



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Giovana Cavenaghi Guimarães

**Caracterização biofísico-química da proteína de matriz do Vírus
Sincicial Respiratório Humano**

São José do Rio Preto
2021

Giovana Cavenaghi Guimarães

Caracterização biofísico-química da proteína de matriz do vírus sincicial respiratório humano

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2019/08739-1
CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
Coorientador: Dr. Ícaro Putinhon Caruso

São José do Rio Preto
2021

G963c Guimarães, Giovana Cavenaghi
Caracterização biofísico-química da proteína de matriz do Vírus Sincicial
Respiratório Humano / Giovana Cavenaghi Guimarães. -- São José do Rio Preto, 2021
42 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Bióciências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Fátima Pereira de Souza
Coorientador: Ícaro Putinhon Caruso

1. Vírus Sincicial Respiratório Humano. 2. Proteínas recombinantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências
Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Giovana Cavenaghi Guimarães

**Caracterização biofísico-química da proteína de matriz do Vírus
Sincicial Respiratório Humano**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2019/08739-1
CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luiz Gustavo Araujo Gardinassi
Universidade Federal de Goiás (UFG)

São José do Rio Preto
16 de junho de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dra. Fátima Pereira de Souza pela orientação, pela confiança depositada, pelos anos de convivência e por sempre respeitar e apoiar minhas decisões.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Ícaro Putinhon Caruso pelos ensinamentos, pela orientação e auxílio ao resolver problemas, tratar e interpretar os resultados obtidos, por sempre ouvir minhas opiniões e apoiar meus sonhos.

Agradeço a todos os colegas de trabalho, mas especialmente agradeço aos meus companheirxs Vitor Brassolatti, Jéssica Marostica, Artemiza Miranda por me apoiar e tornar esta jornada mais leve.

Agradeço a todo o corpo docente do departamento de biologia pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do IBILCE pelos conhecimentos transmitidos e pelos recursos concedidos para participação em eventos importantes para meu aprimoramento acadêmico.

Agradeço a todo o corpo docente do departamento de física por disponibilizar os equipamentos necessários ao desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos funcionários do IBILCE por auxiliar na manutenção dos laboratórios.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2019/08739-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

De maneira geral, agradeço ao IBILCE, que mesmo em momentos de dificuldade consegue ser capaz de acolher e suprir seus cursos e laboratórios com uma excelente infraestrutura.

Por fim, agradeço à minha família por me incentivar e apoiar sempre.

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram. ”

Alexander Graham Bell (Inventor, 1847-1922)

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) é o principal agente causador de infecções no trato respiratório inferior em crianças e idosos por todo o mundo. A proteína de matriz (M) é essencial para o ciclo viral, uma vez que atua no processo de replicação, interagindo com proteínas do complexo ribonucleoproteico (RNPs). Posteriormente, a proteína M atua coordenando a transferência dos RNPs para locais de jangadas lipídicas, a partir da interação com o citoesqueleto celular, auxiliando assim no brotamento e liberação de vírions. Sabe-se então, que a proteína atua na célula hospedeira e tem grande importância na replicação viral, desta forma, o objetivo do presente trabalho foi compreender as mudanças conformacionais que podem ocorrer na proteína em diferentes condições de pH, temperatura e salinidade. Utilizando a proteína de matriz recombinante, foram realizados experimentos de fluorescência, dicroísmo circular e calorimetria de varredura diferencial. Os resultados do presente trabalho demonstraram que o processo de desnaturação térmica da proteína é irreversível e apresenta temperatura de desenovelamento de aproximadamente 44 °C. Além disso, sua estrutura secundária é influenciada pelo pH. Porém, mesmo em condição extremamente ácida, a proteína ainda possui parte de sua estrutura preservada. Por fim, o aumento da concentração iônica leva a uma desestabilização da proteína, resultando em diminuição da sua temperatura de desenovelamento. Desta forma os resultados do presente estudo auxiliaram para uma melhor compreensão de características conformacionais da proteína de matriz do hRSV.

Palavras-chave: Proteína M. hRSV. Temperatura. pH. Salinidade.

ABSTRACT

The human Respiratory Syncytial Virus (hRSV) is the main cause of infections in the lower respiratory tract in children and elderly all over the world. The matrix protein (M) is essential for the viral cycle once it acts on the replication process interacting with the ribonucleoprotein complex (RNPs). Posteriorly, the M protein interacts with the cellular cytoskeleton coordinating the RNPs transference to lipid rafts aiding the viral budding process and virion release. It is known that the protein acts in the host cell and has a great importance in the viral replication, thus, the objective of this work was to understand the conformational changes that can occur in the protein structure at different conditions of pH, temperature and salinity. Using the recombinant matrix protein, fluorescence, CD and DSC experiments were performed. The results of the present work demonstrates that the denaturation process is irreversible, with a melting temperature of about 44 °C. In addition, the secondary structure of the protein is influenced by the pH, but, even in extremely acid conditions, there is still some conserved secondary structure of the protein. Lastly, the increase of the ionic concentration leads to protein destabilization, resulting in a decrease of the melting temperature. Thus the results of the present work helped to better understand the conformational characteristics of the hRSV matrix protein.

Keywords: M protein. hRSV. Temperature. pH. Salinity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema da organização do RNA do Vírus Sincicial Respiratório (RSV).	14
Figura 2 Estrutura da proteína M.	16
Figura 3 Modelo dimérico da estrutura da proteína M.	17
Figura 4 SDS-Page da purificação por afinidade a níquel.	26
Figura 5 <i>Western Blot</i> da amostra de proteína M	27
Figura 6 SDS-Page da clivagem da proteína M com TEV protease.	27
Figura 7 Cromatograma de exclusão molecular da proteína M.	28
Figura 8 SDS-Page da cromatografia de exclusão molecular da proteína M.	28
Figura 9 Espectro de UV da proteína M.	29
Figura 10 Espectros de desnaturação térmica acompanhada por Dicroísmo Circular e Fluorescência da proteína M.	29
Figura 11 Desnaturação térmica acompanhada pelo espectro de dicroísmo circular da proteína.	30
Figura 12 Espectro de fluorescência e de dicroísmo circular da proteína M em diferentes condições de pH.	31
Figura 13 Centro de massa espectral e variação da elipticidade molar da proteína M em diferentes condições de pH.	31
Figura 14 Termogramas de desnaturação da proteína de matriz em diferentes concentrações salinas.	32
Figura 15 Temperatura de desenovelamento da proteína M em diferentes concentrações salinas.	33
Figura 16 Visão ampliada da interface de dimerização da proteína de matriz do hRSV	34
Figura 17 Entalpia calorimétrica do processo de desnaturação da proteína M em diferentes concentrações salinas.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC: Antes da clivagem

CD: *Circular Dichroism* (Dicroísmo Circular)

CMIB: Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular

DC: Depois da clivagem

DLS: *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento de luz dinâmico)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade Óptica

DSC: *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria Diferencial de Varredura)

DTT: Ditioneitol

EDTA: *Ethylenediaminetetra acetic acid* (ácido Etilenodiamino tetracético)

ELU: Eluição

FT: *Flow-through*

HCl: Ácido Clorídrico

HRSV: *Human Respiratory Syncytial Virus*

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB: *Luria-Bertani broth*

LRTI: Infecções do rato respiratório inferior

M: Marcador de massa molecular

NaCl: Cloreto de Sódio

NaF: Fluoreto de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

Ni-NTA: *Nickel Nitrilotriacetic Acid* (Ácido Nitrilotriacético)

pH: Potencial hidrogeniônico

PI: Ponto isoelétrico

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetilsulfonila)

RNA: Ácido Ribonucleico

RNP: Ribonucleoproteico

RPM: Rotações por minuto

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
(Eletroforese em Gel de Poliacrilamida desnaturante)

TEVP: *Tobacco Etch Virus Protease*

UA: Unidades de absorvância

URTI: Infecções do trato respiratório superior

UV/Vis: Espectro de luz na região do ultravioleta ao visível

VSR: Vírus Sincicial Respiratório

β ME: *β -mercaptoetanol* (2-mercaptoetanol)

LISTA DE SÍMBOLOS

m	Metro
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
g	Gramma
mg	Miligramma
ng	Nanogramma
µg	Microgramma
s	Segundo
min	Minuto
° C	Graus Celcius
K	Kelvin
mol	Mol
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
Cal	Calorias
kCal	Quilocalorias
ua	Unidades de Absorbância
J	Joule
kJ	Quilojoule
kb	Quilobases
×g	Veze Constante Gravitacional Universal
rpm	Rotações por minuto
ε	Coeficiente de Extinção Molar
ΔH	Variação de entalpia
ΔG	Variação de energia livre de Gibbs
T	Temperatura
R	Constante universal dos gases

θ	Sinal de CD registrado como miligraus
mdeg	Miligraus
l	Comprimento do caminho óptico
Da	Dalton
kDa	Quilodalton
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Vírus Sincicial Respiratório Humano	13
1.2 Importância da proteína M na infecção viral	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Clonagem e expressão da proteína	20
3.2 Extração e purificação das proteínas	21
3.3 Preparo das amostras para os experimentos	22
3.3.1 Preparo das amostras para desnaturação térmica	22
3.3.2 Preparo das amostras para variação de pH	22
3.3.3 Preparo das amostras para desnaturação com variação de sal.....	23
3.4 Medidas espectrofluorimétricas	23
3.4.1 Cálculo do centro de massa do espectro	23
3.5 Medidas de dicroísmo circular	24
3.6 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Produção e purificação da proteína	26
4.2 Desnaturação térmica da proteína	29
4.3 Variação de pH	30
4.4 Variação da concentração iônica	32
5. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS.....	37

1. Introdução

1.1 Vírus Sincicial Respiratório Humano

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) é responsável por mais de 60% das infecções do trato respiratório inferior em crianças no mundo todo e mais de 80% em crianças com menos de um ano (HALL et al., 2009, SHAY et al., 1999). Desta forma, até os dois anos de idade, muitas crianças já apresentaram uma ou duas infecções por RSV, onde, 40% apresentam infecção do trato respiratório inferior (JEANNE et al., 2009), sendo estas, infecções mais graves que podem agravar a clínica da doença. No grupo dos idosos, os dados apresentam um número total de hospitalizações maior que do vírus influenza. Estima-se que 78% das mortes causadas por hRSV sejam de adultos acima de 65 anos de idade, um número que tende a aumentar devido ao envelhecimento das populações, refletindo as mudanças nas estruturas sociais globais (THOMPSON et al., 2003, FALSEY et al., 2005).

O RSV pode ocasionar infecções tanto no trato respiratório superior (URTI), quanto no inferior (LRTI) (WU et al., 2007). A etiologia das URTI é caracterizada por tosse, dificuldade respiratória, coriza, dispneia e febre (KIM et al., 2007). As LRTI geralmente apresentam quadro clínico mais grave, sendo bronquiolite e pneumonia as doenças mais comumente associadas, principalmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (WU et al., 2007). A primeira infecção por RSV é geralmente mais grave, e ocorre durante os dois primeiros anos de vida (ZHAN et al., 2007). No entanto, infecções por RSV não proporcionam uma resposta imune efetiva no hospedeiro, de modo que a recidiva da infecção é comum, porém os sintomas são geralmente menos severos.

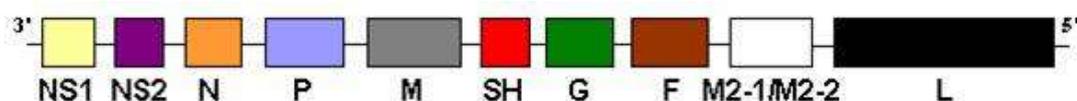
O vírus é dispersado por gotículas de muco ou saliva no momento que um indivíduo tosse, espirra ou fala. O contágio pode ser direto ou indireto, uma vez que indivíduos sadios entram em contato com secreções depositadas em um objeto ou superfícies e as conduz para mucosas orais, nasais ou oculares. Ao alcançar as células epiteliais ciliadas, do trato nasofaríngeo do futuro hospedeiro, o hRSV inicia sua replicação. Mas, ele também pode se propagar pelo epitélio bronquiolar e alveolar, onde ocorrem os sintomas característicos da infecção aguda do trato respiratório inferior (COLLINS et al., 2008, HALL et al., 1981, HALL et al., 1980).

Os surtos de hRSV apresentam sazonalidade regional, assim como ocorre com o vírus *Influenza*, porém nem sempre os ciclos de ambos os vírus coincidem. Fatores

como a umidade são importantes para a disseminação do vírus, principalmente em regiões tropicais. Mas, de maneira geral, os picos no número de casos ocorrem em meses de inverno, nos quais a temperatura é mais amena e as pessoas tendem a se aglomerar em suas casas, facilitando a transmissão intrafamiliar, em que o contágio geralmente ocorre dos indivíduos adultos para as crianças (HEIKKINEN et al., 2015, PAYNTER S., 2015, YANG et al., 2015). Apesar de existirem dois subtipos virais (RSVA e RSVB), não existe distinção geral clara entre a sazonalidade de ambos. O que se sabe até o momento é que os subtipos alternam surtos e que RSVA gera títulos virais mais altos, provavelmente facilitando sua dispersão nos momentos de aglomeração familiar. Reservatórios para o vírus ainda não foram encontrados, possivelmente este continue se replicando de forma mais amena em hospedeiros adultos ou em crianças durante o verão (KIM et al., 2015, AUSAR et al., 2005).

O hRSV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae*, gênero *Orthopneumovirus* (ADAMS et al., 2016), com nucleocapsídeo helicoidal circundado por um envelope lipídico externo onde se encontram as glicoproteínas de membrana. O genoma do RSV é constituído por RNA fita simples de polaridade negativa, não segmentada, composta por aproximadamente 15.200 nucleotídeos e 10 genes, que codificam 11 proteínas, devido a duas regiões de leitura aberta sobrepostas localizadas no gene M2, produzindo as proteínas M2-1 e M2-2 (COLLINS et al., 1991) (Figura 1).

Figura 1. Esquema da organização do RNA do Vírus Sincial Respiratório (RSV).



Fonte: Modificada a partir de www.micro.msb.le.ac.uk.

Dentre as proteínas, duas não estruturais (NS1 e NS2) são responsáveis pela evasão da resposta imune; das oito proteínas estruturais, cinco (N, P, L, M2-1 e M2-2) formam o complexo nucleocapsídeo envolvido na replicação e transcrição viral e quatro (SH, M, G e F) estão associadas à membrana, sendo que as proteínas G e F são glicoproteínas com função de adesão e fusão do vírus com a célula hospedeira (JIN et al., 2000, WHITEHEAD et al., 1999). Assim, o processo de infecção viral ocorre

devido à ligação e fusão do vírus à célula, com duas proteínas em particular sendo importantes: proteína de ligação (G) e proteína de fusão (F), que são os alvos primários dos anticorpos do hospedeiro. A glicoproteína G medeia a ligação do vírus à célula do hospedeiro, em seguida a proteína F promove a fusão do vírus com a célula do hospedeiro e também promove a agregação de múltiplas células, dando origem a grandes células multinucleadas (produzindo o sincício, estrutura que dá nome ao vírus) (PETERS et al., 2008), permitindo a transmissão do vírus de célula a célula.

1.2 Importância da proteína M na infecção viral

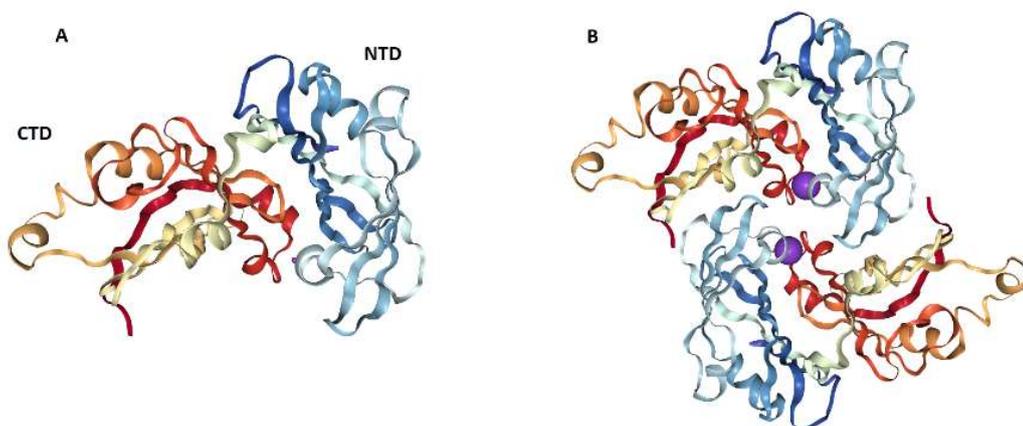
A proteína de matriz (M) do vírus sincicial respiratório humano é uma proteína estrutural não glicosilada composta por 256 aminoácidos. Esta envolve todo o complexo ribonucleoproteico (RNP, composto pelas proteínas L, N e P), localizando-se entre a proteína M2-1 e a bicamada lipídica viral (MARTY et al., 2004, KISS et al., 2014). No início da infecção viral, a proteína M é direcionada ao núcleo da célula hospedeira por meio de proteínas de transporte nuclear, como a Importina-1. Neste local, ela desempenha um papel regulatório na parada do ciclo celular (KIPPER et al., 2015). Estudos indicam estreita relação entre a proteína M e a expressão do gene p53, que codifica um fator supressor de tumores que, por meio de uma cascata de ativação gênica, desencadeia a pausa no ciclo celular, quando expresso em grande quantidade. Portanto, a proteína M pode interromper a transcrição na célula infectada, enquanto o vírus replica seu material genético (IMANI, F., 2012). Em seguida, através de uma proteína de transporte nuclear diferente, como a CRM-1, a proteína de matriz viral migra do núcleo para o citoplasma, interage com M2-1, e juntas adentram corpos de inclusão, onde se encontram os complexos RNPs. Nesta etapa, ocorre a passagem da fase de transcrição viral para a de empacotamento, pois cessa-se a transcrição e a proteína M inicia a coordenação da etapa de brotamento viral (IMANI, F., 2012, MITRA et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2013).

Para o brotamento, a proteína M atua no empacotamento e transferência dos complexos RNPs, localizados dentro de corpos de inclusão, para regiões de jangadas lipídicas, onde ocorrerá a liberação dos novos vírions. Sendo assim, M é imprescindível para o brotamento viral, estimulando a curvatura ideal da membrana para o surgimento das partículas virais (RAY et al., 2016, SHAHRIARI et al., 2016).

Existem evidências na literatura que sugerem que a proteína M interage com o citoesqueleto da célula hospedeira, como a actina, para efetuar a condução do complexo formado entre RNP-M (SHAHRIARI et al., 2016, SHAHRIARI et al., 2018). A proteína M pode ainda interagir tanto com as glicoproteínas virais quanto com as do hospedeiro (CAV1, por exemplo) (KIPPER et al., 2015) e as conduzir conjuntamente à formação de um complexo. Para que o processo de endereçamento e brotamento seja bem-sucedido, a proteína M deve interagir não apenas com F, G e M2-1, mas também com N e P e outros fatores celulares. Esta interação possibilita sua oligomerização, assim como ocorre em proteínas de matriz dos demais *paramyxovirus*, conferindo à partícula viral um formato filamentoso típico quando próxima a membrana celular (MITRA et al., 2012, SHAHRIARI et al., 2016).

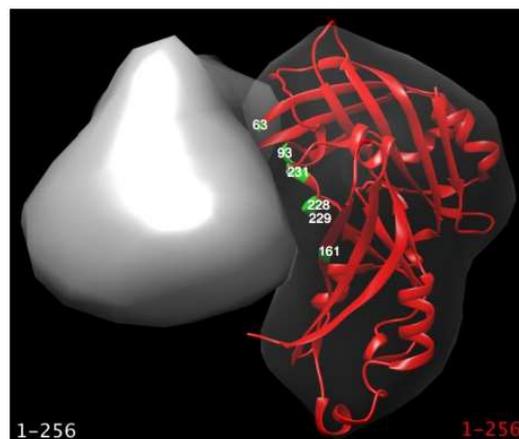
Estruturalmente, a proteína M é constituída por dois domínios distintos que são o N e C terminais, conectados por uma alça de 13 resíduos de aminoácidos (Figura 2). O domínio N-terminal possui formato de ferradura enquanto o C-terminal apresenta a configuração de um barril achatado, ambos contendo, majoritariamente, folhas β , com aparente sítio de ligação a metais bivalentes. Estudos mostraram que a proteína M pode interagir consigo mesma e realizar uma auto-oligomerização, possibilitando a formação de oligômeros pela interação entre a região N-terminal de uma proteína com a C-terminal de outra (BAJOREK et al., 2014, TREVISAN et al., 2018).

Figura 2 Estrutura da proteína M (PDB: 4V23) sendo que, (A) é a representação da estrutura monomérica da proteína com seus domínios CTD (domínio C-terminal) e NTD (domínio N-terminal) e (B) é a representação da proteína M dimérica, onde as esferas roxas indicam o local de co-cristalização do potássio.



A interface dos dímeros é compreendida pelos resíduos 63 a 68, 92 a 105, 129 a 134, 144, 163, 225 a 235. Já a treonina 205, modula a oligomerização da proteína M a partir de fosforilação mediada pela proteína P. Foi demonstrado, ainda, que todos os resíduos são necessários para a formação de um dímero estável (Figura 3) (FORSTER et al., 2015, TREVISAN et al., 2018). A carga residual positiva sobre os domínios de M pode possibilitar a sua interação com a membrana plasmática de pneumócitos, cuja carga residual é negativa, deixando algumas regiões hidrofóbicas expostas, que provavelmente servem para interagir com outras proteínas (MONEY et al., 2009a), corroborando com os dados da literatura a respeito das interações entre os monômeros da M, com outras proteínas virais e do hospedeiro.

Figura 3 Modelo dimérico da estrutura da proteína M evidenciando os aminoácidos essenciais para a dimerização da mesma.



Fonte: Adaptado de Trevisan, et al. (TREVISAN et al., 2018).

Desta forma, a proteína de matriz (M) tem grande importância no processo de infecção viral, no qual interage com diversas proteínas virais e celulares. Conhecer as características estruturais e conformacionais da proteína M em diversas condições físico-químicas é importante para o conhecimento dos estados oligoméricos e dinâmica que essa biomolécula apresenta em solução. Desta forma, o conhecimento deste comportamento pode elucidar a incongruência evidenciada quanto a cristalização da proteína em conformação monomérica (MONEY et al., 2009b) e dimérica (FORSTER et al., 2015). São reportados na literatura estudos do mesmo tipo realizados com a proteína M2-1 do HRSV, que demonstraram que variações de temperatura e pH podem induzir alterações em sua conformação, mudando assim seu

estado oligomérico (LEYRAT et al., 2014, ESPERANTE et al., 2011). O mesmo já foi realizado para a proteína não estrutural NS1, demonstrando mudanças conformacionais dependentes do pH (PRETEL et al., 2013).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Sabendo da importância da proteína M na infecção pelo hRSV, o presente estudo teve como objetivo conhecer as variações da proteína referentes a composição de estrutura secundária e estados oligoméricos em diferentes condições físico-químicas de temperatura, pH e força iônica. Para isso primeiramente foi feita a transformação de bactérias *Escherichia coli* da linhagem RIL com o plasmídeo pD441-NHT:M que contém o gene da proteína M, em seguida foi feita a expressão e purificação da proteína M. Uma vez pura foram realizados experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular (CD), emissão de fluorescência do triptofano e calorimetria de varredura diferencial (DSC) em diversas condições de pH, concentração iônica e temperatura.

3. Material e métodos

3.1 Clonagem e expressão da proteína

O DNA que codifica a proteína M com 256 aminoácidos foi obtido da empresa DNA2.0 (ATUM) em vetor de expressão pD441-NHT:M com sítio de clivagem para TEVP (*Tobacco Etch Virus Protease*) e cauda de seis resíduos de histidina (composição final 269 aminoácidos e 30 kDa). O DNA foi utilizado no processo de transformação em *E. coli* da linhagem BL21 RIL e a transformação foi realizada por meio de choque térmico, com o uso de gelo e banho térmico. Primeiramente, foram adicionados 100 ng de plasmídeo ao tubo contendo as células competentes (BL21 RIL), que foi levado ao gelo por 30 minutos, depois ao banho térmico (42 °C), por 1 minuto e retornado ao gelo por mais 2 minutos. Em seguida, as bactérias foram inoculadas em meio de cultura LB, sob agitação. As culturas foram, então, clarificadas por centrifugação e os *pellets* formados foram usados para realizar a semeadura em placas de petri, contendo meio de cultura solidificado com ágar, contendo 34 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de sulfato de canamicina. As placas foram incubadas em estufa, por 16 horas, a 37 °C para crescimento das colônias bacterianas.

Após o crescimento, três colônias de cada placa foram selecionadas visualmente e submetidas a testes de expressão. Para os testes de expressão, as colônias foram inoculadas separadamente em 5 mL de meio de cultura LB contendo os mesmos antibióticos, até atingirem a densidade óptica (DO) de 0,8 unidades de absorvância (ua). A indução de expressão foi realizada *overnight*, a 28 °C, com a adição de 0,4 mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Posteriormente foi realizada a comparação entre os períodos pré-indução e pós-indução de expressão gênica. Alíquotas de cada período testado foram retiradas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), possibilitando determinar quais clones foram os mais adequados para expressar a proteína de interesse. Os melhores clones foram estocados com 25% de glicerol, em freezer -80 °C.

O clone que apresentou melhor expressão foi adicionado a um *Erlenmeyer* com 50 mL de LB, contendo 34 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de sulfato de canamicina e colocado para crescer sob agitação a 37 °C, por 16 horas. Em seguida a cultura foi transferida para um frasco maior, com volume total de 1 L, adicionando-se mais antibióticos para manter a concentração inicial, sob as mesmas condições de agitação

e temperatura, até atingir a DO de 0,8 ua, quando foi realizada a indução da expressão com 0,4 mM de IPTG a 28 °C, sob agitação por 16 horas.

3.2 Extração e purificação das proteínas

Transcorrido o período de indução, a cultura foi clarificada por centrifugação a $4000 \times g$, 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspenso em tampão de lise contendo: 500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM β -mercaptoetanol (β ME), 0,5% Triton X-100, 5% glicerol, 0,5 mM de inibidor de protease (PMSF) e 1 mg/mL lisozima. Após homogeneizada, a suspensão foi incubada por 50 minutos em gelo e, então, levada para a etapa de lise por sonicação. O lisado foi clarificado a 17.000 rpm (25.000 \times g), por 50 minutos a 4 °C. O *pellet* formado foi descartado, enquanto o sobrenadante contendo a fração solúvel de proteínas passou por filtro com diâmetro de poro de 0,45 μ m (*Minisart*[®]) e submetido à purificação por cromatografia de afinidade. Alíquotas de cada uma das etapas de lavagem e eluição foram preparadas para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, com o propósito de determinar o grau de pureza da proteína.

A proteína M foi expressa com cauda de poli histidina (His₆), seguida por um sítio de clivagem para TEVP, em sua extremidade N-terminal. Desta forma, a purificação da proteína de interesse foi realizada manualmente por cromatografia de afinidade, em resina carregada com níquel. Primeiramente, a fração solúvel obtida da lise foi inserida em uma coluna de cromatografia, previamente equilibrada com tampão de equilíbrio contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8), 500 mM de NaCl, 5 mM de Imidazol e 1 mM de β ME. As etapas de lavagem e eluição ocorreram logo em seguida, com um gradiente de imidazol variando de 10 mM a 1 M. Para a confirmação de que a proteína eluída de fato se tratava da proteína M, foi realizado um *Western Blot* com a amostra, utilizando anticorpo para detecção da cauda de poli histidina.

Posteriormente, as amostras contendo a proteína de interesse eluída foram concentradas para 1 mL em filtros de centrifuga *Amicon*[®] *Ultra-15*. Uma vez concentrada, a amostra de proteína foi submetida a clivagem com TEVP (produzida de forma recombinante no próprio CMIB), com objetivo de remover sua cauda His₆. O processo consistiu em diluir a proteína pela metade em tampão contendo: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 10 μ M de cloreto de potássio, 2 mM DTT. A diluição foi

realizada a fim de propiciar condições ideais para o funcionamento da protease. Por fim, a TEVP foi adicionada na proporção 30:1 (M/TEVP mol/mol) e a amostra foi incubada a 20 °C, por 20 horas. A etapa seguinte consistiu em uma nova purificação por cromatografia de afinidade, desta vez com o intuito de separar a proteína clivada da protease (TEVP também contém cauda His₆, no entanto não possui sítio para clivagem, o que impede autoclivagem). Terminado esse procedimento, foi realizado novo SDS-PAGE para verificação de pureza e da ocorrência de clivagem, para então concentrar a proteína até 500 µL e submeter a nova metodologia cromatográfica.

Um último processo de purificação de exclusão molecular, também denominada gel filtração, foi realizado em um sistema de purificação automatizado (*ÅKTA purifier*, GE Healthcare®), com a intenção de retirar os contaminantes restantes e trocar o tampão da proteína de interesse. Para isso, a coluna de gel filtração foi equilibrada com tampão contendo 50 mM de fosfato de sódio (pH 7), 150 mM de NaCl e 1 mM de βME. As eluições foram realizadas com o mesmo tampão, as amostras desta etapa foram coletadas e alíquotas foram submetidas a um novo SDS-PAGE para análise de pureza, para então prosseguir para os experimentos.

3.3 Preparo das amostras para os experimentos

Passadas as etapas de purificação, foram realizadas medidas de espectroscopia de UV/Vis, com espectrofotômetro *BioMate™ 3S Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) equipado com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Estas medidas foram realizadas para se determinar a concentração estoque da amostra da proteína M (Figura 9). No cálculo da concentração da proteína, foi utilizado o valor do coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280} = 25900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ obtido a partir do programa *ProtParam* (Expasy).

3.3.1 Preparo das amostras para desnaturação térmica

A solução estoque de proteína foi preparada em tampão similar ao tampão de gel filtração (50 mM de fosfato de sódio (pH 7), 150 mM de NaF e 1 mM de βME) em concentração final de 5,7 µM.

3.3.2 Preparo das amostras para variação de pH

As amostras de proteína foram preparadas nos pH 4,5 a 10 com incrementos de 0,5. Cada amostra de proteína foi preparada em concentração final de 5 µM em um

tampão universal contendo: 50 mM de citrato de sódio, 50 mM de borato de sódio e 50 mM de fosfato de sódio monobásico. O pH foi ajustado manualmente com HCl e NaOH. As amostras preparadas foram incubadas por 4 horas a 4 °C antes das medidas, para certificação de que a proteína não precipitaria.

3.3.3 Preparo das amostras para desnaturação com variação de sal

Para a preparação das amostras de proteína nas diferentes concentrações salinas, primeiramente foram feitos dois tampões, um sem NaCl e outro contendo 4 M do mesmo, ambos com de 50 mM de fosfato de sódio e 1 mM de DTT. A partir disso as amostras de proteína foram preparadas a 1 mg/mL (~30 µM) com as concentrações salinas de 150, 300, 500, 1000 e 2000 mM.

3.4 Medidas espectrofluorimétricas

As medidas de fluorescência foram realizadas no equipamento ISS PCI *Photon Counting Spectrofluorometer*, equipado com controlador de temperatura e cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Para todos os experimentos realizados, os triptofanos da proteína M foram excitados em 295 nm e os espectros de emissão foram coletados no intervalo de 300 a 500 nm. As aberturas de fenda utilizadas foram de 1 mm tanto na excitação quanto na emissão. Os espectros resultam da média de 10 acumulações. Para os experimentos de variação de pH os espectros da proteína foram coletados todos a 25 °C. Já na desnaturação térmica, a primeira medida foi feita a 20 °C, e os espectros subsequentes foram coletados a cada 2 °C, sendo então: 22, 24, 26, ..., 70 °C. A cada elevação de temperatura aguardava-se 10 min para a estabilização do sistema. Após cada medida, a proteína foi agitada e um novo espectro foi coletado, este processo foi repetido para todas as condições de pH e variação de temperatura.

3.4.1 Cálculo do centro de massa do espectro

Para realizar uma normalização dos espectros, foi analisada a mudança do centro de massa do espectro, utilizando a equação adaptada de Esperante (ESPERANTE et al., 2011) (equação 1):

$$CM = \frac{\sum(v_i F_i)}{\sum F_i} \quad (1)$$

sendo que CM corresponde ao centro de massa espectral, F_i é a intensidade de fluorescência e v_i é o comprimento de onda.

3.5 Medidas de dicroísmo circular

Para os experimentos de dicroísmo circular (abreviado do inglês como *CD*, de *Circular Dichroism*), foi utilizado o equipamento Jasco J-815 (Jasco, USA) equipado com um sistema Peltier para controle de temperatura e uma cubeta de quartzo de 0,5 mm de caminho óptico, a qual estava acoplada a um bloco espaçador de metal de 9 mm. Os espectros são o resultado de 10 varreduras em um intervalo espectral de 260–200 nm com uma resolução de 0,1 nm em uma velocidade de varredura de 50 nm·min⁻¹ e 1,0 nm de largura de banda espectral. O sinal de CD foi registrado como elipticidade (θ) em miligraus.

No experimento de desnaturação térmica a fração de proteína desnaturada (f_D) no processo de desenovelamento foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$f_D = \frac{\theta - \theta_D}{\theta_N - \theta_D}, \quad (3)$$

sendo que θ , θ_N e θ_D são sinais de CD da proteína em cada temperatura investigada, na primeira (proteína nativa) e na última (proteína desnaturada) temperatura, respectivamente. Portanto, a fração de proteína nativa foi calculada por $f_N = 1 - f_D$. A temperatura na qual $f_N = f_D$ é denominada a temperatura de *melting* ou de desnaturação (T_m). Usando um modelo de transição de dois estados (nativa ↔ desenovelada) (OLSSON et al., 2010):

$$\frac{\theta_N - \theta}{\theta_N - \theta_U} = \frac{K_u}{1 + K_u} \quad (4)$$

sendo que,

$$K_u = \exp\left(\frac{\Delta H_m(1 - T/T_m)}{RT}\right) \quad (5)$$

no qual o sinal espectroscópico é dependente de temperatura, θ_N e θ_U são os sinais da proteína nos estados nativa e desenovelada, respectivamente, T é a temperatura absoluta, T_m é a temperatura de *melting*, K_u é a constante de equilíbrio de desnaturação e ΔH_m é a entalpia de desnaturação térmica de *van't Hof* no T_m .

3.6 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

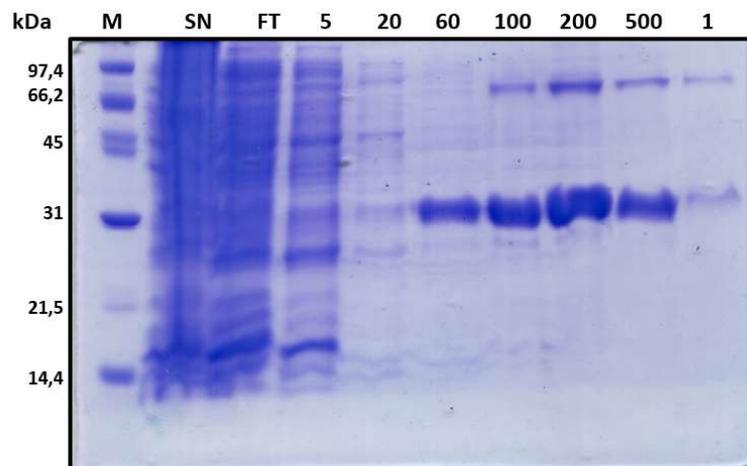
Os experimentos de DSC foram realizados utilizando o calorímetro N-DSC III (TA Instruments, USA) na faixa de temperatura de 10 a 80 °C com uma taxa de varredura de 1,0 °C/min. Inicialmente, as duas células de amostra do calorímetro foram preenchidas com a solução tampão e deixadas equilibrar a 10 °C por 10 minutos e, em seguida, varreduras de temperatura 10–80 °C foram realizadas repetidas vezes (~10) até que a linha de base do equipamento fosse reprodutível. Após a calibração da linha de base com a solução tampão, uma das células de amostra do calorímetro teve sua solução trocada por outra contendo a proteína M. O processo de varredura de temperatura com o equipamento contendo a proteína procedeu da seguinte forma: i) aquecimento e resfriamento de 10 a 25 °C para equilíbrio térmico do calorímetro, e ii) aquecimento e resfriamento de 10 a 80 °C para realizar o processo de desnaturação da proteína e por fim, foi realizado um iii) aquecimento de 10 a 80 °C para investigar um possível reenovelamento. A contribuição da capacidade calorífica à pressão constante (C_p , $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) da solução tampão foi subtraída dos valores da proteína M na faixa de temperatura investigada. A variação de entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}^D) para o processo de desnaturação foi determinada pelo cálculo da área do termograma da proteína, depois da linha de base ter sido corrigida.

4. Resultados e Discussão

4.1 Produção e purificação da proteína

A figura 4 mostra o resultado obtido pelo processo de purificação por cromatografia de afinidade em gradiente crescente na concentração de imidazol. Ao longo do gradiente, nota-se a existência de uma banda de proteína eluída a partir de 60 mM do competidor, com massa molecular similar a proteína M (30 kDa), porém ainda na presença de alguns contaminantes.

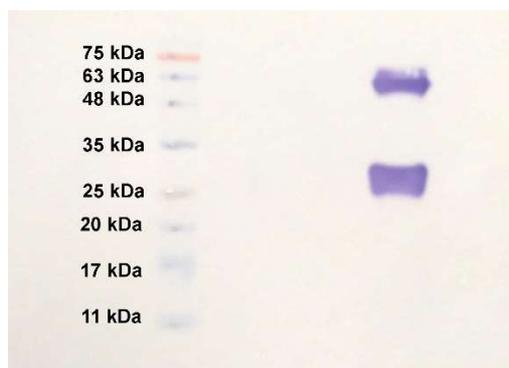
Figura 4. SDS-Page da purificação por afinidade a níquel. (M) marcador; (SN) fração solúvel após a lise celular ou sobrenadante; (FT) proteínas que passaram sem aderir à coluna ou *flow-through*; (5) lavagem com 5 mM de imidazol; (20) lavagem com 20 mM de imidazol; e eluições da proteína com 60, 100, 200, 500 mM e 1M de Imidazol.



Fonte: autoria própria

Utilizando uma amostra obtida da purificação por afinidade foi realizado *Western Blot* para confirmação de que a proteína eluída de fato se tratava da proteína M (figura 5). Nele foi possível observar uma grande banda entre os marcadores de massa molecular de 25 e 35 kDa, correspondendo à proteína de interesse em seu estado monomérico. Porém devido à alta concentração em que a amostra se encontrava, também foi possível identificar que, mesmo após o processo de desnaturação, houve formação de um possível estado dimérico, referente a banda próximo a 60 kDa.

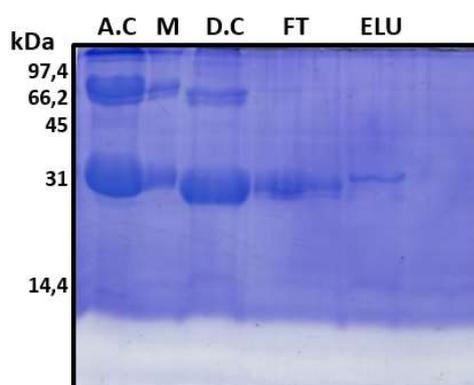
Figura 5. Western Blot da amostra de proteína M. As bandas coloridas são referentes ao marcador de massa molecular e as azuis escuras são referentes a proteína purificada.



Fonte: autoria própria

Após a confirmação, a solução com a proteína foi submetida ao processo de clivagem com TEVP para remoção da cauda His₆. Ao fim do processo foi realizado um novo SDS-PAGE (Figura 6) no qual foi possível a verificação da ocorrência da clivagem em boa parte da amostra, uma vez que a maior parte não se ligou a coluna de afinidade, sendo eluída com o *flow-trough* e apresentando massa molecular de 28 kDa (agora com 257 aminoácidos). Uma pequena parte permaneceu sem clivagem aparecendo no processo de eluição e foi descartada.

Figura 6. SDS-Page da clivagem da proteína M com TEVP protease. (A.C) Amostra de proteína antes da clivagem; (M) marcador de massa molecular; (D.C) amostra após a clivagem; (FT) *flow-trough* ou amostra que não se ligou a coluna; (ELU) eluição com 1 M de Imidazol.

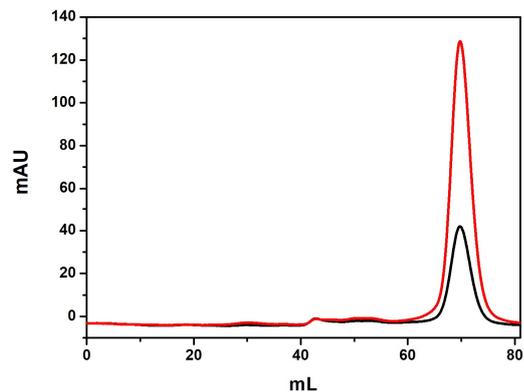


Fonte: autoria própria

Por fim, as amostras contendo a proteína clivada foram concentradas e submetidas ao processo de purificação por exclusão molecular. As eluições foram coletadas de acordo com o cromatograma (Figura 7) e alíquotas foram submetidas a

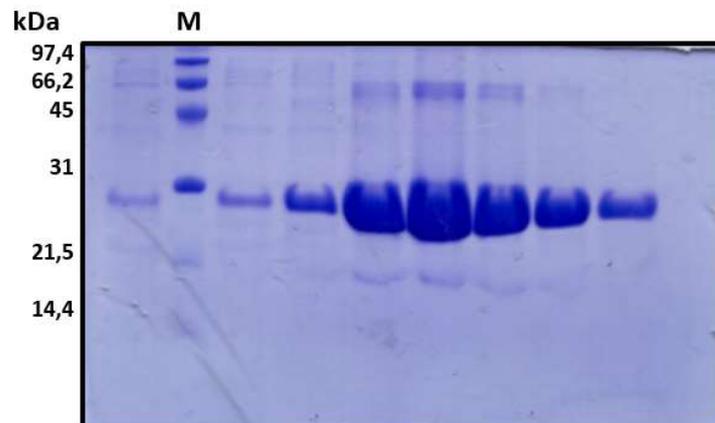
análise por SDS-PAGE (Figura 8), no qual foi possível observar grandes bandas com massas correspondentes a 28 kDa, apresentando alto grau de pureza. As amostras com elevado grau de pureza foram concentradas e em seguida utilizadas para prosseguir com os experimentos.

Figura 7. Cromatograma de exclusão molecular da proteína M. A linha vermelha representa a absorbância no comprimento de onda de 280 nm; a linha preta representa a absorbância no comprimento de onda de 260 nm. Pode-se observar que a proteína foi eluída próximo a 70 mL.



Fonte: autoria própria

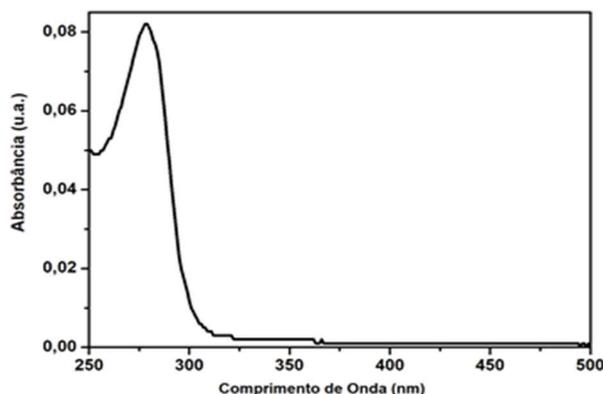
Figura 8. SDS-PAGE da cromatografia de exclusão molecular da proteína M. (M) Marcador. As demais bandas correspondem às frações de proteína eluída com bom grau de pureza.



Fonte: autoria própria

Por fim a concentração da proteína foi determinada por meio de espectroscopia de UV (Figura 9). Desta forma o rendimento da produção de proteína em um litro de expressão foi por volta de 200 μ M.

Figura 9. Espectro de UV da proteína M. A medida foi realizada por meio de titulação de 6 μL proteína em 600 μL tampão.

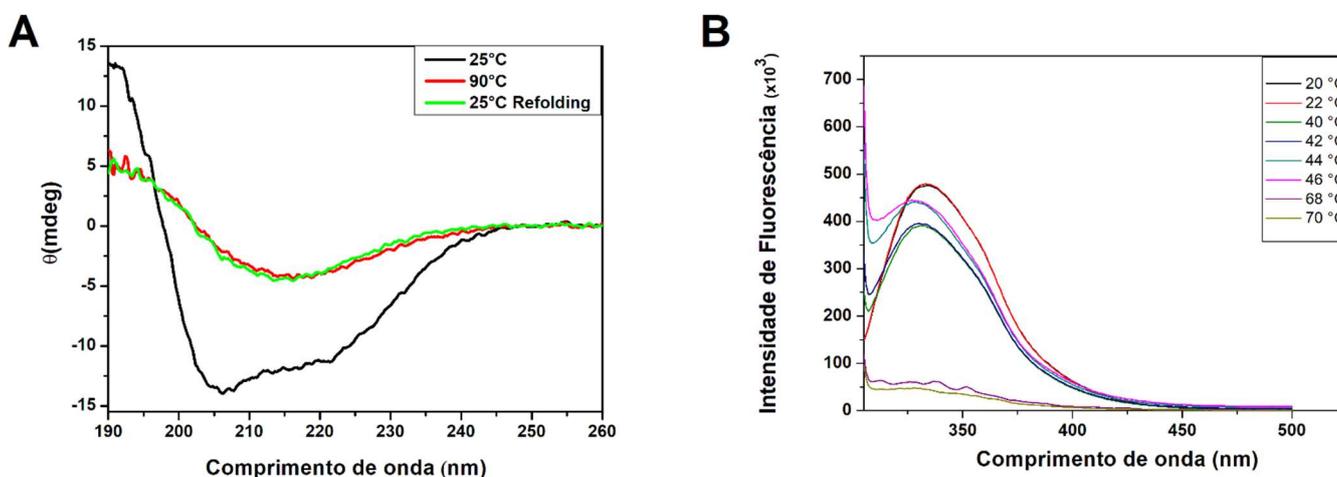


Fonte: autoria própria

4.2 Desnaturação térmica da proteína

Após a purificação, a proteína M foi submetida aos experimentos de desnaturação térmica acompanhada pelos espectros de dicroísmo circular e deslocamento do pico de emissão de fluorescência do triptofano (Figura 10).

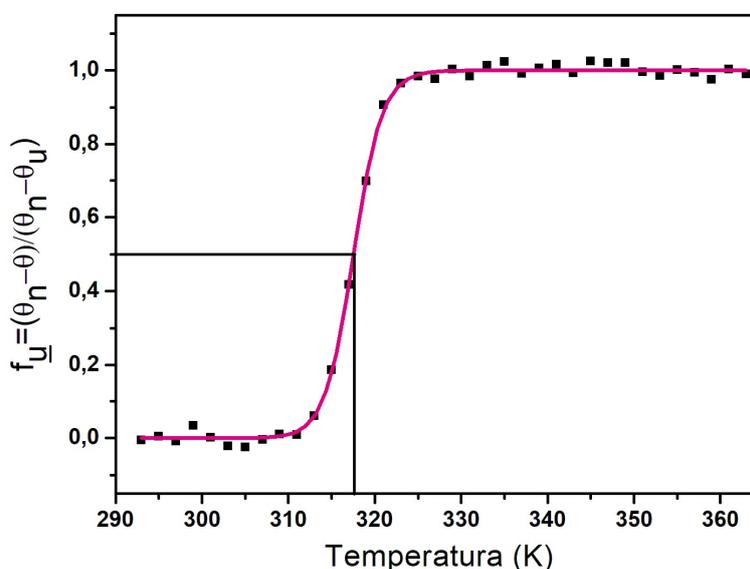
Figura 10. Espectros de CD e Fluorescência das análises com variação de temperatura. (A) Espectros de CD com 5 μM de proteína M, no qual a linha preta corresponde ao espectro coletado no início do experimento, em 25 °C, a linha vermelha corresponde ao espectro coletado após a elevação da temperatura, chegando a 90 °C e a linha verde corresponde ao retorno da temperatura para 25 °C na tentativa de reenovelamento (*refolding*). (B) Espectros de emissão de fluorescência da proteína M a 8 μM coletados a partir de 20 °C (linha preta) com acréscimos de 2 °C chegando a 70 °C (linha vermelha).



Fonte: autoria própria

Inicialmente, pode-se observar que a desnaturação térmica da proteína M é irreversível, uma vez que o espectro de reenovelamento (Figura 10 A) é muito similar ao espectro da proteína desenovelada a 90 °C. Desta forma, podemos afirmar que a proteína M não voltou a sua conformação de estrutura secundária com o retorno da temperatura. Além disso, pode-se observar um grande aumento do espalhamento de luz na região de 300 nm (Figura 10B) a partir dos espectros de 44 °C. Este processo pode ser indicativo de um processo de agregação da proteína, fato que confirma a impossibilidade de reenovelamento da mesma. Utilizando as equações 3, 4 e 5 foi possível realizar o ajuste teórico dos dados experimentais de CD (Figura 11), e desta forma, obter a temperatura de desnaturação da proteína de 44 °C (317 K), além da variação de entalpia de *van't Hoff* de $164,5 \pm 22,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Figura 11. Desnaturação térmica acompanhada pelo espectro de dicroísmo circular da proteína. A linha contínua identifica a temperatura em que 50% das proteínas em solução estão desnaturadas (temperatura de desenovelamento ou *melting*), correspondente a 44 °C (317 K).

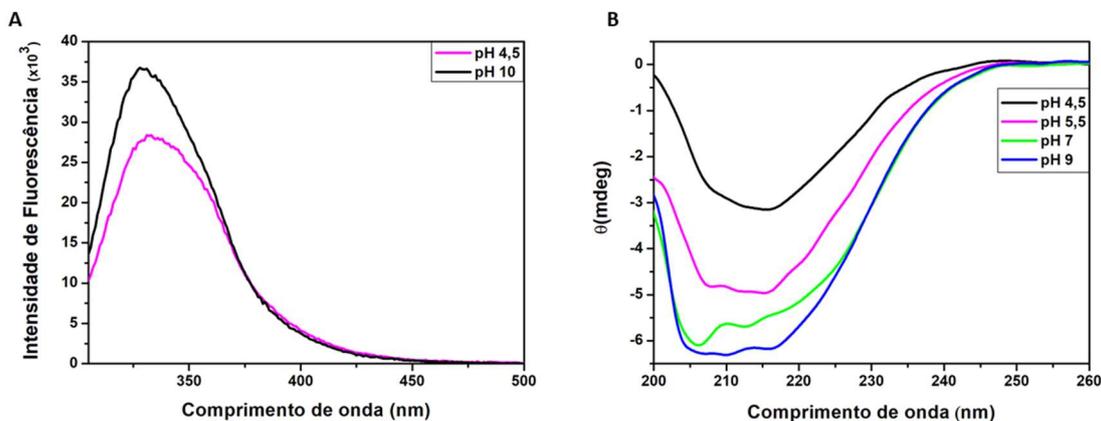


Fonte: autoria própria

4.3 Variação de pH

Após a preparação das amostras e transcorridas as 4 horas de incubação, as mesmas foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm (13.200×g). Foram então realizados os experimentos de fluorescência e CD, sendo o primeiro realizado com as amostras de pH de 4,5 a 10 e o CD foi realizado apenas dos pH de 4,5 a 9.

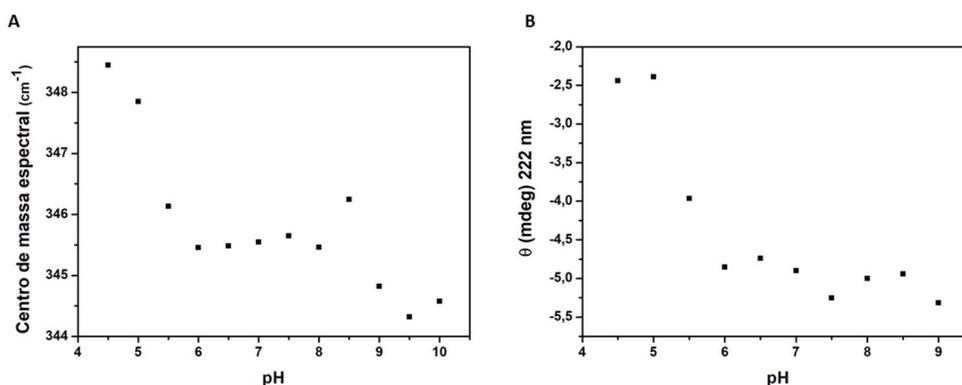
Figura 12. (A) Espectros de emissão de fluorescência da proteína M a 5 μM , nos pH 4,5 e 10. Os picos se encontram em 330 e 333 nm, respectivamente. (B) Espectros de dicroísmo circular da proteína a 5 μM , nos pH 4,5, 5,5, 7 e 9.



Fonte: autoria própria

Os resultados mostraram que os triptofanos da proteína se tornaram mais expostos ao solvente e que a elipticidade molar se tornou significativamente menos negativa em pH ácido, indicando uma desnaturação parcial da proteína (Figura 12). Apesar disso, ainda foi possível observar sinal de CD em pH 4,5, indicando que a mesma ainda possui parte de sua estrutura preservada. Também foi possível observar uma transição entre os pH 5 e 5,5 que se acentua em pH 6 (Figura 13). Além disto, existe uma aparente transição próximo ao pH 8,5, que pode ser devido a passagem pelo pI teórico da proteína (8,47) ou pode estar simplesmente relacionado a um perfil de decaimento do espectro.

Figura 13. (A) Centro de massa espectral da proteína M em diferentes condições de pH. (B) Variação da elipticidade molar (Θ) medida no comprimento de onda de 222 nm em relação a variação de pH.

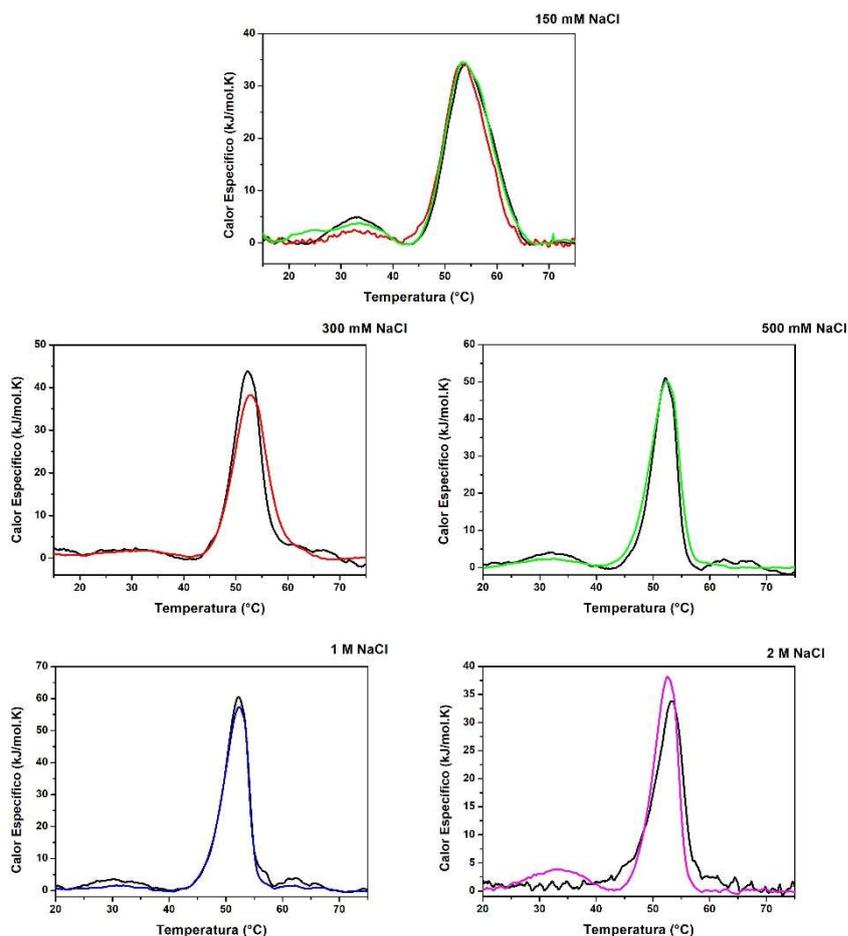


Fonte: autoria própria

4.4 Variação da concentração iônica

As amostras de 150, 300, 500, 1000 e 2000 mM foram preparadas e em seguida levadas ao equipamento de DSC. A Figura 14 mostra os termogramas obtidos para as diferentes concentrações salinas.

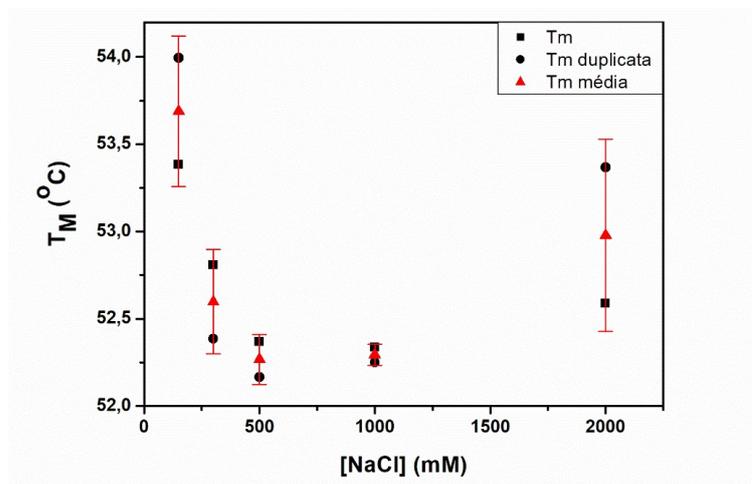
Figura 14. Termogramas de desnaturação da proteína M em diferentes concentrações salinas. As diferentes linhas coloridas representam as réplicas do experimento (1 mg/ml, 30 μ M).



Fonte: autoria própria

Os experimentos foram coletados em duplicata com proteínas recém produzidas. É possível perceber que todos os termogramas apresentam um máximo de calor específico (C_p) em aproximadamente 50 °C, correspondente a desnaturação da proteína, porém alguns apresentam um outro máximo de C_p , por volta de 30 °C. Provavelmente, o segundo sinal pode estar relacionado a um arranjo organizado da proteína, no qual agregados solúveis são desfeitos. Apesar de apresentar um padrão, este fato não pode ser confirmado uma vez que não aparece em todos os experimentos. Neste sentido, mais experimentos precisam ser feitos.

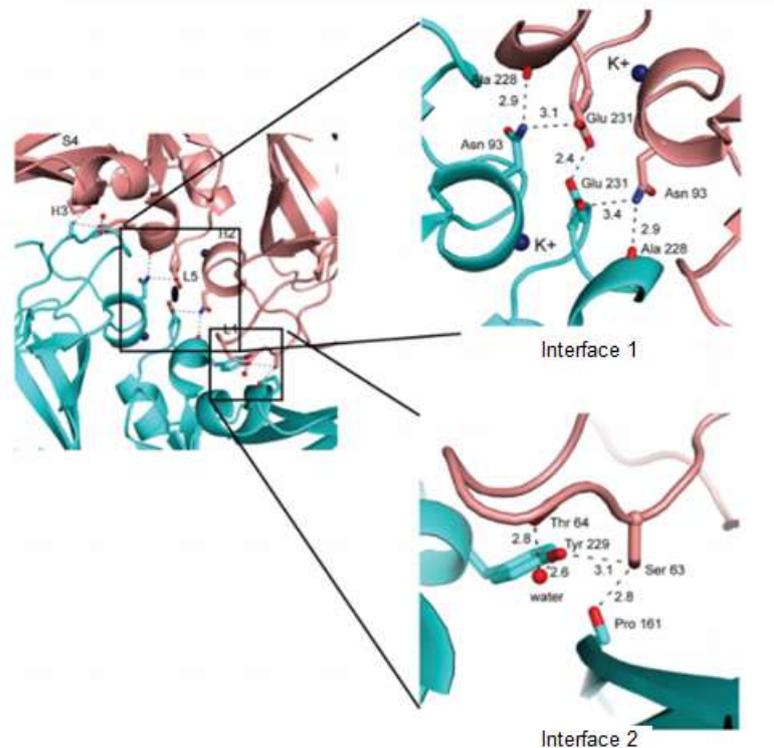
Figura 15. Temperatura de *melting* da proteína M em diferentes concentrações salinas. Os quadrados e os círculos representam a medida e sua duplicata. Já os triângulos representam a média das temperaturas obtidas com o desvio padrão.



Fonte: autoria própria

A temperatura de desenovelamento (*melting*) da proteína em 150, 300, 500, 1000 e 2000 mM de NaCl foi de 53,68, 52,59, 52,26, 52,29 e 52,97 °C (Figura 15), respectivamente, como observado na Figura 15. Desta forma pode-se evidenciar que de 150 mM a 1 M existe uma diminuição da estabilidade térmica da proteína uma vez que a temperatura de *melting* tem tendência decrescente. Entretanto na concentração de 2 M, pode-se observar uma elevação no Tm em relação as três concentrações salinas anteriores. A diminuição da temperatura de desenovelamento com o aumento da concentração de sal pode ser devido a duas hipóteses: i) pode estar ocorrendo uma ligação sítio específica de um dos íons Na⁺ ou Cl⁻ na proteína, a qual poderia promover um efeito de desestabilização térmica da mesma, ou ii) o sal poderia também promover um efeito desestabilizante na interface polar de interação dos protômeros no dímero. Como observado na Figura 16, os resíduos envolvidos na interface da dimerização são polares ou carregados. Por mais que existam contatos hidrofóbicos, as ligações de hidrogênio desempenham papel crucial na formação do dímero. Assim, a adição de sal também poderia desestabilizar a interação entre os monômeros enfraquecendo assim o dímero da proteína M e, dessa forma, torná-la menos estável, uma vez que o dímero é a forma predominante que a proteína se encontra em solução (TREVISAN et al., 2018).

Figura 16. Visão ampliada da interface de dimerização da proteína de matriz do hRSV. As ligações de hidrogênio são mostradas pelas linhas pontilhadas com mais detalhes nos dois destaques. (Acima direita) Interface 1 compreendendo os resíduos Asn 93, Ala 228 e Glu 231. O íon potássio é indicado como uma esfera azul. (Abaixo à direita) Interface 2 que compreende os resíduos Ser 63, Thr 64, Pro 161 e Tyr 229. Fonte: adaptada de Foster, A et al. (FORSTER et al., 2015).

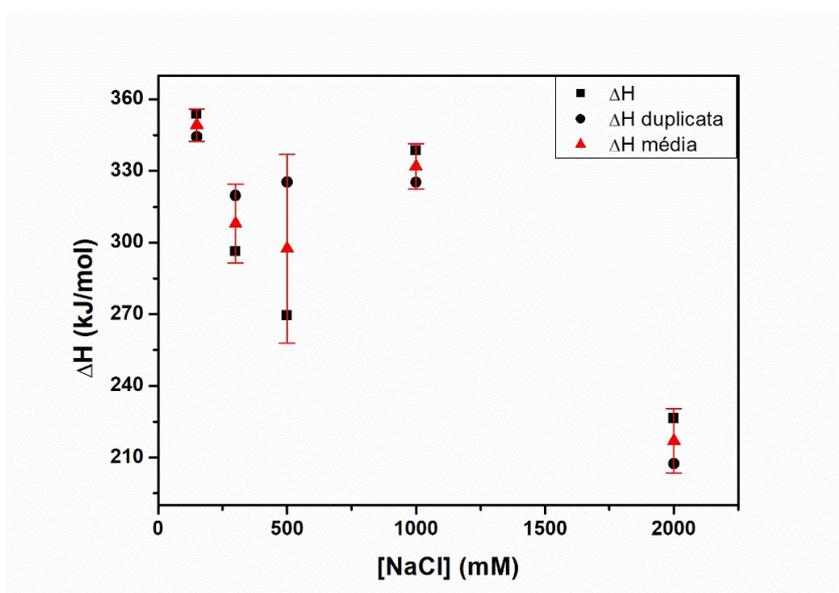


Fonte: autoria própria

No experimento com concentração de 2 M de NaCl, houve um aumento na temperatura de *melting*, em relação as três concentrações salinas anteriores. Este fato pode estar ligado ao efeito de *salting-out*, no qual os efeitos de *Hofmeister* e a atividade de água são modificados. Estas características auxiliam com que os aminoácidos que estavam em condições de carga desfavoráveis, agora estejam em ligações favoráveis, aumentando assim a estabilidade térmica da proteína (CORONADO, et al. 2017).

Além da avaliação do T_m , também foram extraídos os valores de variação de entalpia calorimétrica (Figura 17), o que mensura a quantidade de energia necessária para desenovelar a proteína.

Figura 17. Variação de entalpia calorimétrica do processo de desnaturação da proteína M em diferentes concentrações salinas. Os quadrados e os círculos representam a medida e sua duplicata. Já os triângulos representam a média das temperaturas obtidas com o desvio padrão.



Fonte: autoria própria

A variação de entalpia calorimétrica segue a mesma característica de queda a partir de 150 mM até 1 M de NaCl, podendo estar associado diretamente ao fato de que é necessário menos energia para chegar a temperatura *melting*, uma vez que ela é menor. Já na concentração de 2 M de NaCl há uma queda brusca na entalpia calorimétrica, que é acompanhada pelo aumento do T_m que provavelmente está relacionado ao limiar do efeito de *salting out*.

É possível observar uma discrepância entre os valores de temperatura de *melting* encontrados para os experimentos de CD e DSC na mesma condição de tampão. Isto pode estar relacionado ao fato de que os dois experimentos mensuram parâmetros diferentes: o primeiro mede valores de elipticidade molar, ou seja, ele monitora mudanças de estrutura secundária da proteína, já o segundo, mensura o calor liberado pela quebra de interações não covalentes na estrutura da proteína. Além disso, a diferença encontrada pode ser devido a concentração de proteína utilizada nos experimentos – para o CD 5 μM e para DSC por volta de 30 μM . Sabe-se que a proteína M apresenta dependência de concentração para oligomerização, sendo assim, os valores encontrados corroboram com esta proposta.

5. Conclusões

Desta forma, conclui-se que a proteína foi produzida em quantidade e pureza satisfatória. Os experimentos permitiram compreender que a desnaturação térmica da proteína M, acompanhada pelo espectro de CD, é irreversível, provavelmente devido a formação de agregados, e possui temperatura de *melting* de aproximadamente 44 °C. Já nos experimentos com variação do pH, na faixa analisada, a proteína não apresenta desnaturação total, apenas parcial com duas transições, uma próxima ao pH 5,5 e 6 e outra próxima ao pH 8, sendo a segunda provavelmente devido ao ponto isoelétrico da proteína. Quanto a variação iônica acompanhada por DSC, a temperatura de *melting* encontrada foi de aproximadamente 50 °C. Com o aumento da concentração de sal, houve uma queda na temperatura de *melting*. Tal fenômeno pode se dar devido a duas hipóteses: a primeira pode ser devido a uma ligação sítio específica na interface entre os domínios da proteína e a segunda devido a uma ação global do sal na interface entre os monômeros, o que poderia desestabilizar o dímero. Os valores encontrados de variação de entalpia calorimétrica corroboram com as hipóteses dos valores encontrados de T_m .

Nota-se ainda que a proteína apresenta diversos comportamentos que até o momento, permanecem sem explicação. São estes: i) a dependência de concentração da proteína para apresentar certas características conformacionais, como persistência em aparecimento de dímeros quando em alta concentração mesmo após processo de desnaturação para SDS-PAGE e aparecimento de sinais indicativos de arranjo organizado em experimentos de DSC, que podem estar diretamente relacionados a oligomerização da proteína para a formação do capsídeo viral; ii) o fato de o aumento na concentração iônica desestabilizar a proteína, que acaba sendo uma exceção da regra, já que normalmente as proteínas são estabilizadas pela presença de sal, o que poderia estar intimamente ligado a maior estabilidade da proteína em sua forma dimérica. Por fim, são necessários mais estudos para que as hipóteses levantadas neste trabalho possam ser confirmadas e elucidadas, para então poder estabelecer uma correlação de como estes fatores podem influenciar o ciclo viral.

Referências

ADAMS; M. J.; LEFKOWITZ, E. J.; KING, A. M. Q.; et al. **Arch Virol.** 161: 2921. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2977-6>, 2016.

ALEXANDER GRAHAM BELL. **Inventor**, 1847-1922

AUSAR SF; REXROAD J; FROLOV VG; LOOK JL; KONAR N; MIDDAUGH CR. Analysis of the thermal and pH stability of human respiratory syncytial virus. **Mol Pharm** 2:491–499. 10.1021/mp0500465, 2005.

BAJOREK, M.; CALY, L.; TRAN, K.C.; MAERTENS, G.N.; TRIPP, R.A.; BACHARACH, E.; TENG, M.N.; GHILDYAL, R.; JANS, D.A. The Thr205 phosphorylation site within respiratory syncytial virus matrix (M) protein modulates oligomerization and virus production. **J. Virol.** 88, 6380–6393, 2014.

COLLINS P. The molecular biology of human respiratory syncytial viruses (RSV) of the genus *Pneumovirus*, In D. W. Kingsbury (ed), The paramyxoviruses. **Plenum Publishing**, New York, N. Y. 103-162, 1991.

COLLINS, P. L.; B. S. GRAHAM. *Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis.* **J Virol.** 8. 82 (5): p. 2040-55, 2008.

CORONADO, M. A., I. P. CARUSO,, R. J. EBERLE. Cold shock pro-teín A from *Corynebacterium pseudotuberculosis*: role of electrostatic forces in the stability of the secondary structure. **Protein Pept. Lett.** 24:358–367, 2017.

ESPERANTE, S. A.; CHEMES, L. B.; SANCHEZ, I. E.; DE PRAT-GAY, G. The respiratory syncytial virus transcription antiterminator M(2-1) is a highly stable, zinc binding tetramer with strong pH-dependent dissociation and a monomeric unfolding intermediate. **Biochemistry**, 50, 8529–8539, 2011.

FALSEY A.R.; HENNESSEY P.A.; FORMICA M.A.; COX C.; WALSH E.E. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N. Engl. J. Med.* 352 (17):1749–59, 2005.

FORSTER, A.; MAERTENS, G.N.; FARRELL, P.J.; BAJOREK, M. Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. **J. Virol.** 89, 4624–4635, 2015.

- FORSTER, A.; MAERTENS, G.N.; FARRELL, P.J.; BAJOREK, M. Dimerization of matrix protein is required for budding of respiratory syncytial virus. **J. Virol.** 89, 4624–4635, 2015.
- HALL C.B., WEINBERG G.A., IWANE M.K., BLUMKIN A.K., EDWARDS K.M., STAAT M.A., AUINGER P., GRIFFIN M.R., POEHLING K.A., ERDMAN D., GRIJALVA C.G., ZHU Y., SZILAGYI P. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 360:588–598. 10. 1056/NEJMoa0804877, 2009.
- HALL, C. B. AND R. G. DOUGLAS, JR. *Modes of transmission of respiratory syncytial virus.* **J Pediatr**,. 99 (1): p. 100-3. 1981.
- HALL, C. B.; R. G. DOUGLAS, JR.; GEIMAN J. M. *Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus.* **J Infect Dis.** 141 (1): p. 98-102,1980.
- HEIKKINEN T.; VALKONEN H.; WARIS M.; RUUSKANEN O. Transmission of Respiratory Syncytial Virus Infection Within Families, **Open Forum Infectious Diseases**, Volume 2, Issue 1, 1 January, ofu118, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofu118>, 2015.
- IMANI, F.; Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Induces Lung Epithelial Cell Cycle Arrest through a p53 Dependent Pathway. v. 7, n. 5, p. 1–9, 2012.
- JEANNE H.; SCHICKLI, F. D. Challenges in developing a pediatric RSV vaccine. **Human vaccines**, v. 5, n. 9, p. 582–91, 2009.
- JIN, H.; ZHOU, H.; CHENG, X.; et al. Recombinant Respiratory Syncytial Viruses with Deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 Genes Are Attenuated in Vitro and in Vivo. **Virology**, v. 273, n. 1, p. 210–218. doi: 10.1006/viro.2000.0393, 2000.
- KIM YI; MURPHY R; MAJUMDAR S; HARRISON LG; AITKEN J; DE VINCENZO JP. Relating plaque morphology to respiratory syncytial virus subgroup, viral load, and disease severity in children. **Pediatr Res** 78:380–388. 10. 1038/pr. 2015. 122, 2015.
- KIM, Y.J.; BOECKH, M.; ENGLUND, J. A. Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 28, n. 2, p. 222–242. doi: 10.1055/s-2007-976494, 2007.
- KIPPER, S.; et al. New Host Factors Important for Respiratory Syncytial Virus (RSV) Replication Revealed by a Novel Microfluidics Screen for Interactors of Matrix (M) Protein * . p. 532–543, 2015.

KISS, G.; ET AL. Structural analysis of respiratory syncytial virus reveals the position of M2-1 between the matrix protein and the ribonucleoprotein complex. **J. Virol.** 88, 7602–7617 (2014).

LEYRAT, C.; RENNER, M.; HARLOS, K.; HUISKONEN, J. T.; GRIMES, J. M. Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator M2-1 regulate transcription efficiency in Pneumovirinae. **elife**, No. e02674, 2014.

MARTY, A.; MEANGER, J.; MILLS, J.; SHIELDS, B.; GHILDYAL, R. Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells. **Arch. Virol.** 149, 199–210, 2004.

MITRA, R.; et al. The Human Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Required for Maturation of Viral Filaments. *n. M*, p. 4432–4443, 2012.

MONEY, V. A.; ET AL. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *v.* 106, n. 11, p. 4441–4446, 2009a.

MONEY, V.A.; MCPHEE, H.K.; MOSELY, J.A.; SANDERSON, J.M.; YEO, R.P. Surface features of a mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 4441–4446. 2009 b.

OLIVEIRA, A. P.; et al. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in. **Virus Research**, v. 177, n. 1, p. 108–112, 2013.

OLSSON, U.; WOLF-WATZ, M. Overlap between folding and functional energy landscapes for adenylate kinase conformational change, **Nature Communications**, v. 16, p. 111–119, 2010.

PAYNTER S. 2015. Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings. **Epidemiol Infect** 143:1110–1118. 10.1017/S0950268814002702. Department of Health. 11 October. Australian influenza surveillance report and activity updates. Department of Health, Australian Government, Canberra, Australia, 2016.

PETERS, T. R.; J. E. CROWE, JR. Respiratory syncytial virus. In *Principles and practice of pediatric infectious diseases*, eds. S. S. Long, L. K. Pickering, C. G. Prober, 1112-16. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2008.

PRETEL E.; CAMPOREALE G, DE PRAT-GAY G. The Non-Structural NS1 Protein Unique to Respiratory Syncytial Virus: A Two-State Folding Monomer in Quase Equilibrium with a Stable Spherical Oligomer. **PLoS**. September, Volume 8, Issue 9, e74338, 2013.

RAY, G.; SCHMITT, T.; SCHMITT, P. Nucleocapsid Proteins Determine Matrix Protein Compatibility and. v. 90, n. 7, p. 3650–3660, 2016.

SHAHRIARI, S.; GORDON, J.; GHILDYAL, R. Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding. **Virology Journal**, p. 1–11, 2016.

SHAHRIARI, S.; WEI, K. J.; GHILDYAL, R. Respiratory syncytial virus matrix (M) protein interacts with actin in vitro and in cell culture. **Viruses** 10:E535. doi: 10.3390/v10100535, 2018.

SHAY, D. K.; HOLMAN, R. C.; NEWMAN, R. D.; et al. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. **JAMA**, v. 282, n. 15, p. 1440–1446, 1999.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Analytical Biochemistry**, v. 282, p. 252-260, 2000.

THOMPSON WW; SHAY DK; WEINTRAUB E; BRAMMER L; COX N; et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. **JAMA** 289 (2):179–86, 2003.

TREVISAN, M.; DI ANTONIO, V.; RADEGHERI, A.; PALÙ, G.; GHILDYAL, R.; ALVISI, G. Molecular requirements for self-interaction of the respiratory syncytial virus matrix protein in living mammalian cells. **Viruses**, 10, 109, 2018.

WHITEHEAD, S. S.; BUKREYEV, A.; TENG, M. N.; et al. Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 3438–3442, 1999.

WU, H.; PFARR, D. S.; JOHNSON, S.; et al. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, n. 3, p. 652–665. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.024, 2007.

YANG L; CHAN KH; SUEN LK; CHAN KP; WANG X; CAO P; HE D; PEIRIS JS; WONG CM. Age-specific epidemic waves of influenza and respiratory syncytial virus in a subtropical city. **Sci Rep** 5:10390. 10. 1038/srep10390, 2015.

ZHAN, X.; HURWITZ, J. L.; KRISHNAMURTHY, S.; et al. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein expressed by recombinant Sendai virus elicits B-cell and T-cell responses in cotton rats and confers protection against RSV subtypes A and B. **Vaccine**, v. 25, n. 52, p. 8782–8793. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.10.038, 2007.