentração do RNA foi ajustada para 200 ng/ μL . O material sintetizado foi analisado em gel de agarose (Figura 23).

Figura 23. Obtenção de RNA através da transcrição *in vitro* dos vetores pSFVGPV e pSFVGFP

Gel Agarose 0,8% - M: Marcador λ HindIII; 1: pSFVGPV linear; 2: RNA GPV transcrito; 3: pSFVGFP circular; 4: RNA GFP transcrito.

5.10 Associação entre a proteína de capsídeo e o RNA de interesse

Na tentativa de aperfeiçoar essa abordagem de associação e possivelmente eliminar qualquer outro RNA contaminante que possa se complexar de forma inespecífica com a

proteína de capsídeo, foi realizado um ensaio onde a proteína C foi aquecida a 70 °C ou 100 °C e posteriormente incubada com RNA. Para este teste foi utilizado apenas o RNA SFVGFP, que foi incubado com a Proteína C a 30 °C por 30 minutos, utilizando o mesmo protocolo de 400 moléculas de proteína para cada molécula de RNA. O resultado do ensaio foi analisado por gel de agarose (Figura 24).

Figura 24. Análise do complexo Proteína-RNA por gel de agarose após aquecimento da proteína

Gel Agarose 0,8% - Marc: Marcador λ HindIII; 1: RNA SFVGFP; 2: Proteína C; 3: Proteína C aquecida 70 °C; 4: Proteína C aquecida 70 °C e posteriormente associada com RNA SFVGFP; 5: Proteína C aquecida 100 °C; 6: Proteína C aquecida 100 °C e posteriormente associada com RNA SFVGFP.

Na Figura 24 é possível observar que houve a eliminação da contaminação com RNAs inespecíficos pela exposição da proteína às temperaturas de 70 e 100 °C sem comprometer a formação do complexo entre a proteína C e o RNA auto replicativo do SFV.

Com intuito de verificar a formação do complexo entre proteína C e o RNA e também a integridade da proteína após o aquecimento, um novo ensaio de associação entre a proteína de capsídeo e o RNA auto replicativo foi realizado, utilizando proteína C e os RNAs SFVGFP e SFVGVPV, com as proporções moleculares previamente estabelecidas. As amostras foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 25).

Figura 25. Análise do complexo Proteína-RNA em contrastação negativa por microscopia eletrônica de transmissão

Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A): Proteína C pura controle negativo / aumento 60.000x; (B): Proteína C controle negativo aquecida 100 °C / aumento 129.300x; (C): Proteína C pura associada com RNA SFVGPV / aumento 129.300x; (D): Proteína C pura associada com RNA SFVGFP / aumento 46.460x. Seta indicando partículas semelhantes a nucleocápsides.

Nos resultados da microscopia eletrônica é possível observar no controle negativo (Figura 25A) que as moléculas de proteína C pura se associam entre si, mesmo sem a presença de RNA, formando cápsides vazias. Quando analisada a imagem da proteína C controle negativo após aquecimento a 100 °C (Figura 25B) é possível verificar que mesmo após ser exposta à alta temperatura, a proteína recombinante é capaz de se remodelar e voltar a sua forma ativa, associando entre si e formando cápsides vazias.

As imagens obtidas dos complexos Proteína-RNA SFVGPV e Proteína-RNA SFVGFP (C e D), realizados com a proteína C pura, mostram que ocorreu associação entre a proteína e o RNA devido à presença de um ponto mais denso, característico na detecção de ácido nucleico pela técnica utilizada, no centro das cápsides. Porém, nota-se que, além de partículas com RNA, também existe a formação de cápsides vazias (Figura 25D), o que remete à importância da concentração do RNA de interesse a ser utilizado para este tipo de ensaio. As partículas analisadas neste ensaio de microscopia variaram entre 20 a 38 nm de comprimento.

5.11 Entrega do complexo Proteína-RNA às células BHK-21 e a macrófagos J774A1

Antes de entregar o complexo Proteína-RNA às células BHK-21 e a macrófagos J774A1, foi realizado um ensaio de toxicidade da proteína junto à célula. Para isso, foi feita uma diluição seriada da proteína de capsídeo subproduto, partindo de 25 µg/mL. Como controle foi utilizado o tampão onde a proteína está suspensa (HEPES), em diferentes concentrações. Neste ensaio foi observado que a concentração máxima de proteína de capsídeo a ser utilizada, sem efeitos citotóxicos, seria de 12,5 µg/mL.

Após teste de toxicidade, foi realizada a entrega do complexo Proteína-RNA às células BHK-21 e macrófagos J774A1. Como controle positivo o RNA SFVGFP foi entregue utilizando kit de transfecção de acordo com protocolo do fabricante. A análise da entrega foi realizada por microscopia de fluorescência (Figura 26).

Figura 26. Análise da entrega do complexo Proteína-RNA por microscopia de fluorescência

Microscopia de Fluorescência. Colunas: macrófagos J774A1 visualizados em campo claro e fluorescência, células BHK-21 visualizadas em campo claro e fluorescência, respectivamente. Primeira linha: controle positivo - transfecção do RNA SFVGFP com auxílio de kit TransMessenger. Segunda linha: complexo proteína C + RNA SFVGFP. Terceira linha: entrega do RNA SFVGFP sozinho.

A transfecção do RNA SFVGFP com kit TransMessenger se mostrou eficiente para as duas linhagens celulares, porém com maior expressão da proteína GFP em células BHK-21 do que em macrófagos J774A1, o que nos remete a uma possível incompatibilidade do procedimento utilizado para a transfecção das J774A1. Em contrapartida, a entrega do complexo Proteína-RNA foi realizada em macrófagos J774A1 com a expressão da proteína GFP, o que não foi visível em células BHK-21, mostrando assim que, possivelmente, os macrófagos tenham capturado o complexo. Os resultados também mostram que a entrega do RNA sozinho em ambas as linhagens celulares não resultou na expressão da GFP, que pode ter sido degradado durante a manipulação ou não tenha a eficiência de entrada nas células, uma vez que não foi utilizada nenhuma técnica para forçar essa entrega.

Essa mesma abordagem foi utilizada para analisar a formação do complexo entre proteína C e RNA SFVGPV, porém com análise por imunofluorescência indireta. Nesse caso não foi possível confirmar a entrega do RNA à célula alvo, provavelmente pela expressão em pouca quantidade da proteína GPV, impossibilitando a sua detecção.

6. DISCUSSÃO

A vacinação tem se mostrado bastante eficiente para controle e até mesmo a erradicação de doenças infecciosas. A administração do agente imunizante vivo atenuado ou inativado é uma estratégia eficaz para a indução de uma boa resposta imunológica. Embora as preparações vacinais sejam produtos altamente testados e padronizados, não se pode descartar o risco decorrente de um tratamento ineficiente de inativação ou de reversão da atenuação em alguns casos. Pensando nisso, alternativas mais seguras, como as vacinas de subunidade já são utilizadas para imunização, como as vacinas contra Hepatite A ou B. Com o intuito de minimizar a exposição a moléculas exógenas, presentes nas formulações vacinais, mas que não possuem características imunogênicas, tecnologias para o desenvolvimento de novas vacinas baseadas em ácidos nucleicos vêm sendo estudadas.

A primeira entrega *in vivo* de DNA e mRNA aconteceu na década de 90. Estudos mostraram que quando essa entrega ocorre de forma eficiente, é possível provocar resposta imunológica tanto celular quanto humoral (FYNAN et al., 1993; ULMER et al., 1993; TANG et al., 1992; WOLFF et al., 1990).

Essa proposta foi aperfeiçoada e atualmente mais de 160 estudos de terapia com DNA já foram submetidos a ensaios clínicos (www.clinicaltrials.gov). No entanto, ainda existe uma grande discussão relacionada à segurança na entrega de DNA, devido à necessidade de entrada no núcleo celular e a probabilidade de integração em regiões indesejadas do genoma. Em contrapartida, estudos recentes tem apostado na entrega do mRNA auto replicativo de *Alphavirus* (BOGERS et al., 2014; HEKELE et al., 2013), pois a sua transcrição ocorre no citoplasma da célula, expressando níveis elevados do antígeno, garantindo assim a indução de uma resposta imune potente (HIKKE, M. C.; PIJLMAN, G. P., 2016), sem o risco de integração no genoma. Porém, a falta de estabilidade do mRNA resulta em uma grande perda de material por degradação. Pensando nisso, este trabalho trouxe a proposta de utilizar uma proteína, que naturalmente envolve o mRNA auto replicativo de *Alphavirus*, para proteger este material e fazer a entrega do mesmo à célula alvo.

Proteínas de capsídeo têm sido utilizadas em trabalhos recentes na forma de VLPs (*virus like particle*), com uma abordagem de vacinas de nanopartículas (HIKKE et al., 2016). Dentre as funções atribuídas à proteína C pode-se destacar sua atividade autoproteolítica, o que descarta a necessidade da inserção de um *stop códon* para sua expressão na forma recombinante, e sua capacidade de proteger o material genético quando o mesmo é envolvido

pela proteína formando a nucleocápside. Estas características de interações proteína-proteína e proteína-RNA foram utilizadas neste trabalho para formar a nucleocápside e envolver o RNA de interesse.

Desta forma, a primeira etapa deste trabalho consistiu na construção de um vetor de expressão em sistema procarioto contendo a sequência que codifica para a proteína de capsídeo do *Alphavirus Semliki Forest*. Para isso foi realizada a clonagem e a verificação da expressão da proteína de interesse. A primeira construção obtida foi eletroporada em bactérias, porém sua expressão resultou em um produto de tamanho menor que o esperado, fruto da geração de um *stop códon* nesta construção (Figura 8) e o encerramento precoce da tradução. Essa forma, correspondendo a cerca de metade do tamanho da proteína C, não poderia apresentar as características desejadas de formação da estrutura de proteção ao RNA auto replicativo, uma vez que a região de interação entre proteína-proteína fica localizada mais próxima à região C-terminal, aproximadamente entre os aminoácidos 114 ao 267, como foi descrito por Hong et al., 2006. Portanto a etapa de clonagem foi retomada para a obtenção de uma construção que apresentasse a sequência correta.

Após o resultado do sequenciamento e a confirmação da construção, foram selecionados dois clones para a expressão da proteína às temperaturas de 28 °C e 37 °C. Essas temperaturas já haviam sido estabelecidas como ideais para a expressão de proteínas de capsídeo de *Alphavirus* (MORILLAS et al., 2008; HONG; PERERA; KUHN, 2006; MUKHOPADHYAY et al., 2002; TELLINGHUISEN et al., 1999).

Os ensaios mostraram que as bactérias expressaram a proteína C em boa quantidade, embora tenha sido observada a expressão conjunta da proteína na forma truncada ou degradada, mesmo sem adição do indutor. Bactérias Rosetta (DE3) pLysS têm como característica suprimir a expressão basal de proteínas recombinantes antes da indução por IPTG, o que não foi possível observar nos testes realizados neste trabalho (Figuras 18 e 19), mostrando que mesmo sem indução, a proteína C já tem expressão. Portanto, é possível inferir que a grande quantidade de lisinas que se repetem na região N-terminal desta proteína tenha facilitado a expressão de formas truncadas devido o esgotamento de tRNA para este aminoácido no momento da tradução.

A segunda etapa do trabalho consistiu na purificação da proteína C. Para isso foi aplicada a técnica de purificação por cromatografia de afinidade com íon metálico imobilizado (IMAC) que é bastante conhecida e utilizada em outros trabalhos (GOH et al., 2016; ARAUJO et al., 2016). Esta primeira fase da purificação foi realizada com sucesso, onde a cauda com seis histidinas presente no N-terminal da proteína de capsídeo interagiu de

forma eficiente com o níquel presente na coluna. A segunda fase da purificação, que consiste na troca de tampão, se deu com a técnica de cromatografia de exclusão por peso molecular o que resultou na proteína C com alto grau de pureza. Quando foram realizados os ensaios posteriores de associação entre RNA e proteína, foi necessário ainda testar vários métodos para a remoção de ácidos nucleicos residuais. De fato, causa surpresa a presença de contaminação por ácidos nucleicos nas amostras de proteína C purificada por essa metodologia. Mas a presença de marcação de amostras de proteína C pura no gel de agarose, usando agente intercalante de bases (GelRed), expôs claramente essa contaminação. Após experimentos usando RNase, foi testado o tratamento da proteína C a altas temperaturas, o que resultou na remoção da contaminação com ácidos nucleicos. A terceira etapa deste trabalho envolveu a associação da proteína de capsídeo com o RNA auto replicativo do SFV. A proteína C tem a capacidade de interagir com ácido nucleico de *Alphavirus* através de um sinal de encapsidação, que fica localizado na região codificadora para proteína não estrutural nsP2, formando assim o nucleocapsídeo (HONG et al., 2006; LINGER et al., 2004; KUJALA et al., 2001; LU; KIELIAN, 2000; TELLINGHUISEN et al., 1999; OWEN; KUHN, 1996; BOEGE et al., 1983). Essa capacidade foi explorada neste trabalho com intuito de envolver o RNA auto replicativo *in vitro*, promovendo assim a proteção do mesmo. Essa associação foi confirmada em ensaio de mobilidade em gel de agarose (Figura 14). Entretanto, além da associação entre RNA de SFV e proteína C, foi verificado que a proteína era capaz de se associar de forma inespecífica a outro tipo de RNA. O RNA utilizado para essa análise foi o RNA MAYV(E2), que codifica para a proteína E2 de Mayaro. Embora o vírus Mayaro pertença ao gênero *Alphavirus*, o ácido nucleico utilizado neste trabalho não compreende a sequência que codifica para as proteínas não estruturais do vírus Mayaro, portanto não existe a presença do sinal de encapsidação para o reconhecimento específico deste RNA. A ligação inespecífica de proteínas de capsídeo de *Alphavirus* a moléculas de ácidos nucleicos, sejam RNAs de diferentes tamanhos ou mesmo moléculas de DNA simples fita, deve-se à presença na porção N-terminal da proteína C de um grau elevado de carga positiva, o que implica na ligação inespecífica com outros ácidos nucleicos (HONG et al., 2006; WENGLER et al., 1984).

Os dados encontrados na literatura referentes à formação da nucleocapside afirmam que esse evento ocorre obrigatoriamente na presença de ácido nucleico (HONG et al., 2006; TELLINGHUISEN et al., 1999). No entanto, é possível verificar nas imagens adquiridas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 25) que existe a formação de cápsides vazias, somente com a interação entre proteína-proteína, mesmo após a exposição da proteína C a

altas temperaturas. Esse dado difere do que foi demonstrado para a proteína C do vírus Sindbis, considerado um *Alphavirus* modelo, em que a proteína C desse vírus não formou estruturas do tipo cápside na ausência de ácidos nucleicos (TELLINGHUISEN et al., 1999). Também foi possível encontrar cápsides vazias nas amostras contendo proteína C e SFV RNA, o que implica na necessidade de uma melhor padronização de concentrações das moléculas de proteína C e RNA para que todo o material utilizado possa ser aproveitado.

Por fim, a quarta etapa do trabalho se deu com a entrega deste complexo Proteína-RNA a macrófagos J774A1 e células BHK-21. A escolha destas linhagens celulares baseou-se nas características promissoras, facilidade de manipulação, bem como a ampla utilização das mesmas em outros trabalhos já desenvolvidos no laboratório. Sabe-se que os macrófagos têm como principal papel na resposta imune a fagocitose e apresentação do antígeno (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005), esta característica é de extrema importância neste trabalho, pois concilia a eficácia de uma abordagem com base em vacinas de ácido nucleico com a capacidade natural de uma célula pertencente ao sistema imunológico em apresentar o antígeno, possibilitando desta forma, uma resposta imune mais rápida e eficaz. As células BHK-21 já possuem uma empregabilidade em processos biotecnológicos, como por exemplo, a produção de vacinas (MORAES et al, 2008) e também já foi utilizada com sucesso em outros trabalhos desenvolvidos no laboratório, usando o vetor viral SFV (PATIÑO, 2016; PUGLIA, 2013).

Os resultados apresentados na entrega do complexo Proteína-RNA à célula alvo se mostraram promissores quando observadas as imagens de microscopia de fluorescência dos macrófagos J774A1, onde foi possível realizar a entrega do material com a tradução do RNA, resultando na expressão da proteína de interesse, neste caso a proteína verde fluorescente (GFP). No entanto, este mesmo resultado não foi visualizado nas células BHK-21, o que nos permite inferir que possivelmente não ocorreu uma entrega do complexo e sim a fagocitose do mesmo pelos macrófagos.

Para os resultados de entrega do complexo utilizando RNA que codifica para a glicoproteína do vírus da raiva (GPV), ficou clara a importância de uma melhor padronização em proporções moleculares, sem perder a eficácia da formação de nucleocápsides, garantindo uma maior concentração do RNA auto replicativo, que possa ser amplificado na célula alvo em quantidade suficiente para expressão da proteína de interesse.

Em conclusão, foi possível realizar a expressão e purificação da proteína de capsídeo recombinante em quantidade satisfatória. A associação entre a proteína C e o RNA auto replicativo do SFV se deu de forma eficiente e foi possível demonstrar a atividade do RNA

após sua entrega a macrófagos. Cabe ressaltar ainda a importância dessa linhagem celular para o sistema imunológico, o que nos permite inferir que após algumas melhorias na etapa de associação, o complexo poderia ser estudado como alternativa para imunização direta com RNA auto replicativo.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho possibilitou a expressão recombinante da proteína de capsídeo do vírus *Semliki Forest* (SFV) e sua associação com um RNA de interesse, onde as conclusões obtidas estão listadas a seguir:

- Foi possível expressar a proteína de capsídeo recombinante do SFV em sistema procarioto em quantidade satisfatória.
- Os métodos aplicados para a purificação da proteína C resultaram em uma preparação com grau de pureza adequado à realização dos ensaios de atividade.
- A proteína C purificada apresentou a propriedade de se associar a um RNA auto replicativo de *Alphavirus*, formando estruturas semelhantes a nucleocápsides.
- A expressão da proteína GFP, após o ensaio de entrega do complexo formado entre proteína C e o RNA SFVGFP a macrófagos, demonstrou que o RNA permaneceu ativo após as etapas de associação e incubação com a célula alvo.

REFERÊNCIAS*

ARAÚJO, E. D.; GELETU, M.; GUNNING, P. T. Strategies for over-expression and purification of recombinant full length STAT5B in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, August, 2016.

ASTRAY, R. M. et al. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 98-103, 2008.

ASTRAY, R. M. et al. Rabies virus glycoprotein and immune response pattern using recombinant protein or recombinant RNA viral vectors. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2829-2832, 2014.

ASTRAY, R. M.; JORGE, S. A. C.; PEREIRA, C. A. Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein. **Archives of Virology**, V. 162, P. 323-332, February 2017.

BERNARDINO, T. C. **Expressão da glicoproteína rábica utilizando pseudopartículas virais**. 2015. 97 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

BOEGE, U.; WENGLER, G.; WITTMANN-LIEBOLD, B. The Core Protein of Alphaviruses. **European Journal of Biochemistry**, v. 133, n. 2, p. 405–414, 1 jun. 1983.

BOGERS, W. M. et al. Potent immune responses in rhesus macaques induced by nonviral delivery of a self-amplifying RNA vaccine expressing HIV type 1 envelope with a cationic nanoemulsion. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 947–955, 15 mar. 2015.

BORREGO, B. et al. Delivery of synthetic RNA can enhance the immunogenicity of vaccines against foot-and-mouth disease virus (FMDV) in mice. **Vaccine**, v. 31, n. 40, p. 4375–4381, 13 set. 2013.

BRITO, L. A. et al. A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 22, n. 12, p. 2118–2129, dez. 2014.

BRZESKI, H. et al. Regulation of the Synthesis of Sindbis Virus-specified RNA: Role of the Virion Core Protein. **Journal of General Virology**, v. 38, n. 3, p. 461–470, 1 mar. 1978.

<<https://clinicaltrials.gov/>> Visitado em 18 de dezembro de 2017.

CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Editora Manole Ltda, 2005.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências, elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DEERING, R. P. et al. Nucleic acid vaccines: prospects for non-viral delivery of mRNA vaccines. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 6, p. 885–899, jun. 2014.

DELANY, T. et al. Health impact assessment in New South Wales & Health in all policies in South Australia: differences, similarities and connections. **BMC Public Health**, 14/699, 2014.

ELGIZOLI, M. et al. Semliki Forest virus capsid protein acts as a pleiotropic regulator of host cellular protein synthesis. **Journal of Virology**, v. 63, n. 7, p. 2921–2928, jul. 1989.

FAVRE, D. et al. Semliki Forest virus capsid protein expressed by a baculovirus recombinant. **Archives of Virology**, v. 132, n. 3-4, p. 307–319, 1993.

FLEETON, M. N. et al. Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 9, p. 1395–1398, 1 maio 2001.

FORSELL, K.; SUOMALAINEN, M.; GAROFF, H. Structure-Function relation of the NH2-terminal domain of the Semliki Forest Virus capsid protein. **Journal of Virology**, v. 69, n.3, p. 1556-1563, mar. 1995.

FROS, J. J. et al. The C-terminal domain of Chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replications, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling. **Journal of Virology**, v. 87, n. 18, p. 10394-10400, september 2013.

FULLER, S. D.; VON BONSDORFF, C. H.; SIMONS, K. Cell surface influenza haemagglutinin can mediate infection by other animal viruses. **The EMBO journal**, v. 4, n. 10, p. 2475–2485, out. 1985.

FYNAN, E. F. et al. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. **Proc. Natl. Acad. Science**, v. 90, p. 11478-11482, December, 1993.

GARMASHOVA, N. et al. The old world and new world alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2471-2484, mar. 2007.

GEALL, A. J. et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 36, p. 14604–14609, 4 set. 2012.

GEALL, A. J.; MANDL, C. W.; ULMER, J. B. RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 152–159, abr. 2013.

GOH, H. C. et al. Going native: complete removal of protein purification affinity tags by simple modification of existing tags and proteases. **Protein Expression and Purification**, September, 2016.

HAHN, C. S.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Sequence analysis of three Sindbis virus mutants temperature-sensitive in the capsid protein autoprotease. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 82, n. 14, p. 4648–4652, jul. 1985.

HEKELE, A. et al. Rapidly produced SAM® vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. **Emerging Microbes & Infections**, v. 2, n. 8, p. e52, 14 ago. 2013.

HENAO, L. F.; CORTÉS, F.; NAVAS, M. C. Semliki Forest Virus: a viral vector with multiple applications. **Colombia Médica**, v. 38, n. 2, p. 159-169, 2007.

HIKKE, M. C. et al. Alphavirus capsid proteins self-assemble into core-like particles in insect cells: A promising platform for nanoparticle vaccine development. **Biotechnology Journal**, v.10, 2016.

HONG, E. M.; PERERA, R.; KUHN, R. Alphavirus capsid protein Helix I controls a checkpoint in nucleocapsid core assembly. **Journal of Virology**, v. 80, n. 18, p. 8848-8855, September 2006.

JAKOB, R. Nucleolar accumulation of Semliki Forest virus nucleocapsid C protein: influence of metabolic status, cytoskeleton and receptors. **Journal Medicine Microbiology**, v. 40, p. 389-392, 1994.

JOHANSSON, D. X. et al. Intradermal electroporation of naked replicon RNA elicits strong immune responses. **PloS One**, v. 7, n. 1, p. e29732, 2012.

KALLEN, K.-J. et al. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNaive(®) vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, n. 10, p. 2263–2276, out. 2013.

KARIKÓ, K. et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. **Immunity**, v. 23, n. 2, p. 165–175, ago. 2005.

KREITER, S. et al. Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity. **Cancer Research**, v. 70, n. 22, p. 9031–9040, 15 nov. 2010.

KUJALA, P. et al. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3873-3884, 2001.

LEITNER, W. W.; YING, H.; RESTIFO, N. P. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. **Vaccine**, v. 18, n. 9-10, p. 765–777, 10 dez. 1999.

LI, L.; SAADE, F.; PETROVSKY, N. The future of human DNA vaccines. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 2–3, p. 171–182, 31 dez. 2012.

LINGER, B. R. et al. Sindbis virus nucleocapsid assembly: RNA folding promotes capsid protein dimerization. **RNA Journal**, v. 10, p. 128-138, 2004.

LIU, F. et al. Fusion with extracellular domain of cytotoxic T-lymphocyte-associated-antigen 4 leads to enhancement of immunogenicity of Hantaan virus DNA vaccines in C57BL/6 mice. **Virology Journal**, v. 8, p. 448, 2011.

LIU, M. A. Immunologic Basis of Vaccine Vectors. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 504–515, 29 out. 2010.

LJUNGBERG, K.; LILJESTRÖM, P. Self-replicating alphavirus RNA vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 2, p. 177–194, fev. 2015.

LØVÅS, T.-O. et al. DNA Vaccines: MHC II-Targeted Vaccine Protein Produced by Transfected Muscle Fibres Induces a Local Inflammatory Cell Infiltrate in Mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e108069, 9 out. 2014.

LU, Y. E.; KIELIAN, M. Semliki Forest virus budding: assay, mechanisms, and cholesterol requirement. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 7708-7719, 2000.

LUNDSTROM, K. Alphavirus-based vaccines. **Viruses**, v. 6, n. 6, p. 2392–2415, 2014.

MARTINON, F. et al. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 7, p. 1719–1722, jul. 1993.

MELANCON, P.; GAROFF, H. Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. **Journal of Virology**, v. 61, n. 5, p. 1301–1309, maio 1987.

MENDONÇA, R. Z. et al. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarrier system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 12, p. 1305-1317, 1993.

MICHEL, M. R. et al. Karyophilic properties of Semliki Forest virus nucleocapsid protein. **Journal of Virology**, v. 64, n. 10, p. 5123-5131, oct. 1990.

MONTEIRO-VENTINI, D. C. **Purificação e imunogenicidade da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) expressa pelos sistemas células S2 e Semliki Forest vírus**. 2014. 137 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. Editora Roca Ltda, 2008.

MORILLAS, M. et al. Novel enzymatic activity derived from the Semliki Forest virus capsid protein. **Journal Molecular Biology**, n. 376, p. 721-735, 2008.

MUKHOPADHYAY, S. et al. In vitro assembled Alphavirus core-like particles maintain a structure similar to that of nucleocapsid cores in mature virus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 21, p. 11128-11132, Nov. 2002.

OWEN, K. E.; KUHN, R. J. Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. **Journal of Virology**, v. 70, n. 5, p. 2757-2763, may. 1996.

PATINHO, S. F. S. **Produção de proteínas recombinantes em células BHK-21 cultivadas em meio livre de soro fetal bovino**. 2016. 125 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

PERERA, R. et al. Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil alphahelix important for core assembly. **Journal of Virology**, v. 75, n. 1, p. 1-10, jan. 2001.

PERRI, S. et al. An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10394–10403, out. 2003.

PUGLIA, A. L. P. et al. Quantitative RT-PCR for titration of replication-defective recombinant Semliki Forest virus. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 2, p. 647-652, 2013.

RIEZEBOS-BRILMAN, A. et al. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 35, n. 3, p. 233-243, 2006.

RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, p. 2483–2500, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAXENA, S. et al. A sindbis virus replicon-based DNA vaccine encoding the rabies virus glycoprotein elicits immune responses and complete protection in mice from lethal challenge. **Vaccine**, v. 26, n. 51, p. 6592–6601, 2 dez. 2008.

SKOGING, T.; LILJESTROM, P. Role of the C-terminal tryptophan residue for the structure-function of the Alphavirus capsid protein. **Journal Molecular Biology**, n. 279, p. 865-872, 1998.

TANG, D. C.; DEVIT, M.; JOHNSTON, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, v. 356, n. 6365, p. 152–154, 12 mar. 1992.

TELLINGHUISEN, T. L. et al. In vitro assembly of alphavirus cores by using nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Virology**, v. 73, n. 7, p. 5309-5319, July 1999.

ULMANEN, I.; SÖDERLUND, H.; KÄÄRIÄINEN, L. Semliki Forest virus capsid protein associates with the 60S ribosomal subunit in infected cells. **Journal of Virology**, v. 20, n. 1, p. 203–210, out. 1976.

ULMER, J. B. et al. RNA-based vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 30, p. 4414–4418, 22 jun. 2012.

ULMER, J. B. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**, v. 259, p. 1745-1749, 19 March 1993.

VAN STEEG, H. et al. Infection of neuroblastoma cells by Semliki Forest virus. The interference of viral capsid protein with the binding of host messenger RNAs into initiation complexes is the cause of the shut-off of host protein synthesis. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 138, n. 3, p. 473–478, 1 fev. 1984.

WALKER, J. M.; RAPLEY, R. **Molecular Biology and Biotechnology**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2009.

WEISS, B.; GEIGENMULLER-GNIRKE, U; SCHLESINGER, S. Interactions between Sindbis virus RNAs and a 68 amino acid derivative of the viral capsid protein further defines the capsid binding site. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 5, p. 780-786, 24 jan. 1994.

WENGLER, G. et al. Establishment and analysis of a system which allows assembly and disassembly of alphavirus core-like particles under physiological conditions in vitro. **Virology**, v. 132, n. 2, p. 401–412, 30 jan. 1984.

WOLFF, J. A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, v. 247, n. 4949 Pt 1, p. 1465–1468, 23 mar. 1990.

YOKOMIZO, A. Y. et al. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 1, p. 102-109, 2007.

ANEXOS

ANEXO A-	Competência de Bacterias	77
ANEXO B-	Imunodeteção por <i>Western Blotting</i>	79
ANEXO C-	Tranfecção de RNA	80

ANEXO A

Competência de Bactérias

Materiais:

- Bactérias não competentes
- Placa de petri com meio LB + ágar estéril
- Meio de cultura SOB (2% Peptona; 0,5% Extrato de levedura; 10 mM Cloreto de sódio; 2,5 mM Cloreto de potássio; 10 mM Cloreto de magnésio; 10 mM Sulfato de magnésio)
- Solução de Cloreto de Magnésio a 1M
- Solução RFI (100 mM Cloreto de potássio; 50 mM Cloreto de manganês; 30 mM Acetato de potássio; 10 mM Cloreto de cálcio; 15% Glicerol)
- Solução RFII (10 mM Na MOPS; 10 mM Cloreto de potássio; 75 mM Cloreto de cálcio; 15% Glicerol)
- Alça para estriar
- Tubo de ensaio
- Tubos tipo Falcon de 15 mL e 50 mL
- Erlen Meyer de 500 mL
- Gelo
- Criotubos
- Nitrogênio líquido

Procedimento:

- Estriar as bactérias não competentes em uma placa de petri com LB ágar e incubar a 37 °C por 16 horas
- Inocular uma colônia em 3 mL de meio SOB (pré aquecido) em um tubo de ensaio e incubar a 37 °C, sob agitação de 240 rpm, por 16 horas
- Colocar 100 mL de meio SOB no erlen meyer e inocular com os 3 mL de cultura que estavam crescendo
- Incubar a 37 °C, sob agitação de 240 rpm até atingir DO de 0,6 em comprimento de onda a 550 nm
- Colocar o erlen no gelo e adicionar 0,5 mL de Cloreto de magnésio
- Transferir a cultura para todos de 50 mL (pré inseridos no gelo) e incubar por 15 minutos
- Centrifugar a 4 °C, por 12 minutos a uma velocidade de 3000 rpm

- Descartar o sobrenadante completamente e ressuspender suavemente as bactérias em 20 mL de solução RFI
- Incubar no gelo por 15 minutos e posteriormente centrifugar a 4 °C, por 12 minutos a uma velocidade de 3000 rpm
- Descartar o sobrenadante completamente e ressuspender suavemente as bactérias em 20 mL de solução RFII
- Fazer alíquotas de 100 µL em criotubos identificados
- Congelar rapidamente em nitrogênio líquido
- Estocar a -80 °C ou em nitrogênio líquido

ANEXO B

Imunodeteção por *Western Blotting*

- Aplicar 50 µL de tampão de lise (62,5 mM Tris, 2% SDS, 10% glicerol e 5% β mercaptoetanol) a amostra e incubar 100 °C por 10 minutos
- Aplicar amostras (30 µL) no gel de eletroforese SDS-PAGE 12%
- Corrida de migração 150 v
- Transferir para membrana de nitrocelulose por 1 hora / 12 v
- Bloquear da membrana com PBS + 3% leite mólico e incubar *over night* / 4 °C
- Lavar três vezes, de 10 minutos cada, com PBS + Tween 20 (0,05%)
- Incubar por 1 hora em agitação / T. A, anticorpo primário mouse anti-histina (1:4000, em 25 mL de PBS + 3% leite mólico)
- Lavar três vezes, de 10 minutos cada, com PBS + Tween 20 (0,05%)
- Incubar por 1 hora em agitação / T. A, anticorpo secundário goat anti-mouse HRP (1:5000, em 25 mL de TBS + 3% leite mólico)
- Lavar três vezes, de 10 minutos cada, com PBS + Tween 20 (0,05%)
- Adicionar o kit de revelação Super Signal® (Thermo) sobre a membrana
- Reveladar no aparelho de fotodocumentação UVITEC Cambridge

ANEXO C

Transfecção de RNA

Para realizar os ensaios de transfecção de RNA, utilizando Kit TransMessenger (Qiagen), as células foram incubadas em placas de 6, 12 ou 24 poços, dependendo do experimento, com inóculo de 5×10^4 células por cm^2 .

A quantidade de $2\mu\text{g}$ de RNA é recomendada para a transfecção de um poço da placa de 6 poços.

- Calcular o volume V da mistura de $2\mu\text{g}$ de RNA
- Descontar o valor de V e de enhancer R ($4\mu\text{g}$) da quantidade de buffer EC-R qsp $100\mu\text{L}$
- Misturar o enhancer R e o buffer EC-R
- Adicionar o RNA à mistura e levar ao vortex por 10 segundos
- Incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos
- Centrifugar brevemente para coletar as gotas aderidas à tampa do microtubo
- Adicionar $8\mu\text{L}$ de transmessenger e misturar por pipetação (5x)
- Incubar as amostras à temperatura ambiente por 10 minutos
- Enquanto os complexos são formados, aspirar o meio de cultura e lavar e lavar as células com PBS, com pelo menos 2x o volume de meio utilizado para o cultivo
- Adicionar $900\mu\text{L}$ de meio sem soro e sem antibióticos ao complexo formado e misturar bem por pipetação
- Adicionar a mistura à placa, gota a gota, agitando-a no final para garantir homogeneidade
- Incubar as células a 37°C durante 3h
- Após a incubação, retirar o meio com o complexo e trocar por meio de cultura novo
- Analisar transfecção em microscópio de fluorescência invertido