

Título em Português: EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CAPSÍDEO DE CYCLOVIRUS HUMANO

Título em Inglês: Expression of the human Cyclovirus capsid protein

Autor: Sophia Barchi

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Otavio Henrique Thiemann

Área de Pesquisa /
SubÁrea: Biofísica Molecular

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CAPSÍDEO DE CYCLOVIRUS HUMANO

Sophia Barchi ¹

Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

Instituto de Física de São Carlos/USP

so.mbarchi@usp.br¹

Objetivos

O Cyclovirus humano é um vírus emergente anteriormente detectado em mamíferos, aves e insetos, tendo uma provável transmissão interespecie entre mamíferos. Pertencem à família *Circoviridae* e são não-envelopados com genoma circular de DNA fita simples, contendo duas ORFs que codificam uma proteína associada à replicação e uma proteína do capsídeo, que resulta em uma estrutura icosaédrica.

O objetivo deste projeto é expressar e purificar proteínas de capsídeo viral a fim de obter estruturas do tipo VLP (*Virus-Like Particle*) em vista da ausência do conteúdo genômico do Cyclovirus humano, dando a possibilidade de realizar ensaios de rastreamento das condições de cristalização do VLP para coleta de dados de difração de raios-X, estudos estruturais por criomicroscopia eletrônica e de contraste negativo.

Métodos e Procedimentos

Para a síntese de modelos não infecciosos, referenciadas como VLPs (*Virus-Like Particles*), os passos que se seguem são clonagem, transformação, expressão e purificação. O passo de purificação pode seguir diferentes métodos, visto que há possibilidade da expressão da proteína com e sem cauda de histidina.

Além disso, foram empregados também métodos de análise de concentração através de espectrofotometria e DLS (*Dynamic Light*

Scattering) que foram sucedidos por *negative-stain*, uma metodologia de contraste negativo que consiste no preparo da grade com deposição de um sal metálico sobre a amostra, o que favorece a diferença de contraste entre a amostra e o *background* observado, permitindo a observação através do MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão).

Ademais, foi feita também uma estimativa da estrutura do capsídeo viral através do servidor AlphaFold 3 e o software PyMOL através da reconstrução dos modelos preditos do trímero e pentâmero.

Resultados

As proteínas de capsídeo contendo cauda de histidina foram clonadas em vetor pET28a (*Novagen*) e transformadas em cepas de *Escherichia coli* Rosetta (DE3) (*Novagen*) e submetidas a testes de expressão, se apresentando solúveis, o que se mostra favorável ao estágio de purificação.

A purificação abrangeu os processos de cromatografia por afinidade, passando por análise através do gel de eletroforese que apresentou bandas de purificação em boa quantidade, mas em presença de contaminantes ainda. As referidas amostras passaram por concentração através de ultrafiltração a fim de se obter um volume suficiente a ser utilizado em uma cromatografia de exclusão molecular (Figura 1), essas amostras tiveram suas concentrações analisadas e observadas com o espalhamento

dinâmico de luz para análise de pureza e distribuição da molécula.

Com esse processo, é possível obter amostras elegíveis para o *negative-stain* e análise com MET (Figura 2).

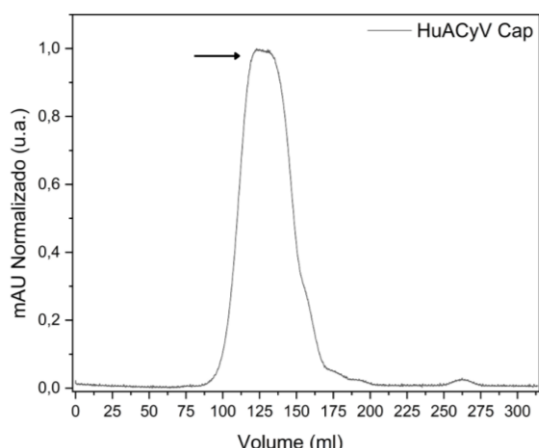


Figura 1: Gráfico da cromatografia por exclusão molecular HuACyV Cap His. A seta indica o pico de saída da proteína de interesse.

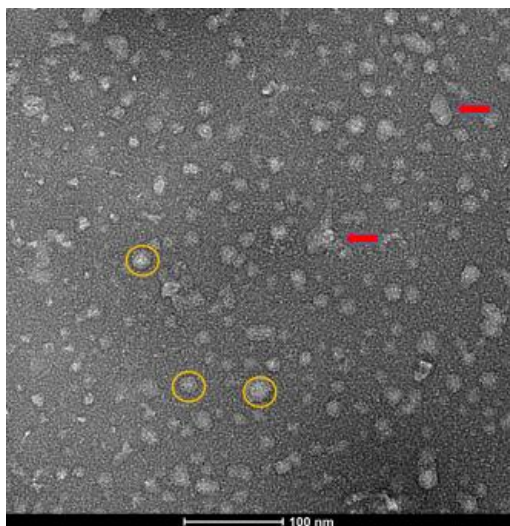


Figura 2: Exemplo de resultado de microscopia por contraste negativo de VLPs HuCyV-Cap. Assinalado em círculo laranja alguns exemplos de VLPs identificados. As setas vermelhas indicam contaminantes ou proteínas HuCyV-Cap não organizadas em VLPs.

Conclusões

Ao fim dos experimentos foi possível obter um protocolo de expressão e purificação com a proteína de capsídeo do Cyclovirus humano com cauda de histina capaz de apresentar boas concentrações promissoras aos métodos de caracterização estrutural por meio do MET, difração por raios-x e crio-microscopia eletrônica.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo financiamento deste projeto: expressão de proteínas de capsídeo de Cyclovirus humano (2023-1174). Também agradeço a todos os professores, técnicos e colegas do grupo de biofísica e biologia estrutural “Sérgio Mascarenhas” (BBE).

Referências

- [1] Breitbart, Mya, et al. "ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae." The Journal of general virology 98.8 (2017): 1997.
- [2] Smits SL, Zijlstra EE, van Hellemond JJ, Schapendonk CM, Bodewes R, Schürch AC, Haagmans BL, Osterhaus AD. Novel cyclovirus in human cerebrospinal fluid, Malawi, 2010-2011. Emerg Infect Dis. 2013;19(9):1511-3. doi: 10.3201/eid1909.130404. PMID: 23968557; PMCID: PMC3810929.
- [3] Tan le V, van Doorn HR, Nghia HD, Chau TT, Tu le TP, de Vries M, Canuti M, Deijs M, Jebbink MF, Baker S, Bryant JE, Tham NT, BKrong NT, Boni MF, Loi TQ, Phuong le T, Verhoeven JT, Crusat M, Jeeninga RE, Schultz C, Chau NV, Hien TT, van der Hoek L, Farrar J, de Jong MD. Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections. mBio. 2013 Jun 18;4(3):e00231-13. doi: 10.1128/mBio.00231-13. PMID: 23781068; PMCID: PMC3684831.

EXPRESSION OF HUMAN CYCLOVIRUS CAPSID PROTEINS

Sophia Barchi¹

Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

Institute of Physics of São Carlos/USP

so.mbarchi@usp.br¹

Objectives

The human Cyclovirus is an emerging virus previously detected in mammals, birds, and insects, with probable interspecies transmission among mammals. It belongs to the Circoviridae family and is a non-enveloped virus with a single-stranded circular DNA genome, containing two ORFs that encode a replication-associated protein and a capsid protein, resulting in an icosahedral structure.

The objective of this project is to express and purify viral capsid proteins to obtain VLP (Virus-Like Particle) structures, which lack the genomic content of the human Cyclovirus. This allows for crystallization screening assays of the VLP to collect X-ray diffraction data and conduct structural studies via cryo-electron microscopy and negative stain electron microscopy.

Materials and Methods

For the synthesis of non-infectious models, referred to as VLPs (Virus-Like Particles), the steps include cloning, transformation, expression, and purification. The purification step may follow different methods, as there is the possibility of expressing the protein with or without a histidine tag.

In addition, methods for concentration analysis, such as spectrophotometry and Dynamic Light Scattering (DLS), were used, followed by negative-stain, a contrast technique consisting of sample preparation with a metallic salt

deposition, which enhances the contrast difference between the sample and the background. This allows observation through a Transmission Electron Microscope (TEM).

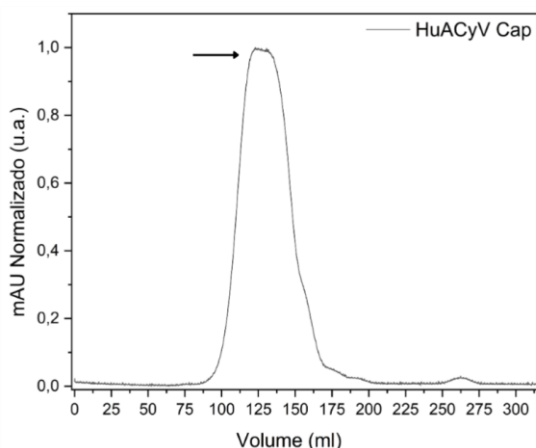
Furthermore, an estimate of the viral capsid structure was made using the AlphaFold server and the PyMOL software, reconstructing predicted models of the trimer and pentamer.

Results

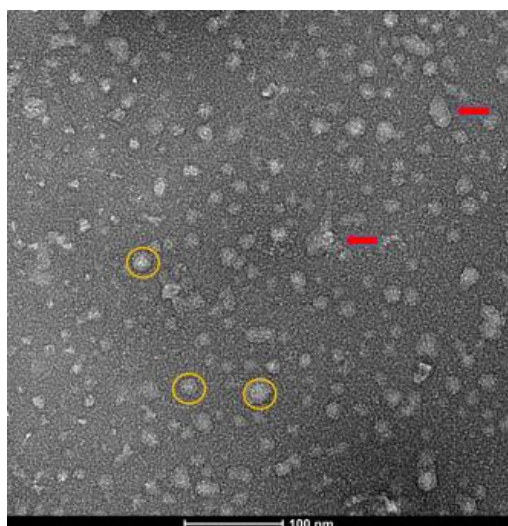
The histidine-tagged capsid proteins were cloned into a pET28a vector (Novagen) and transformed into Escherichia coli Rosetta (DE3) strains (Novagen) for expression tests. The proteins were soluble, which is favorable for the purification stage.

Purification involved affinity chromatography, followed by gel electrophoresis analysis, which showed a good amount of purified bands, albeit with some contaminants. The samples underwent ultrafiltration to concentrate a sufficient volume for size-exclusion chromatography (Picture 1). These samples were analyzed for concentration and observed using dynamic light scattering to assess purity and molecular distribution.

With this process, it was possible to obtain samples suitable for negative-stain and TEM analysis (Picture 2).



Picture 1: Graph of size-exclusion chromatography for HuACyV Cap His. The arrow indicates the peak of the protein of interest.



Picture 2: Example of negative-stain microscopy results for HuACyV-Cap VLPs. Some VLPs are circled in orange, while red arrows indicate contaminants or HuCycV-Cap proteins not organized into VLPs.

Conclusions

At the end of the experiments, it was possible to establish an expression and purification protocol for the human Cyclovirus capsid protein with a histidine tag, achieving promising concentrations for structural characterization methods such as

TEM, X-ray diffraction, and cryo-electron microscopy.

Acknowledgements

I thank CNPq for funding this project: expression of human Cyclovirus capsid proteins (2023-1174). I also thank all the professors, technicians, and colleagues from the "Sérgio Mascarenhas" biophysics and structural biology group (BBE).

References

- [1] Breitbart, Mya, et al. "ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae." *The Journal of general virology* 98.8 (2017): 1997.
- [2] Smits SL, Zijlstra EE, van Hellemond JJ, Schapendonk CM, Bodewes R, Schürch AC, Haagmans BL, Osterhaus AD. Novel cyclovirus in human cerebrospinal fluid, Malawi, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(9):1511–3. doi: 10.3201/eid1909.130404. PMID: 23968557; PMCID: PMC3810929.
- [3] Tan le V, van Doorn HR, Nghia HD, Chau TT, Tu le TP, de Vries M, Canuti M, Deijs M, Jebbink MF, Baker S, Bryant JE, Tham NT, BKrong NT, Boni MF, Loi TQ, Phuong le T, Verhoeven JT, Crusat M, Jeeninga RE, Schultsz C, Chau NV, Hien TT, van der Hoek L, Farrar J, de Jong MD. Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections. *mBio*. 2013 Jun 18;4(3):e00231-13. doi: 10.1128/mBio.00231-13. PMID: 23781068; PMCID: PMC3684831.