

Fátima Pereira de Souza

**Ligação da Angiotensina II à Região Promotora
dos Genes do Sistema Renina – Angiotensina:
Evidências para Regulação Autógena**





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

FÁTIMA PEREIRA DE SOUZA

**LIGAÇÃO DA ANGIOTENSINA II À REGIÃO PROMOTORA DOS
GENES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA: EVIDÊNCIAS PARA
REGULAÇÃO AUTÓGENA**

Fajara
K-S
Mmm

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

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO RUGGIERO NETO



790/98

São José do Rio Preto - SP

-1997-



Agradecimentos

À Prof. Dr. João Ruggieri Neto, pela orientação, incentivo, oportunidade, confiança, compreensão, paciência e amizade, cujas foram de grande importância durante a iniciação científica e na execução deste trabalho.

À Prof. Dr. José Eduardo Krieger, Laboratório de Biologia Molecular da UNESP, pela confiança e grande colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dr. Marcelo Antônio Farias, Departamento de Física, pela carinho e apoio, e pelos conselhos profissionais durante a realização deste trabalho, principalmente no período mais difícil e inspirado pelo exemplo profissional.

À Prof. Dr. Afely Gama, Departamento de Geologia, pela carinho, amizade, e pelos conselhos profissionais, pelo apoio emocional e espiritual, durante a realização deste trabalho, sobretudo pelo exemplo profissional.

À Maria de Lourdes Jureguera pela amizade e auxílio durante a realização do Laboratório de Biologia Molecular da UNESP e após durante a realização deste trabalho.

Dedico

À Prof. Dr. ...
À minha tia Constância, que está no plano superior e aos meus pais Ananias e Deocleciana.

À Prof. Madalena ... pelo apoio financeiro durante o segundo ano de graduação.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto, pela orientação, incentivo, oportunidade, confiança, compreensão, paciência e amizade, as quais foram de grande importância durante a iniciação científica e no transcorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, Laboratório de Biologia Molecular do Incor USP, pela confiança, e grande colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey, Departamento de Física, pelo carinho e amizade, e pelos conselhos profissionais, durante a realização deste trabalho, principalmente no período mais difícil e sobretudo pelo exemplo profissional

Ao Prof. Dr. Arif Cais, Departamento de Zoologia, pelo carinho, amizade, e pelos conselhos profissionais, pelo apoio emocional e espiritual, durante a realização deste trabalho, sobretudo pelo exemplo profissional.

À Maria de Lourdes Junqueira pela amizade e auxílio durante a utilização do Laboratório de Biologia Molecular do Incor USP, e apoio durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Cláudia Bonini Domingues, pelo carinho, amizade, durante a realização deste trabalho.

À Prof. Madalena Volpe, pelo apoio financeiro durante o segundo ano de graduação.

Ao Prof. Dra. Eloíza Helena Tajara, Departamento de Biologia, pelo incentivo a busca de conhecimentos científicos no início da pós-graduação.

Ao Prof. Uderlei Donizete Covissi, pelo auxílio no transcorrer da iniciação científica e pelo companherismo.

Ao Prof. Dr. Luiz Juliano Neto, Departamento de Biofísica Escola Paulista de Medicina UNESP.

Ao Prof. Dr. Laerte Miola, Departamento de Química, pelo uso do Espectrofluorímetro, durante a realização de parte deste trabalho.

Aos professores José Ruggiero, Márcio F. Colombo, Elso D. Filho, Augusto Augustinho, Jorge Chaine, Marinomio Cornélio, Jhony, José Ramon, Eloi Feitosa, e Gustavo Bonila, Departamento de Física pela gentileza e amizade com que sempre me trataram durante o transcorrer deste trabalho.

Aos funcionários Ilva, Paulo R. Salinas, Antonio A. Barbosa, Francisca F. Barbosa, Aparecida Mansor, Tonilha e Eldes pelo carinho e pela assessoria necessária a realização deste trabalho.

Aos amigos: Fernanda Canduri, Gláucia Peglow, Fábio Renato Lombardi, Renato César Caetano, Alice Moda, Lourdes Vanessa, Valéria Cristina Rufo, Osmar Caôn Filho, Adriana Angélica, e Carlos Henrique Favero pela amizade, carinho, compreensão e companherismo.

Aos colegas de Laboratório: André Luis, Leandra Watanabi, Maria Bernadete, Alexandre, Benatti, Dulcinéia, Cecília, Ocimar, Selma, Lucimara Chioato, Fabiola, Arthur Henrique, Norma, Adriana, Macgaiver, Flavio, Sandra, Murilo, Alexandre Teso, Raquel, Milton,

Giovani, Jeniffer, João Ricardo, Roberto Ruller, Ana Leticia, Mariangela e Alessandra Tróvó.

Às colegas do Departamento de Biologia: Ana Regina, Ana Paula, Lígia Marcia, e Patrícia Casseb.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular Incor, em especial à Ivy e Maria Luisa.

Ao Dr. Sirio Hassen Sobrinho, pelo dedicação e carinho durante meu reestabelecimento.

À Maria do Carmo Junqueira, pela ajuda na revisão bibliográfica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Richard Jhon Ward, pela correção do resumo em inglês.

Aos meus pais Ananias e Deocleciana, pelo amor, compreensão, incentivo e dedicação durante todo tempo.

Ao meu irmão Aparecido que sempre me assistiu, auxiliou e incentivou.

Aos meus irmãos Tereza, Jesus, Catarina, e meus sobrinhos Vitor, Vagner, André e João.

Sobretudo agradeço à Deus, pela vida e pelo aprendizado que esta nos proporciona.

ÍNDICE

RESUMO	01
SUMMARY	03
I-INTRODUÇÃO	05
I-1.Bases Genéticas da Hipertensão	05
I-2.O Sistema Renina-Angiotensina	07
I-3.A Região promotora dos Genes do SRA	13
I-4.A Regulação da Expressão dos Genes do SRA	17
I-5.Objetivo	25
II-MATERIAIS E MÉTODOS	26
II.1-Materiais	26
II.2-Métodos	27
II.2.1-Extração Plasmidial	27
II.2.2-Purificação do Fragmento de 1.3Kb	30
II.3-Experimento de Ligação de Angiotensina-DNA	31
II.3.1-Titulações Fluorimétricas	31
II.3.2-Análise da Isotérma de Ligação	33
II.3.3-Co-eletroforese de Afinidade	37
II.3.4-Retardamento em Gel (Gel Shift)	38



II.3.5-Medidas de Dicroísmo Circular	38
III-RESULTADOS	40
III.1-Titulações Fluorimétricas	40
III.2-Co-eletroforese de Afinidade	50
III.3-Retardamento em Gel (Gel Shift)	57
III.4-Medidas de Dicroísmo Circular	59
IV-DISCUSSÃO	61
VI-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -Esquema da região 5' flanqueadora do gene que codifica os componentes do sistema renina-angiotensina	16
Figura 2 -Titulação de angiotensina II com o plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene angiotensinogênio	41
Figura 3 -Titulação de angiotensina II com o plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene da renina	42
Figura 4 -Titulação de angiotensina II com DNA de timo de bezerro	43
Figura 5 -Titulação de angiotensina II com o plasmídeo W+	44
Figura 6 -Titulação angiotensina II com plasmídeo PstI	45
Figura 7 -Titulação de angiotensina II com o plasmídeo W131	46
Figura 8 -Titulação de angiotensina II com o plasmídeo PstI acrescido de 0,7M de NaCl	47
Figura 9 -Titulação de angiotensina II com pLB	49
Figura 10 - Gráfico de Scatchard	49
Figura 11 -Gel de co-eletroforese de afinidade realizada em pH 7.5, com amostra de plasmídeo contendo o fragmento de 132pb	51
Figura 12 -Gel de co-eletroforese de afinidade realizada em pH 8.75, com amostra de plasmídeo contendo o fragmento de 132pb	52
Figura 13 -Gel de co-eletroforese de afinidade realizada em pH 8.75, com amostra de plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene da renina	53
Figura 14 -Gel de co-eletroforese de afinidade realizada pH 8.75, com amostra de plasmídeo pUC18	55

Figura 15- Gel de co-eletroforese de afinidade realizada pH 8.75, com amostrado fragmento de 1,3Kb da região promotora do gene da ECA **56**

Figura 16- Gel de eletroforese realizada com de fragmento 132pb da região promotora do gene da ECA **58**

Figura 17- Medida de CD utilizando plasmídeo W+ **60**

RESUMO

O sistema Renina-Angiotensina (SRA) envolve três proteínas principais, angiotensinogênio, renina e enzima conversora da angiotensina I (ECA), que estão envolvidas na homeostasia vascular.

A expressão dos genes do SRA pode ser também tecido-específica, na qual podem estar envolvidos vários laços de *feedback* para a regulação da expressão destes genes.

O propósito deste trabalho é evidenciar, através da leitura de ligação, se a angiotensina II (AngII) reconhece e se liga à região promotora de alguns destes genes, atuando como um fator regulador da expressão gênica.

As evidências para ligação foram obtidos através de titulações fluorimétricas em soluções de AngII marcados com marcador fluorescente, derivado do ácido benzóico.

Plasmídeos analisados apresentam inserção de 1300pb das regiões promotoras dos genes do angiotensinogênio, da renina e da ECA, bem como os fragmentos da região promotora do gene da ECA de 510pb, 232pb, 132pb e o plasmídeo pLB.

O fragmento de 1300pb do gene da ECA foi analisado pelo método de co-eletroforese de afinidade, enquanto o de 132pb por gel de retardamento "gel shift".



Utilizamos também método de dicroísmo circular para o plasmídeo que continha 1300pb da região promotora da ECA.

Em conclusão, existem evidências de que a AngII se liga a região promotora do gene da ECA e, desta forma, a AngII poderia atuar como fator regulador autógeno para a expressão deste gene.



SUMMARY

The Renin-Angiotensin System (RAS) involves three main proteins: angiotensinogen, renin and angiotensin I converting enzyme (ACE) and is involved in vascular homeostasis.

Expression of the RAS genes can be tissue-specific in which several feedback loops appear to be involved in the regulation of the expression the Renin-Angiotensin System.

The aim of this study is to ascertain if angiotensin II (AngII) recognizes and binds to the promoter region of some of these genes, thereby acting as a regulating factor in gene expression.

Plasmids pLB, containing insertions of either the 1300bp from the promoter region of the angiotensinogen gene, the 1300bp from the renin gene, the 1300bp from the ACE gene or the 510bp, 232 bp, 132bp fragments ACE gene promoter region, were analysed by solution fluorimetric titrations method of AngII marked with the fluorescent label benzoic acid. Analysis of ACE 1.3kb fragments were analysed by the co-eletroforesis method, whereas the 132bp was analysed by the band-shift agarose gel electrophoresis.

The plasmid which contains 1300bp of the promoter region of ECA was also studied using circular dichroism.



In conclusion there are evidence that AngII binds with the ACE gene promoter region and so can activate as a transcription autogen factor.

1.1. Bases Genéticas da Hipertensão

A hipertensão é uma doença cardiovascular grave responsável por aproximadamente 20 a 30% da mortalidade da população (10-15% em 1994).

Em aproximadamente 20% dos casos de hipertensão, a pressão sanguínea elevada é um sinal inicial de doença específica, como por exemplo, doença renal. 20% dos casos de hipertensão não podem ser atribuídos a qualquer causa específica, sendo chamados hipertensão essencial ou primária (SHEKHTER, 1976). Os indivíduos com hipertensão essencial apresentam níveis plasmáticos normais ou até mesmo baixos de renina e angiotensina II, com distribuição semelhante a população normal, portanto, esta desordem poderia estar relacionada a mutação genética específica destas substâncias (SHEKHTER et al., 1976).

A hipertensão essencial é uma desordem na qual uma variedade de fatores ambientais e genéticos contribuem para aumentar a pressão sanguínea (KIDDER et al., 1992).

Embora a maior frequência seja de casos de hipertensão essencial, nos casos não há evidência para uma causa específica nem para



I-INTRODUÇÃO

I.1- Bases Genéticas da Hipertensão

A hipertensão é uma doença cardiovascular grave responsável por aproximadamente 20 a 30% de mortalidade da população (HILBERT, 1991).

Em aproximadamente 20% dos casos de hipertensão, a pressão sangüínea elevada é um sinal clínico de doença específica, como por exemplo, doença renal; 80% dos casos de hipertensão não podem ser atribuídos a qualquer causa conhecida, sendo chamados hipertensão essencial ou primária (SELKURT, 1976). Os indivíduos com hipertensão essencial apresentam níveis plasmáticos normais, ou até mesmo baixos, de renina e angiotensina II, com distribuição semelhante à população normal, entretanto, esta desordem poderia estar relacionada à produção tecido-específica destas substâncias (HELLIGE *et al.*, s.d).

A hipertensão essencial é uma desordem na qual uma variedade de fatores ambientais e genéticos contribuem para aumentar a pressão sangüínea (KURTZ *et al.*, 1992).

Embora a maior freqüência seja de casos de hipertensão essencial, sua causa não foi esclarecida ainda, mas estudos familiares mostram



que de 20 a 40% dos casos de hipertensão essencial podem ter base genética. Estudos epidemiológicos indicam também que a distribuição da pressão sanguínea na população é contínua e que a base genética desta desordem parece ser poligênica, e não seguir um padrão de herança mendeliana, (HILBERT *et al.*, 1991). Provavelmente vários genes que interagem com fatores ambientais estimulam a pressão alta em pessoas susceptíveis.

Os genes reguladores da pressão sanguínea em rato podem estar localizados no cromossomo 1 nas vizinhanças do gene da família calicreína, o gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) no cromossoma 10 e o da renina no cromossomo 13 (KURTZ, 1992).

A ECA é importante na homeostase cardiovascular, pois atua na conversão de angiotensina I (AngI) no peptídeo vasoconstritor angiotensina II (AngII), produto final do sistema renina angiotensina (HILBERT *et al.*, 1991).

A ECA pode ter o papel regulador do sistema renina-angiotensina plasmático, bem como no tecido. Consequentemente, os genes codificadores dos componentes deste sistema são potenciais candidatos para participar das bases genéticas da hipertensão essencial investigada (HILBERT *et al.*, 1991).



I.2 O Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) desempenha um papel fundamental na regulação da pressão sanguínea e na regulação homeostática de fluidos e eletrólitos do organismo. Este sistema é classicamente entendido como um sistema “endócrino” no qual a substância ativa é a angiotensina II (AngII), produzida pela clivagem enzimática dupla a partir do substrato angiotensinogênio. A renina atua sobre o angiotensinogênio, produz angiotensina I que é clivada pela ECA em Angiotensina II, esta atuará na vasoconstrição.

Estruturalmente o angiotensinogênio é uma glicoproteína globular de massa molecular 55-65 kD e cerca de 452 resíduos de aminoácidos, dependendo de seu grau de glicosilação, apresenta de 13 a 14% de carboidratos. Esta glicoproteína é originária do tecido hepático, da zona pericentral dos lóbulos do fígado principalmente. O mRNA do angiotensinogênio apresenta o peptídeo sinal com cerca de 24 a 33 resíduos de aminoácidos que é clivado depois da tradução (GRIENDLING *et al.*, 1993). O angiotensinogênio é lançado na corrente sanguínea onde pode sofrer a clivagem enzimática, pela renina, na ponte Leu-Val ou Leu-Leu na região N-terminal (BOUHNİK *et al.*, 1981). A posição desta clivagem irá depender da espécie fornecedora da amostra de angiotensinogênio. A renina



é uma protease aspártica de cadeia simples de massa molecular de 37 a 40 kD (DZAU & PRATT 1992).

Inicialmente, o mRNA da renina é traduzido em preprorenina, cujo peptídeo sinal é removido da região N-terminal e é glicosilada durante o transporte pelo retículo endoplasmático, onde se torna prorenina. A prorenina entra no caminho constitutivo, sofre uma clivagem enzimática e formando a cadeia simples de renina, que será secretada pelo aparelho de Golgi, ou sofre uma segunda clivagem enzimática resultando em duas cadeias simples, que se ligarão por ponte dissulfeto, e é armazenada em grânulos (DZAU & PRATT, 1992) a serem secretados através de um caminho regulatório sofisticado. A renina, que é a enzima ativa, apresenta estrutura primária com duplo domínio, contendo amino e carboxi-terminal similares, apresenta ainda uma estrutura lobular em torno do sítio ativo. A renina contém resíduos altamente básicos, que não estão presentes nas demais proteases aspárticas, e são importantes para determinar a especificidade ao angiotensinogênio (DZAU & PRATT, 1992). A região catalítica apresenta dois resíduos de ácido aspártico que atuam sobre o angiotensinogênio em nível plasmático, produzindo a angiotensina I, que é o decapeptídeo inativo.

A angiotensina I é clivada em angiotensina II pela ectoenzima plasmática ou transmembrânica, a ECA, que é uma carboxi-terminal-dipeptidil peptidase de massa molecular 140-180 kD produzida



principalmente no epitélio pulmonar, e com massa molecular de 90-110 kD quando produzida nas células testiculares (CORNELL *et al.*, 1995). Apresenta-se sob duas formas: ligada à membrana pelo seu domínio C-terminal hidrofóbico e a plasmática que perde seu domínio C-terminal por uma provável clivagem proteolítica pós-traducional. Ambas desempenham papel físico-químico e enzimático idêntico (WEI *et al.*, 1990), e exibem apenas um dos dois sítios ativo, com quatro resíduos funcionais representados pela tirosina, arginina, glutamina e lisina (DZAU & PRATT, 1992).

A AngII, que é um octapeptídeo vasoconstritor, ao atingir os receptores nos órgãos alvos, principalmente no endotélio vascular e no córtex adrenal via circulação, liga-se aos seus receptores de membrana (Esses receptores compreendem AT1, que é um membro da superfamília de receptores ligados à proteína G, com 7 domínios transmembrânicos) e dá origem a dois sinais distintos, regulados de maneira diferente.

A transferência da informação para o sistema efetor intracelular é realizada pelas proteínas G reguladoras. Na primeira fase, ocorre a inibição da adenil ciclase, com conseqüente ativação da fosfolipase C e fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato, induzindo a produção de trifosfato inositol e diacilglicerol, induzindo, deste modo, a redução na concentração de cAMP ou o aumento do nível de cálcio intracelular, devido à abertura dos canais



de cálcio e, conseqüentemente o aumento da pressão arterial. Na segunda fase, com o acúmulo do diacilglicerol e ativação da proteína quinase C, a fosfolipase D media a hidrólise da fosfatidilcolina e assim ocorre a alcalinização do meio intracelular, que esta associado a fenômeno de crescimento celular (GRIENDLING *et al.*, 1993).

Quando a AngII atinge os locais receptores nos órgãos alvo, principalmente no endotélio vascular e no córtex adrenal, provoca um aumento do nível de cálcio citosólico aumentando consideravelmente o tônus vascular. Concomitantemente, as células glomerulares do córtex adrenal reagem à AngII, produzindo aldosterona que atuará na retenção de sódio e água. O cálcio intracelular acumulado, provoca ainda uma inibição da síntese da ECA e da renina, e esta inibição pode ser determinada em parte em nível transcricional (KRIEGER, 1996). Existem evidências de que a infusão de cálcio pode levar a mudanças na excreção de sódio e/ou alterações na hemodinâmica renal e pode ainda influenciar indiretamente a liberação de renina. O cálcio pode desempenhar um importante papel como mensageiro celular para outros elementos que afetam a liberação da renina (DZAU & PRATT, 1992).

O estímulo de receptores β -adrenérgicos ou baixa pressão de perfusão, que hiperpolariza a membrana das células justaglomerulares, resulta em perda de cálcio intracelular. Este decréscimo de cálcio



intracelular pode ter um sinal positivo para liberação da renina armazenada na forma de grânulos. Inibidores da liberação da renina tais como a AngII ou alta pressão de perfusão atuam despolarizando a membrana das células justaglomerulares, resultando no influxo de cálcio extracelular e aumentando o nível de cálcio intracelular (NAFTLAN *et al.*, 1982). Tais eventos provocam uma diminuição na síntese de AngII. Este bloqueio na síntese de AngII ocorre devido à inibição na produção de ECA e de renina, evidenciando “feedback” negativo da AngII sobre a síntese da ECA e renina, via acúmulo de cálcio intracelular e redução de cAMP (DZAU & PRATT, 1992).

De acordo com KRIEGER (1996), a AngII desempenha múltiplas funções nos diversos órgãos, principalmente nos relacionados ao sistema cardiovascular. Esta é uma visão endócrina do SRA que está sofrendo modificações profundas para dar lugar a um conceito mais amplo, no qual as múltiplas funções do SRA englobariam também ações do tipo “parácrina” e “autócrina” da AngII, pois esta e seus derivados são produzidos localmente nos vários tecidos, incluindo o rim, adrenal, coração, sistema nervoso e vasos.

A AngII ativa o sistema nervoso simpático e esta ativação envolve aumento da síntese e liberação de norepinefrina, inibição pré e pós-sináptica e o aumento da sensibilidade à catecolamina na célula alvo. Na homeostasia



sódio/água, o efeito da aldosterona é complementado pelo aumento do ACTH e excreção de hormônios antidiuréticos, que concomitantemente causa aumento da sede e da necessidade de reposição de sal. A AngII também pode afetar o equilíbrio eletrolítico pela natriurese mediada pelo sistema nervoso central (SNC) (HELLIGE *et al.*, s.d).

A existência de sistemas compartimentalizados, observados devido à localização do mRNA dos componentes do SRA por meio de técnicas de biologia molecular, mostram que os diversos componentes podem ser regulados de maneira independente e tecido-específica. Deste modo desconhecemos a cinética da reação de ativação do SRA em cada um dos sistemas compartimentalizados, de forma que é difícil prever-se qual é o fator limitante para ativação do sistema e da produção de AngII (KRIEGER, 1996). Um dos pontos importantes seria conhecer a forma com que os genes responsáveis pela síntese das proteínas deste sistema são regulados, como estes genes estão estruturados e qual a contribuição da angiotensina II para a regulação da expressão destes genes.



I.3- A Região Promotora dos Genes do SRA

Do ponto de vista de biologia e genética moleculares, o que se procura é um melhor entendimento para os mecanismos de regulação da expressão dos genes codificadores das proteínas envolvidas no SRA. Sabe-se que as regiões 5' *upstream* flanqueando os genes destas proteínas contêm várias regiões promotoras e potencializadoras, bem como elementos reguladores, que atuam em conjunto para regular a expressão biológica do gene, como mostrado na (**figura 1**). Sabe-se ainda que no sistema SRA, a expressão do mRNA, tanto da renina como do angiotensinogênio e da ECA, parece ser regulada de maneira tecido-específica.

A região codificadora do gene da renina contém sequência de aproximadamente 12,5 Kb, composta de nove exons e oito íntrons, sendo que no gene humano existe um exon adicional. A região 5' flanqueadora do gene da renina, contém elementos regulatórios essenciais. Nesta região estão presentes os três principais elementos de controle: o promotor, os potencializadores e elementos regulatórios. A região promotora compreende duas caixas TATA, localizadas na posição de -77 a -71 (TAATAAA) e de -29 a -23 (TATAAAA), designadas respectivamente P1 e P2, regiões estas que são altamente conservadas em diferentes espécies (DZAU & PRATT 1992). Os elementos regulatórios e potencializadores apresentam duas



seqüências consenso para elemento responsivo de ação cis para cAMP, três para o glucocorticóide (**GRE**), duas para a progesterona (**PRO**) e uma para estrógeno (**ERE**). Nesta região existem também uma sequência para polioma e três para SV40. A regulação direta deste gene por estas supostas moléculas regulatórias vem sendo investigada (GRIENDLING *et al.*, 1993). Transfecção transiente da sequência de -224 a -138 e de -75 a -47 em células derivadas de rim embrionário de camundongo, permitem identificar também dois elementos importantes na transcrição, no gene da renina, **RU-1**, de -224 a -138 e **RP-2**, -de 75 a -47 (TAMURA *et al.*, 1992 e TAMURA *et al.*, 1993).

A região promotora do gene do angiotensinogênio com aproximadamente 1300pb, apresenta sequência consenso para elemento responsivo glucocorticóide (**GRE**), um elemento responsivo tireoideano (**TRE**), um elemento responsivo estrogênico (**ERE**), uma sequência “enhancer” (**ENH**), cAMP e duas seqüências promotoras, caixa TATA e um elemento CAAT próximo ao sítio de iniciação. Além desses, contém a região promotora proximal localizada de -96 a +22, dois elementos de ação cis **AGE2** de -96 a -52 e **AGE3** de -6 a +22 (TAMURA *et al.*, 1994), um elemento responsivo de fase aguda **APRE** de -531 a -557, contendo uma sequência 5'-AGTTGGGATTTCACACC-3' que é reconhecida por diferentes proteínas que se ligam ao DNA. Os elementos de ação cis



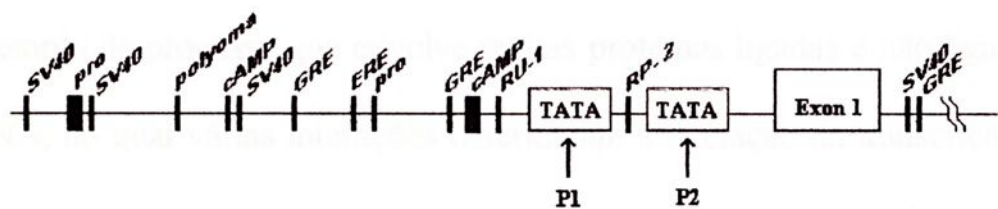
localizados na posição -1222 a +44 que compreende a caixa TATA e o sítio de iniciação, são importantes na expressão do gene angiotensinogênio humano em células de hepatócito hepG2. Em especial, o promotor central AGCE1 do gene humano, que se localiza na sequência de -16 a +44 do sítio de iniciação, apresenta importância na transcrição. O AGCE1 ativa a transcrição do angiotensinogênio através do elemento *upstream* ou elemento *dawnstream* central (YANAI *et al.*, 1996).

O angiotensinogênio apresenta na região promotora proximal elemento regulador negativo e elemento regulador positivo, que se localiza entre a sequência PAL e GRE, próximo à caixa TATA (ZHAO *et al.*, 1992).

A região 5' flanqueadora do gene da enzima conversora da angiotensina contendo cerca de 1300pb também tem várias unidades de transcrição, sequências promotoras e elementos regulatórios. A região promotora contém dois blocos de sequência localizada entre as posições -1 a -260 e -670 a -950 com 60% de homologia entre humano e camundongo. A região promotora do gene da ECA de rato apresenta três sequências consenso para o sítio de ligação Sp1 (GGCGGG). Apresenta ainda sítio de ligação AP2, cAMP, elemento responsivo glucocorticóide GRE (TGTTCT) e sequência que confere responsividade a estímulos físicos do tipo "Shear" stress (GAGACC). As sequências que possuem homologia



para regiões regulatórias conhecidas incluem a sequência rica em timina-adenina (TA) localizadas entre as bases -77 a -81 e corresponde ao consenso da caixa TATA. Apresenta ainda duas sequências consensuais H₁-Box (TGTGTTT), que é importante para a expressão dos genes da família das histonas (KRIEGER, 1996).



RENINA (Humana)



ANGIOTENSINOGENIO (Humano)



ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA
(Rato)

Figura 1: Esquema da região 5' flanqueadora do gene que codifica os componentes do sistema RA. Os supostos promotores (P1 e P2), enhancers e elementos regulatórios são mostrados para um gene humano. Legenda: GRE-elemento responsivo glicocorticóide, ERE- elemento responsivo estrogênico, P-promotor, TRE-elemento responsivo tireoidiano, APRE-elemento responsivo da fase aguda, ENH-região enhancer, PAL-sequências palíndromes.(modificado de GRIENDLING *et al.*, 1993).

I.4-Regulação da Expressão dos Genes do SRA

Muitos processos biológicos envolvem múltiplas proteínas que interagem em ordem e local específico. Entender quais as proteínas que se associam, como se associam e qual o papel que desempenham no processo biológico representam um desafio.

A transcrição gênica em eucariotos pela RNA polimerase II é um exemplo de processo que envolve muitas proteínas ligadas e não ligadas ao DNA, no qual várias interações determinam a iniciação da transcrição, que geralmente são grupos de eventos regulatórios determinantes da expressão total do gene individual.

A expressão específica dos genes nas células eucariotas é regulada em uma grande extensão de níveis transcricionais, pela interação de proteínas com elementos de controle específico do DNA organizados dentro da região 5' flanqueando o gene a ser transcrito (MANIATIS *et al.*, 1987). A organização dos elementos de controle do DNA que resulta na transcrição de um gene específico, inclui elementos promotores centrais que estão envolvidos na iniciação exata da transcrição, potencializadores e elementos silenciadores. Estes estão envolvidos na modulação da taxa de transcrição do gene através de vários efetores moleculares, tais como: hormônios, éster formol e íons metálicos. Uma combinação de



potencializador, silenciador e região promotora proximal é, portanto, responsável pela expressão específica do gene.

Análises funcionais e estruturais de vários fatores de transcrição ligados a estes elementos de ação cis mostram que eles se ligam a homodímeros ou heterodímeros de modo que a natureza modular do elemento de ação cis DNA permita interação precisa proteína-proteína entre os vários fatores de transcrição (ZHAO *et al.*, 1993).

Um gene pode ser regulado por fatores de transcrição que se ligam a uma sequência específica da região promotora, localizado *upstream* do sítio de iniciação ou a potencializadores, que podem estar a vários quilobases do sítio de iniciação. (KENNETH, 1993).

A regulação da expressão dos genes do sistema renina-angiotensina é um ponto muito importante para entendermos o processo de regulação da síntese das proteínas deste sistema e o processo de homeostasia cardiovascular, do ponto de vista dos fatores genéticos e moleculares e suas implicações no processo de regulação da pressão vascular. É importante também para o entendimento da regulação tecido-específica deste sistema e da influência causada pela angiotensina II, nos vários órgãos e demais sistemas hormonais.

Possivelmente, os reguladores da atividade transcricional do SRA sejam mediados pelo cAMP. A síntese e a secreção da renina nos rins



podem ser influenciadas pelo cAMP intracelular. O cAMP aumenta o nível de mRNA da renina através da estimulação da transcrição e também pela estabilização do mRNA depois da transcrição. (TAMURA *et al.*, 1993 e HORIUCHI *et al.*, 1991 e TAMURA *et al.*, 1994).

A biossíntese da renina no rim é regulada ainda por muitos outros fatores, incluindo balanço de cloreto de sódio, pressão sangüínea, atividade do sistema nervoso simpático e AngII, concomitantemente aos fatores de transcrição descritos anteriormente (TAMURA *et al.*, 1995). A biossíntese da renina é influenciada também por outros fatores tais como: íon cálcio, éster formol, inibição da enzima conversora e estimulação dos β -adrenérgicos (BURT *et al.*, 1989), que aumentam o nível de mRNA da renina renal. Em relação à síntese e à secreção da renina observa-se que, com a infusão de AngII no organismo, ocorre um decréscimo de renina renal. Possivelmente existe um sistema renina-angiotensina independente, pelo qual os níveis de AngII circulante exercem uma inibição da liberação na renina por ação intra-renal direta (um curto laço de *feedback*). Supostamente a AngII regula a síntese e liberação da renina através da inibição da expressão gênica (JOHNS, *et al.*, 1990), e exerce efeito inibitório direto na expressão do gene da renina nos vasos da musculatura renal.



Quanto ao angiotensinogênio hepático, os hormônios esteróides são os principais moduladores de sua síntese. Os hormônios glucocorticóides, tireoideanos e estrogênicos regulam positivamente a síntese do angiotensinogênio em nível transcricional. Provavelmente, este fato se deve a partes da região 5' flanqueando o gene do angiotensinogênio, que respondem a estes hormônios.

A AngII estimula a expressão do mRNA do angiotensinogênio por efeito de *feedback* positivo. Os níveis de angiotensinogênio são modulados sob diferentes condições fisiológicas e patofisiológicas e também são regulados de maneira tecido-específica (KLETT, *et al.*, 1993).

A síntese do angiotensinogênio hepático é dependente de numerosos hormônios e mediadores de processos inflamatórios (interleucina 1 e 6) que estimulam sua síntese, enquanto o glucagon e a prostaglandina inibem sua síntese e secreção (KLETT *et al.*, 1993).

A AngII é o principal candidato para uma regulação de *feedback* da síntese do angiotensinogênio e está relacionada ao estímulo da síntese e secreção do angiotensinogênio em cultura de hepatócito primária ou em células hepáticas parenquimais. Este estímulo pode ser realizado por meio de dois mecanismos (KLETT *et al.*, 1993): 1) A inibição da adenilil ciclase ligada à proteína G diminui a afinidade da AngII ao seu receptor e, deste modo, a fosfolipase C não é estimulada. Consequentemente, o aumento nos



níveis de trifosfato inositol, de diacilglicerol e da concentração intracelular de cálcio, que ocorreria com a estimulação da fosfolipase C, é inibido, alterando fatores que se refletem na síntese e secreção do angiotensinogênio; 2) O aumento do mRNA do angiotensinogênio não depende do estímulo transcricional, mas sim de sua estabilização via proteína polissomal 12 kD, que tem afinidade com a região (3'UTR) do mRNA do angiotensinogênio. A ativação da proteína polissomal ligada ao mRNA depende de sua fosforilação em resposta a uma inibição da proteína quinase A (KLETT *et al.*, 1995).

Um outro aspecto de grande importância é o que se observa quando ocorre um aumento na concentração de angiotensina exógena no organismo, que resulta na elevação da taxa de angiotensinogênio plasmático. Isto não significa necessariamente aumento da síntese e sim aumento da concentração plasmática por falta da clivagem exercida pela renina que, em condições de taxa elevada de AngII, apresenta sua síntese inibida devido ao efeito de *feedback* negativo que a AngII exerce sobre a síntese da renina (KHAYYALL *et al.*, 1973). Este aumento pode ser também devido às alterações provocadas pelo aumento da pressão ou alterações na produção de corticosteróide (NAKAMURA *et al.*, 1990).

Existe um sistema renina-angiotensina no tecido periférico incluindo a parede vascular, que é o principal sítio de produção de



angiotensina, além dos existentes nos vasos pulmonares e no sangue circulante. O conteúdo de ECA da parede vascular pode ser mais importante para modulação do tônus vascular do que se considera, devido à formação de AngII e à degradação da bradicinina (vasodilatador) nestes locais.

O grau do efeito anti-hipertensivo dos inibidores de ECA no tecido em relação à sua inibição no plasma foi correlacionado em aorta de coelho. A taxa de conversão de AngI em AngII foi evidenciada nas células endoteliais da parede vascular e também em rins de cães hipertensos. O aumento de ECA da parede vascular foi sugerido por desempenhar função na manutenção da hipertensão em estágio crônico (IWAI *et al.*, 1987).

Os níveis de ECA apresentam um quadro particular, sendo elevados durante a infância, diminuem e permanecem estáveis durante a vida adulta. A maturação da tireóide está envolvida no processo de regulação dos níveis de ECA do plasma (COSTERUSSE *et al.*, 1994).

Segundo SCHUNKERT *et al* (1993) a infusão de AngII no organismo diminui a concentração de ECA no plasma.

BOOZ *et al* (1992) evidencia sítio de ligação de alta afinidade para AngII na cromatina.

O grupo de Biologia Molecular do Incor-USP, liderado pelo Dr. J. E. Krieger, vem desenvolvendo um projeto de pesquisa muito interessante sobre os mecanismos moleculares envolvidos no SRA. Nesse projeto, as



análises dos processos de regulação do gene da ECA são realizadas a partir de seqüências compreendidas no fragmento 1300pb *upstream* do sítio de iniciação de transcrição deste gene, em rato. Este fragmento foi clonado no vetor de expressão da luciferase (pGL2) e transfectado em células endoteliais e renais, que sintetizam e secretam ECA. Foram co-transfectados nestas células também o vetor de expressão da β -galactosidase sob controle do promotor do simia vírus. Eles observaram expressão acentuada da luciferase na célula que continha o vetor com a região promotora da ECA, sugerindo que esta região do promotor contém elemento regulatório importante para a expressão da ECA em células endoteliais. Em seguida foram construídos mutantes de 1124, 510, 420, 288 e 232pb, a partir de deleções na sequência de 1300pb, que foram subclonados. Observou-se então a existência de sequência regulatória importante para a expressão gênica de maneira tecido-específica (KRIEGER, J. E. 1996). A adição de 56bp no fragmento de 232pb aumentou a expressão da luciferase, e diminuiu com a transfecção de fragmentos de 510, 1126 e 1300pb respectivamente, evidenciando assim a existência de uma ou mais seqüências regulatórias positivas no intervalo de -232 a -288, importantes para a expressão basal do gene da ECA, em células endoteliais. Nas células renais ocorreu um aumento na expressão da luciferase com a adição de 56bp e 132pb. Entretanto, quando o vetor



contendo inserção de 510pb foi transfectado, ocorreu um aumento ainda maior da expressão da luciferase que persistiu quando o fragmento de 1126pb foi utilizado. A expressão da luciferase diminuiu em direção aos valores basais, quando o fragmento completo W/Luc foi transfectado, demonstrando desta forma a presença de uma sequência regulatória positiva na região compreendida entre a sequência de -420 a -510 e uma sequência regulatória negativa compreendida entre -1126 e -1300pb.

O intervalo de 56pb (-232 a -288pb) localizado dentro do promotor do gene da ECA de rato contém a sequência regulatória positiva importante para a expressão basal desta enzima em células renais e endoteliais. O intervalo de 188pb (-1126 a -1300pb) localizado dentro do promotor do gene da ECA de rato contém a sequência regulatória negativa importante para expressão basal desta enzima em células renais.

Esses autores realizaram, ainda, experimentos a partir de injeção de moléculas de plasmídeos contendo a região promotora do gene da enzima conversora e também seqüências contendo fragmentos de 1124, 510, 420, 288 e 232pb no ventrículo esquerdo de rato, tendo como sinalizador o gene da luciferase. Foram observados níveis de transcrição de luciferase alterados dependendo do grau de hipertrofia cardíaca do rato e da sequência que foi injetada. Observaram também que existe uma sequência regulatória positiva no intervalo de -288 a -420, e uma sequência regulatória



negativa entre -420 e -510 e que estas são importantes para a expressão basal do gene da ECA no ventrículo esquerdo de rato.

I.5-Objetivo

Tendo em vista que a regulação da expressão do gene da ECA e da renina se dá por uma regulação de *feedback* negativo, em que a AngII é o fator limitante para a inibição ou estímulo da expressão dos genes da ECA e da renina, e tendo em vista que a AngII entra em contato com a cromatina (BOOZ *et al.*, 1992), temos como hipótese de trabalho que a regulação ocorra de forma direta. Ou seja, a AngII pode estar atuando como um fator modulador da transcrição do gene da renina e da ECA através da interação direta com a região promotora destes genes.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar se a AngII reconhece alguma seqüência na região promotora dos genes das proteínas envolvidas no sistema renina-angiotensina, a qual atua como reguladora da expressão destes genes por ligação direta ao DNA ou por competição com fatores de transcrição.



II.MATERIAIS E MÉTODOS

II.1- Materiais

No presente trabalho, foram utilizados plasmídeos (pUC) contendo insertos de 1300pb da região promotora dos genes do sistema renina angiotensina, clonados a partir do genoma de rato. Tais plasmídeos foram designados pC₂AT ANG₄, que continha inserto de 1300pb da região promotora do gene do angiotensinogênio e pC₂AT-KL-12, contendo o inserto de 1300pb da região promotora do gene da renina. No plasmídeo pLB de *E. Coli* da linhagem NM538, foi clonada a região promotora do gene da enzima conversora, sendo que este plasmídeo (contendo inserto de 1300pb com 1272pb desta região) foi designado W⁺ (estas clonagens foram realizadas pelo Dr. J. E. Krieger do Instituto do Coração Hospital das Clínicas-USP).

A partir da sequência de 1300pb contendo 1272pb da região promotora da enzima conversora da angiotensina I, foram produzidos fragmentos de 510pb designados DNA *Pst*I, de 232pb designados DNA *Sac*I e de 132pb designados W131, sendo que estes fragmentos também se apresentavam inseridos no plasmídeo pLB. O plasmídeo pLB sem inserto da região promotora do genes da ECA foi usado como controle assim como o



DNA cromossomal de timo de bezerro e o plasmídeo pUC18. Foram utilizados ainda os fragmentos de 1.3Kb e de 132pb sem estarem inseridos no vetor.

A angiotensina II usada para a realização deste trabalho, apresentava-se marcada com um marcador fluorescente derivado do ácido benzóico (que foi sintetizada pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da Escola Paulista Medicina UF SP)

II.2- Métodos

II.2.1- Extração Plasmidial

As bactérias foram pré-inoculadas, partindo de uma colônia, em 1,5ml de meio LB (MANIATIS,1989), contendo 50µg/ml do antibiótico ampicilina, e submetidas a agitação constante em Shaker Orbital Gallenkamp por um período de 12 horas, a 37°C e em seguida inoculadas em 500ml de meio LB também contendo 50µg/ml de antibiótico e novamente em agitação constante por um período de 12 a 14 horas a 37°C.

Depois de previamente crescidas, estas bactérias foram coletadas por centrifugação a 8000rpm em centrífuga Sorvall RC5B Plus a 4°C por 10



minutos. O *pellet* foi então submetido a lise alcalina. Nesta fase, as bactérias são inicialmente ressuspensas em solução contendo 50mM de Tris-HCl pH 8,0, 10mM de EDTA contendo RNase, que é necessária para a inibição enzimática de DNases, digestão de RNA e quelamento de íons Mg^{+2} . Em seguida, acrescenta-se a solução contendo 20mM de NaOH e 1% de triton, para romper a parede bacteriana a partir da dissolução da membrana lipoprotéica, solubilizando e desnaturando as proteínas devido ao rompimento das pontes dissulfeto. Em seguida, é adicionada uma solução contendo 2,6mM de acetato de potássio pH 5,2, e após misturar suavemente segue-se repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Ao acrescentar esta terceira solução, devido ao seu baixo pH e concentração salina elevada ocorre a renaturação das macromoléculas. Os plasmídeos, por serem moléculas menores e possuírem vínculos topológicos, se renaturam mais rapidamente que o DNA cromossomal e proteínas, que deste modo são precipitados durante a centrifugação à 6000rpm por 10 minutos à 4°C. O DNA plasmidial na solução de sobrenadante, é coletada. Este sobrenadante é purificado em uma mini-coluna que contém resina de afinidade e retém as moléculas de DNA, quando a solução anterior é aplicada à coluna. Finalmente, acrescenta-se 3ml de solução contendo 100mM de Tris e 10mM de KCl pH8,5 para romper as ligações DNA-resina, após centrifugação a 1000rpm por 2 minutos a 4°C, o DNA é coletado. A



purificação do DNA envolve precipitação em solução 0,75 volumes de isopropanol. O isopropanol atuará na exclusão das moléculas de água da camada de hidratação juntamente com a neutralização das cargas dos grupos fosfatos da molécula. Isto é devido à composição salina da solução que faz com que a molécula de DNA plasmidial se torne bem mais densa e precipite durante a centrifugação à 12000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante é descartado e o *pellet* é seco e ressuspendido em tampão PBS contendo 140mM de NaCl, 2,6mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄ e 1,7mM de KH₂HPO₄. Em seguida, mede-se a densidade óptica da amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280nm.

A lise alcalina também foi feita segundo MANIATS (1989) e a purificação neste caso foi feita em coluna C15/70 da Pharmacia, empacotada com resina Sephacryl S1000 (Pharmacia) equilibrada com tampão contendo 25mM de Tris HCl pH 8,0 e 10mM de EDTA pH8,0 A 25°C, na qual foi aplicada 1,5ml da amostra de DNA. Após a obtenção da linha de base, [Rikadenki Mod 8381L] as frações de pico foram coletadas e concentradas por precipitação.

Quando, após a purificação com Kit Pure prep da Pharmacia ainda restava RNA (que era detectado por eletroforese em gel de agarose 1% realizada em tampão TAE-40mM de Tris base 2mM de Na₂EDTA2H₂O, 20mM de acetato de sódio e 29,6mM de ácido acético



glacial - à 5volts/cm por uma hora e meia), esta era tratada com 20µg/ml de RNase da Pharmacia à 37⁰C por 30 minutos. A enzima era extraída com 2:1 de fenol clorofórmio.

II-2.2.Purificação do Fragmento de 1.3Kb

O fragmento de 1.3Kb foi obtido do tratamento do plasmídeo contendo inserto de 1300bp da região promotora do gene da enzima conversora com as enzimas de restrição *NotI* e *BglII*. Depois de submetido a digestão por aproximadamente 12 horas a 37⁰C, faz-se um gel de agarose para verificação desta digestão. Após a verificação, a amostra total é submetida a eletroforese em gel de agarose à concentração de 0,8% contendo 1µg/ml de brometo de etídio, a 4volts/cm por um período de aproximadamente uma hora. Em seguida a banda de interesse é visualizada por transiluminação de UV e coletada em solução de acetato de sódio 75mM. Esta amostra então passa pelo processo de extração com butanol absoluto para a retirada dos resíduos de brometo de etídio e sofre extração com 2:1 de fenol clorofórmio-álcool- isoamilico. A precipitação é feita com duas vezes o volume de etanol absoluto e 0.2N de acetato de sódio pH 5,2, o precipitado é deixado em gelo seco por aproximadamente 20 minutos,



centrifugado por 30 minutos à 14000 rpm. O sobrenadante, é descartado, o *pellet* é seco e ressuspenso em tampão TE 1x (25mM de Tris-HCL pH 8,0 e 10mM de EDTA).

II-3. Experimento de Ligação Angiotensina-DNA

3.1 Titulações Fluorimétricas

A espectroscopia de fluorescência e o monitoramento da anisotropia de fluorescência são técnicas utilizadas para medir, em solução, o perfil de ligação de pequenas moléculas e proteínas a ácidos nucleicos (LE TILLY *et al.*, 1993).

A técnica é baseada na observação de mudança na forma do movimento de uma sonda fluorescente ligada à AngII. O octapeptídeo (AngII), marcado com um marcador fluorescente derivado do ácido benzóico, quando em solução, apresenta um movimento isotrópico praticamente esférico, pois o tempo de reorientação do marcador é praticamente igual ao da angiotensina. Entretanto, quando ela se complexa com o DNA, o tempo de reorientação do marcador é bem menor que o do complexo e o movimento resultante é anisotrópico. A imagem que pode ser



feita é do movimento do marcador na superfície de um cilindro concêntrico ao eixo do complexo Angiotensina-DNA (LE TILLY & ROYER, 1993 e YANG *et al.*, 1994).

As titulações fluorimétricas foram feitas em fluorímetro Hitachi F4500, em cubetas de fluorescência de caminho óptico 1cm, em tampão PBS pH 7,4, contendo 140mM de NaCl, 2,6mM de KCl, 10mM de Na_2HPO_4 e 1,7mM de KH_2HPO_4 , usando polarizadores poliméricos.

O estudo da ligação é feito através de experimento de titulações nos quais, à solução de AngII previamente preparada (4,5 μl de $2,5 \times 10^{-5}\text{M}$ de AngII em 0,9 ml de tampão PBS), são adicionadas aliquotas de DNA plasmidial contendo inserto da região promotora dos genes do SRA. Primeiramente monitora-se a anisotropia da solução tampão (PBS) nas 4 posições de polarização, acrescenta-se 4,5 μl de AngII $2,5 \times 10^{-5}\text{M}$. Mede-se as intensidades de fluorescência, em seguida para cada aliquota de DNA adicionada, a anisotropia também é monitorada, nas intensidades de fluorescência dos feixes de excitação (320nm) e emissão (420nm) polarizados paralelo e perpendicularmente.

A anisotropia então é dada por: (YANG *et al.*, 1994).

$$r = \frac{(I_{//} - GI_{\perp})}{(I_{//} + 2GI_{\perp})}$$



Sendo $I_{//}$, paralelo é a intensidade de emissão de fluorescência paralelo ao feixe, usando excitação paralelo e $I_{\perp}$, perpendicular é a intensidade de emissão perpendicular ao feixe de excitação paralela.

Sendo:
$$G = \frac{i_{\perp}}{i_{//}} \quad \text{ou} \quad G = I_{HV}/I_{HH}$$

Sendo I_{HV} é medida da intensidade de fluorescência com excitação horizontal e emissão polarizada vertical e I_{HH} é a intensidade de fluorescência com excitação horizontal e emissão polarizada horizontal (YANG *et al.*, 1994).

3.2. Análise da Isotérma de Ligação

A isotérma de ligação é representada pelo gráfico da anisotropia em função da concentração de DNA adicionada, que será utilizada para determinar o valor da constante de equilíbrio aparente.

O processo de ligação é suficientemente rápido e o equilíbrio pode ser descrito supondo um modelo de dois estados. Desta forma, para cada aliquota de DNA adicionada, as concentrações de AngII e de DNA podem ser escritas como sendo compostas por duas distribuições: livre e ligada através das equações:



$$[AII]_t = [AII]_f + [AII]_b \quad (1)$$

$$[DNA]_t = [DNA]_f + [DNA]_b \quad (2)$$

Onde:

$[AII]_f$ = concentração molar de angiotensina livre

$[DNA]_f$ = concentração molar de DNA livre

$[AII]_b$ = concentração molar de angiotensina ligada

$[DNA]_b$ = concentração molar de DNA ligado

Desta forma, a anisotropia de fluorescência é suposta também ser composta pelas concentrações das frações de fluoróforo livre e ligado (f_b e f_f):

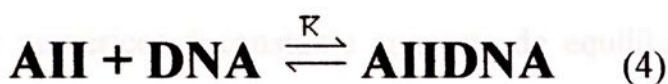
$$r = f_b \cdot [r]_b + f_f \cdot [r]_f \quad (3), \text{ onde:}$$

r = anisotropia

$[r]_b$ = anisotropia da fração de fluoróforo ligado

$[r]_f$ = anisotropia da fração de fluoróforo livre

Esta ligação pode então ser escrita como:



e a constante de equilíbrio pode então ser escrita como:

$$K = [AIIDNA] / [AII]_f \cdot [DNA]_f \quad (5)$$

Levando em conta as concentrações de angiotensina e DNA podemos reescrever a expressão (1) e (2) usando a notação:

$$[AII]_b = [AIIDNA] \text{ e } [DNA]_b = [AIIDNA],$$

desta forma temos que:

$$[AII]_f = [AII]_t - [AIIDNA] \quad (1)$$

$$[DNA]_f = [DNA]_t - [AIIDNA] \quad (2)$$

Substituindo a equação (5), temos que:

$$K = [AIIDNA] / ([AII]_t - [AIIDNA]) ([DNA]_t - [AIIDNA])$$

Nesta equação são conhecidas a $[AII]_t$ e $[DNA]_t$, pode-se então, determinar a concentração de AIIDNA em função de $[AII]_t$, $[DNA]_t$ e K que passa a ser um parâmetro ajustável

$$[AIIDNA] = \frac{(K[AII]_t + K[DNA]_t + 1) \pm \sqrt{(K[AII]_t + K[DNA]_t + 1)^2 - 4K^2[AII]_t[DNA]_t}}{2K}$$

Desta forma, temos equacionada a constante aparente de equilíbrio (K) em função da concentração do complexo formado. Atribuindo valores numéricos à constante aparente de equilíbrio e, conhecendo-se as concentrações totais de AngII e de DNA adicionado em cada passo da titulação, é possível determinar a concentração do complexo formado e também a concentração de angiotensina livre. Com este procedimento pode-se calcular as frações de angiotensina livre e ligada e o valor teórico da



anisotropia (**equação 3**) para cada aliquota de DNA adicionada à solução de AngII. Desta maneira, o valor de K é o que gera a isotérma teórica que melhor ajusta à isotérma experimental (HEYDUK & LEE, 1990). Sabendo-se a concentração de AngII ligada e livre e a concentração total de DNA, obtemos a fração de saturação, dividindo a concentração de AngII ligada pela concentração de DNA total.

Uma maneira alternativa de analisar a ligação da AngII ao DNA é usando isotérma de Scatchard. Nesta isotérma, a saturação fracional (v) da AngII é definida pela relação entre as concentrações de angiotensina complexada ao DNA e a de DNA (em pares de base), ($v = [AIIDNA]/[DNA]$). A isotérma de ligação é dada pelo gráfico de $v/[AII]_f$ vs v . No caso de um gráfico linear pode-se considerar que exista um único tipo de sítio de ligação, sendo que a inclinação da reta fornece o valor da constante de ligação e o inverso do valor de v correspondente ao intercepto em $v/[AII]_f = 0$, fornece o número de pares de base (n) ocupados por uma molécula de ligante ($n = 1/v$).



3. 3-Co-eletroforese de Afinidade

Este método consiste na associação de 2 géis de agarose, sendo que um é o gel suporte, e mede aproximadamente 12/10cm a uma concentração de 1%. Este apresenta um poço na região superior de aproximadamente 8,5cm de largura, 1mm de comprimento e 2mm de profundidade. Na região inferior do gel, a uma distância de 6mm deste poço superior e perpendicular a ele, existem 8 poços paralelos entre si, com 12cm de comprimento separados entre si por 4mm, e com 5mm de largura e 4mm de profundidade. Os poços inferiores são preenchidos com um segundo gel de agarose a 2% contendo o ligante (AngII), sendo que cada poço deste segundo gel contém uma concentração diferente de ligante.

A agarose Ultra Pure da GIBCO BRL é previamente dissolvida em tampão TAE (40mM de Tris base 2mM de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20mM de acetato de sódio e 29,6mM de ácido acético glacial pH 8,75) e fundida. O ligante em diferentes concentrações é colocado em tubos com 2,5ml de agarose 2% homogeneizada e aplicada nos poços inferiores.

Coloca-se o tampão TAE 1X (40mM de Tris base 2mM de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20mM de acetato de sódio e 29,6mM de ácido acético glacial) e em seguida aplica-se a amostra de DNA. Esta eletroforese é realizada a 4°C, por três horas a 6,5 volts/cm.



O gel é corado em 1µg/ml de brometo de etídio durante 30 minutos e submetido a visualização por transiluminação com luz UV.

3.4- Retardamento em Gel (Gel shift)

Neste experimento, utilizamos 100ng do fragmento W131, que possui 132pb, e angiotensina II, nas seguintes concentrações de 5×10^{-9} M, 5×10^{-8} M e 3×10^{-8} M e o competidor inespecífico poli (dI-dC) em uma concentração de 0.5µg/µl incubados por aproximadamente 20 minutos.

O experimento foi realizado em gel de agarose Ultra Pure da GIBCO BRL, a 1%. O gel foi feito em cuba vertical em tampão TAE pH 8,75, a uma voltagem de 5.8volts/cm, por um período de 3 horas a 4°C, em seguida corado em 1µg/ml de brometo de etídio, por um período de 30 minutos. Foram visualizados por transiluminação em luz UV.

3.5-Medidas de Dicroísmo Circular (CD)

O espectro de dicroísmo circular foi coletado para o plasmídeo contendo a região promotora do gene da enzima conversora, W+, usando



espectropolarímetro Jasco J-710, em cubetas de quartzo de caminho óptico 2mm, em tampão PBS pH 7,4, contendo 140mM de NaCl, 2,6mM de KCl, 10mM de Na_2HPO_4 e 1,7mM de KH_2HPO_4 .

Primeiramente, obtém-se o espectro da solução tampão PBS nos comprimentos de onda compreendido entre 200 e 320nm (espectro referência) e o mesmo é feito para a solução contendo uma concentração de $1,1 \times 10^{-5}\text{M}$ de DNA W+. Nesta solução de DNA, é acrescentado então $1 \times 10^{-5}\text{M}$ de AngII e novo espectro é coletado.

III-RESULTADOS

III. 1-Titulações Fluorimétricas

Foram feitas titulações com amostras de plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene do angiotensinogênio (pC₂AT ANG₄), da renina (pC₂AT-KL-12), da enzima conversora da angiotensina I (W+), da enzima conversora com deleções (WPstI DNA, WSacI DNA e W131 DNA), do plasmídeo controle (pLB), usado nos construtos contendo fragmento da região promotora da ECA e também do DNA cromossomal de timo de bezerro.

As titulações feitas com amostra do plasmídeo que contém inserto de 1300pb da região promotora do gene do angiotensinogênio em solução de AngII marcada com composto fluorescente resulta em uma isotérma de ligação, que não apresenta patamar de saturação. Os dados obtidos mostraram apenas uma variação linear e pequena da anisotropia, comportamento indicativo da ausência de formação de complexo DNA-AngII. Esses dados são apresentados no gráfico de anisotropia em função da concentração de DNA utilizada na titulação (**figura 2**).



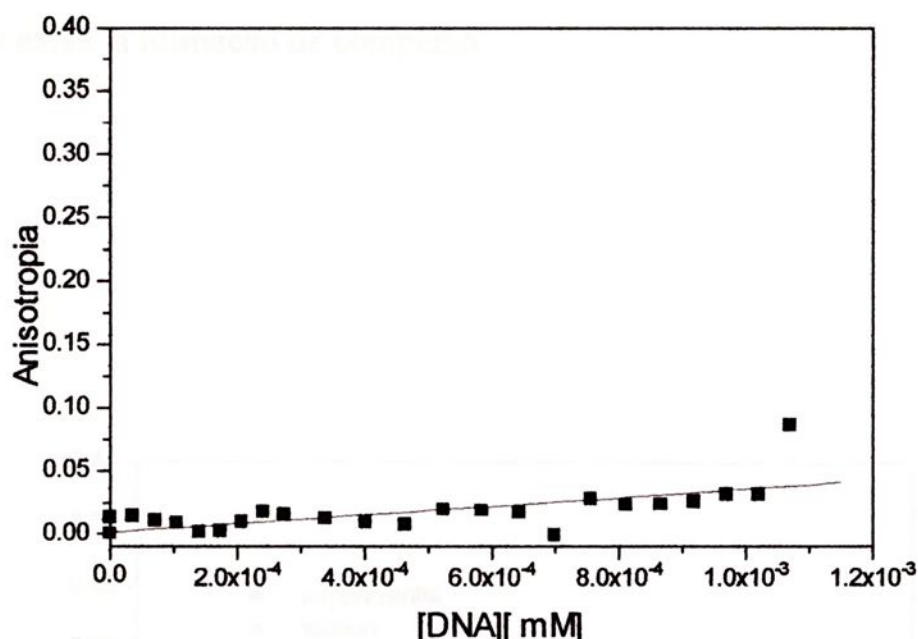


Figura 2-Titulação de angiotensina II com o plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene angiotensinogênio, numa concentração de 4μg/ml, em 0,9ml de tampão PBS e 2,5μg/μl de AngII.

Entretanto, quando as titulações são feitas com plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene da renina, o que se observa é uma variação considerável na anisotropia (**figura 3**), em relação ao comportamento observado no gráfico que representa o experimento com angiotensinogênio ou DNA cromossomal de timo de bezerro (**figura 4**). Na figura 3, pode-se dizer que existe um aumento razoável de anisotropia à medida que o plasmídeo é adicionado. Entretanto, o comportamento que caracteriza a formação de complexo é a existência de um patamar de saturação, como pode ser visto no gráfico teórico nesta figura. O aumento de

anisotropia com a inexistência de patamar de saturação não permitiu afirmar que existe a formação de complexo.

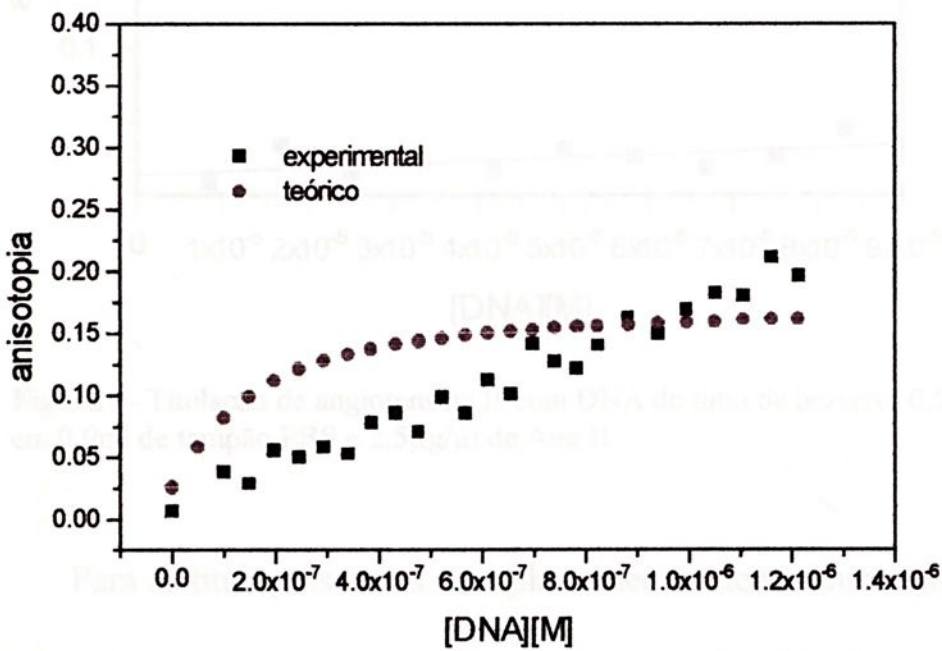


Figura 3-Titulação de angiotensina II com o plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene da renina, numa concentração de 4,54 µg/ml, em 0,9ml de tampão PBS e 2,5 µg/µl de AngII

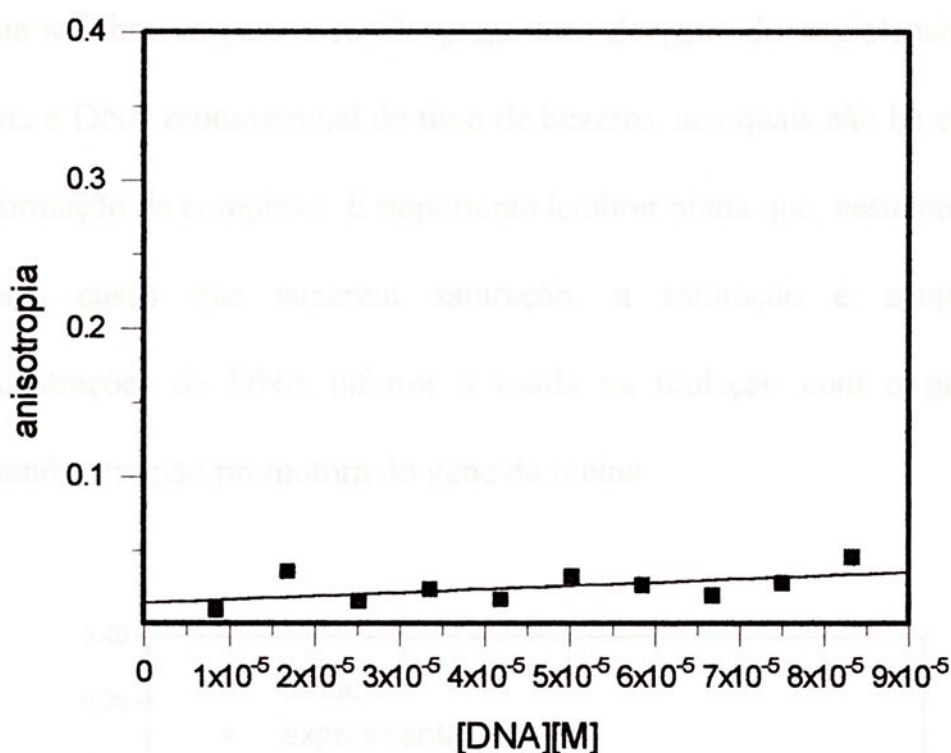


Figura 4- Titulação de angiotensina II com DNA de timo de bezerro 0,5µg/µl em 0,9ml de tampão PBS e 2,5µg/µl de Ang II.

Para as titulações feitas com plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene da enzima conversora contendo 1300pb, ocorre uma mudança bem acentuada da anisotropia de fluorescência. A (figura 5) mostra um gráfico da anisotropia em função da concentração de plasmídeo adicionado. O comportamento observado é um aumento de anisotropia, seguido de um patamar de saturação, indicativo de formação de complexo DNA-AngII. Neste gráfico, observamos também que o complexo é rapidamente formado pois, desde o início da titulação, ocorre um aumento bem acentuado da curva referente à concentração de DNA em função da

anisotropia, descartando evidência de qualquer movimento isotrópico, como o que se observa para a região promotora do gene do angiotensinogênio, renina e DNA cromossomal de timo de bezerro, nos quais não há evidência de formação de complexo. É importante lembrar ainda que, neste caso e nos demais casos que sugerem saturação, a saturação é atingida em concentrações de DNA inferior à usada na titulação com o plasmídeo contendo a região promotora do gene da renina.

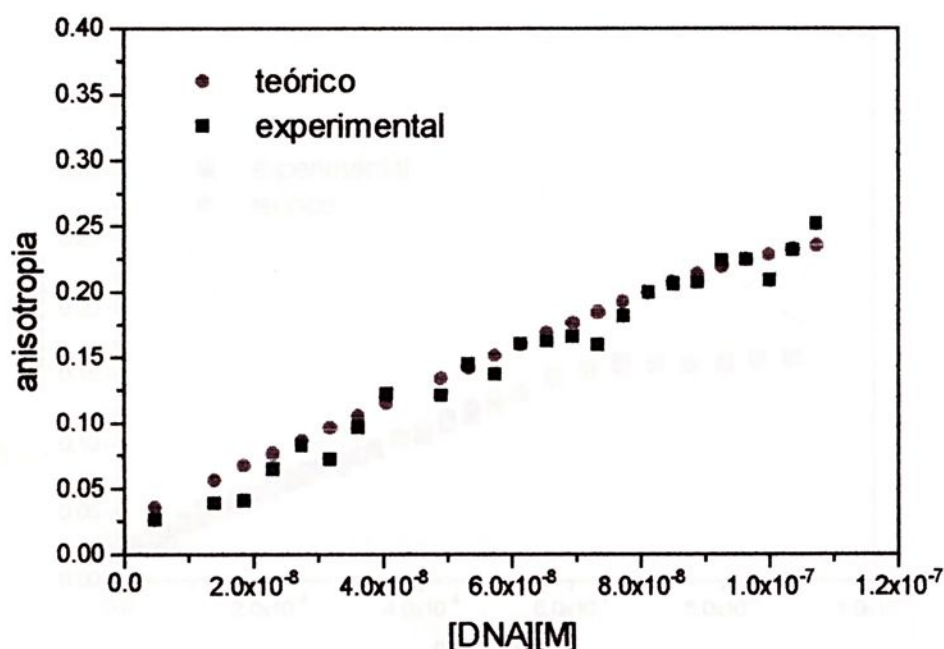


Figura 5-Titulação de angiotensina II plasmídeo W⁺, numa concentração de 3,2µg/ml, em 0,9ml de tampão PBS, em 2,5µg/µl de AngII.

Quando a titulação foi feita com fragmentos da região promotora do gene da enzima conversora (WPstI DNA), contendo uma sequência de 510pb, observou-se também um aumento na anisotropia seguido de um

patamar de saturação (**figura 6**). Este comportamento foi observado também quando a titulação é realizada com o fragmento de 232pb (WSacI DNA) e de 132pb (W131 DNA), sendo este o menor fragmento usado e que também apresenta aumento de anisotropia (**figura 7**), indicativo não só de formação de complexo mas também que a provável sequência de reconhecimento pela AngII, está na sequência compreendida no fragmento de 132pb.

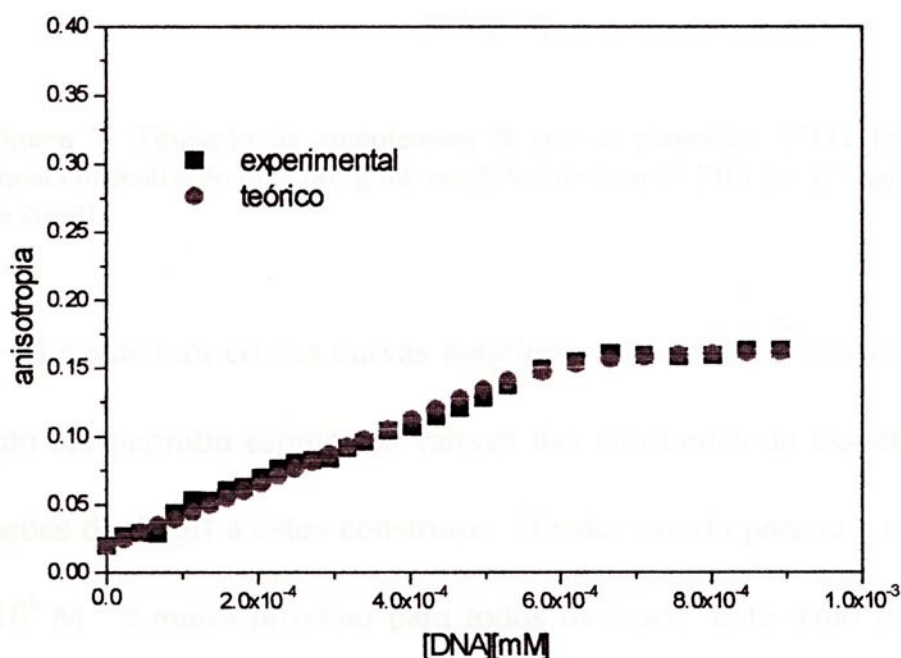


Figura 6- Titulação de angiotensina II com plasmídeo contendo a região promotora de PstI numa concentração de 2,75µg/µl em 0,9 ml de tampão PBS e 2,5µg/µl de Ang II.

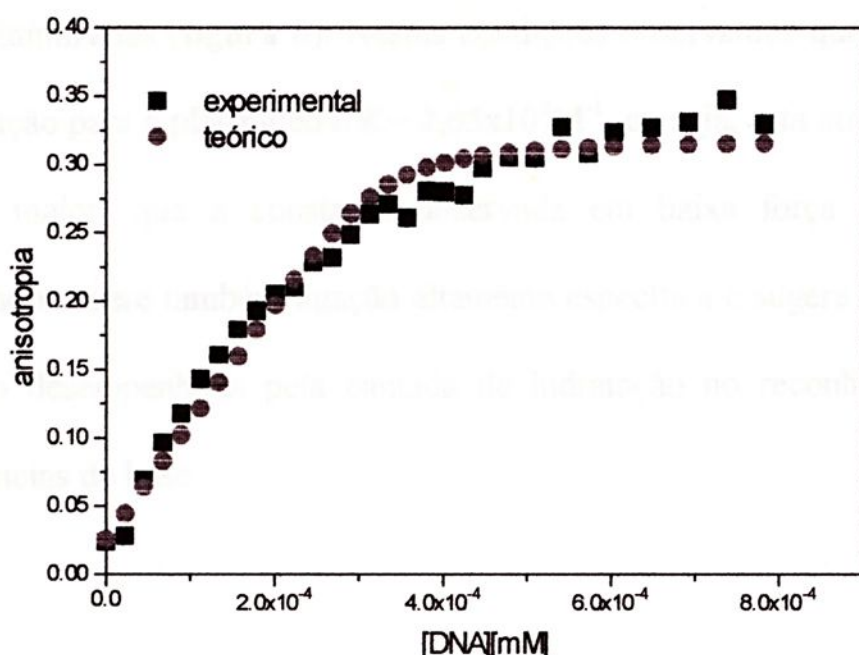


Figura 7- Titulação de angiotensina II com o plasmídeo W131 feita numa concentração de 2,66 μ g/ml, em 0,9ml de tampão PBS em 2,5 μ g/ μ l de AngII.

O ajuste teórico das curvas anteriores usando procedimento descrito na seção 3.2 permitiu estimar os valores das constantes de associação para as ligações da AngII a estes construtos. O valor obtido para tais constantes, $K=2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, é muito próximo para todos os casos. Este dado sugere uma ligação muito forte, se comparada a proteínas que reconhecem sequência muito específica no DNA, tais como fatores de transcrição (JONHSON & MCKNICHT, 1989).

Com o objetivo de avaliar a especificidade destas ligações, foi realizada uma titulação com fragmento WPstI DNA 510pb na presença de 0.8M de NaCl pois em altas concentrações de sal, as cargas do grupo

fosfato do DNA devem ser blindadas e possíveis contribuições eletrostáticas são minimizadas (**figura 8**). Nestas condições observamos que a constante de ligação para o plasmídeo é $K = 2,65 \times 10^9 \text{M}^{-1}$, ou seja, esta constante é dez vezes maior, que a constante observada em baixa força iônica. Este resultado sugere também ligação altamente específica e sugere a importante função desempenhada pela camada de hidratação no reconhecimento de seqüências de base.

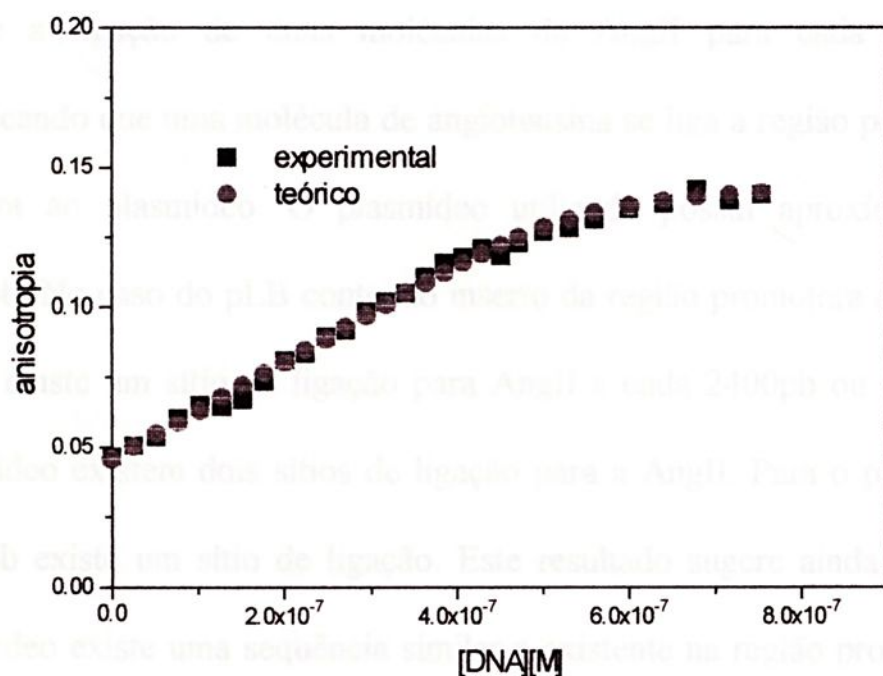


Figura 8-Titulação de angiotensina II com o plasmídeo PstI numa concentração de 2,27 $\mu\text{g/ml}$, em 0,9ml de tampão PBS acrescido de 0,8M de NaCl em 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de AngII.

O experimento controle de ligação da AngII ao plasmídeo pLB que foi usado nas clonagens da região promotora do gene da enzima conversora da angiotensina I indicou uma mudança na anisotropia de fluorescência, semelhante à observada para o plasmídeo quando continha a inserção da região promotora do gene da ECA (**figura 9**), sendo que o valor da constante de ligação também é próximo ao observado para o inserto. Entretanto, os ajustes teóricos ou gráfico de Scatchard, (**figura 10**) indicam que ocorre a ligação de uma AngII para cada plasmídeo, enquanto que para o plasmídeo contendo a região promotora e fragmentos do gene da ECA ocorre a ligação de duas moléculas de AngII para cada plasmídeo significando que uma molécula de angiotensina se liga à região promotora e a outra ao plasmídeo. O plasmídeo utilizado possui aproximadamente 5400pb. No caso do pLB contendo inserto da região promotora do gene da ECA, existe um sítio de ligação para AngII a cada 2400pb ou seja, neste plasmídeo existem dois sítios de ligação para a AngII. Para o pLB a cada 5400pb existe um sítio de ligação. Este resultado sugere ainda que neste plasmídeo existe uma sequência similar a existente na região promotora do gene da ECA.



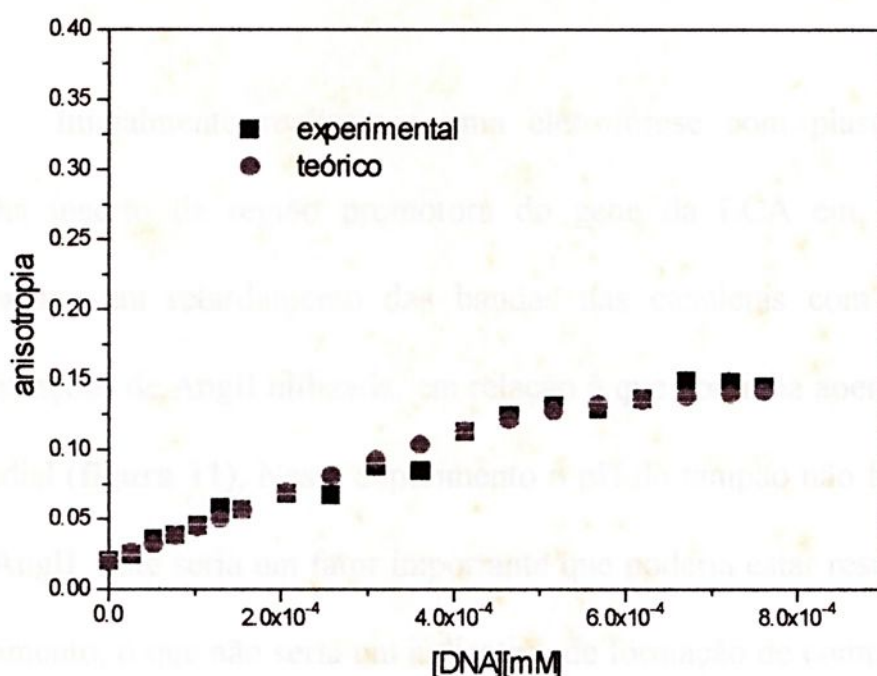


Figura 9- Titulação de angiotensina II com pLB, plasmídeo usado para a clonagem da região promotora do gene da ECA, numa concentração de 3,27 μ g/ml, em 0,9ml de tampão PBS e 2.5 μ g/ μ l de AngII.

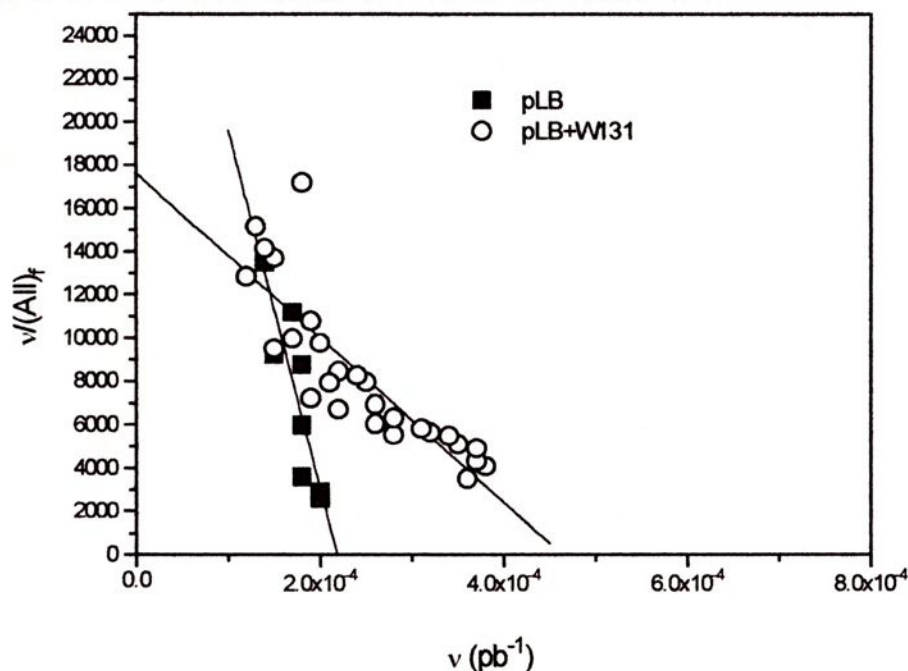


Figura 10-Gráfico de Scatchard, representado para o plasmídeo pLB e para o plasmídeo pLB com inserção de 132pb da região promotora do gene ECA.

III.2- Co-eletroforese de Afinidade

Inicialmente realizamos uma eletroforese com plasmídeo que continha inserto da região promotora do gene da ECA em pH 7,5, e observamos um retardamento das bandas nas canaletas com diferentes concentrações de AngII utilizada, em relação à que continha apenas o DNA plasmidial (**figura 11**). Neste experimento o pH do tampão não foi igual ao pI da AngII. Este seria um fator importante que poderia estar resultando em retardamento, o que não seria um indicativo de formação de complexo e sim um efeito de cargas na migração do peptídeo que estava em pH diferente do seu pI, ocasionando deste modo uma "retenção" do DNA durante a migração e, conseqüentemente, levando ao retardamento.



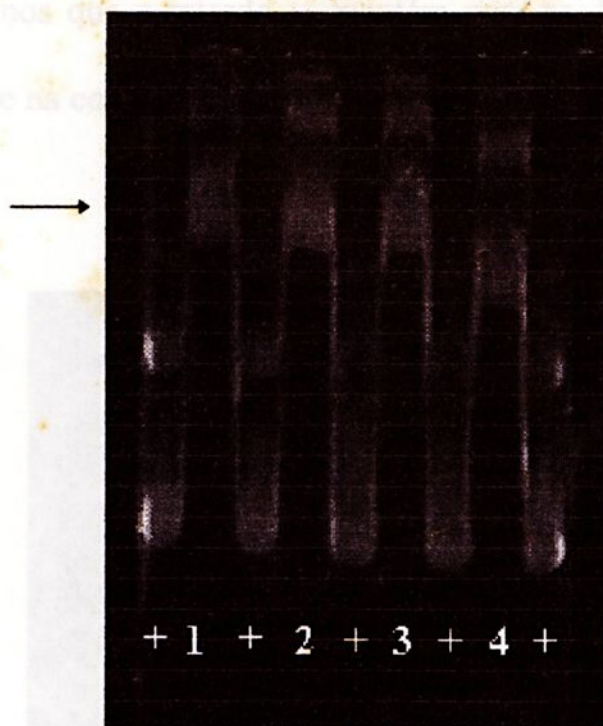


Figura 11-Gel de co-eletroforese de afinidade em pH 7.5, com amostra de plasmídeo contendo o fragmento de 132pb na concentração de $4 \times 10^{-7} \text{M}$. A AngII nas concentrações de: 1- $2 \times 10^{-8} \text{M}$, 2- $1 \times 10^{-8} \text{M}$, 3- $5 \times 10^{-9} \text{M}$, 4- sem AngII, sendo este gel de concentração 2%, e + bandas referentes apenas ao DNA, sendo este gel de concentração 1%, → indica posição de retardo da banda.

Para excluir esta possibilidade calculamos o pI teórico da AngII (EXPASY Molecular Biology Server), que é aproximadamente 8,75 e então realizamos o experimento novamente neste pH, e pudemos notar o retardamento, como mostrado na (**figura 12**), que evidencia a ligação da AngII ao plasmídeo que contém a região promotora do gene da ECA, confirmando os resultados de fluorescência. Uma outra questão era a de que a concentração do gel utilizado a 2%, estaria influenciando o retardamento, então usamos também concentrações de 1% de agarose nos poços que são preenchidos com diferentes concentrações de ligante (dados não mostrados).

Observamos que o retardo se mantém para as duas concentrações do gel, sendo que na concentração de 2% há uma melhor separação das bandas.

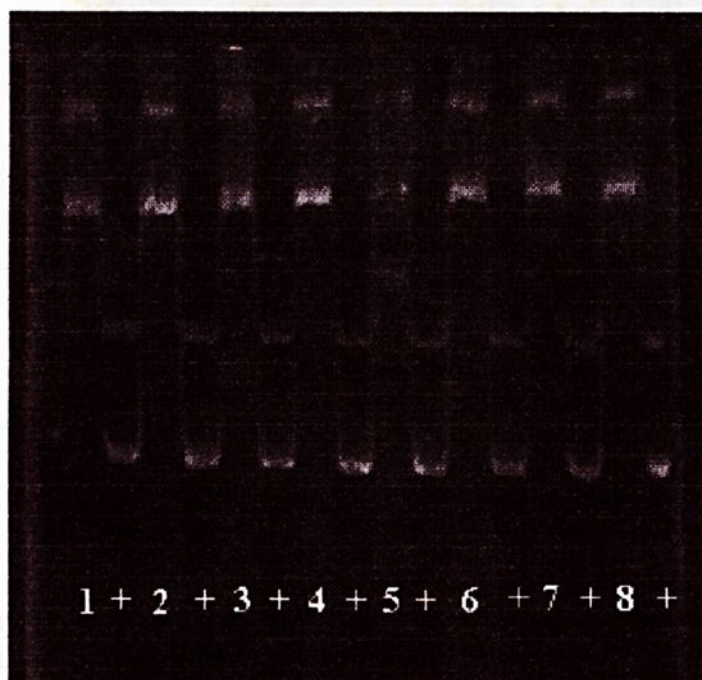


Figura 12-Gel de co-eletroforese de afinidade em pH 8.75, com amostra de plasmídeo contendo o fragmento de 132pb da região promotora do gene da ECA na concentração de $1,0 \times 10^{-7} \text{M}$. A AngII nas concentrações de: 1e 2- sem AngII, 3- $5 \times 10^{-9} \text{M}$, 4- $1,0 \times 10^{-8} \text{M}$, 5- $3 \times 10^{-8} \text{M}$, 6- $5 \times 10^{-8} \text{M}$, 7- $1 \times 10^{-7} \text{M}$, 8- $3 \times 10^{-7} \text{M}$, sendo este gel de concentração 2%, e + bandas referentes apenas ao DNA, sendo este gel de concentração 1%.

O experimento foi feito também com o plasmídeo que continha a região promotora do gene da renina e observou-se a existência de retardamento suave, o que indica a formação de complexo da AngII com o promotor da renina (**figura 13**).

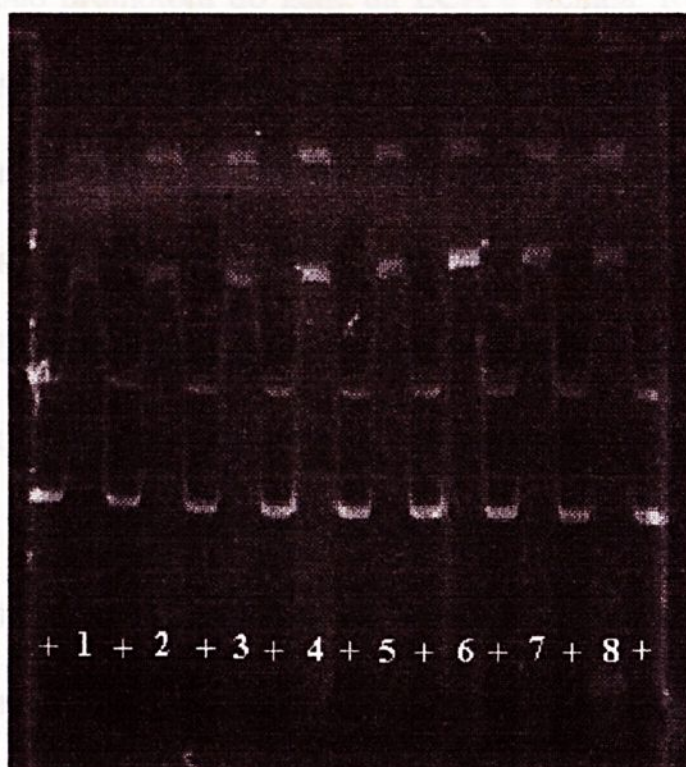


Figura 13- Gel de co-eletroforese de afinidade em pH 8.75, com amostra de plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene da renina na concentração de $1,0 \times 10^{-7} \text{M}$. A AngII nas concentrações de: 1 e 2- sem AngII, 3- $1 \times 10^{-8} \text{M}$, 4- $2,0 \times 10^{-8} \text{M}$, 5- $3 \times 10^{-8} \text{M}$, 6- $5 \times 10^{-8} \text{M}$, 7- $1 \times 10^{-7} \text{M}$, 8- $3 \times 10^{-7} \text{M}$, sendo este gel de concentração 2%, e + bandas referentes apenas ao DNA, sendo este gel de concentração 1%.

No sentido de testar a especificidade da ligação de AngII a região promotora dos genes da ECA e da renina, realizamos experimentos de co-eletroforese com o plasmídeo pUC18 e não observamos retardamento nas bandas referente às diferentes concentrações de ligante. Como pode ser visto na (figura 14), todas às bandas têm a mesma migração, com disposição similar as bandas referentes ao DNA, mostrando que não existe um retardamento como o observado para o que

ocorre com a região promotora do gene da ECA e Renina. Repetimos o experimento utilizando o plasmídeo pLB no qual foi feita a clonagem da região promotora da ECA, e este também mostra um retardamento indicativo da formação de complexo (dado não mostrado). No gel de coeletroforese de afinidade mostrado na **figura 15**, usando o fragmento de 1300pb da região promotora do gene da enzima conversora, podemos observar também ocorrência de retardamento das bandas referentes às diferentes concentrações de angiotensina utilizada. Deve-se chamar a atenção para alguns detalhes deste gel. O retardamento só se inicia a uma concentração de $3 \times 10^{-8} \text{M}$ de AngII, que corresponde à canaleta 5. Esta é a concentração em que inicia o retardo na **figura 12**. Na canaleta 6 é calculada uma concentração de $5 \times 10^{-8} \text{M}$ de AngII que foi sintetizada com sequência de aminoácidos invertida (Asp-Tyr-His-Val-Arg-Ileu-Pro-Phe). Para este peptídeo de sequência invertida, não há retardamento significativo; nas canaletas 7 e 8 foi novamente usada AngII (Asp-Arg-Val-Tyr-Ileu-His-Pro-Phe) em concentrações de $1 \times 10^{-7} \text{M}$ e $3 \times 10^{-7} \text{M}$, sendo então observado retardo. Este resultado confirma os resultados de fluorescência e sugere ainda que a interação deve ser específica pois com o uso da sequência invertida não se observa retardo significativo do fragmento. Tais resultados sugerem que a AngII reconhece uma sequência similar na região promotora do gene, da ECA, e do plasmídeo pLB e que



este fato não acontece para o pUC18, sugerindo ligação sequência específica, da AngII.

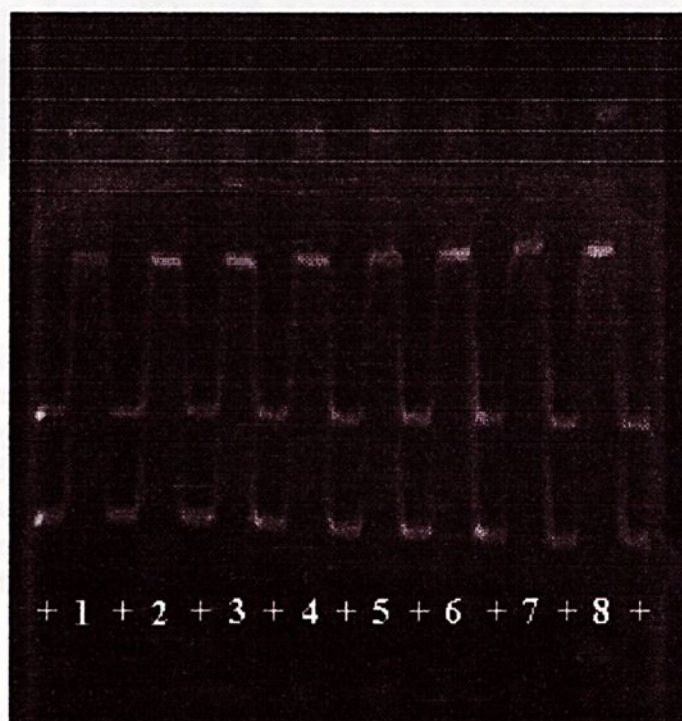


Figura 14- Gel de co-eletroforese de afinidade em pH 8.75, com amostra de plasmídeo pUC18 na concentração de $1,0 \times 10^{-7} M$. A AngII nas concentrações de: 1 e 2- sem AngII, 3- $1 \times 10^{-8} M$, 4- $2,0 \times 10^{-8} M$, 5- $3 \times 10^{-8} M$, 6- $5 \times 10^{-8} M$, 7- $1 \times 10^{-7} M$, 8- $3 \times 10^{-7} M$, sendo este gel de concentração 2%, e + bandas referentes apenas ao DNA, sendo este gel de concentração 1%.

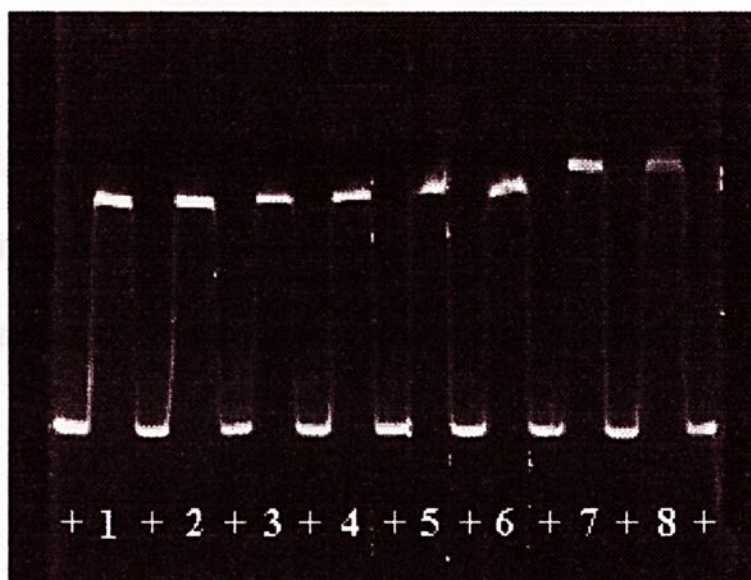


Figura 15- Gel de co-eletroforese de afinidade em pH 8.75, com amostra do fragmento de 1,3Kb da região promotora do gene da ECA na concentração de (1,6mg totais) ou (100ng por canaleta). A AngII nas concentrações de: 1- sem AngII, 2- $5 \times 10^{-9} \text{M}$, 3- $1 \times 10^{-8} \text{M}$, 4- $2,0 \times 10^{-8} \text{M}$, 5- $3 \times 10^{-8} \text{M}$, 6- $5 \times 10^{-8} \text{M}$ com sequência de amino-ácidos invertida, 7- $1 \times 10^{-7} \text{M}$, 8- $3 \times 10^{-7} \text{M}$, sendo este gel de concentração 2%, e + bandas referentes apenas ao DNA, sendo este gel de concentração 1%.

Nos dados de fluorescência observamos que havia um patamar de saturação bem acentuado. Este fato se confirma para os dados de co-eletroforese, onde acima da concentração da $1 \times 10^{-7} \text{M}$ existe uma estabilização do retardamento (**figura 15**, referente as canaletas, 7 e 8), e as bandas apresentam migração muito similar, com praticamente a mesma posição no gel. Tal fato indica patamar de saturação, ou seja, ponto em que todos os sítios de ligação já estão ocupados.

Os resultados evidenciam deste modo ligação sequência específica, e estão de acordo com os resultados obtidos por titulações fluorimétricas, nos quais obtivemos evidências de formação de complexo, inclusive, para este fragmento que contém 132pb da região promotora da ECA. A constante de ligação para a formação deste complexo é da ordem de 10^8 M^{-1}

III.3- Retardamento em Gel (Gel shift)

Como observamos nos resultados anteriores, utilizando técnicas de anisotropia de fluorescência e co-eletroforese, existem evidências de formação de complexo entre o plasmídeo que contém o fragmento de 1300pb da região promotora do gene da ECA e AngII. Quando utilizamos o fragmento de 132pb da região promotora do gene da ECA em experimento de retardamento em gel (gel shift) observamos discreto retardo nas bandas correspondentes às amostras que receberam diferentes concentrações de AngII (**figura 16**).



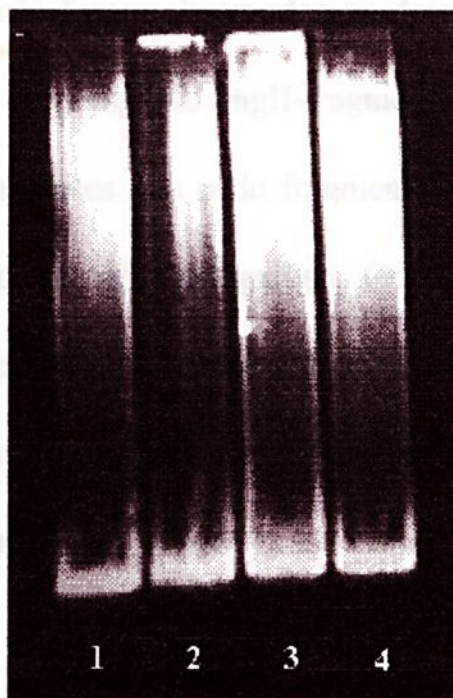


Figura 16- Eletroforese realizada com de fragmento 132pb da região promotora do gene da ECA. A figura representa 1- apenas DNA+0,5µg/µl de competidor inespecífico (dI-dC), 2-100ng de DNA+5x10⁻⁹M de AngII+0,5µg/µl de competidor inespecífico (dI-dC), 3-100ng de DNA+5x10⁻⁸M de AngII+0,5µg/µl de competidor inespecífico (dI-dC), 4-100ng de DNA+3x10⁻⁷M de AngII 0,5µg/µl de competidor inespecífico (dI-dC), realizada em gel de agarose 1%.

Na realidade as amostras que receberam diferentes concentrações de AngII deveriam apresentar dois conjuntos de bandas. Um conjunto correspondente ao fragmento e o outro ao complexo. Neste segundo conjunto, as bandas inferiores deveriam tornar-se menos intensas e as banda superiores tornar-se mais intensas, de tal forma que, numa determinada concentração de AngII, a banda inferior desaparece ficando apenas a banda superior, indicando retardo em relação à amostra que continha apenas

DNA. Nos resultados não foram observados os dois conjuntos de bandas, pois o peso molecular do complexo angII-fragmento é praticamente igual, aproximadamente 2pb maiores que o do fragmento livre. Essa diferença é difícil de ser resolvida em gel de agarose. Outro fato que pode estar impedindo o retardamento é o tempo de vida do complexo. Para complexo com tempo de vida curto nem sempre é possível observar retardamento neste tipo de experimento.

III-4 Medida de Dicroísmo Circular (CD)

A comparação dos espectros de dicroísmo circular do plasmídeo W+ na presença e ausência de AngII (**figura 17**) indica uma ligeira mudança nas posições da banda positiva e negativa. Estas bandas estão aproximadamente 6nm mais próximas no espectro do plasmídeo na presença de angiotensina II do que na ausência. Pode ser observada ainda variação de intensidade destas bandas. Na ausência de AngII, a soma das intensidade destas bandas é de 12,2 (em unidades arbitrárias), enquanto que, na presença de AngII, a intensidade é 7,5. Considerando o efeito da diluição na adição de angiotensina ao DNA, a intensidade deveria ser 11.95. A mudança observada, portanto, não é devida à diluição do plasmídeo. Este



dado evidencia portanto ligação da AngII ao plasmídeo W+, corroborando o resultado observado utilizando fluorescência e co-eletroforese de afinidade. Tais experimentos foram realizados mais que uma vez para cada um dos métodos utilizados.

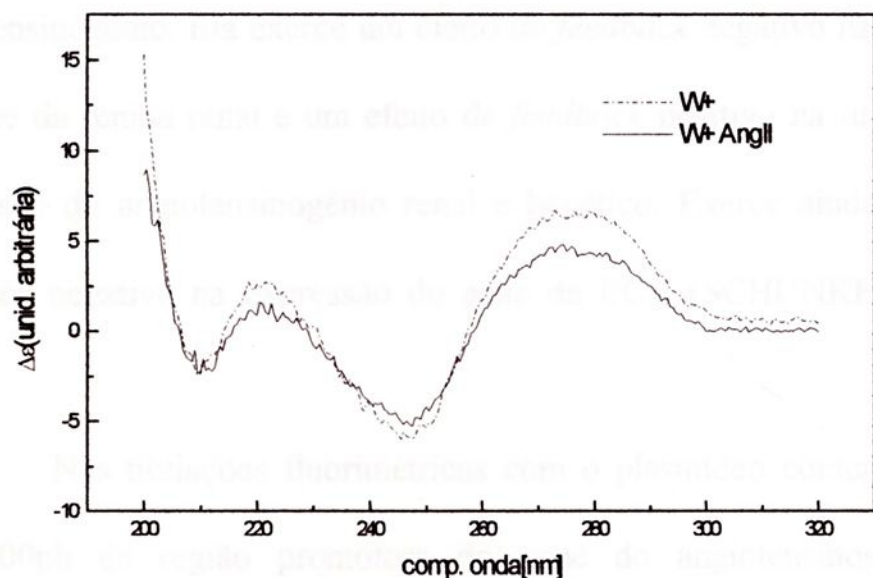


Figura 17-Espectro de dicroísmo circular de $1,1 \times 10^{-5} \text{M}$ de plasmídeo contendo inserto W+, e plasmídeo mais $1 \times 10^{-5} \text{M}$ de AngII em Tampão PBS pH 7.4.

IV-DISCUSSÃO

A síntese da AngII é regulada principalmente por duas enzimas, a renina e a ECA. Embora, a renina clive o angiotensinogênio para formar a AngI, o passo final da cascata renina-angiotensina é catalisada pela ECA, produzindo o peptídeo ativo AngII.

A AngII é o principal fator regulador da síntese da renina e do angiotensinogênio. Ela exerce um efeito de *feedback* negativo na expressão do gene da renina renal e um efeito de *feedback* positivo na regulação da expressão do angiotensinogênio renal e hepático. Exerce ainda efeito de *feedback* negativo na expressão do gene da ECA (SCHUNKERT *et al.*, 1993).

Nas titulações fluorimétricas com o plasmídeo contendo inserto de 1300pb da região promotora do gene do angiotensinogênio, não observamos mudança significativa na anisotropia de fluorescência, mostrando ausência de formação do complexo DNA-AngII. A ligação para AngII, se houver, pode não estar compreendida nesta sequência de 1300pb da região promotora do gene do angiotensinogênio, o que não invalida a existência de um laço de *feedback* da angiotensina II sobre a síntese do angiotensinogênio, ou estímulo da secreção de outras substâncias que atuariam de forma direta sobre a síntese do angiotensinogênio.



Existem evidências indicando correlação entre os níveis de AngII e a síntese e secreção do angiotensinogênio, mas AngII não é o único fator preponderante no controle da síntese do angiotensinogênio. Existem elementos, tais como, os fatores de transcrição NF-1/CAAT e C/EBP que se ligam à região promotora de -115 a -145pb *upstream* do sítio de iniciação que estão relacionados com a regulação da expressão do gene (ZHAO *et al.*, 1993). Sabe-se ainda que a atividade transcricional é mantida pela região compreendida entre -1222 a +44pb onde se localiza a caixa TATA (FUKAMIZU *et al.*, 1990). A região de -1222 a +44, compreende, além da caixa TATA -32 a -24, o elemento AGCE1 -16 a +44, que é um elemento regulador autêntico da transcrição do angiotensinogênio juntamente com o elemento *upstream*, ALE ou elemento enhancer *downstream* central. (YANAI *et al.*, 1996).

A AngII participa da regulação da síntese e secreção do angiotensinogênio por meio de *feedback* positivo, no qual o aumento da síntese e secreção deste está correlacionado com o aumento da concentração de seu mRNA (KLETT *et al.*, 1988). A AngII pode manter elevada também, a concentração do angiotensinogênio plasmática, devido a inibição da síntese e da secreção da renina. Consequentemente diminui a clivagem do angiotensinogênio em angiotensina I, pela renina.



Deste modo, a AngII deve atuar de forma indireta na manutenção da concentração de angiotensinogênio no plasma reforçando, desta forma, nossos dados experimentais de que a AngII não reconhece a sequência específica no seguimento de 1300pb da região promotora do gene do angiotensinogênio.

As titulações fluorimétricas em plasmídeo contendo a região promotora do gene da renina apresentaram variação relativamente grande de anisotropia, contudo não foi possível observar patamar de saturação, o que não permitiu garantir a existência de ligação. Entretanto, os dados de mobilidade no experimento de co-eletroforese de afinidade parecem indicar ligação, pois há uma pequena variação na mobilidade em função da concentração de AngII.

É importante destacar que existem evidências de que um aumento da concentração de AngII exógena na circulação leva a uma diminuição acentuada na quantidade de renina. Uma possível explicação para tal fato é que a AngII estaria atuando sobre o estoque de renina, impedindo sua liberação, ou sobre o mRNA aumentando o seu *turnover*. O que se sugere é um curto efeito de *feedback* negativo da AngII sobre a síntese da renina no tecido renal, mas não existem evidências concretas de que a atuação direta da AngII sobre a síntese da renina (JOHNS *et al.*, 1990).



BHAT *et al.*, (1994) sugerem que a administração de AngII *in vivo* pode levar à alteração de outros fatores que atuam na regulação da síntese da renina.

Os resultados de fluorescência e de co-eletroforese de afinidade sugerem fortemente ligação direta da AngII à região promotora do gene da ECA.

Nas titulações com plasmídeo contendo inserto da região promotora do gene da ECA, o que se observa é um aumento na anisotropia de fluorescência, seguido de um patamar de saturação, e este fato se repete para todos os fragmentos de 510pb, 232pb e 132pb. Este comportamento indica que o sítio de ligação da AngII está compreendido na região de 132pb, evidenciando ligação sítio específica. A constante de ligação calculada é muito alta, da ordem de 10^8 a 10^9 M⁻¹. Constantes de ligação dessa ordem são característica de fator de transcrição e indicativas de ligação para regulação “autógena”(JONHSON & MCKNICHT, 1989).

Contribuições eletrostáticas em geral fortes e que caracterizam ligações não específicas poderiam estar “modulando” esta ligação. Para eliminar este fator fizemos a titulação em tampão PBS acrescido de 0,8 M de NaCl e observamos um aumento significativo na constante de ligação. Esta constante é da ordem de 10^9 M e se comparada às anteriores, é dez vezes maior. Este fato indica que realmente a ligação da AngII à região



promotora do gene da ECA é específica, pois com o aumento da concentração de sal as contribuições de cargas dos grupos fosfatos do DNA na ligação são eliminados. Tais resultados sugerem que a afinidade da AngII ao DNA seja modulada apenas por interações fracas tais como força de van der Waals, ponte de hidrogênio, etc, que caracterizam ligações de alta especificidade. Em titulações utilizando DNA cromossomal de timo de bezerro, não observamos mudança na anisotropia, nem patamar de saturação, ou seja, a AngII não reconhece qualquer sequência em uma molécula tão grande como esta de DNA de timo de bezerro, o que parece reforçar alta especificidade à região promotora do gene da ECA.

Entretanto, quando se realizam titulações com o plasmídeo pLB, observamos um aumento na anisotropia de fluorescência, muito semelhante ao do plasmídeo contendo a região promotora do gene da ECA. O ajuste teórico das curvas são também muito similares.

A primeira hipótese é a de que a AngII estaria reconhecendo uma sequência neste plasmídeo e se complexando, já que este foi o plasmídeo utilizado para clonar a região promotora do gene ECA, o qual apresentava também aumento na anisotropia.

Quando se fazem os ajustes teóricos, as constantes são muito próximas, mas quando se faz o gráfico de Scatchard, encontramos dois sítios de ligação, ou seja, ligam-se duas moléculas de AngII para cada



plasmídeo, significando que uma se liga ao plasmídeo e a outra à região promotora do gene da ECA. Esse resultado sugere a existência de dois sítios de ligação no plasmídeo W+, sendo um da região promotora do gene da ECA e o outro do plasmídeo, e a existência de um único sítio no plasmídeo pLB, o que reforça a observação anterior de ligação direta da AngII à região promotora do gene da ECA.

Deste modo, podemos levantar a hipótese da existência de uma sequência no plasmídeo similar à existente na região promotora do gene da ECA, no entanto, é difícil afirmar a existência da similaridade pelos métodos que foram usados. Observamos variação de anisotropia de fluorescência em titulações da AngII com plasmídeo contendo a região promotora do gene da renina, mas quando comparamos à observada em experimento similar usando a região promotora do gene da ECA, notamos que a taxa de variação de anisotropia é muito acentuada desde o início da titulação para a região promotora do gene da ECA, e nesta existe patamar de saturação bem acentuado. Este comportamento das curvas é indicativo de que a ligação da AngII na região promotora do gene da ECA é mais evidente que na região promotora do gene da renina. Os dados de dicroísmo circular também sugerem ligação da AngII à região promotora do gene da ECA.



Os resultados obtidos a partir da técnica de retardamento em gel *gel shift*, raramente mostraram um retardamento, sendo observada apenas pequena variação na mobilidade de DNA. Embora esta técnica seja uma das mais usadas para estudar interação de proteínas e pequenos ligantes ao DNA, a habilidade para distinguir espécies ligadas e não ligadas é dependente do tempo de vida do complexo, especialmente quando o ligante apresenta baixo peso molecular, tais como hormônios e oligopeptídeos, como é o caso da AngII. Quando o tempo de vida do complexo formado é muito curto, é difícil observar um retardo significativo na mobilidade do DNA em presença do ligante. A técnica que nos possibilitou observar diferença significativa de mobilidade foi a de co-eletroforese de afinidade (LIM, *et al.*, 1991).

As evidências do reconhecimento de um sítio na região promotora do gene da ECA confirmam-se quando analisamos a formação do complexo em gel de co-eletroforese de afinidade, especialmente quando utilizamos o fragmento de 1300pb da região promotora do gene da ECA. A constante de ligação obtida em experimentos de co-eletroforese de afinidade é da ordem de $5 \times 10^8 M^{-1}$, significando que para a concentração total de DNA e de AngII utilizados, toda a angiotensina se complexa. Os resultados estão de acordo com os resultados obtidos pelo grupo do Prof. Dr. J. E. KRIEGER, que sugerem a existência de sequência regulatória positiva no



intervalo de -232 a -288, que responde a estímulos de células endoteliais e renais, e de sequência regulatória negativa no intervalo de -1126 a -1300pb do gene da ECA, que responde a estímulo tecido-específico renal. Deve ser salientado que estas sequências estão contidas nos fragmentos utilizados para a realização dos nossos experimentos.

Nossos resultados parecem sugerir que a AngII atua como um fator regulador da expressão do gene da ECA, possivelmente via interação direta da AngII à região promotora, ou seja, a AngII atuando como um fator de transcrição autógeno.

Segundo BOOZ *et al.*, (1992), a AngII atua sobre o núcleo através de receptor nuclear, provocando mudança na conformação da cromatina, ou seja, a AngII poderia estar ligando-se à cromatina. Estes mesmos autores sugerem, ainda, estímulo de expressão gênica e crescimento celular provocado pela AngII e a existência de sítio de alta afinidade para a AngII em núcleo de hepatócito de rato.

RE *et al.*, (1983 e 1984) encontraram evidência da existência de receptor de hormônio intranuclear, e em particular para a AngII. Esta evidência foi observada a partir da mudança estrutural que ocorre em cromatina cujo núcleo foi tratado com AngII. A cromatina neste caso, torna-se mais solúvel, e esta solubilidade torna-se mais intensa quando o núcleo em seguida ao tratamento com AngII, recebe ribonuclease de *micrococcus*.



Estes autores sugerem que a ocorrência desta solubilidade permite maior acesso ao DNA pela RNA polimerase e este evento ocorre próximo ao sítio de iniciação aumentando o nível de RNA. Este fato sugere a exposição de sítio de ligação na cromatina, por intermedio da AngII.

Evidencia ainda que a ligação específica da AngII ao receptor nuclear parece causar mudanças estruturais na cromatina consistentes com a indução por fatores de transcrição, e que a região de ligação parece estar próxima ao sítio de atuação da ribonuclease de *micrococcus*, região rica em receptor de hormônio e associada ao aumento da atividade transcricional.

Sabe-se que o passo principal para a produção da AngII é a clivagem da AngI pela ECA, uma ectoenzima encontrada principalmente na membrana das células endoteliais de todos os vasos sangüíneos (capilares e artérias). Esta tem uma posição que favorece reações e um possível efeito de feedback da AngII poderia regular a expressão dos genes da ECA, equilibrando a produção de AngII e consequentemente o sistema renina-angiotensina (SOUBRIER *et al.*, 1988).

Deste modo, altas concentrações de AngII inibiriam a produção de ECA por meio da regulação dos genes precursores da enzima, sendo esta feita por meio da ligação da AngII à região promotora do gene da ECA, possibilitando assim sua autorregulação. Desta forma, a AngII atuaria como um fator endógeno de transcrição para a ECA.



Segundo SCHUNKERT *et al.*, 1993, a infusão de AngII *in vivo* leva à diminuição da atividade da ECA e à inibição da síntese de mRNA no tecido pulmonar, sugerindo desta forma a regulação de feedback negativo da ECA pela AngII. Nossos dados sugerem evidências de ligação sequência-específica da AngII à região promotora do gene da ECA, ou seja, a AngII poderia estar regulando a expressão deste gene de forma direta, por meio de interação com a região promotora.



V-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHAT, J. G., THEKKUMKARA, T. J., THOMAS, W. G., CONRAD, K. M., BAKER, K. M. Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. *J. Biol. Chem.*, v.269, n.50, p.31443-31449, 1994.
- BOOZ, J.W., CONRAD,K.M., HESS,A.L., SINGER, A.A., BAKER, K.M. Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology*, v.130, n.6, p.3641-3649, 1992.
- BOUHNİK, J., CLAUSER, E., STROSBERG, D., FRENOY, J. P., MÈNARD, J., CORVOL, P. Rat angiotensinogen and des(angiotensinI) angiotensinogen: purification characterization and partial sequencing. *Biochemistr*, v.20, p.7010-7015, 1981.
- BURT, D. W., NAKAMURA, N., KELLEY, P., DZAU, V. J. Identification of negative and positive regulatory elements in the human renin gene. *J. Biol. Chem.*, v.264, n.13, p.7357-7362; 1989.
- CORNELL, M. J., WILLIAMS, T. A., LAMARGO, N. S., COATES, D., CORVOL, P., SOUBIER, F., HOHEISE, J., LEHRACH, H., ISSAC, R. E. Cloning and expression of an evolutionary conserved single-



- domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila Melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, v.9, p.13613-13619, 1995.
- COSTETOUSSE, O., ALLEGRINI, J., HUANG, H., BOUNHIK, J., ALLENC-GELAS, F. Regulation of ACE gene expression and plasm level during rat postnatal development. *Am. J. Physiol.*, v.267, n.30 p.E745-F753, 1994.
- DZAU, V. J., PRATT, R. E. Renin angiotensin system. In: *The Hert and cardiovascular system*. 2.ed. Nova York:Raven Press, 1992. cap.73, p.1817-1840.
- FUKAMIZU, A., TAKAHASHI, S., SEO, M. S., TODA, M., TANIMOTO, K., UEHARA, S., MUROKAMI, K. Struture and expression of the human angiotensinogen gene. *J. Biol. Chem.*, v.265, n.13; p.7576-7582, 1990.
- GRIENDLING, K. K., MURPHY, T. J., WAUNE, A. R. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, v.6, n.87, p.1816-1828, 1993.
- HELLIGE, G., SPEKERMANN, P. G., UNGER, T. *Sistema renina-angiotensina circualnte tecidual*. S.l., Hoechst, s.d.(não editado comercialmente)
- HEYDUK, T., LEE, J., C. Aplication of fluorecence energy transfer and polimerization to monitor *Escherichia Coli* cAMP receptor protein and



- lac promoter interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.87, p.1744-1748, 1990.
- HILBERT, P., LINDPAINTNER, K., BECKMANN, J. S., SERIKAWA, T., SOUBIER, F., DUBAY, C., CARTWRIGHT, P., DE GOWYON, B., JULLIER, C., TAKAHASI, S., VICENT, M., GANTEN, D., GEORGES, M., LATHROP, G. M. Cromosomal mapping of two genetic loci associat with blood-pressure regulation in fereditary hipertensive rats. *Nature*, v.353, p.521-529, 1991.
- HORIUCHI, M., NAKAMURA, N., TANG, S. S., BARRET, G., DZAU, V. J. Molecular mechanism of tissue-specific regulation of mouse renin gene expression by cAMP. *J. Biol. Chem.*, v.266, p.16247-16254, 1991.
- IWAI, N., MATSUNAGA, M., KITA, T., TEI, M., KAWAI, C. Regulation of angiotensin converting enzyme in cultured human vascular endothelial cells. *Bioch. Bioph. Res. Com.*, v.149, n.3, p.1179-1185, 1987.
- JOHNS, D. W., PEACH, M. J., GOMEZ, A., INAGAMI, T., CAREY, R. M. Angiotensin II regulates renin gene expression. *J. Physiol.*, v.259, n.28, p.F882-F887, 1990.
- JONHSON, P. F., MCKNIGHT, S. L. Eucaryotic transcriptional regutation proteins. *annu. Rev. Biochem.* v.58, p.799-839, 1989.



- KENNETH, W. A. *Gene and chromosome analysis*. New York: Academic Press, v.1, pt. A. 1993.
- KHAYYALL, M., MACGREGOR, J., BROWN, J. J., LEVER, A. F., ROBERTSON. Increase of plasm renin substract concentration after infusion of angiotensin in the rat. *Clin. Sci.* v.44, p.87-90, 1973.
- KLETT, C., BADER, M., SCHWEMMLE, M., GATEN, D., HACKENTHAL, E. Contribution of a 12 kDa protein to the angiotensin II induced stabilization of angiotensinogen mRNA: interation whith the 3' untranslated mRNA. *J. Mol. Endocrinol.*, v.14, p.209-226, 1995.
- KLETT, C., HELLMANN, W., MULLER, F., SUZUKI, F., NAKANISHI, S., OHKUBO, H., GATEN, D., HACHENTHAL, E. Angiotensin II controls angiotensinogen secretion at a pretranslation level. *J. Hypertens.*;v.6, supp l4, p.S442-S445, 1988.
- KLETT, C., NOBILING, R., GIERSEHIK, P., HACKENTHAL, E. Angiotensin II stimulates the Synthesis of angiotensinogen in hepatocytes by inhibiting adenyl cyclase activity and stabilizing angiotensinogen mRNA; *J. Biol. Chem.*, v.268, p.25095-25107, 1993.
- KRIEGER, J.E.Genética da hipertensão arterial e regulação da expressão gênica da enzima conversora da angiotensina.*Tese de livre docência*, S.P. 1996.



- KURTZ, T. W. Genetic aproaches to hypertension. *Ann. Med.*, v.24, p.81-83, 1992.
- LE TILLY, V., ROYER, C. A. Fluorecence anisotropy assays implicate protein-protein interations in regulating trp repressor DNA binding. *Biochemistry*, v.32, p.7753-7758, 1993.
- LIM, W. A., SAVER, R, T., LANDER, A, D. Analysis of DNA-protein interations by affinity coeletroforesis. *Methods Enzymol.*, v.208, p.197-210, 1991.
- MANIATIS, T., GOODBOUN, S., FISCHER, J. A. Regulation de inducible and tissue especific gene expression. *Science*; v.236, p.1237-1245, 1987.
- NAFTILAN, A. J., Oparil, S. The Role of Calcium in the Control of Renin Release. *Hypertens*, v.4, p.670-675, 1982.
- NAKAMURA, A., IWAO, H., FUKUI, K., KIMURA, S., TAMAKI, T., NAKANISHI, S., ABE, Y. Regulation of liver angiotensinogen and kidney renin mRNA level by angiotensin II. *Am. J. Physiol.*, v.258, n.21, p.E1-E6, 1990.
- RE, R. N., LABCHE, R. A., BRAYAN, S . Nuclear-hormone mediated changes in chromatin solubillity. *Biochem. Biophys. Res. comm.*, v.110, n.1 p.61-68, 1983.



- RE, R. N., VIZARD, D. L., BROWN, J., BRAYN, S. E. Angiotensin II receptors in chromatin fragments generated by micrococcal nuclease. *Biochem. Biophys. Res. comm*, v.119, n.1 p. 220-227, 1984.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual* E.F. 2.ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHUNKERT, H., INGELFINGER, J. R., HIRSCH, A. T., PINTO, Y., REMME, W. J., JACOB, H., DZAU, V. J. Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA level by angiotensin II. *Cir.Res.*, v.72, p.312-318, 1993.
- SELKURT, E.E. *Fisiologia*. 3.ed. Guanabara: editora Guanabara Koogan, 1976.
- SOUBRIER, F., ALLENC-GELAS, F., HUBRT, C., ALLEGRINI, J., JOHN, M., TREGEAR, G., CORVOL, P. Two putative centers in human angiotensin I converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.85, p.9386-9390; 1988.
- TAMURA, K., TANIMOTO, K., MURAKAMI, K., FUKAMIZU, A. A Combination of upstream and proximal elements is required for efficient expression of the mouse renin promotor in cultured cells. *Nucleic Acids Res.*, v.20, p.3617-3623, 1992.



- TAMURA, K., TANIMOTO, K., MURAKAMI, K., FUKAMIZU, A.
Activation of mouse renin promoter by cAMP and c-Jun in a kidney-derived cell line. *Biochem. Biophys. Acta.*, v.1172, p.306-310, 1993.
- TAMURA, K., UMEMURA, S., FUKAMIZU, A., ISHII, M., MURAKAMI, K. Recent advances in the study of renin and angiotensinogen genes: from molecules to the whole body. *Hypertension.*, v.1, n.18 p.7-18, 1995.
- TAMURA, K., UMEMURA, S., ISHII, M., TANIMOTO, K., MURAKAMI, K., FUKAMIZU, A. Molecular mechanism of transcriptional activation of the angiotensinogen gene by proximal promoter. *J. Clin. Invest.*, v.93, p.1370-1379, 1994.
- TAMURA, K., UMEMURA, S., YAMAGUCHI, S. Mechanism of cAMP regulation of renin gene transcription by proximal promoter. *J. Clin. Invest.*, v.94, p.1959-1967, 1994.
- YANAI, K., NIBU, Y., MURAKAMI, K., FUKAMIZU, A. A cis acting DNA element located between TATA box and transcription initiation site is critical in response to regulatory sequences in human angiotensinogen gene. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.15981-15986, 1996.
- YANG, M., GHOSH, S. S., MILLAR, D. P. Direct Measurement of Thermodynamic and kinetic parameter of DNA triple helix formation by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, v.33, p.15329-15337, 1994.



ZHAO, Y.Y., GU, W., SIDDIQUI, M. A. Q., KUMAR, A. Identification of cis-acting DNA elements involved in the regulation of angiotensinogen gene expression. *Cell. Mol. Biol. Res.*, v.38, n.1, p.71-80, 1992.

ZHAO, Y. Y., QASBA, P., SIDDIQUI, M. A, Q., KUMAR, A. Multiple CCAAT binding proteins regulate the expression of the angiotensinogen gene. *Cell, Mol. Biol. Res.*, v.39, n.8 p.727-737,1993.

WEI, L., ALLENC-GELAS, F., SOUBIER, F., MICHAND, A., CORVOL, P., CLAUSER, E. Expression and characterization of recombinat human angiotensin I converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, v.266, n.9, p. 5540-5546.



