

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução

“Expressão Heteróloga, Purificação e Caracterização
Estrutural do Peptídeo (171-194) da p24 do HIV-1”

Priscila Vasques Castilho

SÃO CARLOS

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução

**“Expressão Heteróloga, Purificação e
Caracterização Estrutural do Peptídeo (171-
194) da p24 do HIV-1”**

Priscila Vasques Castilho

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Evolução do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre em
Genética e Evolução, área de
concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C352eh

Castilho, Priscila Vasques.

Expressão heteróloga, purificação e caracterização estrutural do peptídeo (171-194) da p24 do HIV-1 / Priscila Vasques Castilho. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

81 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Genética molecular. 2. Expressão heteróloga. 3. Peptídeo. 4. p24. 5. HIV-1. I. Título.

CDD: 574.87328 (20^a)

Orientadora
Prof^a Dr^a Ana Paula Ulian de Araújo

“O pensamento faz a grandeza do homem.(...) O homem não passa de um caniço, o mais fraco da natureza, mas é um caniço pensante. Não é preciso que o universo inteiro se arme para esmagá-lo: um vapor, uma gota de água, bastam para matá-lo. Mas, mesmo que o universo o esmagasse, o homem seria ainda mais nobre do que quem o mata, porque sabe que morre e a vantagem que o universo tem sobre ele; o universo desconhece tudo isso.”

Pascal

“Se não der frutos, valeu a beleza das flores.
Se não der flores, valeu a sombra das folhas.
Se não der folhas, valeu a intenção da semente.”

Henfil

Aos meus pais: A vocês, que abriram as portas do meu futuro, iluminando
o meu caminho com a luz mais intensa que encontraram: o estudo.
Ao Cleber, pelo apoio e compreensão das horas ausentes.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em particular:

À Prof. Ana Paula U. de Araújo pelo constante apoio, boa vontade, e orientação na realização deste trabalho.

À Prof. Leila M. Beltramini pelas proveitosas discussões e sugestões que muito nos ajudaram.

À Patrícia, pelos ensinamentos de CD, fluorescência e por ter sempre estado disposta a contribuir.

Aos professores Antônio Miranda, Heloísa, S. S. Araújo e Otávio Thiemann, por terem contribuído com experimentos imprescindíveis, Celso Benedetti e Flávio H. da Silva, por terem gentilmente cedido os vetores com a seqüência gênica da HRPII e UBE2G2, respectivamente.

Aos colegas que muito contribuíram para os meus conhecimentos científicos: André, Andressa, Cláudia, Daiane, Débora, Leandro, Marcel, Marli, Melissa, Patrícia, Wânius.

Àos meus eternos melhores e mais amados amigos: Meiroska, Kitana, Marianta e Juku.

E a todos que, de maneira direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho pudesse ser realizado: Alê, Assu, Bel, Beto, Ceará, Cris, Gustavo, Jabá, Kelven, Marlon, Otaciro, Sheila, Su, meus valiosos amigos fora da biofísica (Alisson, Cleber, Flavi, Gabi, Laine, Lu, Marcão, Tati).

RESUMO

As proteínas do centro do HIV-1 estão envolvidas em processos cruciais durante o ciclo de vida viral. A p24 é a principal proteína do capsídeo do HIV e é inicialmente expressa como parte da poliproteína Gag. A associação das proteínas Gag na superfície da membrana interna da célula hospedeira dá início à montagem viral e desencadeia o processo de brotamento da membrana da célula hospedeira. Dessa forma, a p24 possui um importante papel estrutural tanto no contexto da Gag, como na sua forma madura. Nesse sentido, foi escolhido um peptídeo da região C-terminal da p24, TLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNA, (p24-3) que compõe a região principal responsável pela dimerização da proteína p24. O peptídeo linear, rp24-3, e sua variante cíclica, rp24-3m, foram produzidos em *Escherichia coli* via estratégia recombinante. Os fragmentos gênicos foram obtidos por meio da montagem de genes sintéticos e foram inseridos no vetor pET 32a para a produção como proteínas de fusão na forma solúvel. Os produtos expressos foram purificados por cromatografia de afinidade em Ni e submetidos a uma clivagem enzimática. Os peptídeos foram então purificados por cromatografia em fase reversa e suas sequências primárias e massas moleculares foram inferidas por meio do sequenciamento de aminoácidos e análises por espectrometria de massa, respectivamente. A estrutura secundária do rp24-3 foi investigada por dicroísmo circular e fluorescência estática, mostrando-se estruturado diferentemente em água e em PBS. Além disso, o triptofano está em um ambiente parcialmente escondido. A adição de metanol acima de 70% causou um grande aumento no conteúdo de hélices. Concluindo, este trabalho mostra um sistema viável para a produção do rp24-3, proporcionando quantidades necessárias para a realização de estudos estruturais.

Abstract

Proteins from the inner core of HIV-1 are involved in crucial processes during the virus life cycle. p24 is the major capsid protein of HIV and is initially expressed as part of the gag polyprotein. The association of gag proteins to the cell inner-membrane surface initiates virus assembly and induces budding from the host cell membrane. Thus, p24 plays an active structural role both as part of the Gag protein and in its mature form. In this sense, we have chosen a region from C-terminal of p24, TLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNA, (p24-3) which is part of the major region responsible for protein dimerization. The linear peptide, rp24-3, and its cyclic variant, rp24-3m, were produced by recombinant strategy in *Escherichia coli*. The gene fragments were obtained by the synthetic gene approach and inserted into pET 32a to produce fusion proteins in the soluble form. The expression products were purified by Ni-affinity chromatography followed by an enzymatic cleavage. The peptides were purified by reverse phase chromatography and their primary sequence and molecular masses were inferred by amino acid sequence analysis and mass spectrometry, respectively. The rp24-3 secondary structure was investigated by circular dichroism and steady state fluorescence, been structured differently in water and in buffer. Besides, its tryptophan is in a partially buried environment and the addition of methanol above 70% caused a highly increase in helical content. In conclusion, this work shows a suitable system for rp24-3 production, providing satisfactory amount for structural studies.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
HIV	1
A p24	3
EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	9
ESTRATÉGIAS PARA A PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS EM <i>E. COLI</i>	11
PROTEÍNAS CARREADORAS	12
CLIVAGEM DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO	14
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 MONTAGEM DOS FRAGMENTOS GÊNICOS SINTÉTICOS	17
3.2 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO	21
3.2.1 <i>pET 32-P24</i>	23
3.2.2 <i>pET HRP-P24</i>	23
3.2.3 <i>pET CICa-P24</i>	24
3.2.4 <i>pET Fc-P24</i>	26
3.2.5 <i>pET UBE-P24</i>	27
3.2.6 <i>pGEX-P24</i>	27
3.2.7 <i>pET BbCI-P24</i>	28
3.3 LINHAGENS UTILIZADAS	29
3.3.1 <i>Transformações das construções em E. coli</i>	29
3.4 VERIFICAÇÃO DOS CLONES POSITIVOS	30
3.4.1 <i>Sequenciamento dos DNA</i>	30
3.5 EXPRESSÃO DE TRX- p24, UBE-p24 E BbCI-p24 EM <i>E. COLI</i>	31
3.6 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	32
3.6.1 <i>Trx-p24</i>	32
3.6.2 <i>UBE-p24</i>	33
3.7 LIBERAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DA PROTEÍNA DE FUSÃO	33
3.7.1 <i>Clivagem com fator Xa</i>	33
3.7.1.1 <i>Trx-p24</i>	34
3.7.1.2 <i>UBE-p24</i>	34
3.7.2 <i>Clivagem com Enteroquinase</i>	34
3.8 PURIFICAÇÃO POR EXCLUSÃO MOLECULAR.....	35
3.9 PURIFICAÇÃO POR HPLC	35
3.10 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	36
3.10.1 <i>Sequenciamento de aminoácidos</i>	36
3.10.2 <i>Espectrometria de massa</i>	36
3.10.3 <i>Análises estruturais do rp24-3</i>	36
Dicroísmo circular (CD)	36
Fluorescência Estática.....	37

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 MONTAGEM DOS GENES SINTÉTICOS DO RP24-3M E RP24-3	39
4.2 ESTRATÉGIA ADOTADA PARA A PRODUÇÃO DOS PEPTÍDEOS	40
4.2.1 Construções com a ClCa, BbCl e Fc	43
4.3 ENSAIOS DE EXPRESSÃO	44
4.3.1 Expressão e purificação das proteínas de fusão solúveis	478
4.4 CLIVAGEM DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO	52
4.4.1 Clivagem com fator Xa	52
4.4.2 Clivagem com Ek	54
4.5 PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	57
4.5.1 Cromatografia de Filtração Molecular	57
4.5.2 Cromatografia em Fase Reversa	59
4.6 ESTUDOS ESTRUTURAIS DO RP24-3	63
4.6.1 Espectroscopia de CD	63
4.6.2 Fluorescência Estática	66
5 CONCLUSÕES	68
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
6 PERSPECTIVAS	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	79
GLOSSÁRIO	80

1 Introdução

As tentativas para controlar a epidemia da doença causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) têm sido focalizadas em estudos biológicos, bioquímicos, estruturais do vírus e em interações entre componentes virais e novas drogas. Apesar das proteínas do envelope viral terem um papel chave no início da infecção, a formação do capsídeo é crucial para a infectividade (Turner & Summers, 1999; Tang *et al.*, 2003).

Sendo o capsídeo viral composto de dímeros da molécula da p24 (Berthet-Colominas *et al.*, 1999), estudos estruturais envolvendo regiões desta molécula, ou seja, peptídeos podem ser uma ferramenta interessante para elucidar os processos de montagem, maturação e desmontagem do capsídeo. Com o intuito de viabilizar a produção recombinante de peptídeos para posterior realização de estudos estruturais, vários sistemas de expressão bacterianos foram construídos visando à obtenção do produto gênico de forma estável, solúvel, de fácil purificação e com um rendimento satisfatório.

HIV

Os vírus estão classificados por famílias de acordo com o ácido nucléico que contém, seu tamanho, sua forma, subestrutura e modo de replicação. O HIV pertence à família Retroviridae e ao gênero *Lentivirus*, que inclui os retrovírus que possuem genomas complexos, exibem um capsídeo cônico e apresentam-se envelopados. Todos os *Lentivirus* são revestidos por uma bicamada lipídica a qual é derivada da membrana da célula hospedeira, contendo assim várias proteínas de membrana celular provenientes da célula hospedeira, inclusive antígenos do complexo maior de histocompatibilidade, actina e ubiquitina (Arthur *et al.*, 1992).

O genoma de HIV codifica um total de 3 proteínas estruturais, 2 proteínas do envelope viral, 3 enzimas e 6 proteínas acessórias. Na década de 90, a pesquisa forneceu informações sobre a resolução tridimensional da estrutura de todas as enzimas virais, proteínas estruturais e do envelope, assim como de 3 proteínas acessórias (Turner & Summers, 1999).

A figura 1.1 representa o HIV maduro. A bicamada lipídica está em amarelo, as proteínas do envelope expostas (SU ou GP120; em azul claro) estão ancoradas via interações com as proteínas transmembrânicas (TM ou GP41; em violeta), ambas são glicoproteínas. Internamente existem aproximadamente duas mil cópias da proteína matriz (MA ou p17; em verde) que se encontram na superfície interna da membrana viral. No núcleo, cerca de duas mil cópias da proteína do capsídeo (CA ou p24; em vermelho) formam uma estrutura cônica que encobre seu genoma dimérico de RNA associado às proteínas do nucleocapsídeo (NC ou P7; em azul) e três enzimas essenciais: protease (PR; rosa); transcriptase reversa (RT; em violeta) e integrase (IN; em verde escuro) (Turner & Summers, 1999).

Como todos os retrovírus, o genoma do HIV é codificado por RNA que é transcrito reversamente para DNA viral pela transcriptase reversa, por meio da infecção de novas células hospedeiras. Esta é iniciada pelas interações entre as glicoproteínas de superfície expostas e receptores CD4 encontrados principalmente na superfície do linfócitoT auxiliar, ou seja, SU liga-se ao CD4 e ancora o vírus à superfície celular. Interações adicionais com receptores quimiocinas provocam uma mudança conformacional que leva a fusão das membranas virais e celulares via interações com a TM (Turner & Summers, 1999).

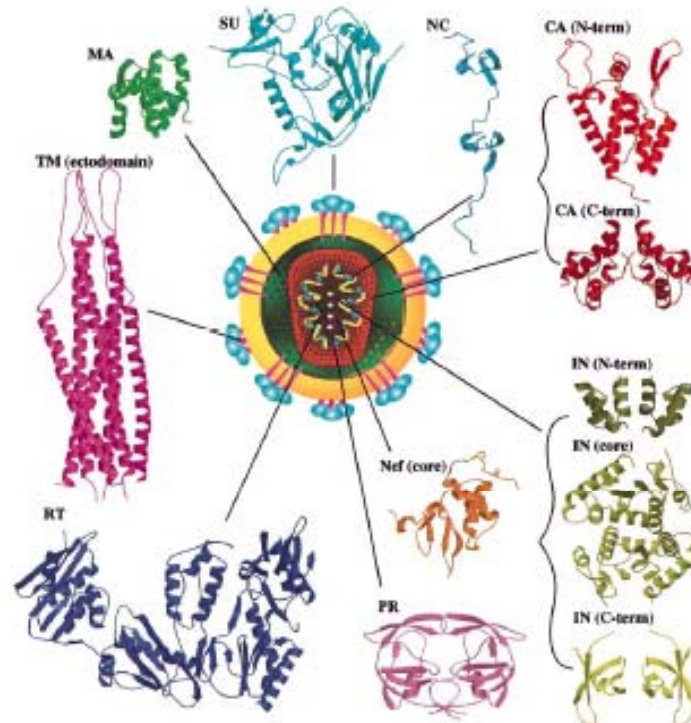


Figura 1.1. Representação do HIV maduro. Figura retirada de Turner & Summers, 1999. (Descrição da figura no texto).

O ciclo de replicação do vírus tem duas fases, a inicial e a tardia. A inicial começa com o reconhecimento da célula alvo pelo vírus maduro e envolve todos os processos que levam inclusive a integração do DNA viral, pela ação da integrase, dentro do cromossomo da célula hospedeira. A fase tardia começa com a regulação da expressão, por intermédio das proteínas virais acessórias, do genoma proviral integrado e envolve todos os seus processos, incluindo desde o desenvolvimento inicial do vírus até sua maturação (Turner & Summers, 1999).

A p24

Estudos recentes sobre os processos iniciais de infecção e disseminação do HIV-1 têm se focado em proteínas do envelope viral (Eckert & Kim, 2002). Porém, apesar destas proteínas terem um papel

fundamental no processo infeccioso, as proteínas do centro (*core*) do vírus também estão envolvidas em processos relevantes no ciclo de vida viral, como a montagem, maturação e desmontagem do capsídeo (Turner & Summers, 1999; Tang *et al.*, 2003).

Anticorpos contra a p24 são produzidos inicialmente após a infecção e sua detecção é amplamente usada como diagnóstico para a infecção por HIV. Porém, à medida que a doença progride, o nível de anticorpos que reconhecem essa proteína cai (Janvier *et al.*, 1993).

O capsídeo do HIV é formado pela auto-associação de moléculas da p24. Em vírus maduros, sua forma característica é de uma concha cônica. Em vírus recém brotados de células hospedeiras, a p24 é inicialmente expressa como parte da poliproteína Gag. No processo de maturação viral, a Gag é processada e origina as proteínas estruturais da matriz, do capsídeo e do nucleocapsídeo (Berthet-Colominas *et al.*, 1999). A figura 1.2 esquematiza a organização da Gag.

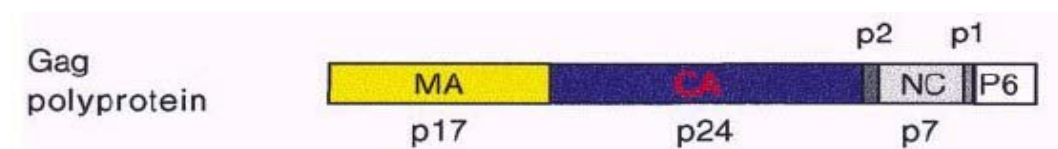


Figura 1.2. Representação esquemática da Gag. A figura mostra as 3 proteínas estruturais (MA, CA e NC) separadas por peptídeos espaçadores (p1 e p2) e terminando com o peptídeo C-Terminal (p6). (Figura extraída de Berthet-Colominas *et al.*, 1999).

A montagem viral é iniciada pela associação de proteínas Gag intactas, que se acoplam via N-terminal da MA a superfícies da membrana interna da célula, induzindo o brotamento dos vírus imaturos, ficando as moléculas Gag irradiadas para dentro em arranjos cristalinos (Fuller *et al.*, 1997). Concomitantemente ao brotamento da célula hospedeira, Gag é clivada pela protease viral e origina seus componentes distintos. A seguir, a p24 se condensa para formar o capsídeo maduro. Desta forma, a p24 exerce um importante papel estrutural tanto na sua

forma imatura, como parte da Gag, como na sua forma madura durante todo o ciclo de vida viral (Berthet-Colominas *et al.*, 1999).

Em 1999, Berthet-Colominas *et al.*, determinaram a estrutura cristalográfica da primeira molécula inteira da p24 do HIV-1 complexada com um fragmento de anticorpo monoclonal. Este complexo foi escolhido para os ensaios de cristalização pelo fato de vários grupos terem fracassado na tentativa de cristalizar a p24 sozinha, provavelmente devido à flexibilidade, a tendência de oligomerização e a coesão intrínseca da molécula p24.

A comparação com dímeros da p24, previamente observados por Momany *et al.* (1996) e Gamble *et al.* (1997), mostra que os mesmos resíduos e elementos de estrutura secundária podem ser compartilhados em diferentes interfaces, revelando uma plasticidade e coesão marcante da p24, propriedades que combinadas com a flexibilidade interdomínio, permitem que a p24 tenha vários papéis estruturais e altere seu modo de auto-associação durante o seu ciclo de vida (Berthet-Colominas *et al.*, 1999).

A molécula p24 contém 231 resíduos e possui 2 domínios helicoidais, o N-terminal (7 α -hélices, H1-H7) e o C-terminal (4 α -hélices, H8-H11) conectados por um polipeptídeo flexível (Berthet-Colominas *et al.*, 1999). Mutações no N-terminal originam vírus que são capazes de estruturar e de realizar o brotamento, porém não formam um capsídeo normal e não são infecciosos (Dorfman *et al.*, 1994; Cimarelli & Darlix, 2002). Já mutações e deleções no domínio C-terminal impedem ou extinguem a dimerização do capsídeo e, conseqüentemente, a montagem viral (Hausdorf, *et al.*, 1994). Ou seja, mutações no N-terminal geralmente afetam a morfologia do vírus, enquanto mutações no C-terminal afetam a montagem viral.

Estudos *in vitro* identificaram compostos que se ligam a p24 do HIV-1 e que inibem a montagem do capsídeo. Um dos compostos,

CAP-1, é bem tolerado em culturas celulares possibilitando estudos de mecanismos antivirais *in vivo*. O CAP-1 não inibe a síntese ou a incorporação viral das glicoproteínas do envelope, além disso ele não interfere no processo de entrada, transcrição reversa, integração, processamento proteolítico ou produção viral. Ou seja, ele inibe a infectividade viral, mas não interfere no processo de entrada do vírus na célula hospedeira, sugerindo um novo mecanismo antiviral. As partículas do vírus geradas na presença de CAP-1 exibem tamanhos heterogêneos e morfologias anormais do *core* do capsídeo. É provável que o composto iniba a dimerização da p24 durante a montagem e maturação do vírus. Esta descoberta marcou o início do desenvolvimento de inibidores da montagem da p24, dando origem a uma nova classe de agentes terapêuticos para o tratamento da AIDS (Tang *et al.*, 2003). Isto leva a crer que existam regiões da p24 que possam estar envolvidas na estabilização da forma cônica.

O domínio C-terminal contém uma região de 20 resíduos, chamada de região de homologia principal, que é conservada em todos os retrovírus e é essencial para a montagem, maturação e infectividade (Hausdorf, *et al.*, 1994). Outra região importante, que é compreendida por este domínio, é a hélice H9. A coesão e plasticidade da p24 devem-se em parte à conformação das cadeias laterais e estrutura secundária da hélice H9, ou seja, os mesmos resíduos e elementos de estrutura secundária podem participar de várias interfaces diferentes. Ao passo que várias regiões diferentes do domínio N-terminal podem participar das interfaces da dimerização, a região do domínio C-terminal envolvida nas interfaces é sempre a mesma (H9) (Berthet-Colominas *et al.*, 1999).

Desta forma, sendo a montagem do capsídeo crucial para a infectividade (Tang *et al.*, 2003), estudos estruturais envolvendo regiões da p24 são promissores para auxiliar a elucidar os processos de montagem, maturação e desmontagem do capsídeo, assim como outros processos em que essa região possa estar eventualmente envolvida.

Visto que peptídeos podem adquirir várias conformações, das quais apenas algumas são similares àquela adquirida quando no contexto da proteína nativa (Leinikki *et al.*, 1993), é favorável que essas regiões em estudo compreendam peptídeos de 15 resíduos ou mais e que, portanto, possam mimetizar melhor a conformação assumida na proteína nativa.

Sendo assim, foi escolhida a região correspondente aos resíduos 171-194 da região C-terminal da p24 do HIV-1, nomeada de p24-3, para o desenvolvimento deste trabalho. Como dito anteriormente, a p24 pode se associar em homodímeros, estando o peptídeo alvo compreendido na interface de dimerização (H9). Além disso, vários aminoácidos hidrofóbicos presentes no p24-3 fazem deste peptídeo um candidato a participar de diversas interações importantes, como proteína-proteína ou até mesmo proteína-lipídeo.

A figura 1.3 representa a estrutura secundária do monômero da molécula da p24; no quadro à esquerda, diferentes cores foram usadas para representar as várias hélices e à direita, a porção correspondente ao p24-3, utilizado neste trabalho, está evidenciado em vermelho.

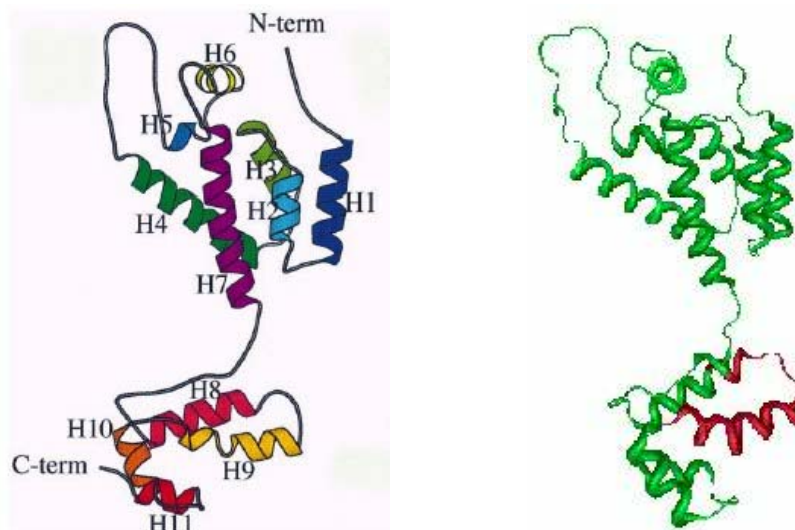


Figura 1.3. Representação dos monômeros da molécula p24 recombinante. Retirado de Berthet-Colominas *et al.*, 1999. O quadro à esquerda mostra as 11 α -hélices em cores distintas, sendo os domínios C- e N- terminais ligados por um polipeptídeo. O quadro à direita, mostra a H9 inteira e uma pequena porção da H8 destacadas em vermelho, compreendendo a região do p24-3.

Com o intuito de obtermos um peptídeo com uma estrutura rígida, já que o p24-3 poderia estar desestruturado em solução, e para estudos comparativos, uma forma modificada que permitia uma versão cíclica do peptídeo foi também sintetizada.

Expressão Heteróloga em *Escherichia coli*

Embora peptídeos possam ser sintetizados quimicamente, a produção de peptídeos por meio de estratégias de DNA recombinante é bastante interessante, pois contorna vários problemas encontrados na síntese química como a limitação no número de resíduos do peptídeo alvo. A síntese de um polipeptídeo com mais de 20 resíduos de aminoácidos encontra dificuldade na purificação da molécula alvo dos demais peptídeos produzidos durante a síntese (Kuliopolus & Walsh, 1994), visto que não se tem um acoplamento total de todos os resíduos no polipeptídeo a ser formado. Além disso, ao sintetizar peptídeos que possuem aminoácidos hidrofóbicos, ocorre freqüentemente a formação de agregados no grão da resina, dificultando a incorporação dos aminoácidos subsequentes (Fields & Noble, 1990). Outro fator que desencoraja o uso da síntese química é a complexidade na incorporação de alguns resíduos como met, trp e cis (Dobeli *et al.*, 1998).

No entanto, para viabilizar a produção de proteínas recombinantes vários critérios são essenciais como a facilidade na manipulação do hospedeiro, a estabilidade e solubilidade da proteína, assim como a velocidade e o rendimento da purificação (Williamson *et al.*, 2000). A escolha do hospedeiro para a produção heteróloga depende principalmente das propriedades e do destino final da proteína expressa (Jonasson *et al.*, 2002).

A bactéria gram negativa *E. coli* é o microrganismo mais usado na expressão heteróloga de proteínas por ter um rápido crescimento, usar um meio de cultivo simples e barato, e por ter expressão e linhagens bem caracterizadas (Reddi *et al.*, 2002). Segundo Carey (1996), *E. coli* é capaz de produzir proteínas em níveis tão altos quanto de 10 a 40% da massa celular total. Assim, a expressão

heteróloga é sempre primeiramente testada neste organismo, sendo que sistemas alternativos podem vir a ser usados quando o produto expresso não possui atividade biológica devido à falta de modificações pós-traducionais essenciais para o correto enovelamento da proteína, ou quando o rendimento da proteína nativa é muito baixo (Jonasson *et al.*, 2002).

Estratégias genéticas têm sido usadas por mais de duas décadas para melhorar a expressão heteróloga de proteínas em *E. coli* e para simplificar os procedimentos de recuperação das mesmas, como a adaptação do produto gênico para um tipo de purificação específica, o delineamento de vetores de expressão eficientes e a melhoria das cepas bacterianas de produção em diferentes aspectos como, por exemplo, a deleção de genes de proteases ou manejo da superexpressão de tRNAs para códons raros, de “foldases” ou chaperonas (Jonasson *et al.*, 2002).

A expressão em *E. coli*, freqüentemente gera proteína na forma insolúvel. Visto que os níveis de expressão de uma proteína heteróloga são bem maiores do que sua expressão nativa, é freqüente um *pool* de proteínas mal enoveladas que se agregam (Reddi *et al.*, 2002). Existem várias formas de minimizar a formação destes corpos de inclusão em *E. coli*, como a redução da velocidade de síntese protéica, que pode ser obtida usando baixas temperaturas para o crescimento bacteriano, e a co-expressão com foldases. Outra estratégia adotada é fusionar a proteína alvo a um parceiro altamente solúvel como a Trx, CaBP, GST, (La Vallie & McCoy, 1995), MBP, Nus A, CAP (Shih *et al.*, 2002), etc.

A produção na forma solúvel no citoplasma é interessante por não carecer de passos adicionais de solubilização e enovelamento. Estes passos não garantem que as características físicas e funcionais da proteína renovelada representem autenticamente as características da nativa. Além disso, o custo do sistema de produção é encarecido e o rendimento pode ser insatisfatório (Jonasson *et al.*, 2002).

Estratégias para a produção de peptídeos em *E. coli*

As técnicas de DNA recombinante, usadas para obter e associar genes de diversas origens possibilitando a expressão em diferentes células hospedeiras tem permitido a obtenção de grandes quantidades de proteína (La Vallie & McCoy, 1995; Rai & Padh, 2001; Jonasson *et al.*, 2002). Porém, em se tratando de peptídeos isso nem sempre acontece, visto que um dos problemas em se expressar peptídeos em *E. coli* é a susceptibilidade dos peptídeos à proteólise, devido a proteases presentes no citoplasma bacteriano (Murby *et al.*, 1996).

Uma estratégia para sanar este problema é produzir os peptídeos fusionados a uma proteína carreadora, já que esta pode mascarar as propriedades físicas do peptídeo e, além disso, muitas vezes pode facilitar a purificação da proteína de fusão (Uhlen *et al.*, 1992; Ståhl *et al.*, 1999). A expressão do gene sintético da somatostatina como uma proteína de fusão em *E. coli* (Itakura *et al.*, 1977) marcou o advento da produção de várias proteínas recombinantes heterólogas em bactérias. Apesar das vantagens proporcionadas pela fusão, tem-se a desvantagem, em algumas construções, do produto desejado consistir de apenas uma pequena porção da proteína de fusão, ocasionando um baixo rendimento do peptídeo alvo (Jonasson *et al.*, 2002).

Alternativamente, o rendimento pode ser aumentado pela produção de polipeptídeos repetidos em *tandem*, ou seja, uma proteína de fusão com múltiplas cópias do peptídeo alvo com metioninas intercalantes para permitir posterior clivagem química (Fukushima, 1998, Kuliopulos & Walsh, 1994). Além disso, estudos demonstraram que o monômero de insulina de 80 aminoácidos pôde ser estavelmente produzido em *E. coli* quando em *tandem*. O monômero de insulina apresenta-se instável sozinho, mas em fusão com polipeptídeos em

tandem a produção se deu em corpos de inclusão, conferindo resistentência à degradação (Shen, 1984). Para obter os peptídeos individuais é necessário a clivagem química em sítios adjacentes aos monômeros. Comumente, usa-se o CNBr que reconhece os resíduos de metioninas e cliva anteriormente a elas. Este método é, portanto, inadequado para peptídeos que possuem metionina internas em suas seqüências.

Proteínas carreadoras

Quando a expressão heteróloga da proteína ou peptídeo alvo não é tóxica para o hospedeiro é preferível que seja produzida na forma solúvel. Sendo assim, vários pesquisadores se empenham no sentido de encontrar qual a melhor proteína carreadora que favorece a proteína alvo a ser expressa na fração solúvel e com um rendimento satisfatório quando no contexto de proteína de fusão.

Frorath *et al.* (1992), ao tentar expressar a interleucina-6 de forma solúvel fusionou-a à GST e à Trx, conseguindo a proteína na forma solúvel apenas na construção com a Trx.

Um estudo envolvendo a fusão de 27 genes humanos, que codificam proteínas de tamanho entre 6,7 kDa e 19,5 kDa, à 6 proteínas diferentes analisou qual das proteínas carreadoras era mais favorável para a expressão e solubilidade desses genes humanos. Dentre as proteínas testadas, GST (26 kDa), Trx (13 kDa), Nus A (55 kDa), Gb1 (7,5 kDa), MBP (43 kDa) e ZZ (17kDa), 26 genes foram expressos em pelo menos algum sistema, sendo 23 proteínas na forma solúvel. Os melhores índices de expressão e solubilidade foram encontrados nas fusões com Trx, MBP, Gb1 e ZZ (respectivamente do maior para o menor índice). A proteína carreadora de maior sucesso foi a Trx, pois obteve 24 proteínas

de fusão expressas e 20 destas na forma solúvel (Hammarström *et al.*, 2002).

Outro trabalho similar envolveu um “*screening*” de 40 genes de diversos organismos que codificavam proteínas alvo de tamanhos entre 9 kDa e 100 kDa. Estes genes foram clonados em oito vetores de expressão que permitiam a fusão com Nus A, Inteína, Trx, His₆, MBP, CBP, CAP ou GST. Obteve-se expressão em mais de 95% das fusões, sendo que em pelo menos uma construção de cada gene pôde ser observado expressão na forma solúvel. As proteínas carreadoras que levaram o maior número de genes a se expressar na forma solúvel foram: 1º MBP e Nus A, 2º GST, 3º Trx, 4º His₆, 5º inteína e CBP, e em último CAP (Shih *et al.*, 2002).

Jayakumar *et al* (1996) clonaram o cDNA de FAS e seus subdomínios em *E. coli*, fusionando estes genes a dois tipos de vetores: pMAL-c2 (fusão com MBP) e pET 32b (+) (fusão com Trx). O intuito de produzir as proteínas alvo de forma solúvel foi alcançado e, além disso, percebeu-se que após as etapas de purificação por afinidade das proteínas alvo fusionadas à Trx os rendimentos foram maiores do que os encontrados na fusão com MBP.

Ainda, pesquisas apontaram que quando as proteinases aspártica de mamífero (procatepsina D e pepsinogênio) são expressas em *E. coli*, ambas se acumulam em corpos de inclusão. Após fusioná-las a Trx ou MBP elas continuam insolúveis, porém o rendimento da proteína solúvel após o renovelamento foi aumentado (Sachadev & Chirgwin, 1998).

Clivagem das proteínas de fusão

Nos casos nos quais o polipeptídeo alvo será usado em estudos estruturais ou como um produto farmacêutico pode ser necessária a remoção do parceiro de fusão e/ou da cauda de afinidade. Existem vários métodos baseados na clivagem enzimática (enteroquinase, fator Xa, trombina, etc.) ou química (hidroxilamina, CNBr) disponíveis que clivam em sítios específicos nas proteínas de fusão (LaVallie *et al.*, 1994).

As vantagens dos métodos de clivagem química são que os reagentes usados são relativamente baratos, facilmente disponíveis e, além disso, as reações podem ser adequadas para produção em larga escala. Entretanto, as condições das reações freqüentemente requeridas podem levar à modificação nas cadeias laterais dos aminoácidos ou desnaturação da proteína alvo pelo fato da reação requerer condições extremamente ácidas (Carter, 1990). Outra desvantagem é que a seletividade freqüentemente é pobre, podendo acarretar na clivagem em sítios inespecíficos da proteína alvo (Kuliopulos & Walsh, 1994).

A clivagem enzimática é o método preferido quando se deseja alta seletividade e clivagem em condições fisiológicas, embora o alto custo de algumas enzimas seja uma desvantagem. Porém, mesmo usando os métodos enzimáticos, a clivagem em sítios inespecíficos pode ocorrer e, por isso, é essencial que se faça uma caracterização rigorosa da proteína de interesse após a clivagem. A retenção da atividade biológica não quer dizer que necessariamente não ocorreu proteólise indesejada durante os passos de clivagem (Jenny *et al.*, 2003).

2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral viabilizar a produção heteróloga do peptídeo, o qual compreende a região da hélice H9 na p24 do HIV-1, e de sua versão cíclica para posterior estudos estruturais. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Realizar a montagem dos fragmentos gênicos de ambos peptídeos;
- Encontrar uma proteína carreadora adequada à expressão dos peptídeos;
- Otimizar o protocolo de expressão em *E. coli*;
- Purificar os peptídeos recombinantes e verificar a integridade e pureza dos mesmos;
- Caracterizar os peptídeos purificados com relação à estrutura primária e massa molecular;
- Realizar estudos estruturais através de espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência estática.

3 Materiais e Métodos

Para que os objetivos propostos neste trabalho fossem alcançados, os procedimentos experimentais mostrados pela figura 3.1 foram realizados.

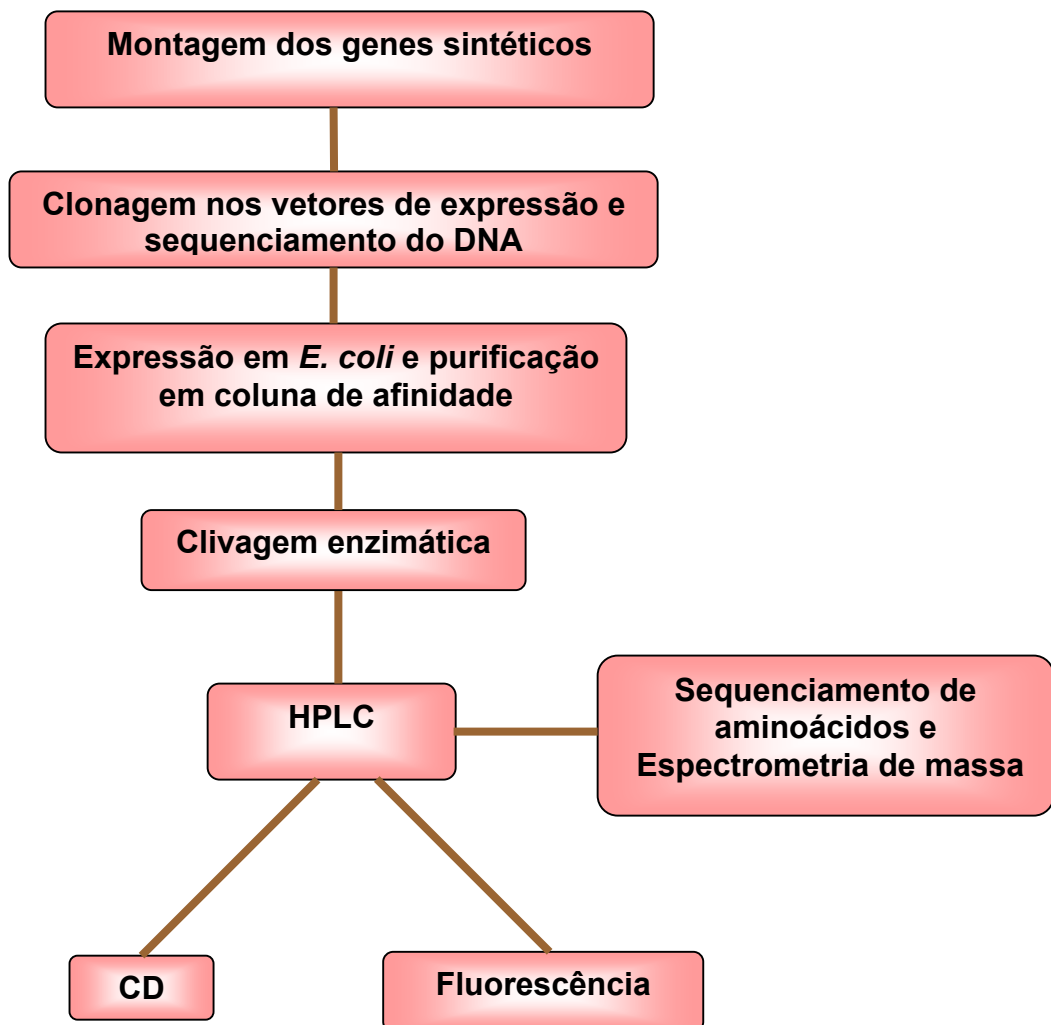


Figura 3.1. Fluxograma da metodologia empregada no trabalho.

3.1 Montagem dos fragmentos gênicos sintéticos

Existem duas técnicas principais para a construção do gene sintético. A primeira técnica envolve a síntese de oligodesoxirribonucleotídeos (ODNs) abrangendo a seqüência inteira. Os ODNs são anelados e unidos pela T4 DNA ligase (Climie & Santi, 1990; Oprian *et al.*, 1991) e os fragmentos de DNA são então clonados em um plasmídio tanto diretamente ou depois de uma amplificação pela PCR. Contudo, esta técnica é sensível a estruturas secundárias dos ODNs e interações adversas ocorrem freqüentemente entre eles.

A segunda técnica é o método baseado na PCR (Jayaraman & Puccini, 1992; Ye *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1993) na qual longos segmentos de ODNs pertencentes às duas fitas da seqüência do gene em questão são aneladas por sobreposições curtas. Os ODNs longos são então estendidos por uma polimerase termoestável usando regiões sobrepostas como iniciadores (*primers*) (Au *et al.*, 1998). Um gene inteiro é formado após o passo de amplificação pela PCR.

Neste trabalho, os fragmentos gênicos sintéticos que codificam as duas variantes peptídicas foram montados via PCR em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.).

Sendo a porção central dos dois peptídeos idênticas, optou-se pela montagem dos genes em duas etapas. Na primeira, a região central foi formada por sobreposições nas extremidades 3' de um par de oligos. O fragmento gerado nesta reação de extensão serviu de molde para uma segunda reação, na qual oligonucleotídeos distintos para cada peptídeo, serviram de iniciadores numa reação de PCR. Sítios de reconhecimento para endonucleases foram incorporados nos oligonucleotídeos para ambas as construções. A seqüência dos oligonucleotídeos empregados na montagem dos genes, bem como dos demais empregados neste trabalho, estão na tabela 3.1. A seqüência de

aminoácidos correspondente aos peptídeos nas formas linear e modificada pode ser visto na tabela 3.2.

Tabela 3.1. Seqüência dos oligos empregados no trabalho. Sítios de reconhecimento para endonucleases dos oligonucleotídeos: 2 (a) s: *NcoI*; 2 (b) s: *BamHI*; 2 r: *XhoI*; 3 (a) s: *NcoI*; 3 (b) s: *BamHI*; 3 r: *XhoI*.

Oligonucleotídeos	Seqüência
1s	5' AACCTGCGTGCTGAACAGGCTTCTCAGGAAGTTAAAACTGGATG ACC
1r	5' AAGCGTTCTGAACCAGCAGGGTTTCGGTCATCCAGTTTTTAAC
2 (a) s	5' CATGCCATGGCTATCGACGGTCGTGCTGCTGCTTGCACCCTGCG TGCTGAACAG
2 (b) s	5' CGGGATCCATCGAAGGTCGTGCTGCTG
2r	5' CCGCTCGAGTTAAGCAGCAGCGCAAGCGTTCTGAACCAGCAG
3 (a) s	5' CATGCCATGGCTACCCTGCGTGCTGAACAG
3 (b) s	5' CGGGATCCATCGAAGGTCGTGCTACCCTGCGTGCTGAACAG
3r	5' CCGCTCGAGTTAAGCGTTCTGAACCAGCAG
4s	5' GGAATTCCATATGGATAAACGAGTTGCCGA
4r	5' GTAGCCATGGCTTCGATGATGGTGCTGTT
5s	5' GAGATTCCATATGTCCGTGATTCTGGATATAAG
5r	5' GTAGCCATGGCTTCATAAGTTGCTTTTCTG
6s	5' GGAATTCCATATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCATCAGCAG CGTTCACTGGGATGGC
6r	5' CGGGATCCCTCAGAGGAATCATAGGG

Tabela 3.2. Seqüência de aminoácidos correspondente aos peptídeos nas diversas construções. Em vermelho aminoácidos inseridos para propiciar a clivagem pelo fator Xa; letras minúsculas correspondem aos aminoácidos que não fazem parte da p24.

Fragmento sintético	Oligos	Seqüência de aminoácidos correspondente aos peptídeos nas diversas construções
rp24-3m/ core / rp24-3	1s e 1r	TLRAEQASQEVKNWMT
rp24-3m/X (com sítio de reconhecimento para o fator Xa)	2(a)s e 2r	maidgraaacTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNAcaaa#
rp24-3m/E (com sítio de reconhecimento para a Enteroquinase codificado no vetor)	2(b)s e 2r	amacTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNAcaaa#
rp24-3/X (com sítio de reconhecimento para o fator Xa)	3(a)s e 3r	maidgrTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNA#
rp24-3/E (com sítio de reconhecimento para a Enteroquinase codificado no vetor)	3(b)s e 3r	amaTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNA#

A amplificação do fragmento central, comum a todos os peptídeos, foi feita utilizando-se:

Mistura da Reação	Quantidade Final por Reação
Oligo 1s	10 pmol
Oligo 1 r	10 pmol
Tampão HiFi [10 X]	[1X]
MgSO ₄	3,2 mM
dNTPs (Promega)	0,25mM
<i>Taq Platinum</i> (Invitrogen)	1 U
H ₂ O	31,4µL
Total	40 µL

O ciclo de extensão deste fragmento foi realizado sob as seguintes condições:

94°C por 1 minuto
 94°C por 1 minuto }
 55°C por 2 minutos } 10 X
 68°C por 2 minutos }
 68°C por 10 minutos

A montagem final dos fragmentos rp24-3/X, rp24-3m/X, rp24-3/E e rp24-3m/E completos seguiu o seguinte protocolo:

Mistura da Reação de PCR	Quantidade Final por Reação
Molde (produto da extensão anterior)	2 µL
Oligo <i>sense</i> referente a sequência gênica (vide tabela 2)	100 pmol
Oligo <i>reverse</i> referente a sequência gênica (vide tabela 2)	100 pmol
Tampão HiFi [10 X]	[1X]
MgSO ₄	3,2 mM
dNTPs	0,25mM
<i>Taq Platinum</i>	1 U
H ₂ O	29,4µL
Total	40 µL

O ciclo de amplificação para os dois genes sintéticos foi realizado sob as seguintes condições:

94°C por 30 segundos
94°C por 30 segundos }
55°C por 30 segundos } 25 X
68°C por 30 segundos }
68°C por 5 minutos

A visualização dos produtos de 100pb amplificados foi realizada após eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com Brometo de etídio, em tampão TAE [1X], sob luz UV como descrito em Ausubel *et al.* (1995).

Os produtos amplificados foram dessalinizados usando o kit QIAQuick (Qiagen) e cerca de 1µg foi submetido a clivagem com 15 U da respectiva endonuclease (BioLabs). Após as reações de digestão, as amostras foram purificadas usando este mesmo kit. Os fragmentos foram então ligados ao vetor (que continha a seqüência gênica da proteína carreadora) ou diretamente à seqüência codificante da proteína carreadora.

3.2 Construção dos Vetores de Expressão

A seqüência codificante do rp24-3m/X, rp24-3/X, rp24-3m/E e/ou rp24-3/E foi (foram) inserida (s) em sete vetores diferentes, permitindo a expressão dos peptídeos fusionados à proteínas carreadoras diversas, sendo algumas delas não disponíveis comercialmente. Neste caso, foi necessário abolir o códon de parada da seqüência codificante da proteína carreadora. Isto foi feito através de uma PCR usando oligonucleotídeos destituídos do códon de parada, possibilitando assim uma fase aberta de leitura entre o rp24-3m ou rp24-3 e a proteína carreadora. A figura 3.2 mostra um esquema das construções, sendo que o peptídeo foi fusionado sempre na região C-terminal da proteína

carreadora. Na interface da fusão dos peptídeos rp24-3m/X, rp24-3/X foi inserido um sítio de reconhecimento para a protease fator Xa que possibilitasse após a clivagem, a liberação dos peptídeos sem resíduos adicionais.

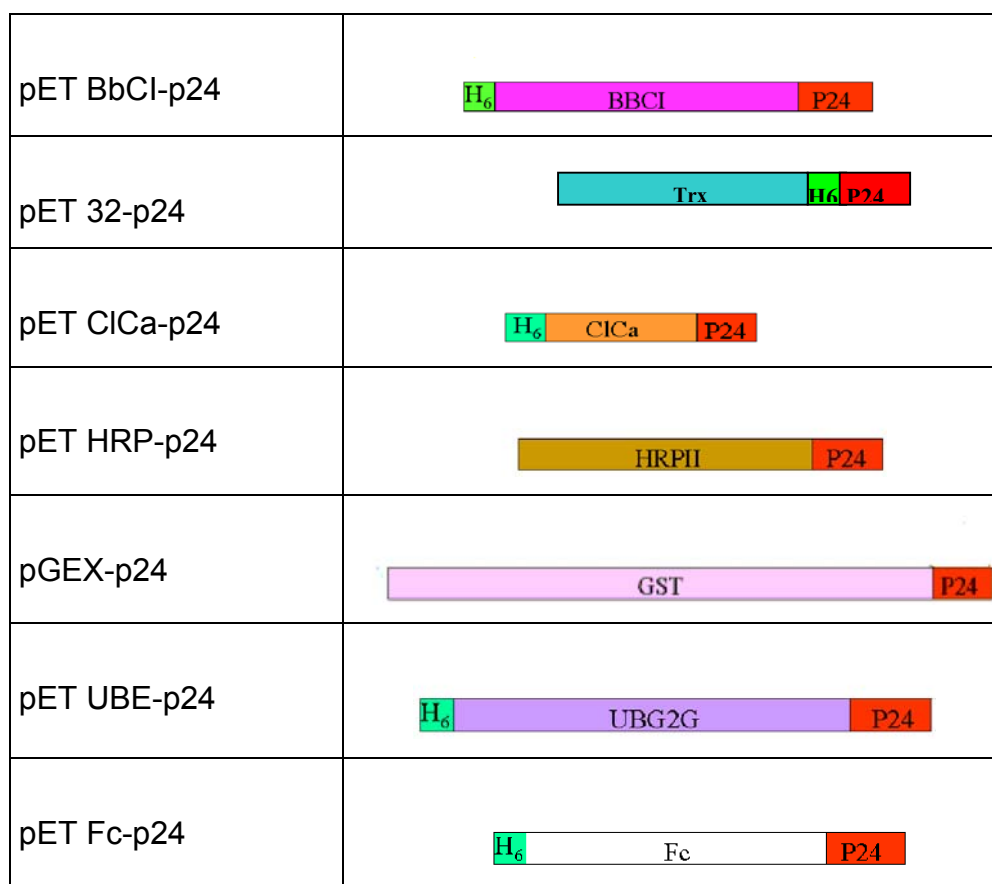


Figura 3.2. Esquema das construções empregadas. Os tamanhos de cada seqüência de aminoácidos está representado proporcionalmente.

Aproximadamente 2 µg do DNA de cada vetor e do fragmento gênico sintético foram digeridos com 15 U da endonuclease adequada (BioLabs). Os vetores previamente digeridos foram purificados em gel de agarose 0,8% (Tampão TAE [1X]) usando o Kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf). Os produtos amplificados das proteínas carreadoras e dos peptídeos foram dessalinizados antes da digestão,

assim como purificados após a restrição enzimática para futura ligação (no vetor ou com outra molécula) usando o kit PCR Purification kit (Qiagen).

As condições de ligação de inserto com vetor para todas as construções finais foram: 20 horas de ligação a 8^o C, com 3 U de T4 DNA Ligase (Promega) e Tampão *Rapid Ligation* [1X] (Promega), seguindo uma razão aproximada de 1 molécula de vetor para cada 6 a 10 moléculas de inserto.

3.2.1 pET 32-p24

As seqüências gênicas sintéticas construídas para as duas variantes peptídicas foram inseridas no pET 32 a (Novagen). Este vetor, além de uma cauda de histidinas, possui uma seqüência codificadora para a tiorredoxina de *E. coli* (trx a), a qual está envolvida em uma série de funções celulares como a redução de proteínas com ligações dissulfetos. Além disso, a trx possui uma estabilidade térmica inerente, fato que possibilita um passo adicional de purificação por aquecimento. (Novy *et al*, 1995).

O vetor pET 32a (+) foi digerido em *Nco*I e *Xho*I. Para as reações de ligação, foram usados 100 ng deste vetor e 12 ng de cada produto amplificado (previamente digerido) rp24-3m/X, rp24-3/X, rp24-3m/E ou rp24-3/E.

3.2.2 pET HRP-p24

A proteína recombinante rica em histidinas (HRP) de *Plasmodium falciparum* foi gentilmente cedida pelo Dr. Celso Benedetti, no LNLS- Campinas, SP. Essa proteína possui uma seqüência de aminoácidos incomum devido ao seu alto conteúdo de histidinas, alaninas e ácido aspártico, que são arrançados em repetições contíguas de

AHHAHHAAD (Wellens & Howard, 1986). Ela é sintetizada pelas formas assexuais do parasita durante os estágios iniciais de infecção do eritrócito, assim como nos gametócitos em desenvolvimento (Hayward *et al.*, 2000).

Tendo esta proteína uma expressão satisfatória na forma solúvel, ela foi usada como parceiro de fusão. Outra característica interessante é que devido ao alto conteúdo de resíduos de histidinas na sua sequência, ela pode ser purificada pela afinidade ao Níquel, sem a necessidade de uma cauda adicional de histidinas. A seqüência gênica parcial que codifica a HRP_{II} estava inserida no vetor pET 3b (Invitrogen), sendo retirada pela clivagem nos sítios de restrição *NcoI* e *BamHI*. Após a separação, a qual se deu em gel 0,8%, a banda correspondente ao fragmento gênico foi purificada e utilizada numa mistura de ligação com o vetor pET 28 a (Novagen), previamente clivado também em *NcoI* e *BamHI*.

Essa mistura foi utilizada para transformar células DH5 α , seguida pela análise de restrição das colônias transformantes. Selecionou-se uma colônia positiva e fez-se a digestão com *XhoI* e *BamHI*. A seguir, foram juntados 100 ng deste novo vetor com 60 ng dos insertos rp24-3m/X ou rp24-3/X, para a construção do pET HRP-P24.

3.2.3 pET ClCa-p24

A clorocatecol 1,2 dioxigenase de *Pseudomonas putida* (ClCa) é uma enzima que catalisa a clivagem do anel aromático, simultaneamente incorporando um átomo de oxigênio em compostos aromáticos e halogenados como o clorocatecol. Estes compostos poluentes são recalcitrantes à degradação por microorganismos e se acumulam na natureza (Williams & Sayers, 1994).

A ClCa tem sido altamente expressa na forma solúvel em *E. coli* e, desta forma, foi também testada como proteína carreadora. Em

virtude de seu tamanho (260 aminoácidos), optou-se por uma forma truncada correspondente aos resíduos 1-180, visando minimizar o tamanho da proteína carreadora em relação ao peptídeo. O vetor pET 28a foi linearizado em *NdeI* e *XhoI*, para que o fragmento gênico referente à ClCa fosse nele inserido. As modificações da sequência codificadora foram obtidas por meio da PCR usando o par de oligonucleotídeos 4 s e 4 r (sequência na tabela 1), 30 ng de DNA de um clone que continha a seqüência da ClCa nativa, 100 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,25mM de dNTP, 6,4mM de MgSO₄, Tampão HiFi [1X], 5 U de *Taq Platinum* (Invitrogen) e água MilliQ para um volume de 50 µL.

O ciclo de amplificação do gene foi realizado sob as seguintes condições:

94°C por 1 minuto
94°C por 30 segundos
55°C por 20 segundos } 25 X
68°C por 20 segundos }
68°C por 5 minutos

Após dessalinizar o produto amplificado de 200pb, este foi clivado em *NdeI* e *NcoI* e, depois de purificado, ligado ao gene sintético da rp24-3m/X ou rp24-3/X previamente clivado e purificado.

Juntou-se 250ng do fragmento codificante da rp24-3m/X ou rp24-3/X com 500ng do correspondente a ClCa (razão molar 1:1), com 3 U de T4 DNA Ligase, Tampão [1X], e água MilliQ para um volume final de 20µL.

A reação de ligação foi incubada por 2 horas a 18⁰ C e em seguida foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2%. A banda correspondente à ligação das duas moléculas foi purificada do gel e ligada ao pET 28a previamente linearizado.

3.2.4 pET Fc-p24

A sequência protéica utilizada como parceira de fusão, chamada de fragmento conservado (Fc), faz parte da região conservada de uma proteína que é expressa em portadores de melanoma maligno e cólon-retal, chamada Bradeiona (ou septina 4) (Tanaka *et al.*, 2001). Esse fragmento protéico tem sido altamente expresso em nosso laboratório em *E. coli* com estabilidade satisfatória e alta solubilidade.

O segmento gênico o qual codifica o Fc foi amplificado por PCR usando como molde o DNA do gene Fc. Os oligos externos 6s e 6r (seqüência na tabela 1) foram usados para a inserção de um sítio de restrição para *NdeI* e uma sequência codificante para a cauda de His na extremidade 5', além de abolir o códon de parada na extremidade 3'.

Para a PCR, usou-se 50 ng do DNA molde, 50 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,25mM de dNTP, 6,4mM de MgSO₄, Tampão HiFi [1X], 2,5U de *Taq Platinum* (Invitrogen) e água MilliQ para um volume final de 50 µL.

O ciclo de amplificação usado foi:

94 ^o C por 1 minuto	
94 ^o C por 30 segundos	} 5 X
55 ^o C por 20 segundos	
68 ^o C por 30 segundos	
94 ^o C por 30 segundos	} 20 X
60 ^o C por 20 segundos	
68 ^o C por 30 segundos	
68 ^o C por 5 minutos	

O produto amplificado foi dessalinizado e após digestão com *BamHI* e *NdeI* foi purificado e inserido no pET 29a (Novagen) (linearizado nos mesmos sítios de restrição). Após transformação de células DH5α e extração do DNA plasmidial por lise alcalina (como descrito em Ausubel *et*

al., 1995), clones positivos foram seqüenciados. Selecionou-se um clone com a seqüência correta para a digestão com *Bam*HI e *Xho*I, para a subsequente ligação de rp24-3m/X ou rp24-3/X no vetor, usando 20 ng de inserto e 100ng de vetor.

3.2.5 pET UBE-p24

A UBE2G2 faz parte da família das enzimas que conjugam à ubiquitina. A conjugação das proteínas alvo a ubiquitina é um passo essencial no processo de degradação dependente de proteassomo. Sua expressão é alta em células musculares esqueléticas de adultos humanos (Katsanis & Fisher, 1998) e têm se revelado também alta quando expressa em *E. coli*.

A seqüência gênica que codifica a UBE2G2 foi gentilmente cedida pelo Dr. Flávio Henrique da Silva, da UFSCar para ensaios como proteína carreadora. O vetor pET28a contendo a UBE2G2, clonada nos sítios *Nde*I e *Bam*HI, foi digerido com as endonucleases *Bam*HI e *Xho*I. Os produtos amplificados rp24-3m/X ou rp24-3/X digeridos e purificados foram então ligados nesse vetor, mantendo a proporção de 25 ng de inserto e 100 ng de vetor.

3.2.6 pGEX-p24

O vetor pGEX apresenta como proteína carreadora a GST (glutathione S-transferase, 26 kDa), oriunda de *Schistosoma japonicum* e é bem expressa em *E. coli* permanecendo com atividade enzimática. Essa proteína tem sido amplamente usada para estudos em imunologia molecular (Toye, 1990), produção de vacinas (Fikrig, *et al*; 1990) e estudos envolvendo interações entre proteína-proteína (Kaelin, *et al*; 1991) e DNA- proteína (Chittenden, *et al*; 1991). A GST é encontrada comercialmente nos vetores pGEX (Amersham Biosciences), entre outros.

O vetor utilizado que continha a sequência codificante da GST foi o pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences), este foi linearizado em *Bam*HI e *Xho*I e purificado para a inserção de rp24-3m/X e rp24-3/X. A mistura de ligação continha 100ng de vetor e 25ng de inserto.

3.2.7 pET BbCI-P24

A proteína BbCI (*Bauhinia bauhinioides* Cruzipain Inhibitor) é um inibidor de protease, originalmente presente em sementes de *Bauhinia bauhinioides*, que apresenta atividade inibitória para cruzipaina, uma cisteinoproteinase de *Trypanosoma cruzi*, descrita como possível alvo de drogas contra esse parasita (de Oliveira *et al.*, 2001). Por ser uma proteína de 18 kDa altamente expressa em *E. coli* de forma solúvel, muito estável e ser uma proteína de estudo em nosso laboratório, esta também foi candidata a parceira de fusão.

Nesta nova montagem, usou-se o pET 28a linearizado em *Nde*I e *Xho*I. Analogamente a ClCa, o gene que codifica a BbCI foi amplificado por PCR usando os oligonucleotídeos 5s e 5r (tabela 1), para eliminar o códon de parada.

Usando as mesmas quantidades de reagentes da reação referente ao gene ClCa, fez-se a PCR sob as seguintes condições:

94 ^o C por 30 segundos	
94 ^o C por 30 segundos	} 5 X
45 ^o C por 30 segundos	
68 ^o C por 30 segundos	
94 ^o C por 30 segundos	} 20 X
50 ^o C por 30 segundos	
68 ^o C por 30 segundos	
68 ^o C por 5 minutos	

Após dessalinizar o produto amplificado correspondente à BbCl, este foi clivado em *NdeI* e *NcoI* e, depois de purificado, fez-se a ligação ao segmento gênico da rp24-3m/X ou rp24-3/X, seguindo a razão molar de 1:1.

Incubou-se a reação por 2 horas a 18⁰ C e em seguida, fez-se a eletroforese em gel de agarose 2%. A banda correspondente a ligação das duas moléculas foi purificada do gel e 40ng foi usado em uma mistura de ligação com 100ng de pET 28a linearizado em *NdeI* e *XhoI*.

3.3 Linhagens utilizadas

Duas linhagens diferentes de células de *E. coli* foram utilizadas. Para o propósito de propagação plasmidial, células DH5 α (Invitrogen), foram transformadas. A medida que o sequenciamento de DNA plasmidial revelava-se correto, células da linhagem BL21 (DE3) (Novagen) que possui uma cópia integrada do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7, sob o controle do promotor *lac* UV5, induzível por IPTG eram transformadas. Essas células são deficientes nas proteases *lon* e *omp T*, o que as tornam adequadas para a expressão de proteínas recombinantes (Studier *et al.*, 1990).

3.3.1 Transformações das construções em *E. coli*

Todo o volume das misturas de ligação foi usado na transformação por choque térmico de células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen) visando à propagação plasmidial. As células competentes foram preparadas segundo o protocolo descrito em Ausubel *et al.*(1995). Estas, após serem transformadas, foram plaqueadas em meio com LB-Ágar e antibiótico de seleção adequado para cada vetor. Algumas das colônias resistentes foram crescidas em 5mL de meio LB

com antibiótico de seleção para a extração do DNA plasmidial por lise alcalina como descrito em Ausubel *et al.*, 1995.

Os clones previamente sequenciados, contendo a sequência correta do inserto, foram inseridos em *E. coli* BL21(DE3) para a expressão protéica (Novagen), também por choque térmico. Um total de 100 ng do DNA da extração plasmidial (uma alíquota da amostra que foi seqüenciada) foi usado na transformação.

As células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo (LB-Ágar com antibiótico de seleção), utilizando uma colônia de cada placa transformante para seguir com os experimentos de expressão.

3.4 Verificação dos clones positivos

As colônias transformantes tiveram seu DNA plasmidial extraído por meio de lise alcalina (Ausubel *et al.*, 1995) para uma análise de restrição. Nessas reações, foram usados 700ng de cada DNA plasmidial, 5U de cada enzima de restrição que flanqueiam o inserto, em um tampão compatível à ambas.

3.4.1 Sequenciamento dos DNA

O sequenciamento de DNA foi gentilmente realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular (Instituto de Física da USP-São Carlos) sob a supervisão do Dr. Otávio Thiemann, utilizando um sequenciador automático ABI Prism 377 Sequencer (Perkin Elmer). O método empregado foi o do didesoxinucleotídeo marcado (Sanger *et al.*, 1977), utilizando-se dos oligonucleotídeos que hibridizavam em regiões promotoras e terminadoras dos vetores de expressão utilizados.

3.5 Expressão de Trx-p24, UBE-p24 e BbCl-p24 em *E.coli*

As colônias selecionadas foram inoculadas em 5ml de meio LB com o antibiótico de seleção e incubadas a 37°C por 12 a 16 horas, com agitação de 250 rpm. Após esse período de proliferação celular, foi feita uma diluição da cultura seguindo uma proporção de 1:100 com meio Terrific Broth suplementado com o antibiótico de seleção.

A cultura diluída permaneceu crescendo a 37°C, 250 rpm e quando atingida uma D.O._{600nm} = 0,4 a 0,6 retirou-se uma alíquota para SDS-PAGE 15%.

Para um teste inicial, todas as construções foram induzidas com 1mM de IPTG por 2 horas. Após esse período, retirou-se uma segunda alíquota para análise por SDS-PAGE. As culturas foram centrifugadas a 4°C em uma centrífuga Sorvall RC-5C por 5 minutos à 10000xg para a coleta das células e descarte do meio de cultura. As células precipitadas foram congeladas a -20°C.

Os extratos protéicos brutos (totais) que possuíam uma banda de expressão adicional após a indução (pela análise em SDS-PAGE) foram avaliados quanto à solubilidade da proteína recombinante.

Para tanto, células provenientes de 50ml de cultura foram ressuspensas em 1ml de tampão 50 mM Tris-HCl, pH.8 contendo 300mM de NaCl (Trx-p24 e UBE-p24) ou PBS (BbCl-p24). A seguir foram fragilizadas por ação enzimática da lisozima (USB) e, após 30 minutos de incubação em gelo, foram lisadas por ultrassom usando um aparelho sonicador (Thornton).

Após a etapa de lise celular, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 16000xg, a 4°C. Foi retirada uma alíquota das frações solúvel e insolúvel para SDS-PAGE.

3.6 Purificação por cromatografia de afinidade

O fato de todos os produtos expressos terem uma cauda de polihistidinas possibilitou a purificação em coluna afinidade contendo níquel. A resina utilizada foi a Ni-NTA *Superfow* [ácido nitrilotriacético com níquel imobilizado acoplado a uma resina de fluxo rápido (QIAGEN)].

3.6.1 Trx-p24

O sobrenadante da etapa anterior (proteínas solúveis totais após lise celular e centrifugação) foi reservado e o precipitado ressuspensado no mesmo tampão. A amostra foi submetida a uma segunda etapa de sonicação visando à lise total das células e consequente recuperação máxima da proteína de fusão.

As frações solúveis foram juntadas e aplicadas a uma coluna de afinidade Ni-NTA previamente equilibrada com o mesmo tampão em que as células foram ressuspensas. A seguir, o suporte contendo a resina de Ni e a fração protéica solúvel foi colocado horizontalmente em um agitador (para permitir uma maior superfície de contato entre a resina e a amostra) com uma velocidade de 30 rpm, a 22^oC por 1 hora. Passado o tempo de incubação, retirou-se o suporte do agitador e fixou-o em um aparato verticalmente dando continuidade à purificação.

Após a passagem da amostra, a resina foi lavada com 10 volumes de tampão de ressuspensão e a proteína de fusão foi eluída com 5 volumes do mesmo tampão contendo 250mM de Imidazol. Foram retiradas amostras em todos os passos da purificação para análise em SDS-PAGE.

3.6.2 UBE-p24

O sobrenadante (coletado após a lise das células e centrifugação) foi aplicado na coluna pré equilibrada com o mesmo tampão de ressuspensão das células e o fluxo coletado foi repassado 3 vezes. A coluna foi lavada com 4 volumes do mesmo tampão e a proteína de interesse eluída com o mesmo tampão contendo 40 mM de Imidazol, seguida de 2 volumes do tampão contendo 100 mM de Imidazol e, por fim, 2 volumes do tampão contendo 250 mM de Imidazol.

Foram retiradas amostras em todos os passos da purificação para análise em SDS-PAGE.

3.7 Liberação dos peptídeos da proteína de fusão

3.7.1 Clivagem com fator Xa

O fator Xa consiste de duas subunidades que interagem por ligação dissulfeto. Esta protease reconhece especificamente a sequência IDGR (ou ainda, IEGR) e catalisa a clivagem antes do primeiro aminoácido no seguimento deste tetrapeptídeo (Jonasson *et al.*, 2002).

Tendo todas as construções um sítio de reconhecimento para esta enzima, realizou-se a clivagem das proteínas de fusão expressas e purificadas.

A troca do tampão em que as amostras se encontravam (tampão de eluição) pelo tampão de clivagem recomendado pelo fornecedor (50mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl e 5 mM CaCl₂) se deu utilizando o Centriprep 10 (AMICON) ou Centricon 10 (AMICON). A retirada do fator Xa (Promega) após a digestão foi feita no mesmo aparato, porém, neste caso, o peptídeo livre e outros contaminantes menores que 10 kDa foram filtrados, permanecendo na fração inferior, enquanto os contaminantes maiores que 10 kDa (como a protease e a

Trx) ficaram retidos na parte superior do concentrador. Após a digestão, amostra foi submetida a uma purificação pela C18 e os picos eluídos tiveram seus resíduos de aminoácidos sequenciados para averiguar a integridade do peptídeo.

3.7.1.1 Trx-p24

Vários ensaios variando tempo de incubação e unidades da protease foram testados, objetivando uma clivagem altamente específica. A condição adotada para a digestão da amostra purificada pela cromatografia de afinidade foi: 1U de enzima para cada 70 µg de proteína, por 1 hora a 24^oC, em tampão de clivagem para fator Xa.

3.7.1.2 UBE-p24

Para esta construção utilizou-se 5U de fator Xa para cada 1 mg de proteína de fusão, incubando a amostra por 10 horas a 24^oC.

3.7.2 Clivagem com Enteroquinase

A enteroquinase (EK) é uma serina proteinase altamente específica que pode ser usada para catalisar a digestão de proteínas de fusão com o intuito de liberar a proteína desejada do (s) parceiro (s) de fusão. Esta enzima reconhece a seqüência -(Asp)₄Lys e cliva após o resíduo de lisina. Neste trabalho, utilizou-se a EK (EKMax) da Invitrogen, uma enzima recombinante, que consiste da subunidade catalítica da holoenzima, expressa em *Pichia pastoris* de tamanho 26,3 KDa (La Vallie *et al.*, 1994).

As frações eluídas da cromatografia de afinidade foram submetidas a um Centriprep 10 para a substituição do tampão de eluição

pelo de clivagem. Este tampão consistiu de 50mM de Tris-HCl pH 8, contendo 0,1% de Tween 20 (USB), 1mM de CaCl₂ e 50mM de NaCl.

Depois de numerosos testes variando a quantidade de enzima, o tempo e a temperatura de incubação, o tempo de clivagem foi estabelecido em 6 horas a 22^oC, utilizando 0,5 U de enzima para cada 1 mg de proteína de fusão (na construção com o rp24-3/E ou rp24-3m/E), estando a solução protéica ~ 1,5 mg/ml.

Após a incubação, a amostra foi transferida novamente a um Centriprep 10, para a separação dos peptídeos de outros contaminantes de maior massa, como a proteína carreadora. Reduziu-se o volume da amostra em um aparelho de centrífugo-liofilização (Savant RC210A) para dar continuidade a purificação.

3.8 Purificação por Exclusão Molecular

Os peptídeos rp24-3 e rp24-3, após liberação da proteína de fusão pela ação da EK, foram submetidos a uma etapa cromatográfica de exclusão molecular na coluna Superdex Peptide HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) acoplada a um sistema Äkta Explorer-10 (Pharmacia LKB Biotechnology).

A coluna foi previamente equilibrada com 2 volumes de ácido acético 5% e a eluição dos peptídeos foi feita com 2 volumes desta mesma solução, usando um fluxo de 1 mL/minuto.

3.9 Purificação por HPLC

Vários métodos para a otimização das condições de purificação dos peptídeos em uma coluna C18 (25 x 1 mm, VYDAC 15-20 μ -300Ångstron) foram testados. Após padronização, as cromatografias foram feitas sob as seguintes condições: 65 minutos de duração,

começando com 85% de solução A (0,1 % de TFA), e 15 % de solução B (0,1 % de TFA + 90% de acetonitrila) por 5 minutos; 35% de solução A e 65% de solução B em 50 minutos, permanecendo 5 minutos na concentração atingida; e em 2 minutos voltando a condição inicial. As corridas foram monitoradas a 220 nm ou 280 nm, sob um fluxo de 1mL/minuto.

3.10 Caracterização dos Peptídeos

3.10.1 Sequenciamento de aminoácidos

Uma alíquota das amostras eluídas da coluna C18, referente a cada versão do peptídeo, foi liofilizada e submetida ao seqüenciamento N-terminal. Esta etapa foi realizada na Universidade Federal de São Carlos, sob os cuidados de Heloísa Sobreiro S. Araújo, num seqüenciador automatizado Shimadzu PPSQ-10 conforme condições recomendadas pelo fabricante.

3.10.2 Espectrometria de massa

A massa molecular e a pureza dos peptídeos previamente seqüenciados foram inferidas por espectrometria de massa, usando o método de *electrospray ionization ion-trap*, em um aparelho Waters LC/ESI-MS, realizado pelo Dr. Antônio Miranda (UNIFESP).

3.10.3 Análises estruturais do rp24-3

Dicroísmo circular (CD)

Estudos de CD na região do ultravioleta distante (de 250nm a 185nm) podem ser utilizados para avaliar, quantitativamente, o conteúdo total de estrutura secundária de proteínas (Havel, 1996).

O dicroísmo circular (Circular Dichroism; CD) é muito utilizado nos estudos de mudanças conformacionais de proteínas e peptídeos devido à sua sensibilidade em distinguir a presença e a porção de elementos de estrutura secundária destas moléculas em solução.

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J715 (*Jasco Corporation*, Japão). O espectro do rp24-3 foi medido em água, 50mM de NaCl em PBS e em metanol 10%, 20%, 50%, 70% e 80%, usando cubetas de quartzo circular de 1mm de caminho óptico. Os espectros foram registrados num intervalo de 195 a 250nm, a 25° C, como uma média de 16 varreduras. Em todas as medidas os espectros dos solventes foram subtraídos.

A predição quantitativa da estrutura secundária do rp24-3 foi realizada pela desconvolução dos espectros de CD usando o programa SELCON 3, desenvolvido por Sreemana *et al.*(1999). Este programa utiliza o perfil das medidas de CD de uma proteína alvo para o cálculo das contribuições de estruturas secundárias do confôrmero analisado. Isto se dá por meio de comparações com os perfis de CD de conjuntos de proteínas com estruturas resolvidas e também de proteínas desnaturadas, encontrados em bancos de dados fornecidas com os programas.

Os programas são fornecidos num pacote de *softwares* popular para esta aplicação chamado *CDPro* no endereço: <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro>. Cada um dos programas utiliza uma metodologia para inferir as porcentagens das diferentes estruturas secundárias presentes na proteína (ou, nesse caso, peptídeo) alvo.

Fluorescência Estática

É possível caracterizar macromoléculas biológicas por emissão de fluorescência e verificar mudanças discretas no microambiente dos grupos fluorescentes (fluoróforos) naturais como

triptofano, tirosina e fenilalanina. Além disso, alterações no espectro de emissão, no rendimento quântico ou na posição do máximo de emissão, podem estar relacionadas também a alterações induzidas por ligantes, supressores, solventes, íons ou agentes solubilizantes (Eftink, 1991; Lakowicz, 1983).

Como a molécula rp24-3 possui apenas um fluoróforo (triptofano) foi possível verificar a vizinhança do triptofano no rp24-3 por meio de fluorescência estática. Os espectros em água, em 50mM de NaCl em PBS e em várias concentrações de metanol foram obtidos usando 36 μ M de peptídeo.

As amostras foram excitadas num comprimento onda de 280nm e monitorados no intervalo de 295-450 nm, a 25°C em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, Fluorescence, Analytical and Biomedical Instrumentation – Illinois/USA), usando uma cubeta retangular de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

Os espectros de fluorescência dos solventes foram subtraídos para eliminar efeitos de *background*.

4 Resultados e Discussão

4.1 Montagem dos genes sintéticos do rp24-3m e rp24-3

Genes sintéticos são bastante úteis na engenharia genética e de proteínas quando os clones “naturais” de DNA não estão disponíveis ou quando os genes serão expressos em um hospedeiro heterólogo, (Au *et al.*, 1998) o que pode requerer otimização no uso de códons preferenciais (Au *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2002). Esta técnica também pode ser empregada quando mutações ou sítios de restrição precisam ser introduzidos ou quando uma seqüência de genes nova necessita ser criada para a expressão de uma proteína “artificial”, ou seja, não existente na natureza (Au *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2002; Stemmer *et al.*, 1995).

Os genes sintéticos referentes às seqüências codificadoras dos peptídeos, independente do sítio de reconhecimento para protease, foram montados e amplificados nas condições apresentadas em materiais e métodos.

A eletroforese em gel de agarose 0,8 % (figura 4.1) revelou um fragmento de DNA amplificado de 100pb para o do rp24-3m e um tamanho ligeiramente menor para o rp24-3.

A estratégia de montagem do gene sintético baseado na PCR é interessante por não ser afetado pela estrutura secundária dos oligonucleotídeos (Au *et al.*, 1998), por permitir a síntese em um único passo de PCR e purificação em um só passo também e por permitir que se gerem mutantes somente pela substituição de alguns oligonucleotídeos.

Porém são observados alguns problemas como o anelamento ilegítimo de oligonucleotídeos e a heterogeneidade na seqüência dos mesmos ao sintetizar um fragmento gênico grande (1 Kb)

(Jayaraman & Puccini, 1992). No entanto, Stemmer *et al.* (1995) foram capazes de montar um plasmídeo inteiro por meio desta técnica.

Sendo os fragmentos gênicos que codificam os peptídeos alvo deste trabalho de tamanho em torno de 100 pb esta técnica se adequou perfeitamente permitindo a montagem das sequências codificantes desejadas de forma rápida. A utilização de códons preferenciais para *E. coli* também pode ser destacada como uma vantagem desta metodologia, uma vez que gerou altos níveis de expressão neste hospedeiro.

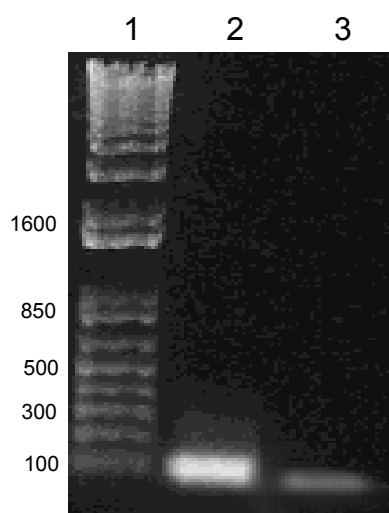


Figura 4.1. Montagem do fragmento gênico sintético por PCR. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, TAE [1X]. Coluna (1) padrão 1Kb Plus DNA Ladder (Gibco); o fragmento inteiro formado do rp24-3m (2) e do rp24-3 (3).

4.2 Estratégia adotada para a produção dos peptídeos

Apesar da síntese química muitas vezes proporcionar um rendimento de peptídeos satisfatório, muitos problemas podem desencorajar o uso desta estratégia, como a limitação no tamanho do polipeptídeo a ser produzido e a presença de resíduos hidrofóbicos que

acarretam dificuldades durante as etapas de purificação (Fields & Noble, 1990; Kuliopulos & Walsh, 1994). Outro aspecto desfavorável para a síntese química é a insolubilidade de moléculas peptídicas maiores, ocasionado pela presença de regiões hidrofóbicas e/ou pela formação de estrutura secundária, principalmente folha beta, acarretando a solvatação incompleta do polipeptídeo nascente resultando em um alto nível de seqüências deletadas no produto final. Além disso, outra complexidade é a incorporação de resíduos de Met, Cys e Trp (Dobeli *et al.*, 1998).

Por outro lado, a produção heteróloga contorna estes problemas, porém é necessário proteger os peptídeos da ação de proteases bacterianas, o que pode ser feito através da expressão dos peptídeos na forma de proteína de fusão, que por sua vez pode diminuir o rendimento final do peptídeo (Murby *et al.*, 1996).

Uma outra alternativa bastante interessante para a estabilização dos peptídeos recombinantes recém sintetizados é a produção de monômeros do peptídeo alvo seqüencialmente repetidos (em *tandem*). Para a liberação destes monômeros, o CNBr é o agente químico usualmente adotado, liberando os monômeros pela clivagem após resíduos de metionina.

Os peptídeos rp24-3 e rp24-3m possuem um resíduo de metionina em uma região que, quando no contexto da p24, está na interface de contato entre os dímeros (Berthet-Colominas *et al.*, 1999), podendo este resíduo ser crucial para a interação entre os dímeros ou com outras moléculas. Além da presença de uma metionina interna na seqüência do peptídeo alvo, a seletividade na clivagem química é inferior aquela da clivagem enzimática (Jonasson *et al.*, 2002).

Assim, foi adotada a estratégia de fusionar os peptídeos a proteínas relativamente pequenas (com um tamanho não excedente a 26 kDa), para que o rendimento final de peptídeo não fosse prejudicado, e ainda expressas em *E. coli* na forma solúvel. A tabela 4.1 mostra as

proteínas carreadoras testadas e seus respectivos tamanhos sem e em fusão com a seqüência peptídica.

Diversos trabalhos (Skosyrev *et al.*, 2003; Sachadev & Chirgwin, 1998; Jayakumar *et al.*, 1996; Shih *et al.*, 2002; Frorath *et al.*, 1992; Hammarström *et al.*, 2002) mostram que cada proteína (ou peptídeo) se comporta diferentemente ao ser associada com determinada proteína carreadora. Ou seja, não existe uma proteína carreadora universal que consiga além de promover a expressão de uma dada proteína ou peptídeo, promova também sua solubilidade. A escolha do melhor parceiro de fusão é proteína-específico não sendo, pelo menos até o momento, algo predictivo.

Tabela 4.1. Parceiros de fusão testados. Dentre as proteínas testadas, têm-se Trx, GST, UBG2G, BbCi, HRPII, Fc, CICa. As proteínas de fusão são constituídas de moléculas de peptídeo, proteína carreadora e resíduos de aminoácidos contidos no vetor.

Proteína Carreadora	Tamanho aproximado da Proteína Carreadora	Tamanho aproximado da Proteína de Fusão
Trx	11,8 kDa	23 kDa
Fc	13,5 kDa	18 kDa
UBG2G	19 kDa	24,5 kDa
BBCI	17 kDa	24,5 kDa
HRPII	14,450 kDa *	18 kDa **
CICa	6,6 kDa	13 kDa
GST	26 kDa	29 kDa

(*) migra em SDS PAGE com peso aparente de ~ 27 kDa

(**) migra em SDS PAGE com peso aparente de ~30 kDa

Sendo assim, os peptídeos rp24-3m e rp24-3 foram fusionados a proteínas carreadoras e, a medida que o resultado do sequenciamento referente a cada construção revelava-se correto, a expressão do gene da proteína de fusão contida no clone era testada.

Um dos objetivos deste trabalho foi encontrar um parceiro de fusão adequado, que permitisse a produção destes peptídeos com alto rendimento, fácil manuseio e baixo custo. Visto que os peptídeos linear e cíclico diferem apenas em poucos resíduos de aminoácidos nas porções N e C-terminal, partiu-se do pressuposto que esse parceiro ideal seria o mesmo para ambas as formas do peptídeo. Assim, quando a proteína carreadora não preencheu os requisitos de parceiro ideal para um dos peptídeos, os testes de expressão não foram prosseguidos com o outro.

4.2.1 Construções com a ClCa, BbCl e Fc

As sequências gênicas parciais das proteínas carreadoras ClCa e Fc, as quais foram usadas para as respectivas fusões, foram reamplificadas para que seqüências de reconhecimento das endonuclease *NdeI* e *XhoI* (para a ClCa) e *NdeI* e *BamHI* (para o Fc) fossem introduzidas. Ainda, os peptídeos foram inseridos após a proteína carreadora numa fase aberta de leitura, através da retirada do códon de parada da proteína carreadora.

No caso do Fc, adicionou-se uma seqüência codificadora para cauda de polihistidinas na extremidade 5' da seqüência gênica, visto que o vetor que não possuía essa seqüência. A análise por eletroforese em gel de agarose revelou um fragmento amplificado de cerca de 200pb (figura 4.2) para o fragmento referente à ClCa e 400pb para o referente ao Fc, correspondendo ao tamanho esperado.

A seqüência codificante para a BbCl foi amplificada para que o códon de parada fosse retirado e uma seqüência de reconhecimento para *NcoI* fosse inserida. O produto amplificado mostrou-se do tamanho esperado (figura 4.2), tendo 500pb.

Os fragmentos gênicos da ClCa e da BbCl foram inicialmente ligados com o gene sintético dos peptídeos, purificados, para depois serem ligados ao vetor.

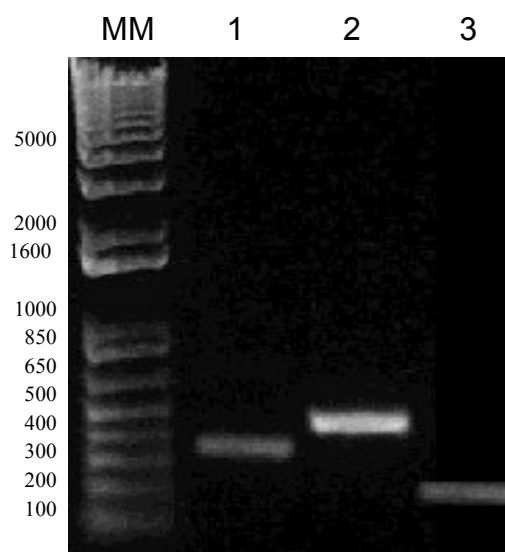


Figura 4.2. Produto de amplificação dos fragmentos gênicos codificantes para a Fc, BbCl e CICa. Eletroforese em gel de agarose 0.8 %, corado com Brometo de etídeo e visualizado sob transiluminador UV. Coluna (1) produto amplificado do fragmento referente ao Fc, (2) produto amplificado da BbCl e (3) produto amplificado referente à CICa.

4.3 Ensaio de Expressão

Mesmo nos casos em que não houve a expressão da proteína de interesse detectável por SDS-PAGE, a maioria dos extratos solúveis após a lise das células foi cromatografada em resina de afinidade para certificação do resultado, figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6.

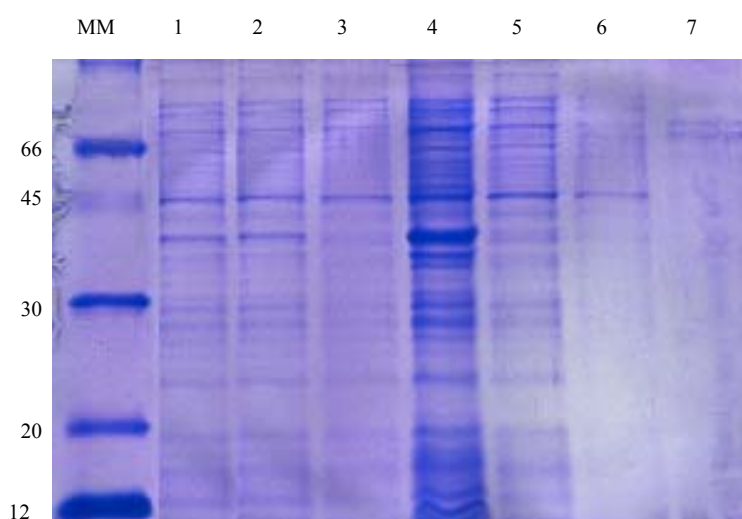


Figura 4.3. Análise da expressão em *E. coli* BL21(DE3) pETFc-p24 (rp24-3m). SDS-PAGE 15%, corado com azul de Comasie. MM: marcador de massa molecular (kDa); Colunas: (1) proteínas totais após a indução; (2) fração solúvel após lise celular; (3) fração insolúvel após lise celular; (4) proteínas não retidas na resina de Ni-NTA; (5) lavagem da resina; (6) fração eluída com 40mM de Imidazol; (7) fração eluída resina de Ni-NTA com 250mM de Imidazol.

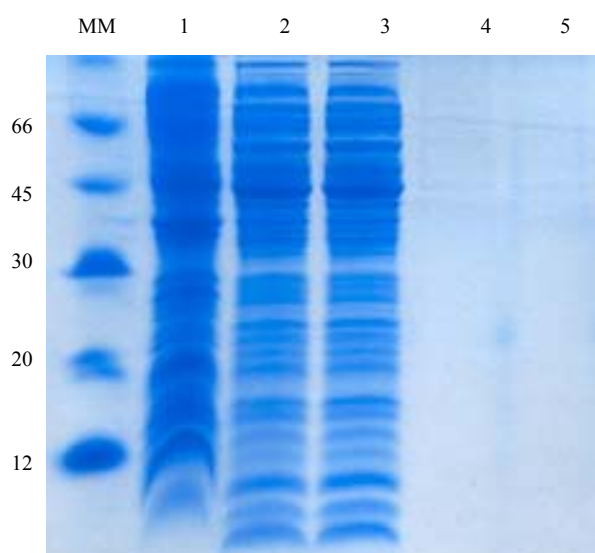


Figura 4.4. Análise da expressão em *E. coli* BL21(DE3) pETCICa-p24 e ligação da proteína de fusão em Ni-NTA. SDS-PAGE 15%, corado com azul de Comasie. Colunas:(MM) marcador de massa molecular (kDa); (1) Proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3) pETCICa-p24: (1) fração insolúvel após lise celular; (2) fração solúvel após lise celular; (3) proteínas não retidas na resina de Ni-NTA; (4) lavagem da resina; (5) fração eluída da resina de Ni-NTA com 250mM de Imidazol.

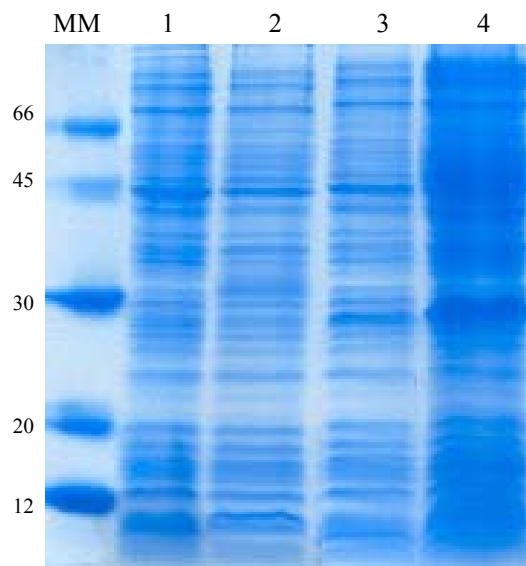


Figura 4.5. Análise da expressão em *E. coli* BL21(DE3) pETHRP-p24 (rp24-3). SDS-PAGE 15%, corado com azul de Comasie. MM: marcador de massa molecular (kDa); Colunas: (1) proteínas totais antes de indução; (2) após indução; *E. coli* BL21(DE3)pETHRP, antes de indução (3) e após indução (4).

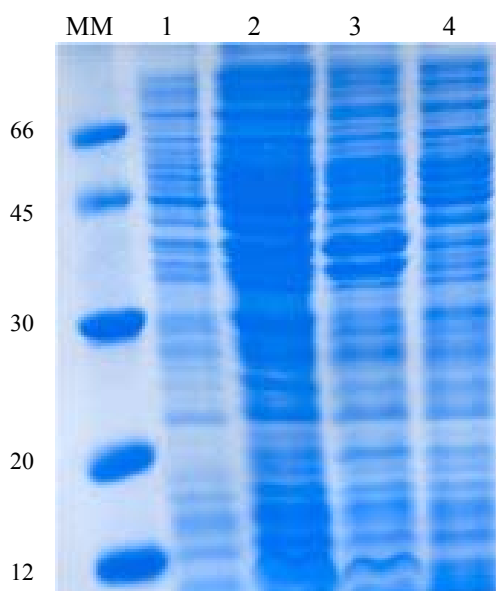


Figura 4.6. Análise da expressão em *E. coli* BL21(DE3) pGEX-p24 (rp24-3). SDS-PAGE 15%, corado com azul de Comassie. MM: marcador de massa molecular (kDa); Colunas: (1) proteínas totais antes da indução; (2) após a indução; (3) fração insolúvel após lise celular; (4) fração solúvel após lise celular.

Além disso, para a construção utilizando a ClCa como proteína carreadora, foi feita uma RT-PCR com o intuito de detectar o mRNA precursor da proteína de fusão. O RNA total foi extraído a partir de uma cultura de células de *E. coli* (usando o Kit Rneasy, Qiagen), e fez-se a RT-PCR conforme instruções do fabricante. O cDNA foi detectado por eletroforese em gel de agarose, indicando que a proteína de fusão foi transcrita, porém não conseguiu ser traduzida (mRNA instável) ou o produto foi prontamente degradado. A tabela 4.2 revela quais foram as construções testadas e os resultados dos testes de expressão.

Tabela 4.2. Resultados da expressão e solubilidade das proteínas de fusão. Em parêntese está a versão do peptídeo incorporada na proteína de fusão e testada.

Proteína de Fusão	Expressão da proteína de fusão	Expressão solúvel
ClCa-p24 (rp24-3m/X)	Não	-
BbCl-p24 (rp24-3m/X)	Sim	Não
HRPII-p24 (rp24-3n/X)	Não	-
GST-p24 (rp24-3m/X e rp24-3/X)	Não	-
UBE-p24 (rp24-3/X)	Sim	Sim
Fc-p24 (rp24-3m/X)	Não	-
Trx-p24 (rp24-3m/X, rp24-3/X, rp24-3m/E, rp24-3/E)	Sim	Sim

Para as demais construções que não apresentaram expressão detectável por SDS-PAGE não foram realizados ensaios para a detecção do transcrito, mas as causas para a ausência de expressão podem ser as mesmas.

4.3.1 Expressão e purificação das proteínas de fusão solúveis

Como só houve expressão nas construções referentes à fusão com BbCl (figura 4.7), Trx (figuras 4.8 e 4.9) e UBE2G2 (figura 4.10), e estando a proteína de fusão contendo a BbCl na forma insolúvel, os experimentos prosseguiram com as fusões solúveis (Trx e a UBE2G2).

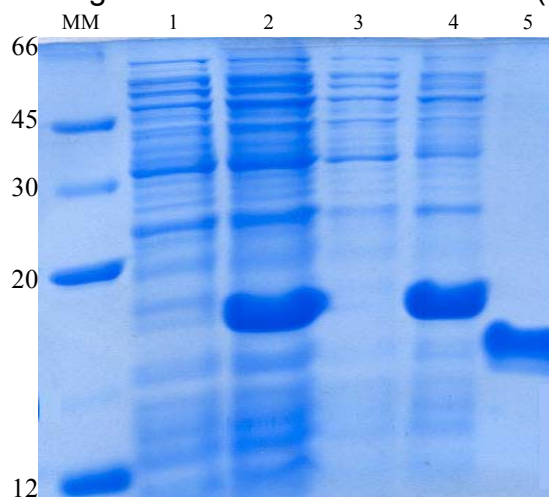


Figura 4.7. Análise da expressão e solubilidade da proteína BbCl-p24 (rp24-3m). SDS-PAGE 15%, corado com azul de Comassie. MM: marcador de massa molecular (kDa); Colunas: (1) Proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3) pET BbCl-p24 (rp24-3m) antes da indução; (2) após a indução; (3) fração solúvel após lise celular; (4) fração insolúvel após lise celular; (5) proteína BbCl sozinha (controle).

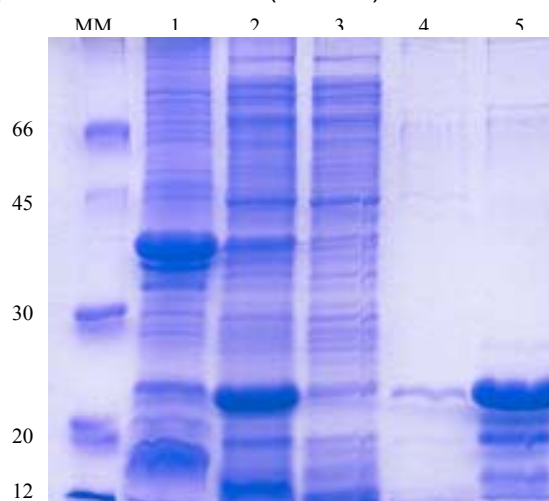


Figura 4.8. Análise da Expressão, solubilidade e purificação da Trx-p24 (rp24-3). SDS-PAGE 15% corado com azul de Comassie. MM: marcador de massa molecular (kDa); Colunas: Proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3) pET 32-p24 (rp24-3) (1) fração insolúvel após lise celular, (2) fração solúvel após lise celular, (3) material não retido na resina Ni-NTA, (4) lavagem da resina, (5) eluição com 250 mM de Imidazol.

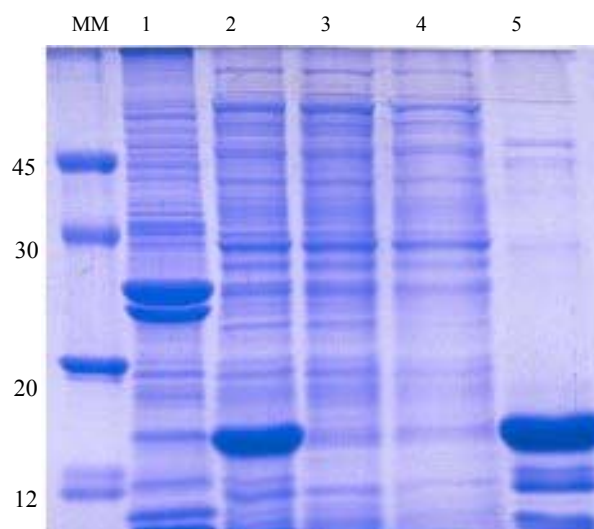


Figura 4.9. Análise da Expressão, solubilidade e purificação da Trx -p24 (rp24-3m). Eletroforese em SDS-PAGE 15%; MM: marcador de massa molecular (kDa); Colunas: Proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3) pET 32-p24 (rp24-3m) (1) fração insolúvel após lise celular, (2) fração solúvel após lise celular, (3) material não retido na resina Ni-NTA, (4) lavagem da resina, (5) eluição com 250 mM de Imidazol.

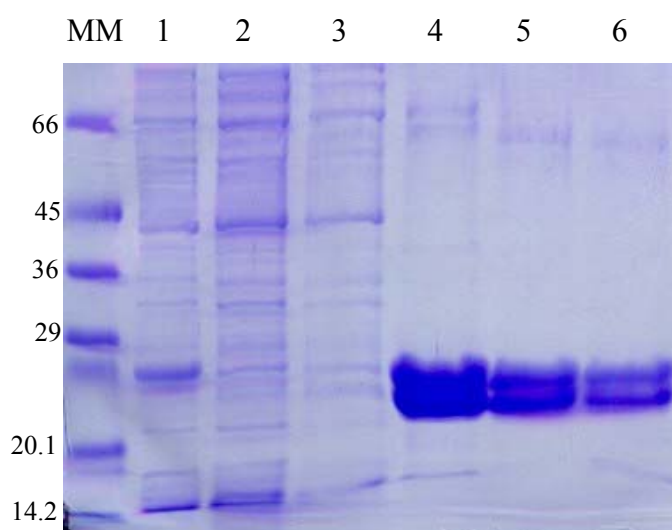


Figura 4.10. Expressão e purificação da UBE-p24 (rp24-3m/X). SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.; MM: marcador de massa molecular (kDa). Colunas: Proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3) pET UBE-p24 (rp24-3m/X), (1) fração solúvel após lise celular; (2) material não retido na resina Ni-NTA; (3) lavagem da resina; (4, 5 e 6) eluição da proteína de fusão com 40 mM, 100 mM e 250 mM de Imidazol, respectivamente.

Um critério adotado para a escolha do parceiro de fusão ideal foi seu tamanho, já que possivelmente o rendimento final do

peptídeo seria maior com um parceiro de tamanho menor, pois o peptídeo corresponderia a uma porcentagem maior da fusão. Neste caso, ambas as proteínas carreadoras expressas solúveis eram de tamanho aproximado e, além disso, foram expressas relativamente iguais em termos quantitativos.

Embora as proteínas de fusão contendo tiorredoxina tenham eluído com muitos contaminantes da cromatografia de afinidade (figuras 4.8, 4.9), a eluição da UBE-p24 desta etapa cromatográfica era sempre acompanhada de um contaminante de massa molecular próxima e de mesma intensidade da fusão (figura 4.10). Investigações sobre a natureza deste contaminante não foram feitas, mas o fato deste eluir sob concentrações relativamente altas de imidazol sugere que poderia representar um produto de degradação da proteína de fusão ou, ainda, da terminação precoce da síntese.

Assim, em função da clivagem com o fator Xa ter se revelado inespecífica (discussão posterior), tornando necessário alterar o sítio de clivagem enzimática e, conseqüentemente, reconstruir as fusões, aliado aos problemas de purificação, optou-se por prosseguir apenas com uma das proteínas carreadoras.

Estando a construção com a Trx no pET 32a, o qual possui um sítio de reconhecimento para a Ek adjacente à região de inserção dos peptídeos, foi possível testar a especificidade da Ek. Felizmente, após otimizações nas condições de clivagem (temperatura, concentração da proteína, quantidade de enzima utilizada, tampão ideal) a EK revelou-se adequada para a liberação dos peptídeos das fusões. Sendo assim, os genes sintéticos referentes a cada peptídeo foram reconstruídos destituídos do sítio de reconhecimento para o fator Xa, para que após a clivagem com Ek o peptídeo apresentasse o mínimo de aminoácidos excedentes com relação à seqüência original.

O nível de expressão e a solubilidade das novas construções (com sítio de reconhecimento para Ek), foram similares às anteriores.

A construção pET32-p24 (com sítio de reconhecimento para a Ek) foi então a escolhida para produzir os peptídeos e dar andamento ao trabalho.

Para tentar contornar o problema da presença de contaminantes após a purificação em resina de afinidade, estratégias como a adição de detergente e o aumento da concentração de NaCl nas soluções de purificação foram testadas, porém revelaram-se desvantajosas.

4.4 Clivagem das proteínas de fusão

4.4.1 Clivagem com fator Xa

O método mais popular para remover “caudas” de afinidade ou até mesmo proteínas carreadoras envolve o uso de uma protease específica como o fator Xa. Este possui uma preferência para ligações peptídicas em que o C-terminal possui um resíduo de arginina. A seqüência de aminoácidos em volta do sítio a ser clivado, principalmente nas seqüências que precedem esta região, contribui bastante com a especificidade da clivagem (Jenny *et al.*, 2003).

Testes variando a estringência (quantidade de sal no tampão de clivagem, temperatura, quantidade de enzima e tempo de ação) foram realizados. Não foi possível obter clivagem total da fusão, uma vez que razões elevadas de protease/proteína de fusão levavam a inúmeros subprodutos de degradação (resultados não mostrados). Quando uma razão de 14U de fator Xa/ mg de Trx-rp24 foi usada, incubando a amostra a 19^oC por 1 hora (figura 4.11) a clivagem foi parcial, comprometendo o rendimento final de peptídeo, desencorajando testes adicionais usando condições mais estringentes.

O sequenciamento da porção N-terminal dos peptídeos purificados em fase reversa revelou que mesmo nessas condições de clivagem parcial acima descrita, a clivagem em sítios secundários do peptídeo ainda ocorria, não sendo detectadas moléculas de peptídeo íntegras.

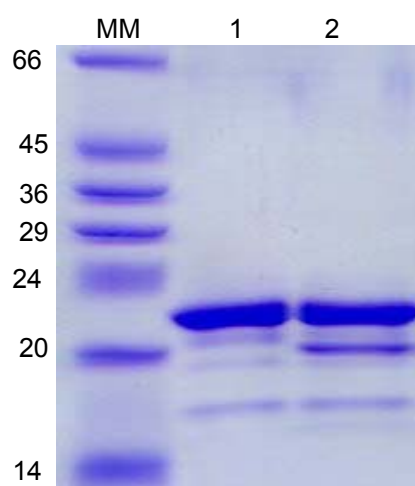


Figura 4.11. Análise da clivagem da fusão Trx-p24 (rp24-3m/X) por fator Xa. SDS-PAGE 15%, corado com azul de Coomassie. MM: marcador de massa molecular (kDa); Colunas: frações eluídas da purificação por Ni-NTA contendo a trx-rp24-3m, (1) antes da clivagem, (2) após 1 hora de clivagem a 19° C com 14U/mg de Trx-p24m.

Na construção com a UBE2G2, a clivagem também não foi específica. Após 10 horas de incubação a 24⁰C, usando a razão de 5U /mg de proteína de fusão, a clivagem foi parcial e, ainda assim, a análise do sequenciamento da porção N-terminal revelou que o peptídeo também havia sido clivado em sítios secundários (figura 4.12).



Figura 4.12. Sítios inespecíficos de clivagem na seqüência de aminoácidos do rp24-3m/X. As setas indicam os sítios nos quais ocorreu a clivagem catalisada pelo fator Xa, determinada pela análise de aminoácidos do N-terminal.

Jenny e colaboradores (2003) fazem uma extensa revisão sobre especificidade dos sítios de clivagem do fator Xa e trombina e trazem freqüentes relatos de proteólise em outros sítios da proteína de interesse.

Resultados similares aos obtidos nesse trabalho também ocorreram com Wang e colaboradores (1999). Eles fusionaram uma proteína humana, relacionada a resistência a drogas, à MBP com um sítio intermediário de reconhecimento do fator Xa, para a liberação do peptídeo da fusão. No entanto, a protease revelou-se altamente inespecífica na clivagem, levando-os a realizar uma nova construção substituindo o sítio de reconhecimento do fator Xa pelo de trombina.

Zaitseva e colaboradores (1996), em seu trabalho envolvendo proteínas quiméricas dos transportadores ABC, conseguiram melhorar a especificidade do fator Xa alterando as condições de clivagem. Quando a reação de clivagem com fator Xa se dava em solução contendo 100mM fosfato de Na, pH 8.0, 20% de glicerol, 0,1 % dodecilmaltosídeo, 1,5M NaCl, e 1mM CaCl₂, ocorria a digestão completa, mas com clivagem interna na proteína de interesse numa seqüência VSGR. Após reduzir a concentração dos sais, do dodecilmaltosídeo e o pH, a hidrólise passou a ocorrer mais lentamente e a digestão completa no sítio específico do fator Xa ocorreu após 4 horas de clivagem a 23^oC, com mínimas clivagens em sítios secundários.

4.4.2 Clivagem com Ek

Como previamente descrito, as tentativas de usar o fator Xa como a protease para a liberação do peptídeo levaram a fragmentação do peptídeo, levando a busca de uma outra protease. Como o pET 32a possui um sítio de clivagem para a Ek, esta protease foi testada na digestão da fusão Trx-p24m. Felizmente, o seqüenciamento N-terminal dos picos previamente purificados da coluna C18 revelou a integridade dos peptídeos, confirmando a especificidade da EK para a liberação dos peptídeos (nas condições previamente apresentadas).

Desde que a região de reconhecimento do fator Xa foi inserida na montagem dos genes sintéticos dos peptídeos via PCR, foi necessário sintetizar outros fragmentos gênicos, usando novos oligonucleotídeos externos, para a retirada da seqüência codificante do sítio do fator Xa. Nesta nova construção, alguns resíduos de aminoácidos tiveram de ser incluídos na seqüência nativa do p24-3 para que fosse inserido em fase de leitura correta com sítio de enteroquinase. Assim, na versão linear incorporou-se a seqüência AMA no N-terminal.

Na forma modificada houve ainda a inserção de dois resíduos de cisteínas (N e C-terminais) e a extensão de 3 resíduos adicionais para que as cisteínas não fossem terminais. Assim, nesta versão cíclica, adicionou-se: AMAC-, na porção N-terminal e -CAAA, no C-terminal.

Devido à precipitação da proteína de fusão no tampão recomendado para a digestão com Ek, foi necessário alterar a concentração de sal na solução protéica. A quantidade máxima de sal permitida no tampão sem interferir na atividade da Ek foi de 50mM de NaCl, sendo que concentrações superiores impediram a clivagem. Assim, a concentração protéica para a subsequente clivagem foi mantida em cerca de 1,5 mg/mL em tampão 50mM Tris-HCl pH 8, contendo 50mM de NaCl, 1 mM CaCl₂, e 0,1 % de Tween-20 (v/v). A reação foi incubada a 24^oC por 6 horas (figura 4.13).

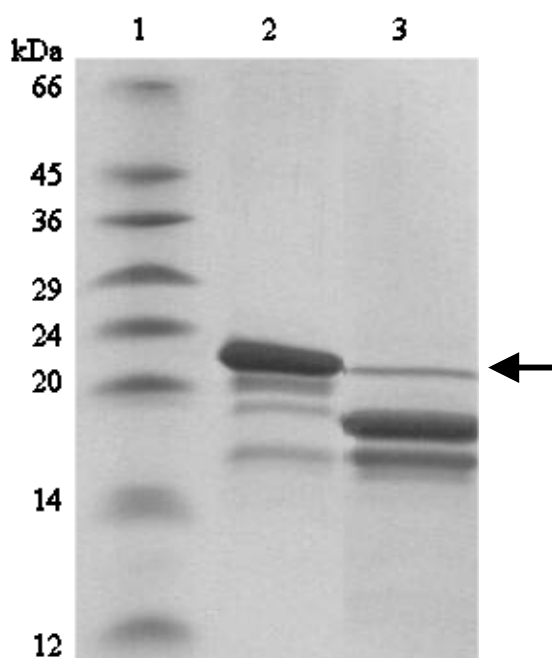


Figura 4.13. Clivagem da Trx-rp24 (rp24-3m/E) pela Ek. SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. MM: marcador de massa molecular (kDa); Colunas: (1) frações eluídas da purificação por Ni-NTA contendo a Trx-p24 (rp24-3m/E) antes da clivagem, (2) após 6 horas de clivagem, com 0,5 U de EK/ 1mg de proteína de fusão em tampão de clivagem contendo 50mM de NaCl. Seta à direita indicando a proteína de fusão.

Vários aspectos podem afetar a especificidade da clivagem, assim como a estabilidade da proteína alvo como a razão enzima/substrato, a temperatura e a duração em que se dá a reação (Jenny *et al.*, 2003). Foi verificado que testes em condições não tão bem controladas (como clivagem direto na resina de Ni-NTA ou clivagem por tempos longos e altas concentrações de enzima) acarretaram na clivagem em sítios secundários localizados na seqüência peptídica.

Assim, como em concordância com Jenny *et al* (2003), um dos aspectos que precisam ser levados em conta nas reações de clivagem de proteínas de fusão são a escolha do tampão em que a reação de clivagem ocorrerá, considerando cuidadosamente o pH e a força iônica. O rendimento final de ambos os peptídeos, quantificado através do coeficiente de extinção teórico ($\epsilon_{280nm}^{1mg/mL} = 1.875$,

<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>), foi de 5-6mg/L de cultura, sendo satisfatório quando comparados aos encontrados na literatura para outros peptídeos: 1 mg/L de cultura (Ponti *et al.*, 1999), 1,8 mg/L de cultura (Williamson *et al.*, 2000) e 0,5 mg/L de cultura (Skosyrev *et al.*, 2003).

4.5 Purificação dos peptídeos

4.5.1 Cromatografia de Filtração Molecular

Após a liberação do peptídeo da proteína carreadora, a amostra contendo os peptídeos foi submetida a uma cromatografia de gel filtração (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) em coluna *Superdex Peptide*. Como pode ser observado na figura 4.14, a fração contendo rp24-3 não foi efetivamente separada de todos contaminantes. Ainda, análises comparativas de amostras purificadas em C18, submetidas previamente ou não à gel filtração, mostraram perfis similares. Isto dispensou o uso da gel filtração para a purificação da versão linear do peptídeo.

Porém, para a versão modificada do peptídeo (rp24-3m), a gel filtração na *Superdex Peptide* (figura 4.15), mostrou-se capaz de separar a fração correspondente ao peptídeo em fração distinta daquelas dos contaminantes. Sendo assim, a purificação por gel filtração foi um procedimento adotado para o peptídeo cíclico.

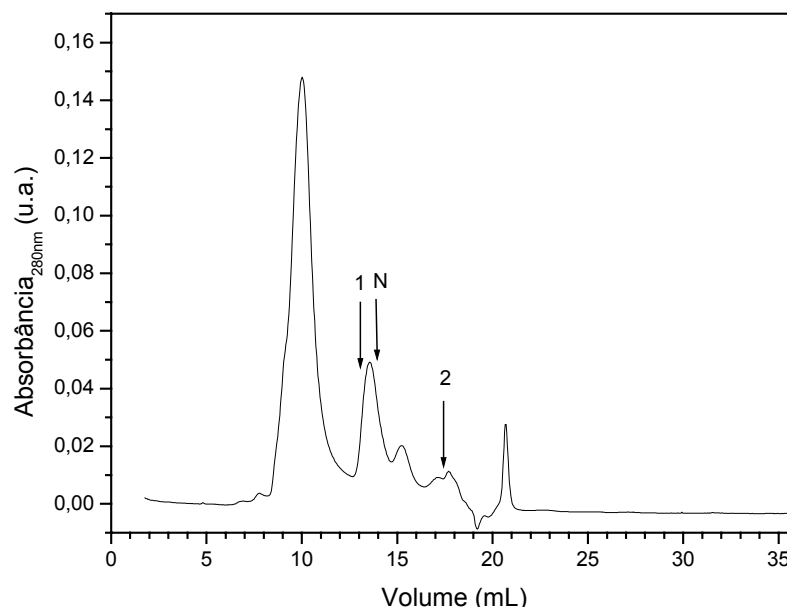


Figura 4.14. SEC do rp24-3 na coluna Superdex Peptide. Perfil de eluição do peptídeo em ácido acético 5%. As setas indicam as posições de eluição dos padrões de massa molecular, (1) Inibidor de caliceína (6,6 kDa); (2) Angiotensina (1 kDa) e (N) o pico contendo o rp24-3.

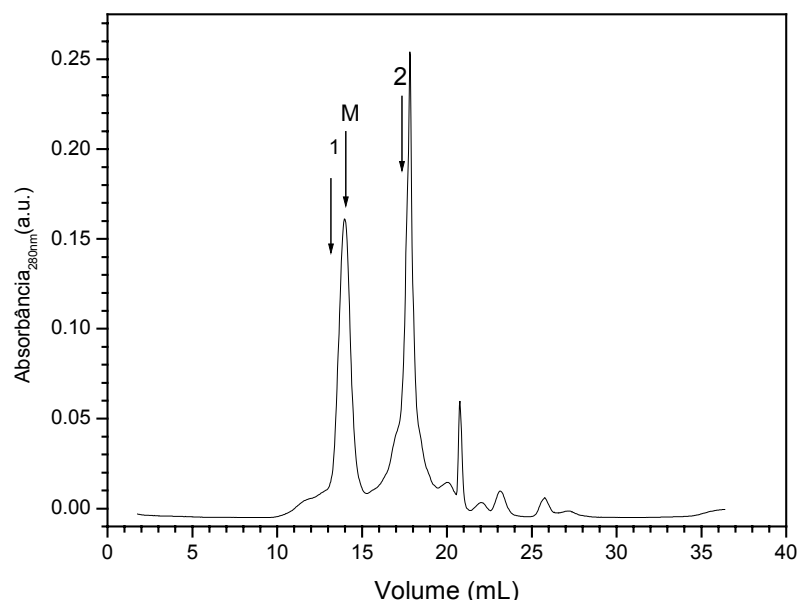


Figura 4.15. SEC do rp24-3m na coluna Superdex Peptide. Perfil de eluição do peptídeo em ácido acético 5%. As setas indicam as posições de eluição dos padrões de massa molecular, 1: Inibidor de caliceína (6,6 kDa), 2: Angiotensina (1 kDa) e M: pico contendo o rp24-3m.

4.5.2 Cromatografia em Fase Reversa

Para as amostras do rp24-3, logo após liberação do peptídeo da proteína de fusão e filtração em Centricon 10, foi realizada uma cromatografia em fase reversa usando uma coluna C18, nas condições previamente apresentadas. Como mostrado na figura 4.16, apenas esta etapa cromatográfica foi suficiente para purificar o peptídeo alvo, sendo eluído com tempo de retenção de 36 minutos. Uma alíquota desta fração purificada foi utilizada no sequenciamento de aminoácidos, confirmando a sequência completa esperada para o peptídeo. Além disso, as análises por espectrometria de massa também confirmaram a massa molecular predita, bem como constatou um grau de pureza satisfatória para a amostra.

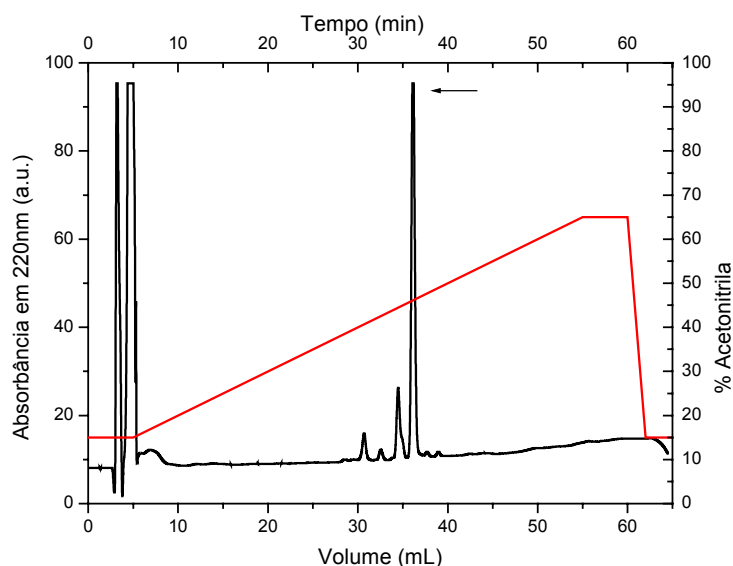


Figura 4.16. Purificação do rp24-3 em cromatografia de fase reversa C18. O perfil de eluição (linha preta) e o gradiente de acetonitrila (linha vermelha) de 15% a 65% de solução B durante 50 minutos. O pico correspondente ao peptídeo está indicado pela seta. As corridas foram monitoradas pela leitura da absorbância a 220nm e as frações (1mL) foram coletadas sob um fluxo de 1mL/min.

Em contrapartida, a variante peptídica modificada, rp24-3m, foi eluída desta mesma coluna com tempos de retenção variáveis, impedindo a detecção um perfil de eluição único para todas as amostras provenientes de preparações distintas. A figura 4.17 mostra dois perfis (A e B) para amostras oriundas de ensaios de expressão, purificação e clivagem diferentes, usando condições experimentais idênticas.

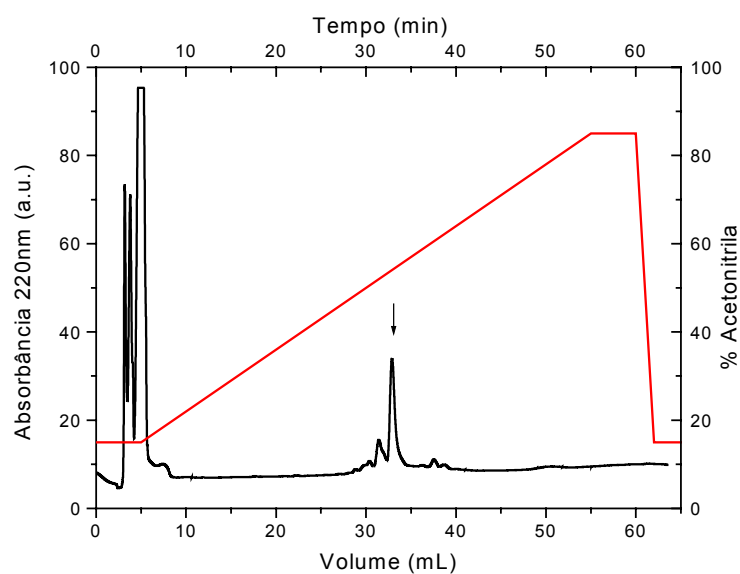
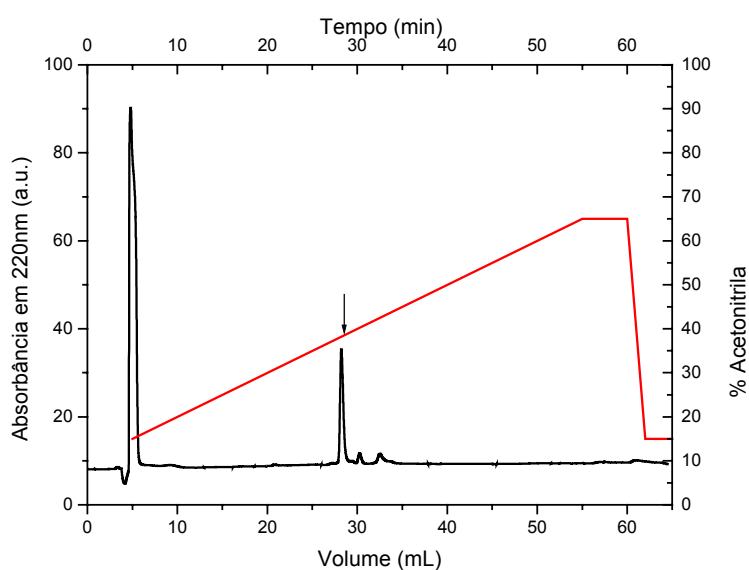
**A****B**

Figura 4.17. Dois perfis de purificação do rp24-3m em cromatografia de fase reversa C18 . Os perfis de eluição (linhas preta) e o gradiente de acetonitrila de 15% a 65% de solução B durante 50 minutos. (linha vermelha). Os picos correspondentes ao peptídeo estão indicados pelas setas. As condições de expressão, cromatografia de afinidade e clivagem da proteína de fusão foram as mesmas em A e B. As corridas foram monitoradas a 220nm e as frações (1mL) foram coletadas em um fluxo de 1mL/min.

O seqüenciamento de aminoácidos, dos picos indicados na figura 4.17A e 4.17B, confirmaram a seqüência de aminoácidos correta para o peptídeo p24-3m.

O resultado da espectrometria de massa desses picos variáveis revelou a presença de formas com uma massa molecular de 3453,5 Da, 3451 Da, 6908Da e 10362 Da, indicando a presença de múltiplas formas oligoméricas: não cíclica (provavelmente), cíclica (provavelmente), dimerizada e trimerizada, respectivamente.

A análise por SDS-PAGE de amostras oriundas da eluição da coluna de Ni-NTA revelou a presença de proteínas de fusão monoméricas, diméricas e provavelmente triméricas (figura 4.18). Isto sugere que uma parcela de peptídeos cicliza-se durante ou logo após sua síntese como na forma de proteína de fusão. Ainda, outra parte, ao invés de fazer ligação S-S intramolecular, participa de ligação intermolecular, formando oligômeros de proteína de fusão.

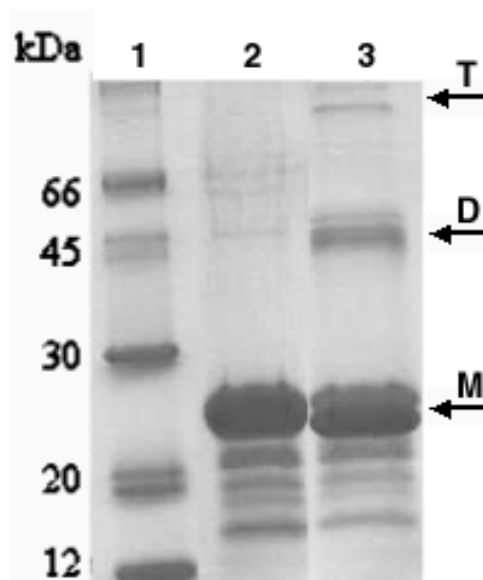


Figura 4.18. Análise da oligomerização da proteína de fusão Trx-p24 (rp24-3m). SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. Colunas: (1) padrão de massa molecular; (2) Alíquota de Trx-p24m (rp24-3m) eluída da resina Ni-NTA em condições não redutoras (sem β - mercaptoetanol no tampão de corrida) e (3) reduzida (com β -mercaptoetanol no tampão de corrida). As setas apontam para as bandas correspondentes às formas monoméricas (M), diméricas (D) e possivelmente triméricas (T) da proteína de fusão.

Existem trabalhos que descrevem a produção recombinante de peptídeos cíclicos (Dobeli *et al.*, 1998; Fairlie *et al.*, 2002), porém nestes os resíduos de cisteínas estavam “próximos” (apenas 4-6 resíduos entre eles), diferente do que ocorre com o rp24-3m. Diversas estratégias para se obter uma amostra pura e homogênea foram testadas como, por exemplo, a adição de agentes redutores (DTT e cisteína/cistina) imediatamente após a clivagem ou, ainda, a purificação em fase reversa com um fluxo mais alto. Porém, as tentativas testadas não tiveram sucesso, impedindo a obtenção do p24-3m monomérico numa forma homogênea e, conseqüentemente, impedindo sua utilização em estudos espectroscópicos.

4.6 Estudos estruturais do rp24-3

4.6.1 Espectroscopia de CD

A figura 4.19 mostra os espectros de CD do rp24-3 em água (linha preta, tanto em A como em B). É possível observar que, mesmo em água, o peptídeo adquire uma estrutura secundária, sugerido por um mínimo acentuado em cerca de 220nm e um máximo positivo em cerca de 196nm (Venyaminov & Yang, 1996).

A desconvolução do espectro confirma esta evidência, resultando em 32% de elementos helicoidais, 39% de estruturas beta e 29% de formas desordenadas. Isto indica que o rp24-3 é estruturado mesmo em água, diferentemente da estrutura randômica esperada para pequenos peptídeos, que devido a sua alta flexibilidade, comumente adquirem uma estrutura secundária desordenada.

Quando em 50mM PBS, (figura 4.19, A, linha azul), a forma da curva sofreu uma mudança significativa, pois a leve banda em torno de 205nm que pode ser vista no espectro do rp24-3 em água, desapareceu. A desconvolução deste espectro revelou 36% de elementos helicoidais,

40% de estruturas beta e 24% de formas desordenadas. Comparando com os resultados apresentados pela desconvolução da amostra do peptídeo em água, pode ser observado uma diminuição no índice de estruturas desordenadas, enquanto que a presença de estruturas ordenadas, elementos helicoidais e beta, aumentaram. Essa variação pode ser atribuída a um aumento na estabilidade da estrutura do peptídeo promovida pelo tampão PBS.

Com o intuito de investigar as mudanças conformacionais do peptídeo, metanol, um solvente indutor de estrutura secundária (Williams & Weave, 1990), foi adicionado em várias concentrações (figura 4.19, B).

A adição de 10 e 20% de metanol não causou nenhuma mudança significativa no espectro. Porém, em 50% de metanol, alterações consideráveis puderam ser observadas. Um mínimo em cerca de 205nm foi detectado, assim como um aumento da intensidade do mínimo em 220nm e do máximo em 196nm. Os resultados de desconvolução do espectro sugeriram 41% de estruturas helicoidais, 30% de elementos beta e 29% de formas desordenadas, indicando assim um aumento do conteúdo de hélices.

Acima de 70% de metanol, ao lado da banda positiva em cerca de 196nm, o mínimo negativo foi intensificado reafirmando a indução de formas helicoidais pela adição de metanol. A desconvolução deste espectro resultou em 80% de estruturas helicoidais, 9% de elementos beta e 11% de formas desordenadas.

O fato do peptídeo estar estruturado até mesmo em água pode ser explicado pela presença de resíduos hidrofóbicos na sua sequência (figura 4.20), pois, em meio aquoso, estes resíduos hidrofóbicos ficam preferencialmente não expostos e com isso, a molécula do peptídeo poderia adquirir uma estrutura secundária regular (Brandeen & Tooze, 1991).

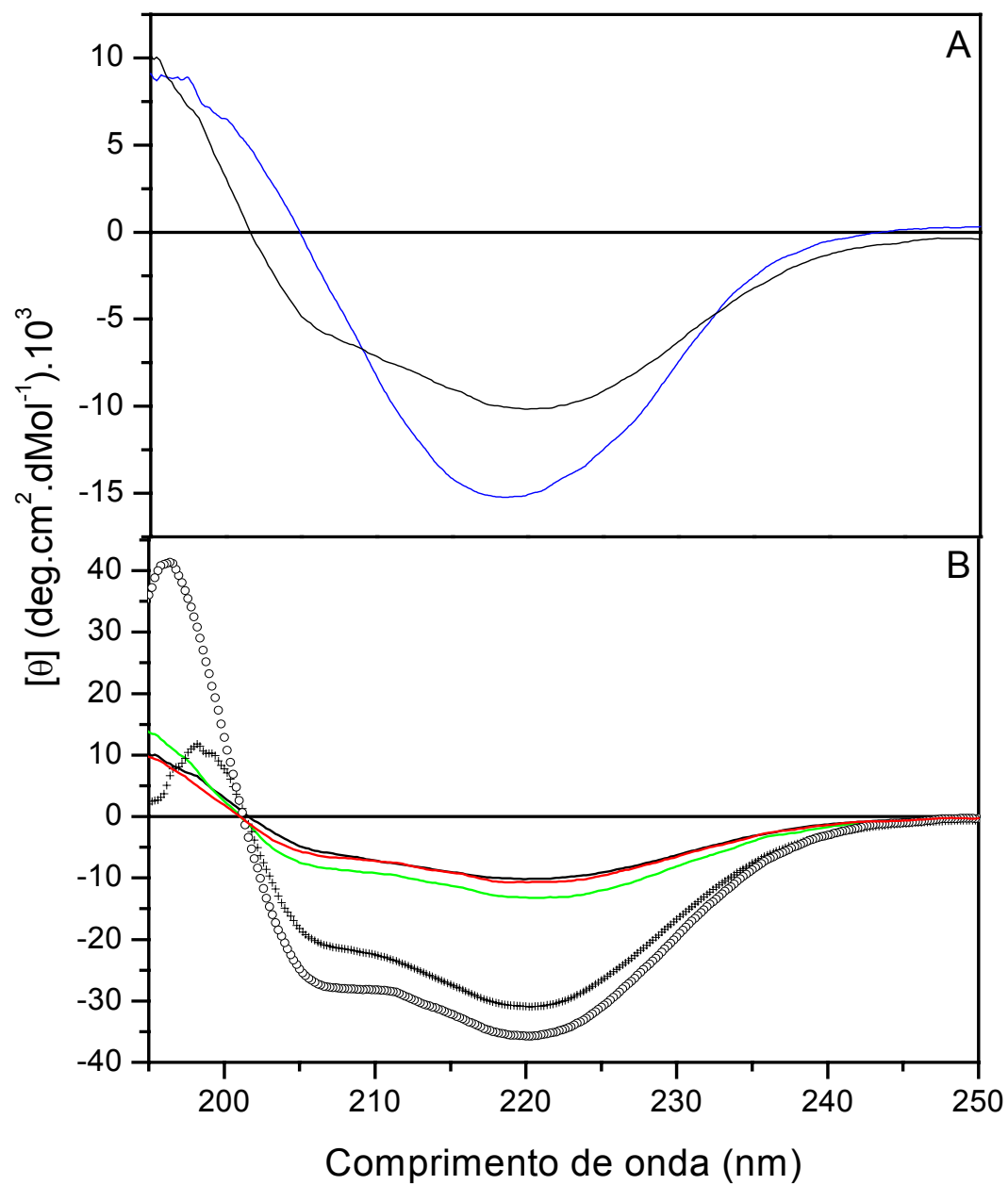


Figura 4.20. Espectro de CD do rp24-3. (A) Em água (linha preta) e em PBS (linha azul); **(B)** Em metanol 20% (linha vermelha), 50% (verde), 70% (linha de cruz) e 80% (linha de círculos vazios).

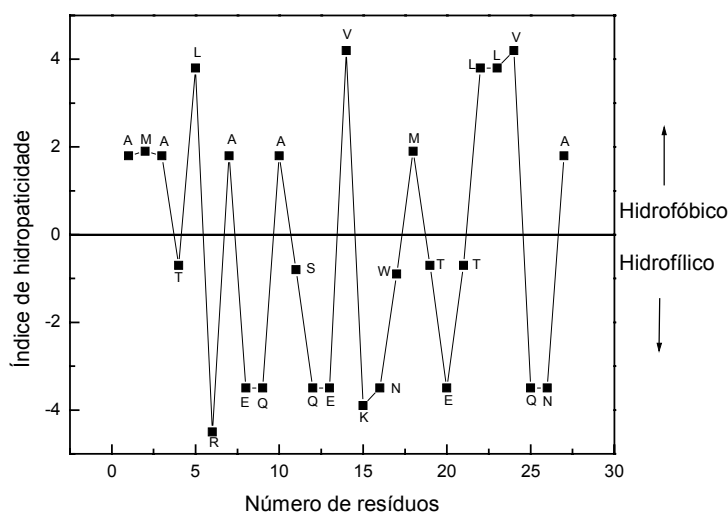


Figura 4.20. Índice de hidropaticidade do rp24-3. A figura mostra o índice de hidrofobicidade de cada resíduo de aminoácido do rp24-3.

4.6.2 Fluorescência Estática

A vizinhança do único triptofano no rp24-3 foi analisada por fluorescência estática. O máximo de emissão em água foi no comprimento de onda 332nm (figura 4.21, linha sólida), o qual concorda com o triptofano em um ambiente parcialmente escondido (Lakowicz, 1983). Quando em PBS (figura 4.21, linha pontilhada), o máximo de emissão foi alterado para 337nm, indicando uma leve exposição do fluoróforo ao meio aquoso. Estes resultados sugerem que o rp24-3 possui estrutura secundária organizada de forma que mantém o triptofano protegido da interação com o meio polar, tanto em água como em PBS. Em até 80% de metanol, apesar da estrutura secundária ter mudado, a vizinhança do triptofano permaneceu inalterada, mostrando um máximo de emissão similar ao obtido em água.

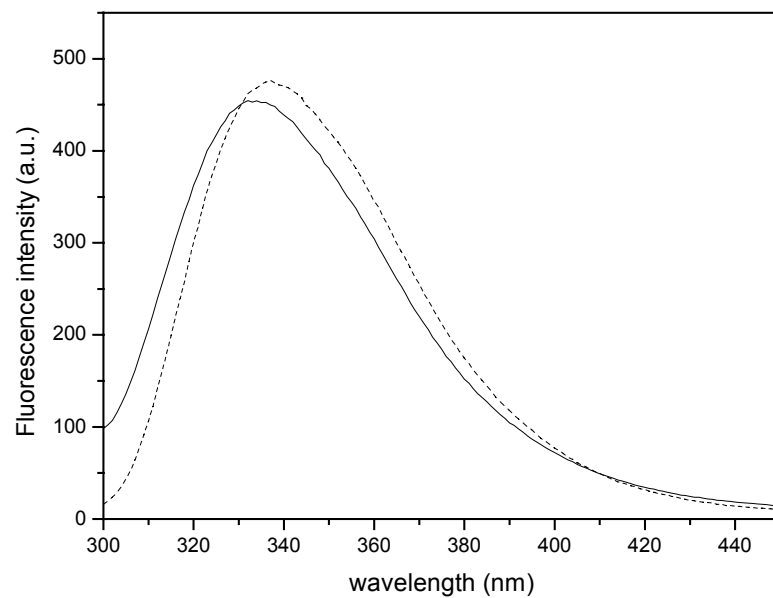


Figura 4.21. Espectro de fluorescência do rp24-3. Em água (linha sólida) e em PBS (linha pontilhada). O comprimento de excitação foi de 280nm, e a emissão foi varrida de 300 a 450nm.

5 Conclusões

Os fragmentos gênicos sintéticos foram facilmente sintetizados usando a estratégia do “gene sintético”. O sistema de expressão para a produção recombinante no qual os peptídeos foram fusionados a proteína carreadora (Trx) mostrou-se o mais adequado à expressão dos peptídeos p24-3 na forma solúvel.

Após a liberação dos peptídeos, por meio da clivagem enzimática, e subsequente purificação na C18, foi obtido um rendimento satisfatório (5-6mg/L de cultura) para a produção recombinante. Apesar de não ter conseguido homogeneidade nas amostras do rp24-3m ciclizado, o mesmo não ocorreu com o rp24-3 que foi obtido com pureza necessária para a realização de ensaios espectroscópicos.

O rp24-3 revelou-se estruturado mesmo em água. Além disso, as mudanças estruturais vistas com a indução do metanol indicam que o peptídeo é relativamente flexível. Os resultados de fluorescência sugerem que a organização da estrutura secundária do rp24-3 mantém o triptofano protegido da interação com o meio polar.

5.1 Considerações Finais

A região H9 da p24 do HIV possui uma alta plasticidade e coesão, evidenciando a importância biológica da p24 que, por poder se auto-associar em dímeros de várias maneiras, pode ter vários papéis estruturais durante a montagem, maturação e desmontagem nas infecções virais (Berthet-Colominas et al., 1999).

A seqüência do rp24-3 está contida no domínio C-terminal, a maior parte na hélice 9, a qual está sempre envolvida nas interações da p24 quando se auto-associa como homodímero via C-terminal com C-terminal (C-C) (Gamble *et al.*, 1997) e N-terminal com C-terminal (N-C) (Berthet-Colominas et al., 1999). Os aminoácidos hidrofóbicos, Val 181, Trp 184, Met 185 e Leu 189, que estão envolvidos no contato direto entre as interfaces dos dímeros N-C, estão compreendidos na seqüência do rp24-3 e rp24-3m.

Finalmente, a plasticidade deste peptídeo pode ser uma eficiente ferramenta para elucidar a importância biológica de sua região na p24. Além disso, também poderá ser útil para investigar a auto-associação que ocorre durante o ciclo de vida viral, seja de infecções virais *in vitro* ou modelos de infecção.

6 Perspectivas

Experimentos preliminares revelaram que houve a precipitação de vesículas unilamelares pequenas de 1:1 PC/POPG (Fosfatidilcolina/Palmitoil-Oleil-Fosfoglicerol) quando rp24-3 é adicionado. Isto pode ser um indicativo que o peptídeo interage com outras moléculas, neste caso lipídeos. Com o intuito de especular quais lipídeos interagem, estudos envolvendo vesículas unilamelares pequenas e monocamadas estão sendo realizados.

7 Referências Bibliográficas

- Arthur, L. O., Bess, J. W., Jr, Sowder, R. C. I., Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J.-C. and Handerson L. E. (1992). *Science*. **258**: 1935-1938.
- Au, L.C., Yang, F.Y., Yang, W.J., Lo S.H. and Kao, C.F. (1998). Gene Synthesis by a LCR-Based Approach: High Level Production of Leptin-L54 Using Synthetic Gene in *Escherichia coli*. *Biochem Bioph Res Com*. **248**: 200-203.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struthl, K., (1995). Short Protocols in Molecular Biology. 3^a ed. USA, Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Berthet-Colominas, C., Monaco, S., Novelli, A., Sibai, G., Mallet, F. and Cusak, S. (1999). Head-to-tail dimmers and interdomain flexibility revealed by the crystal structure of HIV-1 capsid protein (p24) complexed with a monoclonal antibody Fab. *EMBO*. **18 (5)**: 1124-36.
- Brandeen, C. & Tooze, J. (1991). Introduction to Protein Structure, 1st edn. Garland Publishing, Inc, NY.
- Carey, P. R. (1996). Protein engineering and design. *Academic Press*. 75-90.
- Carter, P. (1990). In Protein Purification: From Molecular Mechanism to Large-Scale Processes (Ladish, M. R., Wilson, C.-D., Painton, C. -D. C., and Builder, S. E., eds), pp. 181-193, American Chemical Society.
- Chang, H. H., Hu, S. T., Huang, T. F., Chen, S. H., Lee, Y. H., and Lo, S.J. (1993). Rhodostomin, an RGD-containing peptide expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*, facilitates the attachment of human hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **190 (1)**: 242-9.
- Chittenden, T. Thomas; Livingston, David M.; Kaelin, William G., Jr. (1991). The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can

- interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell*. **65**: 1073-1082.
- Cimarelli, A. and Darlix, J. -L. (2002). Assembling the virus immunodeficiency virus tipe 1. *Cell. Mol. Life. Sci.* **59**: 1166-1184.
- Climie, S., and Santi, D. V. (1990). Chemical Synthesis of the Thymidylate Synthase Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 633-637.
- de Oliveira, C., Santana, L. A., Carmona, A. K., Cezari, M. H., Sampaio, M. U., Sampaio, C. A., Oliva, M. L. (2001). Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds. *Biol Chem.* **382**: 847-52.
- Dobeli, H., Andres, H., Breyer, N., Draeger, N., Sizmann, D., Zuber, M.T., Weinert, B.& Wipf, B. (1998). Recombinant fusion proteins for the industrial production of disulfide bridge containing peptides: purification, oxidation without concatamer formation, and selective cleavage. *Protein Expr. Purif.* **12**: 404-14.
- Dorfman, T., Bukovsky, A., Ohagen, A., Hoglund, S. and Gottlinger, H. G. (1994). Functional domains of the capsid protein of the virus immunodeficiency virus tipe 1. *J. Virol.* **68**: 8180-8187.
- Eckert, D. M. & Kim, P. S. (2001) Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 777-810.
- Eftink, M. R. (1991) Methods of biochemical analysis: fluorescence techniques for studing proteins structure. Edited by Clarence H. Suelter, *John Wiley & Sons*.
- Fairlie, W. D., Uboldi, A. D., De Souza, D. P., Hemmings, G. J., Nicola, N. A. & Baca, M. (2002) A fusion protein system for the recombinant production of short disulfide-containing peptides. *Protein Expr. Purif.* **26**: 171-178.
- Fields, G. B. & Noble, R. L. (1990) Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl aminoacids. *Int. J. Pep. Prot. Res.* **35**: 161-214.

- Fikrig, E., Barthold, S.W., Kantor, F.S. and Flavell, R.A. (1990). Protection of mice against the Lyme disease spirochete agent by immunizing with recombinant OspA. *Science*. **250**: 553-556.
- Frorath, B., Abney, C. C., Berthold, M., Scanarini, M. and Northeman, W. (1992). Production of recombinant rat interleukin-6 in *Escherichia coli* using a novel highly efficient expression vector pGEX-3T. *BioTechniques*. **12**: 558-63.
- Fukushima, Y. (1998). Genetically engineered synthesis of tandem repetitive polypeptides consisting of glycine-rich sequences of spider dragline silk. *Biopolymers*. **45**: 269-279.
- Fuller, S. D., Wilk, T., Gowen, B. E., Kräusslich, H.-G. and Vogt, V. M. (1997). Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle. *Curr. Biol*. **7**: 729-738.
- Gamble, T. R., Vajdos, F. F., Yoo, S., Worthylake, D. K., Housesweart, M., Sundquist, W I. and Hill, C. P. (1997). Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell*. **87**: 1285-1294.
- Hammarström, M., Hellgren, N., Berg, S. V. D., Berglund, H. and Härd, T. (2002). Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion protein in *Escherichia coli*. *Protein Science*. **11**: 313-21.
- Hausdorf, G., Gewiess, A., Wray, V. & Porstmann, T. J. (1994) A recombinant human immunodeficiency virus type-1 capsid protein (rp24): its expression, purification and physical-chemical characterization. *Viol. Methods*. **50**: 1-9.
- Havel, A.H. (1996). Spectroscopic Methods for Determining Protein Structure in Solution. USA, Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Hayward, R. E., Sullivan, D.J. and Day, K. P. (2000). *Plasmodium falciparum*: histidine-rich protein II is expressed during gametocyte development. *Exp. Parasitol*. **96**: 139-46.

- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., and Boyer, H. W. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatin. *Science*. **198**: 1056-1063.
- Janvier, B., Mallet, F., Cheynet, V., Dalbon, P., Vernet, G., Besnier, M. J., Choulet, P., Goudeau, A., Mandrand, B. and Barian, F. (1993). Prevalence and persistence of antibody titers to recombinant HIV-1 core and matrix proteins in HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **6**: 898-903.
- Jayakumar, A., Huang, W.-Y., Raetz, B., Chirala, S. S. and Wakil, S. J. (1996). Cloning and expression of the multifunctional human fatty acid synthase and its subdomains in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **93**: 14509-14.
- Jayaraman, K., and Puccini, C. J. (1992). A PCR-mediated gene synthesis strategy involving the assembly of oligonucleotides representing only one of the strands. *Bio Techniques*. **12**: 392-398.
- Jenny, R. J., Mann, K. G. and Lundblad, R. L. (2003) A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expression and Purification*. **31**: 1-11.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A. and Stahl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35**: 91-105.
- Kaelin, W.G. Jr, Pallas, D.C., DeCaprio, J.A., Kaye, F.J., Livingston, D.M. (1991). Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell*. **64(3)**: 521-532.
- Katsanis, N. and Fisher, E.M.C. (1998). Identification, expression, and chromosomal localization of ubiquitin conjugating enzyme 7 (UBE2G2), a human homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* Ubc7 gene. *Genomics*. **51**: 128-131.

- Kuliopulos, A. and Walsh, C.T. (1994). Production, Purification, and Cleavage of Tandem Repeats of Recombinant Peptides. *J.Am.Chem. Soc.* **116**: 4599-4607.
- La Vallie, E. R., McCoy, J. M., Smith, D. B. And Riggs, P. (1994). In Current Protocol in Molecular Biology (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K., eds), 16.4.5-16.4.17, John Wiley and Sons.
- Lakowicz, J.R. (1983) Principles of fluorescence spectroscopy, 1st edn. Plenum Press, NY.
- LaVallie, E.R. and McCoy, J.M. (1995). Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Current Opinion on Biotechnology*. **6**: 501-6.
- Leinikki, P., Lehtinen, M., Hyöty, H., Parkkonen, P., Kantanen, M. L. and Hakulinen, J. (1993) Synthetic peptides as diagnostic tools in virology. *Adv. Virus Res.* **42**, 149-186.
- Lin, Y., Cheng, G., Wang, X. and Clark, T. G. (2002). The use of synthetic genes for the expression of ciliate proteins in heterologous systems. *Gene*. **288**: 85-94.
- Momany, C. et al., (1996). Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein. *Nature Struct. Biol.* **3**: 763-770.
- Murby, M., Uhlén, M. and Ståhl, S. (1996). Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. **7**: 129-136.
- Novy, R., Berg, J., Yaeger, K. and Mierendorf, R. (1995). pET TRX Fusion system for Increased solu-bility of proteins expressed in E. coli. *inNovations* **3**: 7–9. Novagen, Inc.
- Oprian, D. D., Asenjo, A. B., Lee, N., and Pelletier, S. L. (1991). Design, chemical synthesis, and expression of genes for the three human color vision pigments. *Biochemistry*. **30**: 11367-11372.
- Ponti, D., Mignogna, G., Mangoni, M. L., De Biase, D., Simmaco, M. & Barra, D. (1999) Expression and activity of cyclic and linear analogues

- of esculetin-1, an antimicrobial peptide from amphibian skin. *Eur. J. Biochem.* **263**, 921-927.
- Rai, M. and Padh, H. (2001). Expression system for production of heterologous proteins. *Current Science.* **80 (9)**: 1121-8.
- Reddi, H., Bhattacharya, A. and Kumar, V. (2002). The calcium-binding protein of *Entamoeba histolytica* as fusion partner for expression of peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **36**: 213-8.
- Sachdev, D. and Chirgwin, J. M. (1998). Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**: 933-7.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- Shen, S. –H. (1984). Multiple joined genes prevent product degradation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**: 4627-4631.
- Shih, Y-P., Kung, W-M., Chen, J-C., Yeh, C-H., Wang, A. H-J. and Wang, T.F. (2002). High-throughput screening of soluble recombinant proteins. *Protein Science.* **11**: 1714-9.
- Skosyrev, V. S., Kuleskiy, E. A., Yakhnin, A. V., Temirov, Y. V. and Vinokurov, L. M. (2002). Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expression and Purification.* **28**: 350-6.
- Sreerama, N.; Venyaminov, S.Y.; Woody, R.W. (1999) Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* **8**: 370-380.
- Stahl, S., Nilsson, J., Hober, S., Uhlén, M. and Nygren, P.-Ä. (1999). The Encyclopedia of bioprocesses technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation (Flickinger, M.C. and Drew, S. W., eds), 49-63.
- Stemmer, W. P. C., Crameri, A., Ha, K. D., Brennan, T.M. and Heyneken, H. L. (1995). Single – step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene.* **164**: 49-53.

- Studier, F. W., Rosenberg, A.H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct the expression cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89.
- Tanaka, M., Tanaka, T., Kijima, H., Itoh, J., Matsuda, T., Hori, S., Yamamoto, M. (2001). Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, Bradeion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**: 547-553.
- Tang, C., Loelinger, E., Kinde, I., Kyere, S., Mayo, K., Barklis, E., Sun, Y., Huang, M. and Summers, M. (2003). Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *J. Mol. Biol.* **327**: 1013-20.
- Toye, B., Zhong, G.M., Peeling, R. and Brunham, R.C. (1990). Immunologic characterization of a cloned fragment containing the species-specific epitope from the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* **58**: 3909-3913.
- Turner, B. and Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**: 1-32.
- Uhlen M., Forsberg G., Moks T., Hartmanis M., und Nilsson B. (1992) Fusion proteins in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **3**, 363-369.
- Uhlén, M., and Moks, T. (1990). Gene fusions for purpose of expression: an introduction. *Methods Enzymol.* **185**: 129-144.
- Venyaminov, S.Yu. & Yang, J.T. (1996). Determination of Protein Secondary Structure. In Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (Fasman, G:D., ed), pp. 69-75. Plenum Press, NY.
- Wang, C., Castro, A. F., Wilkes, D. M. and Altenberg, G. A. (1999). Expression and purification of the first nucleotide-binding domain and linker region of human multidrug resistance gene product: comparison of fusions to glutathione-S transferase, thioredoxin and maltose-binding protein. *Biochem. J.* **338**: 77-81.

- Wellens, T. E. and Howard, R. J. (1986). Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**: 6065-9.
- Williams, P. A. and Sayers, J. R. (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation. Biodegradation*. **5 (3-4)**: 195-217.
- Williams, R. W. & Weave, J. L. (1990) Secondary structure of substance P bound to liposomes in organic solvents and in solution from Raman and CD spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **265**, 2505-2513.
- Williamson, P.T. F., Roth, J. F., Haddingham, T. and Watts, A. (2000). Expression and Purification of Recombinant Neurotensin in *Escherichia coli*. *Protein Expression and purification*, **19**: 271-275.
- Woody, R., Berova, N. and Nakanishi, K. (1994). *Circular Dichroism: Principles and applications*. VCH publishers, NY, USA.
- Ye, Q-Z., Johnson, L. L., and Baragi, V. (1992). Gene synthesis and expression in *E. coli* for pump, a human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **186**: 143-149.
- Zaitseva, J., Zhang, H., Binnie, M., Hermodson, M. (1996). The proteins encoded by the *rbs* operon of *Escherichia coli*: I I. Use of chimeric protein constructs to isolate and characterize RbsC. *Prot. Sci.* **5**: 1100-1107.

Anexos

Seqüências de aminoácidos (totais ou parciais) utilizadas nas construções:

>Trx a, *Escherichia coli*

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLN
IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLLFKNGEVAATKVGALSCKGQLKEFLDANLA

>HRPII, *Plasmodium falciparum*

MAKNAKGLNLNKRLHETQAHVDDAHHAHHVADAHHAHHAADAHHAHHAADAHHAHHAAD
AHHAHHAADAHHAHHAAYAHHAHHAADAHHAHHAADAHHAHHAADAHHAHHAADAHHA
AHHAADAHHAHHAAGS

> ClCa (1-60) *Pseudomonas putida*

MDKRVAEVAGAIIVEAVRKILLDKRVTEAEYRAGVDYLTEVAQTRETALLLDVFLNSTII

>Fc (Fragmento 1-122 da Bradeiona β , *Homo sapiens*)

MDRSLGWQGNVSPEDRTEAGIKRFLEDDTDDGELSKFVKDAFSGNASCHPPEAKTWASRP
QVPEPRPQAPDLYDDDLEFRPPSRPQSSDNQQYFCAPAPLSPSARPRSPWGKLDPYDSSE
GS

>UBE2G2, *Homo sapiens*

MAGTALKRLMAEYKQLTLNPPEGIVAGPMNEENFFEWALIMGPEDTCFEFGVFPAILSF
PLDYPLSPPKMRFTCEMFHPNIYPDGRVCISILHAPGDDPMGYESSAERWSPVQSVEKIL
LSVVSMLAEPNDESGANVDASKMWRDDREQFYKIAKQIAQKSLGLGIEGR

>GST, *Schistosoma mansoni*

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKFELGLEFPNLPYYIDG
DVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDAFETLKV
DFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFK
KRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPR

>BbCi, *Bauhinia bauhinoides*

MSVILDTKGEVPSNAADAYYLVPVSHGEGGLALAKVGNEAEPKAVVLDPHHRPGLTVRFE
TPLAIAIITESFFLNIFVPSSSDSEVWDVSKQYPIGLAVKVTDTKSFVGPFRVEKEGEG
YKIVYYPDRGQTGLDIGLVHRNDKYLLAATEGEPFVFKIRKATYE

Glossário

AIDS: “*Acquired Immunodeficiency Syndrome*”, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CaBP: “*Calcium Binding Protein*”, proteína ligante à cálcio

CAP: “*Celulose Associated Protein*”, proteína associada a celulose

CAP-1: N-3- cloro-4- metilfenil)-N- { 2-[({ 5-[(dimetilamino) -metil]-2-furil} -metil)-sulfanil]-etil } urea

CBP: “*Calmodulin Binding Protein*”, proteína ligante a calmodulina

dNTPs: Dessoxirribonucleotídeo tri-fosfato

DTT: Ditionitrito

ELISA: “*Enzyme Linked Immunosorbance Assay*”

FAS: “*Fatty Acid Synthase*”, Gordurta Ácida Sintase de Cérebro Humano

Gb1: domínio Gb1 da proteína G

GFP: “*Green Fluorescent Protein*”, Proteína Fluorescente Verde

GST: Glutathione-S-transferase

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IPTG: Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo

Kb: Kilo bases

Lac: lactose

LB: Meio de Cultura Luria-Bertani

MBP: “*Maltose Binding Protein*”, proteína ligante a maltose

NAC: “*Nitrogen Assimilation Control*”, Proteína que controla a assimilação do Nitrogênio

Nus A: Proteína de fusão do pET43 que facilita a expressão solúvel de proteínas

Ob: “*Obelin*”, Obelina (fotoproteína luminescente ligante a cálcio)

ODNs: Oligodesoxirribonucleotídeos

Pb: Pares de bases

PBS: “*Phosphate Buffer Saline*”, Tampão Fosfato

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PIP2 :fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

RT-PCR: “Reverse transcriptase-PCR”

TAE: Tampão de Eletroforese:Tris, Ácido Acético, EDTA

TFA: Ácido Trifluoroacético

Trx :Tiorredoxina

ZZ : duplo domínio Z da proteína A