



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

**LUANA GONÇALES GARCIA**

Biologia Estrutural:  
Expressão e Caracterização Estrutural da Proteína 25K do  
*Cole latent virus*

**São José do Rio Preto - IBILCE/UNESP**

**Março de 2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

**LUANA GONÇALES GARCIA**

**Biologia Estrutural:**  
**Expressão e Caracterização Estrutural da Proteína 25K do**  
*Cole latent virus*

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos 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

Coorientador: Prof. Dr. José Osmar Gaspar

**São José do Rio Preto - IBILCE/UNESP**

**Março de 2012**

Garcia, Luana Gonçalves.

Biologia estrutural : expressão e caracterização estrutural da proteína 25K do *Cole latent virus* / Luana Gonçalves Garcia. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

46 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Raghuvir Krishnaswamy Arni

Coorientador: José Osmar Gaspar

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Proteínas – Estrutura. 3. Dicroísmo circular. 4. Clonagem. I. Arni, Raghuvir Krishnaswamy. II. Gaspar, José Osmar. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.112

**LUANA GONÇALES GARCIA**

**Biologia Estrutural:  
Expressão e Caracterização Estrutural da Proteína 25K do  
*Cole latent virus***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos 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.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni  
Professor Titular  
UNESP- São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey  
Professor Assistente Doutor  
UNESP- São José do Rio Preto

Profa. Dra. Priscila Belintani  
Professor Doutor  
UNORP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 13 de março de 2012

*Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da  
minha vida:*

*Aos meus pais, Carlos e Marlene, por todo amor,  
apoio e dedicação dados a mim em todos os  
momentos da minha vida.*

*Às minhas irmãs, Juliana e Mariana, ao meu  
cunhado José, à minha avó Lourdes e à minha  
sobrinha Beatriz, por toda a amizade, apoio e  
alegrias que me proporcionaram.*

*Ao meu namorado, Ricardo, por toda a força e  
carinho que me deu nos momentos que mais precisei.*

*Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar o meu caminho.

Ao Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni, por acreditar em mim, pelos ensinamentos e por todas as oportunidades que me proporcionou nesses dois anos.

Ao Prof. Dr. José Osmar Gaspar, pela co-orientação, por ter sido essencial ao meu ingresso na vida científica e pelos primeiros ensinamentos científicos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey, pela ajuda na realização deste trabalho e pela participação enriquecedora na comissão examinadora.

À Profa. Priscila Belintani, pela participação na comissão examinadora deste trabalho e por todos os ensinamentos que foram transmitidos a mim, mesmo que indiretamente.

À Profa. Fátima Pereira de Souza, por todo o apoio nos momentos difíceis e por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos de laboratório, Livia, Ricardo, Vinícius e Tadaiti, por toda a amizade, ajuda e força que me deram todos esses anos inesquecíveis. Vocês foram verdadeiros professores para mim e fizeram com que os dias mais difíceis se tornassem mais agradáveis e divertidos.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular: Anwar, Carol Wilson, Eliana, Hévila, Mônica e Rehana.

À minha família, por me darem toda a base para que eu alcançasse os meus objetivos.

Às minhas amigas de faculdade (Ana Carolina, Carol Stuchi, Daniela, Daniele, Denise, Elô, Gabi, Jaque e Júlia) e de Araçatuba (Carol, Fer, Isa, Lidi, Má e Pri), que me acompanharam nesta caminhada e sempre torceram por mim.

À FAPESP, CAPES e CNPQ, pelo incentivo à pesquisa.

## RESUMO

As atividades realizadas compreenderam a produção de cDNA utilizando primer anti-senso e RNA purificado, amplificação do gene codificador da proteína 25K do *Cole latent virus* (CoLV25K), purificação do fragmento amplificado, ligação em vetor de multiplicação pGEM-T, transformação em células competentes de *Escherichia coli* linhagem TOP 10, purificação do vetor, digestão enzimática com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III, subclonagem no vetor de expressão pET28a, transformação em células competentes de *E. coli* linhagem BL21-RIL, sequenciamento do gene no vetor de expressão e expressão da proteína a 37 °C . Quando expressa a 37 °C, a proteína, de 25 kDa, foi encontrada em sua totalidade nos corpos de inclusão. Dessa forma, a proteína foi purificada sob condição desnaturante (utilizando 8 M de uréia) e submetida à diálise para seu reenovelamento. Após o reenovelamento, a proteína foi concentrada para aproximadamente 3 mg/mL e foram realizadas medidas de dicroísmo circular, para verificar o seu conteúdo de estrutura secundária, e o espalhamento dinâmico de luz, para estimar a distribuição de tamanho das populações de partículas que estão presentes na solução. Os dados da deconvolução do experimento de dicroísmo circular indicam um percentual de 40-46%  $\alpha$ -hélice, 12-14% folha- $\beta$ , 15-22% voltas e 24-28% de outras estruturas, indicando que a proteína está estruturada; e os dados do espalhamento dinâmico de luz mostraram que a proteína encontra-se estável, monodispersa, mas apresenta um complexo de partículas que deve ser removido para que fique nas condições ideais de cristalização. Foram utilizadas também outras técnicas para tentar alcançar a solubilidade da proteína expressa: abaixando a temperatura de expressão para 18 °C, utilizando meio de cultura auto-indutivo e utilizando o método do stress osmótico e choque térmico. Os experimentos para obtenção da proteína na forma solúvel não obtiveram sucesso.

Palavras-chave: clonagem; Carlavirus; expressão; reenovelamento; dicroísmo circular; espalhamento dinâmico de luz.

## **ABSTRACT**

*The experiments performed were, the production of cDNA using anti-sense primers and purified RNA, amplification of the gene encoding the 25K protein of Cole latent virus (CoLV25K), purification of the amplified fragment, cloning in multiplication vector pGEM-T for cell transformation into competent Escherichia coli strain TOP 10, vector purification, enzymatic digestion using the enzymes Bam HI and Hind III, subcloning in expression vector pET28a, transformation into competent cells of E. coli strain BL21-RIL, sequencing of the gene cloned into the expression vector and protein expression at 37 °C. When expressed at 37 °C, the protein with a molecular mass of 25 kDa was detected in inclusion bodies. Thus, the protein was purified under denaturing conditions (using 8 M urea) and subjected to dialysis to stimulate refolding. After refolding, the protein was concentrated to approximately 3 mg / mL and the circular dichroism assay was performed to verify the content of secondary structure, and dynamic light scattering, to estimate the size distribution of particle populations which are present in solution. The data from the deconvolution of circular dichroism experiments indicate a percentage of 40-46%  $\alpha$ -helix, 12-14%  $\beta$ -sheet, 15-22% turns and 24-28% of other structures, indicating a structured protein; and the data of the dynamic light scattering showed that the protein is stable, monodisperse, but forms a large complex of particles which must be separated to before crystallization experiments. Other techniques were used to solubilize the expressed protein: lowering the temperature of expression to 18 °C, using the method of auto-induction and the method of osmotic stress and heat shock. However, these experiments were not successful in obtaining the protein in a soluble form.*

*Keywords: cloning; Carlavirus; expression; refolding; circular dichroism; dynamic light scattering,.*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Micrografia eletrônica mostrando partículas virais alongadas do *Cole latent virus*.  
..... 14
- Figura 2.** Organização genômica do RNA dos carlavírus. Cada ORF está representada por um retângulo. O tamanho das proteínas em kDa está indicado por K e os nomes aparecem sobre/sob cada gene ..... 14
- Figura 3.** Gel nativo de agarose a 1% evidenciando em **A**: fragmento de 725 pares de bases amplificado por PCR; **B**: vetor pET28a ligado ao fragmento, antes da digestão enzimática; **C**: digestão enzimática do vetor pET28a com liberação de fragmento. Fragmento referente ao DNA plasmidial na parte superior do gel e fragmento liberado de aproximadamente 725 pb (seta). **(M)** Marcador molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder (Fermentas)..... 29
- Figura 4.** Seqüência de nucleotídeos (acima) e aminoácidos deduzidos (abaixo) correspondentes ao gene da 25K do CoLV. . O destaque em roxo mostra o start-códon; em azul, a cauda de histidina; em vermelho, o oligonucleotídeo senso (CoLV25KF), iniciando com o sítio de restrição para *Bam*HI (GGATCC); em amarelo, o stop-códon; e em verde, o oligonucleotídeo anti-senso (CoLV25KR), terminando com o sítio de restrição para *Hind*III (AAGCTT). ..... 30
- Figura 5.** Comparação da seqüência do gene codificador da 25K obtida neste trabalho (**A**) com a seqüência obtida por Belintani et al (**B**), mostrando 100 % de similaridade entre os genes. .... 31
- Figura 6.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação a partir do sobrenadante, com expressão feita a 37 °C. **(M)** Marcador para proteínas, Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). **(A)** Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. **(B, C, D, E, F)** Amostras referentes a frações das eluições. **(G)** Amostra de resina coletada após a etapa de eluição. .... 32

**Figura 7.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação do corpo de inclusão, com expressão feita a 37 °C. **(M)** marcador molecular Dalton Mark VII-L (Sigma). Extrato de células: **(A)** antes da indução com IPTG, **(B)** após 4 horas de indução da expressão com 1 mM de IPTG. **(C)** Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. **(D, E, F, G, H)** Amostras referentes a frações das eluições. .... 33

**Figura 8. I.** SDS-PAGE a 12% mostrando expressão em *E. coli* e purificação da CoLV25K usando coluna de níquel. **(M)** Marcador molecular Dalton Mark VII-L (Sigma). Extrato de células: **(A)** antes da indução com IPTG, **(B)** após 4 horas da indução da expressão com 1 mM IPTG, **(C)** CoLV25K purificada com massa molecular estimada de aproximadamente 29 kDa. **II.** “Western-blot” de gel com as mesmas amostras utilizadas no gel I, usando anticorpo monoclonal anti-histidina. **(M)** marcador molecular BenchMark prestained ladder (Invitrogen). Extrato de células: **(D)** antes da indução com IPTG, **(E)** após 4 horas da indução da expressão com 1 mM IPTG, **(F)** CoLV25K purificada com massa molecular estimada de aproximadamente 29 kDa. .... 34

**Figura 9.** SDS- PAGE a 12% mostrando o experimento de reenovelamento da proteína recombinante. **(M)** Marcador molecular BenchMark prestained ladder (Invitrogen), **(A e B)** respectivamente, precipitado (p) e sobrenadante (sn) do experimento utilizando o tampão 1 , **(C e D)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 2, **(E e F)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 3, **(G e H)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 4, **(I e J)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 5, **(K e L)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 6. .... 35

**Figura 10.** Espectro do dicroísmo circular da CoLV25K. A conformação da proteína consiste em (40-46%)  $\alpha$ -hélice, (12-14%) folha- $\beta$ , (15-22%) voltas e (24-28%) outras. .... 36

**Figura 11.** Gráfico bidimensional de DLS mostrando a distribuição radial da partícula em função do tempo. A abundância relativa de cada fração radial é representada em uma escala de cor : vermelho é o maior e azul é o menor. .... 37

**Figura 12.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação a partir do sobrenadante em resina de níquel, com expressão feita a 18°C. **(M)** Marcador para proteínas, Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). **(A)** Corpo de inclusão. **(B)** Sobrenadante. **(C)** Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. **(D, E, F)** Amostras referentes a frações das eluições. **(G)** Amostra coletada da resina após etapa de eluição. .... 38

**Figura 13.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação a partir do sobrenadante em resina de níquel, com auto-indução da expressão. **(M)** Marcador para proteínas, Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). **(A)** Corpo de inclusão. **(B)** Sobrenadante. **(C)** Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. **(D, E, F)** Amostras referentes a frações das eluições. **(G)** Amostra coletada da resina após etapa de eluição ..... 39

**Figura 14.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação a partir do sobrenadante em resina de níquel, após expressão com o método de choque térmico. **(M)** Marcador para proteínas, Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). **(A)** Corpo de inclusão. **(B)** Sobrenadante. **(C)** Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. **(D, E, F)** Amostras referentes a frações das eluições. **(G)** Amostra coletada da resina após etapa de eluição. .... 40

**Figura 15.** “Western-blot” utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina. **(M)** marcador molecular Prestained Molecular Weight Marker (Sigma). **(A)** Amostra contendo o corpo de inclusão do teste de “stress” osmótico e choque térmico. **(B)** Amostra contendo o sobrenadante do teste de “stress” osmótico e choque térmico. **(C)** Amostra contendo o corpo de inclusão da expressão feita a 18 °C. **(D)** Amostra contendo o sobrenadante de expressão feita a 18 °C. **(E)** Amostra contendo o corpo de inclusão de expressão em meio auto-indutivo. **(F)** Amostra contendo o sobrenadante de expressão em meio auto-indutivo..... 41

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BCIP/NBT - *5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate/nitro-blue tetrazolium*
- BSA - *Bovine Serum Albumin/ Albumina Sérica Bovina*
- CD – Dicroísmo Circular
- cDNA – DNA complementar
- CP - Proteína capsidial
- DLS – *Dynamic Light Scattering/Espalhamento Dinâmico de Luz*
- DNA - *Deoxyribonucleic Acid/ Ácido Desoxirribonucleico*
- DTT – Dithiothreitol
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- *E. coli - Escherichia coli*
- IPTG - isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranosídeo
- LB – Luria-Bertani
- MP – Proteína do movimento
- NBT - *Nitroblue terazolium*
- O.D. – *Optical density/ densidade óptica*
- ORF – Open Reading Frame
- PCR – *Polymerase Chain Reaction/ Reação em Cadeia da Polimerase*
- PMSF - Fenilmetilsulfonilflúor
- Rep – Replicase
- RNA – *Ribonucleic Acid/ Ácido Ribonucleico*
- SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
- SDS-PAGE - *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*
- TAE – Tris – Acetato – EDTA
- TGB – *Triple Gene Block/ Bloco Triplo de Genes*
- X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>13</b>
1.1. Características gerais dos fitovírus	13
1.2. <i>Cole latent virus</i>	14
1.3. Produção de proteínas durante a replicação viral	15
1.4. Expressão de proteínas heterólogas em bactérias	15
<b>2. Justificativa</b>	<b>18</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>19</b>
<b>4. Material e métodos</b>	<b>19</b>
4.1. Produção de cDNA	19
4.2. Amplificação por PCR	20
4.3. Purificação do fragmento amplificado	20
4.4. Ligação do fragmento amplificado em vetor para multiplicação (pGEM)	20
4.5. Transformação em célula competente ( <i>Escherichia coli</i> - TOP 10)	20
4.6. Purificação do plasmídeo recombinante	21
4.7. Digestão enzimática com <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III (Promega)	21
4.8. Digestão enzimática e defosforilação do vetor de expressão	21
4.9. Ligação do DNA em vetor de expressão	21
4.10. Digestão enzimática com <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III (Promega)	22
4.11. Transformação em célula competente	22
4.12. Sequenciamento do gene em vetor de expressão pET28a	22
4.13. Testes de expressão	23
4.14. Expressão da proteína recombinante a 37 °C	23
4.15. “Western- blot”	24
4.16. Purificação e reenovelamento da proteína recombinante expressa a 37 °C	24
4.17. Dicroísmo Circular	25
4.18. Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS)	25
4.19. Testes de solubilização	26
4.19.1. Expressão a 18 °C e purificação da proteína recombinante	26
4.19.2. Teste de expressão em meio auto-indutivo	26
4.19.3. “Stress” osmótico e choque térmico	27

4.19.4. “Western-blot”	28
4.20. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%	28
<b>5. Resultados e discussão</b>	<b>28</b>
5.1. Amplificação do gene de interesse, clonagem e sequenciamento	28
5.2. Resultados referentes à expressão feita a 37 °C	31
5.2.1. Expressão e purificação	31
5.2.2. “Western-Blot”	33
5.2.3. Reenovelamento da proteína recombinante	34
5.2.4. Dicroísmo Circular	35
5.2.5. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	36
5.3. Resultados dos testes de solubilização da proteína	37
5.3.1. Expressão a 18 °C e purificação da proteína recombinante	38
5.3.2. Teste de expressão em meio auto-indutivo	38
5.3.3. “Stress” osmótico e choque térmico	39
5.3.4. “Western-Blot”	40
<b>6. Conclusão</b>	<b>41</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b>	<b>42</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Características gerais dos fitovírus

Dentre os fitopatógenos, os vírus são os únicos que não apresentam células nem metabolismo próprio, portanto, dependem da célula hospedeira para executar as funções vitais. São compostos por ácido nucléico (RNA ou DNA) envolto por uma capa de proteínas (capsídeo). Alguns vírus de plantas possuem lipídios, glicoproteínas e até membranas como constituintes (AGRIOS, 1988).

Em geral, os vírus de plantas são alongados ou icosaédricos (isométricos), mas também, existem vírus com formato baciliforme ou sem forma definida. O tamanho dos vírus varia de cerca de 20 nm a 300 nm para vírus isométricos e complexos e 3-25 nm em diâmetro e 200 - 2000 nm em comprimento, para os vírus alongados. Nas células infectadas, em muitos casos, podem-se ver agregados de enormes quantidades de partículas denominados inclusões citoplasmáticas (FIELDS et al, 1996).

Para realizar uma infecção sistêmica na planta hospedeira, os fitovírus precisam superar diversas barreiras. Eles devem entrar na célula através de um ferimento ou inoculação por vetores, iniciar a multiplicação, translocar para as células vizinhas (movimento célula-a-célula) e finalmente para as outras partes da planta (movimento a longa distância).

Durante os processos de infecção, transporte e multiplicação das partículas pela planta, as proteínas virais exercem papel fundamental. Teoricamente, um vírus de planta necessita de apenas três proteínas para completar seu ciclo de vida: uma replicase (Rep), uma proteína de movimento célula-a-célula (MP) e uma proteína capsidial (CP). Porém, alguns vírus podem sintetizar proteínas com outras funções como: fatores de transmissão por vetores ou proteases.

Alguns vírus de planta possuem a função de movimento distribuída a três proteínas, todas essenciais para o movimento, codificadas pelo chamado bloco triplo de genes (“triple gene block” – TGB). A acumulação de sequências genômicas publicadas revelaram a presença do TGB nos gêneros *Carlavirus*, *Potexvirus*, *Allexivirus*, *Foveavirus*, *Hordeivirus*, *Benyvirus*, *Pomovirus* e *Pecluvirus* (MOROZOV & SOLVYEV, 2003).

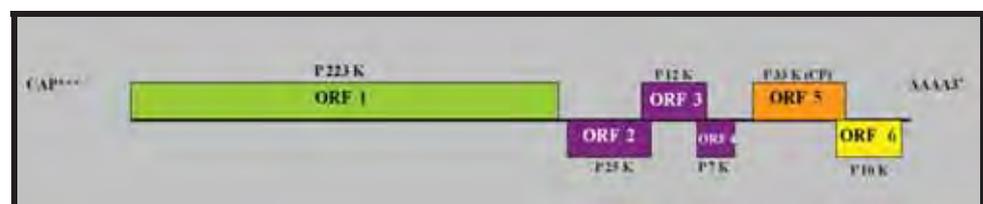
## 1.2. *Cole latent virus*

O *Cole latent virus* (CoLV) é um fitovírus do gênero *Carlavirus*, que apresenta partículas filamentosas com cerca de 650 nm de comprimento e RNA genômico de 8,3 kb envolto por moléculas de proteína capsidial com cerca de 34 kDa. Algumas espécies do gênero *Carlavirus* também podem apresentar RNA subgenômico de 2,1-3,3 kb e 1,3-1,6 kb (FOSTER & MILLS, 1990).



**Figura 1.** Micrografia eletrônica mostrando partículas virais alongadas do *Cole latent virus*.

O RNA genômico dos carlavírus contém seis cadeias abertas de leitura (Open Reading Frame-ORFs). A ORF1 codifica um polipeptídeo com função de metiltransferase, protease, helicase e RNA polimerase dependente de RNA. As ORFs 2, 3 e 4 formam um bloco triplo de genes (25K, 12K, 17K) relacionado ao movimento do vírus célula a célula. A ORF5 codifica a proteína capsidial e a região seguinte codifica uma proteína rica em cisteína cuja função ainda não foi determinada.



**Figura 2.** Organização genômica do RNA dos carlavírus. Cada ORF está representada por um retângulo. O tamanho das proteínas em kDa está indicado por K e os nomes aparecem sobre/sob cada gene.

*Cole latent virus* (CoLV) foi encontrado pela primeira vez em couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) no Brasil, Estado de São Paulo (A.S. COSTA, dados não publicados). O vírus é transmitido mecanicamente e de maneira não persistente por afídeo da espécie *Myzus persicae* (MELLO, 1980). Evidências moleculares foram obtidas por Belintani *et al* (2002) contribuindo para o reconhecimento do CoLV como uma espécie distinta dentro do gênero *Carlavirus*. O RNA genômico do CoLV é poliadenilado mas não foi detectado RNA subgenômico no RNA total extraído de partículas do CoLV. No entanto, dois RNAs subgenômicos (2,6 e 1,3 kb) e três RNAs de fita dupla (8.3, 2.6 e 1.3 kb) são produzidos em plantas infectadas pelo CoLV.

### **1.3. Produção de proteínas durante a replicação viral**

Muitas proteínas codificadas pelos RNAs virais, sejam proteínas capsidiais ou proteínas não estruturais, acumulam-se na célula como "corpos de inclusão" ou "viroplasmas" tanto no citoplasma como no núcleo.

Quando as proteínas virais se acumulam nas células como corpos de inclusão há a possibilidade de as mesmas serem purificadas por métodos bioquímicos, a partir de extratos das folhas das plantas infectadas como ocorre, por exemplo, com os potyvírus (URCUQUI-INCHIMA *et al*, 2001). Por outro lado, quando as proteínas não estruturais (e mesmo as partículas virais) são sintetizadas em tecidos específicos da hospedeira (floema, por exemplo) e em baixas concentrações, tais métodos mostram-se ineficientes e alternativas devem ser buscadas. Uma estratégia alternativa que vem sendo utilizada ultimamente para estes casos é a expressão de tais proteínas, sejam estruturais ou não, em *Escherichia coli* e que, após purificação, podem ser utilizadas para a produção de antissoros específicos e para estudos de genômica estrutural.

### **1.4. Expressão de proteínas heterólogas em bactérias**

Nas últimas duas décadas, sistemas de expressão de proteínas em procariotos, particularmente em *Escherichia coli*, têm sido explorados para a produção, em escala industrial, de uma variedade de proteínas (PANDA, 2003). As células procarióticas (*Escherichia coli*) são normalmente preferidas para a expressão de proteínas heterólogas pelo fato de oferecerem algumas vantagens como (1) fonte de carbono de baixo custo para o crescimento, (2) rápido acúmulo de biomassa, (3) possibilidade de uso em processo de fermentação com alta densidade de células e (4)

possibilidade de produção de proteínas em larga escala. Entretanto, a falta de componentes para modificações pós-tradução e a produção de proteínas inativas devido à formação de corpos de inclusão, oferecem um significativo desafio no uso destes sistemas de expressão.

Um grande número de protocolos está à disposição, os quais descrevem várias estratégias para a conversão de proteínas inativas, expressas como corpos de inclusão insolúveis, em frações solúveis e biologicamente ativas (SAHDEV *et al*, 2008). De modo geral, estas estratégias podem ser subdivididas em três grupos: (1) aquelas em que os fatores que influenciam a formação da fração insolúvel são modificados, (2) aquelas onde as proteínas expressas são renaturadas a partir dos corpos de inclusão e (3) aquelas em que a proteína de interesse é expressa na forma solúvel através da produção de proteínas fusionadas. Sabe-se que a purificação de proteínas expressas de forma solúvel pode ser feita em menor tempo, com baixos custos e com menos prejuízos à integridade das proteínas, em comparação com a purificação e renaturação a partir dos corpos de inclusão. Assim, muito tem sido feito no sentido de obter metodologias que possibilitem e otimizem a expressão de proteínas solúveis. Uma das estratégias mais conhecidas para produção de proteínas recombinantes solúveis é a expressão a baixas temperaturas (SCHEIN, 1989). Sabe-se que as interações hidrofóbicas que levam à formação dos agregados protéicos são altamente favorecidas pelas altas temperaturas (KIEFHABER *et al*, 1991). Além disso, baixas temperaturas inibem a produção de “heat shock” proteases e aumentam a produção de chaperonas (FERRER *et al*, 2004).

Quando nenhuma das estratégias é eficiente e, as proteínas continuam presentes apenas nos corpos de inclusão, inevitavelmente, as metodologias envolvendo o uso de agentes desnaturantes passam a ser utilizadas.

Altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* em geral resultam no acúmulo dessas proteínas *in vivo* como agregados insolúveis (KANE & HARTLEY, 1988; FAHNERT *et al*, 2004). Em geral, os corpos de inclusão são solubilizados pelo uso de altas concentrações de agentes desnaturantes tais como uréia e cloridrato de guanidina (CLARCK, 1998; LILIE *et al*, 1998). A solubilização das proteínas dos corpos de inclusão por agentes desnaturantes resulta na perda da estrutura secundária levando à exposição da superfície hidrofóbica (DILL & SHORTLE, 1991). Tal perda da estrutura secundária durante a solubilização e a interação entre as moléculas proteicas desnaturadas durante a renaturação, resultam na agregação dessas

moléculas e são consideradas como a principal razão para o baixo rendimento de proteínas biologicamente ativas a partir dos corpos de inclusão, muitas vezes atingindo apenas 15-25% da produção total de proteínas (DATAR *et al*, 1993). Assim sendo, o maior desafio nesta área tem sido converter eficientemente estas proteínas insolúveis e inativas em produtos solúveis e corretamente enovelados (CLARCK, 2003; PANDA, 2003).

As maiores vantagens associadas com a formação dos corpos de inclusão são (1) a expressão de altos níveis de proteína, cerca de 30% das proteínas totais da célula, (2) a fácil purificação devido ao tamanho e densidade quando comparados com os componentes celulares, (3) menor degradação da proteína expressada, (4) resistência ao ataque proteolítico por proteases celulares e (5) homogeneidade da proteína de interesse. Por essas razões, as proteínas recombinantes expressas em corpos de inclusão em *E. coli* têm sido largamente utilizadas na produção comercial de proteínas (WALSH, 2003).

Há dois importantes aspectos a serem considerados na recuperação de proteínas biologicamente ativas a partir dos corpos de inclusão: a solubilização dos agregados protéicos e a renaturação da proteína solubilizada em uma forma biologicamente ativa. A renaturação das proteínas obtidas em estado desnaturante, a partir de corpos de inclusão, é um processo laborioso que requer muitas etapas operacionais e, na maioria das vezes, resulta em recuperação muito pequena de proteína renaturada.

A recuperação de proteínas biologicamente ativas a partir de corpos de inclusão envolve quatro etapas: (1) isolamento dos corpos de inclusão a partir de células de *E. coli*, (2) solubilização dos agregados de proteínas, (3) renaturação e (4) purificação da proteína solubilizada. Dentre estas etapas, a solubilização e a renaturação são as cruciais para a alta recuperação de proteínas biologicamente ativas. Os corpos de inclusão são geralmente separados dos demais componentes celulares usando-se centrifugação de baixa rotação após a lise das células bacterianas. Agregados semi-puros juntos com contaminantes são então solubilizados usando-se agentes desnaturantes em altas concentrações (6-8 M), tais como uréia ou cloridrato de guanidina (LILIE *et al*, 1998, CLARK, 2003, VALLEJO & RINAS, 2004). Uma vez solubilizadas, as proteínas são então renaturadas ao estado nativo através da remoção do agente desnaturante na presença de agentes oxidantes (FISCHER *et al*, 1993).

Vários métodos têm sido descritos para a renaturação das proteínas recombinantes desnaturadas, como a diluição e a diálise (TSUMOTO *et al*, 2003; MIDDELBERG, 2004; VALLEJO & RINAS, 2004; SINGH & PANDA, 2005). Diluição da proteína solubilizada diretamente no tampão de renaturação é o método mais comumente utilizado para a renaturação em pequena escala de proteínas recombinantes. Diferentes métodos de diálise e diluição junto com a utilização de aditivos têm sido descritos para uma melhor renaturação de proteínas (TSUMOTO *et al*, 2003). Por outro lado, processos de renaturação em pulsos (BUSWELL *et al*, 2002), cromatografia de exclusão molecular (BATAS & CHAUDHURI, 1996) e cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (LI *et al*, 2004; ABE *et al*, 2009) têm sido também bastante utilizadas. Estes processos envolvem essencialmente a separação física das moléculas protéicas parcialmente renaturadas durante a troca do tampão, o que ajuda na redução das interações proteína-proteína, diminuindo a agregação das moléculas e melhorando a recuperação de proteínas biologicamente ativas.

A produção de proteínas em *Escherichia 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 em fusão com cauda de histidina 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).

## 2. Justificativa

Importantes contribuições quanto à caracterização molecular dos vírus de plantas têm sido feitas citando-se, como exemplos, o sequenciamento dos RNAs, a detecção dos RNAs subgenômicos e a determinação da estratégia para expressão do genoma do vírus. Entretanto, muitos aspectos a respeito do ciclo de multiplicação desses vírus e da função de algumas proteínas não são conhecidos. Análises estruturais por cristalografia de raios-X, que pudessem fornecer dados sobre a estrutura das partículas virais e de outras proteínas não estruturais, são praticamente inexistentes. Nesse sentido, a cristalização e a determinação das estruturas cristalográficas de proteínas da capa viral purificadas (não como partículas) e de proteínas não estruturais (helicases, polimerases, movimento, transmissão por vetores, etc) poderiam fornecer dados no nível de átomos que pudessem permitir a postulação de modelos

para explicar seus possíveis mecanismos e funções no ciclo de multiplicação viral. Além disso, devido à função de movimento ser distribuída em três proteínas codificadas pelo chamado bloco triplo de genes, muitas atividades destas proteínas no movimento célula-a-célula ainda serem desconhecidas e estas proteínas serem consideradas difíceis de serem expressas, os carlavírus tornam-se um atrativo modelo para a investigação do processo de movimento.

### 3. Objetivos

O objetivo principal deste projeto de mestrado foi a produção de uma proteína do *Cole latent virus* em estado nativo, a partir de expressão em *Escherichia coli*, com o desenvolvimento de metodologia para a expressão, purificação, reenovelamento, caracterização espectroscópica e cristalização da proteína. A disponibilidade de cristais servirá como ponto de partida para a determinação de suas estruturas tridimensionais numa etapa posterior, que poderá contribuir para melhorar o entendimento sobre seus mecanismos e modos de funcionamento.

Foi estudada a proteína 25K de 25 kDa, presente no bloco triplo de genes, que está envolvido no movimento viral entre células (espalhamento do vírus a curta distância na planta).

### 4. Material e métodos

#### 4.1. Produção de cDNA

Um oligonucleotídeo anti-senso (5'- AAG CTT CCG CTG CCA ATA GA-3') foi desenhado utilizando-se o programa "Primer 3.0" a partir de sequências do genoma viral depositadas no Genbank. O RNA viral purificado e o oligonucleotídeo anti-senso foram desnaturados por aquecimento a 94 °C por 10 min e imediatamente resfriados em gelo, e, em seguida os demais componentes foram adicionados. A reação teve volume total de 20 µL, consistindo de: 50 mM Tris pH 8,3; 75 mM KCl; 10 mM DTT; 0,1 mM cada dCTP, dGTP, dATP, dTTP; 0,4 µM do oligonucleotídeo, 2 unidades de inibidor de RNase; 1µg RNA viral e 40 unidades de Transcriptase Reversa "Superscript II" (Invitrogen). A reação foi incubada por 2 h a 42°C.

#### **4.2. Amplificação por PCR**

Para a amplificação por PCR, foram utilizados o oligonucleotídeo anti-senso descrito no item 4.1 e o oligonucleotídeo senso (5'- GGA TCC GAT GTG TTA GTG AAT TTG – 3'), que também foi desenhado utilizando-se o programa “Primer 3.0” a partir de sequências do genoma viral depositadas no Genbank. A mistura da reação (25 µL) consistiu de: 20 mM Tris pH 9,5; 50 mM KCl; 5,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM cada dCTP, dGTP, dATP, dTTP; 1 µL de cDNA; 150 ng de cada oligonucleotídeo e 3 unidades de *Taq* polimerase (Fermentas). A mistura foi colocada em termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf) programado para desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, com uma extensão final a 72 °C por 10 min.

#### **4.3. Purificação do fragmento amplificado**

Uma alíquota do produto da reação de PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris 0,04 M; acetato de sódio 0,02 M; EDTA 0,001 M pH 8,3). A banda referente ao fragmento amplificado foi excisada do gel com lâmina (tipo gilete) e purificada com o “DNA Extraction Kit” (Fermentas), seguindo-se as orientações do fabricante. O DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% utilizando-se “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen) como marcador.

#### **4.4. Ligação do fragmento amplificado em vetor para multiplicação (pGEM)**

Para esta ligação foi utilizado o “pGEM – T Easy Vector System I” seguindo-se as orientações do fabricante (Promega). A reação foi submetida a 4 °C por 16 h.

#### **4.5. Transformação em célula competente (*Escherichia coli* - TOP 10)**

Após a reação de ligação, o vetor recombinante foi transformado em *E. coli* linhagem TOP 10, utilizando-se 50 µL de células competentes e 5 µL da reação de ligação. Essa mistura permaneceu no gelo durante 1 hora e, então, submetida ao choque de temperatura a 42 °C por 1 min e 2 min no gelo. Em seguida 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 + ampicilina 100 µg/mL),

contendo ainda 40  $\mu\text{L}$  de X-Gal 20 mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside) e as colônias brancas testadas para comprovar a existência do inserto através de PCR. As colônias que apresentaram o inserto foram inoculadas em tubos individuais de 7 mL de meio líquido seletivo (LB + ampicilina 100  $\mu\text{g/mL}$ ) sob agitação e aeração constantes a 37 °C para posterior extração do DNA plasmidial.

#### **4.6. Purificação do plasmídeo recombinante**

O DNA plasmidial foi purificado utilizando-se o “GeneJet Plasmid Miniprep Kit”, seguindo-se as orientações do fabricante (Fermentas). O DNA plasmidial foi eluído em 50  $\mu\text{L}$  de água.

#### **4.7. Digestão enzimática com *Bam* HI e *Hind* III (Promega)**

Para cada 1  $\mu\text{g}$  de DNA foram utilizadas 10 unidades (1  $\mu\text{L}$ ) de cada enzima. A reação de digestão de 50  $\mu\text{L}$  consistiu de: 25  $\mu\text{L}$  de vetor (125 ng/ $\mu\text{L}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de cada enzima, 5  $\mu\text{L}$  de tampão E 10X, 5,0  $\mu\text{L}$  de BSA 10X e 9  $\mu\text{L}$  de água. O produto da reação foi submetido à temperatura de 37 °C por 2h e a 65 °C por 15 min. Em seguida, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose e a banda referente ao fragmento extraída conforme o item 4.3. Posteriormente, o DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% utilizando-se “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen) como marcador.

#### **4.8. Digestão enzimática e defosforilação do vetor de expressão**

O vetor de expressão pET 28a foi digerido seguindo os passos descritos no item anterior. Em seguida, o vetor digerido foi defosforilado utilizando-se a enzima CIAP (Fosfatase alcalina de intestino de bezerro) (Invitrogen), 5 unidades de enzima para cada 1  $\mu\text{g}$  de DNA. A mistura foi submetida a 37°C por 30 min. e a 75 °C por 10 min. Posteriormente, o DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% utilizando-se “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen) como marcador.

#### **4.9. Ligação do DNA em vetor de expressão**

Vetor e fragmentos digeridos com as mesmas enzimas foram ligados utilizando-se T4 DNA Ligase (Promega), conforme instruções do fabricante.

#### **4.10. Digestão enzimática com *Bam* HI e *Hind* III (Promega)**

O vetor de expressão pET 28a recombinante foi digerido seguindo os passos descritos no item 4.7 para verificar, em gel nativo de agarose a 1%, a liberação do fragmento de interesse.

#### **4.11. Transformação em célula competente**

O vetor recombinante pET 28a foi transformado em linhagem BL21-RIL de *E. coli* competente utilizando-se 50 µL de células competentes e 1 µL de amostra de plasmídeo. Essa mistura permaneceu no gelo durante 1 h e, então, foi submetida ao choque de temperatura a 42 °C por 1 min e 2 min no gelo. Em seguida foram adicionados 250 µL de meio líquido SOC (meio SOB + 200 mM de glicose) e as bactérias foram submetidas à regeneração (1 h a 37 °C com agitação a 250 RPM). Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol, 30 e 34 µg/mL, respectivamente). As colônias foram testadas por PCR e uma das colônias positivas foi inoculada em tubos individuais de 7 mL de meio líquido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol, 30 e 34 µg/mL, respectivamente) sob agitação e aeração constantes a 37 °C para posterior extração do DNA plasmidial.

#### **4.12. Sequenciamento do gene em vetor de expressão pET28a**

O DNA plasmidial purificado foi sequenciado pela técnica de reação de terminação em cadeia, utilizando-se o sequenciador automático “ABI 377 DNA Sequencer” (Laboratório de Estudos Genômicos, IBILCE/UNESP – São José do Rio Preto, SP) e o “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit”(Applied Biosystems), seguindo-se as orientações do fabricante.

O sequenciamento do vetor de expressão foi realizado nos dois sentidos de leitura (senso e anti-senso) com 4 repetições, utilizando os oligonucleotídeos senso e anti-senso descritos nos itens 4.1 e 4.2 e as sequências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa Multalin. A sequência consenso foi comparada com a sequência do gene codificador da 25K, obtida por Belintani *et al*, no laboratório de Fitovirologia (dados não publicados), para confirmação da inserção do gene da 25K no vetor de expressão pET28a e com as sequências depositadas no GenBank, para verificação de similaridade com vírus do mesmo gênero.

A seqüência de aminoácidos deduzida foi determinada pelo programa Translate (<http://www.expasy.org/tolls/dna/html>) e a estimativa da massa molecular feita pelo programa ExPASy Proteomics Server, disponível no site <http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>.

Após o seqüenciamento, a colônia positiva foi utilizada para o pré-inóculo nos testes de expressão.

#### **4.13. Testes de expressão**

Inicialmente 700 µL do pré-inóculo foram transferidos para cada novo tubo contendo 7 mL de meio líquido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol, 30 e 34 µg/mL, respectivamente). Os tubos foram mantidos sob agitação e aeração a 37 °C até atingirem a OD (densidade óptica) ideal. A OD foi determinada através da leitura da amostra em espectrofotômetro. A indução da expressão foi feita com diferentes concentrações de IPTG (0,1, 0,5 e 1 mM de IPTG). Foram coletadas amostras após 30 min, 2 h e 4 h da indução.

#### **4.14. Expressão da proteína recombinante a 37 °C**

Após a constatação da expressão nos testes iniciais, a expressão foi realizada em maior escala visando à obtenção de proteínas para purificação. Inicialmente 10 mL de pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 1 L de meio líquido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol 30 e 34 µg/mL, respectivamente). O tubo foi mantido sob agitação e aeração a 37 °C até atingirem a OD ideal, determinada por leitura da amostra em espectrofotômetro. A indução de expressão foi feita com IPTG 1 mM por 4 h. Em seguida, o meio foi centrifugado por 20 min a 8.000 xg e 4 °C. O “pellet” foi ressuspensionado em 30 mL de tampão de lise (100 mM fosfato de sódio, 300 mM NaCl, 20 mM β- mercaptoetanol, 1% Triton X-100, 1% Tween 20). A solução foi submetida a pulsos de 15 s a 300 W em sonicador para lise celular. Esta amostra foi centrifugada por 30 min a 6.000xg a 4 °C. A fase aquosa foi coletada e utilizada para a purificação da proteína de interesse. O corpo de inclusão foi lavado com o tampão de lise, deoxicolato de sódio 2% e água. A cada lavagem, a amostra foi submetida a pulsos em sonicador e centrifugada a 8000xg por 20 min e, após a última centrifugação, a amostra foi então utilizada para a purificação da proteína de interesse.

#### 4.15. “Western- blot”

Alíquotas contendo o extrato de células antes e após a indução com IPTG e a proteína recombinante purificada conforme o item 4.16 foram misturadas com tampão de amostra (1:1) e aplicadas em gel SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em um eletrotransferidor (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad) operando sob voltagem constante (100V) por 3 horas.

O tampão de transferência utilizado foi o Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M) contendo metanol 20%. A membrana foi incubada com antissoro monoclonal Anti-poli-histidina (produzido em camundongo; Sigma) e antissoro anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:30.000 e a detecção da reação antígeno/anticorpo foi feita com mistura de BCIP/NBT (“5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate/nitro-blue tetrazolium”) até o aparecimento do resultado da reação (cor azul púrpura).

#### 4.16. Purificação e reenovelamento da proteína recombinante expressa a 37 °C

A purificação do sobrenadante foi feita utilizando tampões para purificação sob condições nativas, em coluna de afinidade utilizando resina de níquel (Ni Sepharose High Performance) conforme instruções do fabricante (GE Healthcare). A eluição foi feita em tampão 20 mM Fosfato de sódio, 0,5 M NaCl e 500 mM imidazol, pH 8. A purificação do corpo de inclusão foi feita com tampões para purificação sob condições desnaturantes, em coluna de afinidade utilizando resina de níquel conforme instruções do fabricante. A eluição foi feita em tampão 100 mM Fosfato de sódio, 10 mM Tris e 8 M de uréia, pH 4,5.

A fim de encontrar a melhor condição de reenovelamento, alíquotas de 1 mL da proteína purificada, na concentração 0,1 mg/mL, foram dialisadas, em duas etapas de 24 horas cada, sob agitação e a 20 °C, contra os diferentes tampões de reenovelamento listados a seguir:

Tampão 1: 30 mM acetato de sódio pH 5,5, 100 mM NaCl, 1 mM de DTT, 1 mM EDTA, 500 mM L-Arginina, 20% de glicerol;

Tampão 2: 30 mM acetato de sódio pH 5,5, 30 mM NaCl e 1% glicerol;

Tampão 3: 50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM Glutathione Reduzida, 1 mM EDTA, 500 mM L-Arginina, 20 % glicerol;

Tampão 4: 50 mM Tris pH 7.0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 M NDBS sulfobetaína;

Tampão 5: 50 mM Tris pH 7.0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 M NDBS sulfobetaína, 10 % glicerol;

Tampão 6: 30 mM fosfato de sódio pH 7.5, 200 mM NaCl e 20% glicerol.

Após os testes, a proteína foi coletada e centrifugada a 10.000xg por 10 minutos a 5 °C. Amostras do precipitado, ressuspendido em igual volume (1 mL) de tampão de amostra, e do sobrenadante foram aplicadas em gel SDS a 12%, que evidenciou a melhor condição de reenovelamento.

Após encontrar a melhor condição de reenovelamento, foi feita uma nova purificação e toda a proteína eluída foi utilizada para o experimento de reenovelamento, que consistiu de 2 etapas de 24 horas cada, sob agitação e a 20 °C, em que 20 mL da solução contendo a proteína purificada foi dialisada contra 1 L de tampão contendo 30 mM acetato de sódio pH 5.5, 30 mM NaCl e 1% glicerol (Tampão 2).

Após a diálise, a amostra contendo a proteína purificada foi concentrada em dispositivos de ultrafiltração AMICON (3.000 Da) conforme instruções do fabricante (Millipore) a uma rotação de 4.000xg a 10 °C e utilizada para Dicroísmo Circular.

#### **4.17. Dicroísmo Circular**

Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) foram obtidos utilizando um espectropolarímetro Jasco 710, operando a 25 °C. A concentração de proteína utilizada nas medidas de CD foi de 3.0 mg/mL em tampão contendo 30 mM de acetato de sódio, 30 mM de NaCl e 1% de glicerol, pH 5.5 , utilizando uma cubeta de 0.05 mm de caminho óptico. Cada espectro representa uma média de 3 acumulações coletados na faixa de comprimentos de onda entre 195 a 255 nm, com um “step size” 0.2 nm, a uma velocidade de 50 nm/min, e uma largura de banda de 1 nm. A linha de base foi corrigida pela subtração do espectro do tampão obtido em idênticas condições. Os resultados foram convertidos em elipticidade em unidades de mg/mL,  $[\Phi]$  (deg cm<sup>2</sup> decagrama<sup>-1</sup>), e a estrutura secundária foi analisada com o programa CDPro.

#### **4.18. Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS)**

A concentração de proteína utilizada nas medidas de DLS foi de 3.0 mg/mL em tampão contendo 30 mM de acetato de sódio, 30 mM de NaCl e 1% de glicerol, pH

5.5. As medidas de DLS foram realizadas utilizando-se o equipamento *SpectroLIGHT* 500 system, Molecular Dimensions, UK, portando um controlador de temperatura, em comprimento de onda de 781,2 nm e ângulo de detecção do espalhamento de 90° . O programa usado para a execução das medidas do raio hidrodinâmico foi o CONTIN. Antes do experimento, a amostra foi centrifugada a 15000xg por 10 min e a 10°C, a fim de remover possíveis partículas em suspensão.

#### **4.19. Testes de solubilização**

##### **4.19.1. Expressão a 18 °C e purificação da proteína recombinante**

Inicialmente 25 mL de pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 250 mL de meio líquido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol 30 e 34 µg/mL, respectivamente). O tubo foi mantido sob agitação e aeração a 18 °C até atingir a OD ideal. A indução de expressão foi feita com IPTG 1 mM “overnight” . Em seguida, o meio foi centrifugado por 30 min a 6.000xg e 4 °C. O “pellet” foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de lise (50 mM tampão fosfato de sódio, 200 mM NaCl, 1mM PMSF, pH 8). A solução foi submetida a pulsos de 15 s a 300 W em sonicador para lise celular. Esta amostra foi centrifugada por 30 min a 6.000xg a 4 °C. A fase aquosa foi coletada e utilizada para a purificação da proteína de interesse e uma alíquota do corpo de inclusão foi coletada para análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A purificação foi feita em coluna de afinidade utilizando resina de níquel (Ni Sepharose High Performance) conforme instruções do fabricante (GE Healthcare). A eluição foi feita em tampão 20 mM fosfato de sódio , 0,5 M NaCl e 500 mM imidazol, pH 7.4.

##### **4.19.2. Teste de expressão em meio auto-indutivo**

Inicialmente 25 mL de pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 250 mL de meio auto-indutivo (ZYM-5052), que consiste de meio LB + canamicina e cloranfenicol 30 e 34 µg/mL, respectivamente + meio M (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2mM) + meio 5052 (0,5% glicerol, 0,05% glicose, 0,2% α-lactose), contendo 50 µg/mL, de acordo com Studier, 2005. O tubo foi mantido sob agitação e aeração a

18 °C por 48 horas. Em seguida, o meio foi centrifugado por 30 min a 6.000xg e 4°C. O “pellet” foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de lise (50 mM tampão fosfato, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 8). A solução foi submetida a pulsos de 15 s a 300 W em sonicador para lise celular. Esta amostra foi centrifugada por 30 min a 6.000xg a 4 °C. A fase aquosa foi coletada e utilizada para a purificação da proteína de interesse e uma alíquota do corpo de inclusão foi coletada para análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A purificação foi feita em coluna de afinidade utilizando resina de níquel (Ni Sepharose High Performance) conforme instruções do fabricante (GE Healthcare). A eluição foi feita em tampão 20 mM fosfato de sódio, 0,5 M NaCl e 500 mM imidazol, pH 7.4.

#### **4.19.3. “Stress” osmótico e choque térmico**

Inicialmente 25 mL de pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo contendo 250 mL de meio líquido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol 30 e 34 µg/mL, respectivamente), contendo 0,5M NaCl e 1mM betaína. O tubo foi mantido sob agitação e aeração a 37 °C até atingir a OD ideal. Para o choque térmico, o tubo foi submetido à temperatura de 47 °C por 20 minutos (contados a partir do momento em que o meio de cultura atingiu esta temperatura). Posteriormente, o tubo foi transferido para outro shaker, a 18 °C, e a indução da expressão foi feita com 1mM IPTG “overnight”. Em seguida, o meio foi centrifugado por 30 min a 6.000xg e 4 °C. O “pellet” foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de lise (50 mM tampão fosfato, 200 mM NaCl, 1mM PMSF, pH 8). A solução foi submetida a pulsos de 15 s a 300 W em sonicador para lise celular. Esta amostra foi centrifugada por 30 min a 6.000xg a 4 °C. A fase aquosa foi coletada e utilizada para a purificação da proteína de interesse e uma alíquota do corpo de inclusão foi coletada para análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A purificação foi feita em coluna de afinidade utilizando resina de níquel (Ni Sepharose High Performance) conforme instruções do fabricante (GE Healthcare). A eluição foi feita em tampão contendo 20 mM fosfato de sódio, 0,5 M NaCl e 500 mM imidazol, pH 7.4.

#### 4.19.4. “Western-blot”

Alíquotas contendo a fase aquosa e o corpo de inclusão dos itens 4.19.1, 4.19.2 e 4.19.3 foram misturadas com tampão de amostra (1:1) e aplicadas em gel SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em um eletrotransferidor (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad) operando sob voltagem constante (100V) por 3 horas.

O tampão de transferência utilizado foi o Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M) contendo metanol 20%. A membrana foi incubada com antissoro monoclonal Anti-poli-histidina (produzido em camundongo; Sigma) e antissoro anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:30.000 e a detecção da reação antígeno/anticorpo foi feita com mistura de BCIP/NBT (“5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate/nitro-blue tetrazolium”) até o aparecimento do resultado da reação (cor azul púrpura).

#### 4.20. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%

Os experimentos tiveram suas análises feitas por eletroforese, feita em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas por fervura (3min a 100 °C) em tampão de amostra (Tris HCl 0,125 M pH 6,8, contendo SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 1 mM). As amostras foram centrifugadas por 5 min a 16.000xg e 10 µL do sobrenadante de cada amostra foram aplicados no gel. A eletroforese foi conduzida por 90 min a 100 V em aparelho Hoefer mini VE Amersham Biosciences GE. Os géis foram fixados e corados em mistura contendo metanol, água, ácido acético (50:50:10) e Comassie Blue 0,25% por 3 h e descorados com metanol e água (1:1) por 18 h.

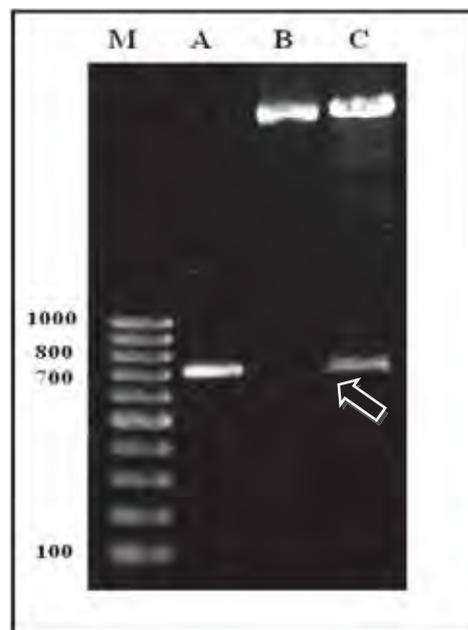
## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Amplificação do gene de interesse, clonagem e sequenciamento

O produto da reação de PCR, amplificado com os oligonucleotídeos específicos, foi analisado em gel nativo de agarose a 1%, apresentando única banda de aproximadamente 725 pb correspondente ao fragmento de tamanho esperado para o possível gene codificador da proteína (Figura 3- A). O fragmento amplificado foi purificado e ligado ao vetor pGEM.

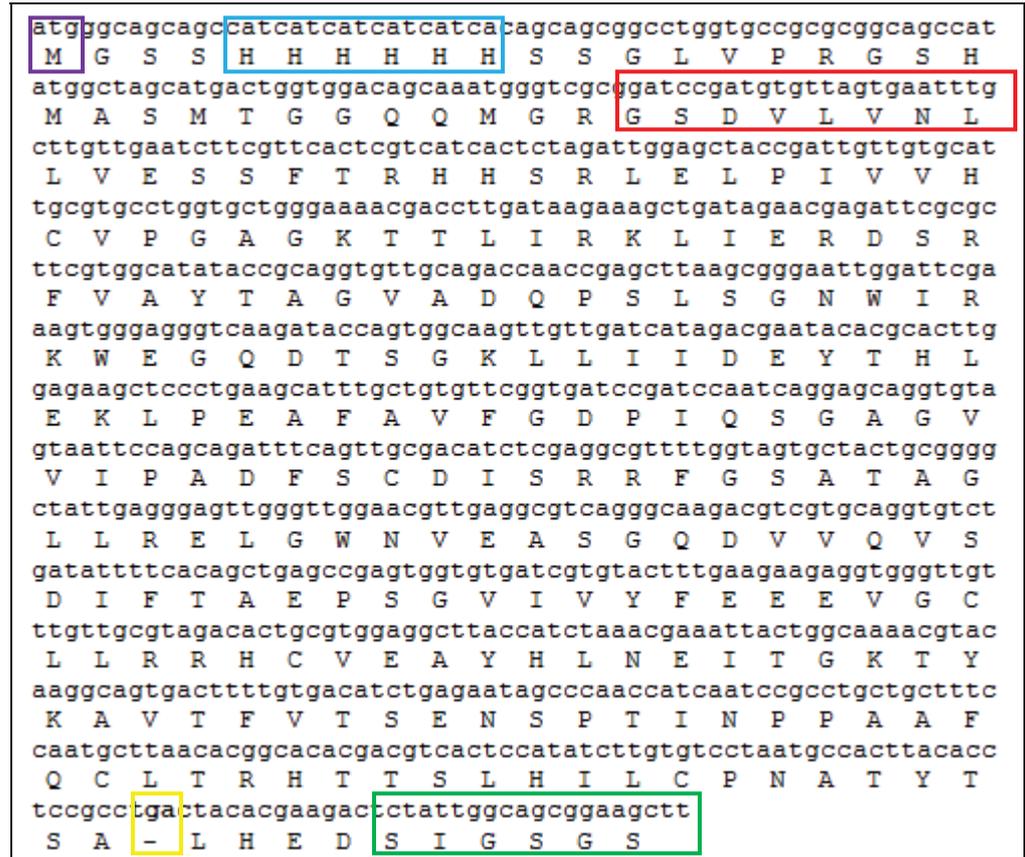
A digestão do vetor recombinante pGEM com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III liberou o fragmento clonado de 725 pb, conforme esperado. O fragmento foi purificado e utilizado na reação de ligação ao vetor pET 28a.

A digestão do vetor recombinante pET 28a com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III liberou o fragmento clonado de 725 pb, conforme esperado (Figura 3- C), confirmando a inserção do gene de interesse no vetor de expressão.



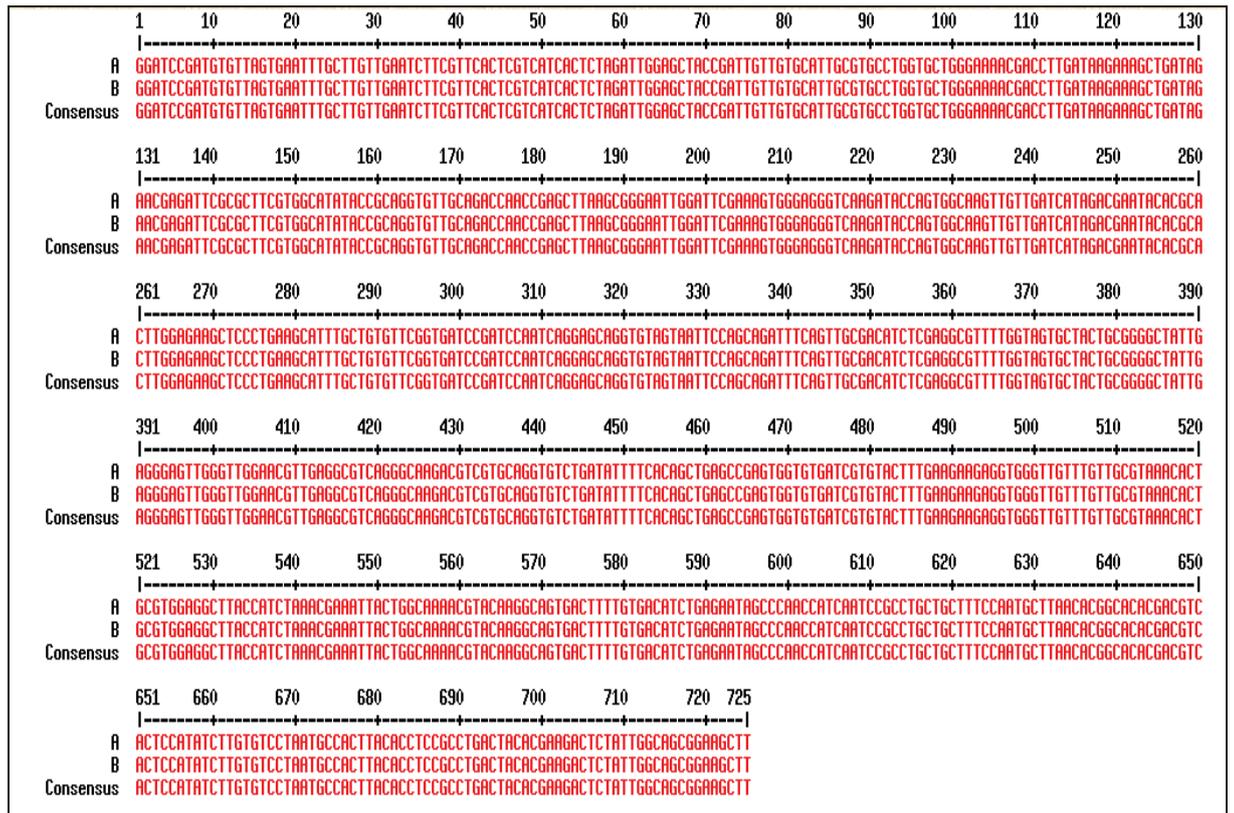
**Figura 3.** Gel nativo de agarose a 1% evidenciando em **A**: fragmento de 725 pares de bases amplificado por PCR; **B**: vetor pET28a ligado ao fragmento, antes da digestão enzimática; **C**: digestão enzimática do vetor pET28a com liberação de fragmento. Fragmento referente ao DNA plasmidial na parte superior do gel e fragmento liberado de aproximadamente 725 pb (seta). **(M)** Marcador molecular GeneRuler 100pb DNA Ladder (Fermentas).

A sequência obtida a partir do sequenciamento automatizado do gene codificador da proteína 25K do *Cole latent virus* apresentou 725 nucleotídeos e 230 aminoácidos deduzidos (Figura 4).



**Figura 4.** Sequência de nucleotídeos (acima) e aminoácidos deduzidos (abaixo) correspondentes ao gene da 25K do CoLV. . O destaque em roxo mostra o start-códon; em azul, a cauda de histidina; em vermelho, o oligonucleotídeo senso (CoLV25KF), iniciando com o sítio de restrição para *Bam*HI (GGATCC); em amarelo, o stop-códon; e em verde, o oligonucleotídeo anti-senso (CoLV25KR), terminando com o sítio de restrição para *Hind*III (AAGCTT).

A sequência foi então comparada com a sequência do gene codificador da 25K, obtida por Belintani *et al* (dados não publicados) apresentando 100% de similaridade entre os genes (Figura 5). Além disso, a sequência demonstrou alta similaridade (74%) com o vírus *Potato virus M* (AF023877), do gênero *Carlavirus*, cuja sequência encontra-se depositada no GenBank. A estimativa da massa molecular feita pelo programa ExPASy Proteomics Server foi de aproximadamente 29 kDa ( 25kDa referentes à CoLV25K e o restante referente à cauda de histidina e parte do vetor). Após ter sido confirmada a inserção do gene de interesse, os testes de expressão foram iniciados.



**Figura 5.** Comparação da sequência do gene codificador da 25K obtida neste trabalho (A) com a sequência obtida por Belintani et al (B), mostrando 100 % de similaridade entre os genes.

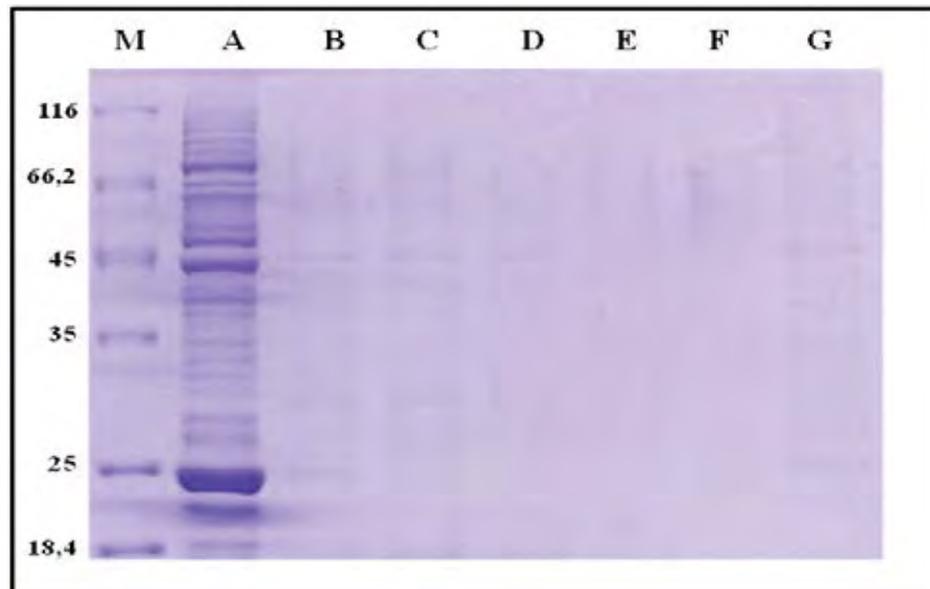
## 5.2. Resultados referentes à expressão feita a 37 °C

### 5.2.1. Expressão e purificação

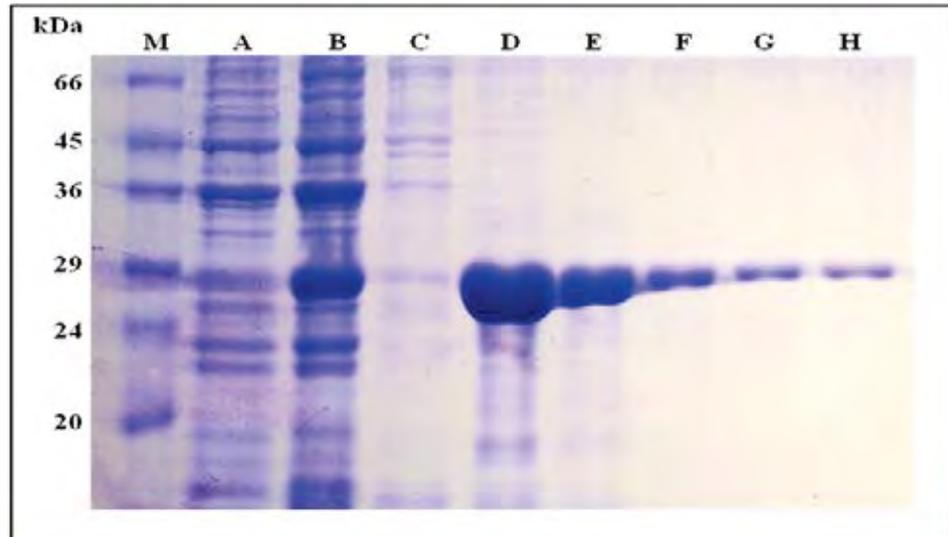
Corpos de inclusão formados a altas temperaturas têm propriedades similares aos corpos de inclusão normalmente descritos que contêm, principalmente, proteínas recombinantes desnaturadas e são quase completamente insolúveis em soluções aquosas com detergentes suaves ou baixas concentrações de agentes desnaturantes (PETERNEL *et al*, 2008a,b). Embora a expressão de proteínas na forma de corpos de inclusão seja frequentemente considerada indesejável, sua formação pode ser vantajosa, pois o seu isolamento do agregado celular é uma forma conveniente e efetiva de purificar a proteína de interesse (SINGH & PANDA, 2005).

O processo de purificação a partir do sobrenadante em resina de níquel, com expressão feita a 37 °C, não possibilitou a obtenção da proteína de interesse, de aproximadamente 29 kDa, conforme esperado (Figura 6). Já a

purificação a partir do corpo de inclusão possibilitou a obtenção da proteína de interesse com baixa concentração de contaminantes, como pode ser visto na Figura 7. A lavagem do corpo de inclusão com deoxicolato de sódio 2% (dados não amostrados) e a etapa de lavagem do processo de purificação, com tampão 100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris e 8 M uréia pH 7,5, mostraram-se eficientes na eliminação de contaminantes.



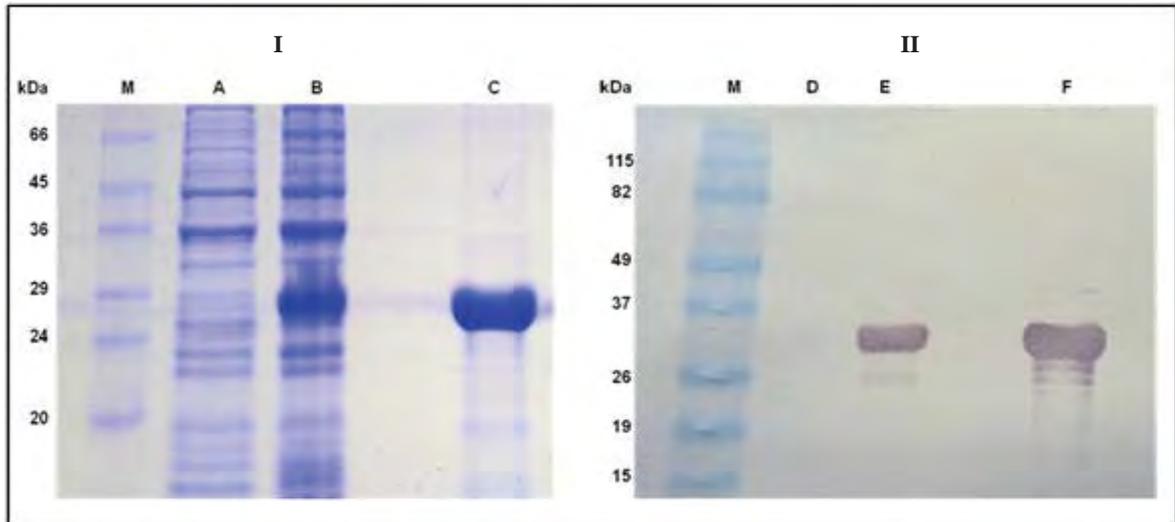
**Figura 6.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação a partir do sobrenadante, com expressão feita a 37 °C. **(M)** Marcador para proteínas, Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). **(A)** Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. **(B, C, D, E, F)** Amostras referentes a frações das eluições. **(G)** Amostra de resina coletada após a etapa de eluição.



**Figura 7.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação do corpo de inclusão, com expressão feita a 37 °C. (M) marcador molecular Dalton Mark VII-L (Sigma). Extrato de células: (A) antes da indução com IPTG, (B) após 4 horas de indução da expressão com 1 mM de IPTG. (C) Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. (D, E, F, G, H) Amostras referentes a frações das eluições.

### 5.2.2. “Western-Blot”

A proteína presente no corpo de inclusão após 4 horas de expressão e a proteína purificada foram detectadas pelo anticorpo. Além disso, não foi detectada a proteína antes da indução com 1 mM de IPTG. Dessa forma, conclui-se que a proteína detectada é a de interesse, uma vez que a proteína expressa possui cauda de histidina e é detectada pelo anticorpo monoclonal anti-histidina, conforme pode ser observado na figura 8.



**Figura 8.** I. SDS-PAGE a 12% mostrando expressão em *E. coli* e purificação da CoLV25K usando coluna de níquel. (M) Marcador molecular Dalton Mark VII-L (Sigma). Extrato de células: (A) antes da indução com IPTG, (B) após 4 horas da indução da expressão com 1 mM IPTG, (C) CoLV25K purificada com massa molecular estimada de aproximadamente 29 kDa. II. “Western-blot” de gel com as mesmas amostras utilizadas no gel I, usando anticorpo monoclonal anti-histidina. (M) marcador molecular BenchMark prestained ladder (Invitrogen). Extrato de células: (D) antes da indução com IPTG, (E) após 4 horas da indução da expressão com 1 mM IPTG, (F) CoLV25K purificada com massa molecular estimada de aproximadamente 29 kDa.

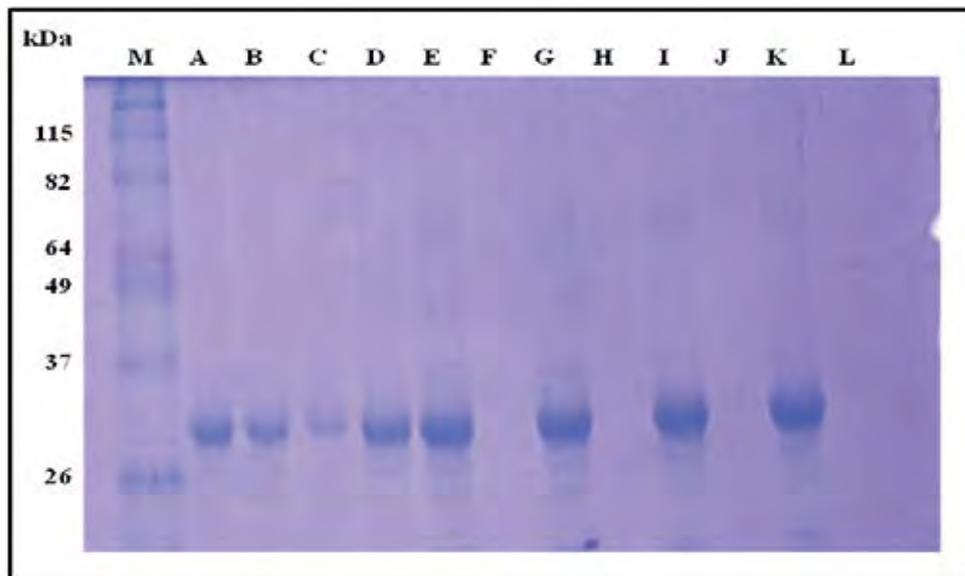
### 5.2.3. Reenovelamento da proteína recombinante

Após a confirmação da identidade da proteína por “western-blot”, foram feitos alguns testes a fim de encontrar o tampão ideal para a proteína purificada. As proteínas frequentemente apresentam propriedades físicas e químicas diferentes e, portanto, as condições ideais de estabilização para uma dada proteína não são iguais para todas as proteínas. Assim, triagens empíricas devem ser realizadas para que seja encontrada a condição ideal para determinada proteína. Portanto, não existe um tampão universal para o reenovelamento, é necessário testar diferentes condições e limitar o que é mais eficiente para cada proteína (YASUDA et al, 1998). A melhor forma de reenovelamento não pode ser deduzida com base em propriedades moleculares das proteínas. O procedimento adequado deve ser determinado caso a caso (RUDOLPH & LILIE, 1996).

Podemos observar na figura 9 que a melhor condição de reenovelamento para a proteína foi com o uso do tampão 2, no qual a maior parte da proteína encontra-se concentrada no sobrenadante. Pode ser observado também que a proteína precipitou completamente em diálise contra tampões 3, 4, 5 e 6. No

tampão 1, mesmo que a proteína esteja presente na fração solúvel, grande parte dela foi encontrada no precipitado.

Após ser encontrado o tampão de reenovelamento ideal para a proteína, 20 mL da proteína purificada foi dialisada contra o tampão 2 e, posteriormente, concentrada para aproximadamente 3 mg/mL para a realização do Dicroísmo Circular.

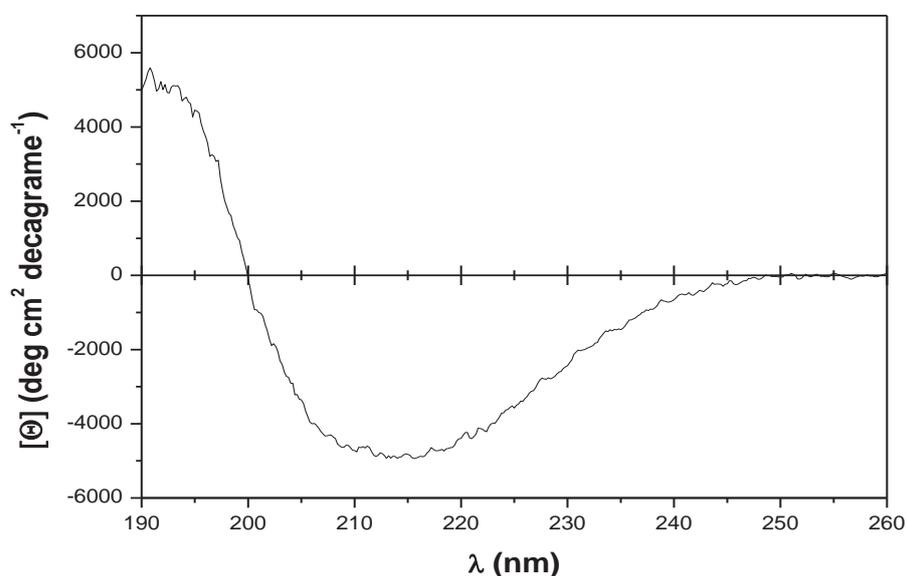


**Figura 9.** SDS- PAGE a 12% mostrando o experimento de reenovelamento da proteína recombinante. **(M)** Marcador molecular BenchMark prestained ladder (Invitrogen), **(A e B)** respectivamente, precipitado (p) e sobrenadante (sn) do experimento utilizando o tampão 1, **(C e D)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 2, **(E e F)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 3, **(G e H)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 4, **(I e J)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 5, **(K e L)** respectivamente, p e sn do experimento utilizando o tampão 6.

#### 5.2.4. Dicroísmo Circular

Desde 1960 a espectroscopia por dicroísmo circular tem sido utilizada como metodologia altamente eficiente para a determinação dos diferentes tipos de estruturas secundárias em proteínas e polipeptídeos. Quando tais moléculas interagem com a luz ultravioleta provocam uma alteração nessa luz incidente e seu espectro reflete a porcentagem de cada tipo de estrutura (WHITMORE & WALLACE, 2007).

Os espectros do dicroísmo circular foram registrados em aparelho Jasco, de 190 a 260 nm, para estimar o conteúdo de estrutura secundária e a qualidade da proteína. Tendo em vista que os resultados fornecidos pelos métodos utilizados pelos programas SELCON3, CDSSTR, e CONTINL são similares, os valores apresentados relativos às frações de estrutura secundária da proteína refletem as médias dos resultados obtidos com os três programas. A deconvolução do espectro mostrou que a estrutura secundária continha (40-46%)  $\alpha$ -hélice, (12-14%) folha- $\beta$ , (15-22%) voltas e (24-28%) outras. Dessa forma, os resultados indicam que a CoLV25K possui estrutura secundária e é adequada para os estudos estruturais. O resultado da deconvolução pode ser observado na figura 10.



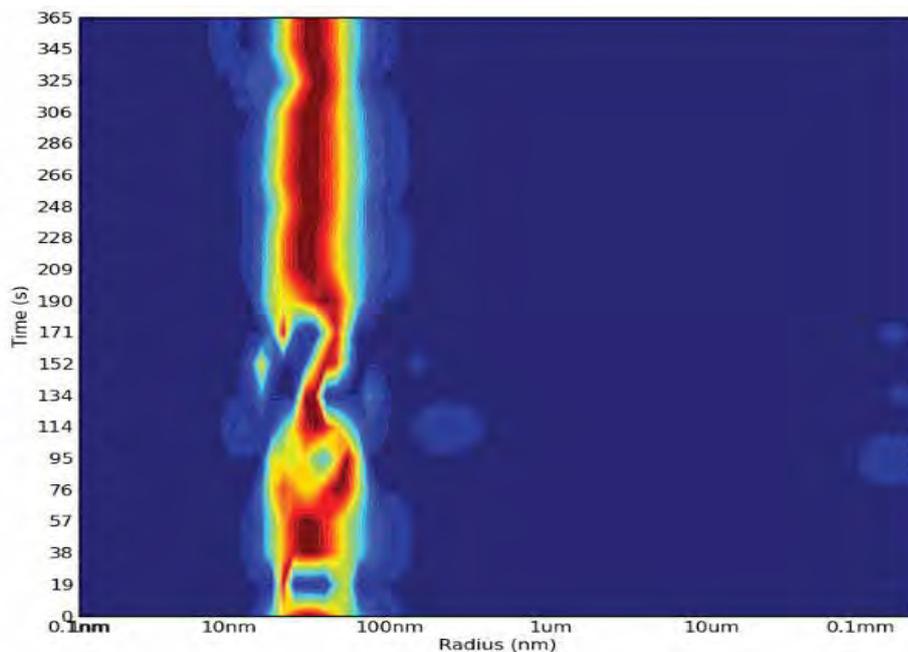
**Figura 10.** Espectro do dicroísmo circular da CoLV25K. A conformação da proteína consiste em (40-46%)  $\alpha$ -hélice, (12-14%) folha- $\beta$ , (15-22%) voltas e (24-28%) outras.

### 5.2.5. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Recentemente, esta técnica não-destrutiva tem obtido popularidade por explorar algumas propriedades, como tamanho e forma, de moléculas em solução (MURPHY, 1997). O DLS é uma técnica que mede a distribuição radial da solução medida e é muito usada como diagnóstico para determinar se uma amostra de proteína é adequada para cristalização pelo fornecimento de informações sobre a distribuição de tamanhos e estado de agregação da proteína em solução. Essas informações são importantes, pois estão relacionadas ao

processo de cristalização, já que quanto mais homogênea (monodispersa) estiver a amostra, maior é a probabilidade de nucleação e crescimento dos cristais.

O experimento de DLS mostrou que a CoLV25K apresenta-se estável, monodispersa e homogênea, mas forma complexos de partículas de até 100 nm (Figura 11), que devem ser separados para que a proteína fique nas condições ideais para cristalização. A fim de separar este complexo de partículas, alterações no pH, nas concentrações de sal e glicerol, além da adição de diferentes detergentes e de  $\beta$ -ciclodextrina, conforme descrito por Bajorunaite et al (2009), terão que ser feitas no tampão usado no reenovelamento e concentração da proteína.



**Figura 11.** Gráfico bidimensional de DLS mostrando a distribuição radial da partícula em função do tempo. A abundância relativa de cada fração radial é representada em uma escala de cor : vermelho é o maior e azul é o menor.

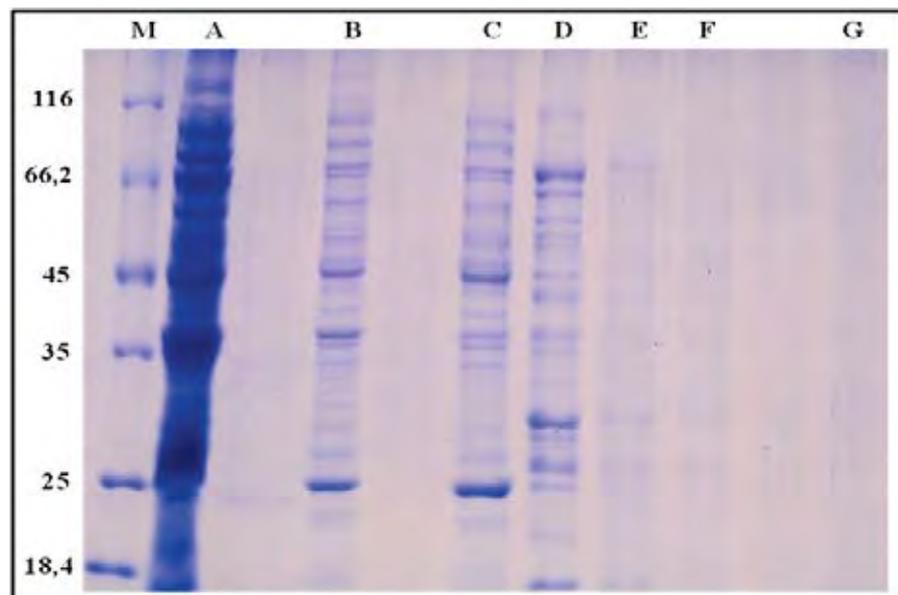
### 5.3. Resultados dos testes de solubilização da proteína

A literatura descreve muitos métodos para o redirecionamento das proteínas dos corpos de inclusão para a fração citoplasmática solúvel. Em geral, eles podem ser divididos em procedimentos onde a proteína é reenovelada a partir dos corpos de inclusão, e procedimentos onde a estratégia de expressão é modificada para obtenção de proteínas

solúveis (SORENSEN & MORTENSEN, 2005). Em *E. coli*, diversas estratégias têm sido exploradas para otimizar a produção de proteínas solúveis. Em geral, a indução da expressão gênica em baixas temperaturas aumenta a solubilidade das proteínas e minimiza a formação de corpos de inclusão (VERA *et al*, 2007). Sendo assim, é possível, em alguns casos, aumentar a solubilidade da proteína de interesse reduzindo a temperatura de cultivo, uma vez que a taxa metabólica das bactérias é reduzida (SCHEIN & NOTEBORN, 1988).

### 5.3.1. Expressão a 18 °C e purificação da proteína recombinante

Conforme evidenciado na figura 12, no teste feito a 18 °C, a purificação a partir do sobrenadante não possibilitou concluir que a proteína de interesse estava presente na fração solúvel. Por isso, as amostras contendo o corpo de inclusão e o sobrenadante foram submetidas ao “western-blot”.



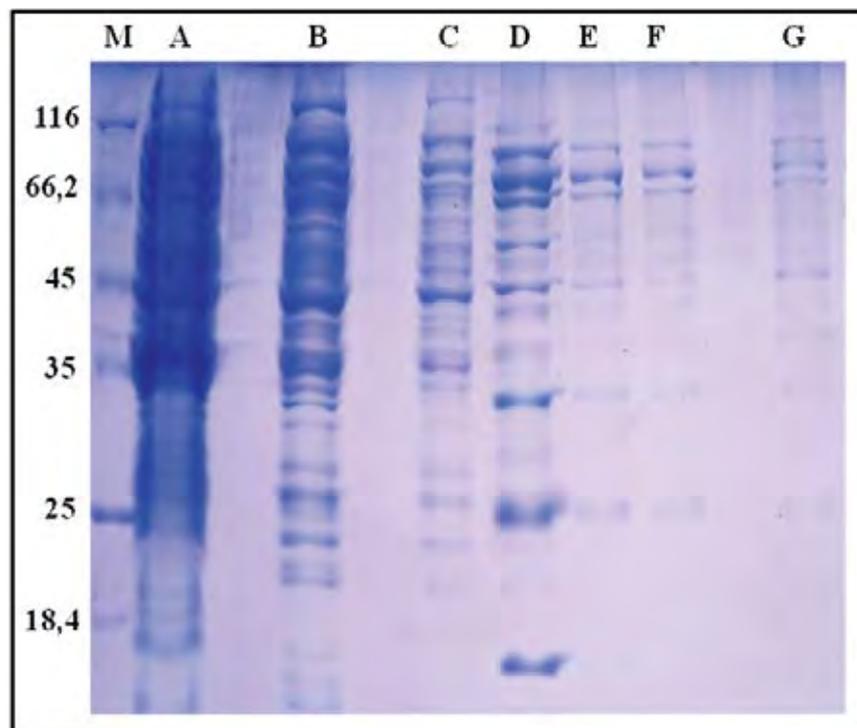
**Figura 12.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação a partir do sobrenadante em resina de níquel, com expressão feita a 18°C. (M) Marcador para proteínas, Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). (A) Corpo de inclusão. (B) Sobrenadante. (C) Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. (D, E, F) Amostras referentes a frações das eluições. (G) Amostra coletada da resina após etapa de eluição.

### 5.3.2. Teste de expressão em meio auto-indutivo

Outra estratégia de expressão testada a fim de obter a proteína solúvel foi o teste de expressão em meio auto-indutivo que, além de ser feito em baixa

temperatura, não utiliza IPTG para indução da expressão. A auto-indução permite um “screening” eficiente de muitos clones em paralelo para expressão e solubilidade, à medida que as culturas têm que ser inoculadas e crescer até a saturação, e têm como produto final muito mais proteínas do que as obtidas pela indução convencional com IPTG (STUDIER, 2005).

Conforme pode ser observado na figura 13, não foi possível concluir se houve a produção de proteínas solúveis e, por isso, as amostras contendo o corpo de inclusão e o sobrenadante foram submetidas ao “western-blot”.



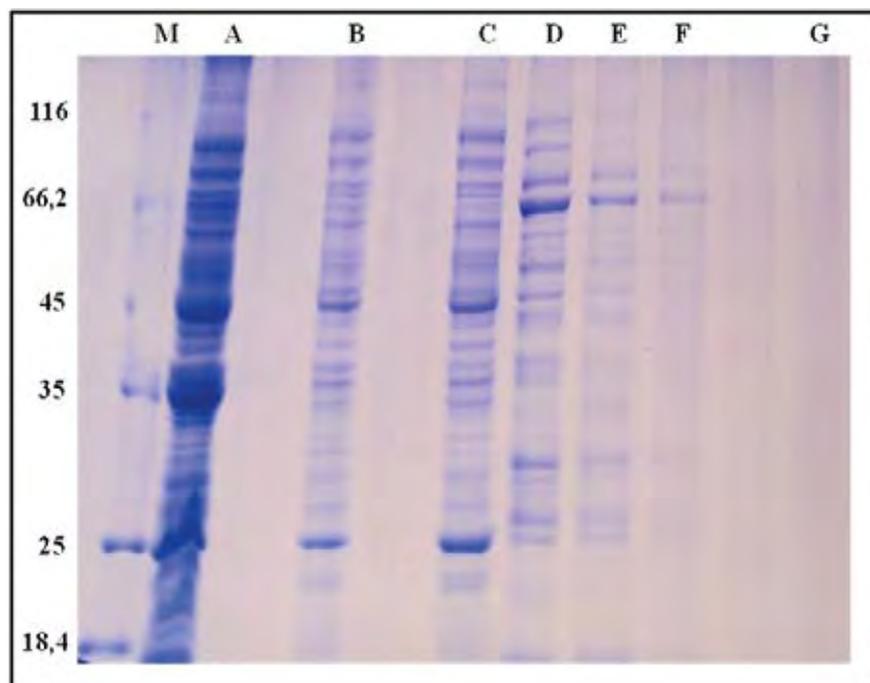
**Figura 13.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação a partir do sobrenadante em resina de níquel, com auto-indução da expressão. (M) Marcador para proteínas, Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). (A) Corpo de inclusão. (B) Sobrenadante. (C) Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. (D, E, F) Amostras referentes a frações das eluições. (G) Amostra coletada da resina após etapa de eluição

### 5.3.3. “Stress” osmótico e choque térmico

De acordo com Oganessian *et al*, 2007, uma estratégia para aumentar o nível de expressão de proteínas recombinantes numa forma nativa solúvel é aumentar a concentração celular de osmólitos e de chaperonas. Isto pode ser alcançado pelo crescimento das células bacterianas na presença de alta

concentração de sal, sorbitol e betaína, assim como as expõem ao choque térmico. O choque térmico induz a produção de chaperonas que, por sua vez, ativam o processo de enovelamento e previne a agregação de proteínas, aumentando a solubilidade da proteína recombinante.

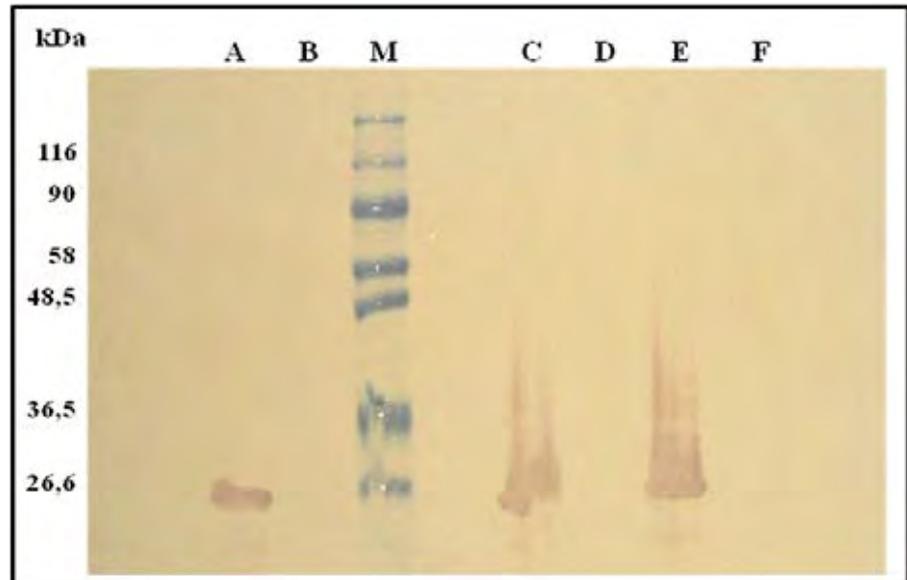
Conforme evidenciado na figura 14, assim como nos testes dos itens anteriores, a purificação do sobrenadante não possibilitou concluir se houve a obtenção de uma proteína de interesse e, então, as amostras contendo o corpo de inclusão e o sobrenadante foram também submetidas ao “western-blot”.



**Figura 14.** SDS-PAGE a 12% mostrando a purificação a partir do sobrenadante em resina de níquel, após expressão com o método de choque térmico. (M) Marcador para proteínas, Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). (A) Corpo de inclusão. (B) Sobrenadante. (C) Amostra coletada durante a lavagem da resina no processo de purificação. (D, E, F) Amostras referentes a frações das eluições. (G) Amostra coletada da resina após etapa de eluição.

#### 5.3.4. “Western-Blot”

A proteína de interesse não foi detectada pelo anticorpo anti-histidina no sobrenadante de nenhum dos testes acima, no entanto, foi detectada a sua presença nos corpos de inclusão. Dessa forma, conclui-se que ela foi expressa, mas não fica presente na fração solúvel utilizando os testes de solubilidade feitos, conforme pode ser observado na figura 15.



**Figura 15.** “Western-blot” utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina. **(M)** marcador molecular Prestained Molecular Weight Marker (Sigma). **(A)** Amostra contendo o corpo de inclusão do teste de “stress” osmótico e choque térmico. **(B)** Amostra contendo o sobrenadante do teste de “stress” osmótico e choque térmico. **(C)** Amostra contendo o corpo de inclusão da expressão feita a 18 °C. **(D)** Amostra contendo o sobrenadante de expressão feita a 18 °C. **(E)** Amostra contendo o corpo de inclusão de expressão em meio auto-indutivo. **(F)** Amostra contendo o sobrenadante de expressão em meio auto-indutivo.

## 6. Conclusão

A proteína pôde ser recuperada em grandes quantidades e alto grau de pureza dos corpos de inclusão utilizando agentes desnaturantes e, posteriormente, reenovelada com baixo grau de precipitação. Os resultados do dicroísmo circular (CD) e do espalhamento dinâmico de luz (DLS) permitiram concluir que a proteína reenovelada possui estrutura secundária e está estável, monodispersa e homogênea, mas forma um complexo de partículas que deve ser separado para que fique nas condições ideais de cristalização.

## 7. Referências bibliográficas

- ABE, R. et al. Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 381: 306-310, 2009.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 3 ed. Academic Press, San Diego, EUA, 803p. 1988.
- BAJORUNAITE, E. et al. Anti-aggregatory effect of cyclodextrins in the refolding process of recombinant growth hormones from *Escherichia coli* inclusion bodies. **International Journal of Biological Macromolecules**. 428-434, 2009.
- BATAS, B. & CHAUDHURI, J.B. Protein folding at high concentration using size exclusion chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**. 50: 16-23, 1996.
- BELINTANI, P. et al. Molecular evidences confirm Cole latent virus as a Carlavirus. **Journal of Phytopathology**. 150, 330-333, 2002.
- BUSWELL, A. M. et al. Effect of operating variables on the yield of recombinant tripsinogen for a pulse-fed dilution-refolding reactor. **Biotechnology and Bioengineering**. 77: 435-444, 2002.
- CLARCK, E.D. Refolding of recombinant proteins. **Current Opinion in Biotechnology**. 9: 157-163, 1998.
- CLARCK, E.D. Protein refolding for industrial processes. **Current Opinion in Biotechnology**. 85: 43-93, 2003.
- DATAR, R.V.; CARTWRIGHT, T.; ROSEN, C.G. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. **Bio/Technology**. 11: 349-357, 1993.
- DILL, K.A. & SHORTLE, D. Denatured states of proteins. **Annual Review of Biochemistry**. 60: 795-825, 1991.

- FAHNERT, B.; LILE, H.; NEUBAUER, P. Inclusion bodies: formation and utilization. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. 89: 93-142. 2004.
- FERRER, M. et al. Expression of a temperature sensitive esterase in a novel chaperone based *Escherichia coli* strain. **Applied environmental microbiology**. 70, 4499-4504, 2004.
- FIELDS, B.N.B. *et al.* **Fundamental Virology**, 3 ed. Ed. Raven Publishers, Philadelphia, USA, 1996.
- FISCHER, B.; SUMMER, I.; GOODENOUGH, P. Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *E. coli* as inclusion bodies. **Biotechnology and Bioengineering**. 41: 3-13, 1993.
- FOSTER, G.D. & MILLS, P.R. Evidence for the role of subgenomic RNAs in the production of potato virus S coat protein during *in vitro* translation. **Journal of General Virology**. 71, 1247-1249, 1990.
- KANE, J.F. & HARTLEY, D.L. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**. 6: 95-101, 1988.
- KIEFHABER, T. et al. Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. **Biotechnology**. 9, 825-829, 1991.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685, 1970.
- LI, M., SU, Z.; JANSON, J.C. *In vitro* refolding by chromatographic procedures. **Protein Expression and Purification** 33: 1-10, 2004.
- LILIE, H.; SCHWARZ, E.; RUDOLPH, R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. 9: 497-501, 1998.
- MELLO, S.C.M. **Caracterização do vírus latente da couve**. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 56 pp. 1980

- MIDDELBERG, A.P.J. Preparative protein folding. **Trends in Biotechnology**. 20: 433-437, 2004.
- MOROZOV, S.Y. & SOLOYEV, A.G. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. **Journal of General Virology**, 84, 2003.
- MURPHY, R.M. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn. **Current Opinion in Biotechnology**. 8, 25-30, 1997.
- OGANESYAN, N. *et al.* Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. **Protein expression and purification**. 52, 280-285, 2007.
- PANDA, A.K. Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. 85: 43-93, 2003.
- PETERNEL, S. *et al.* Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. **Microbial Cell Factories**. 7: 34-42, 2008a.
- PETERNEL, S. *et al.* New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 49: 239-246, 2008b.
- RÜCKER, E. *et al.* Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. **Protein Expression and Purification**. 21: 220-223, 2001.
- RUDOLPH, R. & LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. **The FASEB journal**, 10, 49-56, 1996.
- SAHDEV, S.; KHATTAR, S.K, SAINI, K.S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 307: 249-264, 2008.

- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Press, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- SCHEIN, C.H. & NOTEBORN, M.H.M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by low growth temperature. **BioTechnology**. 6, 291-294, 1988.
- SCHEIN, C.H. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. **BioTechnology**. v. 7, p. 1141-1148, 1989.
- SINGH, S.M. & PANDA, A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 99, No. 4, 303-310, 2005.
- SORENSEN, H. P. & MORTENSEN, K.K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**. 4:1, 2005.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**. 41, 207-204, 2005.
- TSUMOTO, K. *et al.* Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. **Biochemistry Biophysical Research Communication** 312: 1383-1386, 2003.
- URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**. 74: 157-175, 2001.
- VALLEJO, L.F. & RINAS, U. Strategy for recovery of active protein through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**. 3: 2-12, 2004.
- VERA, A., GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N.; ARÍS, A.; VILLAVERDE, A. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**, 96, No. 6, 2007.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks-2003. **Nature Biotechnology**. 21: 865-870, 2003.

WHITMORE, L. & WALLACE, B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and referende databases. **Biopolymers**, 89, 392-400, 2007.

YASUDA, M. et al. Effect of additives on refolding of a denaturedprotein. **Biotechnology Progress**, 14, 601-606, 1998.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 10/04/2012

*Luana Gonçalves Garcia*

---

Assinatura