

Vinícius dos Santos Santana

Expressão, purificação e caracterização estrutural *in silico* das
proteínas capsidiais codificadas pelo *Grapevine virus A e B*

São José do Rio Preto

2014

Vinícius dos Santos Santana

Expressão, purificação e caracterização estrutural *in silico* das proteínas capsidiais codificadas pelo *Grapevine virus A e B*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni

São José do Rio Preto

2014

Santana, Vinícius dos Santos.

Expressão, purificação e caracterização estrutural in silico das proteínas capsidiais codificadas pelo Grapevine virus A e B / Vinícius dos Santos Santana. -- São José do Rio Preto, 2014
103 f. : il.

Orientador: Raghuvir Krishnaswamy Arni

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bioquímica. 2. Vírus de plantas. 3. Proteínas capsidiais - Purificação. 4. Cristalização. I. Arni, Raghuvir Krishnaswamy. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 581.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Vinícius dos Santos Santana

Expressão, purificação e caracterização estrutural das
proteínas capsidiais codificadas pelo *Grapevine virus A e B*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Priscila Belintani
UNORP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Ana Theresa Silveira de Moraes
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Alessandra Vidotto
FAMERP- São José do Rio Preto

Prof. Dr. Fábio Rogério de Moraes
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
2014

AGRADECIMENTOS

À minha família que esteve sempre presente e me dando apoio. Aos meus amados pais Vanderlei Santana e Ana Maria P. dos Santos, à minha irmã Natália dos Santos Santana e à minha namorada Patrícia Buck por todo amor, ensinamentos e sábios conselhos.

Ao meu orientador Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni, pela paciência e confiança para investir na minha formação, e ainda mais, pela sua amizade durante esses 4 anos de convivência.

Ao Prof. Dr. José Osmar Gaspar, por ceder os plasmídeos clonados e pelo apoio dado em relação aos vírus de plantas.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica: André, Anwar, Eliana, Fábio, Josie, Mônica, Raphael, Rehana e Ricardo, pela convivência, confidências, risos fartos e cumplicidade.

Aos professores Dra. Andreia Estela Moreira de Souza, Dra. Priscila Belintani, Dr. Marcelo Andres Fossey, Dra. Ana Theresa Silveira de Moraes, Dr. Ramon José Beltran Abrego, Dra. Alessandra Vidotto, Dr. Fábio Rogério de Moraes, pela disponibilidade na composição da banca. Agradeço as sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao meu amigo Fábio pela ajuda com as técnicas de bioinformática e ao Ícaro pela ajuda com alguns experimentos, dúvidas e análise de dados experimentais.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey, pela ajuda com as técnicas de dicroísmo circular.

Ao Prof. Dr. Christian Betzel (Universität Hamburg, Alemanha), pelo apoio e por permitir a realização parcial deste trabalho em seu laboratório.

À FAPESP, pela sua relevância como órgão de fomento para a pesquisa científica e pela concessão de bolsa de doutorado e pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE), que permitiu o desenvolvimento do nosso projeto.

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia do IBILCE/Unesp.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIACÕES	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. Introdução	14
1.1 Lenho rugoso da videira (<i>Grapevine Rugose Wood</i>)	15
1.2 Intumescimento dos ramos da videira (<i>Grapevine corky bark</i>)	15
1.3 Acanaladura do lenho de kober ("Kober stem grooving")	17
1.4 Organização do genoma viral.....	18
1.5 Funções das proteínas capsidiais de vírus de plantas	19
1.6 Relevância e Justificativa	20
2. Objetivo geral	22
2.1 Objetivos específicos.....	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Plasmídeos contendo as ORFs codificadoras das proteínas capsidiais	23
3.2 Linhagem de bactéria utilizada para expressão das proteínas	23
3.3 Transformação dos vetores em células competentes	23
3.4 Confeção de oligonucleotídeos para adicionar o sítio de clivagem para a TEV protease	24
3.5 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	26
3.6 Corte enzimático	27
3.7 Purificação dos vetores e dos insertos após o corte enzimático	27
3.8 Reação de ligação dos insertos nos vetores.....	27
3.9 Extração dos plasmídeos recombinantes.....	28
3.10 Transformação do plasmídeo recombinante em células de linhagem de expressão.....	28
3.11 Expressão e purificação da TEV protease.....	28
3.12 Testes de expressão das proteínas capsidiais	29
3.13 Purificação das proteínas capsidiais sob condição desnaturante	30
3.14 Purificação das proteínas capsidiais sob condição nativa	30
3.15 Análise das proteínas purificadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	31
3.16 Western blotting	31
3.17 Dicroísmo Circular	32
3.18 Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	34

3.19	Predição da estrutura tridimensional das proteínas capsidiais	35
3.20	Validação dos modelos gerados	37
3.21	Ensaio de cristalização.....	38
4.	Resultados	40
4.1	Expressão e purificação da TEV protease	40
4.2	Resultados da proteína capsidial do GVB.....	42
4.2.1	Clonagem da proteína capsidial no vetor pET28a.....	42
4.2.2	Testes de expressão e purificação	44
4.2.3	Western Blotting	48
4.2.4	Dicroísmo Circular.....	49
4.2.5	Experimento de espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	50
4.2.6	Ensaio de cristalização.....	51
4.2.7	Predição da estrutura tridimensional da GVBcp	52
4.3	Resultados da proteína capsidial do GVA.....	64
4.3.1	Clonagem da proteína capsidial no vetor pET28a.....	64
4.3.2	Expressão e purificação das proteínas capsidiais	66
4.3.3	Dicroísmo Circular.....	68
4.3.4	Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	69
4.3.5	Ensaio de cristalização.....	71
4.3.6	Predição da estrutura tridimensional da GVAcp	78
5.	Discussão	89
6.	Conclusões	94
7.	Perspectivas Futuras	95
8.	Referências	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Uvas da cultivar Isabel colhidas de plantas com a doença do intumescimento dos ramos.	14
Figura 2. Intumescimento dos ramos na cultivar Isabel.	16
Figura 3. Planta da cultivar <i>Petit Syrah</i> sem a doença do intumescimento dos ramos	16
Figura 4. Caneluras do tronco após a retirada da casca.....	17
Figura 5. Aparência da copa de vinífera tinta infectada.....	18
Figura 6. Organização e expressão do genoma da espécie-tipo do gênero <i>Vitivirus</i>	19
Figura 7. Esquema da construção das proteínas capsidiais	25
Figura 8. Ciclagem da temperatura utilizada na amplificação dos insertos.	26
Figura 9. Diagrama de ligação peptídica	41
Figura 11. Teste de clivagem da cauda de histidina	41
Figura 12. SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do experimento de clivagem.	41
Figura 13. Gel de agarose a 1% mostrando o resultado da amplificação da ORF	42
Figura 14. Gel de agarose a 1,0% mostrando o corte enzimático do plasmídeo pET28a.....	43
Figura 15. Gel de agarose a 1,0% mostrando o resultado da PCR.....	44
Figura 16. SDS-PAGE 12% da purificação da GVBcp.....	45
Figura 17. SDS-PAGE 12% da GVBcp expressa a 18 °C.....	46
Figura 18. SDS-PAGE 12% da purificação da GVBcp.....	46
Figura 19. SDS-PAGE 12% da purificação da GVBcp.....	47
Figura 20. SDS-PAGE 12% da GVBcp expressa a 18 °C.....	47
Figura 21. Gel de poliacrilamida contendo SDS.	48
Figura 22. <i>Western blotting</i> mostrando a detecção da GVBcp.....	49
Figura 23. Espectro de CD (190 a 250 nm) da proteína GVBcp.....	50
Figura 24. Histograma dos resultados da análise de DLS da GVBcp	51
Figura 25. Cristal da GVBcp obtido	52
Figura 26. Representação em <i>cartoon</i> da estrutura da GVBcp	53
Figura 27. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVBcp	54
Figura 28. Resultado do programa <i>ProSA</i> para o modelo da GVBcp	54
Figura 29. Estrutura do dímero PapMV mostrada na forma de <i>cartoon</i>	55
Figura 30. Alinhamento das sequências de aminoácidos	56
Figura 31. Comparação da estrutura da GVBcp gerada pelo <i>I-Tasser</i>	56

Figura 32. Representação em <i>cartoon</i> do melhor modelo da GVBcp.....	57
Figura 33. Representação em <i>cartoon</i> da estrutura da GVBcp	58
Figura 34. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVBcp gerado pelo <i>Quark</i>	58
Figura 35. Resultado do programa ProSA para o modelo da GVBcp.....	59
Figura 36. Comparação da estrutura da GVBcp gerada pelo <i>Quark</i>	60
Figura 38. Representação em <i>cartoon</i> do modelo da GVBcp pelo <i>Rosetta</i>	61
Figura 39. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVBcp.....	61
Figura 40. Resultado do programa <i>ProSA</i> para o modelo da GVBcp gerado pelo <i>Rosetta</i>	62
Figura 41. Comparação da estrutura da GVBcp.....	62
Figura 42. Representação em <i>cartoon</i> do alinhamento da estrutura do GVBcp	63
Figura 43. Gel de agarose a 1% mostrando o resultado da amplificação da ORF	64
Figura 44. Gel de agarose a 1% mostrando o corte enzimático do plasmídeo pET28a	65
Figura 45. Gel de agarose a 1% mostrando o resultado da PCR.....	65
Figura 46. SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação	66
Figura 47. Gel de poliacrilamida contendo SDS mostrando os resultados da purificação.....	67
Figura 48. Cromatograma do resultado da purificação da GVAcp.	68
Figura 49. Espectro de CD (200 a 240 nm) da proteína GVAcp	69
Figura 50. Histograma do resultado do experimento de DLS da GVAcp.....	70
Figura 51. Gráfico do raio hidrodinâmico em função do tempo.	70
Figura 52. Foto da gota de cristalização	71
Figura 53. Foto da gota de cristalização.	72
Figura 54. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA.....	73
Figura 55. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA.....	73
Figura 56. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA.....	73
Figura 57. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA.....	74
Figura 58. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA.....	74
Figura 59. Cristais da proteína capsidial do GVA.....	75
Figura 60. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial.....	75
Figura 61. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA.....	76
Figura 62. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA.....	76
Figura 63. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA.....	77
Figura 64. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA.....	77
Figura 65. Cristais da proteína capsidial do GVA.....	78
Figura 66. Representação em <i>cartoon</i> da estrutura da GVAcp.....	79

Figura 67. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVAcP.	80
Figura 69. Alinhamento das sequências de aminoácidos.	81
Figura 70. Comparação da estrutura da GVAcP.....	82
Figura 71. Representação em <i>cartoon</i> do alinhamento da estrutura do GVAcP.	82
Figura 72. Representação em <i>cartoon</i> da estrutura da GVAcP	83
Figura 73. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVAcP	84
Figura 74. Resultado do programa <i>ProSA</i> para o modelo da GVAcP.....	84
Figura 75. Comparação da estrutura da GVAcP gerada pelo <i>Quark</i>	85
Figura 76. Representação em <i>cartoon</i> do alinhamento da estrutura do GVAcP.....	85
Figura 77. Representação em <i>cartoon</i> do modelo da GVAcP.....	86
Figura 78. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVAcP	87
Figura 80. Comparação da estrutura da GVBcp.....	87
Figura 81. Representação em <i>cartoon</i> do alinhamento da estrutura do GVAcP.....	88

LISTA DE ABREVIACOES

BCIP – 5-bromo-4 cloro-3 indolil fosfato

CATH – acrnimo para os quatro principais níveis na classificação de proteínas – *Class, Architecture, Topoly e Homologous Superfamily*

CD – Dicroísmo circular

DLS – Espalhamento dinâmico de luz

dNTP – Desoxirribonucleotídeos

dsRNA – RNA de fita dupla

DO – densidade ptica

GVA – *Grapevine virus A*

GVAcP – proteína capsidial do *Grapevine virus A*

GVB – *Grapevine virus B*

GVBcP – proteína capsidial do *Grapevine virus B*

Hel – Helicase

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosida

kDa – Quilodalton

LB - Luria Bertani

Mda – Megadaltons

MES - 2-morfolinoetanosulfônico monoidratado

MP – Proteína do movimento

mRNA – RNA mensageiro

Mtr – Metiltransferase

NBT – Nitroblue tetrazólio

ORF – *Open Reading Frame*

PapMV – *Papaya mosaic virus*

PapMVcP – proteína capsidial do *Papaya mosaic virus*

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

PEG – Polietilenoglicol

RdRp – RNA polimerase dependente de RNA

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

sgRNA– RNA subgenômico

SCOP – *Structural Classification of Proteins*

SOB – meio de cultura enriquecido para crescimento bacteriano

(+)ssRNA – RNA de fita única de polaridade positiva

TEV – *Tobacco etch virus*

Tris – Hidroximetil-aminometano

tRNA- RNA transportador

UTR – região não traduzida

UV - ultravioleta

RESUMO

Introdução. O Grapevine virus A e B pertencem à família *Betaflexiviridae*, gênero *Vitivirus*. As partículas virais são filamentos flexuosos de 725 a 800 nm, contêm uma única molécula de (+)ssRNA de aproximadamente 7.6 kb, uma única proteína capsidial de aproximadamente 21.5 kDa, e são restritos ao floema da videira. O GVA é o agente etiológico da acanaladura do lenho de Kober, e o GVB do intumescimento dos ramos, componentes de um complexo de doenças, disseminados pelo material de propagação e por cochonilhas. Este complexo apresenta grande importância econômica para a viticultura e induz alterações no lenho de variedades sensíveis de videiras. Os sintomas gerais constituem no atraso da brotação da primavera, redução de vigor, baixa produção de uva, caneluras e acanaladuras no lenho. De acordo com Galiakparov e colaboradores, as proteínas capsidiais do GVA desempenham um papel no movimento do vírus célula-a-célula. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos a expressão, purificação e a caracterização estrutural *in silico* da proteína capsidial do GVA e GVB (GVAcp e GVBcp). **Métodos.** As proteínas capsidiais clonadas no vetor pET28a foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade (Ni-NTA) e exclusão molecular. A técnica de dicroísmo circular foi utilizada para checar se estavam estruturadas e estimar o conteúdo de estruturas secundárias, e a técnica de espalhamento dinâmico de luz para verificar se as proteínas estavam agregadas ou adequadas para os ensaios de cristalização. Concomitantemente, devido à falta de estruturas de proteínas capsidiais homólogas, foram utilizados os programas *I-Tasser*, *Rosetta* e *Quark*, para gerar um modelo tridimensional das proteínas para obter informações importantes sobre suas estruturas. **Resultados.** As proteínas capsidiais expressas sob baixa temperatura (18 °C) ficaram solúveis, foram purificadas obtendo-se um alto grau de pureza e concentradas para 5 mg/mL. A análise de dicroísmo circular mostrou que ambas estavam estruturadas, e a análise de espalhamento dinâmico de luz indicou que a GVBcp estava agregada e a GVAcp estava na forma de dímero. Obteve-se cristais iniciais de ambas as proteínas, porém somente os cristais da GVAcp foram obtidos após as tentativas de otimização. Analisando-se os modelos gerados pelo *I-Tasser*, observou-se que o melhor molde utilizado foi a proteína capsidial do vírus filamentosso flexuoso Papaya mosaic virus (PapMV), pertencente à família *Alphaflexiviridae*. Foi sugerido pelos autores que o mecanismo de polimerização das proteínas capsidiais na formação do capsídeo ocorre através de um domínio de troca, onde peptídeos da região N-terminal interagem com um “pocket” hidrofóbico da proteína vizinha. Selecionou-se os melhores modelos obtidos pelos programas e, então, foram alinhados com a estrutura cristalográfica do PapMV utilizando o programa TM-align. Os resultados dos alinhamentos mostraram que somente os melhores modelos gerados pelo *I-Tasser* possuíam semelhança estrutural, mas não semelhança funcional, pois a região responsável pelo mecanismo de troca não foi modelado. **Conclusões.** Com sucesso foi elaborado um protocolo para a expressão solúvel e purificação das proteínas capsidiais. As análises de dicroísmo circular indicaram que estavam estruturadas e adequadas para os testes de cristalização. Os cristais obtidos da GVAcp devem ser otimizados para se obter cristais difratáveis e de boa qualidade, a fim de se resolver sua estrutura cristalográfica e entender o mecanismo de polimerização do vírus.

Palavras-chave: 1. GVA 2. GVB 3. Proteína capsidial 4. Expressão 5. Purificação 6. Cristalização 7. Caracterização estrutural *in silico*

ABSTRACT

Introduction. Grapevine virus A and B (GVA and GVB) belong to the *Betaflexiviridae* family, *Vitivirus* genus. The virus particles of genus members are flexuous filaments of 725 to 800 nm in length, containing a (+)ssRNA of approximately 7.6 kb, coding for a single protein of 18 to 21.5 kDa, and are grapevine phloem-restricted. GVA is the etiological agent of Kober stem grooving and GVB is the etiological agent of Grapevine corky bark, both components of the rugose wood complex which are spread by the propagation materials and mealy bugs. This disease complex is of great economic impact to the viticulture causing alterations on wood of susceptible grapevine varieties. The general symptoms are spring delayed budding, reduced grape yield and quality, pits and grooves on the woody cylinder. According to Galikparov and others, GVA coat proteins (*Vitivirus* genus specie-type) play a role in virus cell-to-cell movement. Thus, this work aimed to express, purify and characterize *in silico* GVA and GVB capsid proteins (GVAcp and GVBcp). **Methods.** The coat proteins cloned in pET28a were expressed in *E. coli* and purified by metal affinity (Ni-NTA) and molecular exclusion chromatographies. Circular dichroism analysis was performed to check if proteins were structured and to estimate secondary structure content, and dynamic light scattering was used to check if proteins were aggregated or suitable for crystallization. Concomitantly, due to the lack of homologous coat protein structures, we used I-Tasser, Rosetta and Quark programs to predict the proteins 3D structures to obtain important information about their structures. **Results.** The coat proteins expressed in low temperature (18 °C) remained soluble and were purified yielding high purity proteins concentrated to 5 mg/mL. Circular dichroism showed that both were structured and dynamic light scattering showed that GVBcp was aggregated and GVAcp remained a dimer after molecular exclusion chromatography. We obtained initial crystals of both coat proteins but only GVAcp crystals were obtained after crystals optimization attempts. Analyzing predicted structures generated by I-Tasser we observed that the best used template to model proteins was the crystal structure of the flexuous filamentous Papaya mosaic virus (PapMV) coat protein that belongs to the *Alphaflexiviridae* family. Yang and others suggested that the mechanism of coat proteins polymerization in the formation of the capsid occurs via N-terminal swapping, where N-terminal peptides interact with a hydrophobic pocket of the neighboring protein. We select the best models obtained by the programs and then were aligned with the PapMV crystallographic structure using TM-align program. The results of the alignments showed that only the best models generated by I-Tasser for GVAcp and GVBcp had structural similarity, but not functional similarity, because the region responsible for the swapping was not modeled on the predicted models. **Conclusions.** We successfully developed a protocol for soluble coat proteins expression and purification. Circular dichroism analysis indicated that the proteins were structured and suitable for crystallization trials. The GVAcp crystals must be optimized to obtain diffractable good quality crystals in order to solve its crystal structure and understand the virus coat proteins polymerization mechanism.

Keywords: 1. GVA 2. GVB 3. Capsid proteins 4. Expression 5. Purification 6. Crystallization 7. Structural *in silico* characterization.

1. Introdução

Doenças causadas por vírus na cultura da videira (*Vitis* spp.) são descritas nos países de tradição vitícola há mais de um século, entretanto os estudos desses patógenos começaram a evoluir há aproximadamente meio século (KHUN; FAJARDO, 2013). As principais viroses de videira descritas em outros países também foram constatadas no Brasil, e constituem um dos mais importantes problemas fitossanitários da viticultura nacional, pois estão associados a um decréscimo na produção e qualidade da uva (**Figura 1**) ou, até mesmo, perdas totais dependendo da variedade envolvida. Isto é devido ao cultivo da videira ser realizado pela multiplicação vegetativa (estaquia ou enxertia) de variedades tradicionais de copa e de porta-enxerto, deixando os vinhedos expostos a esses patógenos, que podem ser difundidos pelo material de propagação (AMORIM; KUNIYUKI, 1997).



Figura 1. Uvas da cultivar Isabel colhidas de plantas com a doença do intumescimento dos ramos, mostrando a maturação incompleta (esquerda) e de plantas saudias (direita). Fonte: Embrapa Uva e Vinho. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/complrug.html>>, acessado em 15 de Fevereiro de 2014.

No último trabalho, cerca de 55 vírus, distribuídos em 20 gêneros, foram registrados como causadores de doenças em videiras (MARTELLI, 2003). Entre as principais viroses que ocorrem no Brasil, destaca-se o complexo rugoso (“Grapevine Rugose Wood Complex”), que está associado à alterações no lenho de plantas infectadas (KUHN; FAJARDO, 2013). Neste complexo encontram-se os agentes etiológicos causadores do intumescimento dos ramos da videira (“Grapevine Corky Bark”) e da acanaladura do lenho de Kober (“Kober Stem Grooving”) (KUNIYUKI; COSTA, 1982; KUHN, 1992).

1.1 Lenho rugoso da videira (*Grapevine Rugose Wood*)

O lenho rugoso da videira é o nome dado a um complexo de doenças que apresenta grande importância econômica para a viticultura, razão pela qual é objeto de constante atenção nos programas de seleção sanitária (KUHN; FAJARDO, 2013). Desde as primeiras descrições (GRANITI; CICCARONE, 1961), o lenho rugoso da videira vem sendo considerado um dos mais preocupantes complexos de doenças infecciosas da videira.

Este complexo é caracterizado por induzir alterações no lenho de variedades sensíveis de videira, que ocorre na maioria dos países vitícolas (MARTELLI, 1993; KRAKE et al., 1999). Os sintomas gerais constituem no atraso da brotação da primavera, redução de vigor, baixa produção de uva, intumescência na região acima do ponto de enxertia, casca espessa e corticosa com textura esponjosa, caneluras (*pittings*) e acanaladuras (*groovings*) no lenho, ocorrendo em variedades de copa, porta-enxerto ou ambos (AMORIM; KUNIYUKI, 1997).

O lenho rugoso da videira é constituído por pelo menos quatro doenças distintas: intumescimento dos ramos (“*Grapevine Corky Bark*”), acanaladura do lenho de Kober (“*Kober Stem Grooving*”), acanaladura do lenho de LN-33 (“*LN-33 Stem Grooving*”) e lenho estriado de rupestris ou cascudo (“*Rupestris Stem Pitting*”) (SAVINO et al., 1989; MINAFRA, 2000; MINAFRA; BOSCIA, 2003), sendo todas elas já constatadas no Brasil (KUNIYUKI, 1972; KUHN, 1992; KUNIYUKI et al., 1997; KUHN et al., 2002).

As doenças que compõem este complexo não são facilmente distinguidas em campo, devido à ausência de sintomas específicos nas folhas e a intensidade destes sintomas dependerem da combinação copa/porta-enxerto. Desta maneira, a identificação das doenças é feita utilizando-se três indicadores diferenciais: ‘Kober 5BB’, ‘LN-33’ e *Vitis rupestris* (AMORIM; KUNIYUKI, 1997; LIMA, 2002).

1.2 Intumescimento dos ramos da videira (*Grapevine corky bark*)

O agente etiológico do intumescimento dos ramos da videira é denominado vírus B da videira (*Grapevine virus B*) (GVB), e está especificamente associado ao intumescimento dos ramos (KUHN; FAJARDO, 2013).

O vírus é transmitido por material vegetativo, seja pela multiplicação por estacas ou gemas, como por enxertia. A dispersão do intumescimento dos ramos foi reportada em Israel e México, associado a um possível inseto vetor. Posteriormente, foi realizada a transmissão

experimental do GVB por cochonilhas das espécies *Planococcus ficus*, *Planococcus citri*, *Pseudococcus affinis* e *Pseudococcus longispinus* (KUHNS; FAJARDO, 2013).

Os sintomas são facilmente observados nas cultivares americanas (*Vitis labrusca*), como Isabel, Niágara Rosada e Niágara Branca, caracterizados pelo intumescimento dos entrenós do ramo do ano (**Figura 2A**), com fendilhamento longitudinal do tecido afetado. Em algumas cultivares pode ser observado o avermelhamento das folhas, abrangendo toda a área foliar, inclusive os tecidos ao longo das nervuras (**Figura 3**). Outro sintoma associado à presença do vírus é o engrossamento na região da enxertia (**Figura 2B**) (KUHNS; FAJARDO, 2013).

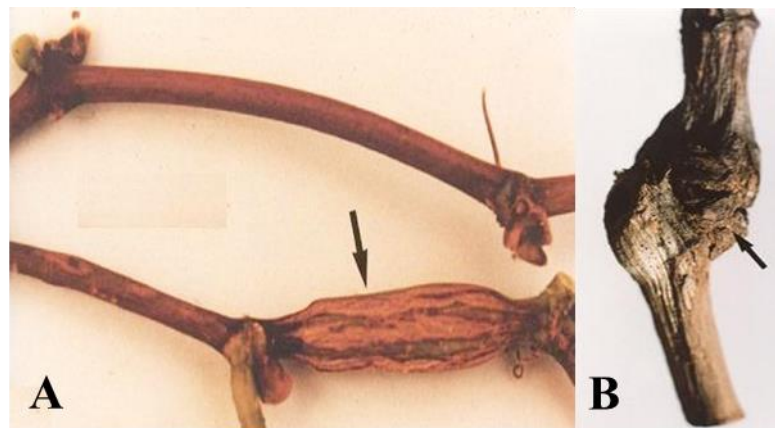


Figura 2. Intumescimento dos ramos na cultivar Isabel (ramo infectado evidenciado pela seta) (**A**); Região da enxertia de uma planta infectada com o intumescimento dos ramos (**B**). Fotos por Gilmar Barcelos Kuhn, Embrapa Uva e Vinho. Disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/uzum/v_intum_ramos.html>, acessado em 15 de Fevereiro de 2014.



Figura 3. Planta da cultivar *Petit Syrah* sem a doença do intumescimento dos ramos (**A**); Planta da cultivar *Petit Syrah* com avermelhamento das folhas, quando afetada pela doença do intumescimento dos ramos (**B**). Fonte: Embrapa Uva e Vinho. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/comprug.html>>, acessado em 15 de Fevereiro de 2014.

1.3 Acanaladura do lenho de kober ("*Kober stem grooving*")

Esta doença foi descrita pela primeira vez na Itália, com o nome de “legno riccio”, também conhecida como “stem-pitting” e “wood-pitting” (KUHN; FAJARDO, 2013).

O *Grapevine virus A* (GVA) é transmissível para hospedeiros herbáceos (*Chenopodium quinoa* e *Nicotiana* spp.). A disseminação das caneluras do tronco ocorre por material vegetativo contaminado e a transmissão por enxertia. A transmissão entre videiras ou para hospedeiros herbáceos pelas conchonilhas das espécies *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus affinis*, *Planococcus citri* e *Planococcus ficus* foi comprovada, havendo ainda um relato de transmissão *Neopulvinaria innumerabilis* (KUHN; FAJARDO, 2013).

Nos sintomas da doença em cultivares sensíveis, verifica-se a formação de reentrâncias longitudinais (caneluras), que prejudicam a formação dos vasos condutores de seiva. A casca do tronco é mais grossa e de aspecto corticento, podendo também ocorrer na região da enxertia uma diferença de diâmetro entre o enxerto e o porta-enxerto (**Figura 4**). As folhas de algumas cultivares apresentam um avermelhamento em plantas muito afetadas, em função da formação deficiente dos vasos condutores na região afetada (**Figura 5**) (KUHN; FAJARDO, 2013).



Figura 4. **A:** Caneluras do tronco após a retirada da casca (esquerda) e com casca (direita), apresentando alterações. **B:** Corte transversal do tronco exibindo reentrâncias típicas das caneluras. Fotos por Gilmar Barcelos Kuhn, disponível em < http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/uzum/v_canel_tronco.html>, acessado em 15 de Fevereiro de 2014.



Figura 5. Aparência da copa de vinífera tinta infectada (direita), ao lado de planta sadia (esquerda) no outono. Foto por Gilmar Barcelo Kuhn, disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/tecnologias/uzum/v_canel_tronco.html>, acessado em 15 de Fevereiro de 2014.

1.4 Organização do genoma viral

O GVA e GVB pertencem à família Betaflexiviridae, gênero *Vitivirus* (CARSTENS, 2010), e são restritos ao floema de sua única hospedeira natural, a videira (ADAMS et al., 2004; FAUQUET et al., 2005). Os vírions são filamentos flexuosos de 725 a 825 x 12 nm de tamanho, possuem uma única molécula de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 7.6 kb, possui cap 5' e é poliadenilada na região 3' terminal (ADAMS et al., 2004; FAUQUET et al., 2005).

Os genomas contêm cinco ORFs ligeiramente sobrepostas (**Figura 6**). As regiões 5' do GVA e GVB iniciam-se com uma UTR de 47-86 nucleotídeos rica em A/T (60-68%). Além da proteína de 21.5 kDa, codificada pela ORF 4, o genoma viral expressa as proteínas não-estruturais. A replicação ocorre no citoplasma, possivelmente em associação com vesículas membranosas. A estratégia de replicação do GVA engloba a produção de conjuntos de sgRNAs, que servem para a expressão de todas as ORFs, exceto para a ORF5, que pode ser expressa via um mRNA bi ou policistrônico. A geração destes sgRNAs parece ser controlada por elementos internos cis-acting (FAUQUET et al., 2005).

Os capsídeos são compostos de um único polipeptídeo de 18 a 21.5 kDa. As proteínas não estruturais são: 1) um polipeptídeo de 194 kDa, com motivos conservados de proteínas relacionadas à replicação (Mtr, Hel, RdRp); 2) um polipeptídeo de 19-20 kDa de função desconhecida, com homologia de sequência não significativa para as proteínas conhecidas; 3)

um polipeptídeo de 31-36.5 kDa (MP, suposta proteína do movimento; 4) um peptídeo de 10 a 14 kDa, com propriedades de ligação ao RNA (ADAMS et al., 2004; FAUQUET et al., 2005).

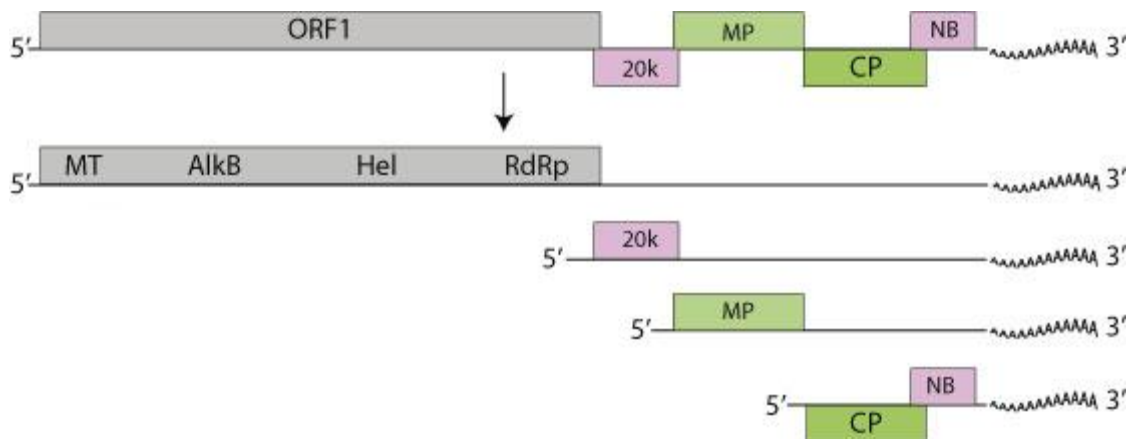


Figura 6. Organização e expressão do genoma da espécie-tipo do gênero *Vitivirus* (*Grapevine virus A*) mostrando relativa posição das ORFs, seus produtos de expressão, e conjuntos de sgRNA. **Mtr**: metiltransferase; **Hel**: helicase; **RdRp**: RNA polimerase dependente de RNA; **20k**: proteína de aproximadamente 20 kDa de função desconhecida; **MP**: suposta proteína do movimento; **CP**: proteína capsial; **NB**: proteína com propriedade de ligação ao ácido nucleio viral. Fonte: ViralZone Expasy, disponível em < http://viralzone.expasy.org/all_by_species/270.html>, acessado em 15 de Fevereiro de 2014.

1.5 Funções das proteínas capsidiais de vírus de plantas

As proteínas capsidiais (CPs) de vírus de plantas são definidas pelos seus papéis estruturais na encapsidação. Entretanto, a encapsidação é somente uma das características de um conjunto de funções e papéis ecológicos desempenhados durante a infecção e disseminação viral (CALLAWAY, 2001; BOL, 2008).

Para a maioria dos vírus de plantas, as proteínas capsidiais também desempenham um papel importante no movimento do vírus através de uma planta infectada, via movimento sistêmico (folha-a-folha via vasculatura) ou ambos movimentos célula-a-célula e sistêmico. (CARRINGTON et al., 1996; GHOSHROY, et al., 1997; LAZAROWITZ; BEACHY, 1999). Poucos vírus de RNA não requerem a proteína capsial para infecção eficiente de uma planta hospedeira. Por exemplo os Umbravírus, nem mesmo codificam uma CP, e são capazes de infectar sistemicamente (RYABOV et al., 1998; RYABOV et al., 1999).

Alguns vírus de plantas adaptaram suas CPs para o transporte via vetores biológicos, incluindo artrópodes, nemátodos e fungos (GRAY, 1996). Outros vírus, podem ter sido vírus de artrópodes e, então, adaptaram suas CPs e outros genes para o transporte e propagação entre plantas (CALLAWAY, 20001).

Em outros vírus, por exemplo os membros dos gêneros *Alfamovirus* e *Iilarvirus* (família *Bromoviridae*), a CP possui um papel adicional, denominado ativação genômica. O RNA genômico não é infeccioso, a menos que algumas CPs ou um transcrito subgenômico da CP são adicionados ao inóculo (BOL; VAN VLOTEN-DOTING; JASPARS, 1971; JASPARS, 1985).

Trabalhos envolvendo as funções das proteínas capsidiais dos vírus *Grapevine virus A* e *Grapevine virus B*, são escassos. Galiakparov e colaboradores (2003), com o objetivo de conduzir uma análise funcional do genoma do *Grapevine virus A* (GVA) (espécie-tipo do gênero *Vitivirus*, família *Alphaflexiviridae*), inseriram mutações em todas as ORFs, e estudaram os efeitos na replicação viral, expressão gênica, sintomas e movimento viral. Conseqüentemente, concluiu-se que a proteína capsidial, além da proteína do movimento (MP), é requerida para o movimento do vírus célula-a-célula, porém, não é requerida para a replicação do GVA.

1.6 Relevância e Justificativa

As proteínas capsidiais (CPs) de vírus de plantas, além do processo de encapsidação, podem desempenhar um conjunto de funções estruturais e papéis ecológicos durante a infecção e disseminação viral. Sabe-se que algumas CPs operam em praticamente todo aspecto da multiplicação e disseminação viral, incluindo assistência na replicação do ácido nucléico viral, movimento célula-a-célula e a longas distâncias, e transporte de plantas infectadas para as não infectadas via vetores biológicos.

De acordo com Galiakparov (2003), as proteínas capsidiais do *Grapevine virus A* (GVA) e *Grapevine virus B* (GVB), além de desempenhar a função de encapsidação, é requerida para o movimento do vírus célula-a-célula, mas não é requerida para a replicação viral. Entretanto, o mecanismo de polimerização das proteínas capsidiais e, também, sua participação no movimento do vírus célula-a-célula é desconhecida.

Considerando a relevância das proteínas capsidiais em diversas funções, e a ausência de dados estruturais das CPs do GVA e GVB na literatura, torna-se importante também,

elucidar as propriedades físico-químicas e estruturais das proteínas. Para tal finalidade, é necessário a elaboração de um de um protocolo de expressão para a obtenção de grandes quantidades de proteínas capsidiais, com alto grau de pureza e solubilidade, pois uma concentração muito baixa de vírus é obtida quando purificados a partir de plantas infectadas. Entretanto, devido ao vírus ser filamentosos e flexuosos, de aproximadamente 700 nm, torna-se inviável a sua utilização em alguns experimentos, como, por exemplo, nos ensaios de cristalização.

Os vírus estão cada vez mais sendo usados na engenharia e nanotecnologia, como ferramentas e blocos de construção para a eletrônica, química e ciências biomédicas (SINGH; GONZALEZ; MANCHESTER, 2006; YOUNG et al, 2008; SOTO; RATNA, 2010). Por exemplo o sistema de expressão da CP do vírus filamentosos flexuosos *Papaya mosaic virus*, que foi utilizado para a engenharia de nanopartículas quiméricas recombinantes, e podem ser utilizados como adjuvante (DENIS et al., 2008, SAVARD et al., 2011) ou como plataforma de vacinas (DENIS et al., 2007, LACASSE et al., 2008). As nanopartículas parecem ser percebidas pelo sistema imune inato, sendo assim, excelentes moléculas imuno-modulatórias para melhorar a vacina da gripe sazonal (SAVARD et al., 2011) ou candidato à vacina da febre tifóide (ACOSTA-RAMIREZ et al., 2008).

Assim, levando em consideração a ampla gama de funções desempenhadas pelas CPs, juntamente com um vasto campo de aplicações, é de grande importância elucidar as propriedades físico-químicas e estruturais das proteínas capsidiais.

2. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal a expressão, purificação e a caracterização estrutural *in silico* das proteínas capsidiais do *Grapevine virus A* e *B*.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar as proteínas capsidiais através da técnica de dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz;
- Caracterizar as proteínas capsidiais através das técnicas de *threading* e *ab initio*, utilizando os programas *I-Tasser*, *Quark* e *Rosetta*;
- Conduzir ensaios preliminares de cristalização.

3. Materiais e Métodos

3.1 Plasmídeos contendo as ORFs codificadoras das proteínas capsidiais

Foi utilizado o plasmídeo pET28a (Novagen) contendo os genes das proteínas capsidiais do *Grapevine virus B* e *Grapevine virus A*, cedidos pelo Prof. Dr. José Osmar Gaspar (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de São José do Rio Preto), previamente sequenciado, proveniente de estudos anteriores (MOREIRA et al., 2004a; MOREIRA et al, 2004b). As ORFs clonadas no vetor foram inseridas utilizando-se as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*.

3.2 Linhagem de bactéria utilizada para expressão das proteínas

A *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL (Novagen), possui cópias extras de genes de tRNA de argU, ileY, leuW. Esses genes codificam tRNAs, que reconhecem códons para arginina (AGA e AGG), isoleucina (AUA) e para leuceína (CUA), respectivamente. Esses tRNAs, frequentemente restringem a tradução heteróloga de proteínas de organismos que possuem genomas ricos em AT. Essa linhagem, tem disponível estes tRNAs, permitindo alto nível de expressão de proteínas, que são fracamente expressas em linhagens convencionais de *E. coli* BL21.

3.3 Transformação dos vetores em células competentes

O vetor recombinante foi transformado em *E. coli*, linhagem TOP 10, para prograpação do plasmídeo, e BL21-RIL para expressão da proteína, utilizando-se 50µL de células competentes e 100 ng do vetor clonado. Essa mistura foi incubada no gelo durante 30 minutos e, então, submetida ao choque térmico, a 42 °C, por 30 segundos e, em seguida, incubada durante 2 minutos no gelo. Após o choque térmico, foram adicionados 250 µL de meio líquido SOC (meio SOB + 200 mM de glicose) e as bactérias foram submetidas à regeneração (1 hora a 37 °C, com agitação a 250 rpm). Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo (LB + kanamicina 50 µg/mL), e as colônias foram testadas para comprovar a existência do inserto através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). As colônias que apresentaram o inserto foram inoculadas em tubos

contendo 5 mL de meio líquido seletivo (LB + 50 µg/ml de Kanamicina), sob agitação e aeração constantes a 37 °C, para posterior extração do DNA plasmidial.

3.4 Confeção de oligonucleotídeos para adicionar o sítio de clivagem para a TEV protease

Novos oligonucleotídeos *forward* foram desenhados para adicionar o sítio de clivagem para a TEV (*Tobacco Etch Virus*) protease entre as proteínas-alvo e a cauda de histidina, com o objetivo de removê-la após a purificação. Foi adicionado aos oligonucleotídeos do GVA e GVB, a sequência do sítio de clivagem da TEV (“GGT GAA AAT TTA TAT TTT CAA”) e uma glicina (“GGT”) entre a proteína alvo e o sítio de clivagem para conferir mobilidade e manter o sítio exposto, com o objetivo de aumentar a eficiência da enzima. O sítio ótimo de reconhecimento para esta enzima é a sequência Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser) (ENLYFQ(G/S)) e a clivagem ocorre entre os resíduos Gln e Gly/Ser. Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação podem ser visualizados no **quadro 1** e o esquema da construção das proteínas capsidiais na **figura 7**.

Quadro 1. Oligonucleotídeos confeccionados utilizados na reação em cadeia da polimerase. Sítio de clivagem para a BamHI (vermelho), sítio de clivagem para a TEV protease (verde) e o aminoácido glicina (azul).

Proteína capsidial do GVA
<p>Oligonucleotídeo <i>forward</i> – GVA fwd</p> <p>ATA GAA TCC GGT GAA AAT TTA TAT TTT CAA GGT GCA CAC TAC GCC AAG AGG</p> <p><i>BamHI</i> TEV protease Gly</p> <p>Oligonucleotídeo <i>reverse</i> – GVA rev</p> <p>ATA AAG CTT CTA TAT CTC GAC AGC CTG</p> <p><i>HindIII</i></p>
Proteína capsidial do GVB
<p>Oligonucleotídeo <i>forward</i> – GVB fwd</p> <p>ATA GGA TCC GGT GAA AAT TTA TAT TTT CAA GGT GAA AAT ATA TCC CGG ATG</p> <p><i>BamHI</i> TEV protease Gly</p> <p>Oligonucleotídeo <i>reverse</i> – GVB rev</p> <p>TAT AAG CTT CTA TAT CTC GAC AGA CTG</p> <p><i>HindIII</i></p>



Figura 7. Esquema da construção das proteínas capsidiais mostrando uma cauda de histidina N-terminal, sítio de clivagem para a TEV protease (em preto), o aminoácido glicina, e a proteína alvo (CP) (do aminoácido 2 ao 198 para GVAcp e do 2 ao 197 para GVBcp).

3.5 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As ORFs codificadoras das proteínas capsidiais, dos resíduos de aminoácidos 2 ao 198 (GVAcp) e 2 ao 197 (GVBcp), contendo sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *HindIII*, e sítio de clivagem para a TEV protease (utilizada para a remoção da cauda de histidina), foram amplificadas utilizando a *Taq Polimerase* (Fermentas), de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante, e adaptada para as temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos. Posteriormente, os produtos da PCR de 633 pb (GVAcp) e 630 pb (GVBcp), foram analisados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio, visualizando-se sob luz ultravioleta. O programa utilizado para a amplificação e as concentrações finais da reação de PCR, podem ser visualizadas na **figura 8** e **quadro 2**, respectivamente.

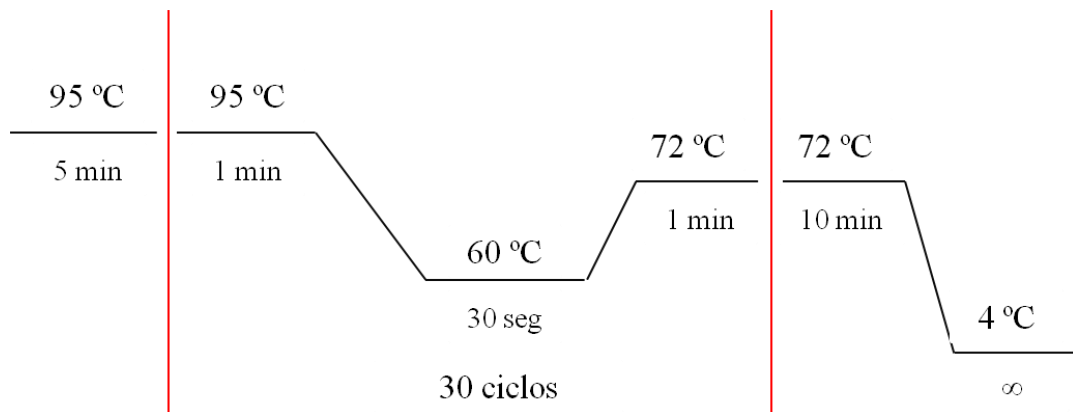


Figura 8. Ciclagem da temperatura utilizada na amplificação dos insertos. Inicialmente, o DNA foi desnaturado por 5 minutos a 95 °C, posteriormente a amplificação foi realizada em 30 ciclos: desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento dos primers a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Ao final dos 30 ciclos, a amostra foi submetida a uma extensão adicional a 72 °C por 10 minutos e, por fim, foi resfriada a 4 °C até ser utilizada.

Quadro 2. Concentração final dos reagentes utilizados na amplificação dos insertos pela reação em cadeia da polimerase.

Reagentes	Concentração final
10x Taq Buffer	
dNTPs	0.2 mM
Forward primer	0.2 μ M
Reverse primer	0.2 μ M
MgCl ₂	4 mM
DNA	100 ng
Taq polimerase	1.25 unidades
Água	q.s.p. 50 μ l
50 μ l	

3.6 Corte enzimático

Os fragmentos amplificados e o vetor pET28a foram digeridos, utilizando as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII* (*New England BioLabs*). Primeiramente, foi realizada uma digestão utilizando a enzima *HindIII*, por 2 horas, a 37 °C e inativada a 65 °C, durante 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado a enzima *BamHI*, as condições ideais para a sua atividade foram ajustadas, e a reação foi incubada por mais 2 horas, a 37 °C.

3.7 Purificação dos vetores e dos insertos após o corte enzimático

Os fragmentos e vetor pET28a, cortados enzimaticamente, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. A banda referente ao vetor e o fragmento foram excisados do gel e purificados utilizando o kit *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante.

3.8 Reação de ligação dos insertos nos vetores

Após a purificação do plasmídeo digerido, foi utilizada a T4 DNA Ligase (Fermentas), seguindo as orientações do fabricante. A reação foi incubada a 16 °C, durante 16 horas. Para

tal reação, a proporção de 3:1 (inserto/vetor) usada foi calculada de acordo com a equação sugerida pelo fabricante:

$$I = \frac{tI \times P}{tV}$$

I = inserto em ng

tI = tamanho do inserto em pb

P = plasmídeo linearizado (100 ng)

tV = tamanho do vetor em pb

3.9 Extração dos plasmídeos recombinantes

Os plasmídeos propagados em *E. coli* (linhagem TOP 10), foram extraídos utilizando-se o kit de extração de plasmídeos *GeneJet Plasmid MiniPrep kit*, a partir de 5 mL de cultura de bactérias cultivadas durante 16 horas, seguindo-se as recomendações do fabricante. No passo final, o plasmídeo foi eluído em 50 uL de tampão TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) e estocado a -20 °C.

3.10 Transformação do plasmídeo recombinante em células de linhagem de expressão

Após a propagação dos plasmídeos recombinantes em *E. coli* (TOP 10), os plasmídeos foram extraídos, purificados e transformados em *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus-RIL, de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.

3.11 Expressão e purificação da TEV protease

O plasmídeo pRK793 foi cedido pelo Prof. Dr. Christian Betzel (Universität Hamburg, Alemanha) e foi utilizado para a produção da TEV protease mutante S219V, conduzida em nosso laboratório. O plasmídeo foi transformado em BL21 CodonPlus-RIL, a protease foi expressa e purificada de acordo com o protocolo descrito por Tropeae, Cherry e Waugh (2009).

3.12 Testes de expressão das proteínas capsidiais

As colônias positivas selecionadas foram inoculadas em meio LB, incubadas durante 16 horas, a 30 °C, com os antibióticos de seleção kanamicina e cloranfenicol (concentração final de 50 µg/mL cada), com agitação de 200 rpm. Posteriormente, vinte mililitros do pré-inóculo foi utilizado para inocular 2 L de meio de cultura Luria Bertani, contendo a mesma concentração final de antibióticos de seleção, que foi incubado a 30 °C, a 200 rpm. Posteriormente, a temperatura foi abaixada até que o meio de cultura atingisse 18 °C. A expressão da proteína foi induzida na fase logarítmica (DO_{600nm} 0,4) do crescimento bacteriano, através da adição de 0,2 mM de IPTG (isopropil- β -tiogalactopiranosídeo), a 18 °C, durante 16 horas.

Também, foi utilizado o meio de cultura autoindutivo descrito por Studier (2005), a 18° C. Foi utilizado o meio ZYM-5052, que consiste em triptona e extrato de levedura (ZY), M (25 mM Na_2HPO_4 , 25 mM KH_2PO_4 , 50 mM NH_4Cl , 5 mM Na_2SO_4 , 2mM $MgSO_4$) e 5052 (0,5% glicerol, 0,05% de glicose e 0,2% de α -lactose). Esta técnica permite uma varredura eficiente de muitos clones em paralelo para expressão e solubilidade, a medida que as culturas têm que ser inoculadas e crescer até a saturação, tendo como produto final muito mais proteínas que a obtida pela indução convencional com IPTG.

Concomitantemente, foi utilizado o método descrito por Oganessian *et al.* (2007), a 18 °C, que consiste na adição de 0,5 M de NaCl ou Sorbitol ao meio de cultura Luria Bertani, acrescidos de 1 mM de Betaína. Segundo o autor, as bactérias adaptam à alta pressão osmótica externa, acumulando pequenos compostos orgânicos conhecidos como osmólitos. Estes osmólitos, agem como chaperonas químicas, aumentando a estabilidade de proteínas nativas e, possivelmente, ajudando no enovelamento de polipetídeos não enovelados. Além disso, a exposição das bactérias ao choque térmico dispara a expressão de proteínas *heat-shock*, muitas das quais agem como cheperonas e contribuem para o enovelamento, e rompem agregados de proteínas ou previnem a agregação.

3.13 Purificação das proteínas capsidiais sob condição desnaturante

Sob condições desnaturantes, a proteína foi solubilizada do corpo de inclusão (expressa a 37 °C, por 4 horas), utilizando o seguinte tampão: 8 M Uréia, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 10mM 2-mercaptoetanol, durante duas horas a temperatura ambiente. A resina de níquel (Ni-NTA) (GE Healthcare Life Sciences) foi equilibrada utilizando o mesmo tampão de solubilização e a solução foi centrifugada a 34.540 x g, por 1 hora e o sobrenadante passado na coluna. A lavagem da resina para a remoção de contaminantes adsorvidos inespecificamente foi realizada utilizando o tampão descrito acima com pH 6.3 e outra lavagem com pH 6.0. As proteínas foram eluídas utilizando o mesmo tampão com pH 5.9.

3.14 Purificação das proteínas capsidiais sob condição nativa

Após a expressão das proteínas capsidiais a 18 °C, as células foram centrifugadas a 6000 x g, durante 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet de bactérias foi ressuspensionado em PBS 1X e centrifugado novamente por 10 minutos, a 4 °C, para eliminar restos de meio de cultura. Em seguida, as células foram ressuspensionadas em tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl, 40 mM de imidazol, 10% de glicerol, 1 mM de PMSF, pH 7.4) e foram intermitentemente sonicadas no gelo durante 10 segundos, com 10 segundos de descanso para o resfriamento da amostra. O tempo total de sonicação foi de 2 minutos. O lisado celular foi centrifugado a 34.540 x g, por 1 hora, a 4 °C, e foi passado na coluna com resina de níquel (Ni-NTA), previamente equilibrada com o tampão de lise para que as proteínas fossem adsorvidas. Após a adsorção, a resina foi lavada utilizando gradiente de imidazol (10 mM a 80 mM) no seguinte tampão: 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10% glicerol e 1 mM PMSF, pH 7.4, com o objetivo de remover contaminantes adsorvidos inespecificamente. Por fim, as proteínas foram eluídas utilizando tampão de eluição (20 mM fosfato de sódio dibásico, 500 mM NaCl, 250 mM imidazol, 10% glicerol e 1 mM PMSF, pH 7.4).

Logo após, utilizando-se o *Äkta Purifier* e a coluna (HiPrep 26/10), e o tampão da amostra foi trocado para 10 mM Tris HCl pH 7.4, 300 mM de NaCl, a fim de remover o glicerol e o imidazol. Nessa condição, o experimento de clivagem da cauda de histidina foi conduzido, adicionando-se TEV protease à solução de proteínas capsidiais, que posteriormente foi passada na coluna contendo resina de níquel para a remoção da protease e da cauda de histidina.

Por último, uma cromatografia de exclusão molecular foi conduzida, com o objetivo de remover proteínas capsidiais agregadas e trocar o tampão da amostra para 10 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, utilizando-se a coluna Superdex 75 10/300 GL (*GE Healthcare Life Sciences*). Este método de purificação se baseia na massa molecular das proteínas, em que as proteínas que possuem maior massa molecular são eluídas primeiro.

3.15 Análise das proteínas purificadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras provenientes das etapas de purificação e do teste de expressão foram analisadas através da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). As proteínas foram desnaturadas por 3 minutos, a 100 °C em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo 4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-Mercaptoetanol e 1 mM de azul de bromofenol). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a 16.000 x g e 10 µL do sobrenadante de cada amostra aplicado no gel. Os géis foram fixados e corados em mistura contendo metanol, água, ácido acético (5:4:1) e *Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,25%, durante 1 hora e descorados com metanol e água (1:1), durante 1 hora.

3.16 Western blotting

Alíquotas contendo proteína recombinante purificada foram homogeneizadas com tampão de amostra (1:1), aquecidas a 100 °C, por 5 minutos, para a desnaturação proteica e aplicadas em gel SDS-PAGE 12%. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, operando sob voltagem constante (100V), durante 1 hora.

O tampão de transferência utilizado foi o Tris-Glicina (0,025 M de Tris, 0,192 M de Glicina), contendo 20% de metanol. A membrana foi incubada em tampão de bloqueio (PBS pH 7.4, acrescido de 0,1% de Tween 20 e 10% de BSA). Posteriormente, a membrana foi incubada em tampão de bloqueio contendo anticorpo monoclonal Anti-Polihistidina (Sigma Aldrich) produzido em camundongo, na diluição de 1:1000. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes durante 15 minutos com tampão PBS, contendo 0,3% de Tween 20, para a remoção de anticorpos não adsorvidos. Prosseguimos, então, com a incubação da membrana com o anticorpo secundário Anti-Mouse, marcado com peroxidase, na diluição de 1:3000, durante 1 hora em tampão de bloqueio. Após três lavagens com PBS-T para a retirada de anticorpos não adsorvidos, foi adicionado o substrato BCIP/NBT (*5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate/nitro-blue tetrazolium*) para a revelação (cor púrpura).

3.17 Dicroísmo Circular

A espectroscopia de luz polarizada ou dicroísmo circular (CD) é um método analítico amplamente utilizado para auxiliar a biologia estrutural na determinação da composição de estruturas secundárias de proteínas e peptídeos. A origem dos espectros destas macromoléculas na região do ultravioleta próximo (180 a 250 nm) são predominantemente originados por transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos amida, os quais são influenciados pela geometria da cadeia peptídica, sendo os espectros, reflexos dos diferentes tipos de estruturas secundárias descritas pelos ângulos diedros ϕ e ψ (**Figura 9A e 9B**).

Quando uma molécula é opticamente ativa, ela absorve luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, com intensidades diferentes. Este efeito é denominado de Dicroísmo Circular (CD). Isto se deve à diferença de índices de refração das duas formas de luz, o que resulta na rotação do plano de polarização da luz. A intensidade e energia dessas transições dependem dos ângulos diedros ϕ e ψ (i.e., da estrutura secundária). (**Figura 9A**).

O espectro de CD de uma proteína com estrutura em hélice alfa, o acoplamento de éxitons das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ produzem uma banda positiva em 192 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), negativa em 209 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e negativa em 222 nm, deslocada para o vermelho (red shifted) ($n \rightarrow \pi^*$). Quando a estrutura secundária é aleatória ou *random coil* (RC), o espectro de CD apresenta banda positiva em 212 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e banda negativa em 195 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Já no caso da estrutura ser folha beta, o espectro de CD apresenta banda negativa em 218 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e positiva em 196 nm ($n \rightarrow \pi^*$) (**Figura 9B**).

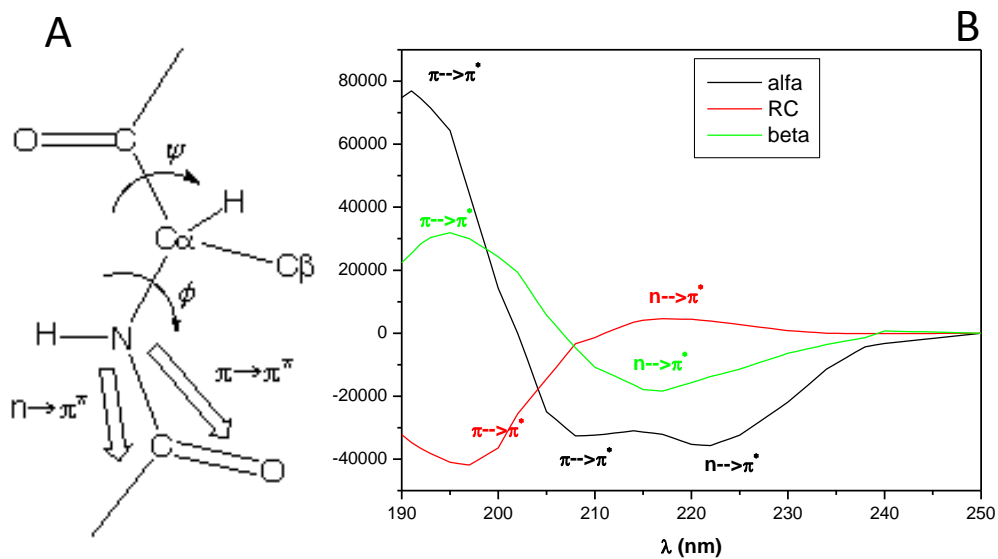


Figura 9. (A) Diagrama de ligação peptídica mostrando a orientação das transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (setas grossas). (B) Espectros padrões de CD correspondentes a configurações hélice alfa (em preto), folha beta (em verde) e estrutura aleatória ou random coil (em vermelho).

Como consequência destas propriedades dos espectros, foram desenvolvidos métodos de análises dos espectros de CD, levando em consideração as contribuições espectrais dos diferentes tipos de estruturas secundárias presentes nas proteínas fornecendo, desta forma, informações sobre a estrutura secundária das mesmas.

Os espectros de referência utilizando correspondentes aos espectros de estruturas puramente compostas de alfa hélice, folha beta, estrutura aleatória ou derivados de proteínas cuja estrutura terciária é conhecida (proteínas cujas estruturas cristalinas foram determinadas), foram desenvolvidos um grande número de algoritmos empíricos que assumem a independência linear na aditividade dos espectros primários de estruturas secundárias no espectro final da proteína (GREENFIELD, 1969; BRAHMS, 1980; JOHNSON, 1999; SREERAMA, 2000; LEES, 2006).

O princípio básico envolvido na análise dos espectros de CD de proteínas, e utilizado no cálculo da fração de estruturas secundárias, é que o espectro de CD da proteína, θ_λ , pode ser expresso como uma combinação linear de espectros puros de estruturas secundárias:

$$\theta_{\lambda} = \sum f_k \Theta_{k,\lambda}$$

Onde f_k é a fração de estrutura secundária e $\Theta_{k,\lambda}$ é o espectro padrão da estrutura secundária k .

Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) foram obtidos com um espectropolarímetro Jasco 710, com cubeta de 1 cm de caminho óptico, termoestatizada a 25 °C, utilizando uma amostra de concentração 0,5 mg/mL em tampão 10 mM de Fosfato de sódio pH 7.4, 100 mM de NaCl. Cada espectro representa a média de 5 varreduras realizadas entre 190 e 250 nm, com passos de 0,2 nm, na velocidade de 50 nm/min, e largura de banda de 1 nm. A linha de base foi corrigida subtraindo o espectro da solução tampão obtido em condições idênticas. As intensidades dos espectros θ em mDeg. foram convertidos para unidades de elipticidade [Φ] em deg cm² decagramme⁻¹. A fração de estruturas secundárias foi analisada utilizando o programa de deconvolução espectral CDPro (SREERAMA & WOODY, 2000).

3.18 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O aparelho Spectroscatter 201 (*Molecular Dimensions*, UK) é um instrumento que pode ser usado para determinar o perfil da distribuição do tamanho de partículas pequenas em suspensão ou polímeros em solução. Além disso, sabe-se que o sucesso da cristalização depende de vários fatores, entre eles, uma solução protéica homogênea. Dessa forma, a técnica de espalhamento dinâmico de luz também pode ser empregada para a seleção da solução protéica monodispersa candidata à cristalização.

Espalhamento dinâmico de luz, também conhecido como espectroscopia de correlação de fóton ou espectroscopia de espalhamento de luz quasi-elástica, é a técnica para medir o coeficiente de difusão translacional de uma macromolécula através do movimento aleatório (Browniano) que as moléculas sofrem na solução (FERRÉ-D' AMARÉ et al, 1997).

O espalhamento da luz monocromática, ocasionado pelo movimento das partículas, mostrará a flutuação de intensidades que corresponde às partículas em movimento. Assim, o conhecimento dessas intensidades, permite obter informações a respeito do coeficiente de difusão e dimensões das macromoléculas (SANTOS; CASTANHO, 1996).

A técnica de DLS permite determinar a função de autocorrelação dos fótons. A função de autocorrelação de um sinal para a intensidade de luz espalhada é utilizada para descrever a correlação entre a intensidade medida no tempo $t = 0$ e a mesma algum tempo após. A análise

do decaimento da função de autocorrelação do sinal de luz espalhada pode dar informação quantitativa sobre o comportamento das moléculas em solução. Cada população monodispersa de moléculas produz uma única curva de decaimento exponencial e uma mistura de mais de uma população de partículas produzem uma soma de exponenciais.

Nos experimentos de DLS, o raio (R) da partícula é inferido a partir do coeficiente de difusão (D) e pela equação de Stokes Einstein:

$$D = kT / 6\pi\eta rh$$

onde: r_h é o raio hidrodinâmico, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em Kelvin e η é a viscosidade do solvente.

Na prática, as macromoléculas em solução não são esféricas e o raio calculado da forma citada acima, a partir do coeficiente de difusão das partículas, oferece uma estimativa do tamanho aparente da partícula hidratada/solvatada designada pela terminologia “raio hidrodinâmico” (SANTOS; CASTANHO, 1996).

3.19 Predição da estrutura tridimensional das proteínas capsidiais

Foram realizadas buscas por homologia e similaridade de sequência primária (BLAST), utilizando o banco de dados PDB. Concomitantemente, foram utilizados os programas de predição de estrutura *I-Tasser*, *Quark* e *Rosetta*. Para a validação dos modelos, foram utilizados os programas *RAMPAGE* (LOVELL et al, 2002), *ProSA-web* (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN & SIPPL, 2007), *TM-align* (ZHANG & SKOLNICK, 2005) e o programa *PyMol* (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.1.0, Schrödinger, LLC.*) utilizado para a visualização e análises gráficas das estruturas das proteínas.

O *I-Tasser* (*Iterative Threading ASSEMBly Refinement*) (ROY et al., 2010; ZHANG, 2008) é uma plataforma para a predição de estrutura e função de proteínas. A predição de estrutura tridimensional é realizada utilizando-se a abordagem de *threading*. Todo o processo é realizado em três etapas:

Primeiramente, a partir de uma sequência de aminoácidos, o servidor tenta recuperar templates de proteína de enovelamentos similares (ou estruturas secundárias super-conservadas) da biblioteca PDB pelo servidor LOMETS, uma abordagem meta-threading localmente instalada.

No Segundo passo, os fragmentos excisados dos templates PDB são remontados em modelos completos por simulações Monte Carlo com regiões desalinhadas (principalmente loops) construídas por modelagem *ab initio*. Em casos onde nenhum template apropriado é identificado por LOMETS, I-Tasser construirá toda estrutura por modelagem *ab initio*. Os estados de baixa energia livre são identificados pelo SPICKER e os centróides desses “clusters” são selecionados para a próxima etapa.

No terceiro passo, a simulação de montagem de fragmento é realizada novamente começando pelos centróides dos “clusters”, onde as restrições espaciais coletadas por ambos os templates LOMETS e estruturas PDB pelo *TM-align* são usados para guiar as simulações. O Propósito da segunda iteração é remover o choque estérico assim como refinar a topologia global dos centróides dos “clusters”. As estruturas geradas na segunda simulação são então agrupadas e as com menor energia são selecionadas. Os modelos atômicos completos finais são obtidos pelo REMO que constrói os detalhes atômicos das estruturas selecionadas através da otimização da energia das ligações de hidrogênio.

Os modelos gerados pelo I-Tasser foram selecionados baseado no *C-score* (pontuação de confiança) para estimar a qualidade dos modelos. O *C-score* está tipicamente na gama de -5.2, onde pontuações mais altas significam um modelo com alta confiança. Para selecionar os 10 melhores moldes usados na predição dos modelos pelo I-Tasser, é utilizado o *Z-score*, que é o número de desvios padrão. Assim, um *Z-score* acima de 1 representa um bom alinhamento (dado acima da média).

QUARK é um método de predição de estrutura *ab initio* baseado na web que foca no design do campo de força e no mecanismo de busca que usa um modelo semi reduzido para representar resíduos de proteínas pelo total de átomos da cadeia principal e o centro de massa da cadeia lateral. Inicialmente, *QUARK* prediz uma ampla gama de características estruturais cuidadosamente selecionadas usando rede neural para a sequência de entrada. Baseado na idéia do Rosetta e I-Tasser, o enovelamento global é criado por simulações Monte Carlo montando fragmentos pequenos gerados por *threading* através das bibliotecas de templates. Entretanto, os fragmentos possuem constantemente múltiplos tamanhos que variam de 1 a 20 resíduos. O método de predição *QUARK ab initio* pode ser dividido em três etapas principais: 1) Predições de características múltiplas e geração de fragmento a partir de uma sequência de entrada; 2) Construções estruturais utilizando-se simulações Monte Carlo baseado no modelo de proteína semi reduzido; 3) Agrupamento de estruturas e refinamento atômico completo (ZHANG; XU, 2012). Como resultado, o programa utiliza o *TM-align* (item 3.20) para validar os modelos gerados.

O programa *Rosetta* utiliza um processo automático de predição de estrutura que constrói um modelo para uma sequência de proteína inteira se a homologia de sequência para proteínas de estrutura conhecida está disponível ou não. A sequência é quebrada em domínios, e modelos para domínios com homologia de sequência para proteínas de estrutura conhecida, são gerados usando modelagem comparativa, onde modelos para domínios sem tal homologia, são construídos utilizando-se o método *ab initio*. Rosetta gera bibliotecas de fragmentos de três e nove resíduos que correspondem a conformações locais vistas no PDB, e então monta os modelos por inserção de fragmento usando uma função de pontuação que favorece características de proteínas. As estruturas geradas são agrupadas baseado no RMSD do carbono alfa. Então, foram gerados 10.000 modelos, e o RMSD utilizado foi de 15 Å, pois com um “cutoff” menor, não foi observado a formação de *clusters* de estruturas. O modelo de menor energia do *cluster* contendo o maior número de modelos foi selecionado (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004; KAUFMANN, 2010).

O RMSD ou desvio quadrático médio, é frequentemente usado para medir diferenças entre valores preditos por um modelo ou um valor observado. Basicamente, representa a amostra do desvio padrão das diferenças entre valores preditos e valores observados.

3.20 Validação dos modelos gerados

O *ProSA-web* fornece uma interface para o programa *ProSA* que é frequentemente empregado na validação de estrutura de proteínas. O programa calcula uma qualidade global para uma estrutura específica selecionada. Se a pontuação está fora da gama característica de proteínas nativas, a estrutura provavelmente contém erros. Um *Z-score* também é retornado, e indica a qualidade global do modelo. Esta pontuação é plotada juntamente com os *Z-scores* de todas as cadeias de proteínas determinadas experimentalmente no PDB (raios-X, NMR), e são distinguidas por diferentes cores. Esta plotagem pode ser usada para checar se o *Z-score* da estrutura selecionada está dentro da gama de pontuações tipicamente encontrada para proteínas nativas de tamanhos similares (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN & SIPPL, 2007).

O *TM-align* é um algoritmo altamente otimizado para comparação e alinhamento de estrutura de proteína. Para duas estruturas de equivalência desconhecida, o programa, primeiramente, gera um alinhamento resíduo a resíduo baseado na similaridade estrutural. Uma sobreposição das duas estruturas e o valor do *TM-score* que mede a semelhança estrutural serão retornados. Em geral, um *TM-score* menor que 0.2 indica que não há

semelhança entre as estruturas; um *TM-score* maior que 0.5 significa que as estruturas compartilham o mesmo enovelamento SCOP/CATH (ZHANG & SKOLNICK, 2005).

O *RAMPAGE* (LOVELL et al, 2002) é um programa para gerar gráficos de Ramachandran. Descreve as rotações da cadeia principal de polipeptídeo em torno das ligações entre N-C α (chamada Phi, ϕ) e C α -C (chamada Psi, ψ). O gráfico de ramachandran fornece um modo simples para visualizar a distribuição da torção dos ângulos de uma estrutura de proteína (RAMACHANDRAN, RAMAKRISHNAN, SASISEKHARAN, 1963). Também fornece uma visão geral dos valores dos ângulos das regiões permitidas e não permitidas, consistindo de um importante indicador da qualidade de estruturas tridimensionais.

3.21 Ensaios de cristalização

Todos os métodos de cristalização envolvem uma transição de fase, na qual a proteína que está na solução no início do experimento, posteriormente, sai da solução para formar cristais, quando a solução é trazida para um estado de supersaturação. Uma vez que o núcleo está formado, a concentração de proteína na solução irá diminuir, conduzindo o sistema para a zona metaestável, onde o crescimento do cristal deve ocorrer sem a formação de mais núcleos (BERGFORS, 1999).

Na técnica da difusão de vapor, uma mistura de solução de proteína e agentes de cristalização (gota) são colocados em um poço que contém um reservatório com a solução de cristalização em uma maior concentração que a gota. Neste sistema fechado, a água irá difundir por vapor, da gota para a solução do reservatório, aumentando a concentração da proteína e dos agentes de cristalização na gota. Na técnica da gota pendurada, a gota é colocado em uma lamínula siliconizada acima do reservatório. Já na técnica da gota sentada, a gota é colocada em uma plataforma do reservatório, que posteriormente é selado com um adesivo transparente.

A priori, utilizamos o kit PCT (*Pre-Crystallization Test*) para determinar as concentrações otimizadas de proteínas para os screenings de cristalização. Amostras altamente concentradas resultam em precipitados amorfos, enquanto que amostras diluídas produzem gotas transparentes. Precipitados amorfos e gotas transparentes são evitados mudando a concentração de proteína conformemente.

Os quatro reagents do kit PCT usados para avaliar a concentração de proteína para os ensaios de cristalização foram:

- 1) Reagente A1: 0.1M de Tris HCl pH 8.5, 2.0M de Sulfato de amônio
- 2) Reagente B1: 0.1M de Tris HCl pH 8.5, 1.0M de Sulfato de amônio
- 3) Reagente A2: 0.1M de Tris HCl pH 8.5, 0.2M de Cloreto de magnésio hexahidratado, 30% volume/volume de Polietilenoglicol 4,000
- 4) Reagente B2: 0.1M de Tris HCl pH 8.5, 0.2M Cloreto de magnésio hexahidratado, 15% volume/volume de Polietilenoglicol 4,000

Os ensaios de cristalização foram conduzidos utilizando-se o método da gota sentada (com o auxílio do robô de cristalização *HoneyBee*) e o método da gota pendurada, que foi executado manualmente.

Os kits comerciais *MORPHEUS (Molecular Dimensions)*, *PACT suite II (Qiagen)*, *JSCG+ (Qiagen)*, foram utilizados nos ensaios conduzidos utilizando-se o método da gota sentada, na proporção de 0,5 µl/0,5 µl e 0,7 µl/0,3 µl (proteína/precipitante). Para os ensaios conduzidos utilizando-se o método da gota pendurada, foram usados os kits de cristalização da *Hamptom Research*, *CrystalScreen I*, *CrystalScreen II*, *CrystalScreen Lite*, *SaltRX I e II* e *PEG Ion*, na proporção de 1 µl/1 µl (proteína/precipitante).

4. Resultados

4.1 Expressão e purificação da TEV protease

Tradicionalmente, as enzimas comumente usadas para clivar as proteínas de fusão são: Fator Xa, enteroquinase (enteropeptidase) e trombina. Entretanto, tem sido observado que todas essas proteases podem clivar proteínas em outros locais além do sítio alvo designado (CHOI et al., 2001; JENNY; MANN; LUNDBLAD, 2003).

A utilização da TEV protease foi adotada pois sua especificidade é muito mais rigorosa que as outras enzimas citadas acima. Além de ser facilmente produzida e purificada em larga escala, a TEV protease possui um perfil de atividade relativamente fixo em valores de pH entre 4 e 9. É cinquenta por cento ativa em 0.5 M de NaCl, assim como na ausência de sal. É maximamente ativa a 34 °C, porém é aconselhado conduzir a reação de digestão à temperatura ambiente (20 °C) ou 4 °C. A atividade da enzima é aproximadamente três vezes maior a 20 °C que a 4 °C (NALLAMSETTY et al., 2004). A enzima possui uma grande tolerância a uma gama de tampões, incluindo fostafo, MES (ácido 2-morfolinoetanosulfônico monoidratado) e acetato, e não é afetada pela adição de glicerol ou sorbitol (até 40%). A enzima é afetada pela adição de alguns detergentes (MOHANTY et al., 2003; LUNDBACK et al., 2008).

A TEV protease foi produzida em nosso laboratório, com o objetivo de remover a cauda de histidina das proteínas capsidiais após a purificação, para posteriormente serem utilizadas nos ensaios de cristalização. O resultado da expressão e purificação da TEV protease pode ser visualizado na **figura 10**.

A fim de estabelecermos uma proporção ideal de TEV protease em relação a proteína capsidial para removermos cem por cento da cauda de histidina, realizamos testes de clivagem utilizando uma proporção de 1:100, 1:50 e 1:25 (protease/proteína capsidial). Nas proporções citadas, não foi obtido cem por cento de remoção da cauda de histidina das proteínas (**Figura 11**), assim passamos a utilizar a proporção de 1:10 (**Figura 12**).

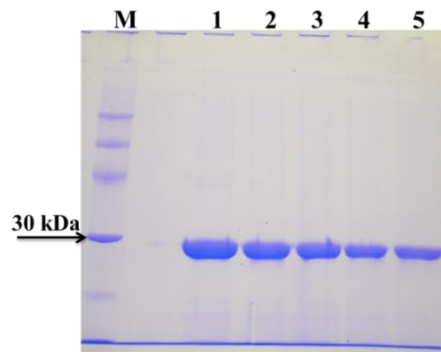


Figura 10. SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação da TEV protease. **M:** marcador de massa molecular; **1 a 5:** TEV protease concentrada a 2,9; 2,0; 1,4; 1 e 0,9 mg/mL, respectivamente.

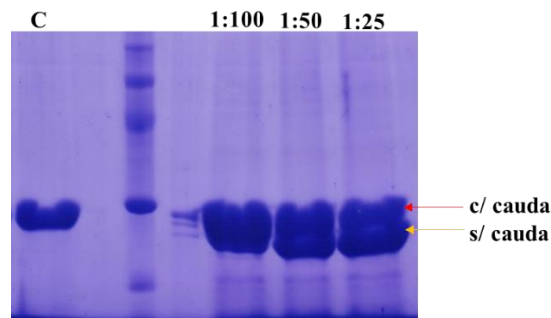


Figura 11. Teste de clivagem da cauda de histidina da proteína capsidial do GVA. **M:** marcador de massa molecular; **C:** proteína concentrada para aproximadamente 5 mg/mL (controle); **1:100** - proporção de 1:100 utilizada (protease /proteína) na reação de clivagem; **1:50** - proporção de 1:50 utilizada (protease/proteína) na reação de clivagem; **1:25** - proporção de 1:25 utilizada (protease/proteína) na reação de clivagem. Seta vermelha e seta laranja indicam proteína com e sem cauda de histidina após o teste de clivagem, respectivamente.

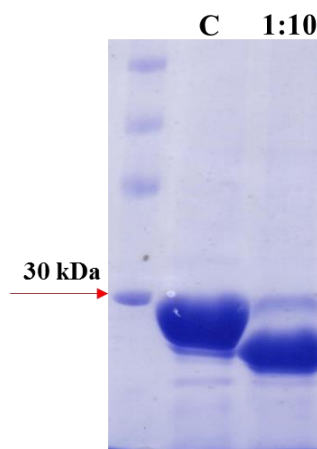


Figura 12. SDS-PAGE 12% mostrando o resultado do experimento de clivagem da cauda de histidina da proteína GVBcp. Utilizando-se a proporção de 1:10 (protease/proteína) foi possível remover cem por cento das caudas de histidina das proteínas. **C:** GVBcp concentrada para 5 mg/mL usada como controle. **1:10** : proporção de 1:10 utilizada na reação de clivagem.

4.2 Resultados da proteína capsial do GVB

4.2.1 Clonagem da proteína capsial no vetor pET28a

Novos oligonucleotídeos foram desenhados para inserir o sítio de clivagem para a TEV protease na proteína GVB, e o fragmento que seria clonado foi amplificado a partir do vetor pET28a cedido pelo Prof. Dr. José Osmar Gaspar, e analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, visualizando sob luz ultravioleta (**Figura 13**). O produto amplificado foi excisado, extraído do gel e purificado.

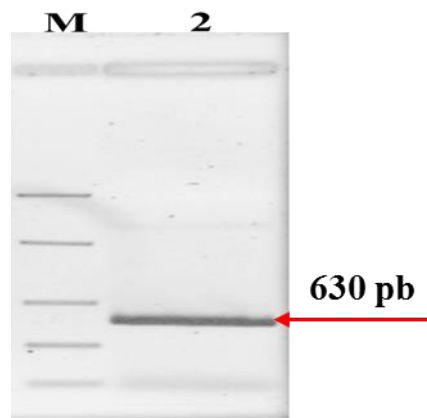


Figura 13. Gel de agarose a 1% mostrando o resultado da amplificação da ORF que codifica a proteína capsial do GVB. **M:** marcador molecular *FastRuler Middle Range DNA ladder* (Fermentas); **2:** banda do produto da PCR amplificado (630 pb), referente à ORF codificadora da proteína capsial do GVB (contendo cauda de histidina e sítio de clivagem para a TEV protease).

Após a amplificação do fragmento, o mesmo e o vetor pET28a foram submetidos ao corte enzimático, utilizando-se as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*. O fragmento foi purificado utilizando o kit *PCR Cleanup* (Qiagen) e o vetor foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% (**Figura 14**), excisado, purificado, e defosforilado utilizando-se a enzima fosfatase alcalina *FastAP* (Fermentas).

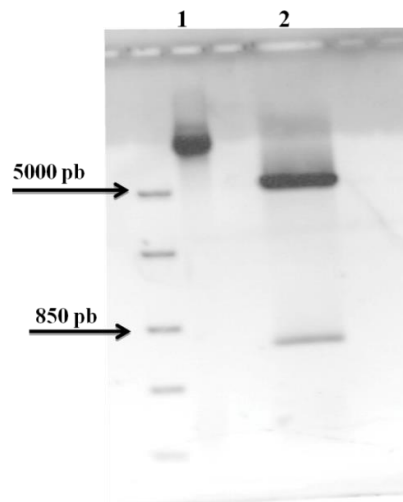


Figura 14. Gel de agarose a 1,0% mostrando o corte enzimático do plasmídeo pET28a. **1:** pET28a contendo inserto (usado como controle não digerido); **2:** pET28a linearizado e digerido (banda mais forte) e o fragmento liberado (banda mais fraca), após o corte enzimático.

O fragmento e o vetor linearizado foram purificados após o corte enzimático, quantificados e usados na reação de ligação na proporção de 3:1 (inserto/vetor). O fragmento foi ligado no vetor, utilizando-se a *T4 DNA Ligase* (*Fermentas*), a 16 °C, durante 16 horas. O produto da reação de ligação foi transformado em *E. coli* DH5 α e 100 μ l da reação de transformação foi plaqueada em meio de cultura sólido, contendo kanamicina para a seleção do plasmídeo recombinante. Após a incubação das placas a 37 °C, algumas colônias foram selecionadas, e a técnica da reação em cadeia da polimerase foi conduzida para verificar se elas possuíam os plasmídeos transformados. O produto da PCR foi analisado através da eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (**Figura 15**).

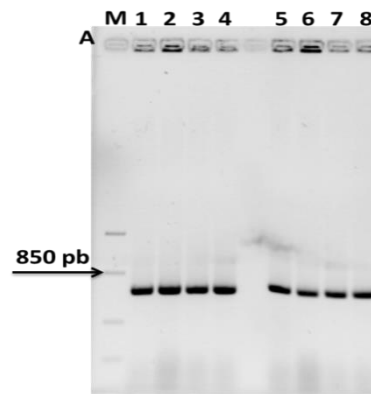


Figura 15. Gel de agarose a 1,0% mostrando o resultado da PCR utilizada para selecionar as colônias positivas. **M:** marcador de peso molecular *FastRuler Low Range* (*Fermentas*); **5 a 8:** colônias positivas para a proteína capsial do GVB (630 pb).

As amostras positivas foram selecionadas, transferidas para 5 mL de meio de cultura líquido LB, contendo kanamicina, e incubadas a 37 °C, durante 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído e utilizado na reação de sequenciamento para verificar se o inserto foi ligado em “frame”.

Assim que foi constatado que o inserto foi inserido em “frame”, o plasmídeo pET28a contendo a ORF que codifica a proteína capsial do GVB foi transformado em *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIL. Novamente, algumas colônias foram testadas por PCR para verificar se possuíam os plasmídeos e, posteriormente, uma colônia positiva foi utilizada para produzir estoque de bactérias transformadas e na expressão da proteína capsial.

4.2.2 Testes de expressão e purificação

Os experimentos de expressão e purificação foram realizados e estão apresentados neste tópico em ordem cronológica, de acordo com a necessidade de superar obstáculos e otimizar os protocolos para a obtenção da GVBcp com alto grau de pureza (acima de 95%, de acordo com a *Hampton Research*, condição considerada ideal para os ensaios de cristalização) e solubilidade.

Na primeira etapa, expressão da GVBcp foi conduzida a 37 °C, durante 4 horas, em meio de cultura LB, induzida com 1 mM de IPTG. Analisando-se o resultado do SDS-PAGE 12% da purificação da proteína capsial do GVB (aproximadamente 26 kDa, contendo a cauda de histidina e o sítio de clivagem para a TEV protease), expressa por 4 hora,s a 37 °C, a proteína não é detectada na fração solúvel (sobrenadante) (**Figura 16A, coluna 1**) após a lise

celular e na purificação sob condição nativa, utilizando resina de níquel (Ni-NTA), estando presente em sua totalidade nos corpos de inclusão. Sendo assim, foi necessário a purificação sob condições desnaturantes (**Figura 16B**) e, posteriormente, foram conduzidos os experimentos de renovelamento.

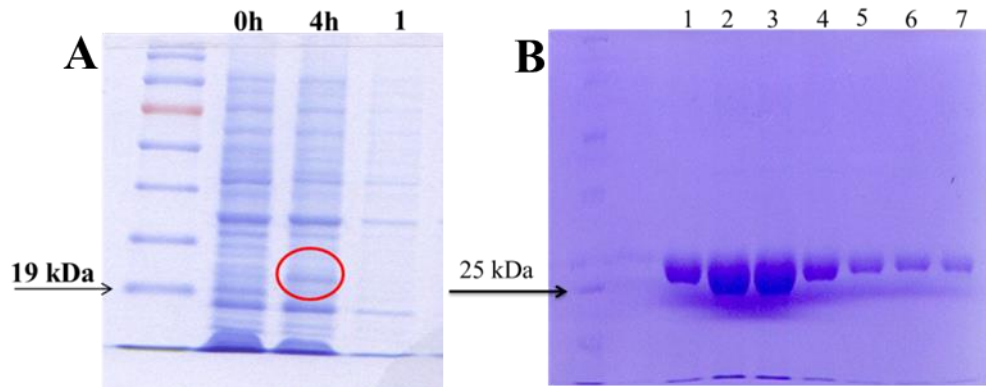


Figura 16. **A)** SDS-PAGE 12% da purificação da GVBcp expressa a 37 °C. **0h:** fração celular não induzida; **4h:** fração celular 4 horas após a indução com IPTG; **1:** purificação da fração solúvel (sobrenadante). **B)** SDS-PAGE 12% GVBcp expressa a 37 °C e purificada sob condição desnaturante (utilizando 8 M de uréia) para posterior tentativa de renovelamento por diluição. **1 a 7:** eluição da proteína usando pH 5.9.

Na segunda etapa, após exaustivas tentativas de renovelamento da GVBcp utilizando diversos protocolos, optou-se por tentar obtê-la solúvel e purificá-la sob condição nativa.

Assim, para tal finalidade, algumas variáveis foram testadas: temperatura de expressão (37 °C e 18 °C), concentrações de IPTG, indução da expressão em diversas densidades ópticas. Além disso, foi utilizado o meio de cultivo autoindutivo (ZYM-5052) e a técnica do choque térmico e osmótico, descrito por Studier (2005) e Oganessian et al. (2007), respectivamente.

Foi observado um aumento significativo na solubilidade da proteína heteróloga, induzindo a expressão a 18 °C com 0,2 mM de IPTG, densidade óptica (DO_{600nm} 0,4), e agitação constante (200 rpm), durante 16 horas (**Figura 17**). Da mesma forma, resultados semelhantes foram observados utilizando-se os métodos descritos por Studier (2005) (**Figura 18**) e Oganessian e colaboradores (2007) (**Figura 19**).

Dessa forma, a purificação da GVBcp expressa a 18 °C foi conduzida sob condição nativa, utilizando resina de níquel (Ni-NTA), concentrada para aproximadamente 2 mg/mL

(Figura 17), e o experimento de dicroísmo circular foi realizado para verificar se estava enovelada e estimar o conteúdo de estruturas secundárias.

Observou-se, também, que as proteínas estocadas na geladeira eram instáveis e precipitavam após alguns dias. Também foi constatado que as mesmas são termoinstáveis e precipitam quando atingem temperatura superior a 18 °C.

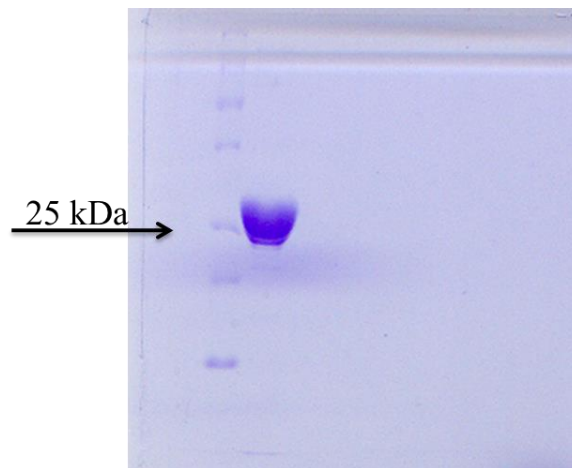


Figura 17. SDS-PAGE 12% da GVBcp expressa a 18 °C, purificada sob condição nativa, dialisada e concentrada para aproximadamente 2 mg/mL.

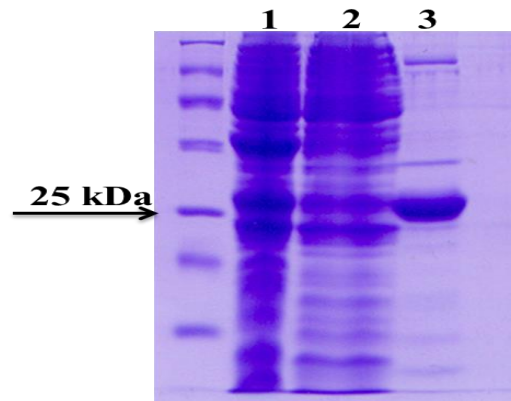


Figura 18. SDS-PAGE 12% da purificação da GVBcp expressa utilizando o meio auto-indutivo (a 18 °C). **1:** Fração insolúvel (corpo de inclusão); **2:** Fração solúvel (sobrenadante); **3:** Primeira eluição.

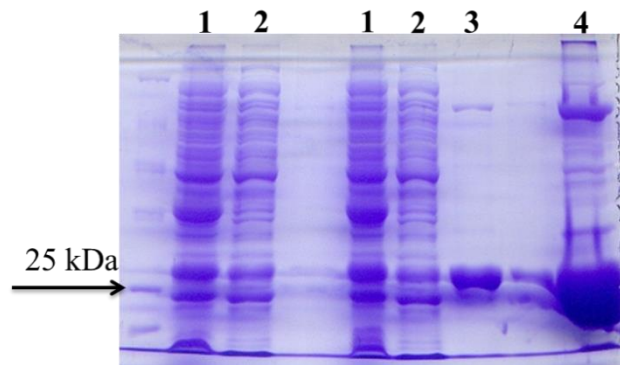


Figura 19. SDS-PAGE 12% da purificação da GVBcp expressa usando o método de choque osmótico e térmico. **1 e 2:** Fração insolúvel (corpo de inclusão) e fração solúvel (sobrenadante), respectivamente.; **3:** Primeira eluição; **4:** Proteína precipitada durante a diálise gradual.

Após o estabelecimento de um protocolo adequado para a expressão e purificação da proteína, ela foi obtida com um alto grau de pureza (superior a 95%, corada com comassie) e concentrada para 7 mg/mL (**Figura 20**). Imediatamente, após verificarmos que a proteína estava pura, concentrada e estruturada, os ensaios de cristalização foram conduzidos.

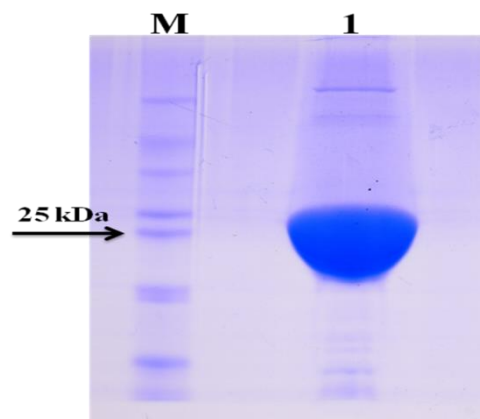


Figura 20. SDS-PAGE 12% da GVBcp expressa a 18 °C, purificada sob condição nativa, dialisada e concentrada para 7 mg/mL.

Na terceira etapa, a expressão da proteína a 18 °C foi conduzida, induzida com 0,2 mM de IPTG, DO_{600nm} 0,4, e a purificação foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando resina de níquel, como descrito na etapa anterior. Com a finalidade de se obter a proteína mais estável, a TEV protease foi utilizada para remover a cauda de histidina.

Novamente, uma cromatografia por afinidade (resina de níquel) foi utilizada para remover a cauda de histidina clivada e a TEV protease usada na reação de clivagem, pois a enzima também possui cauda de histidina. A reação de clivagem pode ser visualizada na **figura 21**. Somente após a segunda purificação para a remoção dos produtos da reação de clivagem da cauda de histidina, a proteína capsidial foi concentrada e submetida novamente aos testes de cristalização.

Após esta etapa, observou-se uma melhora na estabilidade da GVBcp, podendo ser estocada por períodos maiores, entretanto, continuava a precipitar-se quando manuseadas em temperaturas superiores a 18 °C.

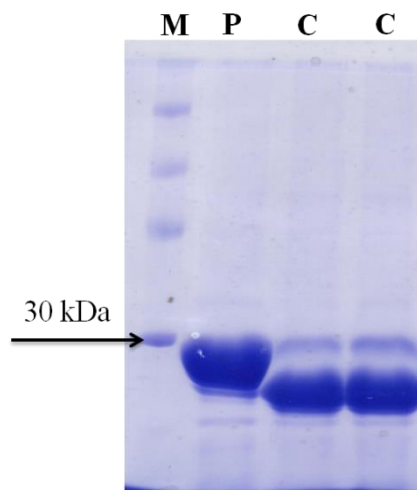


Figura 21. Gel de poliacrilamida contendo SDS mostrando os resultados da purificação da GVBcp e clivagem da cauda de histidina, utilizando-se a TEV protease na proporção de 1:10. **M:** marcado de massa molecular (GE Healthcare); **P:** GVBcp purificada por cromatografia de afinidade (Ni-NTA) usada como controle; **C:** reação de clivagem (banda superior refere-se à TEV protease e banda inferior refere-se à GVBcp sem cauda de histidina).

4.2.3 Western Blotting

Com o objetivo de verificar se a proteína capsidial estava sendo expressa após a indução da expressão, e se a proteína purificada sob condição nativa era a proteína de interesse, realizamos experimentos de *western blotting*. Para tal finalidade, foram utilizados o extrato total de proteínas a partir da cultura de bactérias (após 4 horas da adição de IPTG) e amostras provenientes da etapa de eluição da purificação das proteínas expressas (a 37 °C e 18 °C) sob condição nativa.

De acordo com a metodologia descrita no item 3.16, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE 12%, transferidas para membrana de nitrocelulose e, posteriormente, incubadas

com os anticorpos primário e secundário, Anti-Polihistidina e Anti-Mouse, respectivamente. Após a incubação com a mistura BCIP/NBT, foi observado o aparecimento de uma coloração púrpura nas canaletas onde foram aplicados o extrato total de proteínas (**Figura 22B, coluna 4h**) e a amostra proveniente da etapa de eluição da purificação sob condição nativa a 18 °C (**Figura 22B, coluna 1**). Dessa forma, concluímos que a proteína purificada era a de interesse, uma vez que pode ser detectada após 4 horas da indução com IPTG, também quando expressa a 18 °C e purificada sob condição nativa. Porém, quando expressa a 37 °C, encontrou-se nos corpos de inclusão, pois não foram detectadas pela técnica de *western blotting* após a purificação sob condição nativa.

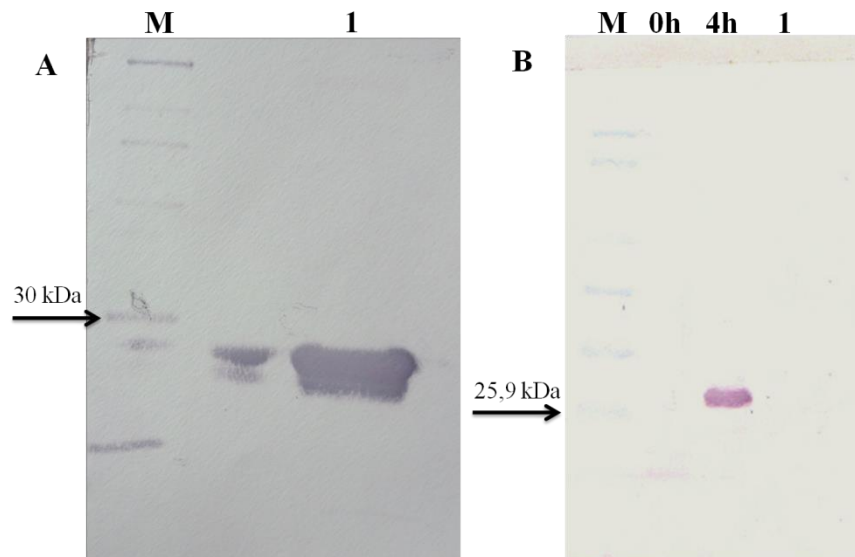


Figura 22. *Western blotting* mostrando a detecção da GVBcp, utilizando-se o extrato total da bactéria após 4 horas de indução da expressão, com 1 mM de IPTG (**B**). *Western blotting* mostrando a detecção da GVBcp expressa a 18°C e purificada sob condição nativa (**A**).

4.2.4 Dicroísmo Circular

O conteúdo de estrutura secundária da GVBcp foi calculado através do espectro de CD (**Figura 23**). O espectro obtido indica que a proteína contém uma quantidade substancial de α -hélice. A análise do conteúdo de estrutura secundária obtido utilizando o programa CDPro, indica as seguintes porcentagens das principais estruturas secundárias: 71% de α -hélice, 5% de β -folha e 24% de outras estruturas. Estes resultados sugerem que a proteína recombinante GVBcp pode ser expressa em *E. coli* e purificada a partir de simples métodos de

cromatografia das frações solúveis, mantendo sua forma nativa e adequada para os ensaios de cristalização.

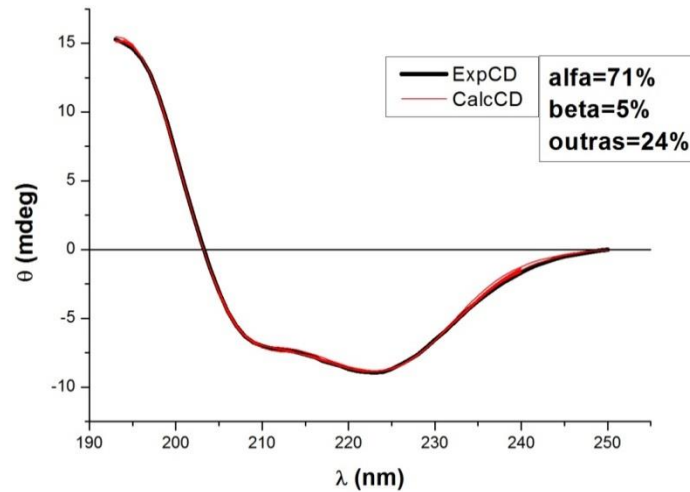


Figura 23. Espectro de CD (190 a 250 nm) da proteína GVBcp e a porcentagem de estruturas secundárias obtidas pela deconvolução do espectro utilizando-se o programa CDPro. **ExpCD:** espectro obtido experimentalmente; **CalcCD:** espectro calculado.

4.2.5 Experimento de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Primeiramente, as análises de DLS foram conduzidas na solução de proteínas capsidiais do GVB (3 mg/mL) a 10 °C no seguinte tampão: 20 mM Tris-HCl, 300 mM de NaCl, pH 7. Analisando-se o gráfico do resultado do experimento de DLS, observou-se claramente, que as proteínas capsidiais estavam agregadas e polidispersas (mais de uma população de agregados), pois a GVBcp possui massa molecular de 21,4 kDa (sem cauda de histidina) e no histograma foi observado agregados com massa molecular de aproximadamente, 291.8 kDa, 314.2 kDa, 2.209 Mda, 3.495 Mda, 4.848 Mda e 11.07 Mda (**Figura 24**). Dessa forma, concluiu-se que essa condição deveria ser otimizada para que os testes de cristalização pudessem ser conduzidos novamente.

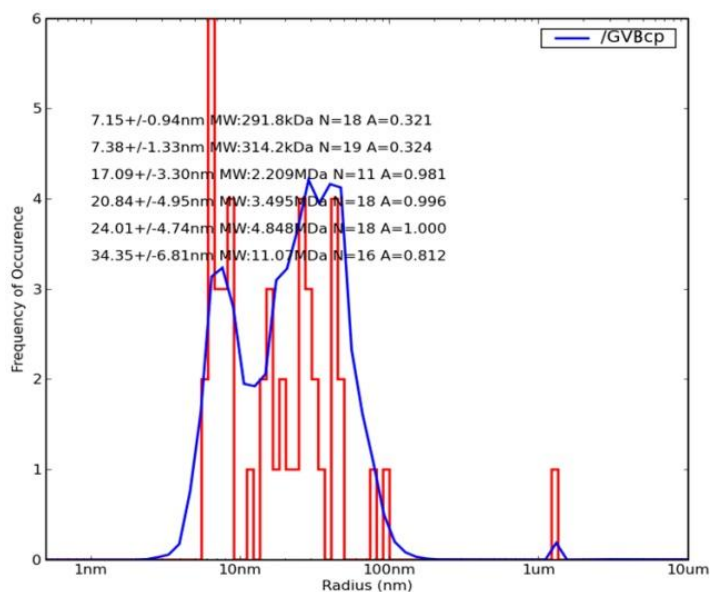


Figura 24. Histograma dos resultados da análise de DLS da GVBcp. A solução de proteína estava polidispersa (várias populações de agregados). As populações de agregados estão representadas em vermelho.

Posteriormente, como os resultados obtidos da proteína capsidial do GVA foram mais promissores, focou-se nos testes envolvendo a GVAcP, com o objetivo de otimizar os cristais obtidos com essa proteína. Como ambas as proteínas capsidiais dos vírus GVA e GVB pertencem à mesma família, mesmo gênero, e apresentam um alto grau de similaridade, a resolução da estrutura cristalográfica da proteína do GVA seria suficiente para resolvermos a estrutura da proteína capsidial do GVB através de modelagem por homologia.

4.2.6 Ensaios de cristalização

Os ensaios de cristalização da GVBcp (7,96 mg/mL, tampão: 20 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5% de glicerol) foram conduzidos a 18 °C, utilizando os kits *Crystal Screen I*, *Crystal Screen II* e *PEG-Ion* da *Hampton Research*. Após duas semanas, foi obtido um único cristal na condição 21 do kit *Crystal Screen I*: 0.2 M de Acetato de magnésio tetraidratado, 0.1 M de Cacodilato de sódio triidratado pH 6.5, 30% volume/volume de (+/-)-2-Metil-2,4-pentanodiol (**Figura 25**). O cristal estava sob um precipitado do tipo *skin*, porém se dissolveu quando tentou-se remover o precipitado para recolhê-lo.

Posteriormente, a cauda de histidina foi removida e os ensaios de cristalização foram conduzidos novamente. Nenhum cristal foi encontrado, somente foi observado após algumas semanas uma porcentagem menor de precipitação das proteínas nas gotas penduradas,

comparada à porcentagem de precipitação encontrada nos ensaios conduzidos com a proteína contendo cauda de histidina, indicando que houve uma melhora na estabilidade da mesma.

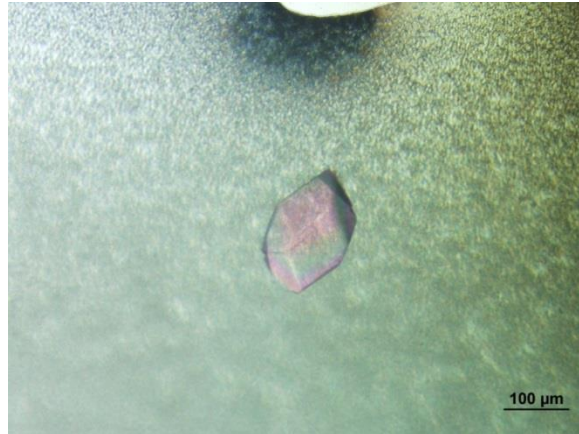


Figura 25. Cristal da GVBcp obtido após duas semana na condição 21 do *Crystal Screen I* (0.2 M de Acetato de magnésio tetraidratado, 0.1 M de Cacodilato de sódio triidratado pH 6.5, 30% volume/volume de (+/-)-2-Metil-2,4-pentanodiol).

4.2.7 Predição da estrutura tridimensional da GVBcp

Foram realizadas buscas por homologia e similaridade de sequência primária utilizando a ferramenta BLAST e o banco de dados PDB e, apesar de haver 99.122 estruturas no banco de dados, somente a proteína Álcool Desidrogenase de *Lactococcus lactis* teve a melhor cobertura (38%) e similaridade (29%). Essa proteína não apresenta a mesma função que a proteína estudada, e a identidade era muito baixa para a modelagem por homologia. Dessa forma, foram utilizados os programas *I-Tasser*, *Quark* e *Rosetta* que são empregados na predição de estruturas de proteínas que não possuem homologia com proteínas conhecidas. Os modelos gerados foram validados utilizando-se os programas *ProSA*, *TM-align* e *RAMPAGE*.

Utilizando-se o programa *I-Tasser*, o modelo da proteína GVBcp com a maior pontuação de confiabilidade (*C-score* -4.97) (**Figura 26**) foi selecionado, e possuía na maioria α -hélices. Além disso, o molde com maior pontuação (*Z-score* 1.84) utilizado na modelagem da GVBcp, foi a estrutura cristalográfica da proteína capsidial do vírus *Papaya mosaic virus* (YANG et al., 2012) (**Figura 29**), um vírus filamentosos e flexuoso, pertencente à família *Alphaflexiviridae*.

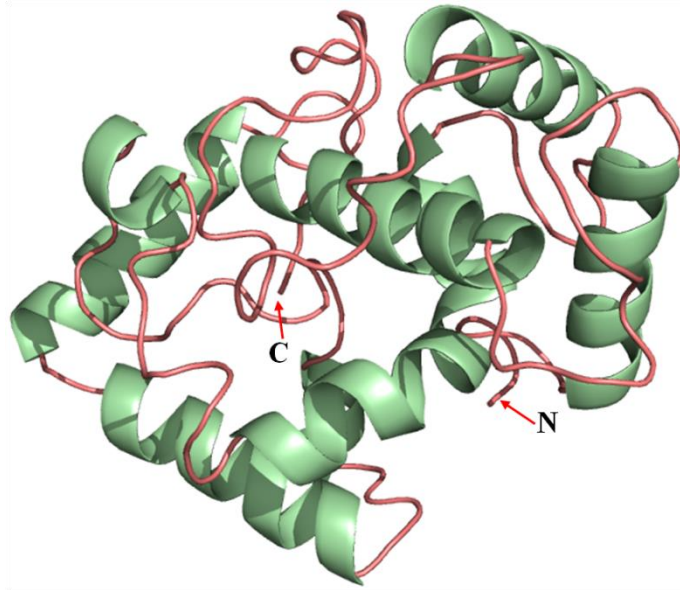


Figura 26. Representação em *cartoon* da estrutura da GVBcp com maior *C-score* obtida pelo programa *I-Tasser*. **N:** região N-terminal; **C:** região C-terminal.

A qualidade do modelo gerado pelo *I-Tasser* foi validada utilizando os programas descritos acima. O gráfico de Ramachandran apresentou 75,9% de resíduos na região favorável, 15,9% na região permitida e 8,2% na região não permitida (**Figura 27**). Analisando este modelo pelo *ProSA*, verificou-se que o mesmo se encontra dentro da gama de pontuação tipicamente encontrada para proteína nativas de tamanhos similares (**Figura 28**). Estes resultados indicam boa qualidade do modelo obtido.

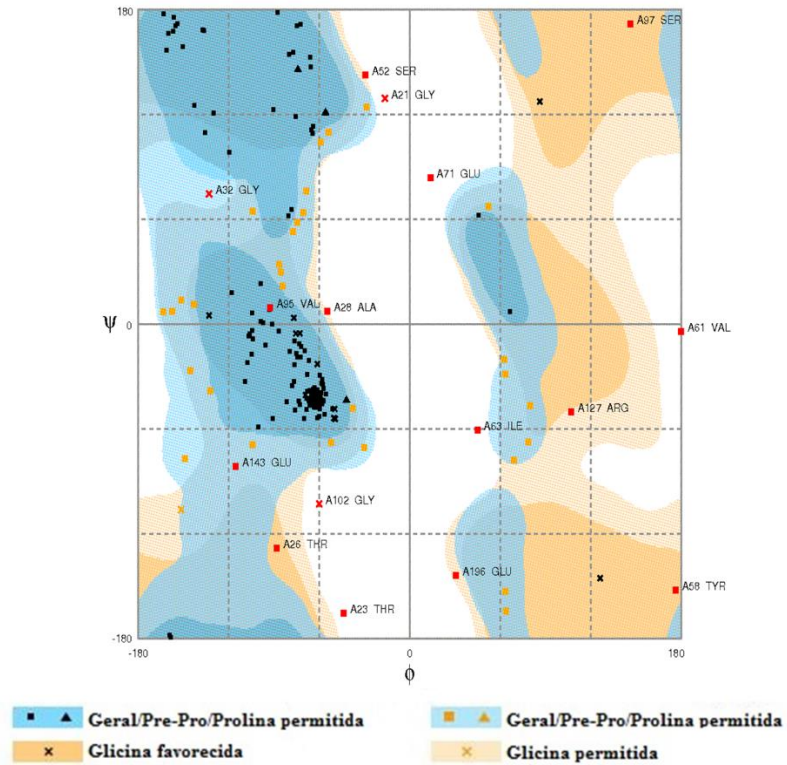


Figura 27. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVBcp gerada pelo *I-Tasser*.

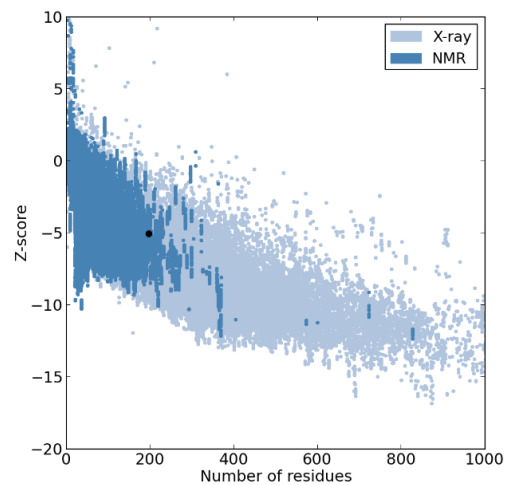


Figura 28. Resultado do programa *ProSA* para o modelo da GVBcp gerado pelo *I-Tasser* retornando a pontuação *Z-score* de aproximadamente -5, indicando que o modelo está dentro da gama de pontuações tipicamente encontrada para proteínas nativas de tamanhos similares revolvidas experimentalmente (NMR em azul escuro e raio-X em azul claro).

A estrutura da proteína capsidial do *Papaya mosaic virus* consiste de um enovelamento de somente alfa hélices. A interface subunidade-subunidade é formada pela

interação hidrofóbica, com um longo sulco em uma proteína, ocupada pelos resíduos de aminoácidos 11 a 26 da região N-terminal da proteína vizinha. Os resíduos importantes da região N-terminal incluem Ala12, Phe13, Ile16, Met21, Ile24 e Val26. Na estrutura tridimensional, Phe13 se encaixa dentro de uma bolsa hidrofóbica na molécula vizinha, formada pelos resíduos Leu39, Val42, Met46, Val56, Ala60, Phe106, Tyr109 e Phe110. Dessa forma, sugeriu-se que a interação hidrofóbica entre o peptídeo N-terminal e o sulco vizinho subjacente, é o mecanismo de polimerização do vírus filamentososo de planta (domínio de troca) (YANG et al., 2012).

Foi proposto um mecanismo de montagem, domínio de troca N-terminal, pela qual as subunidades nos vírus helicoidais são, provavelmente, ligados às interfaces laterais pelos resíduos de aminoácidos salientes da região N-terminal. Esse mecanismo é compatível com a observação bioquímica, em que a proteínas capsídiadas sozinhas são propensas à agregação e são capazes de formar partículas similares a dos vírions selvagens, mesmo na ausência do RNA. Além disso, sugeriu-se que a articulação flexível da alça, pode parcialmente contar para a natureza flexível da grande família de vírus filamentosos de plantas (YANG et al., 2012).

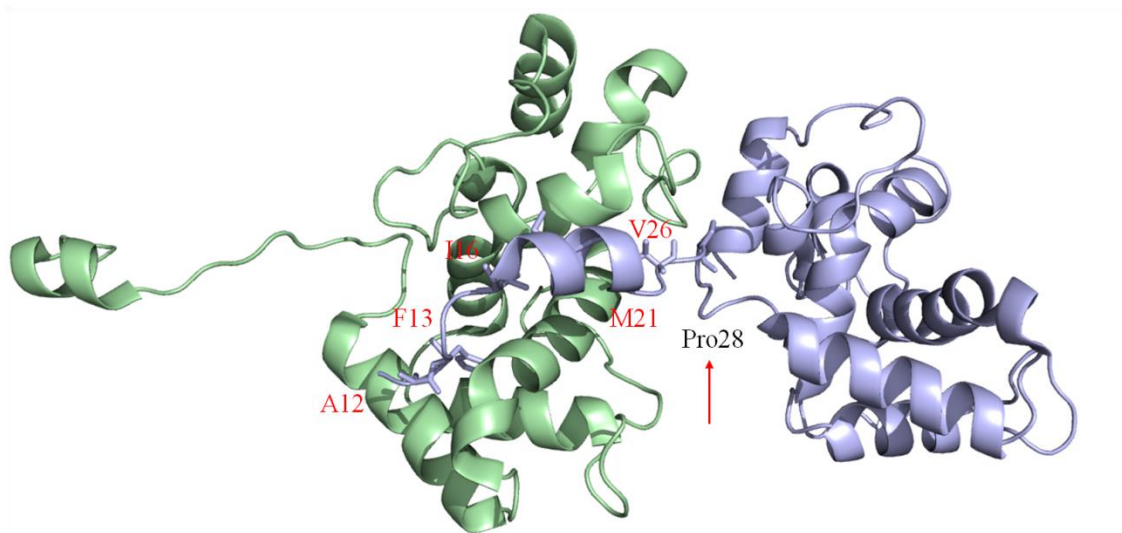


Figura 29. Estrutura do dímero PapMV mostrada na forma de *cartoon*, evidenciando que a região N-terminal da molécula em azul interage com a bolsa hidrofóbica da molécula verde, pelo mecanismo de troca, e que a alça flexível (seta vermelha) conecta as duas moléculas. Figura adaptada de Yang et al. (2012).

Tendo ciência dos aminoácidos importantes para o mecanismo de troca do PapMV, as sequências de aminoácidos do PapMV e GVBcp foram alinhadas utilizando-se o programa

MUSCLE (EDGARD, 2005). Analisando o resultado do alinhamento, observou-se 40 resíduos de aminoácidos conservados (22,10% de similaridade). Porém, os aminoácidos conservados em ambas as estruturas não são os aminoácidos importantes para o mecanismo de troca, observado na estrutura do PapMV (**Figura 30**). Com o objetivo de se comparar a estrutura obtida com a estrutura cristalográfica da proteína capsidial do PapMV, o programa *TM-align* foi utilizado. Foi obtido uma pontuação maior que 0.5 (*TM-score* de 0.5895) e RMSD de 3.78, indicando que as estruturas compartilham o mesmo enovelamento SCOP/CATH, porém a região N-terminal responsável pelo mecanismo de troca (Ala12, Phe13, Ile16, Met21 e Val26) e interação com a bolsa hidrofóbica da proteína vizinha, não foi modelado (**Figura 31**). O alinhamento da estrutura GVBcp gerada pelo *I-Tasser* com a estrutura do PapMV utilizando o programa *PyMol* pode ser visualizado na **figura 32**.

```

GVB          1  -----MENISRMAKIRSNISELLCAGVTFVTDARETGFDLRPMYFRTLFGYIALTGTSA
PapMv        1  MSKSSMSTPNIAFPAITQEQMSSIKVDPTSNLLPSQEQ-----QLKSVSTLMVAAKVPAASV
consensus    1  ..... ** * ..* . . . * ..... ** . . *

GVB          54  KAQHYENVDIIGDKVGAEGIDSRGTINISEQVKKMMGYSRVPSGVCKGLTLRQMCEPFA
PapMv        57  TTVALELVNFCYDNGSSAYTTVTGPSSIPET-----ISLAQLASIVKASGTSLRKFCRYFA
consensus    61  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GVB          114  EEARDCLTILATLRVYSRLASKMAKLGQKEPQ--VMFDNSGLNL-----LTLSAT
PapMv        112  -----PIIWNLRIDKMAPANWEASGYKPSAKFAAFDFDGVENPAAMQPPSGLTRSP
consensus    121  ..... * . ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GVB          163  EASAIQSLNSR---LFRTEGAKNVFTAQASV-----GEQSVEI
PapMv        165  QEERIANATNKQVHLFQAALQDNNFASNSAFITKGQISGSTPTIQFLPPEPETSITR
consensus    181  * . . . . ** . * * . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . * *

```

Figura 30. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas capsidiais do GVB e PapMV evidenciando os aminoácidos conservados em ambas as estruturas (*).

```

IAFPAITQEQMSSIKVDPTSNLLPSQEQQLKSVSTLMVAAKV--PA--A--S-VTTVALELVNFCYDNGSSAYT-TVTGP-----
.....: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----MENISRMAKIRSNISELLCAGVTFVTDARETGFDLRPMYFRTLFGYIALTGTSAKAQHYENVDIIGD

-----SSIPEISLAQLASIVK-AS--G-----T----SLRKFCRY-FAPIIW-NL--RTDKMAPANWEASGYKPSAKFAAF
.....: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
KVGAEGIDSRGTINISEQVKKMMGYSRVPSGVCKGLTLRQMCEPFAEEARDCLTILATLRVYSRLASKMAKLGQ-K-EPQVMF

DFFDGVE-NPAAMQPPSGL-TR-SPTQEERI----A--NAT-N-----
..... . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
DFNSGLNLLTL--S--ATEASAIQSLNSRLFRTEGAKNVFTAQASVGEQSVEI

```

Figura 31. Comparação da estrutura da GVBcp gerada pelo *I-Tasser* com a estrutura do PapMVcp utilizando o programa *TM-align*. A sequência de aminoácidos na linha superior se refere à proteína PapMVcp e a inferior à

GVBcp. Pares de resíduos alinhados menores que 5 Å indicado por (:), indicando similaridade estrutural, e (.) indica outros resíduos alinhados.

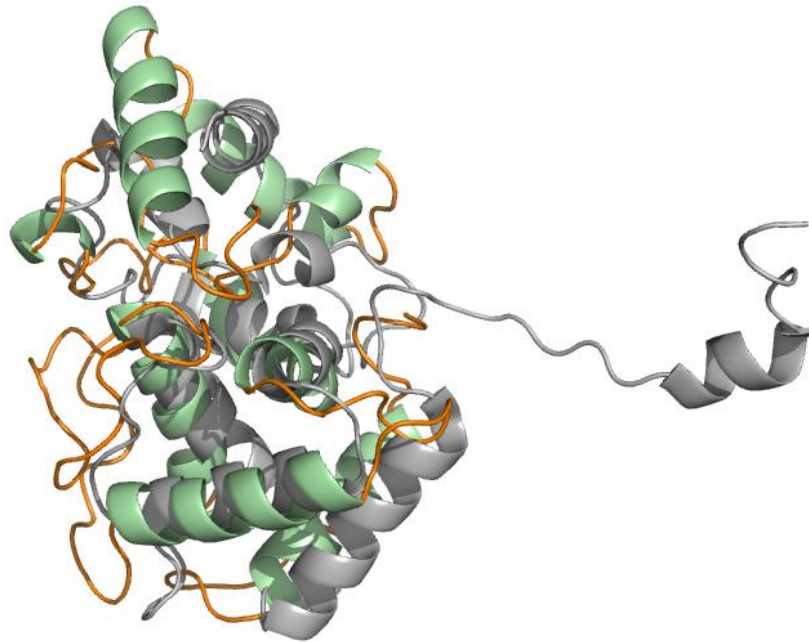


Figura 32. Representação em *cartoon* do melhor modelo da GVBcp (verde) gerada pelo *I-Tasser* alinhada com a PapMV (cinza) utilizando o programa *PyMol*.

Utilizando-se o programa *Quark*, obteve-se 10 modelos, e o modelo com maior pontuação (*TM-score* de 0.3811) foi selecionado (**Figura 33**). O gráfico de Ramachandran apresentou 84,6% de resíduos na região favorável, 9,2% na região permitida e 6,2% na região não permitida (**Figura 34**). Analisando-se este modelo pelo *ProSA*, foi constatado que se encontra dentro da gama de pontuação tipicamente encontrada para proteína nativas de tamanhos similares (**Figura 35**), sugerindo que o modelo não continha erros. Comparando o modelo gerado com a estrutura do PapMV utilizando o programa *TM-align* (**Figura 36**), obtivemos um *TM-score* de aproximadamente 0.336 e RMSD de 5.0, indicando semelhança estrutural aleatória. O alinhamento da estrutura GVBcp gerada pelo *Quark* com a estrutura do PapMV utilizando o programa *PyMol* pode ser visualizado na **figura 37**.

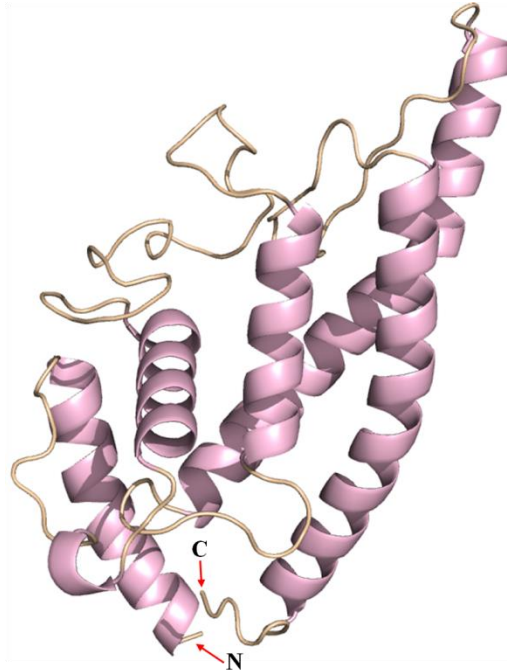


Figura 33. Representação em *cartoon* da estrutura da GVBcp com maior *TM-score* obtida pelo programa *Quark*. N: região N-terminal; C: região C-terminal.

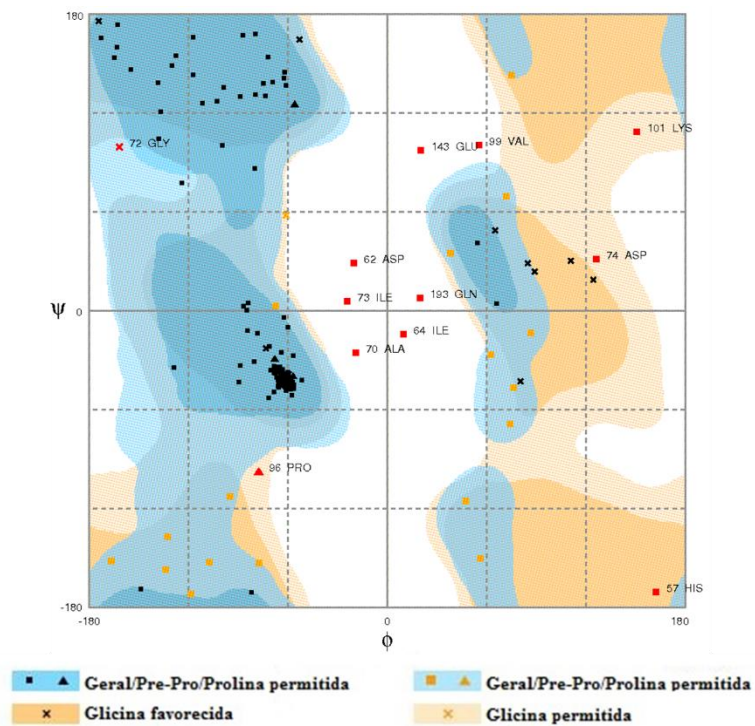


Figura 34. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVBcp gerado pelo *Quark*.

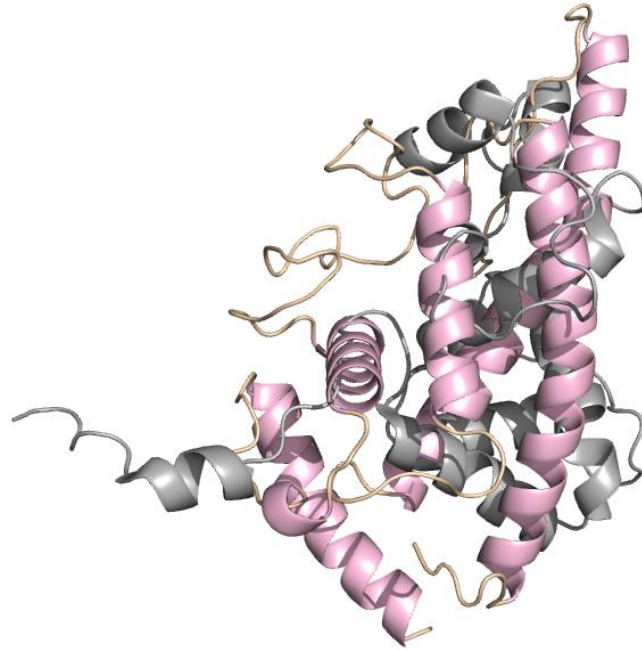


Figura 37. Representação em *cartoon* do melhor modelo da GVBcp (rosa) gerada pelo *Quark* alinhada com a PapMV (cinza) utilizando o programa *PyMol*.

Por fim, o modelo gerado pelo *Rosetta* que possuía a menor energia do “cluster” que continha maior número de modelos (**Figura 38**), foi selecionado. O gráfico de Ramachandran apresentou 98% de resíduos na região favorável, 2% na região permitida (**Figura 39**). Analisando-se este modelo pelo *ProSA*, verificou-se que o mesmo se encontra dentro da gama de pontuação tipicamente encontrada para proteína nativas de tamanhos similares (**Figura 40**), sugerindo que o modelo não continha erros. Novamente, as estruturas do PapMV e GVBcp foram comparadas, utilizando-se o *TM-align* (**Figura 41**). Foi obtido um *TM-score* de aproximadamente 0.30854 e RMSD de 4.9, indicando similaridade estrutural aleatória. O alinhamento da estrutura GVBcp gerada pelo *Rosetta* com a estrutura do PapMV utilizando o programa *PyMol* pode ser visualizado na **figura 42**.

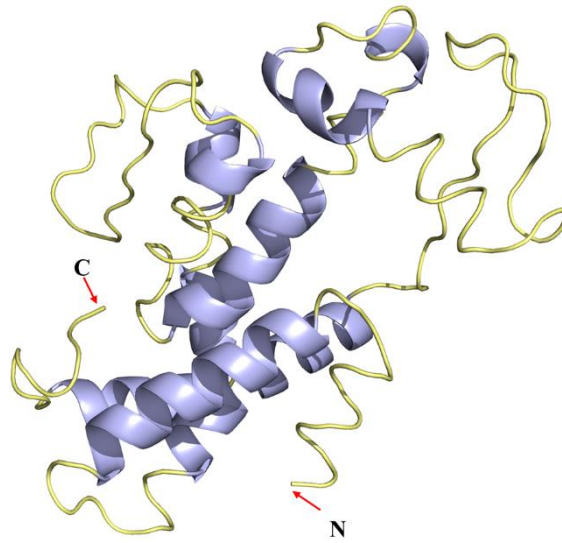


Figura 38. Representação em *cartoon* do modelo da GVBcp com menor energia do "cluster" que continha o maior número de modelos gerados pelo programa *Rosetta*. N: região N-terminal; C: região C-terminal.

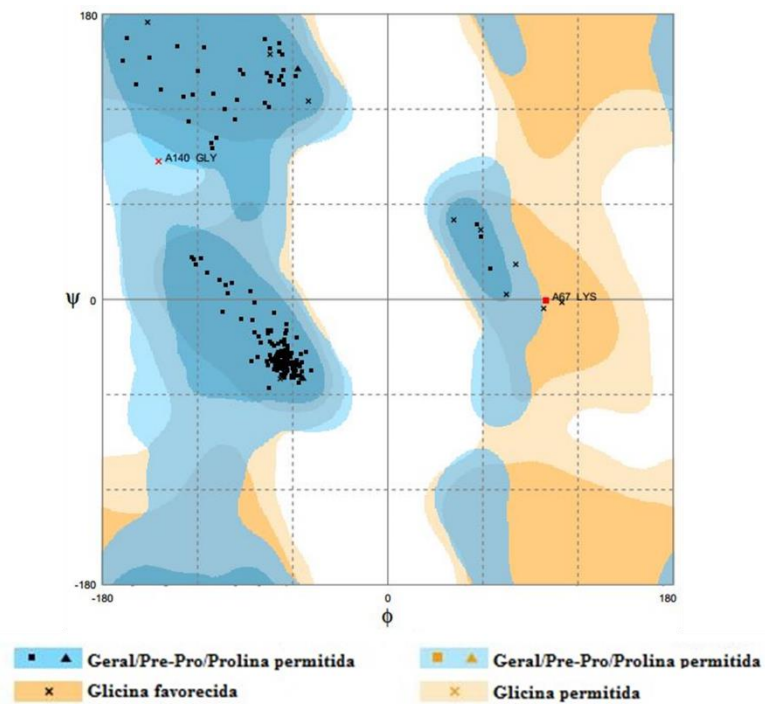


Figura 39. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVBcp gerado pelo programa *Rosetta*.

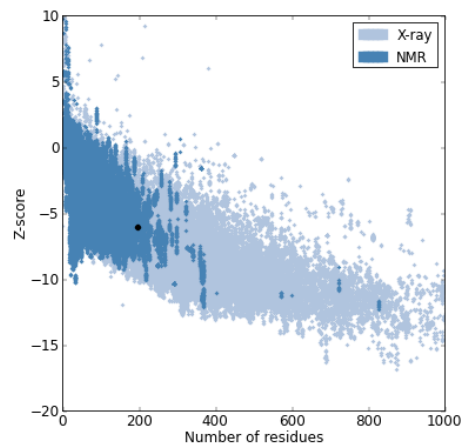


Figura 40. Resultado do programa *ProSA* para o modelo da GVBcp gerado pelo *Rosetta* retornando a pontuação *Z-score* de aproximadamente -5, indicando que o modelo está dentro da gama de pontuações tipicamente encontrada para proteínas nativas de tamanhos similares revolvidas experimentalmente (NMR em azul escuro e raio-X em azul claro).

```

IAFPAITQEQMSSIKV-----DPTSNLLPSQEQLKSVSTLMV-AA-----
      . . . . .
-----MENISRMAKIRSNISELLCAGVTFVTDARETGFDRPMY-FRTLFGYIALTGTSAKAQHYENVDIIGDKVG
-----K-VPAASVTTV--A----LEL-----VNFCYDNG
      . . . . . : : . . . . .
EGIDSRGTINISEQVKMMGYSRVPSGVCKGLTLRQMCEPFAEEARDCLTILATLRVYS-RLASKMAKLGQKEPQVMFDFNSGL-
SSAYTTV-TG-PSSIPEISLAQLASIVKASG-TSLRKFCRYFAPIIWNLRDKMAPANWEASGYKPSAKFAAFDFDGVENPAAMQ
      . . . . . : : : : :
-----NLLTLSATEASAIQSLNSRLEFRTEGAKNVFTAQ-----ASVGEQS--V-E

NPAAMQPPSGLTRSPTQEERIANATN
: : : :
S--V-EI-----

```

Figura 41. Comparação da estrutura da GVBcp gerada pelo *Rosetta* com a estrutura do PapMVcp utilizando o programa *TM-align*. A sequência de aminoácidos na linha superior se refere à proteína PapMVcp e a inferior à GVBcp. Pares de resíduos alinhados menores que 5 Å indicado por (:), indicando similaridade estrutural, e (.) indica outros resíduos alinhados.

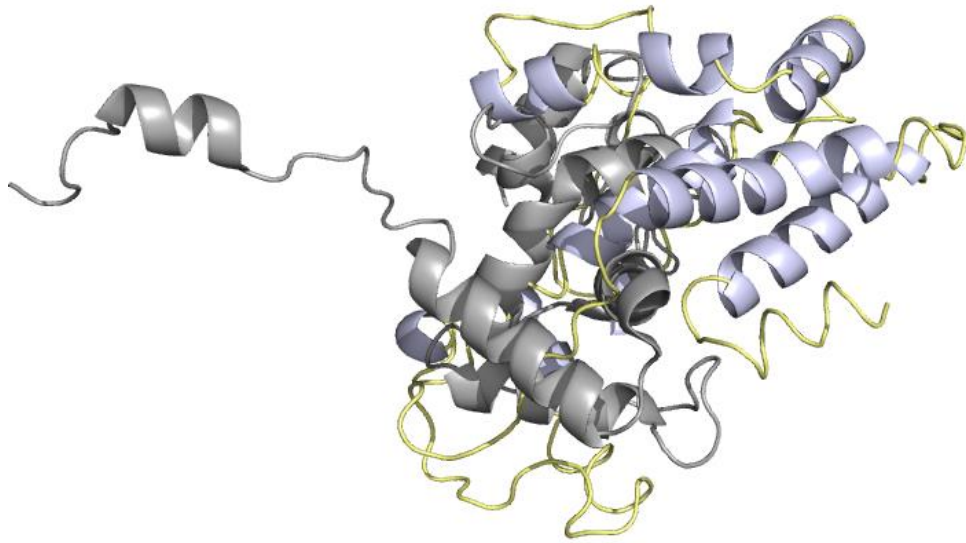


Figura 42. Representação em *cartoon* do alinhamento da estrutura do GVBcp gerado pelo *Rosetta* (azul) com a estrutura do PapMV (cinza) utilizando o programa PyMol.

4.3 Resultados da proteína capsial do GVA

4.3.1 Clonagem da proteína capsial no vetor pET28a

Novos oligonucleotídeos foram desenhados para inserir o sítio de clivagem para a TEV protease na proteína GVAcp, amplificamos o fragmento que seria clonado e foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (**Figura 43**). O produto amplificado foi excisado, extraído do gel e purificado.

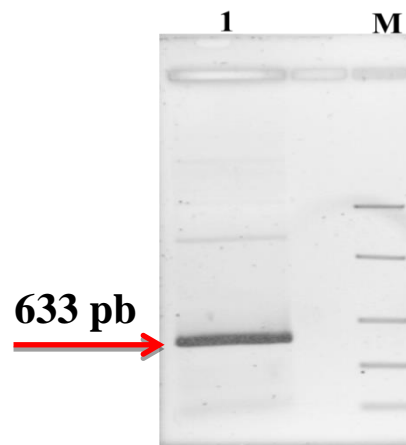


Figura 43. Gel de agarose a 1% mostrando o resultado da amplificação da ORF que codifica a proteína capsial do GVA (contendo cauda de histidina e sítio de clivagem para a TEV protease). **M:** marcador molecular *FastRuler Middle Range DNA ladder* (Fermentas); **1:** banda do produto da PCR amplificado.

Após a amplificação, o fragmento e o vetor pET28a foram submetidos ao corte enzimático utilizando-se as enzimas de restrição BamHI e HindIII. O fragmento foi purificado utilizando o kit PCR Cleanup (Qiagen) e o vetor foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% (**Figura 44**), excisado, purificado, e defosforilado utilizando-se a enzima fosfatase alcalina FastAP (Fermentas).

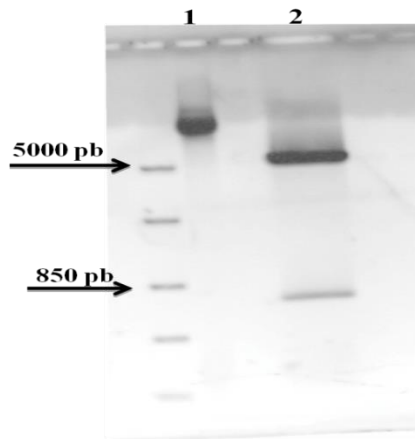


Figura 44. Gel de agarose a 1% mostrando o corte enzimático do plasmídeo pET28a. **1:** pET28a contendo inserto usado como controle; **2:** pET28a linearizado digerido (banda mais forte) e o fragmento liberado (banda mais fraca) após o corte enzimático.

O fragmento e o vetor purificado após o corte enzimático foram quantificados e usados na reação de ligação na proporção de 3:1. O fragmento foi ligado no vetor utilizando-se a T4 DNA Ligase (Fermentas), a 16 °C, incubando-se por 16 horas. O produto da reação de ligação foi transformado em *E. coli* DH5 α , e 100 μ l da reação de transformação foi plaqueada em meio de cultura sólido contendo kanamicina para a seleção do plasmídeo. Após 16 horas de incubação das placas na estufa a 37 °C, algumas colônias foram selecionadas e a técnica da reação em cadeia da polimerase foi conduzida para verificar se elas possuíam os plasmídeos transformados. O produto da PCR foi analisado através da eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (**Figura 45**).

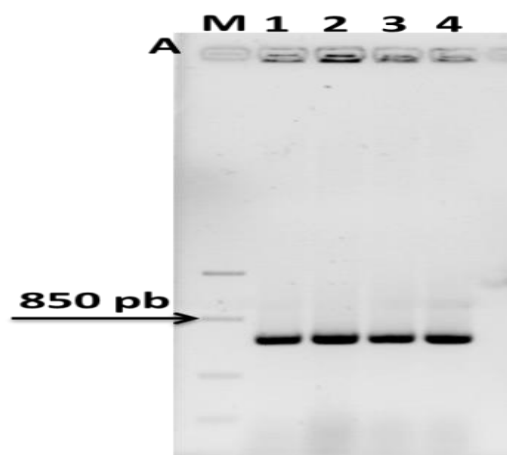


Figura 45. Gel de agarose a 1% mostrando o resultado da PCR utilizada para selecionar as colônias positivas. **M:** marcador molecular *FastRuler Low Range DNA ladder* (Fermentas); **1 a 4:** colônias positivas para a proteína capsial do GVA.

As amostras positivas foram selecionadas, transferidas para 5 mL de meio de cultura líquido LB, contendo kanamicina, e incubadas a 37 °C, durante 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído e utilizado na reação de sequenciamento para verificar se o inserto foi ligado em “frame”.

Assim que constatamos que o inserto foi inserido em “frame”, o plasmídeo pET28a contendo a ORF que codifica a proteína capsidial do GVA, foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus-RIL. Novamente, algumas colônias foram selecionadas e a reação em cadeia da polimerase foi conduzida para verificar se possuíam os plasmídeos e, posteriormente, uma colônia positiva foi utilizada para produzir estoque de bactérias transformadas e na expressão da proteína capsidial.

4.3.2 Expressão e purificação das proteínas capsidiais

Os experimentos de expressão e purificação foram realizados e estão apresentados neste tópico em ordem cronológica.

Na primeira etapa, as proteínas capsidiais foram expressas e purificadas sob condição nativa, seguindo a estratégia descrita na purificação da proteína GVBcp. A GVAcp (aproximadamente 25,7 kDa, contendo cauda de histidina e sítio de clivagem para a TEV protease) foi concentrada para 2,3 mg/mL (**Figura 46**), utilizando-se dispositivo de ultrafiltração de membrana de celulose Amicon (corte de 3 kDa), e os ensaios de cristalização foram conduzidos.

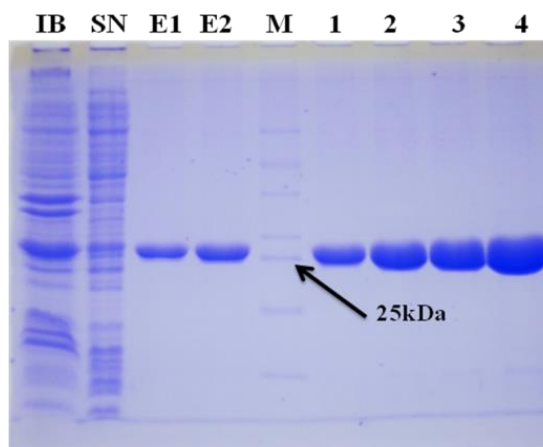


Figura 46. SDS-PAGE 12% mostrando o resultado da purificação das proteínas capsidiais do GVA sob condição nativa. **1:** proteína capsidial do GVA concentrada para 1 mg/mL; **2 e 3:** proteína capsidial do GVA concentrada para 2,3 mg/mL; **4:** proteína capsidial do GVA concentrada para 5 mg/mL.

Na segunda etapa, uma segunda purificação foi realizada para a remoção da cauda de histidina e da TEV protease (que também possui cauda de histidina), e as proteínas capsidiais foram obtidas com uma pureza superior a 95% (coradas com *coomassie brilliant blue*) e sem a cauda de histidina (**Figura 47**). Em seguida, conduzimos os experimentos de cristalização que serão discutidos mais adiante.

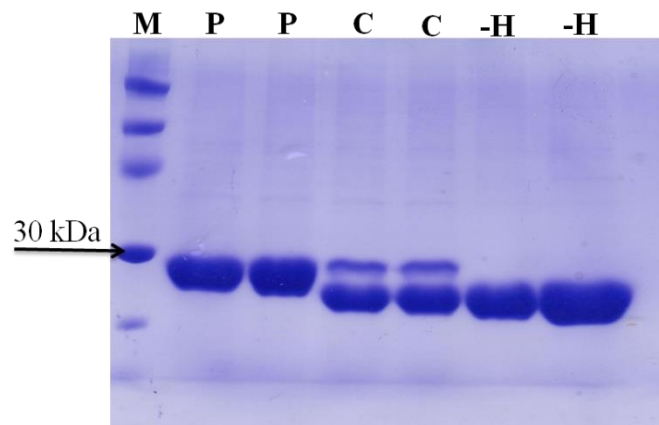


Figura 47. Gel de poliacrilamida contendo SDS mostrando os resultados da purificação da GVAcp, e clivagem da cauda de histidina utilizando-se a TEV protease na proporção de 1:10. **M:** marcador de massa molecular; **P:** GVAcp purificada sob condição nativa utilizando-se resina de níquel; **C:** reação de clivagem (banda superior e inferior refere-se à TEV protease e GVAcp sem cauda de histidina, respectivamente); **-H:** GVAcp sem cauda de histidina após a purificação para remover a TEV protease e a cauda de histidina removida.

Após a remoção da cauda de histidina, foi observada uma maior estabilidade da proteína, porém não podiam atingir uma alta concentração (10 mg/mL) ou atingir temperatura superior a 18 °C, pois agregavam e precipitavam. Pudemos comprovar a agregação da GVAcp induzida pela temperatura ao conduzirmos experimentos de espalhamento dinâmico de luz a 25 °C (dados não apresentados). Após certo tempo a 25 °C, precipitados visíveis puderam ser observados a olho nu.

Na terceira etapa, após a realização da remoção da cauda de histidina, uma purificação por exclusão molecular foi conduzida, com a finalidade de remover as populações de agregados e trabalhar com amostras monodispersas. Anteriormente, a coluna foi calibrada com uma proteína conhecida para estimar a massa molecular da GVAcp. Analisando-se o gráfico da cromatografia, foi observado uma população de agregados que começou a ser eluída após 7 mL, e uma população que começou a ser eluída após 11 mL e, então, o pico que continha a maior concentração de proteínas (11 a 13 mL) foi selecionado, concentrado e os

ensaios de cristalização foram conduzidos novamente. O resultado da cromatografia de exclusão molecular pode ser observado na **figura 48**. Foi estimado que as proteínas capsidiais do pico selecionado estavam na forma de dímeros.

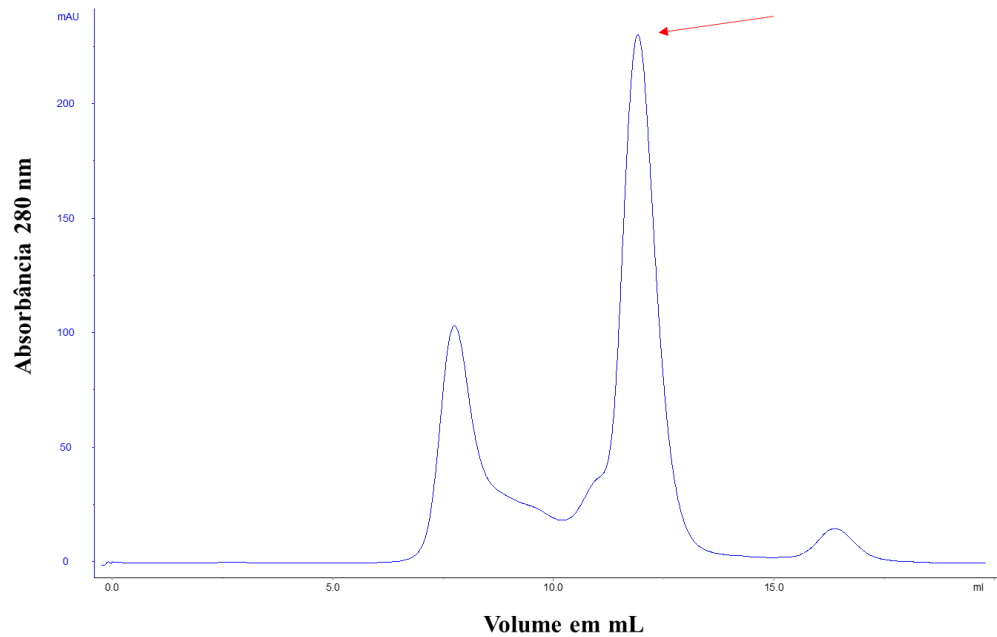


Figura 48. Cromatograma do resultado da purificação da GVAcp, utilizando cromatografia de exclusão molecular, evidenciando o pico selecionado (seta vermelha). A proteína GVAcp (pico selecionado) começou a eluída após 11 mL, aproximadamente.

4.3.3 Dicroísmo Circular

O conteúdo de estrutura secundária da GVAcp foi estimado através do espectro de CD (**Figuras 49**). O espectro obtido indica que a proteína contém uma quantidade substancial de α -hélice. A análise do conteúdo de estrutura secundária obtido utilizando o programa CDPro indicam as seguintes porcentagens das principais estruturas secundárias: 58,9% de α -hélice, 4,6% de β -folha e 36,5% de outras estruturas. Estes resultados sugerem que a proteína recombinante GVAcp pode ser clonada e expressa em *E. coli*, e purificada a partir de simples métodos de cromatografia das frações solúveis, mantendo sua forma nativa e adequada para os ensaios de cristalização.

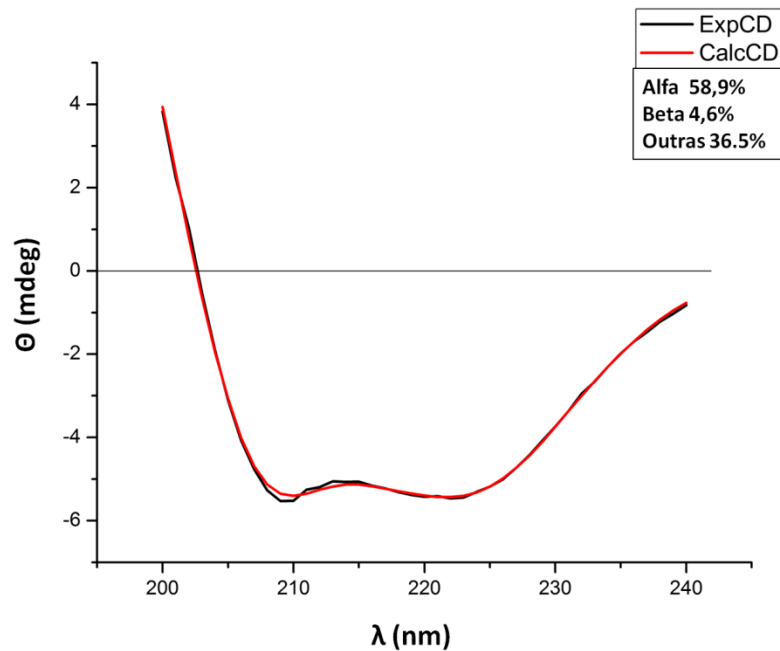


Figura 49. Espectro de CD (200 a 240 nm) da proteína GVAcp e a porcentagem de estruturas secundárias obtidas pela deconvolução do espectro utilizando-se o programa CDPro. **ExpCD:** espectro obtido experimentalmente; **CalcCD:** espectro calculado.

4.3.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Antes das análises de DLS, as proteínas foram centrifugadas por 1 hora a 16.000 x g a 4 °C. Inicialmente, as análises de DLS foram conduzidas na solução de proteína capsial do GVA (2,0 mg/mL) no seguinte tampão: 20 mM Tris-HCl, 300 mM de NaCl, pH 7. Analisando-se o histograma, observou-se duas populações de agregados de proteínas com aproximadamente 7.43 nm (massa molecular de 319,6 kDa) e 32.12 nm (massa molecular de 9.489 MDa), indicando que a amostra não estava monodispersa (**Figura 50**).

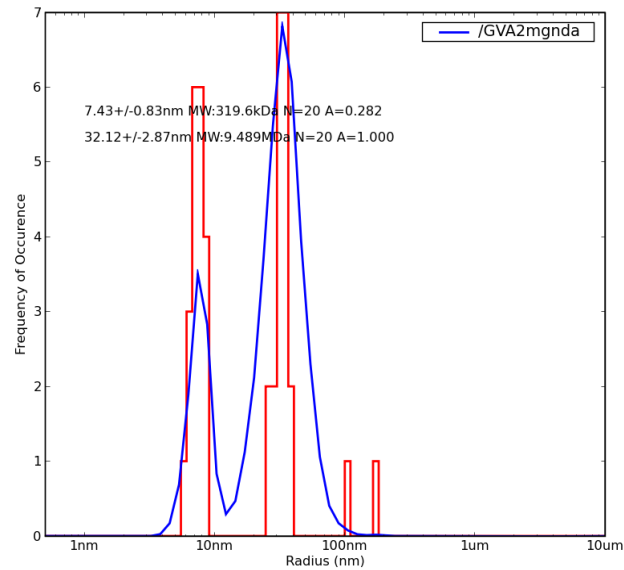


Figura 50. Histograma do resultado do experimento de DLS da GVAcp mostrando duas populações de agregados com massa molecular aproximada de 319.6 kDa (7.43 nm) e 9.48 Mda (32.12 nm).

Posteriormente, após a purificação e remoção da cauda de histidina, uma terceira purificação por exclusão molecular foi conduzida. O pico contendo a maior concentração de proteínas foi selecionado, concentrado e utilizado no experimento de espalhamento dinâmico de luz. Analisando-se os resultados do DLS da GVAcp, foi observado uma melhora no raio hidrodinâmico (aproximadamente 3.58 nm) das populações de proteínas capsidiais (massa molecular de 57.75 kDa) (**Figura 51**). Assim, os ensaios de cristalização foram conduzidos imediatamente após a constatação desse resultado.

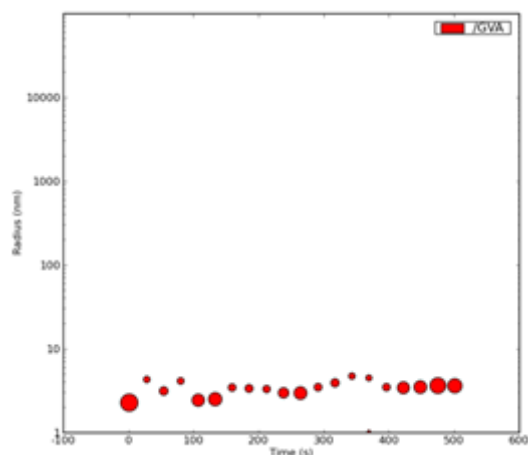


Figura 51. Gráfico do raio hidrodinâmico em função do tempo obtido como resultado do experimento do DLS da GVAcp. Em vermelho populações de proteínas com raio hidrodinâmico de aproximadamente 3.46 nm e massa molecular de 53.19 kDa.

4.3.5 Ensaios de cristalização

Os resultados do teste de pré-cristalização (PCT) foram utilizados com o intuito de encontrar uma concentração inicial de proteína adequada para iniciar os testes de cristalização. A priori, a concentração das proteínas foram abaixadas para 2 mg/mL pois, nesta concentração observamos a presença de pouco precipitado (precipitados não amorfos), já com uma concentração maior foi observado precipitados amorfos.

Inicialmente, demos início aos testes de cristalização utilizando a GVAcP contendo cauda de histidina na concentração de 2 mg/mL (tampão 20 mM de Tris HCl pH 7, 300 mM de NaCl) utilizando-se os kits: *MORPHEUS*, *PACT Suite II* e *JCSG+*. Após 2 semanas, observou-se a presença de agulhas e pequenos cristais na condição 49 (1 M de Tri-sódio citrato, 0,1 M de cacodilato de sódio, pH 6.5) do kit *JCSG+*. A condição contendo o cristal foi analisada utilizando-se o equipamento *CristalScore*, sob luz visível e luz ultravioleta, e pode ser visualizada na **figura 52** e **53**, respectivamente.

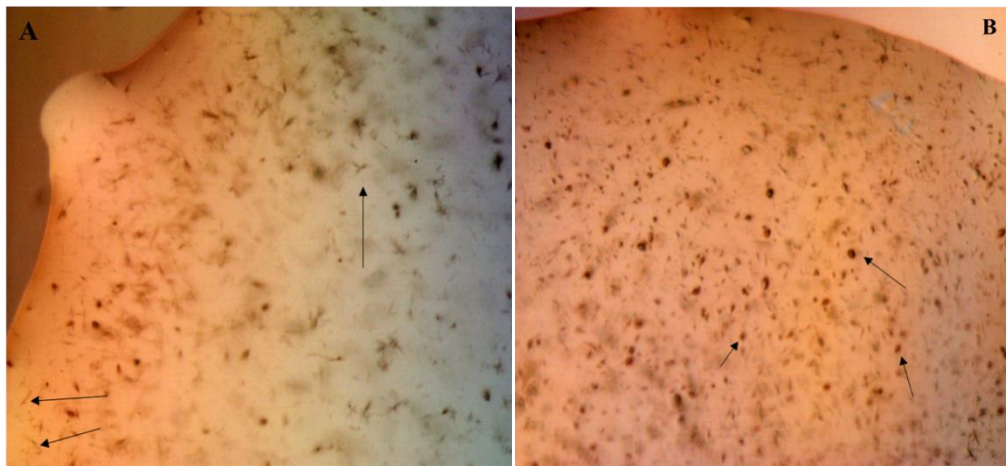


Figura 52. Fotos da gota de cristalização mostrando minúsculos cristais (setas) em forma de agulhas (A) e outros pequenos cristais (setas) (B).

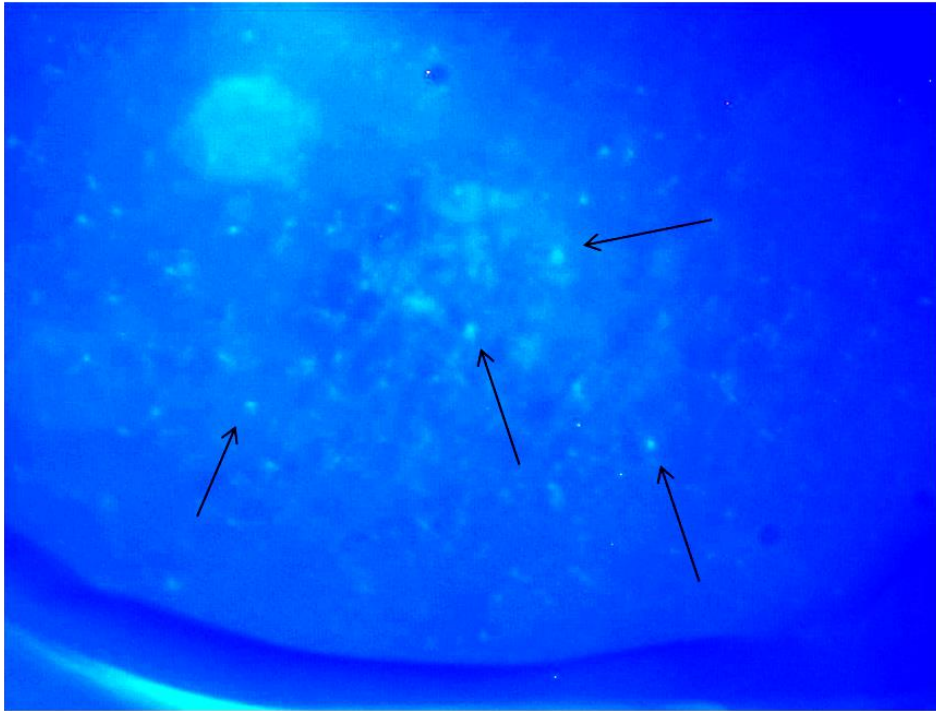


Figura 53. Foto da gota de cristalização visualizada com o equipamento *CrystalScore* sob luz ultravioleta, mostrando pequenos cristais luminescentes de proteína (setas).

A otimização da condição de cristalização encontrada (condição 49 do kit JCSG+) foi conduzida utilizando-se o método da gota suspensa em caixas de cristalização “Linbro Plates” na proporção de 1:1, porém não houve melhora significativa na qualidade dos cristais.

Com o intuito de obter cristais melhores, testes de cristalização da proteína GVAcP sem a cauda de histidina foram conduzidos, utilizando-se o método da gota pendurada com os kits de cristalização *Crystal Screen I*, *Crystal Screen II*, *Crystal Screen Lite*, *SaltRX Set I* e *II*.

Após duas semanas, foram observadas agulhas nas condições de cristalização 33 do kit *Crystal Screen I* (4.0 M de Formato de sódio), 31 e 32 do kit *SaltRX Set I* (3.5 M de Formato de sódio, 0,1 M de BIS-TRIS propano pH 7.0 e 3.5 M de Formato de sódio, 0,1 M de Tris pH 8.5). A concentração da proteína utilizada nos ensaios foram de 1, 4 e 6 mg/mL no tampão 10 mM de Tris HCl pH 7.4, 300 mM NaCl. Os resultados podem ser observados nas **figuras 54, 55 e 56**.



Figura 54. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA obtidos na condição de cristalização 31 do kit *SaltRX Set I*.

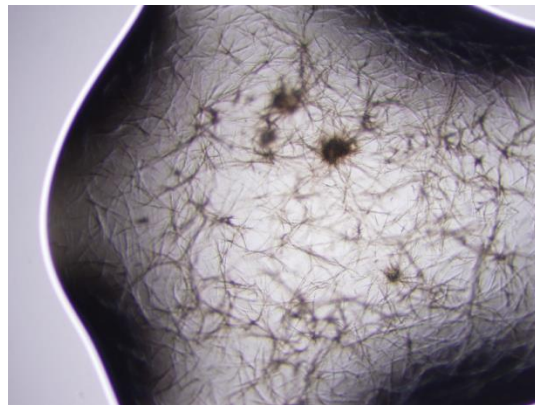


Figura 55. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA obtidos na condição de cristalização 32 do kit *Crystal Screen I*.

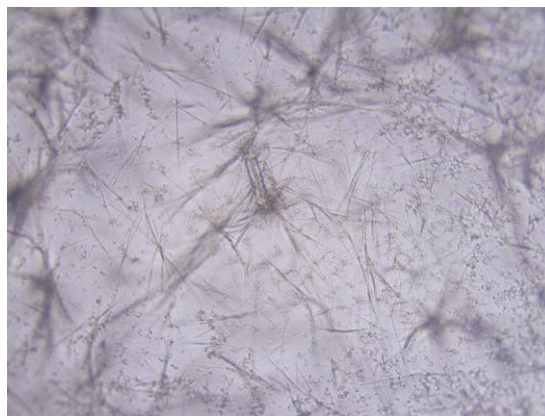


Figura 56. Cristais em forma de agulha da proteína capsidial do GVA obtidos na otimização da condição de cristalização 33 do kit *Crystal Screen I*, utilizando-se a GVAcp na concentração de 1 mg/mL.

Em outra etapa, após a remoção da cauda de histidina, a proteína foi concentrada, e uma cromatografia de exclusão molecular foi conduzida a fim de remover agregados e utilizar

soluções de proteínas monodispersas. Imediatamente após a concentração do pico selecionado (proteína estimada na forma dimérica), foram conduzidos os experimentos de espalhamento dinâmico de luz, e os ensaios de cristalização utilizando-se os kits *Crystal Screen I* e *Crystal Screen II*. A concentração da amostra utilizada foi de 5 mg/mL em tampão 10 mM de Tris HCl pH 7.4, 300 mM de NaCl.

Após alguns dias, foram observados cristais em várias outras condições, porém, os cristais não eram adequados para experimentos de difração de raios-X. Os cristais encontrados nas condições 9, 15, 17, 22, e 33 do kit *Crystal Screen I*, e na condição 32 do kit *Crystal Screen II* podem ser visualizados nas **figuras 57, 58, 59, 60, 61 e 62**, respectivamente.

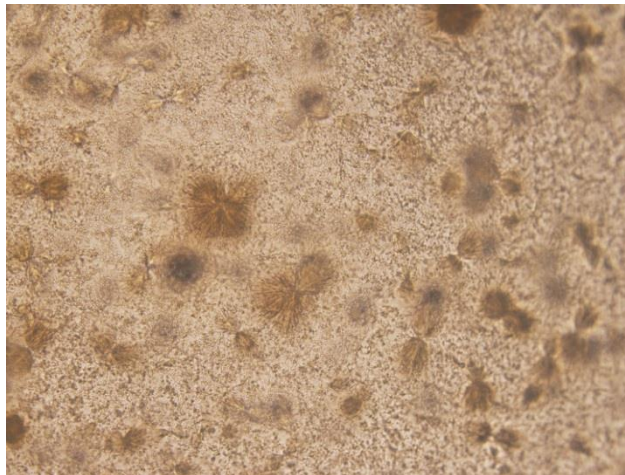


Figura 57. Cristais em forma de agulha da proteína capsial do GVA obtidos na condição de cristalização 09 (0,2 M de Acetato de amônio, 0,1 M de Citrato de sódio tribásico diidratado pH 5.6, 30 % massa/volume de PEG 4.000) do kit *Crystal Screen I*.

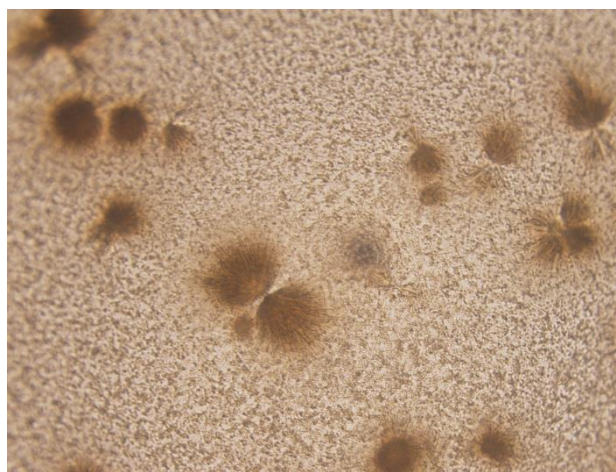


Figura 58. Cristais em forma de agulha da proteína capsial do GVA obtidos na condição de cristalização 15 (0,2 M de Sulfato de amônio, 0,1 M de Cacodilato de sódio triidratado pH 5.6, 30 % massa/volume de PEG 8.000) do kit *Crystal Screen I*.

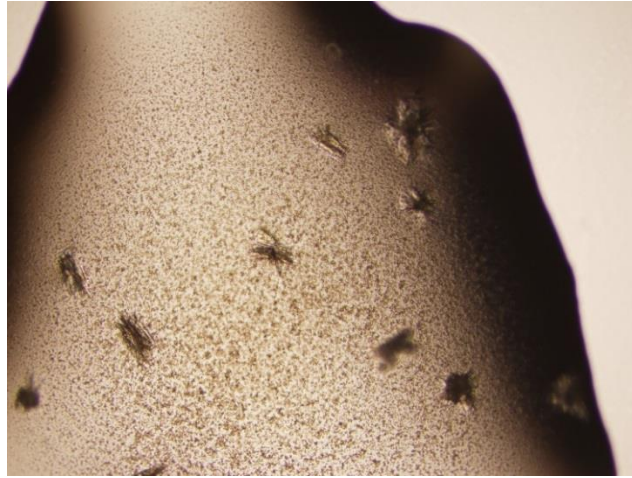


Figura 59. Cristais da proteína capsial do GVA obtidos condição de cristalização 17 (0,2 M de Sulfato de lítio monoidratado, 0,1 M de Tris HCl pH 8.5) do kit *Crystal Screen I*.

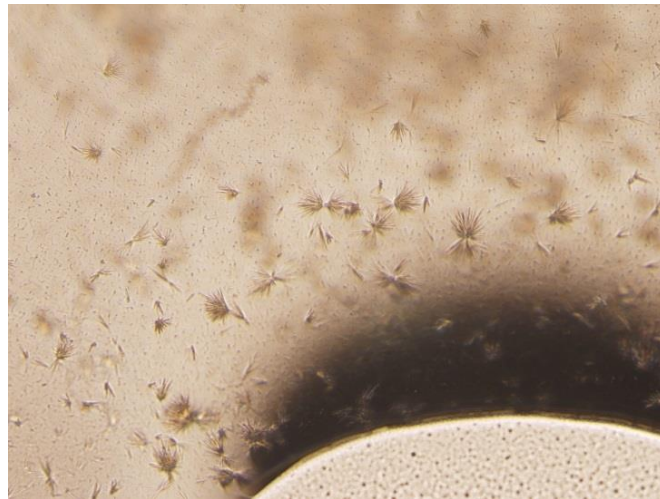


Figura 60. Cristais em forma de agulha da proteína capsial do GVA obtidos na condição de cristalização 22 (0,2 M de Acetato de sódio triidratado, 0,1 M de Tris HCl pH 8.5, 30 % massa/volume de PEG 4.000) do kit *Crystal Screen I*.

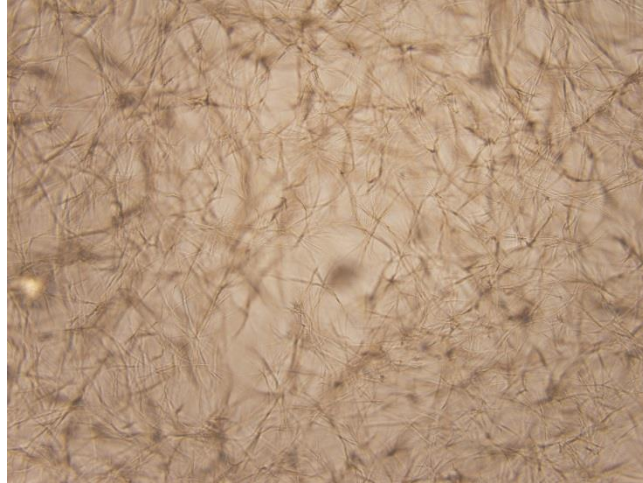


Figura 61. Cristais em forma de agulha da proteína capsial do GVA obtidos na condição de cristalização 33 (4,0 M de Formato de sódio) do kit *Crystal Screen I*.

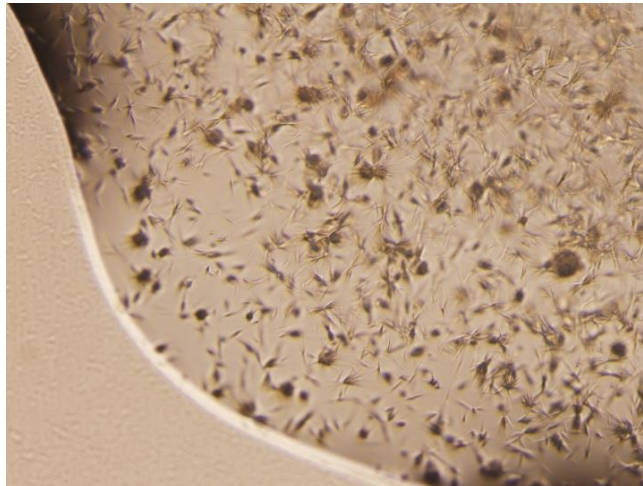


Figura 62. Cristais em forma de agulha da proteína capsial do GVA obtidos na condição de cristalização 32 (0,1 M de Cloreto de sódio, 0,1 M de HEPES pH 7.5, 1.6 M de Sulfato de amônio) do kit *Crystal Screen II*.

Levando em consideração que a estratégia adotada teve como resultado a obtenção de cristais em novas condições de cristalização, uma cromatografia de exclusão molecular foi conduzida e, ao mesmo tempo, além de remover os agregados, a concentração de cloreto de sódio do tampão onde se encontrava a proteína, foi diminuída para 50 mM. Conduzimos os ensaios de cristalização novamente e, conseqüentemente, foi observado um aumento no número de cristais encontrados na condição 09, 15 e 17 do kit *Crystal Screen I* (**Figuras 63, 64 e 65**).

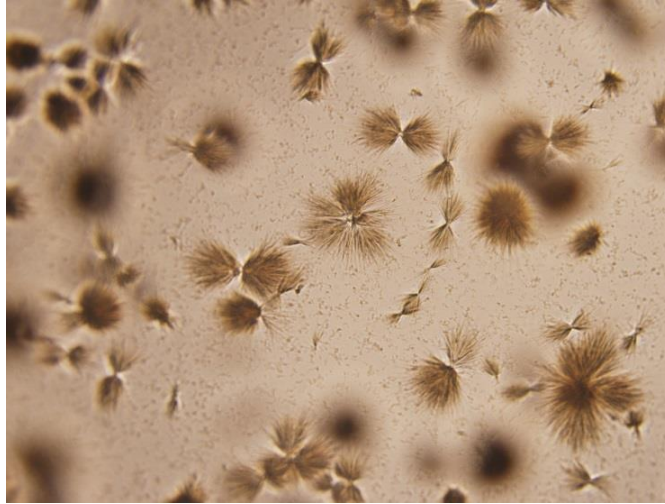


Figura 63. Cristais em forma de agulha da proteína capsial do GVA obtidos na condição de cristalização 09 (0,2 M de Acetato de amônio, 0,1 M de Citrato de sódio tribásico diidratado pH 5.6, 30 % massa/volume de Polietilenoglicol 4.000) do kit *Crystal Screen I*, após a tentativa de otimização.

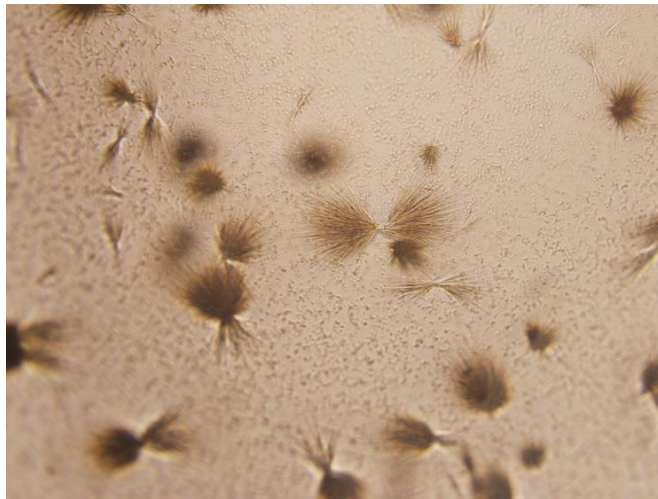


Figura 64. Cristais em forma de agulha da proteína capsial do GVA obtidos na condição de cristalização 15 (0,2 M de Sulfato de Amônio, 0,1 M de Cacodilato de sódio pH 5.6, 30 % massa/volume de PEG 8.000) do kit *Crystal Screen I*, após a tentativa de otimização.



Figura 65. Cristais da proteína capsial do GVA obtidos na condição de cristalização 17 (0,2 M de Sulfato de lítio monoidratado, 0,1 M de Tris HCl pH 8.5) do kit *Crystal Screen I*, após a tentativa de otimização.

4.3.6 Predição da estrutura tridimensional da GVAcp

Foram realizadas buscas por homologia e similaridade de sequência primária (BLAST), utilizando o banco de dados PDB e, apesar de haver 99.122 estruturas no banco de dados, somente a estrutura do fragmento N-terminal da transcriptase reversa do *Murine leukemia virus* complexado com ácido nucléico, teve a melhor cobertura (29%) e similaridade (31%). Essa proteína não apresenta a mesma função que a proteína estudada e a similaridade era muito baixa para a modelagem por homologia. Dessa forma, foram utilizados os programas *I-Tasser*, *Quark* e *Rosetta*, com o objetivo de prever a estrutura tridimensional da GVAcp.

Utilizando-se o programa *I-Tasser*, selecionou-se o modelo da GVAcp que possuía a maior pontuação (*C-score* 3.85) (**Figura 66**), e o modelo continha na maioria α -hélices. Além disso, o *template* com maior pontuação (*Z-score* 1.84), utilizado como molde na modelagem da GVAcp, é a estrutura tridimensional da proteína capsial do vírus *Papaya mosaic virus*, obtida por difração de raios-X, mencionada anteriormente.

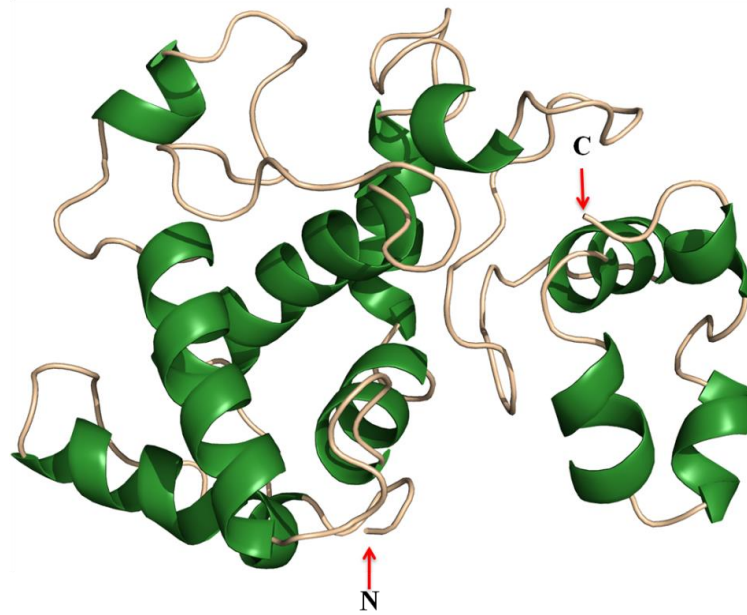


Figura 66. Representação em *cartoon da estrutura* da GVAc com maior *C-score* gerada pelo programa *I-Tasser*. N: região N-terminal; C: região C-terminal.

A qualidade do modelo gerado pelo *I-Tasser* foi verificada, utilizando-se os programas *ProSA* e *RAMPAGE*. O gráfico de Ramachandran apresentou 83,7% de resíduos na região favorável, 12,8% na região permitida e 3,6% na região não permitida (**Figura 67**). Analisando-se este modelo pelo *ProSA*, foi verificado que o mesmo se encontra dentro da gama de pontuação tipicamente encontrada para proteína nativas de tamanhos similares (**Figura 68**), sugerindo que o modelo não continha erros. Estes resultados indicam que a qualidade do modelo obtido é boa.

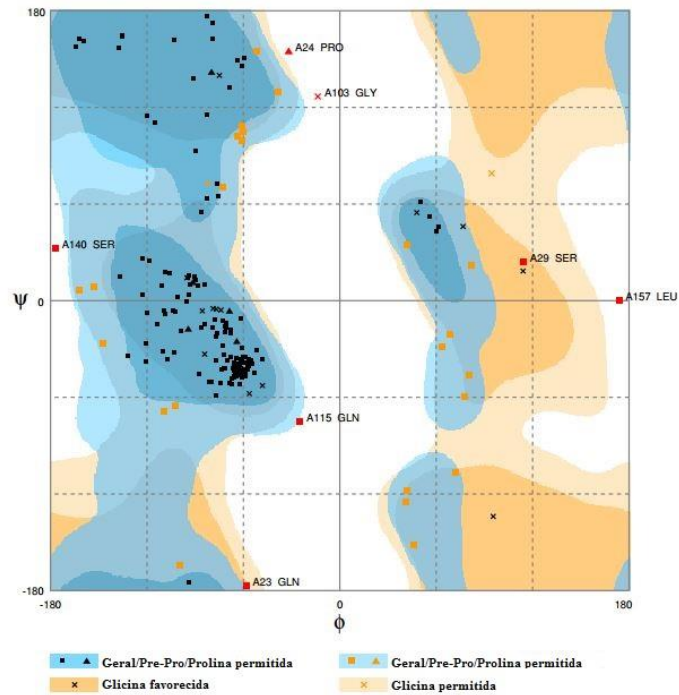


Figura 67. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVAcP gerado pelo *I-Tasser*.

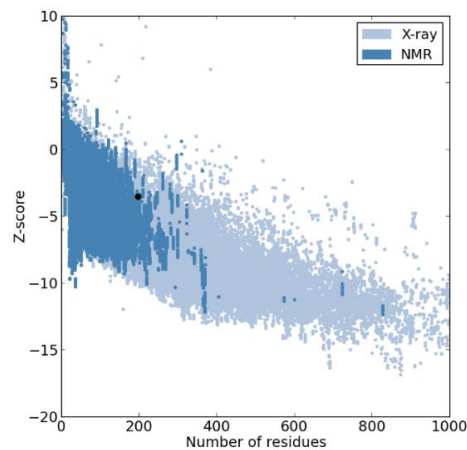


Figura 68. Resultado do programa *ProSA* para o modelo gerado pelo *I-Tasser* para a GVAcP retornando a pontuação Z-score de aproximadamente -5, indicando que o modelo está dentro da gama de pontuações tipicamente encontrada para proteínas nativas de tamanhos similares revolvidas experimentalmente (NMR em azul escuro e raio-X em azul claro).

Tendo ciência dos aminoácidos importantes para o mecanismo de troca do PapMV, as sequências de aminoácidos da PapMVcp e GVAcP foram alinhadas, utilizando-se o programa *MUSCLE*. Analisando-se o resultado do alinhamento, foi observado 36 resíduos de aminoácidos conservados (20% de similaridade). Porém, os aminoácido conservados em

ambas as estruturas, não são os aminoácidos importantes para o mecanismo de troca observado na estrutura do PapMV (**Figura 69**).

```

GVA      1  ---MAHYAKRVEIRATIEELVLA-KAQP AEDASESGYDRNMYLNTLFGYIALVGTSKKAV
PapMv    1  MSKSSMSTPNLAFPATIQEOMSSIRVDPTSNLLPSQ-EQLKSVSTLMVAAKVP AASVTTV
consensus 1  ...      .  **  *  .  *  *      *  ..  .  **  .  .  *  *

GVA      57  HYGEVDIVGPKASKK----TCIDPRGKLVSELVGRMRTL SVAVSEGPVKCATLROMCEP
PapMv    60  ALELVNFCYDNGSSAYTTVTG PSSIPEISLAQLASIVKA-----SCTSLRKEFCRY
consensus 61  *      . *  . . . . . **  .  .  *  . . . . . . . . . . *  . **  *

GVA     113  LAQNAYDFLVLMAENGTYSQLATKMTRSGFKEPQ--VMDFEASGLD-----L KAL
PapMv    110  FAPIIWN-----IRTDKMAPANWEASGYKPSAKFAAFDFDGVENPAAMQPPSGLTRS
consensus 121  *  . . . . . . . . . . *  ** . *  ..  ***  * . . . . . . . . . . *

GVA     161  TLQEPATVIQAMHSR--LFRTECAKGVFNAPSSV-----GEQAMEI-----
PapMv    163  PTQERIANATNKQVHLEQAAQDNNFASNSAFITKGQISGSTPTIQFLPPPETSTTR
consensus 181  **  . . *  . . **  .  *  . *  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

```

Figura 69. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas capsidiais do GVA e PapMV evidenciando os aminoácidos conservados em ambas as estruturas (*).

Para compararmos a estrutura obtida com a estrutura cristalográfica do PapMV, utilizamos o programa *TM-align*. Obtivemos um *TM-score* maior que 0.5 (0.6, aproximadamente) e RMSD de 3.2, indicando que as estruturas compartilham o mesmo enovelamento SCOP/CATH, porém a região N-terminal responsável pelo mecanismo de troca (Ala12, Phe13, Ile16, Met21 e Val26) e interação com a bolsa hidrofóbica da proteína vizinha não foi modelada (**Figura 70**). A representação em *cartoon* do alinhamento da estrutura do GVAcp gerado pelo *I-Tasser* com a estrutura do PapMV utilizando o programa *PyMol*, pode ser visualizado na **figura 71**.

```

IAFPAITQEQMSSIKVDPTS DLLPSQEQLKSVSTLMVAAKVPA-----ASVTTVALELVNFCYDNGSSA--YTTVTGP-S---
    .: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....:
-----MA-HYAKRVEIRAIIEELVLAKAQPAEDASESGYDRNMYLNTLFGYIALVGTS-KKAVHYGEVDIVGP
-----S IPEISLAQLASIVKAS--GT-----S--LRKFCRYFAPI IWNLRTDKM-----APANWEASGYKPSAKFAAFD
    .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....:
KASKKTGIDPRGKLVVSELVGRMRTL SVAVSEGVPVKGATLRQMCEPLAQNAYDFLVLMAEMGTYSQLATKMTRSGFKEP-QVM-FD
FFDGVENPAAMQPPSGLTRSPTEERIANATN-----
:.....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....: .....:
FASGLD-----L-KALTLQEATVIQAMHSRLFRTEGAKGVFNAQSSVGEQAVEI

```

Figura 70. Comparação da estrutura da GVAcP gerada pelo I-Tasser com a estrutura do PapMVcP utilizando o programa TM-align. A sequência de aminoácidos na linha superior se refere à proteína PapMVcP e a inferior à GVAcP. Pares de resíduos alinhados menores que 5 Å (:), indicando similaridade estrutural, e (.) indica outros resíduos alinhados.

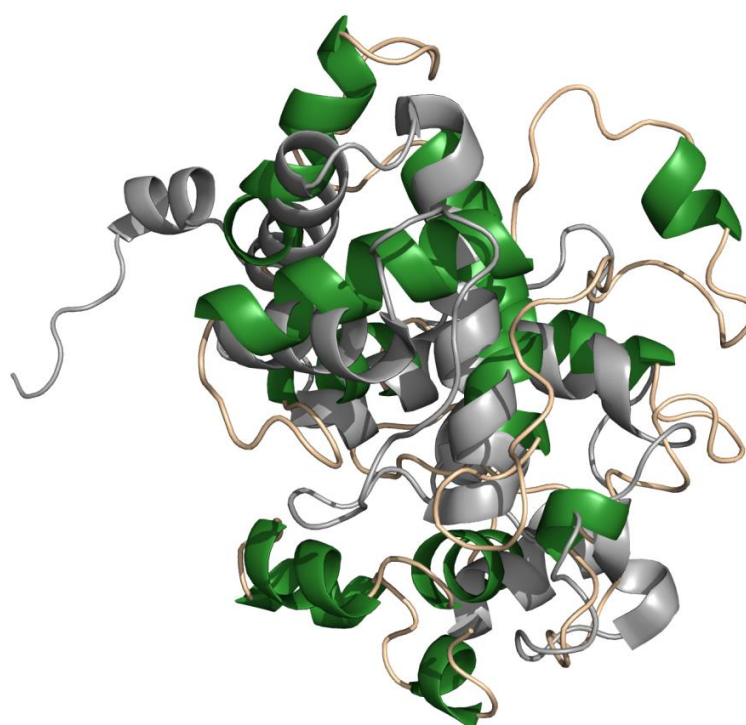


Figura 71. Representação em *cartoon* do alinhamento da estrutura do GVAcP gerado pelo *I-Tasser* (verde) com a estrutura do PapMV (cinza) utilizando o programa *PyMol*.

Utilizando-se o programa *Quark*, foram obtidos 10 modelos, e selecionou-se o modelo com maior pontuação (*TM-score* de 0.3333) (**Figura 72**). O gráfico de Ramachandran apresentou 87,2% de resíduos na região favorável, 8,7% na região permitida e 4,1% na região não permitida (**Figura 73**). Analisando este modelo pelo *ProSA*, verificou-se que o mesmo se encontra dentro da gama de pontuação tipicamente encontrada para proteína nativas de tamanhos similares (**Figura 74**), sugerindo que o modelo não continha erros. Comparando-se

o modelo gerado com a estrutura do PapMV, utilizando o programa *TM-align*, obteve-se um *TM-score* de aproximadamente 0.32 e RMSD de 5.3, indicando semelhança estrutural aleatória (**Figura 75**). A representação em *cartoon* do alinhamento da estrutura do GVAcp gerado pelo *Quark* com a estrutura do PapMV utilizando o programa *PyMol*, pode ser visualizado na **figura 76**.

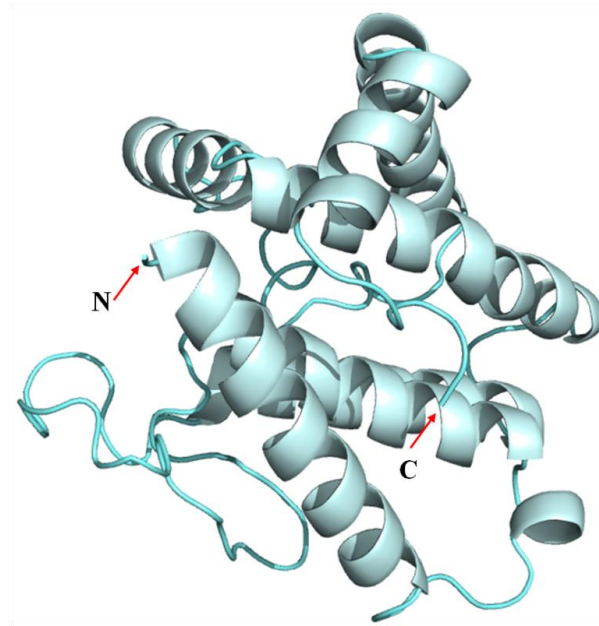


Figura 72. Representação em *cartoon* da estrutura da GVAcp com maior *TM-score* obtida pelo programa *Quark*. N: região N-terminal; C: região C-terminal.

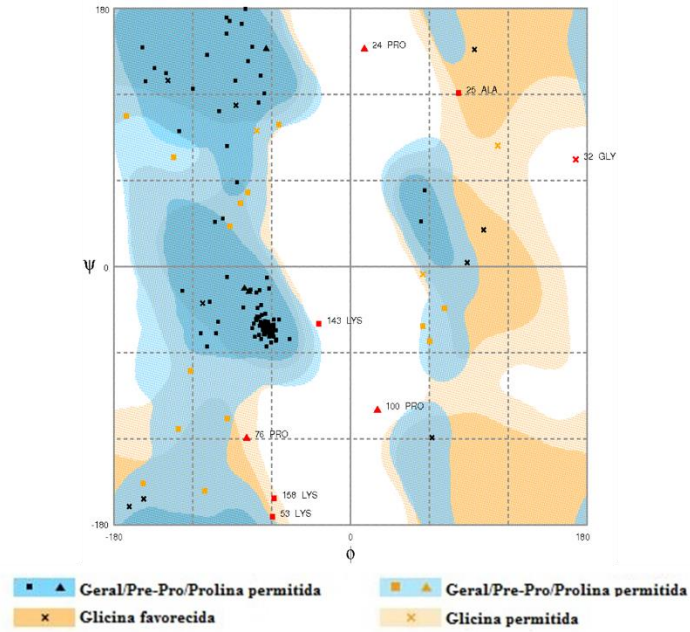


Figura 73. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVAc gerado pelo programa *Quark*.

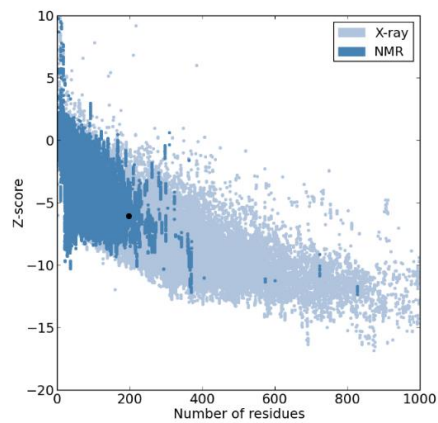


Figura 74. Resultado do programa *ProSA* para o modelo da GVAc gerado pelo *Quark*, retornando a pontuação Z-score de aproximadamente -5, indicando que o modelo está dentro da gama de pontuações tipicamente encontrada para proteínas nativas de tamanhos similares revolidas experimentalmente (NMR em azul escuro e raio-X em azul claro).

```

IAFFPAITQEQMSSIKVDP--TSNLL-PSQEQLKSVSTLMVAAKVPAA---S--VTTVALELVNFCYD--NGSSAYTTVTGPSSI
      . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----MAHYAKRVEIRAIIEELVLAKAQAEDASESGYDRNMYLNTLFGY-I--ALVGTSKK--A-----

PEISLAQLASIVKASGTSL-----RKF-----CRYFA-----PIIWNLRITDKM---
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
----VHYGEVDIVG-PKASKKTGID--PRGKLVV----SELVGRMRTLSVAVSEGPVKGATLRQMCEPLAQNAYDFLVL---MAE

---A--PANWEASGYKPSA-----KFAA--FDFFDG-----V--ENP---AAMQPPSGLTRS
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
MGTYSQLATKMTRSG----FKEPQVMDFASGL---DLKALTLQEATVIQAMHSRLFRTEGAKGVFNAQSSVGEQAVE-----

PTQEERIANATN-
-----I

```

Figura 75. Comparação da estrutura da GVAcp gerada pelo *Quark* com a estrutura do PapMVcp utilizando o programa *TM-align*. A sequência de aminoácidos na linha superior se refere à proteína PapMVcp e a inferior à GVBcp. Pares de resíduos alinhados menores que 5 Å (:), indicando similaridade estrutural, e (.) indica outros resíduos alinhados.

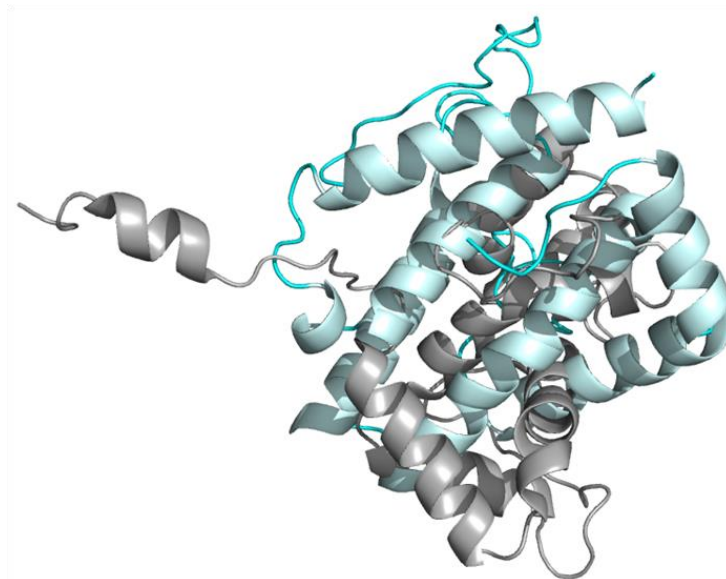


Figura 76. Representação em *cartoon* do alinhamento da estrutura do GVAcp gerado pelo *Quark* (azul) com a estrutura do PapMV (cinza) utilizando o programa *PyMol*.

Finalmente, selecionou-se o modelo gerado pelo *Rosetta* (**Figura 77**) que possuía a menor energia do “cluster” que continha maior número de moldes. O gráfico de Ramachandran apresentou 98,5% de resíduos na região favorável e 1,5% na região permitida (**Figura 78**). Analisando este modelo pelo *ProSA*, verificou-se que o mesmo se encontra dentro da gama de pontuação tipicamente encontrada para proteína nativas de tamanhos similares (**Figura 79**), sugerindo que o modelo não continha erros. Novamente, as estruturas do PapMV e GVAcp foram comparadas, utilizando-se o *TM-align*. Obteve-se um *TM-score*

de aproximadamente 0.317 e RMSD de 5.55, indicando similaridade estrutural aleatória (**Figura 80**). A representação em *cartoon* do alinhamento da estrutura do GVAcp gerado pelo *Rosetta* com a estrutura do PapMV utilizando o programa *PyMol*, pode ser visualizado na **figura 81**.

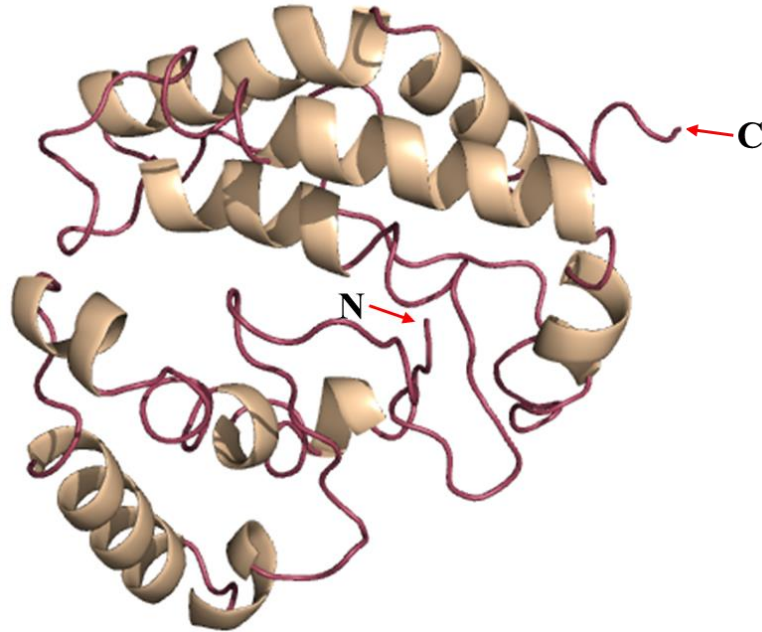


Figura 77. Representação em *cartoon* do modelo da GVAcp com menor energia do "cluster" que continha o maior número de modelos gerados pelo programa *Rosetta*. **N**: região N-terminal; **C**: região C-terminal.

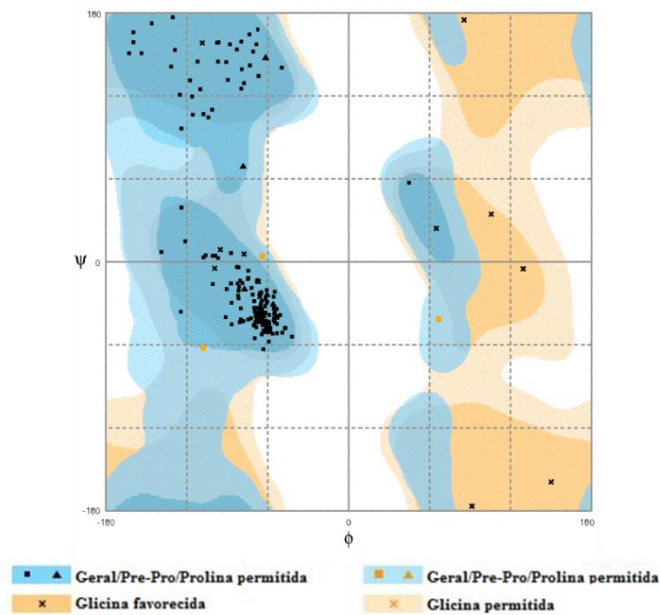


Figura 78. Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína GVAcp gerado pelo *Rosetta*.

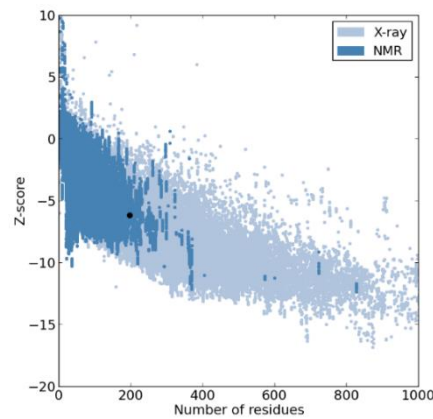


Figura 79. Resultado do programa *ProSA* para o modelo da GVAcp gerado pelo *Rosetta* retornando a pontuação *Z-score* de aproximadamente -5, indicando que o modelo está dentro da gama de pontuações tipicamente encontrada para proteínas nativas de tamanhos similares revolvidas experimentalmente (NMR em azul escuro e raio-X em azul claro).

```

IAFPATIQEQMSSIKVDPTSNLLPSQEQLKSVSTLMVAAKVPA---ASV--TT-VALELVNFCYDNGSSAY-TT-----V--TG-
           .. .. :~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~
-----MAHYA-KRVEIRAIIEELVL--AKAQPAEDASESGYDRNMYLN

-PS--S----IP-EISLAQ-LASIVKAS--GTSLRKFC-----RY-FAPIIWNLRITDKMAP-A-NWEASGYKPSAKFAAF-DFFDG'
:. .   :~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~
TLFGYIALVGTSKKAVHYGEVDI-VG--PKASKK-TGIDPRGKLVVSELVGRMRTL-S-VAVSEGPVKG--ATLRQMCEPLAQNAYD

VENPA-----A--MQ-----P---PSGL-TRS-----PTQEERIANATN-----
~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~~::~
FLVLM AEMGTYSQLATKMTSGFKPEQVMFDFASGLDLKALTLQEATVIQAMHSRLF-----RTEGAKGVFNQSSVGEQAVEI

```

Figura 80. Comparação da estrutura da GVBcp gerada pelo *Rosetta* com a estrutura do PapMVcp utilizando o programa *TM-align*. A sequência de aminoácidos na linha superior se refere à proteína PapMVcp e a inferior à GVBcp. Pares de resíduos alinhados menores que 5 Å (:), indicando similaridade estrutural, e (.) indica outros resíduos alinhados.

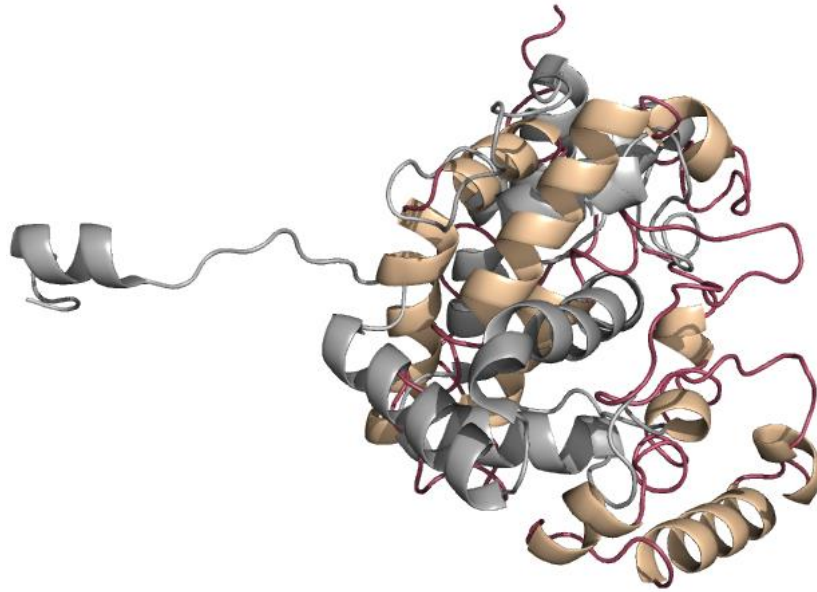


Figura 81. Representação em cartoon do alinhamento da estrutura do GVAcP gerado pelo Rosetta (morrom) com a estrutura do PapMV (cinza) utilizando o programa PyMol.

5. Discussão

As proteínas capsidiais (CPs) de vírus de plantas são definidas baseado nas suas habilidades de formar estruturas ordenadas que encapsidam o ácido nucléico viral. Entretanto, a encapsidação é somente uma das características de um conjunto de funções estruturais e papéis ecológicos desempenhados durante a infecção e disseminação viral. É conhecido que as proteínas capsidiais de alguns vírus de plantas operam em praticamente todo aspecto da multiplicação e disseminação viral, incluindo assistência na replicação do ácido nucléico viral, movimento entre células e órgãos, e transporte de plantas infectadas para as não infectadas via vetores móveis biológicos (CALLAWAY, 2001; BOL, 2008).

De acordo com Galiakparov e colaboradores (2003), a proteína capsidial do *Grapevine virus A* (espécie-tipo do gênero *Vitivirus*), além da proteína do movimento (MP), é requerida para o movimento do vírus célula-a-célula, mas não é requerida no processo de replicação viral.

Na literatura, trabalhos referentes à caracterização estrutural da proteína capsidial dos vírus pertencentes à família *Betaflexiviridae* são inexistentes. Até o presente momento, somente é conhecida uma estrutura tridimensional da proteína capsidial de um vírus filamentosso flexuoso (*Papaya mosaic virus*), pertencente à família *Alphaflexiviridae*, que foi obtida por difração de raios-X (YANG et al., 2012).

Dessa forma, para a realização deste trabalho foi necessário a elaboração de um protocolo de expressão em *E. coli* para que pudéssemos obter concentrações de proteínas capsidiais relativamente altas (em torno de 5 mg/mL). Pois, de acordo com Gaspar (2010, comunicação pessoal), obtém-se uma concentração muito baixa de vírus quando extraídos e purificados a partir de plantas infectadas. Além disso, devido ao tamanho do vírion (aproximadamente 700 nm), a sua utilização nos ensaios de cristalização se torna impossível, tendo em vista que é necessária soluções de proteínas monodispersas preferencialmente na forma monomérica.

A produção de proteínas em *E. coli* geneticamente modificadas tem permitido a obtenção de proteínas para caracterização bioquímica, produção de anticorpos, determinação da estrutura tridimensional, entre outros (RÜCKER et al., 2001). Além disso, a expressão de proteínas heterólogas com cauda de histidina fusionada (His-tag) tem possibilitado a obtenção de proteínas com alto grau de pureza para ensaios cristalográficos, necessários para a compreensão da estrutura e função da proteína alvo (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Por outro lado, a proteína produzida nem sempre é adequada para o uso imediato, podendo

ocorrer degradação proteolítica (ENFORS., 1992) ou formar agregados de proteínas insolúveis não funcionais, como corpos de inclusão (GEORGIU; VALAX, 1996).

A genética apropriada para a produção de proteínas solúveis não foi estabelecida. No entanto, a agregação das proteínas pode ser minimizada controlando-se os parâmetros de alguns processos como: temperatura (CHARLMERS et al., 1990), reduzindo a taxa de expressão do gene recombinante (GALOWAY et al., 2003) ou ajustando a utilização do codon (IMAMURA et al., 1999), por engenharia de proteína (FORRER; JAUSSE, 1998), ou pela co-expressão de chaperonas (WALL; PLÜCKTUN, 1995). Entretanto, essas estratégias não resultam no mesmo grau de sucesso para diferentes polipeptídeos (NISHIHARA et al., 1998), pois as proteínas frequentemente apresentam propriedades físico-químicas diferentes, e as condições ideais de expressão para uma dada proteína não são iguais para todas as proteínas (BRAUN et al., 2002), tornando-se um processo de tentativa e erro.

Adotando-se a expressão das proteínas capsidiais clonadas no vetor pET28a sob baixa temperatura (18 °C), utilizando-se o meio de cultura auto-indutivo (STUDIER, 2005) e o método do choque térmico e osmótico (OGANESYAN et al., 2007), foi possível obter uma concentração de proteína (aproximadamente 5 mg/mL) na condição nativa com um alto grau de pureza (mais de 95%, coradas com comassie), suficiente para que os experimentos de dicroísmo circular, espalhamento dinâmico de luz e os ensaios de cristalização fossem conduzidos. A estratégia adotada para remover a cauda de histidina foi essencial para melhorar a estabilidade das proteínas, pois todas as “tags”, pequenas ou grandes, têm o potencial de interferir com a atividade biológica da proteína e/ou pode impedir sua cristalização, por essa razão, é aconselhável remover as “tags” em algum estágio (CHANT et al., 2005; GOEL et al., 2000).

O desafio para determinar a estrutura de um cristal de proteína capsidial de qualquer vírus filamentosos tem sido produzir uma proteína capsidial de baixo estado oligomérico, que não seja propensa à agregação (LECOURS et al., 2006), pois agregação não específica é prejudicial para a formação de cristais, que requer um núcleo ordenado para adicionar moléculas adicionais (BERGFORS, 1999).

Proteínas capsidiais heterólogas de vírus são capazes de realizar o “self-assembly” mesmo na ausência do RNA viral, formam partículas similares a dos vírions (KUMAR et al., 1997; YUSIBOV et al., 1996; LI et al., 1997; PHELPS et al., 2007; ZHAO et al., 1995), e é influenciado pela força iônica, pH, concentração das proteínas capsidiais e temperatura (KEGEL & van der SCHOOT; 2006; SERRÈRE et al., 2013). Similarmente, sabe-se que as proteínas capsidiais do *Papaya mosaic virus*, vírus filamentosos e flexuosos, pertencente à

família *Alphaflexiviridae*, quando produzidas em *E. coli*, são capazes de se polimerizarem em nanopartículas que se assemelham ao vírus selvagem purificado de plantas infectadas (TREMBLAY et al., 2006). Estes relatos corroboram os resultados da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), que mostraram várias populações com diversas massas moleculares e raios hidrodinâmicos, e a agregação induzida pela temperatura (quando experimentos de DLS foram conduzidos a 25° C, dados não mostrados), sugerindo que as proteínas capsidiais compartilham algumas dessas características descritas.

Em relação às características secundárias, os resultados dos experimentos de difração circular (CD) mostraram bandas características de estruturas alfa hélices, indicando claramente que as conformações das proteínas capsidiais são dominadas por estruturas helicoidais. Do mesmo modo, estudos de difração circular vibracional realizados com as proteínas capsidiais dos vírus filamentosos *Potato virus X* (PVX), *Papaya mosaic virus* (PapMV) e *Narcissus mosaic virus*, mostraram que as proteínas capsidiais desses vírus são dominadas por estruturas helicoidais (SHANMUGAM et al., 2005).

Informação estrutural de alta resolução para os vírus filamentosos flexuosos tem sido deficiente apesar de décadas de estudo (BARATOVA, et al., 1992; PARKER, KENDALL, STUBBS, 2002; TOLLIN et al., 1979). Devido à falta de informações estruturais sobre proteínas capsidiais homólogas às proteínas capsidiais do GVA e GVB, a construção de um modelo tridimensional poderia ser muito informativo. Então, os programas *I-Tasser*, *Quark* e *Rosetta* foram utilizados com o objetivo de obter alguma informação estrutural tridimensional.

Comparando-se as estruturas geradas pelos programas *I-Tasser*, *Quark* e *Rosetta* para a GVBcp, e foi observado que o melhor modelo foi gerado pelo programa *I-Tasser*. O modelo com maior pontuação foi selecionado, baseado nos resultados da comparação do modelo gerado da GVBcp com a estrutura do PapMV pelo programa *TM-align*. Este modelo apresentou uma pontuação de confiabilidade boa (C-score -4.97) e foi validado pelos programas *ProSA* e *RAMPAGE*. Da mesma forma, o resultado da técnica de CD foi utilizado para validar os modelos, pois a GVBcp possuía na maioria alfa-hélices, corroborando com as estruturas geradas pelos programas, que também apresentaram uma predominância de alfa-hélices. Tendo em vista que o molde utilizado na predição da GVBcp era da estrutura cristalográfica da proteína capsidial do Papaya mosaic virus, as estruturas foram comparadas pelo *TM-align*, cujos resultados sugerem que as estruturas possuem semelhança estrutural. O alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas capsidiais do GVBcp e PapMV mostraram 40 resíduos de aminoácidos conservados, porém os aminoácidos importantes para o

mecanismo de troca do PapMV não estavam conservados. Além disso, a região N-terminal responsável pela interação com a bolsa hidrofóbica da molécula vizinha não foi modelada na GVBcp. Assim, os resultados sugerem uma semelhança estrutural entre as proteínas GVBcp e PapMVcp, mas não uma semelhança funcional.

Da mesma forma, as estruturas do GVAcP geradas pelo *I-Tasser*, *Quark* e *Rosetta* foram comparadas, e observou-se que o melhor modelo foi gerado pelo programa *I-Tasser*. O modelo com maior pontuação foi selecionado, baseado nos resultados da comparação do modelo gerado da GVAcP com a estrutura do PapMV. Este modelo apresentou uma pontuação de confiabilidade razoavelmente boa (C-score -3.85) e foi validado pelos programas *ProSA* e *RAMPAGE*. Da mesma forma, o resultado da técnica de CD foi utilizado para validar os modelos, pois a GVAcP possuía na maioria alfa-hélices, corroborando com as estruturas geradas pelos programas, que também apresentaram uma predominância de alfa-hélices. A estrutura da GVAcP gerada pelo *I-Tasser* foi comparada com a estrutura cristalográfica da PapMVcp pelo *TM-align*, e os resultados sugerem que as estruturas possuem semelhança estrutural. O alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas capsidiais do GVAcP e PapMV mostraram 36 resíduos de aminoácidos conservados, mas os aminoácidos importantes para o mecanismo de troca do PapMV não estavam conservados. Além disso, a região N-terminal responsável pela interação com a bolsa hidrofóbica da molécula vizinha não foi modelada na GVAcP. Assim, os resultados sugerem uma semelhança estrutural entre as proteínas GVAcP e PapMVcp, mas não uma semelhança funcional.

As proteínas capsidiais de vírus flexuosos possuem a mínima significância de similaridades de sequência. Em geral, em todas as proteínas capsidiais, há mais conservação estrutural entre as proteínas capsidiais de vírus flexuosos que as comparações das sequências de aminoácidos sugerem, dando suporte à evolução convergente da estrutura da proteína, e que é possível gerar as mesmas características usando diferentes resíduos de aminoácidos (CALLAWAY et al., 2001).

Yang e colaboradores (2012), sugeriram o mecanismo de montagem N-terminal, pela qual as subunidades da PapMVcp são ligadas às interfaces laterais pelo peptídeos salientes da região N-terminal. Esse mecanismo é compatível com a observação bioquímica que a proteína capsidial sozinha é propensa à agregação, e é capaz de formar partículas similares a do vírus selvagem mesmo na ausência do RNA. Além disso, sugeriu-se que a articulação flexível da alça na região N-terminal, pode parcialmente contar para a natureza flexível da grande família de vírus filamentosos de plantas. Entretanto, a região N-terminal supostamente responsável

pelo mecanismo de troca não foi modelada nos modelos gerados pelos programas, portanto, a resolução da estrutura das proteínas capsidiais é necessária para a compreensão do mecanismo de polimerização das proteínas capsidiais do GVA e GVB.

Com o objetivo de obter cristais adequados para experimentos de difração de raios-X, para que as estruturas das proteínas fossem resolvidas, testes de cristalização foram conduzidos, utilizando-se proteínas com e sem cauda de histidina. Foram obtidos cristais iniciais das proteínas capsidiais do GVA e GVB até o presente momento. Agulhas e outros pequenos cristais foram obtidos para a proteína capsidial do GVA contendo cauda de histidina, durante estágio de pesquisa, no laboratório do nosso colaborador Dr. Christian Betzel, e após a remoção da cauda de histidina, em experimentos conduzidos em nosso laboratório, foi observada a formação de agulhas em outras condições. Entretanto, a otimização dessas condições de cristalização gerou os mesmos resultados.

Os vírus estão cada vez mais sendo usados na engenharia e nanotecnologia, como ferramentas e blocos de construção para a eletrônica, química e ciências biomédicas (SINGH; GONZALEZ; MANCHESTER, 2006; YOUNG et al, 2008; SOTO; RATNA, 2010). Por exemplo o sistema de expressão da CP do vírus filamentosso flexuoso *Papaya mosaic virus*, foi utilizado para a engenharia de nanopartículas quiméricas recombinantes, e podem ser utilizados como adjuvante (DENIS et al., 2008, SAVARD et al., 2011) ou como plataforma de vacinas (DENIS et al., 2007, LACASSE et al., 2008). As nanopartículas parecem ser percebidas pelo sistema imune inato, sendo assim, excelentes moléculas imuno-modulatórias para melhorar a vacina da gripe sazonal (SAVARD et al., 2011) ou candidato à vacina da febre tifóide (ACOSTA-RAMIREZ et al., 2008).

Assim, levando em consideração a ampla gama de funções desempenhadas pelas CPs, juntamente com um vasto campo de aplicações, é de grande importância elucidar as propriedades físico-químicas e estruturais das proteínas capsidiais do GVA e GVB.

Este trabalho fornece resultados preliminares essenciais para trabalhos posteriores envolvendo essas proteínas com o intuito de obter-se uma melhor compreensão dos mecanismos de encapsidação e interação das subunidades na formação do capsídeo, a partir da resolução das estruturas cristalográficas. Além disso, utilizando-se o protocolo de expressão e purificação descrito neste trabalho, pode-se obter altas concentrações de proteínas capsidiais com um alto grau de pureza e solubilidade, enoveladas, adequadas para a produção de anticorpos contra essas proteínas, com o objetivo de detectar plantas infectadas em campo.

6. Conclusões

No presente estudo, foi elaborado um protocolo para a expressão solúvel e purificação das proteínas capsidiais do GVA e GVB para futuros estudos estruturais. Além disso, com o intuito de obter informações importantes sobre a estrutura tridimensional das proteínas, para futuramente otimizar a obtenção de cristais, estudos “*in silico*” foram conduzidos utilizando-se as técnicas de *threading* e *ab initio* pelos programas *I-Tasser*, *Quark* e *Rosetta*.

- Foi elaborado um protocolo de expressão e purificação, que permitiu a obtenção das proteínas capsidiais em alta concentração, com um alto grau de pureza e solubilidade;
- Os resultados das análises de dicroísmo circular mostraram que as proteínas estavam enoveladas e adequadas para os ensaios de cristalização;
- Os resultados da técnica de espalhamento dinâmico de luz mostraram que a GVBcp estava agregada e polidispersa, e a GVAcp, após a cromatografia de exclusão molecular, estava monodispersa e na forma dimérica;
- Os melhores modelos tridimensionais selecionados que foram gerados pelo programa *I-Tasser*, quando alinhados à estrutura cristalográfica do PapMv pelo *TM-align*, sugerem que as proteínas capsidiais compartilham o mesmo enovelamento SCOP/CATH, porém não apresentam semelhança funcional;
- Os cristais obtidos da GVAcp devem ser otimizados, para que sua estrutura seja resolvida, com o objetivo de compreender o mecanismo de polimerização das proteínas capsidiais.

7. Perspectivas Futuras

Com sucesso foi elaborado um protocolo de expressão e purificação para que as proteínas capsidiais possam ser expressas e purificadas com um alto grau de pureza e em quantidades suficientes para futuros ensaios de cristalização. Foram obtidos cristais iniciais da proteína capsidial do GVA em várias condições, e acreditamos estarmos próximos da obtenção de cristais adequados para experimentos de difração, que possibilitará a resolução da estrutura dessa proteína para compreendermos seu mecanismo de polimerização. Dessa forma, continuaremos a conduzir os ensaios de cristalização e a otimização das condições de cristalização encontradas, e utilizaremos a técnica da proteólise *in situ* na cristalização, mesmo após o término deste projeto. Concomitantemente, iremos entrar em contato com outros grupos com o objetivo de produzir anticorpos, pois as proteínas capsidiais são obtidas na forma nativa em altas concentrações, com um alto grau de pureza e solubilidade.

8. Referências

- ACOSTA-RAMIREZ, E. et al. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of *papaya mosaic virus*. **Immunology**, vol. 124, p. 186-197, 2008.
- ADAMS, M.J. et al. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, vol. 149, p.1045-1060, 2004.
- AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças de videira. In: KIMATI H., AMORIM L., BERGAMIN A., ARANHA L.E.A., REZENDE J.A.M. (Org). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 736-757, 1997.
- ANINDYA, R; SAVITHRI, H.S. Surface-exposed amino- and carboxy-terminal residues are crucial for the initiation of assembly in *Pepper vein banding virus*: a flexuous rod-shaped virus. **Virology**, v. 316, p. 325-336, 2003.
- BARATOVA, L.A. et al. The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. **Virology**, v. 188, p. 175-180, 1992.
- BERGFORS, T.M. **Protein Crystallization : Techniques, Strategies and Tips**. IUL Biotechnology Series, International University Line, La Jolla, California, 1999.
- BOL, J.F. Role of Capsid Proteins. **Methods in Molecular Biology**, vol. 451, p. 21-31, 2008.
- BOL, J.F.; VAN VLOTEN-DOTING, L.; JASPARS, E.M.J. A functional equivalence of top component α RNA in the initiation of infection by *Alfalfa mosaic virus*. **Virology**, vol. 46 p. 73-85, 1971.
- BRAUN, P. et al. Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. **PNAS** 99: 2654-2659, 2002.
- BRAHMS, S.; BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. **J. Mol. Biol.**, v. 138, p. 149-178, 1980.
- BUCHER, M.H.; EVDOKIMOV, A.G.; WAUGH, D.S. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, p. 392-397, 2002.
- CALLAWAY, A. et al. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 39, p. 419-60, 2001.
- CARRINGTON, J.C. et al. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. **Plant Cell**, vol. 8, p. 1669-81, 1996.
- CARSTENS, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Arch. Virol.**, v. 155, p. 133-146, 2010.
- CHALMERS, J. et al. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamases or human epidermal growth factor. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 56, p.104-111, 1990.

- CHANT, A. et al. Attachment of histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. **Protein Expr Purif**, vol. 39, p. 152-159, 2005.
- CHOI, S. et al. Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from *Saccharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology. **Biotechnol Bioeng**, vol. 75, p. 718-724, 2001.
- DENIS, J. et al. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the *papaya mosaic virus* (PapMV) vaccine platform. **Vaccine**, vol. 26, p. 3395-3403, 2008.
- DENIS, J. et al. Immunogenicity of *papaya mosaic virus-like* particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. **Virology**, vol. 363, p. 59-68, 2007.
- DONG, A. et al. *In situ* proteolysis for protein crystallization and structure determination. **Nature Methods**, vol. 4(12), p. 1019-1021, 2007.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, **Nucleic Acids Research**, vol. 32(5), 1792-97, 2004.
- ENFORS, S.O. Control of *in vivo* proteolysis in the production of recombinant proteins. **Trends Biotechnol.**, vol. 10, p. 310-315, 1992.
- ERICKSON, J.; ROSSMANN, M. Assembly and crystallization of a T = 1 icosahedral particle from trypsinized *Southern Bean Mosaic virus* coat protein. **Virology**, vol. 116, p. 128-136, 1982.
- FAUQUET, C.M. et al. Virus Taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. **Elsevier Academic Press**, 2005.
- FERRÉ-D'AMARÉ, A.R.; BURKLEY. S.K. Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. **Methods in enzymology**, vol . 276, p. 157-166, 1997.
- FONDA, I. et al. Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor-alpha drastically changes its properties. **Sci World J**, vol. 2, p. 1312-1325, 2002.
- GALIAKPAROV, N. et al. Functional analysis of the *grapevine virus A* genome. **Virology**, vol. 306, p. 42-50, 2003.
- GALLOWAY, C.A.; SOWDEN, M.P.; SMITH, H.C. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. **Biotechniques**, vol. 34, p. 524-526, 2003.
- GEORGIU, G.; VALAX, P. Isolating inclusion bodies from bacteria. **Meth. Enzymol.**, vol. 309, p. 48-58, 1996.

- GHOSHROY, S. et al. Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, vol. 48, p. 27-50, 1997.
- GOEL, A. et al. Relative position of the hexahistidine tag affects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. **Biochim Biophys Acta**, vol. 1523, p. 13-20, 2000.
- GRANITI, A.; CICCARONE, A. Osservazioni su alterazioni virosiche e virus-simili della vite in Puglia. **Noriziario Sulle Malattie Delle Piante**, v. 55, p 99-102, 1961.
- GRAY, S.M. Plant virus proteins involved in natural vector transmission. **Trends Microbiol.**, vol. 4, p. 259-64, 1996.
- GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, vol. 8, p. 4108-4116, 1969.
- IMAMURA, H. et al. High level expression of *Thermococcus litoralis* 4-alpha-glucotransferase in soluble form in *Escherichia coli* with a novel expression system involving minor arginine tRNAs and GroELS. **FEBS Lett.**, vol. 457, p. 393-396, 1999.
- JASPARS, E.M.J. Interaction of *Alfalfa mosaic virus* nucleic acid and protein. **Molecular Plant Virology**, Boca Raton, FL: CRC Press, p. 155-225, 1985.
- JENNY, R.J.; MANN, K.G.; LUNDBLAD, R.L. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. **Protein Expr Purif**, vol. 31, p. 1-11, 2003.
- JOHNSON, W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. **Proteins: Struct. Funct. Genet**, vol. 35, p. 307-312, 1999.
- KAUFMANN, K. W. et al. Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you. **Biochemistry**, vol. 49, p. 2987-2998, 2010.
- KEGEL, L.; van der SCHOOT. Physical regulation of the self-assembly of Tobacco Mosaic virus coat protein. **Biophysical journal**, vol. 91, p. 1501-1512, 2006.
- KIM, D.E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Research**, vol. 32, 2004.
- KRAKE, L.R. et al. Graft-transmitted Diseases of Grapevines. **Collingwood: CSIRO**, p. 45-52, 1999.
- KUHN, G.B. Intumescimento dos ramos da videira ("Corky Bark"), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, vol. 17, p. 399-406, 1992.
- KHUN, G.B. Manchas das nervuras da folha da videira (*Vitis* spp.), doença constatada no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 27, p. 639-643, 2002.

KUHN, G.B.; FAJARDO, T.V.M. *Viroses da Videira no Brasil*, 2013. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/viroses.html>>. Acessado em Janeiro de 2014.

KUMAR, A. et al. The structure of Alfafa Mosaic virus capsid protein assembled as a T=1 icosahedral particle at 4.0 Å resolution. **Journal of Virology**, p. 7911-7916, 1997.

KUNIYUKI, H. Nota sobre a ocorrência do “cascudo”, moléstia semelhante ao “legno riccio” em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, vol. 5, p. 137, 1972.

KUNIYUKI, H.; COSTA, A.S. Estudos sobre a virose fendilhamento cortical da videira em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, vol. 7, p. 71-81, 1982.

LACASSE, P. et al. Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. **J. Virol**, vol. 82, p. 785-794, 2008.

LAZAROWITZ, S.G.; BEACHY, R.N. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. **Plant Cell**, vol. 11, p. 535-48, 1999.

LEES, J. G. et al. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. **Bioinformatics**, v. 22, p. 1955-1962, 2006.

LIMA, M.F. Principais viroses de videira. In: *Uvas de Mesa: Fitossanidade* (Lima M. R., ed). Brasília. **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 35-44, 2002.

LECOURS et al. Purification and biochemical characterization of a monomeric form of papaya mosaic potexvirus coat protein. **Protein Expression and Purification**, vol. 42, p. 273-280, 2006.

LI, TIAN-CHENG et al. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of Hepatitis E virus. **Journal of Virology**, p. 7207-7213, 1997.

LOVELL, S.C. et al. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins: Structure, Function & Genetics**, vol. 50, p. 437-450, 2002.

LUNDBACK, A.K. et al. Exploring the activity of tobacco etch virus protease in detergent solutions. **Anal Biochem**, vol. 382, p. 69-71, 2008.

MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 2000-2003. In: *Meeting of International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevines*, 14., 2003, Locorotondo. **Extended Abstracts: ICVG**, p. 3-10, 2003.

MARTELLI, G.P. Rugose wood complex. In: MARTELLI, G. P. (Org.). *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Rome: FAO Publication Division, 1993. p. 43-45.

MINAFRA, A. Rugose wood grapevines. In: **Extended Abstracts 13 th ICVG Conference, Adelaide, Australia**, 30-34, 2000.

McGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, vol. 16, p. 404-405, 2000.

MOHANTY, A.K.; SIMMONS, C.R.; WEINER, M.C. Inhibition of tobacco etch virus protease activity by detergents. **Protein Expr Purif**, vol. 27, p. 109-114, 2003.

MOREIRA, A.E. et al. Caracterização do gene da proteína capsial de dois isolados, patologicamente distintos e sorologicamente semelhantes, do *Grapevine virus B* em videiras no Estado de São Paulo. **Fitopatol. Bras.**, vol. 29 (1), p. 75-80, 2004a.

MOREIRA, A.E. et al. Caracterização do gene da proteína capsial do *Grapevine virus A* em videiras afetadas pela acanaladura do lenho de Kober no Estado de São Paulo. **Fitopatol. Bras.**, vol. 29(2), p. 205-208, 2004b.

NALLANETTY, S. et al. Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro. **Protein Expr Purif**, vol. 38, p. 108-115, 2004.

OGANESYAN, N. et al. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. **Protein Expression and Purification**, vol. 52, p. 280-285, 2007.

PARKER, L.; KENDALL, A.; STUBBS, G. Surface features of potato virus X from fiber diffraction. **Virology**, vol. 300, p. 291-295, 2002.

PHHELPS, J. et al. Expression and self-assembly of Cowpea Chlorotic Mottle virus-like particles in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Biotechnology**, vol. 128, p. 290-296, 2007.

RAMACHANDRAN, GN.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, vol. 7, p. 95-99, 1963.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-Tasser: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, vol. 5(4), p. 725-738, 2010.

RÜCKER, E. et al. Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. **Protein Expression and Purification**, vol. 21, p. 220-223, 2001.

RYABOV, E.V. et al. Host-specific cell-to-cell and long-distance movements of *Cucumber mosaic virus* are facilitated by the movement protein of *Groundnut rosette virus*. **Virology**, vol. 260, p. 98-108, 1999.

RYABOV, E.V. et al. Intracellular location of two *Ground nut rosette Umbravirus* proteins delivered by PVX and TMV vectors. **Virology**, vol. 242, p. 303-313, 1998.

SAMBROOK, J.; & RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^a Ed. ColdSpring Harbor Press, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A. Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus. **Biophys J.**, vol. 71(3), p. 1641-1650, 1996.

SAVARD, C. et al. Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles. *PloS One*, vol. 6, p. e21522, 2011.

SAVINO, V.; BOSCIA, D.; MARTELLI, G.P. Rugose wood complex of grapevine: can grafting to *Vitis* indicators discriminate between diseases? **Proceedings, 9th Meeting of the ICVG**, Kiryat Anavim, p. 91-94, 1989.

SHANMUGAN, G. et al. Structures of viruses from vibrational circular dichroism. **J. Gen. Virol**, vol. 86, p. 2371-77, 2005.

SERRIÈRE, et al. Biophysical Characterization of the Feline Immunodeficiency Virus p24 Capsid Protein Conformation and In Vitro Capsid Assembly. **PLoS One**, vol. 8 (2), p. 1-11, 2013.

SINGH, P.; GONZALEZ, M.J.; MANCHESTER, M. Viruses and their uses in nanotechnology. **Drug Development Research**, vol. 67, p. 23-41, 2006.

SIPPL, M.J. Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. **Proteins**, vol. 17, p. 355-362, 1993.

SOTO, C.M.; RATNA, B.R. Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, vo. 21, p. 426-438, 2010.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Anal. Biochem.**, vol. 287, p. 252-260, 2000.

STUDIER, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, vol. 41, p. 207-234, 2005.

TOLLIN, P. et al. Diffraction studies of papaya mosaic virus. **Virology**, vol. 98, p. 108-115, 1979.

TREMBLAY, M.H. et al. Effect of mutations K97A and E128A on RNA binding and self assembly of papaya mosaic potexvirus coat protein. **FEBS J.**, vol. 273, p. 14-25, 2006.

TROPEA, J.E.; CHERRY, S.; WAUGH, D.S. Expression and purification of soluble His(6)-tagged TEV protease. **Methods Mol. Biol.**, vol. 498, p. 297-307, 2009.

WALL, J.G.; PLÜNCKTUN, A. Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, vol. 6, p. 507-516, 1995.

WERNIMONT, A.; EDWARDS, A. *In situ* proteolysis to generate crystals for structure determination: an update. **PLoS One**, vol. 4(4), p. 1-3, 2009.

WIEDERSTEIN, M; SIPPL, M.J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, vol. 35, Web Server Issue W407-W410, 2007.

XU, D.; ZHANG, Y. *Ab initio* protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. **Proteins**, vol. 80 (7), p. 1715-1735, 2012.

YANG et al. Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous Papaya Mosaic virus. **Journal of Molecular Biology**, vol. 422, p. 263-273, 2012.

YOUNG, M. et al. Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. **Annu. Rev. Phytopathol.**, vol. 46, p. 361-384, 2008.

YUSIBOV, V. et al. Purification, characterization, assembly and crystallization of assembled Alfafa Mosaic virus coat protein expressed in *Escherichia coli*. **Journal of General Virology**, vol. 77, p. 567-573, 1996.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, vol. 9(40), 2008.

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic Acids Research**, vol. 33(7), p. 2302-09, 2005.

ZHAO, X. et al. *In vitro* assembly of Cowpea Chlorotic Mottle virus from coa protein expressed in *Escherichia coli* and *in vitro* transcribed viral cDNA. **Virology**, vol. 207 (2), p. 486-494, 1995.

AUTORIZAÇÃO INTEGRAL

Nome do autor: Vinicius dos Santos Santana

CPF:33690399823 **Telefone:** (17) 33646084

E-mail do autor: vds.santana@gmail.com

Autoriza a divulgação deste endereço eletrônico na C@thedra? Sim Não

Dissertação de Mestrado **Tese de Doutorado** **Tese de Livre-Docência**

Título: Expressão, purificação e caracterização estrutural *in silico* das proteínas capsidiais do *Grapevine virus A e B*

Palavras-chave: 1. Bioquímica. 2. Vírus de plantas. 3. Proteínas capsidiais -Purificação. 4. cristalização

Campus: São José do Rio Preto-SP

Programa de Pós-Graduação: Microbiologia

Área de Concentração: Bioquímica de microrganismos

Linha de Pesquisa: Cristalografia de proteínas

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni

Banca: Prof^a. Dr^a. Priscila Belintani, Prof^a. Dr^a. Ana Theresa Silveira de Moraes, Prof^a. Dr^a. Alessandra Vidotto, Prof. Dr. Fábio Rogério de Moraes.

Data da defesa: 06/05/2014

(X) AUTORIZO a Universidade Estadual Paulista (UNESP), a publicar em ambiente digital institucional, sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto integral da obra acima citada, em formato PDF, a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade, em conformidade com o estabelecido pela CAPES (**PORTARIA No- 13, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2006**).

Data: 20/05/2014.



Assinatura do(a) autor(a)

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 20/05/2014

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'U. Santana', is written above a horizontal line.

Assinatura