

Adriana Rodrigues Alves

Investigação da Relação entre Estrutura e
Função em uma Fosfolipase Pla2 Utilizando
Mutagênese Sítio-Dirigida





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP.

ADRIANA RODRIGUES ALVES

**INVESTIGAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E FUNÇÃO
EM UMA FOSFOLIPASE PLA_2 UTILIZANDO MUTAGÊNESE
SÍTIO-DIRIGIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Física, Área de Concentração em Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.



São José do Rio Preto - SP

1996



Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do
Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio
financeiro da FAPESP.

Orientador: Prof. Dr. Richard John Ward

Co-orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto



Dedico este trabalho

A *Arino Rodrigues Alves e Clarice Teixeira Rodrigues*
Alves, meus pais, que me incentivaram sempre, em todos os aspectos
da vida.

Aos meus queridos irmãos *Andréa e Júnior*, meu cunhado
Carlinhos, meu avô "Juca"

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio
financeiro da FAPESP e FUNDUNESP.

Dedico este trabalho

A *Arino Rodrigues Alves* e *Clarice Teixeira Rodrigues Alves*, meus pais, que me incentivaram sempre, em todos os aspectos da vida.

Aos meus queridos irmãos *Andréa* e *Júnior*, meu cunhado *Carlinhos*, meu avô "*Juca*"

e, especialmente ao meu pequeno *Caíque*, símbolo de vida, de alegria e de esperança e a "alguém" muito especial.

AGRADECIMENTOS

Com carinho especial ao Prof.Dr. Richard John Ward pela orientação dedicada, realizando a análise deste trabalho com dedicação e rigor, o que permitiu sua continuidade, e por todos os momentos de auxílio, amizade e atenção.

Ao brihante mestre e amigo Prof.Dr. João Ruggiero Neto, pela orientação dedicada e cujo exemplo de postura científica sempre me estimulou.

Ao Prof.Dr. Márcio Francisco Colombo, Coordenador do Curso de Pós-Graduação, pelas noções acadêmicas sobre Biofísica Molecular, pela colaboração prestativa no decorrer deste trabalho e pela amizade.

Ao Prof.Dr. Marcelo F. **“Nascer, viver, morrer, renascer ainda
e progredir continuamente, esta é a Lei”.**

Ao Prof.Dr. José Ruggiero, pelas noções acadêmicas *Allan Kardec*

Molecu

Aos Prof.Dr. Johnny Rizzieri Olivieri e Elso Drigo Filho, pela amizade e colaboração em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Com carinho especial ao Prof.Dr. **Richard John Ward** pela orientação dedicada, realizando a análise deste trabalho com dedicação e rigor, o que permitiu sua continuidade, e por todos os momentos de auxílio, amizade e atenção.

Ao brihante mestre e amigo Prof.Dr. **João Ruggiero Neto**, pela orientação dedicada e cujo exemplo de postura científica sempre me estimulou.

Ao Prof.Dr. **Márcio Francisco Colombo**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação, pelas noções acadêmicas sobre Biofísica Molecular, pela colaboração prestativa no decorrer deste trabalho e pela amizade.

Ao Prof.Dr. **Marcelo Fossey** pelo carinho e incentivo constantes durante o decorrer de minha permanência neste departamento.

Ao Prof.Dr. **José Ruggiero**, pelas noções acadêmicas sobre Biofísica Molecular e pela afetuosa amizade.

Aos Prof^ª.Dr^ª. **Johnny Rizzieri Olivieri** e **Elso Drigo Filho**, pela amizade e colaboração em todos os momentos.



Aos demais professores do Departamento de Física, meu carinho e gratidão, pelo gostoso convívio e amizade.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. **Maria Tercília Vilella A. de Oliveira** e **Eloísa Helena Tajara da Silva**, do Departamento de Biologia, pela amizade e pela colaboração prestativa na análise deste trabalho.

Aos técnicos Antônio "**Barbosa**" e "**Paulinho**" Salinas, à secretária Ilva, à Toninha, D. Cida, D. Luíza, Heldes e Francisca, pela amizade e auxílio em todos os momentos.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação, aos funcionários do Pólo Computacional, especialmente ao **José Maria** e ao **Prof. Nicola**, pela presteza na realização das diversas tarefas que desempenham.

Aos meus queridos amigos **Fátima**, **Uderlei**, **Raquel**, "**Mac**" **Alexandre**, **André**, **Flávio**, **Osmar**, **Bernadete**, **Artur**, **Benatti** e **Renato**, pelo companheirismo, carinho e dedicação constantes, sem os quais este trabalho não seria possível.

Aos queridos professores do Departamento de Biologia, **Ana Maria**, **Orlando**, **Eliana** e **Marileila**, pelo grande exemplo profissional, pela amizade e pelo incentivo constante.



Aos demais e não menos importantes colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo ambiente de trabalho saudável e pela convivência harmoniosa.

À toda minha querida família e a todos os meus verdadeiros amigos, que tornaram minha estadia nesta vida uma vivência de força, companheirismo e amor.

A Deus, pela vida!

Pág. 10

Figura 4: *Bothrops asper* na forma monomérica. Pág. 18

Figura 5: Miotoxina II de *Bothrops asper*, evidenciando os resíduos Glu-12 (E12), Trp-77 (W77) e Lys 80 (K80), envolvidos na formação das pontes de hidrogênio e responsáveis pela manutenção e estabilização da forma dimérica. Pág. 19

Figura 6: Frequência de aminoácidos nas posições 5, 102 e 106 dos grupos I e II de PLA₂s e PLA₂s Lys-49. Pág. 23

Figura 7: Frequência de aminoácidos nas posições 28, 32 e 49 dos grupos I e II de PLA₂s e PLA₂s Lys-49. Pág. 24

Figura 8: Estratégias utilizadas para a clonagem do gene da Btxtx I (BTX I) no vetor de expressão pTM2-2, utilizando a linhagem de expressão de *E.coli* BL21(DE3)[pLysS]. Pág. 39

Figura 9: Estratégia de clonagem utilizada para o vetor de expressão pTM2-2. Pág. 40

Figura 10: Cromatograma obtido de filtração em gel com a resina Sephacryl S1000 (Pharmacia), obtido após extração de DNA do pTM2-2. Pág. 42

ÍNDICE DAS FIGURAS

- Figura 1:** Sítios de ação das fosfolipases. **Pág. 1**
- Figura 2:** Alinhamento de sequências de aminoácidos de PLA₂s. **Pág. 6**
- Figura 3:** Representação da alça de ligação de cálcio de uma PLA₂ cataliticamente ativa (PLA₂ de *Naja naja naja*) e de uma PLA₂ cataliticamente inativa (miotoxina II de *Bothrops asper*). **Pág. 10**
- Figura 4:** *Bothrops asper* na forma monomérica. **Pág. 18**
- Figura 5:** Miotoxina II de *Bothrops asper*, evidenciando os resíduos Glu-12 (E12), Trp-77 (W77) e Lys 80 (K80), envolvidos na formação das pontes de hidrogênio e responsáveis pela manutenção e estabilização da forma dimérica. **Pág. 19**
- Figura 6:** Frequência de aminoácidos nas posições 5, 102 e 106 dos grupos I e II de PLA₂s e PLA₂s Lys-49. **Pág. 23**
- Figura 7:** Frequência de aminoácidos nas posições 28, 32 e 49 dos grupos I e II de PLA₂s e PLA₂s Lys-49. **Pág. 24**
- Figura 8.** Estratégias utilizadas para a clonagem do gene da Bttx I (*BTX I*) no vetor de expressão pTM2-2, utilizando a linhagem de expressão de *E.coli* BL21(DE3)[pLysS]. **Pág. 39**
- Figura 9:** Estratégia de clonagem utilizada para o vetor de expressão pTM2-2. **Pág. 40**
- Figura 10:** Cromatograma obtido de filtração em gel com a resina Sephacryl S1000 (Pharmacia), obtido após extração de DNA do pTM2-2. **Pág. 42**

Figura 11: Análise das frações obtidas da purificação do DNA de pTM2-2, resultante da filtração em gel com a resina Sephacryl S1000, através de gel de agarose 1,5%. **Pág. 43**

Figura 12: Estratégia de clonagem envolvendo a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a *BTX I*. **Pág. 48**

Figura 13: Análise da transformação da construção do vetor de expressão da *BTX I* realizada na linhagem DH5 α . **Pág. 55**

Figura 14: Diagrama da mutagênese sítio-dirigida, utilizando os oligonucleotídeos USE. **Pág. 57**

Figura 15: Estratégia utilizada na reação de mutagênese sítio-dirigida, utilizando os oligonucleotídeos BTXC2 e BTXN2. **Pág. 58**

Figura 16: Análise da reação de mutagênese sítio-dirigida. **Pág. 61**

Figura 17: Construção final do vetor de expressão pTM2-2 + *BTX I*. **Pág. 62**

Figura 18: Análise da expressão da *BTX I* em gel de poliacrilamida PAGE-SDS 15%. **Pág. 68**

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1: Grupos de Fosfolipases A₂. Os grupos I, II e III bem como os subgrupos, são definidos por diferenças sequenciais, e o grupo IV apresenta uma sequência distinta. **Pág. 4**

Tabela 2. Aminoácidos característicos para a subfamília de PLA₂s Lys-49. **Pág. 17**

Tabela 3. Análise da propriedade e do tamanho residual predominantes para as 3 regiões designadas. **Pág. 22**

Tabela 4. Distâncias das pontes de hidrogênio entre os resíduos envolvidos na dimerização da molécula. **Pág. 26**

Tabela 5. Programa utilizado na reação de PCR para a amplificação do gene da *BTX I* de *Bothrops jararacussu* (*BTX I*). **Pág. 49**

Tabela 6. Condições utilizadas para as reações de ligação. **Pág. 52**



ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Estrutura e Função de Fosfolipases A ₂ (PLA ₂ s)	1
I.2. As PLA ₂ s dos Grupos I e II	5
I.3. A Subfamília de PLA ₂ s Lys-49	11
II. OBJETIVOS	14
III. ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEQUÊNCIAS DE PLA ₂ s Lys-49	15
III.1. Material e Métodos	15
III.2. Resultados	16
III.3. Análise dos Resultados	26
IV. A BOTROPSTOXINA I DE <i>Bothrops jararacussu</i> : UM MODELO DA SUBFAMÍLIA DE PLA ₂ s Lys-49	30
IV.1. Expressão de PLA ₂ s Recombinantes	32
IV.1.1. Os Vetores de Expressão pET	34
IV.1.2. O Vetor de Expressão pTM2-2	36
V. MATERIAL E MÉTODOS	38
V.1. Manutenção das Culturas de <i>E.coli</i>	38
Estratégias de Clonagem e Expressão	39
V.2. Preparação do Vetor de Expressão pTM2-2	40
V.2.1. Extração de DNA	41
V.2.2. Digestão do Vetor com Enzimas de Restrição	44



V.2.3. Purificação do Vetor	44
V.2.4. Fosforilação do Vetor	45
V.3. Preparação do Inseto da <i>BTX I</i> : A PCR da <i>BTX I</i>	47
V.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	48
V.3.2. Tratamento com a FPLCpure® Klenow DNA	
Polimerase I	50
VI. LIGAÇÃO DOS DNAS	52
VI.1. Metodologia e Resultados	52
VII. SELEÇÃO DE CLONES	53
VII.1. Metodologia e Resultados	53
Mutagênese Sítio-Dirigida para Eliminação de Sítios Únicos	56
VIII. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA	63
VIII.1. Discussão	68
IX. CONCLUSÃO	72
X. RESUMO	74
XI. SUMMARY	77
XII. ANEXOS	79
XIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

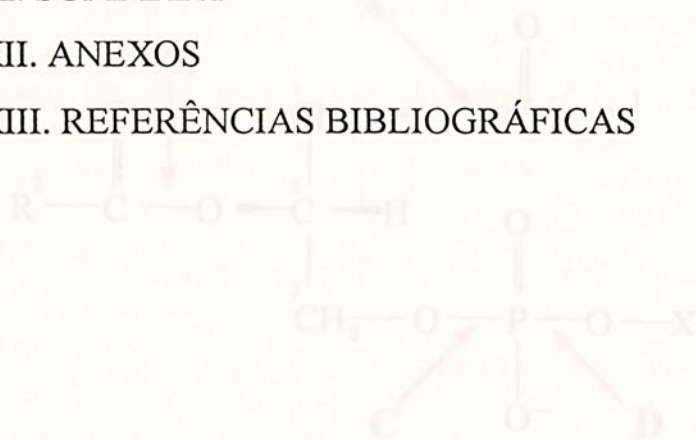


Figura 1: Sítios de ação das fosfolipases. R^1 e R^2 referem-se aos ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-2 dos fosfolipídios numerados estereoespecificamente. X refere-se aos grupos polares, sendo que os mais comuns são a colina, a etanolamina, a serina, o inositol e o glicerol.

I.INTRODUÇÃO

I.1. ESTRUTURA E FUNÇÃO DE FOSFOLIPASES A₂ (PLA₂s)

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) (E.C.3.1.1.4) são enzimas pequenas e estáveis que catalisam a hidrólise da ligação éster na posição *sn*-2 de um fosfolipídio, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios (Hanahan, D.J., 1971; Dennis, E.A., 1983) de acordo com o esquema mostrado na figura 1.

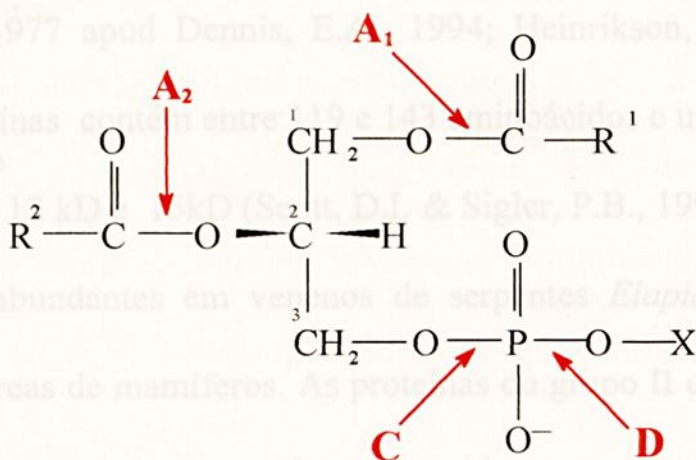


Figura 1: Sítios de ação das fosfolipases. R¹ e R² referem-se aos ácidos graxos nas posições *sn*-1 e *sn*-2 dos fosfolipídios numerados estereoespecificamente. X refere-se aos grupos polares, sendo que os mais comuns são a colina, a etanolamina, a serina, o inositol e o glicerol.

Este grande grupo de proteínas possui aspectos funcionais distintos, ou seja, manifestam alta atividade funcional para os lipídios em agregados micelares e lamelares, em membranas ou ainda, em interfaces água-lipídio (Ramirez, F. & Jain, M.K., 1991) e apresentam o íon cálcio (Ca^{2+}), como um requerimento essencial para a catálise, mesmo encontrando-se fracamente ligado ($K_d > 10^{-4}$ M) (Dennis, E.A., 1983; Scott, D.L. *et al.*, 1992; Scott, D.L. & Sigler, P.B., 1994).

As PLA₂s encontram-se amplamente distribuídas na natureza, tanto intra como extracelularmente. Apresentam um alto grau de homologia e estão divididas basicamente em quatro grupos com base na homologia das sequências dos aminoácidos (Renetseder, R. *et al.*, 1985; Heinrikson, R.L. *et al.*, 1977 apud Dennis, E.A., 1994; Heinrikson, R.L., 1991). Todas estas proteínas contêm entre 119 e 143 aminoácidos e um peso molecular variando entre 12 kD e 15kD (Scott, D.L. & Sigler, P.B., 1994). As enzimas do grupo I são abundantes em venenos de serpentes *Elapidae* e *Hydrophyidae* e em pâncreas de mamíferos. As proteínas do grupo II estão presentes em venenos de serpentes de *Crotalidae* e *Viperidae* e se encontram em uma variedade de tipos celulares, incluindo plaquetas, mucosa gástrica e endotélio vascular. Estão envolvidas ainda em vários processos celulares, como a mudança fosfolipídica para manter a integridade estrutural da membrana celular, e a



liberação de ácido aracdônico. O ácido aracdônico está presente num passo intermediário da síntese de prostaglandinas, leucotrianos e tromboxanas, relacionados com a iniciação e a propagação de processos inflamatórios (Van den Bosch, H., 1980 apud Van den Bosch, H. *et al.*, 1993; Kudo, I. *et al.*, 1993; Dennis, E.A., 1994). As PLA₂s do grupo III incluem enzimas de venenos evolutivamente divergentes, presentes em venenos de abelhas (*Apis mellifera*) e lagartos. O grupo IV apresenta enzimas identificadas em uma variedade de células; com características distintas das demais. Incluem PLA₂s intracelulares de peso molecular 85 kD, dependentes de Ca²⁺ que, neste caso, é específico para o ácido aracdônico (Mayer, R.J. & Marshall, L.A., 1993; Dennis, E.A., 1994). Recentemente, um novo grupo foi proposto (grupo V), e está representado pelas PLA₂s intracelulares Ca²⁺-independentes, enzimas estas purificadas do miocárdio canino (Wolf, R.A. & Gross, R.W., 1985; Hazen, S.L. *et al.*, 1990 apud Dennis, E.A., 1994). As sequências destas PLA₂s fornecem diferenças únicas, distinguindo-as daquelas do grupo IV (Dennis, E.A., 1994). A Tabela 1 compara as características básicas de cada um destes grupos.



Tabela 1: Grupos de Fospolipases A₂. Os grupos I, II e III bem como os subgrupos, são definidos por diferenças sequenciais, e o grupo IV apresenta uma sequência distinta.

Fonte	Localização	Peso Molecular (kD)	Nível de Requerimento de Ca ²⁺
Grupo I A. Venenos de <i>Elapidae</i> e <i>Hydrophyidae</i> . B. Suco pancreático humano e de porco.	Extracelular	13-15	mM
Grupo II: Venenos de <i>Crotalidae</i> e <i>Viperidae</i> ; plaquetas e líquido sinovial humanos.	Intracelular e Extracelular	13-15	mM
Grupo III: Venenos de abelhas e lagartos	Extracelular	16-18	mM
Grupo IV: Inflamações, rim de rato e plaquetas humanas	Intracelular	85	μM
Grupo V: Miocárdio canino e humano	Intracelular	40	Ausente



Com relação à atividade catalítica, um grande número de PLA₂s dos grupos I e II exibem ação farmacológica e, de acordo com os efeitos fisiopatológicos que induzem, podem ser distribuídas em dois grandes grupos. O primeiro deles está representado pelos venenos de *Elapidae* e *Hydrophyidae* e são altamente neurotóxicos, causando paralisia flácida e podendo também levar à morte por paralisia respiratória. Os venenos de *Crotalidae* e *Viperidae* caracterizam o segundo grupo e induzem efeitos sistêmicos locais, incluindo hemorragia, necrose, edema e alterações na coagulação do sangue, no entanto, não causam efeitos neurotóxicos pronunciados, tais como a hipotonia muscular, a paralisia flácida da face, do pescoço, membros, tronco, laringe, faringe e músculos do sistema respiratório (Ohsaka, A., 1979). A base estrutural destas propriedades não são conhecidas.

1.2. AS PLA₂s DOS GRUPOS I E II

As sequências de aminoácidos de um grande número de PLA₂s dos grupos I e II, estão disponíveis no banco de dados de sequências de proteínas (SwissProt and Brookhaven Protein Databases). A figura 2 evidencia um alinhamento das sequências de aminoácidos de algumas fosfolipases.



ABREVIATURAS UTILIZADAS NA FIGURA 2

- Pa21_LATSE: PLA₂ (isoenzima I) de *Laticauda semifasciata*.
Pa22_LATCO: PLA₂ (isoenzima II) de *Laticauda colubrina*.
Pa2H_LATCO: PLA₂ (homóloga I - PLH-I) de *Laticauda colubrina*.
Pa2A_PSEPO: PLA₂ de *Pseudechis porphyriacus*.
Pa29_PSEAU: PLA₂ (isoenzima PA-9C) de *Pseudechis australis*.
Pa21_OXYSC: PLA₂ (cadeia α da taipoxina) de *Oxyuranus scutellatus scutellatus*.
Pa21_PIG: PLA₂ (isoenzima precursora maior) de *Sus scrofa*.
Pa2_BOVIN: PLA₂ (isoenzima precursora) de *Bos taurus*.
Pa2_HORSE: PLA₂ de *Equus caballus*.
Pa26_BUNFA: PLA₂ (isoenzima VI - toxina VI) de *Bungarus fasciatus*.
Pa2_NAJPA: PLA₂ (nigexina) de *Naja pallida*.
Pa22_NAJME: PLA₂ (isoenzima DE-II) de *Naja melanoleuca*.
Pa2M_HUMAN: PLA₂ (enzima precursora associada a membrana) de *Homo sapiens*.
Pa2M_RAT: PLA₂ (enzima precursora associada a membrana) de *Ratus norvegicus*.
Pa2B_CRODU: PLA₂ (enzima precursora CB1- cadeia básica da crotoxina) de *Crotalus durissus terrificus*.
Pa2N_CROSS: PLA₂ de *Crotalus scutulatus scutulatus*.
Pa21_AGKHP: PLA₂ acídica de *Agkistrodon halys pallas*.
Pa2Y_TRIFL: PLA₂ (isoenzima PL-X') de *Trimeresurus flavoviridis*.
Pa21_TRIGA: PLA₂ (isoenzima I) de *Trimeresurus gramineus*.
Pa22_AGKHA: PLA₂ acídica de *Agkistrodon halys blomhoffi*.
Pa24_VIPRF: PLA₂ precursora RV-4 de *Vipera russelli formosensis*.
Pa21_ERIMA: PLA₂ (isoenzima PLA₁) de *Eristocophis macmahoni*.
Pa2_CERCE: PLA₂ de *Cerastes cerastes*.
Pa2_BITCA: PLA₂ (caudoxina) de *Bitis caudalis*.
Pa2B_TRIMU: PLA₂ básica (TMV-K49) de *Trimeresurus mucrosquamatus*.
Pa2B_TRIFL: PLA₂ (precursora básica) de *Trimeresurus flavoviridis*.
Pa22_BOTAS: PLA₂ homóloga (mtx II) de *Bothrops asper*.
Pa2H_AGKPI: PLA₂ homóloga (App-K49) de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*.
BttxI: PLA₂ homóloga de *Bothrops jararacussu*.
B. Godmani: PLA₂ homóloga de *Bothrops godmani*.

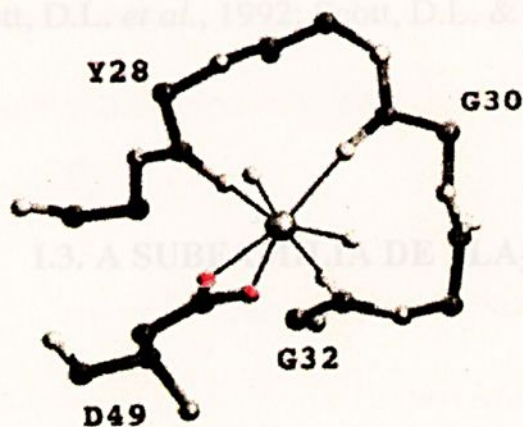
As PLA₂s dos grupos I e II foram comparadas de acordo com a numeração de homologia padrão representada pela PLA₂ pancreática bovina e apresentam certas particularidades estruturais que as caracterizam distintamente, entre elas, as diferenças relacionadas com as posições das pontes dissulfeto. O grupo I apresenta uma ponte dissulfeto entre os resíduos Cys-11 e Cys-77 que, no entanto, está ausente no grupo II, possuindo uma ligação alternativa entre os resíduos Cys-51 e Cys-133. O grupo I ainda apresenta na região compreendida entre os resíduos 52 a 65, uma inserção de 2 a 3 aminoácidos denominada alça elapídica. Nas PLA₂s do grupo I presentes no pâncreas de mamíferos, esta extensão é de 5 aminoácidos e é denominada alça pancreática. Estas alças estão ausentes nas PLA₂s do grupo II porém, apresentam uma extensão de 5 a 7 aminoácidos na região C-terminal, que se liga à proteína através da ponte dissulfeto entre os resíduos Cys-51 e Cys-133 mencionada acima (Arni, R.K. & Ward, R.J., 1996) (Figura 2). No estado cristalino, tanto o grupo I como o grupo II possui uma estrutura com 50% de α -hélice e 10% de β -folha pregueada (Scott, D.L. *et al.*, 1992; Arni, R.K. & Ward, R.J., 1996).

O resíduo de ácido aspártico (ou aspartato) na posição 49 (Asp-49), que é absolutamente conservado nas PLA₂s cataliticamente ativas, desempenha uma função central na catálise. Este contribui com dois átomos de oxigênios



carboxilados para a formação da armadilha de ligação de cálcio, caracterizada ainda pela presença de três átomos de oxigênio da cadeia principal da proteína (região envolvendo os resíduos 25 a 33 da alça de ligação de cálcio) e duas moléculas de água estruturalmente conservadas, completando assim a coordenação da esfera do íon cálcio e formando uma bipirâmide pentagonal (Liu, S.Y., 1990 apud Scott, D.L., 1992). Análises por cristalografia de raio-X da PLA₂ bovina mostraram que na região da alça de ligação de cálcio, o íon Ca²⁺ se encontra ligado aos grupos carbonis dos resíduos Tyr-28, Gly-30 e Gly-32 (Francis, B. *et al.*, 1991) (Figura 3a), sendo que os resíduos de glicina conferem a esta região a flexibilidade conformacional necessária para que os três átomos de oxigênio da cadeia principal contribuam para a estabilização do íon cálcio.

(a)



(b)

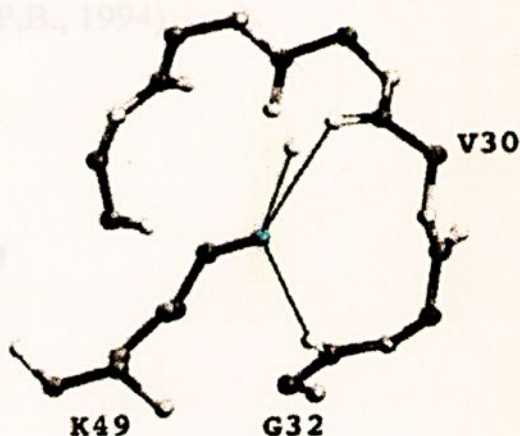


Figura 3: Representação da (a) alça de ligação de cálcio de uma PLA₂ cataliticamente ativa (PLA₂ de *Naja naja naja*). O íon cálcio, representado por uma esfera, está localizado centralmente formando as seguintes ligações: com o oxigênio do grupo carbonil do resíduo Asp-49 (D49), com 3 átomos de oxigênio da cadeia principal e com 2 moléculas de água. (b) A mesma região é mostrada para uma PLA₂ cataliticamente inativa representada pela miotoxina II de *Bothrops asper*. O grupo δ-amino da Lys-49 ocupa a posição do íon cálcio, formando duas ligações com os átomos de oxigênio dos grupos carbonis e uma ligação com uma única molécula de água. (Figura gentilmente cedida por Arni, R.K. e Ward, R.J.).

Os resíduos incluídos no domínio de ligação de cálcio das PLA₂s Asp-49 são altamente conservados (Arni, R.K. & Ward, R.J., 1996). A armadilha catalítica forma-se através de ligações de hidrogênio e também apresenta resíduos invariáveis caracterizados pela His-48, Tyr-52, Tyr-73 e Asp-99

(Scott, D.L. *et al.*, 1990). Foi sugerido através de estudos mutacionais, que a função primária destas tirosinas é fornecer suporte estrutural para o sítio ativo (Scott, D.L. *et al.*, 1992; Scott, D.L. & Siegler, P.B., 1994).

I.3. A SUBFAMÍLIA DE PLA₂s Lys-49

As PLA₂s miotóxicas danificam músculos e encontram-se presentes em uma variedade de venenos de serpentes. São PLA₂s que além de miotoxicidade, podem exercer outras atividades farmacológicas, como por exemplo, os efeitos anticoagulante, neurotóxico, cardiotoxico e inflamatório (Chang, C.C., 1979; Harris, J.B. *et al.*, 1980; Rosenberg, P., 1990 apud Díaz, C., 1991). Várias PLA₂s miotóxicas foram isoladas de venenos de espécies *Bothrops*. Algumas são ativas enzimaticamente, como a miotoxina I de *Bothrops asper*, miotoxina III de *Bothrops asper* e miotoxina de *Bothrops atrox*. Há ainda um grupo de miotoxinas que perderam ou possuem atividade fosfolipásica extremamente baixa. Este grupo consiste da botropstoxina I de *Bothrops jararacussu*, miotoxina básica de *Bothrops nummifer*, miotoxina I de *Bothrops moojeni* e miotoxina II de *Bothrops asper*. As sequências de várias proteínas estão contidas em bancos de dados e são objeto de intensa



investigação. O alinhamento de todas as sequências disponíveis de PLA₂s revelaram que nas PLA₂s dos venenos de serpentes dos grupos I e II, o resíduo aspartato na posição 49 (Asp-49), que se pensava ser invariável, está trocado por um resíduo lisina (Lys-49) (Francis, B. *et al.*, 1991; Rufini, S. *et al.*, 1992).

Determinações recentes das estruturas de raios-X da PLA₂ Lys-49 da miotoxina II de *Bothrops asper* (Arni, R. K. *et al.*, 1995a) e de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Scott, D.L. *et al.*, 1992) mostraram que o grupo δ -amino da Lys-49 ocupa o sítio de ligação de cálcio, resultando na perda da atividade catalítica nestas fosfolipases (Figura 3b). Embora inativos cataliticamente, apresentam atividade citolítica (Lomonte, B. *et al.*, 1994) e destroem a integridade dos lipossomos de membranas sintéticas por um processo independente de cálcio (Rufini, S. *et al.*, 1992). A perda ou redução da atividade fosfolipásica na miotoxina II pode ser devida à presença de asparagina (Asp) na posição 28, leucina (Leu) na posição 32 e lisina (Lys) na posição 49. Nas proteínas que expressam atividade fosfolipásica A₂, estas posições altamente conservadas, são ocupadas pela tirosina, glicina e aspartato, respectivamente (Francis, B. *et al.*, 1991). A miotoxina II de *Bothrops asper*, é uma PLA₂ Lys-49 com atividade catalítica extremamente baixa (0,2 $\mu\text{mol. ácidos graxos.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) (Díaz, C. *et al.*, 1991). As



mutações sítio-dirigidas em PLA₂ de porco indicam que a substituição Asp-49-Lys que mimetiza a mudança observada na proteína do veneno de cobra, reduziu a atividade específica por um fator de 25.000 vezes (Van den Bergh, A. *et al.*, 1988; Van den Bergh, A. *et al.*, 1989).

O alto grau de homologia sequencial apresentado pelas PLA₂s distinguindo-as em grupos específicos, bem como o fato de que algumas modificações residuais em posições específicas estão intimamente ligadas à sua atividade funcional, é que motivaram o trabalho em questão, cujas propostas são as seguintes:

1) Avaliação dos efeitos das mutações pontuais específicas das PLA₂s Lys-49, através da análise das seqüências de aminoácidos de várias PLA₂s dos grupos I e II e,

2) Estabelecimento de um sistema de expressão para a botropstoxina I de *Bothrops jararacussu*, uma PLA₂-Lys-49 utilizando a linhagem de expressão *E.coli* BL21(DE3)[pLysS].



II. OBJETIVOS

O alto grau de homologia sequencial apresentado pelas PLA₂s distinguindo-as em grupos específicos, bem como o fato de que algumas modificações residuais em posições específicas estão intimamente ligadas à sua atividade funcional, é que motivaram o trabalho em questão, cujas propostas são as seguintes:

1) Avaliação dos efeitos das mutações pontuais específicas das PLA₂s Lys-49, através da análise das seqüências de aminoácidos de várias PLA₂s dos grupos I e II e,

2) Estabelecimento de um sistema de expressão para a botropstoxina I de *Bothrops jararacussu*, uma PLA₂-Lys-49 utilizando a linhagem de expressão *E.coli* BL21(DE3)[pLysS].



III. ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEQUÊNCIAS DE PLA₂s Lys-49

III.1. MATERIAL E MÉTODOS

Com o objetivo de avaliarmos os efeitos das mutações pontuais específicas nas PLA₂s Lys-49 foi realizada a análise de 76 sequências de PLA₂s dos grupos I e II, contidas em bancos de dados de proteínas (SwissProt and Brookhaven Protein Databases). Esta pesquisa computacional foi feita com a utilização do programa PILEUP de agrupamento de programas GCG, sendo posteriormente analisado através do programa MDSA (Multi Dimensional Sequence Analysis) (Ward, R. J. & Casari, G. - EMBL, não publicado). Este último programa utiliza o método de comparação algorítmica multidimensional para um grupo de sequências, de acordo com os resíduos de aminoácidos conservados neste grupo. O programa possibilita ainda a identificação de aminoácidos específicos para um grupo ou para uma família



de proteínas. A variabilidade existente no alinhamento das sub-famílias dos grupos I e II para cada posição de aminoácido, em cada uma das regiões definidas, também foi avaliado. Para esta finalidade foi desenvolvido em nosso laboratório, um programa estatístico (Ward, R.J., 1995 - não publicado) denominado "ANPOS" (ANálise de POSição), cuja função consiste em analisar a quantidade presente de cada tipo de aminoácido numa determinada posição, dentro das sequências presentes no alinhamento. Pudemos assim, analisar tanto quantitativamente, como qualitativamente, a variabilidade residual existente no alinhamento das PLA₂s estudadas.

III.2. RESULTADOS

Os aminoácidos característicos da subfamília Lys-49 (Alves, A.R. *et al.*, 1995) foram determinados (tabela 2) e esta análise forneceu fundamentos básicos para a correlação da presença destes resíduos com a função desempenhada.



Tabela 2. Aminoácidos característicos para a subfamília de PLA₂s Lys-49.

	Subfamília Lys-49
Resíduos	Leu-5 Glu-12 Asn-28 Lys-49 Lys-53 Lys-71 Trp-77 Lys-80 Glu-87 Val-102 Leu-106

Através do programa MOLSCRIPT (Kraulis, P. J., 1991), foram geradas imagens da estrutura da miotoxina II de *Bothrops asper* (Arni, R.K. *et al.*, 1995a), tanto na forma monomérica como na forma dimérica. Pudemos observar e definir algumas regiões na proteína, tais como o centro hidrofóbico, o sítio de ligação de cálcio, os resíduos da superfície da proteína envolvidos com o contato de membrana e a região de interface do dímero (Figura 4). Os resíduos envolvidos nas pontes de hidrogênio entre as duas moléculas da proteína (distância compreendida entre 2,5 Å e 3,5 Å) (Baker, E.N., 1984), e que conferem estabilidade à esta conformação, são o Glu(E)12, o Trp(W)77 e a Lys(K)80 (Figura 5).

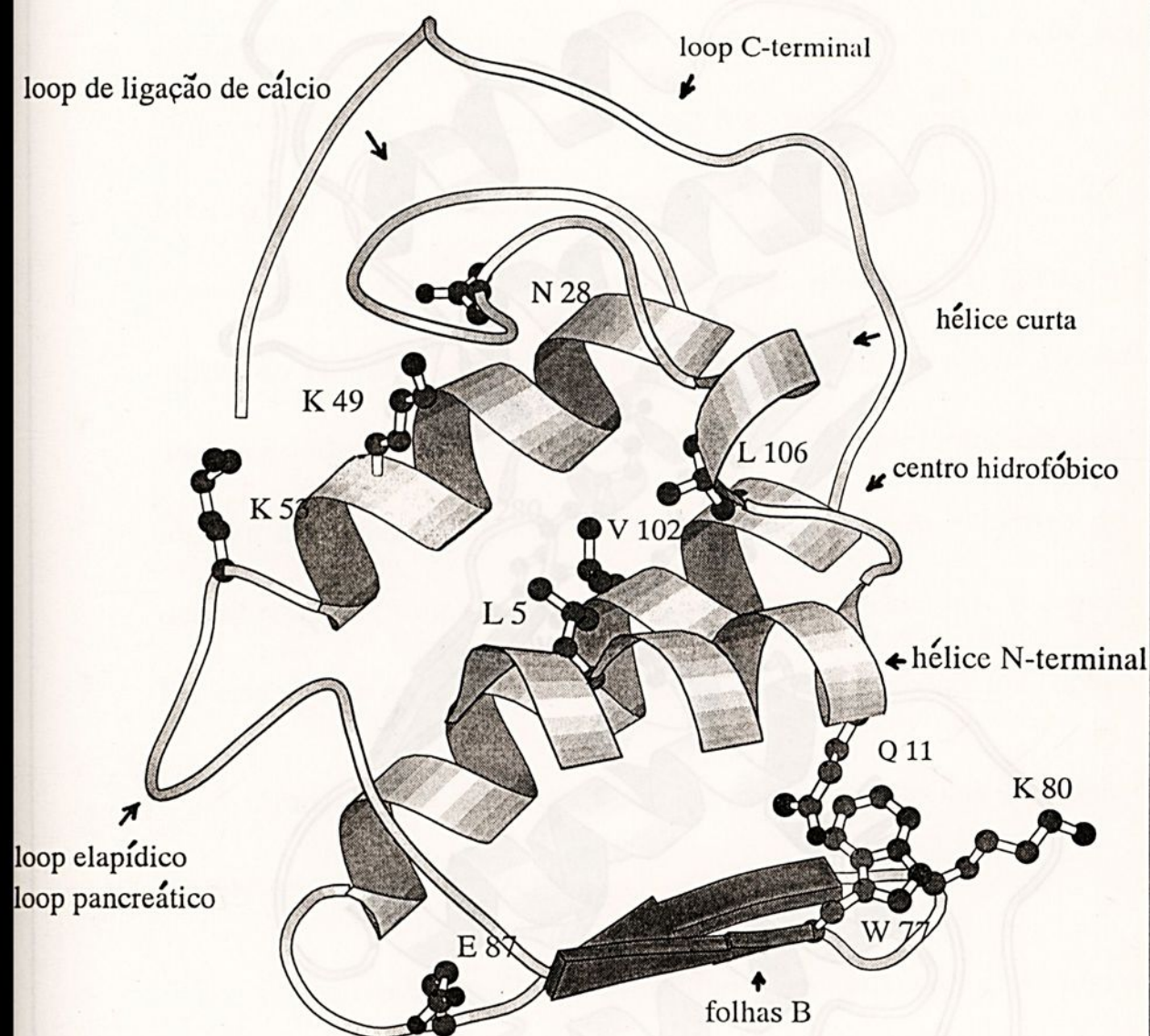


Figura 4: *Bothrops asper* na forma monomérica. Alguns resíduos específicos da subfamília Lys-49, estão evidenciados na figura, tais como os resíduos Leu-5 (L5), Glu-12 (E12), Asn-28 (N28), Lys49 (K49), Lys-53 (K53) e Trp-77 (W77). As regiões caracterizadas para a proteína também são mostradas.

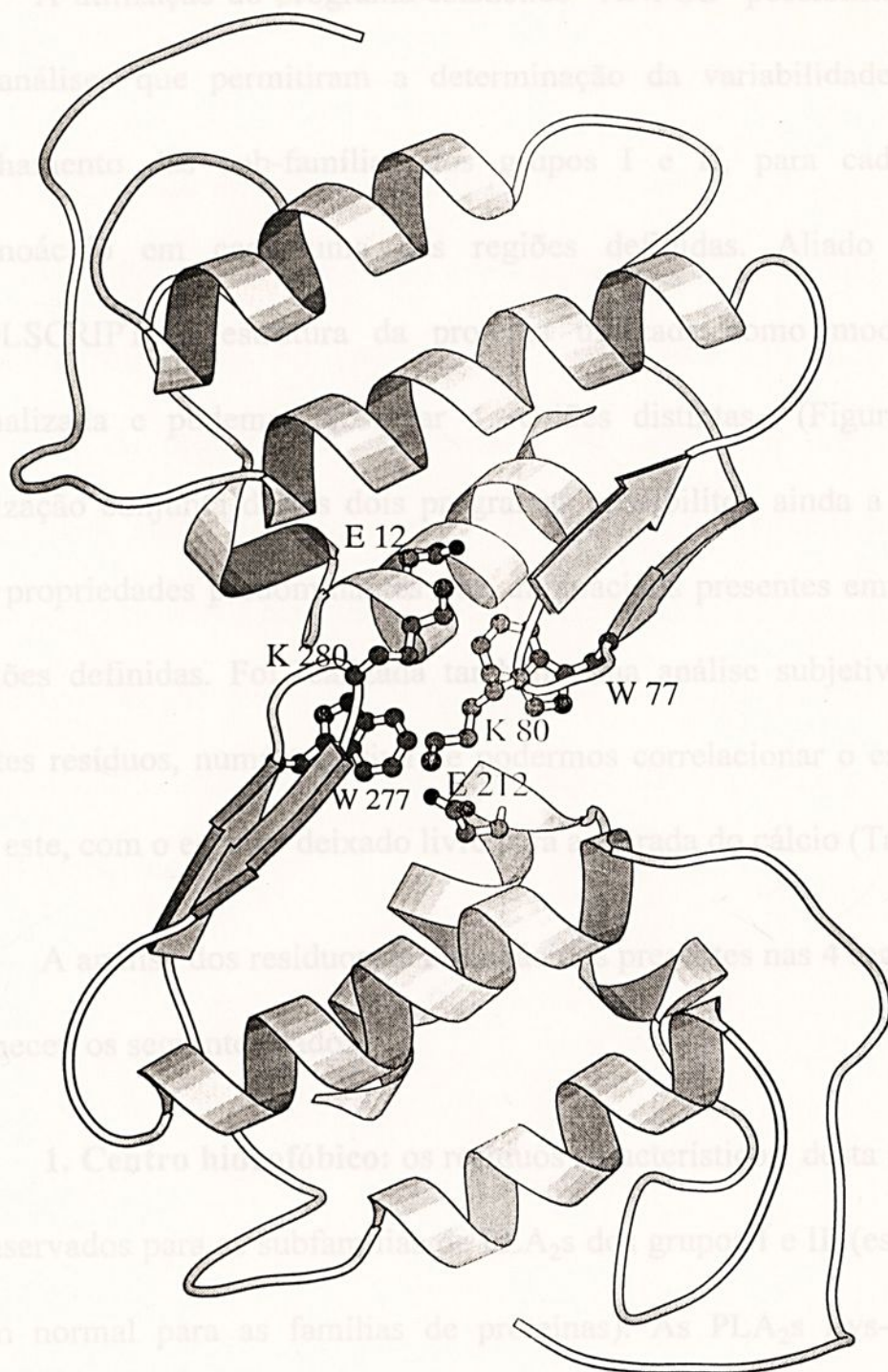


Figura 5: Miotoxina II de *Bothrops asper*, evidenciando os resíduos Glu-12 (E12), Trp-77 (W77) e Lys 80 (K80), envolvidos na formação das pontes de hidrogênio e responsáveis pela manutenção e estabilização da forma dimérica.

A utilização do programa estatístico "ANPOS" possibilitou vários tipos de análises que permitiram a determinação da variabilidade existente no alinhamento das sub-famílias dos grupos I e II, para cada posição de aminoácido em cada uma das regiões definidas. Aliado ao programa MOLSCRIPT, a estrutura da proteína utilizada como modelo pôde ser visualizada e pudemos observar 4 regiões distintas (Figuras 4 e 5). A utilização conjunta destes dois programas possibilitou ainda a caracterização das propriedades predominantes dos aminoácidos presentes em cada uma das regiões definidas. Foi realizada também uma análise subjetiva do tamanho destes resíduos, numa tentativa de podermos correlacionar o espaço ocupado por este, com o espaço deixado livre para a entrada do cálcio (Tabela 3).

A análise dos resíduos de aminoácidos presentes nas 4 regiões definidas, forneceu os seguintes dados:

1. Centro hidrofóbico: os resíduos característicos desta região são bem conservados para as subfamílias de PLA₂s dos grupos I e II (esta ocorrência é bem normal para as famílias de proteínas). As PLA₂s Lys-49 apresentam diferenças nas posições 5, 102 e 106. Os resíduos Leu-5, Val-102 e Leu-106 são exclusivos para a subfamília Lys-49; sendo que as demais PLA₂s também apresentam os resíduos Phe-5, Ala-102 e Phe-106 bem conservados (Figura 6).



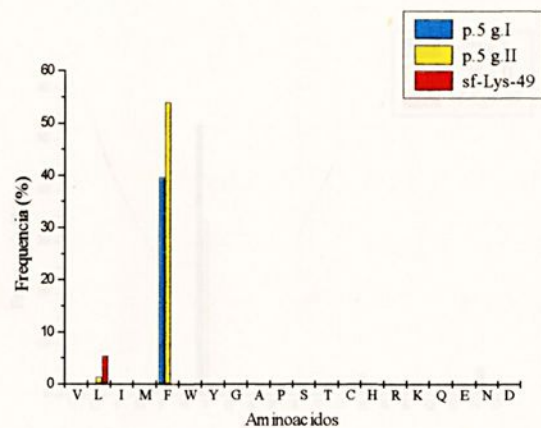
Com relação ao tamanho e propriedade destes resíduos, também existe uma forte conservação destas características dentro dos grupos analisados.

2. Ligação de cálcio: a visualização da estrutura da proteína através do programa MOLSCRIPT mostrou que esta região, representada pelos resíduos de aminoácidos das posições 18 a 33, apresenta uma alça localizada na superfície da proteína, e caracteriza-se por apresentar predominantemente, propriedade hidrofílica bem conservada (Figura 7) e variabilidade no tamanho residual (Tabela 3). Os resíduos de aminoácidos Asn-28, Leu-32 e Lys-49 são exclusivos da sub-família de PLA₂s Lys-49, e estão envolvidos com a ausência de catálise (Francis, B. *et al.*, 1991). O papel da Asn-28 nesta atividade ainda não é conhecido.

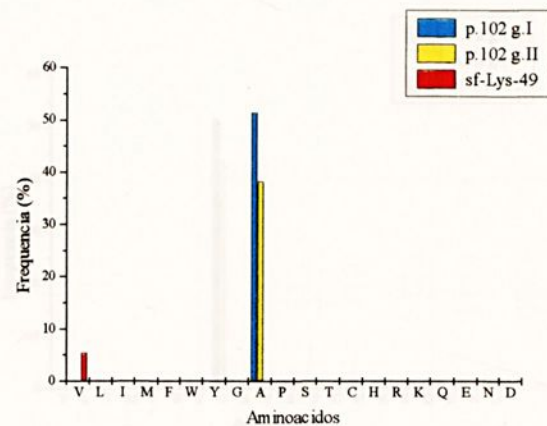
REGIÃO	POSICÃO	PROPRIEDADE	TAMANHO
Ligação de Ca ²⁺	18	M	v
	23	M	v
	24	M	x
	28*	HFO	s
	30	HFI	p
	31	M	v
	32	HFI	p
	33	HFI	v
	49*	HFI	p
Superfície de contato	1	HFI	p
	2	HFO	s
	3	HFO	s
	4	HFI	s
	6	HFI	v
Interface dimérica	12*	M	s
	77*	M	s
	80*	M	v
	87*	M	v

Tabela 3. Análise da propriedade e do tamanho residual predominantes para as 3 regiões designadas. Os resíduos marcados (*) estão representados na figura 4. **Legenda:** HFI=hidrofilicidade; HFO=hidrofobicidade; M=mistura de propriedades; p= resíduo pequeno; g= resíduo grande; v= tamanho variado (p e g).

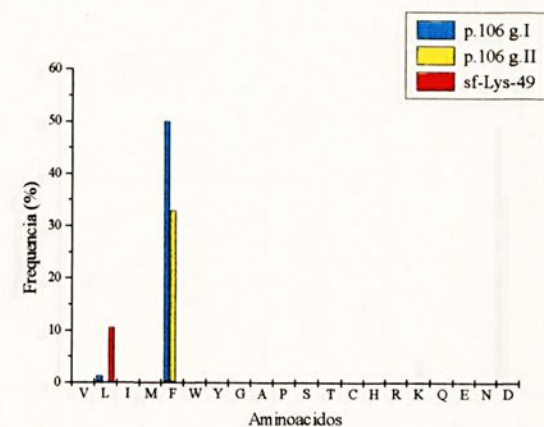
REGIÃO	POSIÇÃO	PROPRIEDADE	TAMANHO
Centro hidrofóbico	5*	HFO	g
	8	HFO	g
	9	HFO	g
	83	HFO	p
	102*	HFO	p
	103	HFO	p
	106*	HFO	g
	110	M	g
Ligação de Ca ²⁺	18	M	v
	19	M	v
	23	M	v
	24	M	v
	28 ^Δ	HFO	g
	30	HFI	p
	31	M	v
	32	HFI	p
	33	HFI	v
	49*	HFI	p
Superfície de contato	1	HFI	p
	2	HFO	g
	3	HFO	g
	4	HFI	g
	6	HFI	v
Interface dimérica	12*	M	g
	77*	M	g
	80*	M	v
	87*	M	v



(a)



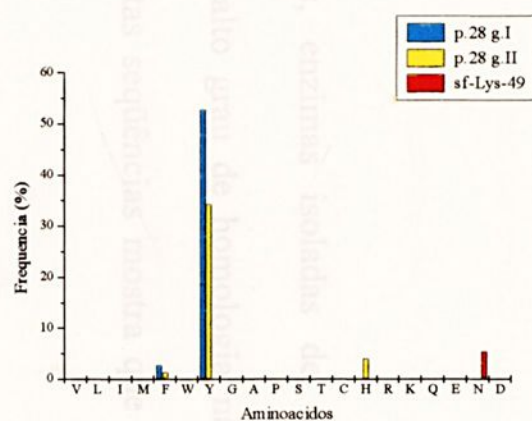
(b)



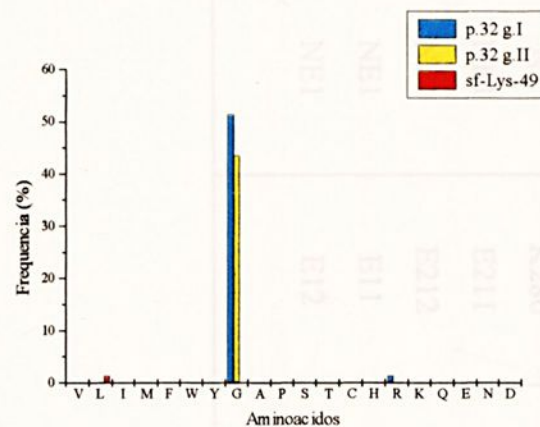
(c)

Figura 6: Frequência de aminoácidos nas posições 5, 102 e 106 dos grupos I e II de PLA₂s e PLA₂s Lys-49.

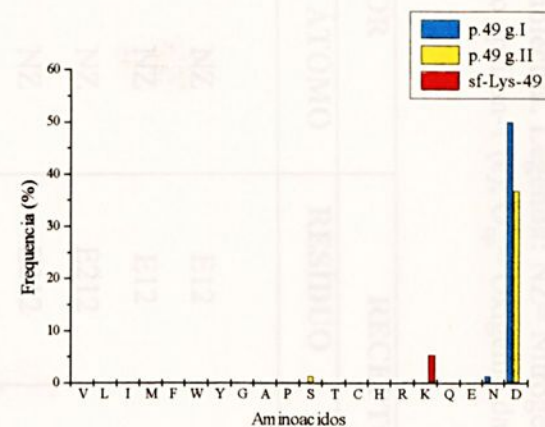
Legenda: p.(posição); g.(grupo); sf(subfamília).



(a)



(b)



(c)

Figura 7: Frequência de aminoácidos nas posições 28, 32 e 49 dos grupos I e II de PLA₂s e PLA₂s Lys-49.

Legenda: p.(posição); g.(grupo); sf(subfamília).

Tabela 4. Distâncias das pontes de hidrogênio entre os resíduos envolvidos na dimerização da molécula. Legenda: NZ= Nitrogênio zeta (ζ); NE1= Nitrogênio epsilon-1 (ϵ); OE1=Oxigênio epsilon-1 (ϵ); O_{cp}= Oxigênio da cadeia principal.

DOADOR		RECEPTOR		DISTÂNCIA (Å)
RESÍDUO	ÁTOMO	RESÍDUO	ÁTOMO	
K280	NZ	E12	OE1	3.22
K280	NZ	E12	OE1	2.98
K80	NZ	E212	OE1	2.87
K80	NZ	E212	OE1	2.89
K280	NZ	K80	Ocp	3.43
K80	NZ	K280	Ocp	2.96
W77	NE1	E211	Ocp	3.04
W77	NE1	E212	Ocp	3.46
W277	NE1	E11	Ocp	3.91
W277	NE1	E12	Ocp	3.95

III.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS

As PLA₂s, enzimas isoladas de um grande número de fontes, apresentam um alto grau de homologia na sequência de aminoácidos. O alinhamento destas seqüências mostra que todas as PLA₂s cataliticamente



ativas apresentam o ácido aspártico na posição 49 (Asp-49) e, este resíduo, apresenta-se como requerimento absoluto para a ligação do íon cálcio, cofator essencial para a atividade enzimática. As PLA₂s-Lys-49 apresentam uma alteração nesta posição, sendo que a substituição do ácido aspártico pela lisina leva estas PLA₂s a danificar membranas biológicas por um mecanismo independente de cálcio, sendo que a base estrutural para este mecanismo permanece desconhecida.

A identificação das mudanças residuais envolvidas diretamente com determinadas regiões que caracterizam as estruturas das proteínas envolvidas no presente estudo, forneceram um forte subsídio para a compreensão da relação entre a estrutura e função desempenhada pelos grupos de PLA₂s envolvidos.

As diferenças estruturais que estas PLA₂s apresentam, mostram a importância da identificação dos resíduos envolvidos na atividade funcional da proteína e os resultados do estudo apresentado mostrou que os resíduos específicos para a subfamília de PLA₂s Lys-49 não estão distribuídos aleatoriamente na proteína (Figuras 4 e 5 e Tabelas 2 e 3). A distribuição residual encontra-se fortemente relacionada com regiões características da proteína, envolvidas direta ou indiretamente com a atividade funcional.



O estudo computacional dos resíduos característicos ou exclusivos de uma determinada proteína, fornecem um embasamento para experimentos de mutagênese, pois possibilita um grande número de informações para posteriores mudanças residuais. Podemos assim, baseados nas evidências fornecidas pelo estudo da variabilidade residual para cada posição da sequência de aminoácidos, conhecer as mutações que ocorrem normalmente na natureza e, a viabilidade ou não de tal ocorrência.

A figura 6 mostra a frequência de todos os aminoácidos presentes na região do centro hidrofóbico. Na maioria das PLA₂s cataliticamente ativas, os resíduos fenilalanina na posição 5 (Phe-5), alanina na posição 102 (Ala-102) e fenilalanina na posição 106 (Phe-106) são altamente conservados, aparecendo com alta frequência nestas posições. Entretanto, nas PLA₂s Lys-49, estes resíduos estão trocados pela leucina-5 (Leu-5), valina-102 (Val-102) e leucina-106 (Leu-106). A mudança no volume dos resíduos envolvidos no centro hidrofóbico das proteínas, podem desestabilizar sua estrutura nativa.

Como já citado, a miotoxina II de *B.asper* forma uma estrutura homodimérica em solução. Através da análise dos resíduos característicos da interface dimérica, representados por Glu-12, Trp-77 e Lys-80 (Figura 5) pudemos observar que estes resíduos são conservados entre as fosfolipases da



subfamília Lys-49. No entanto, dentre as PLA₂s Lys-49 representadas pelas espécies *Bothrops asper*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops nummifer*, *Bothrops godmani* e *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, somente as três primeiras citadas apresentam estruturas homodiméricas.

Dois resíduos específicos (Asn-28 e Lys-49) também foram descobertos na região do sítio de ligação do cálcio. A figura 3a mostra a coordenação do íon cálcio com os grupos carbonis dos resíduos da cadeia principal e com o resíduo Asp-49. A figura 3b mostra o efeito da substituição nesta posição pelo resíduo Lys-49. O volume ocupado pelo íon cálcio é então ocupado pelo grupo delta-amino da lisina. Como resultado, o cálcio é incapaz de ligar-se, resultando na perda da atividade catalítica. A presença da Asn-28 ainda permanece obscura, pois nenhuma atividade funcional foi estabelecida para este resíduo.



IV. A BOTROPSTOXINA I (Bttx I) DE *Bothrops jararacussu*: UM MODELO DA SUBFAMÍLIA DE PLA₂s Lys-49

A Botropstoxina I (Bttx I) é uma proteína de caráter básico que foi isolada do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararacussu*. A sequência nucleotídica de 363 pares de base (pb) codifica uma proteína de cadeia simples com 121 resíduos de aminoácidos. Apresenta um peso molecular de 13667 e 14 resíduos de cisteína, correspondendo à formação de 7 pontes dissulfeto (Cintra, A.C.O. *et al*, 1993; Ward, R.J. *et al.*, 1995). A sequência de aminoácidos da Bttx I é altamente homóloga à miotoxina II de *Bothrops asper*, mostrando 97,5% de identidade, incluindo o resíduo Lys-49 (de acordo com a numeração de homologia padrão comparada à PLA₂ pancreática bovina) (Renetseder, R. *et al.*, 1985; Ward, R.J. *et al.*, 1995).

Esta proteína, como naturalmente ocorre com as PLA₂s homólogas em que o resíduo Asp-49 está trocado pela lisina (Lys) (Honsi-Brandenburgo,



M.L. *et al.*, 1988; Francis, B. *et al.*, 1991; Ward, R.J. *et al.*, 1995), apresenta uma potente atividade miotóxica, embora não mostre nenhuma atividade catalítica detectável de uma fosfolipase PLA₂. Apesar da falta de atividade fosfolipásica, a Bttx I conserva os resíduos His-48 e Asp-99 (Giglio, J.R. *et al.*, 1993), ambos envolvidos no mecanismo catalítico proposto para esta atividade (van den Berg, A. *et al.*, 1988). A Bttx I também apresenta o grupo δ -amino da Lys-49 ocupando o sítio de ligação de cálcio, fato este que leva à perda da atividade catalítica (Arni, R.K. *et al.*, 1995a). A Bttx I de *Bothrops jararacussu* recentemente cristalizada (Arni, R.K. *et al.*, 1995b), mostrou em suas análises iniciais, interações diméricas similares à estrutura da miotoxina II (Arni, R.K. *et al.*, 1995a). O alinhamento das sequências de aminoácidos das PLA₂s Lys-49 Bttx I, miotoxina II de *Bothrops asper* e *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, mostrou que estas três proteínas apresentam, além da presença do resíduo Lys-49, a conservação dos resíduos Glu-12, Trp-77 e Lys-80 envolvidos nas pontes de hidrogênio na interface dimérica (Arni, R.K. *et al.*, 1995a).

Buscando o entendimento do mecanismo de ação da Bttx I é que utilizamos as técnicas de Biologia Molecular para o estabelecimento de um sistema de expressão em *Escherichia coli* para a proteína Bttx I, em sua forma nativa.



IV.1. EXPRESSÃO DE PLA₂s RECOMBINANTES

O entendimento da relação entre estrutura e função das proteínas é uma das metas atuais da biologia. Nos últimos anos, a tecnologia de DNA recombinante representou uma poderosa ferramenta neste sentido. Consideráveis conhecimentos foram acumulados através dos anos, concernentes à genética e fisiologia da bactéria *E.coli*, tornando-a o hospedeiro preferencial para a expressão de proteínas. O desenvolvimento de sistemas de vetores projetados, forneceram vantagens aos sistemas de expressão baseados na *E.coli*, incluindo a geração de biomassa adequada para altas taxas de crescimento celular, tornando-a um sistema potencial para a produção de grandes quantidades de polipeptídios recombinantes por litro de meio de cultura (Marston, F.A.O., 1986 e Varadarajan, R., *et al.*, 1985 apud P. de Geus, C.J, 1987).

As primeiras aplicações da técnica de mutagênese sítio-dirigida buscando o entendimento da relação entre estrutura e função em PLA₂s apresentavam promotores do lago λ (Rosenberg, A.H. *et al.*, 1983). (Dennis, E.A., 1983; Waite, M., 1987 e Volwerk, J.J. & de Haas, G.H., 1982, apud Noel, J.P., 1991), foram dificultadas pelos baixos níveis de expressão de proteína recombinante. O primeiro relato acerca da construção, síntese e



busca de uma expressão em alto nível em *E.coli*, foi feito por Noel e Tsai em 1989 (apud Noel, J.P., 1991) para um gene da proPLA₂ pancreática bovina.

Vários problemas surgiram com os sistemas de expressão para PLA₂s de pâncreas porcino em *E.coli* (De Geus, P. *et al.*, 1987 e Deng, T., 1990), entre eles estão a regulação do sistema de expressão escolhido (Rosenberg, A.H. *et al.*, 1983) e a eventual letalidade deste produto gênico, fator crucial para a obtenção de altos níveis de expressão em larga escala. Vários sistemas foram descritos com o intuito de sanar estes problemas, no entanto, a solução definitiva ainda não havia sido encontrada.

O sistema de expressão pJPNPLA₂, por exemplo, possibilitou a construção e a síntese de um gene codificador para a proPLA₂ pancreática bovina em fusão com a sequência sinal representada pelo gene *ompA* (Movva, N.R. *et al.* apud 1980; Deng, T. *et al.*, 1990). Obteve-se assim, níveis de expressão superiores em *E.coli*, mas não solucionou os problemas relacionados com a regulação e a letalidade do produto de fusão à célula. O gene *ompA-proPLA₂* foi então inserido em vetores de expressão que apresentavam promotores do fago λ (Rosenberg, A.H. *et al.*, 1983). Entretanto, este sistema apresentou uma expressão da proteína a nível basal e, este produto se apresentava letal à célula. Esta letalidade poderia ser



explicada pela presença do peptídeo sinal Omp A, que não é clivado em algumas das proteínas expressas e pode inserir-se dentro da membrana interna da bactéria, afetando assim a função normal da membrana (Deng, T. *et al.*, 1990).

Buscando a construção de um vetor de expressão que permitisse a síntese e a secreção em *E.coli*, tanto de proPLA₂ como de PLA₂ bovina pancreática em altos níveis (Deng, T. *et al.*, 1990), foi desenvolvido recentemente por Studier e colaboradores (1987), um conjunto de vetores de expressão denominados vetores pET (a série pET - plasmídios para expressão pela T7 RNA polimerase). Estes vetores possibilitariam a clonagem e expressão de DNAs alvos sobre controle do promotor forte e altamente regulado do gene 10 do fago T7 (Rosenberg, A.H. *et al.*, 1987; Deng, T. *et al.*, 1990).

IV.1.1. OS VETORES DE EXPRESSÃO pET

Muitos plasmídios estáveis, com alto número de cópias foram descritos, assim como muitos promotores fortes para a RNA polimerase de



E.coli. A RNA polimerase do bacteriófago T7, ou T7 RNA polimerase, por exemplo, apresenta propriedades muito atrativas para os sistemas de expressão em *E.coli*. A T7 RNA polimerase apresenta uma alta seletividade para seus próprios promotores e este fato direciona todo o processo de transcrição e replicação para o DNA do bacteriófago T7 durante a infecção. A eficiência desse processo de infecção é dada pela alta seletividade e atividade da T7 RNA polimerase, que reconhece os promotores que ocorrem no DNA do bacteriófago T7, mas não reconhece aqueles no DNA hospedeiro. A RNA polimerase do DNA hospedeiro é ainda inativada por outras proteínas T7, direcionando toda a transcrição para o DNA T7. Esta atividade de transcrição somente pode ser inibida pela lisozima T7, uma proteína de 150 aminoácidos (Dunn, J.J. & Studier, F.W., 1983), que além de cortar a camada peptidoglicana da parede celular de *E.coli*, também forma um complexo específico com a T7 RNA polimerase, inibindo a transcrição (Moffatt, B.A. & Studier, F.W., 1987). A T7 RNA polimerase, que direciona a transcrição a partir dos promotores T7 do bacteriófago T7, induzem somente a produção de RNAs correspondentes aos genes localizados abaixo ("downstream") do promotor T7. Além de caracterizar-se por apresentar a capacidade de fazer transcritos completos de qualquer DNA que seja colocado sob controle de um promotor T7, apresenta-se como uma enzima muito ativa, alongando cadeias



cinco vezes mais rapidamente que as RNA polimerases de *E.coli* (Studier, F.W. & Moffatt, B.A., 1986).

Os vetores de expressão pET (*p*lasmídios para expressão pela T7 RNA polimerase) (Studier, F.W. & Moffatt, B.A., 1987) permitem a clonagem de DNAs alvos em sítios onde seriam mininamente transcritos pela RNA polimerase de *E.coli*, mas seletivamente e ativamente transcritos pela T7 RNA polimerase. A transcrição nestes vetores é controlada pelo forte promotor $\phi 10$ para T7 RNA polimerase e, em alguns casos, pelo terminador de transcrição T ϕ . O promotor $\phi 10$ refere-se ao promotor para T7 RNA polimerase que precede o gene 10 do fago T7 e, T ϕ refere-se ao terminador de transcrição que segue o gene 10, sendo o responsável por uma eficiente terminação de transcrição pela T7 RNA polimerase, tanto *in vivo* como *in vitro* (Studier, F.W. *et al.*, 1990).

IV.1.2. O VETOR DE EXPRESSÃO pTM2-2

O vetor utilizado para a expressão da PLA₂ em cultura de *E.coli* BL21(DE3)[pLysS] foi o pTM2-2, um vetor derivado da série de



vetores de expressão pET. Contém 2800 pares de base (pb) e apresenta entre outras características, uma transcrição eficiente assegurada pelo promotor T7, a presença da sequência sinal de *E.coli* OmpA, direcionando a secreção da proteína no espaço periplásmico e as estruturas “stem-and-loop” 3’ + 5’, que fornecem estabilidade ao RNAm. Contém ainda uma inserção de 9 pares de base (pb) entre o sítio de restrição Xba I e a região Shine-Dalgarno (SD) e, uma inserção na região múltipla de clonagem, criando o sítio Nhe I entre os sítios Nco I e EcoR I.

Utilizando o vetor de expressão pTM2-2 foi montado o sistema de expressão para a Bttx I em *E.coli*.

As culturas contendo os vetores pTM2-2 e pET3 com Bttx I (clonados) e as linhagens de *E.coli* BL21(DE3)[pLysS], DH5 α e HMS 174 foram armazenadas em pequenas alíquotas em nitrogênio líquido e freezer -80°C na presença de 8% de glicerol. O plaqueamento se deu em placas LB-agar (Meio Luria-Bertani - Maniatis, 1989) com adição do antibiótico apropriado, no caso, a ampicilina (100 μ g/ml) e incubadas a 37°C. As culturas foram crescidas sob agitação constante a 37°C (GALLENKAMP Orbital Incubator Cooled).

O emprego de cada uma destas linhagens, bem como dos vetores utilizados, encontram-se no esquema a seguir (Figura 8), que evidencia as estratégias utilizadas para a obtenção de um sistema de expressão para a Bttx I em sua forma selvagem.



V. MATERIAL E MÉTODOS

PREPARAÇÃO DO VETOR

PREPARAÇÃO DO INSERTO

V.1. MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DE *E. coli*.

As culturas contendo os vetores pTM2-2 e pT7T3 com Bttx I (clone 13) e as linhagens de *E. coli* BL21(DE3)[pLysS], DH5 α e HMS 174 foram armazenadas em pequenas alíquotas em nitrogênio líquido e freezer -80°C na presença de 8% de glicerol. O plaqueamento se deu em placas LB-agar (Meio Luria-Bertani - Maniatis, 1989) com adição do antibiótico apropriado, no caso, a ampicilina (100 μ g/ml) e incubadas a 37°C. As culturas foram crescidas sob agitação constante a 37°C (GALLENKAMP Orbital Incubator Cooled).

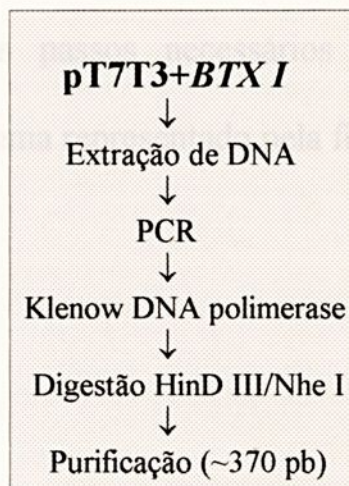
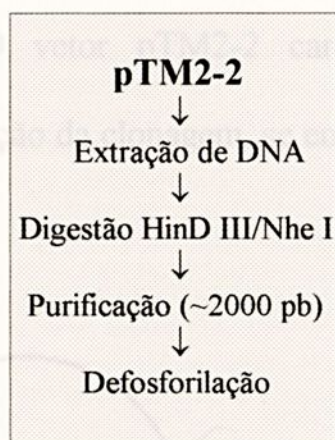
O emprego de cada uma destas linhagens, bem como dos vetores utilizados, encontram-se no esquema a seguir (Figura 8), que evidencia as estratégias utilizadas para a obtenção de um sistema de expressão para a Bttx I em sua forma selvagem.



ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM E EXPRESSÃO

PREPARAÇÃO DO VETOR

PREPARAÇÃO DO INSERTO



LIGAÇÃO

Transformação em DH5α

Seleção de clones

Mini-extrações de DNA → verificação da construção correta
(digestão *HinD* III/*Nhe* I)

SEQUENCIAMENTO

Transformação em HMS 174

Transformação em BL21(DE3)[pLysS]

Culturas submetidas à ativação com IPTG

PAGE-SDS 15%

**EXPRESSÃO DA
PROTEÍNA
RECOMBINANTE**

Figura 8. Estratégias utilizadas para a clonagem do gene da *Bttx I* (*BTX I*) no vetor de expressão pTM2-2, utilizando a linhagem de expressão de *E. coli* BL21(DE3)[pLysS].

V.2. PREPARAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pTM2-2

O vetor pTM2-2 caracterizado, e os passos necessários para a preparação da clonagem, se encontram no esquema representado pela figura 9:

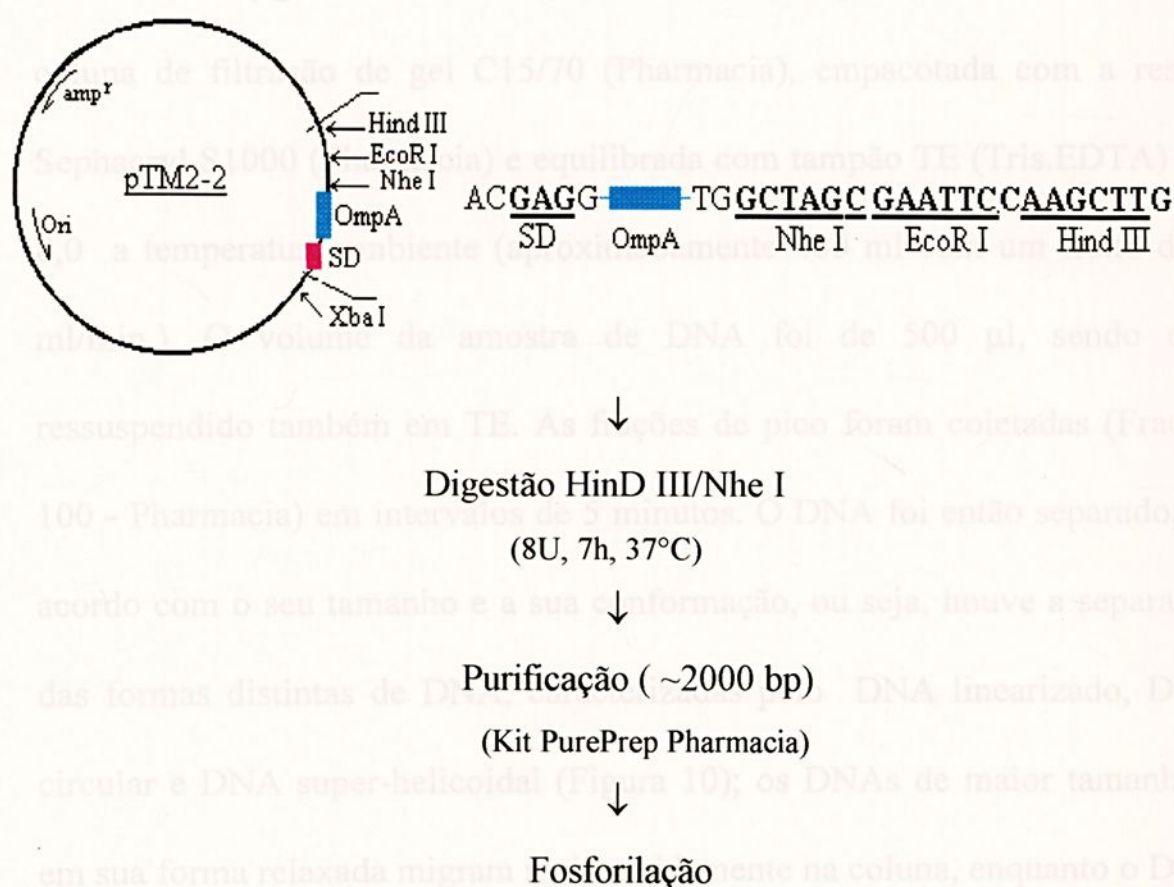


Figura 9: Estratégia de clonagem utilizada para o vetor de expressão pTM2-2.

V.2.1. Extração de DNA

Os plasmídios foram obtidos de 500 ml de culturas bacteriais em meio LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), e lisadas por lise alcalina (Maniatis, 1989), seguida de tratamento com Proteinase K (50 $\mu\text{g/ml}$ - Pharmacia) e RNase (100 $\mu\text{g/ml}$ - Pharmacia) (anexo A). A separação foi realizada na coluna de filtração de gel C15/70 (Pharmacia), empacotada com a resina Sephacryl S1000 (Pharmacia) e equilibrada com tampão TE (Tris.EDTA) pH 8,0 a temperatura ambiente (aproximadamente 400 ml com um fluxo de 1 ml/min.). O volume da amostra de DNA foi de 500 μl , sendo este ressuspendido também em TE. As frações de pico foram coletadas (FracSil 100 - Pharmacia) em intervalos de 5 minutos. O DNA foi então separado, de acordo com o seu tamanho e a sua conformação, ou seja, houve a separação das formas distintas de DNA, caracterizadas pelo DNA linearizado, DNA circular e DNA super-helicoidal (Figura 10); os DNAs de maior tamanho e em sua forma relaxada migram mais rapidamente na coluna, enquanto o DNA na forma superhelicoidal migra mais vagarosamente.



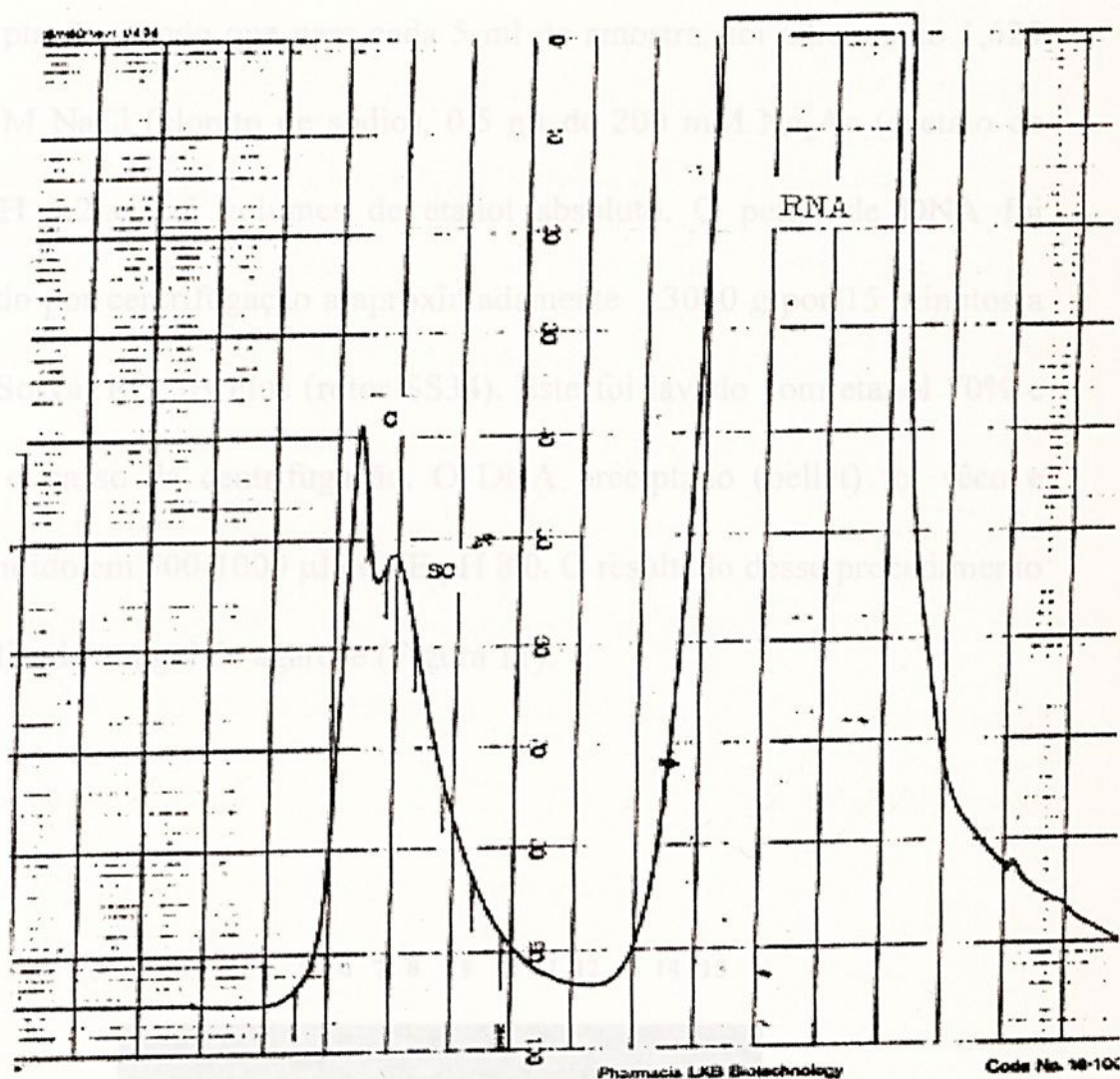


Figura 10: Cromatograma obtido de filtração em gel com a resina Sephacryl S1000 (Pharmacia), obtido após extração de DNA do pTM2-2. Legenda: C- DNA circular; SC: DNA super-helicoidal ("supercoil"). Tampão de eluição: 0,5 M TE pH 8,0.

Este procedimento permitiu a obtenção de um rendimento satisfatório com relação à forma superhelicoidal. As frações coletadas foram concentradas por precipitação, sendo que para cada 5 ml de amostra, foi adicionado 1,625 ml de 5 M NaCl (cloreto de sódio), 0,5 ml de 200 mM Na₂Ac (acetato de sódio) pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto. O pellet de DNA foi recuperado por centrifugação a aproximadamente 13000 g por 15 minutos a 4°C em Sorval RC 5B Plus (rotor SS34). Este foi lavado com etanol 70% e repetido o passo da centrifugação. O DNA precipitado (pellet) foi seco e ressuspensionado em 500-1000 µl de TE pH 8,0. O resultado desse procedimento foi visualizado em gel de agarose (Figura 11).

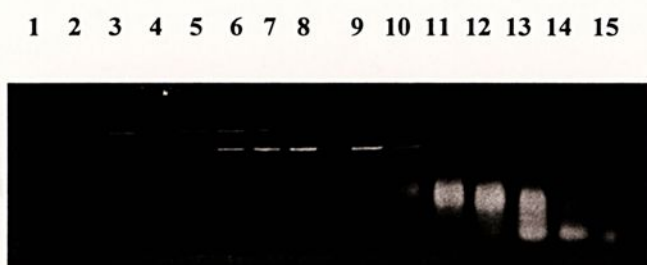


Figura 11: Análise das frações obtidas da purificação do DNA de pTM2-2, resultante da filtração em gel com a resina Sephacryl S1000, através de gel de agarose 1,5%. Linhas 1-4: DNA circular; linhas 5-9: DNA superhelicoidal, sendo que a linha 9 evidencia uma fração isolada de DNA nesta forma; linhas 10-15, frações de RNA.

V.2.2. Digestão do vetor com enzimas de restrição

A seguir, o vetor de expressão pTM2-2 foi submetido às digestões enzimáticas, onde foram utilizadas 8 U das *HinD* III (15U/ μ l-Pharmacia) e *Nhe* I (6U/ μ l-Pharmacia). As digestões forneceram extremidades coesivas para a ligação posterior com o gene da *BTX I*, tratado com estas mesmas enzimas. As digestões do vetor e do fragmento utilizaram aproximadamente 3 unidades de enzima para cada μ g de DNA, 1% do volume total da digestão do tampão One-phor-all plus e água milliQ autoclavada para completar o volume pretendido. As enzimas utilizadas são da Pharmacia. Todas as digestões foram feitas em banho-maria (EV Lab EV:015) a 37°C e as enzimas *HinD* III e *Nhe* I foram inativadas a 65°C por 20 minutos.

V.2.3. Purificação do vetor

O vetor pTM2-2 foi purificado de géis de agarose com a utilização do kit Sephaglas[®] Band Prep da Pharmacia (anexo B). O kit Sephaglas[®] Band Prep da Pharmacia foi projetado para uma purificação de DNA presente em



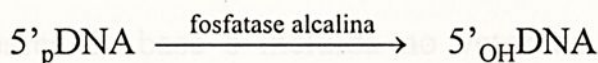
solução ou para uma rápida extração de bandas individuais de DNA em géis de agarose após eletroforese. Este método utiliza o Sephaglas[®] Band Prep, que é uma matriz feita de vidro, sendo que o sal caotrópico necessário para a ligação, desnatura a proteína e dissolve a agarose; o DNA pode assim se ligar seletivamente e ser eluído em um tampão de baixa força iônica. Os métodos utilizados para o uso do vidro empregam o perclorato de sódio e o iodeto de sódio, sendo este último, o sal presente no Sephaglas[®] Band Prep, dissolvendo os pedaços de agarose mais rapidamente que o perclorato de sódio. O kit Sephaglas[®] Band Prep da Pharmacia possibilita um rendimento de 50-75% para fragmentos de DNA de aproximadamente 200 pares de base a 10 kb, sendo que o DNA resultante é viável para manipulações enzimáticas subsequentes.

V.2.4. Fosforilação do vetor

Somente o vetor foi submetido ao tratamento com a fosfatase alcalina (Maniatis, 1989), antes da reação de ligação. A fosfatase (Pharmacia - 1U/ μ l) foi utilizada para catalisar a remoção do resíduo de fosfato-5' do fragmento



de DNA, prevenindo assim a recircularização do vetor. Esta reação ocorre como exemplificado abaixo:



A fosfatase alcalina foi diluída 20 vezes e utilizamos para a reação aproximadamente 0,1U/ μ l de DNA, 1% do volume da reação de tampão One-phor-all mais a quantidade necessária de água milliQ autoclavada. A enzima foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos e inativada a 85°C por 15 minutos, seguido de um descanso de 20 minutos a temperatura ambiente.



V.3. PREPARAÇÃO DO INSERTO DA *BTX I*: A PCR DA *BTX I*

A construção apresentando o cDNA codificador da Bttx I (*BTX I*) contendo 363 pares de base e incluída no vetor de clonagem pT7T3 foi submetida à reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) juntamente com oligonucleotídeos incorporando sítios de restrição para Nhe I e HinD III no N- e C-terminal, respectivamente. Em adição, o oligonucleotídeo C-terminal introduziu um códon de terminação ("stop codon") na sequência da *BTX I*. O produto da PCR foi purificado de gel de agarose (Kit PurePrep Pharmacia) e após digestão com as enzimas de restrição Nhe I e HinD III (seção V.2.2) foi ligado ao vetor de expressão pTM2-2 preparado com estas mesmas enzimas.

Os passos relacionados com a amplificação da *BTX I* através da PCR bem como os passos subsequentes estão especificados na figura 12. Esta mostra a sequência da *BTX I* (em negrito) juntamente com a sequência do vetor pT7T3. As substituições de base bem como as modificações adequadas para as inserções estão indicadas pelas linhas verticais e as extremidades N- e C-terminais da Bttx I madura são indicadas pelas letras em itálico. As sequências dos oligonucleotídeos N- e C-terminal (BTX-N e BTX-C, respectivamente) estão localizados abaixo e acima da sequência do vetor.



Etapa	Duração	Temperatura (°C)
1	2 minutos	94
2	1 minuto	94
3	1 minuto	65
4	4 minutos	72
5	10 minutos	72

Tabela 5. Programa utilizado na reação de PCR para a amplificação do gene da *BTX I* de *Bothrops jararacussu*.

O protocolo utilizado na reação de amplificação foi o seguinte:

Tampão 10XPCR* ¹	8µl	
dNTPs (Pharmacia-100 mM)	15µl	
Oligo BTX-N (Gibco) (10 pmol)	20µl	
Oligo BTX-C (Gibco) (10 pmol)	16µl	
pT7T3 + <i>BTX I</i>	2µl	(para 50ng do vetor com <i>BTX I</i>)
H ₂ O	19µl	
<i>Taq</i> DNA polimerase* ²	20µl	(2,5 U de enzima)

Nota: *¹ : 500 mM KCl, 200 mM Tris pH8,0, 25 mM MgCl₂.

*² : A *Taq* DNA polimerase foi diluída vinte vezes.



V.3.2. Tratamento com a FPLCpure® Klenow DNA polimerase I

O fragmento amplificado através da PCR, foi tratado com o fragmento Klenow DNA polimerase I (Pharmacia) para a adição de nucleotídeos na extremidade 5' alongada, garantindo assim, a complementação nucleotídica das extremidades do material amplificado (Maniatis, 1989) e a formação de extremidades não coesivas.

A reação apresentando um volume de 25µl seguiu o protocolo abaixo:

produto amplificado por PCR	10 µl
10X Tampão Nick Translation*	2,5 µl
4 mM de dNTP (Pharmacia)	2 µl
H ₂ O (MilliQ)	10,5 µl
2 µl de Klenow (9U/µl)	~0,2 µl

A reação foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente e foi inativada com a adição de 1 µl de EDTA pH 8,0 (Maniatis, 1989).



10 X Tampão Nick Translation: 0,5 M Tris.HCl pH 7,5

0,1 M MgSO₄

1 mM DTT

500µg/ml BSA (opcional)

VII. METODOLOGIA E RESULTADOS

O DNA amplificado foi digerido e purificado como descrito anteriormente (seções V.2.2 e V.2.3., respectivamente).

restrição Nhe I e Hind III, em ligado ao vetor fosforilado. As condições básicas utilizadas para as reações de ligação estão resumidas na tabela 6, a seguir, a 16°C por 8 horas.

Reação	Ligação (µl)	Controle negativo (µl)
Tampão SX ^{*1}	4	4
pTM2-2 ^{*2}	5	5
Fragmento ^{*3}	5	0
Ligase (5U/µl) ^{*4}	1	1
H ₂ O	10	15
Voluma final	25	25

Tabela 6. Condições utilizadas para as reações de ligação, realizadas a 16°C por 8 horas. *Nota:* ^{*1}: 10X Tampão Ligase; 200 mM Tris.Cl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 500 µg/ml BSA (soroalbumina - Pharmacia); ^{*2}: preparação do pTM2-2: item 1; ^{*3}: preparação do fragmento: item 2; ^{*4}: T4 DNA Ligase (Pharmacia); diluída SX.

VI. LIGAÇÃO DOS DNAS

VI.1. METODOLOGIA E RESULTADOS

O fragmento amplificado por PCR e digerido com as enzimas de restrição Nhe I e HinD III, foi ligado ao vetor fosforilado. As condições básicas utilizadas para as reações de ligação estão resumidas na tabela 6, e se deram a 16°C por 8 horas.

Reação	Ligação (μl)	Controle negativo (μl)
Tampão 5X * ¹	4	4
pTM2-2 * ²	5	5
Fragmento * ³	5	0
Ligase (5U/μl) * ⁴	1	1
H ₂ O	10	15
Volume final	25	25

Tabela 6. Condições utilizadas para as reações de ligação, realizadas a 16°C por 8 horas. Nota: *¹: 10X Tampão Ligase: 200 mM Tris.Cl pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 500 μg/ml BSA (soroalbumina - Pharmacia); *²: preparação do pTM2-2: item 1; *³: preparação do fragmento: item 2; *⁴: T4 DNA Ligase (Pharmacia): diluída 5X.



VII. SELEÇÃO DE CLONES

VII.1. METODOLOGIA E RESULTADOS

A seleção do clone contendo a construção do vetor de expressão pTM2-2+BTX I foi feita, através da utilização da linhagem de *E.coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169*(ϕ 80*lacZ* Δ M15)*hsdR17recA1endA1gyrA96thi-1relA1*), caracterizada por apresentar uma alta eficiência de transformação. Após a transformação (anexos C1 e C2), foram feitas mini extrações de DNA através de lise bacterial por aquecimento. Neste método, denominado STET, as culturas foram crescidas com ampicilina (100 μ g/ml) durante aproximadamente 12 horas. Posteriormente foram centrifugadas (Centrifuge 5415 C eppendorf) a aproximadamente 672 g por 5 minutos. O material obtido foi então ressuspenso em 300 μ l STET (STET: Sacarose 8%; 50mM EDTA; 50mM Tris.Cl pH 8,0 e Triton X-100 0,1%), com a adição de 6 μ l de lisozima (10 mg/ml) e incubados por 15 minutos. Seguiu-se um aquecimento de 90 segundos a uma temperatura de 42-45°C e uma centrifugação a



aproximadamente 672 g, por 5-10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos, onde foi adicionado 12 µl de CTAB 5% (Sigma), seguido de uma centrifugação imediata por 10 minutos a aproximadamente 672 g. O sobrenadante foi descartado. O pellet obtido (DNA precipitado) foi ressuspensão em 300 µl de NaCl 1,2M, onde foi adicionado 10% do volume (30 µl) de acetato de sódio 2M pH 5,2. Foi adicionado 750 µl de etanol, e seguiu-se uma centrifugação de 15 minutos a aproximadamente 672 g. O pellet de DNA foi lavado com etanol 70% e ressuspensão em 20 µl de TE (Tampão de eluição: 10 mM de Tris.HCl pH 8,0, 1 mM EDTA).

As amostras de DNA foram submetidas a um tratamento de digestão conjunta *HinD* III/*Nhe* I para verificação da inserção correta, pois, os oligonucleotídeos degenerados utilizados na reação de PCR do fragmento a ser clonado, foram criados para inserir um sítio de restrição *HinD* III no C-terminal, e um sítio *Nhe* I no N-terminal. Na Figura 13 temos a análise dessa transformação, onde podemos verificar na linha 1, o vetor de expressão pTM2-2 não submetido à digestão; nas linhas 2 e 3 temos o vetor linearizado pelas digestões com *HinD* III e *Nhe* I, respectivamente, evidenciando a presença desses sítios; a linha 4 evidencia o resultado da construção própria, com o isolamento do gene clonado, após digestão dupla com as referidas



enzimas; na linha 5 tem-se o controle negativo dessa construção, ou seja, o vetor sem o inserto e, a linha 6, o marcador λ Hind III.

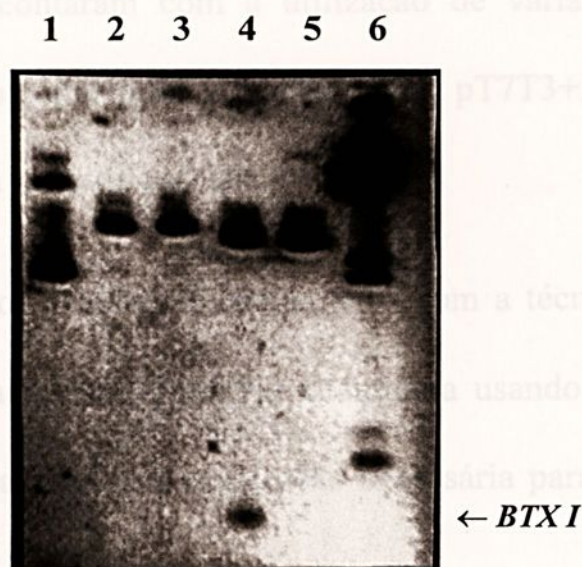


Figura 13: Análise da transformação da construção do vetor de expressão da *BTX I* realizada na linhagem DH5 α . Linha 1: PTM2-2 ; linhas 2 e 3: pTM2-2 digerido com Hind III e Nhe I, respectivamente; linha 4: pTM2-2 com digestão dupla Hind III/Nhe I, evidenciando a construção própria com a liberação da *BTX I*; linha 5: pTM2-2 sem o inserto (*BTX I*) e, linha 6: marcador λ Hind III.

A construção final, correspondente ao vetor de expressão pTM2-2+*BTX I*, foi sequenciada pelo método de terminação de cadeia mediado por dideoxinucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977 apud Maniatis, 1989), no entanto, a sequência de DNA obtida não correspondia à da *BTX I*. Através de uma pesquisa na homologia de seqüências de DNA no banco de dados GenBank

usando o programa FASTA, foi identificada a sequência de um fragmento correspondente à ORF 949 da linhagem de *E.coli*. Como nossos procedimentos contaram com a utilização de várias linhagens de *E.coli*, houve uma contaminação do plasmídeo pT7T3+*BTX I* com o DNA cromossomal da referida bactéria.

Devido aos problemas encontrados com a técnica de mutagênese por PCR, foi utilizada uma estratégia alternativa usando a eliminação de sítios únicos (ESU) para gerar a construção necessária para a expressão da *BTX I* em *E.coli*.

MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA PARA ELIMINAÇÃO DE SÍTIOS ÚNICOS

A técnica de Mutagênese ESU fornece uma alta eficiência de mutagênese e utiliza dois oligonucleotídeos. O oligonucleotídeo mutagênico introduz uma mutação alvo dentro de uma sequência definida do DNA plasmídico e, o oligonucleotídeo de seleção torna-o resistente a digestões específicas, fornecendo uma possibilidade de seleção (Figura 14). O oligonucleotídeo ESU selecionado (Sca I/Mlu I) contém 28 bases e converte o



sítio de restrição Sca I no sítio de restrição Mlu I e apresenta a seguinte sequência: 5'-Pd[CTG TGA CTG GTG ACG CGT CAA CCA AGT C]-3'.

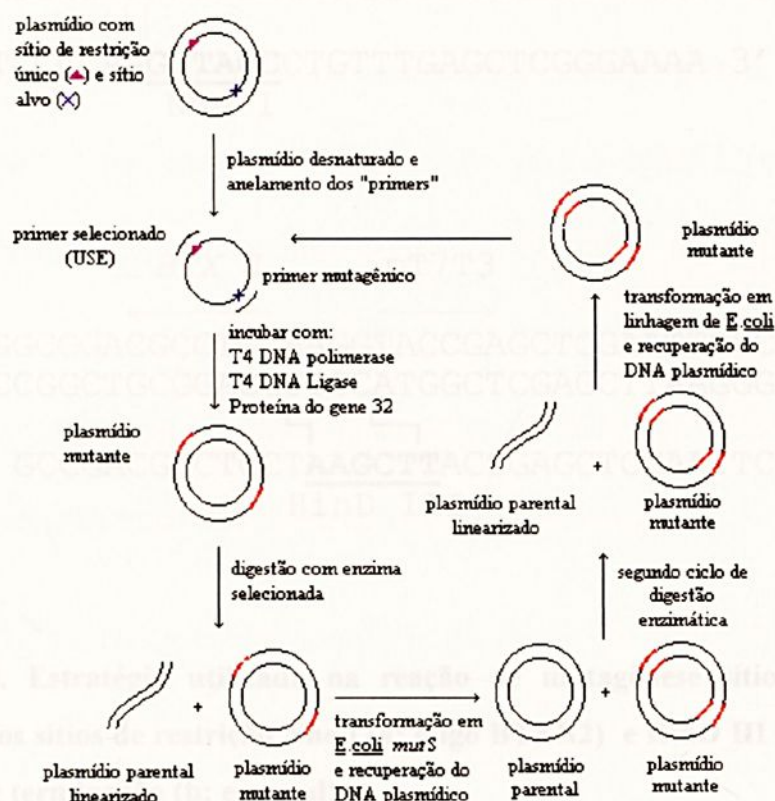


Figura 14. Diagrama da mutagênese sítio-dirigida, utilizando primers U.S.E.

A técnica de ESU permite a introdução também, de múltiplas mutações em uma mesma reação, através da utilização de vários oligonucleotídios mutagênicos. Os oligonucleotídios BTXC2 e BTXN2 foram utilizados com o objetivo de introduzir os sítios de restrição para as enzimas *HinD* III e *Nhe* I respectivamente e estabelecer um códon de terminação (ATT) na extremidade C-terminal, como mostrado na figura 15.

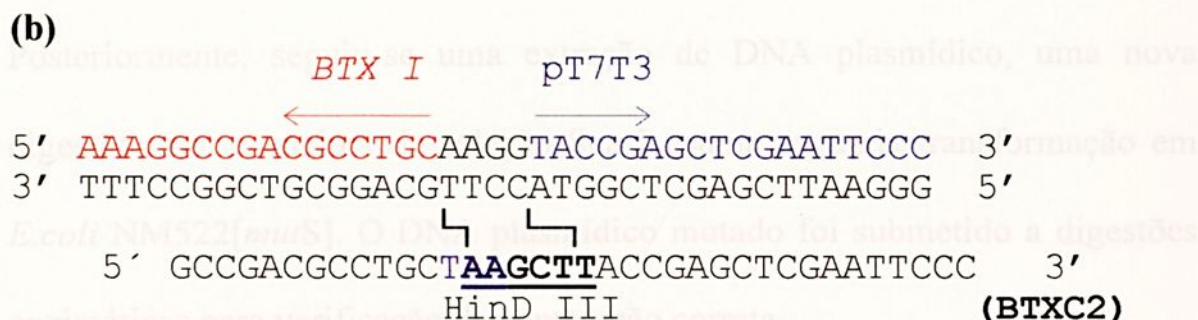
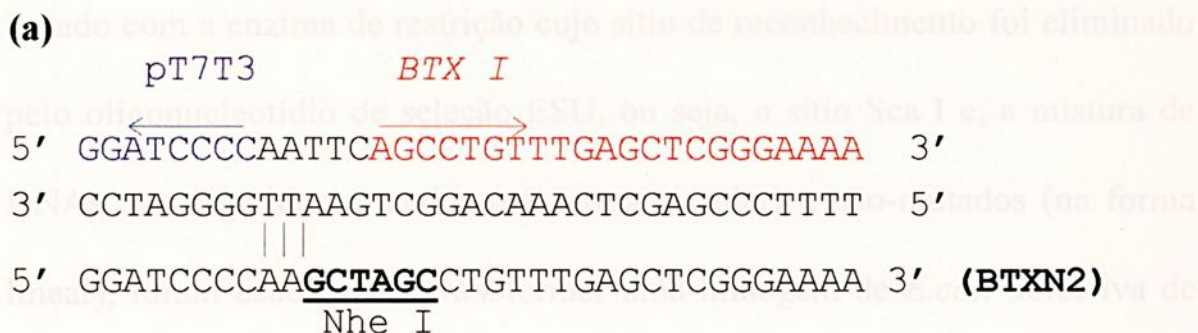


Figura 15. Estratégia utilizada na reação de mutagênese sítio-dirigida para a inserção dos sítios de restrição Nhe I (a: oligo BTXN2) e HinD III (b: oligo BTXC2) e códon de terminação (b: em azul).

O plasmídeo pT7T3+*BTX I* dupla-fita foi primeiramente desnaturado por aquecimento e os dois oligonucleotídios mutagênicos, juntamente com o oligonucleotídio de seleção, foram anelados simultaneamente em uma mesma fita do DNA plasmídico circular simples-fita. Estes oligonucleotídios foram incorporados e, uma nova fita de DNA foi sintetizada pela T4 DNA polimerase, sendo que aproximadamente 90% dos plasmídios mutados conterão ambas mutações direcionadas. O DNA plasmídico mutado foi então

tratado com a enzima de restrição cujo sítio de reconhecimento foi eliminado pelo oligonucleotídio de seleção ESU, ou seja, o sítio Sca I e, a mistura de DNAs não digeridos mutados (na forma circular) e não-mutados (na forma linear), foram usados para transformar uma linhagem de *E.coli* defectiva de reparo (*mutS*), no caso, a linhagem de *E.coli* NM522[*mutS*](anexo C2). Posteriormente, seguiu-se uma extração de DNA plasmídico, uma nova digestão com a enzima de seleção Sca I e uma segunda transformação em *E.coli* NM522[*mutS*]. O DNA plasmídico mutado foi submetido a digestões enzimáticas para verificação da construção correta.

A figura 16 apresenta a análise da reação de mutagênese sítio-dirigida submetida a amplificação, onde podemos verificar na linha 1, o vetor pT7T3+*BTX I* não submetido a mutagênese digerido com *HinD III*, que foi usado como controle, mostrando a presença de um sítio de restrição *HinD III* na região do polilynker. Na linha 2, o plasmídio submetido à mutagênese digerido com a enzima *Nhe I* e apresentando linearização. Na linha 3, o vetor submetido à mutagênese digerido com a enzima *HinD III*. Neste caso, ocorre a liberação de um fragmento de *BTX I* juntamente com a presença de aproximadamente 35 pares de base em decorrência da criação, através da mutagênese, de mais um sítio de restrição *HinD III* na extremidade C-terminal da *BTX I*. Na linha 4 houve uma digestão conjunta com as enzimas



HinD III/Nhe I, havendo a liberação de um fragmento um pouco menor do que o presente na linha 3 e comprovando o resultado positivo para a reação envolvendo os oligonucleotídeos BTXC2 e BTXN2, para a inclusão destes referidos sítios. A linha 5 apresenta a digestão do vetor com a enzima Sca I, evidenciando o resultado da mutagênese utilizando o oligonucleotídeo USE, ou seja, este sítio perdeu sua especificidade após a reação citada. Na linha 6, temos o pT7T3+BTX I digerido com a enzima Mlu I, onde podemos comprovar o resultado da mutagênese para a extinção do sítio Sca I e criação do sítio Mlu I através da linearização do referido vetor.

O material referente à linha 4 da figura 16, ou seja, submetido à digestão dupla Nhe I/HinD III, correspondente à construção final, foi subclonado no vetor de expressão PTM2-2 (pTM2-2+BTX I) e sequenciado novamente pelo método de terminação de cadeia mediado por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977 apud Mantais, 1989).

A figura 17 evidencia o resultado destas citações, sendo que, após esta confirmação, o material foi utilizado para a transformação em DH5 α , seguindo-se mini extrações de DNA.



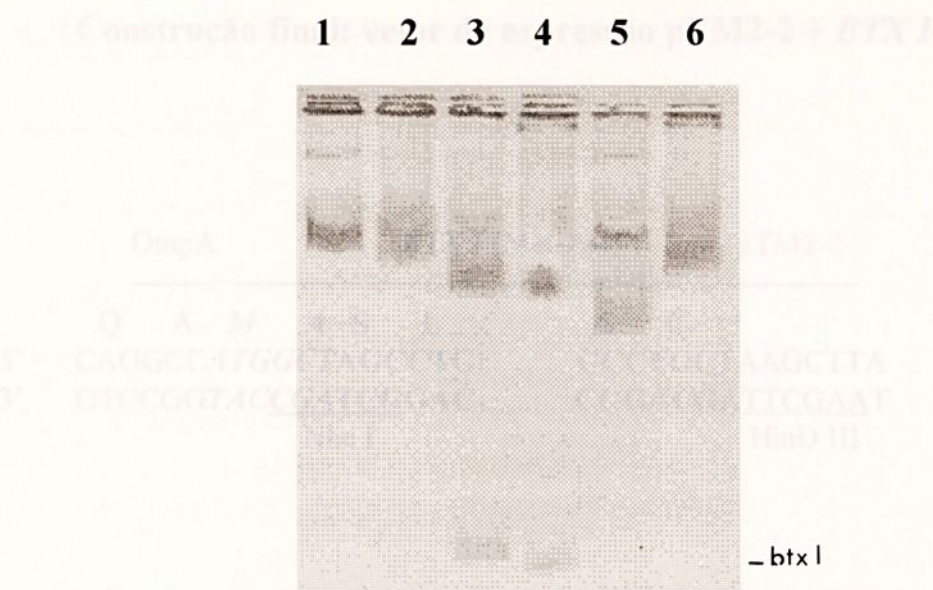


Figura 16. Análise da reação de mutagênese sítio-dirigida, submetida a amplificação (PCR). Linha 1: pT7T3 + *BTX I* linhas 2 a 6: pT7T3 + *BTX I* digerido com as enzimas *Nhe*, *HinD III*; *Nhe I/HinD III*, *Sca I* e *Mlu I*, respectivamente.

O material referente à linha 4 da figura 16, ou seja, submetido à digestão dupla *Nhe I/ HinD III*, correspondente à construção final, foi subclonado no vetor de expressão PTM2-2 (pTM2-2+*BTX I*) e sequenciado novamente pelo método de terminação de cadeia mediado por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977 apud Maniatis, 1989).

A figura 17 evidencia o resultado destas citações, sendo que, após esta confirmação, o material foi utilizado para a transformação em DH5 α , seguindo-se mini extrações de DNA.

Construção final: vetor de expressão pTM2-2 + *BTX I*

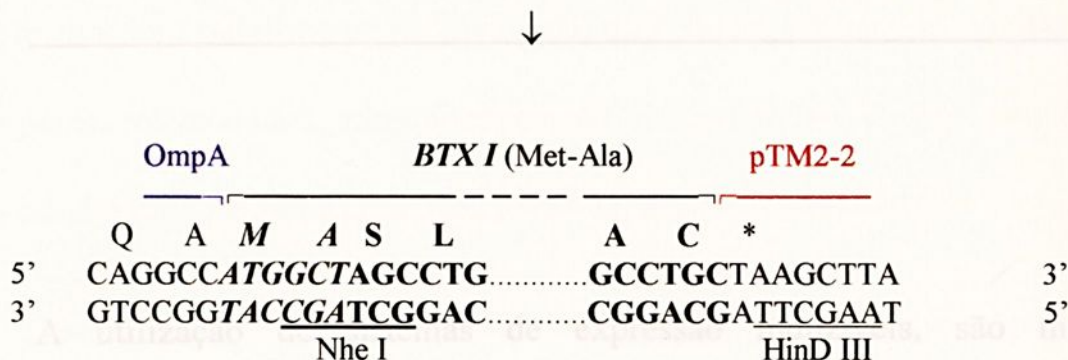


Figura 17: Construção final do vetor de expressão pTM2-2 + *BTX I* apresentando a inserção dos sítios de restrição Nhe I e Hind III, um códon de terminação (stop codon) (*) na extremidade C-terminal.

VIII. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA

A utilização de sistemas de expressão induzíveis, são muito convenientes para a obtenção de expressão de produtos de genes de interesse, em níveis altos. A maior limitação para a obtenção do produto gênico é com relação à capacidade da célula manter e expressar os genes cujo produto é tóxico. Quando os vetores pET são usados para a expressão de genes alvos nas linhagens BL21(DE3), o repressor *lac* atua tanto para reprimir a transcrição do gene da T7 RNA polimerase pela RNA polimerase de *E.coli*, como para bloquear a transcrição do gene alvo, por qualquer outra T7 RNA polimerase que seja produzida. Esta dupla repressão, reduz significativamente a expressão basal do gene de interesse na célula não induzida, no entanto, afeta minimamente o nível de expressão sobre indução. A utilização da linhagem hospedeira de *E.coli* HMS 174 (*recA1hsdRrif^r*) para a clonagem inicial, é devida ao fato de que esta linhagem, além de apresentar a mutação *recA1*, que é defectiva de recombinação, possibilita a propagação dos plasmídios nesta linhagem, na forma monomérica e, a expressão de DNA alvo é mínima na ausência de T7 RNA polimerase. A BL21 não é apropriada



para a clonagem inicial porque é *recA*⁺ e apresenta baixa eficiência de transformação, sendo que os lisógenos DE não podem ser usados, devido aos problemas relacionados com a expressão de genes alvos, por pequenas quantidades de T7 RNA polimerase presente na célula não induzida.

Para que a proteína fosse produzida, foi necessário primeiramente, que o plasmídio recombinante pTM2-2 contendo o gene codificador da Bttx I (*BTX I*) fosse primeiramente transferido para a linhagem hospedeira de *E.coli* HMS 174 (*recA1hsdRrif*^r). Após a estabilização do referido plasmídio, o DNA de interesse foi introduzido na linhagem BL21(DE3) (*hsdSgal(λcIts857ind1Sam7nin5lacUV5-T7geneI)*). Estes hospedeiros lisógenos do fago DE3, são os hospedeiros mais utilizados para a expressão de genes de interesse. São derivados do fago λ e caracterizam-se por apresentar a região de imunidade do fago 21, carregando também um fragmento de DNA contendo o gene *lacI*, o promotor *lacUV5* e o gene para T7 RNA polimerase (Studier, F.W. & Moffatt, B.A., 1986). Uma vez que este lisógeno DE3 é formado, o único promotor conhecido para dirigir a transcrição do gene T7 RNA polimerase é o promotor *lacUV5*, que é induzível pelo isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), ativando a T7 RNA polimerase que, por sua vez, transcreve então o gene de interesse. No entanto, o que ocorre, é que mesmo na ausência de IPTG, ocorre alguma



expressão da T7 RNA polimerase do promotor *lacUV5* nestes lisógenos e a toxicidade dos produtos do gene clonado pode ser suficiente para prevenir o estabelecimento de plasmídios nos lisógenos λ DE3 na *E.coli*, mesmo que esta expressão seja a níveis basais,. Este motivo levou à utilização de vetores que contenham o promotor T7 *lac* (Studier, F.W. & Dubendorff, J.W., 1988 (trabalho não publicado) apud Studier, F.W. *et al.*, 1990), caracterizado por apresentar o promotor T7 sob controle do repressor *lac* (*lacI*), através da inserção da sequência operadora *lac* após (“downstream”) a sequência promotora T7. Na presença de níveis apropriados do repressor *lac* (*lacI*), a redução da transcrição do promotor T7 *lac* pode ser normalizada pela adição de IPTG. Quando estes vetores são usados para expressar determinados genes, o repressor *lac* atua tanto no promotor *lacUV5* do cromossomo hospedeiro, reprimindo a transcrição do gene da T7 RNA polimerase pela polimerase hospedeira, como para o promotor T7*lac* do vetor, bloqueando a transcrição do gene de interesse por alguma T7 RNA polimerase que tenha sido produzida.

Um caminho que fornece estabilidade adicional para a expressão de genes de interesse, é utilizar linhagens hospedeiras contendo um plasmídio compatível que forneça uma pequena quantidade da lisoizima T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase (Moffatt, B.A. & Studier, F.W., 1987; Studier,



F.W., 1991). A lisozima T7 é uma proteína bifuncional: ela corta uma ligação específica na camada peptidoglicana da parede celular de *E.coli* (Inouye, M. *et al.*, 1973), e liga-se à T7 RNA polimerase, inibindo a transcrição. Quando produzida pelo gene clonado, altos níveis da lisozima T7 podem ser relativamente tolerados pela *E.coli*, aparentemente devido à incapacidade da proteína passar através da membrana interna para reagir com a camada peptidoglicana. A lisozima T7 é fornecida à célula através de um clone do gene da lisozima T7 no sítio BamH I do pACYC184 (Chang, A.C.Y. & Cohen, S.N., 1978). O fragmento clonado (10.665-11.296 pares de bases de T7 DNA) (Dunn, J.J. & Studier, F.W., 1983) também contém o promotor $\phi 3,8$ para a T7 RNA polimerase imediatamente após o gene da lisozima. O plasmídio contendo esta orientação de fragmento, de maneira que o gene da lisozima é expresso do promotor *tet* de pACYC184, é denominado pLysE e as células carregando este plasmídio acumulam níveis substanciais de lisozima. Um plasmídio contendo este fragmento na orientação oposta é referido como um pLysS e as células carregando este plasmídio, acumulam níveis baixíssimos de lisozima. Estes plasmídios conferem resistência ao antibiótico cloranfenicol. A presença tanto de pLysS como de pLysE aumentam a tolerância da BL21(DE3) para plasmídios contendo insertos tóxicos.



O DNA do clone selecionado em DH5 α (construções próprias: vetor pTM2-2 + fragmento de *BTX I*) foi transformado na linhagem BL21(DE3)[pLysS] e lançado posteriormente em meio de cultura (2 ml de LB) contendo antibióticos apropriados (ampicilina 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e cloranfenicol 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), MgCl_2 (10 mM) e glicose (20 mM). Após atingirem a fase log de crescimento bacteriano ($\text{OD}_{550} = 0,8-0,9$), foram submetidos à ativação com IPTG (anexo D), induzindo assim o promotor *lacUV5* do lisógeno DE3 formado e, conseqüentemente, a transcrição do gene de interesse pela T7 RNA polimerase. Um pequeno volume dessa amostra, foi corrido em gel de poliacrilamida PAGE-SDS 15% (anexo E). A figura 18 evidencia a expressão do gene da *BTX I* clonado no vetor pTMN2-2, como também a melhora de expressão da proteína em questão, após 5 horas de ativação com o IPTG (250 μM). Devido ao alto conteúdo de pontes dissulfeto apresentado pela proteína, esta apresenta uma certa insolubilidade levando à formação de agregados e, conseqüentemente, de corpos de inclusão. Estes corpos de inclusão puderam ser obtidos através da lise das bactérias em 100 mM de Tris. pH 8,0, 10 mM de EDTA, 0,5% de Triton X-100, juntamente com sonicação. Devido ao seu alto peso molecular, os corpos de inclusão podem ser facilmente separados através de centrifugação (12000 g, 10 minutos) e repetição do processo de



sonicação no material precipitado obtido. Uma amostra foi aplicada no gel de poliacrilamida PAGE-SDS.

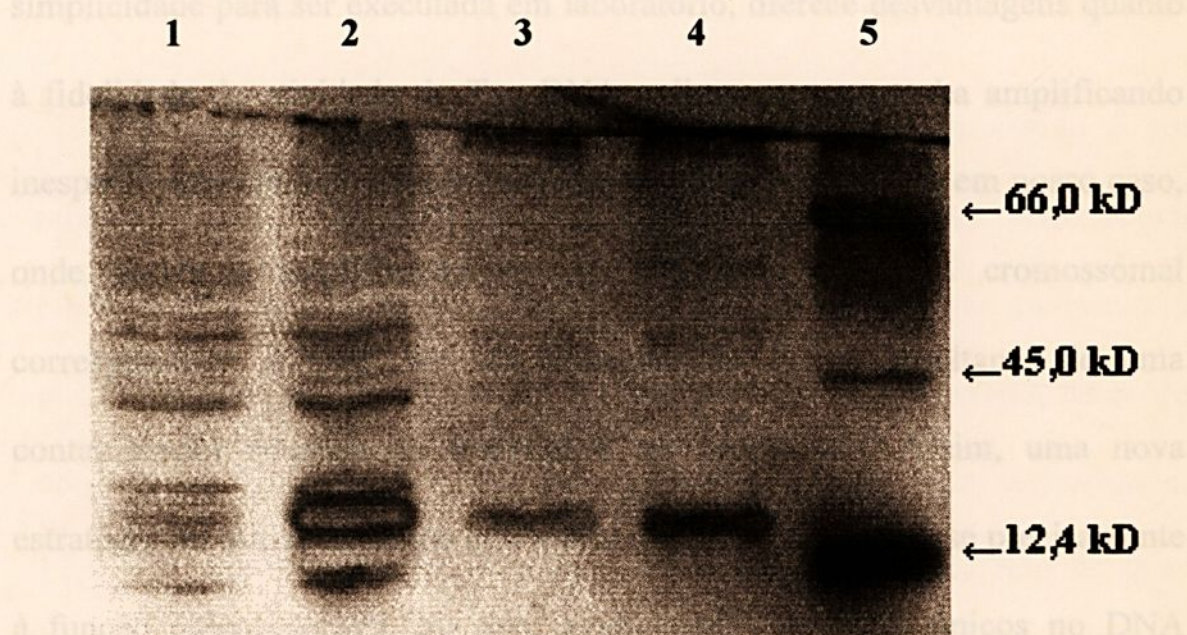


Figura 18: Análise da expressão da *BTX I* em gel de poliacrilamida PAGE-SDS 15%. Linha 1: pTM2-2-*BTX I*, sem ativação com IPTG; linha 2: pTM2-2- *BTX I*, induzido com IPTG (250 μ M) após 5 horas; linha 3: *BTX I* extraída de corpos de inclusão; linha 4: o mesmo material, no dobro do volume; linha 5: marcador: citocromo-C, apresentando uma banda de 12,4 kD.

VIII.1. DISCUSSÃO

Foram feitos basicamente dois procedimentos de mutagênese sítio-dirigida para a obtenção da construção correta do vetor de expressão

contendo a sequência codificadora da Bttx I. O primeiro deles, contou com a utilização da reação de PCR para amplificação e mutagênese do fragmento. No entanto, apesar desta técnica oferecer vantagens com relação à rapidez e simplicidade para ser executada em laboratório, oferece desvantagens quanto à fidelidade de atividade da Taq DNA polimerase que acaba amplificando inespecificamente, inclusive contaminantes. Este fato ocorreu em nosso caso, onde houve a amplificação de um fragmento de DNA cromossomal correspondente à ORF 949 da linhagem de *E.coli*, resultante de uma contaminação ocorrida no material a ser processado. Assim, uma nova estratégia foi utilizada, sendo que a denominação ESU refere-se precisamente à função desempenhada, ou seja, a eliminação de sítios únicos no DNA plasmídico através de oligonucleotídios específicos. Esta técnica forneceu o resultado desejado e obtivemos a construção correta do pTM2-2 + *BTX I*.

O sistema de expressão para a Bttx I (pTM2-2-*BTX I*) foi estabelecido, mostrando forte expressão após indução com IPTG (250 μ M). Estes resultados se encontram coerentes com o trabalho de Deng, T. *et al.* (1990) para a expressão da PLA₂ pancreática bovina. Neste, foi utilizado o vetor de expressão pTO-N, que apresenta o forte promotor T7 altamente regulado, a sequência *ompA* Shine-Dalgarno, seguida pela sequência *OmpA*, a região de clonagem e o peptídeo sinal *OmpA*. Assim como o pTM2-2, os RNAs



produzidos pelo vetor são protegidos pelas estruturas secundárias de ambas extremidades dos RNAs. Podemos inferir que estas características são essenciais no vetor de expressão utilizado para a obtenção de expressão de proteínas tóxicas.

Um outro ponto muito importante que merece ser discutido é com relação à banda evidenciada no gel de poliacrilamida referente à expressão da proteína (Figura 8, linha 2). A proteína recombinante expressa apresenta um peso molecular de 13,7 kD sendo que o peso molecular esperado, de acordo com cálculos relativos à sua sequência de aminoácidos, que corresponde à 13,8 kD. A comprovação desta correta explanação vem do fato de que a construção do pTM2-2 com *BTX I* apresenta a inclusão de 21 aminoácidos referentes à sequência sinal de Omp A (PM=2,4 kD) e, a migração da *BTX I* + sequência sinal, ou *BTX I* não processada, corresponderia a uma banda de aproximadamente 16 kD, que, como evidenciado no gel, se encontra ausente. Este resultado demonstra, portanto, que a proteína recombinante foi processada corretamente, ou seja, a sequência sinal Omp A caracterizada por um peso molecular de 2,4 kD, responsável pelo direcionamento da proteína no espaço periplásmico, foi corretamente clivada pelas proteases endógenas.



A *E.coli* é um hospedeiro incompatível para a expressão de muitas proteínas eucarióticas, em particular, para as proteínas tóxicas. O uso da linhagem BL21(DE3)[pLysS] conjuntamente com o vetor pTM2-2, em nosso caso, permitiu a expressão da proteína no espaço periplásmico da bactéria. Entretanto, a proteína que está presente em corpos de inclusão, necessita de solubilização em altas concentrações de uréia (8 M) e posteriormente, de um redobramento para a formação da proteína nativa. A expressão da *BTX I* recombinante representa uma etapa fundamental na montagem de um sistema de mutagênese de proteína, garantindo consequentemente, uma nova possibilidade de entendimento da relação entre sua estrutura e a função desempenhada.



IX. CONCLUSÃO

O presente estudo levou às seguintes conclusões:

1. A análise comparativa das seqüências de fosfolipases agrupadas em bancos de dados de proteínas possibilitou a identificação de resíduos de aminoácidos característicos para a subfamília de PLA2s Lys-49, sendo que esta distribuição não ocorre aleatoriamente.

2. A localização destes resíduos de aminoácidos levou à identificação de quatro (4) regiões, representadas pelo centro hidrofóbico, pela ligação de cálcio, pela superfície de contato da proteína com a membrana plasmática e pela interface dimérica.

3. A utilização das técnicas de mutagênese sítio-dirigida para eliminação de sítios únicos (ESU) aliada à reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilitou o estabelecimento de um sistema de expressão para a proteína Btxtx I através da utilização do vetor de expressão pTM2-2 contendo o inserto correspondente ao gene da *BTX I*. A linhagem de expressão utilizada



foi a *E.coli* BL21(DE3)[pLysS], sendo que um alto nível de expressão foi conseguido, após cinco horas de ativação com 250 μ M de IPTG.

As fosfolipases A_2 (PLA₂s) (E.C.3.1.1.4) são enzimas pequenas e estáveis que catalisam a hidrólise da ligação éster na posição *sn*-2 de um fosfolipídio. Estão distribuídas em uma grande variedade de tecidos, podendo ser encontradas tanto intracelularmente como extracelularmente. O alto grau de homologia das seqüências de aminoácidos apresentado pelas PLA₂s, permite a sua classificação em dois grupos, bem como a identificação de posições específicas envolvidas em sua atividade funcional.

Os propósitos do presente estudo foram avaliar os efeitos das mutações pontuais específicas das PLA₂s Lys-49 através da análise das seqüências de aminoácidos de várias PLA₂s dos grupos I, II e PLA₂s Lys-49, como também estabelecer um sistema de expressão para a botropstoxina I (Btxtx I) de *Bothrops jararacussu*, uma PLA₂ Lys-49, na linhagem de *E.coli* BL21(DE3)[pLysS].



X. RESUMO

As fosfolipases A_2 (PLA_2 s) (E.C.3.1.1.4) são enzimas pequenas e estáveis que catalisam a hidrólise da ligação éster na posição *sn*-2 de um fosfolípido. Estão distribuídas em uma grande variedade de tecidos, podendo ser encontradas tanto intracelularmente como extracelularmente. O alto grau de homologia das seqüências de aminoácidos apresentado pelas PLA_2 s, permite a sua classificação em dois grupos, bem como a identificação de posições específicas envolvidas em sua atividade funcional.

Os propósitos do presente estudo foram avaliar os efeitos das mutações pontuais específicas das PLA_2 s Lys-49 através da análise das seqüências de aminoácidos de várias PLA_2 s dos grupos I, II e PLA_2 s Lys-49, como também estabelecer um sistema de expressão para a botropstoxina I (Bttx I) de *Bothrops jararacussu*, uma PLA_2 Lys-49 na linhagem de *E.coli* BL21(DE3)[pLysS].



O estudo computacional comparativo, realizado em 76 seqüências de PLA₂s contidas em bancos de dados de proteínas, através do programa estatístico ANPOS, permitiu a identificação de resíduos característicos da subfamília de PLA₂s Lys-49 e mostrou que estes resíduos não estão distribuídos aleatoriamente na proteína. O programa MOLSCRIPT permitiu a visualização da distribuição destes resíduos e a caracterização de quatro regiões na estrutura da proteína (centro hidrofóbico, ligação de cálcio, superfície de contato e interface dimérica).

O gene da *BTX I* foi subclonado no vetor de expressão pTM2-2 através da utilização da técnica de PCR, possibilitando a criação de sítios de restrição para as enzimas *HinD III* e *Nhe I*. Após transformação na linhagem de *E.coli* BL21(DE3)[pLysS], foram obtidos altos níveis de expressão da proteína recombinante após 5 horas de indução com IPTG (250 µM).

As conclusões obtidas indicam que de acordo com o estudo computacional desenvolvido, a distribuição dos resíduos de aminoácidos estão relacionados com regiões características da proteína, envolvidas direta ou indiretamente com sua atividade funcional. A utilização das técnicas de mutagênese sítio-dirigida aliada à (PCR) para a expressão da Bttx I



representa uma importante ferramenta para a compreensão da relação entre estrutura e função de proteínas.

Phospholipases A_2 (PLA_2) are small, stable proteins which catalyse the hydrolysis of fatty acid ester bonds at the sn-2 position of phospholipids. The enzymes are distributed in a wide variety of tissues and are localized both intracellularly and extracellularly. The high degree homology of aminoacid sequence show by PLA_2 s allows them to be classified into two groups, and permits the identification of specific positions involved with functional activity.

The aim of the present study was to evaluate the effects of site-specific mutations on the PLA_2 s Lys-49 through aminoacid sequence analysis all of groups I, II and PLA_2 s Lys-49, and in addition establish an expression system a PLA_2 Lys-49 into the *E.coli* BL21(DE3)[pLysS] using the bothropstoxin I from the venom *Bothrops jararacussu* as a model system.

A comparative study of 76 PLA_2 s in the protein database with the statistical analysis program ANPOS identified the characteristic residues of



XI. SUMMARY

Phospholipases A₂ (PLA₂) are small, stable proteins which catalyse the hydrolysis of fatty acid ester bonds at the sn-2 position of phospholipids. The enzymes are distributed in a wide variety of tissues and are localized both intracellularly and extracellularly. The high degree homology of aminoacid sequence show by PLA₂s allows them to be classified into two groups, and permits the identification of specific positions involved with functional activity.

The aim of the present study was to evaluate the effects of site-specific mutations on the PLA₂s Lys-49 through aminoacid sequence analysis all of groups I, II and PLA₂s Lys-49, and in addition establish an expression system a PLA₂ Lys-49 into the *E.coli* BL21(DE3)[pLysS] using the bothropstoxin I from the venom *Bothrops jararacussu* as a model system.

A comparative study of 76 PLA₂s in the protein database with the statistical analysis program ANPOS identified the characteristic residues of



the subfamily Lys-49. The program MOLSCRIPT permitted visualization of the distribution of these residues and the characterization of four regions (hydrophobic core, calcium binding, contact surface and dimeric interface).

The *BTX I* gene was subcloned into expression vector pTM2-2 using PCR to generate restriction sites for the enzymes Nhe I and Hind III. After transformation of *E.coli* host BL21(DE3)[pLysS], high levels of recombinant protein were expressed after five (5) hours of induction with IPTG (250 μ M).

37°C com agitação vigorosa.

2- Centrifugar a cultura a aproximadamente 3323 g por 10 minutos a 4°C em Sorval RC 5B Plus (rotor SS34).

3- Remover o meio por aspiração, deixando o precipitado bacterial (pellet) secar quanto possível.

4- Ressuspender o pellet bacterial obtido em 1,5% do volume com a Solução I. Adicionar 1 ml da solução de lisozima (Sigma) (10 mg/ml em 10mM de Tris.Cl pH 8,0).

5- Adicionar 1,5 volumes da Solução II recém-preparada. Inverter o tubo fechado gentilmente por várias vezes e depois estocá-lo a temperatura ambiente por 5-10 minutos.

6- Adicionar 2 volumes de Solução III. Inverter o tubo fechado gentilmente por várias vezes e depois estocá-lo em gelo por 10 minutos.



XII. ANEXOS

A- EXTRAÇÃO DE DNA POR LISE ALCALINA (Maniatis, 1989)

1- Transferir uma colônia bacteriana em 500 ml de meio LB (Luria-Bertani) contendo ampicilina (100 µg/ml). Incubar a cultura durante a noite a 37°C com agitação vigorosa.

2- Centrifugar a cultura a aproximadamente 3323 g por 10 minutos a 4°C em Sorval RC 5B Plus (rotor SS34).

3- Remover o meio por aspiração, deixando o precipitado bacteriano (pellet) secar quanto possível.

4- Ressuspender o pellet bacteriano obtido em 1,5% do volume com a Solução I. Adicionar 1 ml da solução de lisozima (Sigma) (10 mg/ml em 10mM de Tris.Cl pH 8,0).

5- Adicionar 1,5 volumes da Solução II recém-preparada. Inverter o tubo fechado gentilmente por várias vezes e depois estocá-lo a temperatura ambiente por 5-10 minutos.

6- Adicionar 2 volumes de Solução III. Inverter o tubo fechado gentilmente por várias vezes e depois estocá-lo em gelo por 10 minutos.



7- Centrifugar o lisado bacterial a aproximadamente 13000 g por 15 minutos a 4°C. Transferir o sobrenadante para um novo tubo. Adicionar 2 vezes o volume total de isopropanol, misturar e estocar a temperatura ambiente por 15 minutos.

8- Centrifugar a aproximadamente 26500 g por 10 minutos a 4°C.

9- Lavar o pellet com etanol 70%. Repetir o passo 8, e então permitir que o pellet de ácido nucléico seque no ar por aproximadamente 10 minutos.

10- Redissolver o ácido nucléico em 1,5 ml de TE (Tris.EDTA)(Sigma) pH 8,0.

11- Tratamento com Proteinase K (Pharmacia)(50µg/ml). A Proteinase K reage na seguinte solução: 10 mM Tris.HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, SDS 1% (Sigma). Incubar a 45°C por 10 horas e inativar com 100µM de PMSF(Sigma).

12- Incubar então com RNase (Pharmacia)(100µg/ml) a 45°C, por 30 minutos.

Solução I: 50 mM glicose
25 mM Tris.Cl (ph 8.0)
10 mM EDTA (ph 8.0)

Esta solução pode ser autoclavada por 15 minutos ou filtrada em filtro estéril Millipore 0.22 µm.



Solução II: 0,2 N NaOH (recém-diluído de um estoque 10N)

1% SDS

Solução III: Acetato de potássio 5M 60ml

Ácido acético glacial 11,5 ml

H₂O 28,5 ml

A solução resultante é 3M com respeito ao potássio, e 5M com respeito ao acetato.

- 1- Pesar um tubo (ependorf).
- 2- Cortar a banda de interesse com material estéril.
- 3- Colocar no tubo eppendorf pesado e pesá-lo novamente para subtrair o peso do tubo sozinho e determinar o atual peso do fragmento de agarose. Se o peso for menor que 250 mg, proceder como descrito abaixo, caso contrário, aumentar os volumes dos reagentes proporcionalmente.
- 4- Adicionar 250 µg de Gel Solubilizador, e agitar o tubo (Agitador de tubos PANEM Mod.251) vigorosamente. Incubar a 60°C por 5-10 minutos ou até que a agarose dissolva.
- 5- Agitar o tubo reservatório do Sephaglas BP para formar uma suspensão uniforme. Adicionar 5 µl dessa suspensão ao gel dissolvido e agitar gentilmente. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, agitando gentilmente a cada minuto para ressuspender o Sephaglas.



B- PURIFICAÇÃO

O métodos utilizado para a obtenção da banda de interesse para a clonagem foi o seguinte:

Sephaglas[®] Band Prep Kit (Pharmacia)

- 1- Pesar um tubo (eppendorf) .
- 2- Cortar a banda de interesse com material estéril.
- 3- Colocar no tubo eppendorf pesado e pesá-lo novamente para subtrair o peso do tubo sozinho e determinar o atual peso do fragmento de agarose. Se o peso for menor que 250 mg, proceder como descrito abaixo, caso contrário, aumentar os volumes dos reagentes proporcionalmente.
- 4- Adicionar 250 µg de Gel Solubilizador, e agitar o tubo (Agitador de tubos FANEM Mod.251) vigorosamente. Incubar a 60°C por 5-10 minutos ou até que a agarose dissolva.
- 5- Agitar o tubo reservatório do Sephaglas BP para formar uma suspensão uniforme. Adicionar 5 µl dessa suspensão ao gel dissolvido e agitar gentilmente. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, agitando gentilmente a cada minuto para ressuspender o Sephaglas.



6- Centrifugar por 30 segundos em microcentrífuga e cuidadosamente remover o sobrenadante, sem destruir o pellet de Sephaglas.

7- Adicionar 40 µl de Tampão de Lavagem ao pellet formado e pipetar várias vezes para ressuspendê-lo. Proceder como no passo 6 e repetir o passo 7 em sua totalidade até completar três lavagens.

8- Agitar o tubo para dispersar o pellet de Sephaglas. Inverter o tubo e permitir sua secagem ao ar por 10 minutos.

9- Adicionar 20 µl de tampão de eluição, agitando gentilmente para, ressuspender o pellet e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente com agitação periódica. Centrifugar por 1 minuto. Remover o sobrenadante e transferi-lo para um tubo limpo. O DNA eluído pode ser estocado a -20°C se necessário.

Reagentes:

Sephaglas BP: 20% (m/v) de Sephaglas BP suspenso em solução aquosa.

Gel solubilizador: solução tampão contendo NaI.

Tampão de lavagem: 20 mM de Tris.HCl (pH 8,0), 1mM EDTA, 0,1 mM NaCl e etanol.

Tampão de eluição: 10 mM de Tris.HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA.



C- TRANSFORMAÇÃO

C1-Transformação Padrão

1- Fazer um pré-inóculo com a linhagem de *E.coli* de interesse em 2 ml de meio SOB (Maniatis, 1989).

2- Inocular a cultura obtida em um volume maior de meio, incubar a 37°C com agitação vigorosa até um crescimento de $4-7 \times 10^7$ células viáveis/ml.

3- Coletar a cultura em tubos de centrifuga ou tubos Falcon e deixar em gelo por 10-15 minutos.

4- Centrifugar a aproximadamente 600 g por 12-15 minutos a 4°C. Secar o pellet invertendo o tubo.

5- Ressuspender as células em 1/3 do volume de cultura de TFB (Tampão de Transformação Padrão) por agitação moderada. Incubar em gelo por 10-15 minutos.

6- Proceder como no passo 4.

7- Ressuspender as células em TFB a 1/12,5 do volume original.

8- Adicionar a solução DMSO/DTT a 3,5% (v/v) no centro da suspensão celular e agitar o tubo cuidadosamente. Incubar em gelo por 10 minutos.



9- Adicionar uma segunda alíquota de DMSO/DTT como no passo acima. Incubar em gelo 10-20 minutos.

10- Pipetar 210 µl dessa solução em um novo tubo e adicionar a solução de DNA (volume menor que 20 µl). Agitar e incubar em gelo por 20-40 minutos.

11- Fazer o choque térmico nas células por 90 segundos a 42°C e retornar os tubos em gelo por 2 minutos. Adicionar 800 µl de meio SOC (Maniatis, 1989) em cada tubo. Incubar a 37°C com agitação moderada por 30-60 minutos e plaquear.

1)TFB:

		<u>Concentração final</u>
KCl (ultrapuro)	7,4 g/l	100 mM
MnCl ₄ H ₂ O	8,9 g/l	45 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,5 g/l	10 mM
HACoCl ₃	0,8 g/l	3 mM
K-MES	20 ml de estoque 0,5M (pH6,3)	10 mM

2) Solução DMSO/DTT (DnD):

	<u>Quantidade/10ml</u>	<u>Concentração final</u>
DTT	1,53 g	1 M
DMSO	9 ml	90%(v/v)
Acetato de Potássio	100 µl de estoque 1M (pH 7,5)	10 mM



Nota: Filtrar a solução DTT em filtro Millipore 0,22 μ m. A solução DnD não precisa ser esterilizada por filtração se a solução estoque de acetato de potássio for estéril.

C2- Transformação Rápida

1. Retirar várias colônias diretamente de uma placa-agar.
2. Dispersar as colônias em 200 μ l de tampão de transformação padrão (TFB) por vigorosa agitação ou por pipetações repetidas.
3. Incubar as células em gelo por 10 minutos.
4. Adicionar a solução de DNA (10-200 ng), misturar e incubar em gelo por 10 minutos.
5. Fazer choque térmico das células a 37°C-42°C por 90 segundos.
6. Plaquear várias frações (por exemplo, 1%, 5%, 25%) em meio seletivo apropriado.



D- ATIVAÇÃO COM IPTG

1. Inocular as colônias de interesse em 2-2,5 ml de meio de cultura LB contendo o antibiótico necessário, glicose (20 mM) e MgCl_2 (10mM) até atingir OD_{550} de 0,8-0,9.

2. Dividir o volume das culturas em dois tubos, separando assim o material controle e o material que será ativado com 10 μl de IPTG (0,25mM).

3. Coletar amostras após 2 horas (100 μl) e após 3 horas (100 μl), processando-as imediatamente da seguinte maneira: centrifugar o material com o objetivo de concentrá-lo em um pellet (precipitado); descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 50 μl de tampão de amostra. Estocar a -20°C até a checagem em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).



E- GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS)

O gel de poliacrilamida 15% utilizado, segue o protocolo contendo as seguintes soluções estoque:

1) Acrilamida (30%)

Para um volume de 100 ml: 30g de acrilamida
0,8g de bis-acrilamida

2) Tampão de corrida do gel (100 ml)

18,7g Tris	1,5 M Tris.Cl pH 8,8
0,4g SDS	0,4% SDS

Acertar o pH para 8,8 com HCl.

3) Tampão do gel de empacotamento (100 ml)

6,06g Tris	0,5M Tris-HCl pH 6,8
0,4g SDS	0,4% de SDS

Acertar o pH para 6,8 com HCl.



Solução para o gel de corrida (gel de acrilamida 15%-60 ml)

30 ml da solução estoque de acrilamida 15%
15 ml do tampão de corrida (0,375M Tris.HCl pH 8,8, 0,1% SDS)
11,66 ml de água
300 µl de persulfato de amônio 10% (APS 10%)
40 µl TEMED
-Polimerizar

4) Tampão de sobreposição (por gel)

2 ml de tampão de corrida do gel pH 8,8
6 ml de água

Solução para o gel de empacotamento (10 ml-5% acrilamida)

1,65 ml do estoque de acrilamida
2,5 ml do tampão de empacotamento
5,75 ml de água
0,1 ml de APS 10%
7 µl de TEMED

Tampão para eletroforese (por litro)

3,03 g de Tris	0,025M Tris
14,41 g de Glicina	0,192M Glicina



1 g. de SDS

0,1% SDS

Fazer esta solução para um volume de 1 litro, com um pH final de 8,3.

O gel deve ser eletroforisado a 30 mA, até que o corante azul de bromofenol esteja a 1 cm do final do gel (aproximadamente 4 horas). (Cuba utilizada: BioRad Mod. Mini PROTEAN[®] II Cell; fonte: Power PAC 3000 BioRad).

Tampão de amostra

0,0625M de Tris.Cl pH6,8

5ml de Tris 0,125M pH6,8

2-10% de SDS

2-10 ml de SDS 10%

10% de glicerol

1 ml de glicerol

5% de mercaptoetanol

0,5 ml de mercaptoetanol

0,001% de azul de bromofenol

0,1% - diluição de 100X

Após a corrida, os géis foram submetidos à coloração em prata, cujo protocolo se encontra a seguir.



COLORAÇÃO EM PRATA

A. Soluções estoque:

1) Fixador:

30% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético.

2) Tampão Tiosulfato (Redutor)

Para 300 ml de etanol, adicionar 650 ml de água e 2,5 ml de acetato de sódio 4M.

Ajustar o pH para 6,0 com ácido acético glacial, e completar para um volume de 1 litro. Estocar a 4°C.

Imediatamente antes do uso, adicionar 100 mg de tiosulfato para 100 ml de tampão tiosulfato.

3) Nitrato de Prata

Adicionar 0,1 % (m/v) de AgNO_3 em H_2O ; adicionar diretamente na solução 25µl/100ml de solução de formamida (37% - Merck), imediatamente antes do uso.



4) Revelador

2,5% (m/v) Na_2CO_3 , 50 μl /100 ml de formamida.

O revelador deve ser feito antes do uso, mas uma solução estoque de 12,5% de Na_2CO_3 pode ser guardada a temperatura ambiente.

B) Coloração:

1. Incubar o gel no fixador por 15 minutos. Repetir esta operação por 2 vezes.
2. Colocar a solução redutora e incubar por 30 minutos.
3. Lavar em H_2O , 3 vezes por 30 minutos cada uma.
4. Colocar a solução de AgNO_3 e incubar por 30 minutos.
5. Lavar o gel rapidamente em H_2O e passar para o revelador.
6. Parar a reação com a adição de ácido acético glacial em uma concentração final de aproximadamente 1% (0,5ml/50ml). Misturar por 5 minutos.
8. Lavar em H_2O , 3 vezes por 5 minutos cada uma.



XIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, A. R., Ruggiero-Neto, J., Arni, R., Casari, G., Ward, R. J. Identification and Analysis of Unique Residues in a Group of Non-cleavage of a hybrid protein from *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 15(9), 3793-3797.
- Alves, A. R., Ruggiero-Neto, J., Arni, R., Casari, G., Ward, R. J. Identification and Analysis of Unique Residues in a Group of Non-cleavage of a hybrid protein from *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 15(9), 3793-3797.
- Alves, A. R., Ruggiero-Neto, J., Arni, R., Casari, G., Ward, R. J. Cloning and Expression of Bothropstoxin I from *Bothrops jararacussu*. In: XXV^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Hotel Glória, Caxambu-MG, 1996. Resumos, p.13.
- Arni, R. K., Ward, R. J., Gutierrez, J.M. e Tulinsky, A. (1995a). Structure of a calcium independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. *Acta Crystall.*, D.51, 311-317.
- Arni, R. K., Ward, R. J., Cintra, A. C. O. e Giglio, J. R. (1995b). Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Botrops jararacussu*. *Toxicon*, 33 (3), 383-386.
- Arni, R. K. & Ward, R. J. (1996). Phospholipase A₂ - A Structural Review. *Toxicon* (in press).



- Baker, E.N. e Hubbard, R.E. (1984). *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **44**, 97-179.
- Chang, A.C.Y. e Cohen, S.N. (1978). *J. Bacteriol.*, **134**, 1141.
- De Geus, P., Van den Bergh, C.J., Kuipers, O., Verheij, H.M., Hoekstra, W.P.M. and De Haas, G.H. (1987). Expression of porcine pancreatic phospholipase A₂. Generation of active enzyme by sequence-specific cleavage of a hybrid protein from *E.coli*. *Nucleic Acids Research*. **15**(9), 3743-3759.
- Deng, T., Noel, J.P. e Tsai, M-D. (1990). A novel expression vector for high-level synthesis and secretion of foreign proteins in *E.coli*: overproduction of bovine pancreatic phospholipase A₂. *Gene*, **93**, 229-234.
- Dennis, E. A. (1994). Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **269**, 13057-13060.
- Dennis, E.A. (1983). Phospholipases. *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) 3 rd Ed. Academic Press, New York., **16**, 307-353.
- Díaz, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. and Gené, J.A. (1991) The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochim. et Biophys. Acta*. **1070**, 455-460.



- Dunn, J.J. e Studier, F.W. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* **166**, 477-535.
- Francis, B., Gutierrez, J. M., Lomonte, B. and Kaiser I. I. (1991). Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A₂. *Arch. Biochem. Biophys.*, **284**, 352-359.
- Francis, B., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. & Kaiser, I.I. (1991). Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch Biochem. Biophys.*, **284**, 352-359.
- Giglio, J.R, Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B.. (1993). Bothropstoxin-I: Amino Acid Sequence and Function. *Journal of Protein Chemistry*, **12** (1), 57-64.
- Hanahan, D.J. (1971). Phospholipases. *The Enzymes* (Boyer - 3 ed.) **5**, 71-85.
- Heinrickson, R. L. (1991). Dissection and Sequence Analysis of Phospholipase A₂. *Methods in Enzymol.*, **197**, 201-215.
- Homsi-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L. e Giglio, J.R. (1988). Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*, **26** (7), 615-627.
- Inouye, M., Arnheim, N. e Sternglanz, R. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 7247.



Jain, M.K. Maliwal, B.P., Yu, B-Z., Szmecinski, H., Squier, T., van Binsbergen, J., Slotboom, A.J. (1994). Functional significance of the conformational dynamics of the N-terminal segment of secreted Phospholipase A₂ at the interface. *Biochem.*, **33**, 4509-4516.

Kraulis, P. J., "Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures" (1991). *J. of Applied Crystallography*, **24**, 946-950.

Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. and Inoue, K. (1993). Mammalian non-pancreatic phospholipases A₂. *Biochem Biophys Acta.*, **117**, 217-231.

Lomonte, B. & Gutiérrez, J. M. (1989). A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon*, **27**, 725-733.

Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L. A. (1994). Broad cystolytic specificity of myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, **32**, 1359-1369.

Maniatis, T., Sambrook, J. e Fritsch, E.F. (1989) in "Molecular Cloning: a laboratory manual", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Ramirez, F. and Jain, M. K. (1991) Phospholipase A₂ at the Bilayer Interface.

Proteins: Structure, Function and Genetics, **9**, 229-239.



- Mayer, R.J. and Marshall, L.A. (1993) New insights on mammalian phospholipase A₂(s); comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes. *The FASEB J.* **7**, 339-348.
- Moffatt, B.A. e Studier, F.W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell.* **49**, 221.
- Movva, N.R., Nakamura, K. and Inouye, M. Amino Acid sequence of the signal peptide of OmpA protein, a major outer membrane protein of E.Coli. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**. 27-29.
- Noel, J., Bingman, C.A., Deng, T., Dupureur, C.M., Hamilton, K.J., Jiang, R.T., Kwak, J.G., Sekharudu, C., Sundaralingam, M. e Tsai, M.D. (1991). Phospholipase A₂ Engineering. X-ray Structural and Functional Evidence for the Interaction of Lysine-56 with Substrates. *Biochem.*, **30**, 11801-11811.
- Peters, A.R., Dekker, N., van den Berg, L., Boelens, R., Kaptein, R., Slotboom, A.J. e de Haas, G.H. (1992). Conformational changes in phospholipase A₂ upon binding to micellar interfaces in the absence and presence of competitive inhibitors. A ¹H and ¹⁵N NMR Study. *Biochem.*, **31**, 10024-10030.
- Ramirez, F. and Jain, M. K. (1991) Phospholipase A₂ at the Bilayer Interface. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **9**, 229-239.



- Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B. W., Drenth, J. and Sigler, P.B. (1985).
A comparasion of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine
pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11627-11636.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.-s, Lin, S.-W, Dunn, J.J. and Studier,
F.W. (1987). Vectors for seletive expression of cloned DNAs by T7 RNA
polymerase. *Gene*, **56**, 125-135.
- Rosenberg, M., Ho-Y.-S and Shatzman, A. (1983). The use of pKC30 and its
derivatives for controlled expression of genes. *Methods Enzymol.* **101**,
123-138.
- Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, R. F., Gubensek, F., Gutiérrez, J. M., Luly,
P., Massoud, R., Morero, R. and Pedersen, J .Z. (1992). Calcium Ion
Independent Membrane Leakage Induced by Phospholipase- like
Myotoxins. *Biochemistry*, **31**, 12424-12430.
- Scott, D. L., Achari, A., Vidal, J. C. and Slgler, P. B.(1992).
Crystallographical and biochemical studies of the (inactive) Lys-49
Phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*.
J. Biol. Chem., **267**, 22645-22657.
- Scott, D.L. and Sigler, P.B. (1994). Structure and catalytic mechanism of
secretory phospholipase A₂. *Advances in Protein Chemistry.* **45**, 53-88.



- Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H. and Sigler, P.B. (1990). Interfacial Catalysis: The Mechanism of Phospholipase A₂. *Science*, **250**, 1541-1546.
- Studier, F.W., Campbell, J.L. e Richardson, C.C. (1978). Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2276.
- Studier, F.W., McAllister, W.T., Morris, C., Rosenberg, A.H. (1981). Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection. *J.Mol.Biol.* **153**, 527.
- Studier, F.W. e Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* **189**, 113.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. e Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct the expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.*, **219**, 37-44.
- Van den Berg, C., Slotboom, A. J., Verheij, H. M. e de Haas, G. (1988). *Eur. J. Biochem.*, **176**, 353-357.



Van den Berg, C., Slotboom, A. J., Verheij, H. M. e de Haas, G. (1989). The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A₂ and their importance for enzymatic activity. *J. Cell. Biochem.*, **39**, 379-390.

Van den Bosch, H., van Schail, R.H.N., Verhoeven, N.M., Neijls, F.W., Aarsman, A.J. (1993). Cloning of the cDNA coding for 14 kDa group II phospholipase A₂ from rat liver. *Biochem. et Biophys. Acta.* **1169**, 1-11.

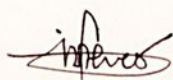
Ward, R. J., Monesi, N., Arni, R. K., Larson, R. E. e Paço-Larson, M.L.(1995). Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Gene*, **156**(2), 305-306.

São José do Rio Preto, setembro de 1996.

Adriana Rodrigues Alves



São José do Rio Preto, setembro de 1996.


Adriana Rodrigues Alves



