

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**ESTUDOS ESTRUTURAIS DO PRECURSOR DOS
PEPTÍDEOS POTENCIADORES DE BRADICININA E DA
PROTEÍNA NUDEL – *NUCLEAR DISTRIBUTION
ELEMENT-LIKE***

KARINE FERNANDA DOS SANTOS

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2008

KARINE FERNANDA DOS SANTOS

**ESTUDOS ESTRUTURAIS DO PRECURSOR DOS
PEPTÍDEOS POTENCIADORES DE BRADICININA E DA
PROTEÍNA NUDEL – *NUCLEAR DISTRIBUTION*
*ELEMENT-LIKE***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirian Akemi Furue Hayashi

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2008**

Santos, Karine Fernanda dos.

Estudos estruturais do precursor dos peptídeos potenciadores de
Brassicinina e da proteína nudel – nuclear distribution element-like/
Karine Fernanda dos Santos. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.
73 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Raghuvir Krishnaswamy Arni

Co-orientador: Mirian Akemi Furue Hayashi

Dissertação (mestrado – Microbiologia) – Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Proteínas - Estrutura. 2. Proteínas - Purificação. 3. Cristalização.
4. Peptídeos. I. Arni, Raghuvir Krishnaswamy. II. Hayashi, Mirian
Akemi Furue. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 577.112

**ESTUDOS ESTRUTURAIS DO PRECURSOR DOS
PEPTÍDEOS POTENCIADORES DE BRADICININA E DA
PROTEÍNA NUDEL – *NUCLEAR DISTRIBUTION*
*ELEMENT-LIKE***

KARINE FERNANDA DOS SANTOS

BANCA EXAMINADORA

Presidente e Orientador: _____
Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni

2º Examinador: _____
Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza

3º Examinador: _____
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

São José do Rio Preto, 25 de Fevereiro de 2008.

DADOS CURRICULARES

Karine Fernanda dos Santos

A autora desse trabalho, Karine Fernanda dos Santos, nasceu em São José do Rio Preto – SP, no ano de 1984. No ano de 2002, iniciou seu curso de Bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Durante a graduação, realizou sua iniciação científica no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron sob a orientação do Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa. Concluiu a graduação em 2005 e, no início de 2006, foi aprovada no curso de Mestrado em Microbiologia na Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de São José do Rio Preto com o auxílio financeiro da FAPESP. Nesse período, realizou estágio no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (CAT/CEPID - Instituto Butantan), sob a orientação da Dr^a. Mirian Akemi Furue Hayashi. Desde a graduação, participou de diversos congressos científicos relacionados às áreas de biologia estrutural, bioquímica e biologia molecular.

"O único homem que não erra é
aquele que nunca faz nada"

"F. D. Roosevelt"

Dedico este trabalho,

*A todas as pessoas que me incentivaram e
confiaram em mim. A constância dessas
pessoas em minha vida me motivou nos
momentos mais difíceis e o amor das
mesmas destacou meu caminho diante de
meus olhos nas situações em que me perdi.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu orientador, Prof. Dr. Raghuvir K. Arni, que, além de possibilitar a execução desse trabalho por meio de sua importante orientação e confiança em mim, sempre me ofereceu grandes oportunidades de aprendizado.

À Prof^a. Dr^a. Mirian Hayashi, minha co-orientadora, pela paciência e ensinamentos.

Ao Dr. Mário T. Murakami, que além de companheiro de laboratório, foi um grande conselheiro.

Ao Dr. Lars Redecke, pela imensa ajuda e bom humor.

À Dr. Fátima P. de Souza, pelo amor, amizade e companheirismo.

À Flávia, pelos muitos momentos que dividimos juntas.

Aos companheiros de laboratório, Daniella, Lydia, Joice, Liliane, Patrícia, Renato, Leandro e Samantha, pela ótima companhia, pelas risadas e pelo infindável apoio.

Aos amigos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – Instituto Butantan - pela ótima convivência.

Ao meu ex-orientador, Dr. João A. R. G. Barbosa, e ao Dr. Francisco Javier M. Martin por todos os anos de ensinamento e amizade.

Aos meus professores da UNICAMP e da UNESP que foram fundamentais para meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Departamento de Física e da Pós-Graduação, sempre muito prestativos.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido a esse trabalho.

Aos grandes amigos de toda vida, Luana, Saulo, Daniela, Priscila e Renata (minha irmã), pela presença, confiança, sinceridade, atenção, apoio, enfim, pela amizade.

Ao Túlio, meu amor, meu grande amigo, minha motivação, minha alegria.

Às minhas avós Mathides e Iraci, pelo amor e preocupação.

A todos meus tios e primos, pela união e amor.

A todas as pessoas da minha nova família de Juiz de Fora, por todo apoio e ótima convivência.

E finalmente aos meus pais, pela companhia, confiança, força, paciência e por todo amor do mundo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIACÕES	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. Introdução	1
1.1 Regulação da Pressão Arterial.....	3
1.1.2 Os BPPs e o controle da pressão arterial	5
1.1.3 Os precursores de BPP-CNP da glândula de veneno de <i>Bj</i>	7
1.2. Esquizofrenia e doenças neurológicas relacionadas	10
1.2.1 DISC1 e sua interação com NUDEL	12
1.2.2 NUDEL.....	14
2. Objetivos.....	16
2.1 Proteína Precursora de BPPs	16
2.2 NUDEL.....	17
3. Procedimentos Experimentais	18
3.1 Proteína Precursora de BPPs	18
3.1.1 Metodologia A	19
3.1.1.1 <i>Transformação de bactérias competentes por choque térmico.</i>	19
3.1.1.2 <i>Expressão</i>	19
3.1.1.3 <i>Purificação</i>	20
3.1.1.4 <i>Análise de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	21
3.1.1.5 <i>Western Blotting</i>	22
3.1.1.6 <i>Diálise e Concentração</i>	23
3.1.1.7 <i>Quantificação</i>	24
3.1.1.8 <i>Dicroísmo Circular (CD)</i>	24
3.1.1.9 <i>Emissão intrínseca de fluorescência</i>	25
3.1.1.10 <i>Cristalização</i>	26
3.1.2 Metodologia B	26
3.1.2.1 <i>Transformação de bactérias competentes por choque térmico</i>	26
3.1.2.2 <i>Testes de expressão</i>	27
3.1.2.3 <i>Teste de solubilidade</i>	27
3.1.2.4 <i>Expressão</i>	28
3.1.2.5 <i>Isolamento e purificação de corpos de inclusão</i>	29
3.1.2.6 <i>Análise de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	30
3.1.2.7 <i>Experimentos de Renaturação</i>	30
3.2 NUDEL	31
3.2.1 <i>Transformação de bactérias competentes por choque térmico</i>	32
3.2.2 <i>Expressão</i>	32
3.2.3 <i>Purificação da Fração Solúvel</i>	33
3.2.4 <i>Isolamento e purificação de corpos de inclusão</i>	33

3.2.5	<i>Análise de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	34
3.2.6	<i>Experimentos de Renaturação</i>	34
3.2.7	<i>Concentração</i>	35
3.2.8	<i>Quantificação</i>	35
3.2.9	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)</i>	36
3.2.10	<i>Dicroísmo Circular (CD)</i>	37
3.2.11	<i>Emissão intrínseca de fluorescência</i>	37
3.2.12	<i>Cristalização</i>	37
4.	Resultados e Discussão	38
4.1	Proteína Precursora de BPP-CNP	38
4.1.1	Expressão e Purificação	39
4.1.2	Dicroísmo Circular e Emissão Intrínseca de Fluorescência	41
4.1.3	Ensaio de Cristalização	44
4.1.4	Otimização da Expressão em larga escala do Domínio BPP	45
4.1.5	Análise de Solubilidade	46
4.1.6	Expressão, Purificação e Renaturação	49
4.1.7	Análise do alinhamento entre seqüências da proteína precursora	52
4.2	NUDEL	55
4.2.1	Expressão e Purificação	55
4.2.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	58
4.2.3	Dicroísmo Circular e Emissão Intrínseca de Fluorescência	62
4.2.4	Cristalização	65
5.	Conclusões e Perspectivas	66
5.1	Proteína Precursora de BPP-CNP	66
5.2	NUDEL	68
6.	Reconhecimento	69
	Referências Bibliográficas	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mecanismo vasoconstritor do Sistema Renina-Angiotensina para controle da pressão arterial..... 4
- Figura 2: Esquema da proteína precursora de BPPs da glândula de veneno de *Bj* separada em domínios segundo MURAYMA *et. al*, 1997..... 7
- Figura 3: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, esta deduzida, do clone codificando BPPs e CNP de *Bj*. 8
- Figura 4: Representação esquemática das construções das proteínas recombinantes da proteína precursora de BPP-CNP. 39
- Figura 5: Análise da purificação do domínio BPP por cromatografia de afinidade de Ni-NTA em SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Blue (A). *Western blotting* mostrando o reconhecimento da banda, correspondente à proteína recombinante (domínio BPP) pelo anticorpo anti-cauda de histidinas, após a purificação (B). 40
- Figura 6: Análise da purificação do domínio BPP+CNP por cromatografia de afinidade de Ni-NTA em SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Blue (A). *Western blotting* mostrando o reconhecimento da banda, correspondente à proteína recombinante (domínio BPP+CNP) pelo anticorpo anti-CNP, após a purificação (B). 41
- Figura 7: Espectros de CD no UV distante do domínio BPP (A) e domínios BPP+CNP (B) na presença de 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 em temperatura ambiente. 42
- Figura 8: Espectro de emissão de fluorescência do domínio BPP (A) e dos domínios BPP+CNP (B) na presença de 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 em temperatura ambiente..... 44
- Figura 9: Cristais obtidos por meio do sistema automatizado de cristalização HoneyBee.. 45
- Figura 10: Esquema representativo dos testes de expressão do domínio BPP..... 46
- Figura 11: Análise da expressão do domínio BPP em meio 2YT (A) e Fermentativo (B) em três densidades ópticas (0,8, 1,5 e 2,0) e dois tempos de indução diferentes (4 e 16 h (O.N.)), em BL21 (DE3) a 37 °C, por SDS-PAGE 12,5 %..... 46
- Figura 12: Análise da solubilidade do domínio BPP a partir da indução em meio 2YT a 37 (A), 25 (B) e 30 °C (C), apresentando as amostras, após lise celular, das frações solúvel (F.S.) e insolúvel (F.I.), em diferentes tempos de indução (4, 8 e 16 h), por meio de SDS-PAGE 12,5 %.. 47
- Figura 13: Esquema representativo dos testes de solubilidade para o domínio BPP. 48

Figura 14: Análise de solubilidade do domínio BPP avaliando a influência de altas densidades ópticas (2,5 e 3,0) na solubilidade da proteína recombinante após indução da expressão por 4 h a 37 °C (C) por SDS-PAGE 12,5 %. Fração solúvel (F.S.); Fração insolúvel (F.I.).	49
Figure 15: Análise por SDS-PAGE 12,5 % das frações eluídas da purificação por cromatografia de afinidade de Ni-NTA do domínio BPP a partir de corpos de inclusão sob condições desnaturantes (8 M de uréia) (A). <i>Western blotting</i> mostrando o reconhecimento da banda, correspondente à proteína recombinante (domínio BPP) pelo anticorpo anti-cauda de histidinas, após a purificação sob condições desnaturantes (B)..	51
Figura 17: Análise da expressão e solubilidade da proteína NUDEL, induzida em meio LB e densidade óptica de 0,8 (A) e 1,5 (B) por 4 horas em BL21 (DE3) a 30 °C, por SDS-PAGE 12,5 %.	55
Figura 18: Análise da expressão da proteína NUDEL, induzida em meio LB e densidade óptica de 0,8 por 4 horas em BL21 (DE3) a 30 °C, por SDS-PAGE 12,5 %.....	56
Figura 19: Análise por SDS-PAGE 12,5 % das frações eluídas da purificação por cromatografia de afinidade de Ni-NTA da proteína NUDEL obtida a partir da fração solúvel.....	56
Figura 20: Análise da expressão da proteína NUDEL, induzida em meio LB e densidade óptica de 0,8 por 4 horas em BL21 (DE3) a 30 °C por SDS-PAGE 12,5 %.....	57
Figura 21: Análise por SDS-PAGE 12,5% das alíquotas das etapas do processo de purificação por cromatografia de afinidade de Ni-NTA sob condições desnaturantes (A) SDS-PAGE 12,5% das frações eluídas com 500 mM de imidazol (B).....	58
Figura 22: Medidas de DLS da proteína NUDEL a 1 mg/ml em diferentes pHs, pH 9,5 (a); pH 8,5 (b); pH 7,5 (c) e pH 6,0 (d). O gráfico exemplifica a porcentagem (eixo Y) da proteína que apresenta determinado raio hidrodinâmico (eixo X).	60
Figura 23: Medidas de DLS da proteína NUDEL a 10 mg/ml em pH 7,5 na ausência de aditivos (a); presença de zinco a 0,1 mM (b) e presença de zinco e DTT (c). O gráfico exemplifica a porcentagem (eixo Y) da proteína que apresenta determinado raio hidrodinâmico (eixo X).	61
Figura 24: Espectros de CD no UV distante da proteína NUDEL na ausência de aditivos (preto), presença de Zinco (vermelho) e DTT+Zinco (verde) em 15 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 30 mM de NaCl em temperatura ambiente.....	63
Figura 25: Espectro de emissão de fluorescência da proteína NUDEL na ausência de aditivos (preto), presença de Zinco (vermelho) e presença de Zinco e DTT (verde) em 15 mM de Tris-HCl pH 7,3 e 30 mM de NaCl em temperatura ambiente. Os máximos de emissão observados para a proteína na ausência de aditivos é 332 nm, na presença de Zinco e Zinco/DTT é 334 e 336 nm, respectivamente.....	64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Composição de estrutura secundária do domínio BPP e domínios BPP+CNP. Os valores são dados em porcentagem (%) e o erro é de 5,57 % para as medidas adquiridas de 190 a 260 nm. 43
- Tabela 2: Composição de estrutura secundária da proteína nudel na ausência e presença de aditivos. Os valores são dados em porcentagem (%) e o erro é de 6,20 % para as medidas adquiridas de 195 a 260 nm. 64

LISTA DE ABREVIÇÕES

- **ACE** - *Angiotensin Converting Enzyme*
- **BCIP** - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate*
- **Bk** - *Bradykinin/Bradicinina*
- **BPPs** - *Bradykinin potentiating peptides/Peptídeos potenciados de bradicinina*
- **bBPP** - *brain BPP*
- **Bj** - *Bothrops jararaca*
- **CAT/CEPID** - *Center of Applied Toxinology/Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão*
- **CDK5** - *quinase dependente ciclina*
- **cDNA** - *DNA complementar*
- **CNP** - *C-type natriuretic peptide/Peptídeo natriurético tipo-C*
- **DISC1** - *disrupted-in-schizophrenia 1*
- **DLS** – *Dynamic light scattering/Espalhamento Dinâmico de Luz*
- **DMF** - *Dimethylformamide*
- **ECA** - *Enzima Conversora de Angiotensina*
- **E. coli** - *Escherichia coli*
- **FEZ1** - *Fasciculation and elongation protein zeta 1*
- **IPTG** - *Isopropylthio-B-D-galactoside*
- **LIS1** - *lissencephaly isolated sequence 1*
- **LNLS** – *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron*
- **NBT** - *Nitroblue tetrazolium*
- **Ni-NTA** - *ácido níquel-nitrilotriacético*
- **NUDEL** - *Nuclear Distribution Element-like*
- **nudE** – *Nuclear distribution protein E*
- **O.D.** – *Optical density/ Densidade óptica*
- **O.N.** – *Over night*
- **PD4B** - *fosfodiesterase 4B*
- **PEG** - *Polietilenoglicol*
- **RNA_m** - *RNA mensageiro*

- **rpm** - rotações por minuto
- **SDS** - Dodecil sulfato de Sódio
- **SDS-PAGE** - *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*
- **SNPs** - *single nucleotide polymorphisms*
- **TEMED** - N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina
- **TTBS** - Tween + *Tris Buffered Saline*
- **14-3-3ε** – *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide*
- **vc** – volume de coluna

RESUMO

Angiotensina II, um peptídeo hipertensivo, e bradicinina, um peptídeo hipotensivo, são fatores humorais cruciais para a regulação da pressão sanguínea. A enzima chave desse sistema é a enzima conversora de angiotensina que produz angiotensina II a partir de angiotensina I e degrada bradicinina. A descoberta dos primeiros inibidores naturais dessa enzima, os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), tornou possível o desenvolvimento dos primeiros medicamentos utilizados no controle da pressão arterial humana. Caracteristicamente, os BPPs contêm de 5 a 13 resíduos de aminoácidos apresentando um resíduo de piroglutâmico no N-terminal e um resíduo de prolina no C-terminal. O precursor de BPPs encontrado na glândula de veneno de *Bothrops jararaca* contém 256 resíduos de aminoácidos e codifica para sete BPPs alinhados em *tandem* seguidos pelo peptídeo natriurético tipo-C. Até o momento, não se conhecem os mecanismos envolvidos para a liberação desses peptídeos da proteína precursora. Dessa forma, a resolução da estrutura dessa proteína pode contribuir para a elucidação do mecanismo envolvido no processamento do precursor para a liberação dos BPPs. Duas construções da proteína precursora de BPPs (domínio BPP e domínios BPP+CNP) da glândula de veneno de *B. jararaca* foram expressas, purificadas e suas identidades confirmadas por experimentos de *western blotting*. A pureza das amostras foi avaliada por SDS-PAGE e a presença de enovelamento após expressão heteróloga foi observada por experimentos de dicroísmo circular e fluorescência. Os ensaios de cristalização não foram promissores. Isso pode ser explicado pela baixa concentração da proteína usada no experimento. Assim, devido ao baixo nível de expressão de ambas as proteínas, métodos para maximização da expressão foram empregados resultando em significativo aumento da expressão do domínio BPP, porém em corpo de inclusão. Métodos de solubilização da proteína a partir da fração insolúvel foram utilizados e a purificação sob condições desnaturantes resultou em alto rendimento e pureza da amostra. Até o momento, nenhum procedimento de renaturação mostrou-se adequado. Além do projeto principal, trabalhos paralelos com a proteína NUDEL (do inglês *nuclear distribution element-like*) de *Rattus norvegicus* foram realizados com o objetivo de estabelecer um procedimento de expressão e purificação com alto rendimento e pureza para estudos de cristalização. A proteína foi altamente expressa, purificada a partir de corpos de inclusão e renaturada pelo método da diluição utilizando-se L-arginina como agente estabilizador dos estados intermediários da renaturação. Estudos de espalhamento dinâmico de luz mostraram que, na presença de 0,1 mM de zinco e 1 mM de DTT, a proteína apresenta-se monomérica e monodispersa. Análises de dicroísmo circular mostraram a presença de estrutura secundária com predominância de folhas- β o que indica que a proteína está enovelada após o processo de renaturação. Ensaios de cristalização da proteína na ausência e presença dos aditivos DTT e zinco estão sendo realizados.

Palavras-chave: Bradicinina, Peptídeos Potenciadores de Bradicinina, *Bothrops jararaca*, Enzima Conversora de Angiotensina, Peptídeo Natriurético Tipo-C.

ABSTRACT

Angiotensin II, a hypertensive peptide, and bradykinin, a hipotensive peptide, are crucial humoral factors for the regulation of blood pressure. The key enzyme for this system is the angiotensin-converting enzyme that produces angiotensin II from angiotensin I and degrades bradykinin. The discovery of the first natural inhibitors for this enzyme, the bradykinin potentiating peptides (BPPs), made it possible to develop the early drugs aimed at controlling unbalanced cardiovascular functions. Characteristically, BPPs contain 5 to 13 amino acid residues that have a pyroglutamyl residue at the N-terminus and a praline residue at the C-terminus. The BPP precursor protein contains 256 amino acid residues coding for seven BPPs aligned in tandem followed by the C-type natriuretic peptide. At present, there are no suggested mechanisms for understanding the release of BPPs from the precursor protein. Two constructs of the BPP precursor protein (BPP domain and BPP+CNP domains) from the venom gland of *Bothrops jararaca* were over-expressed, purified and the identity of both recombinant proteins confirmed by western blotting experiments. The purity of the samples was assessed by SDS-PAGE and the protein fold after expression was observed by circular dichroism and fluorescence experiments. Crystallization assays were not successful, probably due to the low protein concentration used for the experiment. Considering the low expression level observed for both recombinant proteins, the experimental methods were optimized to maximize the yield and resulted in high protein amounts in inclusion bodies. Methods were applied aiming at the solubilization of the proteins from the insoluble fraction and protein purification under denaturing conditions was carried out yielding high amounts of pure protein. Until this moment, none of the procedures were successful in producing refolded proteins. Work conducted in parallel with the NUDEL protein (*nuclear distribution element-like*) from *Rattus norvegicus* was carried out with the aim of establishing an experimental procedure for obtaining high amounts of pure protein for crystallization studies. The protein was over expressed, purified from inclusion bodies and refolded by the dilution method using L-arginine as a stabilizing agent for the intermediary steps of the refolding process. Dynamic light scattering studies demonstrated that the protein was monomeric and monodisperse in the presence of 0.1 mM of zinc and 1 mM of DTT. Circular dichroism analysis showed the presence of secondary structure composed mainly of β -sheets indicating that the protein was folded after the process. Crystallization assays of the protein in the presence and absence of the additives DTT and zinc are currently being carried out.

Key Words: Bradykinin, Bradykinin Potentiating Peptides, *Bothrops jararaca*, Angiotensin Converting Enzyme, C-type Natriuretic Peptide.

Capítulo 1. Introdução

Esta dissertação aborda o estudo de duas proteínas envolvidas em sistemas não relacionados. A proteína precursora dos peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs, do inglês *Bradykinin potentiating peptides*) da glândula de veneno de *Bothrops jararaca* (Bj) possui 256 aminoácidos contendo sete BPPs, potentes inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) usados como modelo para desenho de drogas anti-hipertensivas, e um peptídeo natriurético tipo-C. A proteína NUDEL (do inglês *Nuclear Distribution Element like*) de *Rattus norvegicus* está relacionada com o desenvolvimento neural em mamíferos e sua interação com outras proteínas citosólicas possivelmente implica na relação dessa proteína com a etiologia da esquizofrenia.

A condição de alta pressão arterial (hipertensão) é o fator predominante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo apontada como a maior causa de morte mundialmente. A hipertensão é uma doença comum afetando cerca de 1 bilhão de pessoas, tornando-se, assim, um impactante problema de saúde pública (WHO, 2002). Existem muitas classes de medicamentos aplicadas ao tratamento da hipertensão, chamadas, como um todo, de anti-hipertensivos, as quais agem, de diferentes maneiras, reduzindo a pressão arterial. Uma das drogas de destaque no tratamento da hipertensão arterial humana consiste de inibidores da ECA, como o captopril, enalapril, fosinopril

(Monopril), lisinopril (Zestril), quinapril, ramipril (Altace). O captopril foi desenvolvido em 1975 e é um dos primeiros sucessos do conceito revolucionário do desenho racional de drogas. O Captopril foi desenhado com base na estrutura dos BPPs, potentes inibidores da ECA, descobertos no veneno da serpente brasileira *Bj* (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970). Em 1997, Murayama et al. (1997) reportou a existência de um cDNA da glândula de veneno de *Bj* que codifica para a proteína precursora dos BPPs, esclarecendo a origem desses peptídeos, embora não elucidando o mecanismo de liberação dos mesmos a partir da proteína precursora. O precursor apresenta sete BPPs alinhados em *tandem* intercalados por uma seqüência consenso de cinco aminoácidos. Estudos estruturais da proteína precursora de BPPs da glândula de *Bj*, além de potencialmente fornecer um novo enovelamento protéico, justificando, assim, a importância da biologia estrutural em descrever e estudar novos tipos de enovelamento existentes na natureza, também podem contribuir para a indicação de motivos estruturais possivelmente envolvidos na liberação dos BPPs do precursor.

A NUDEL é uma proteína homóloga ao produto do gene *nudE* de *Aspergillus*, um membro de um grupo de genes considerado importante na migração nuclear em fungos (EFIMOV; MORRIS, 2000). A NUDEL é uma cisteíno-peptidase de 345 aminoácidos e sua interação com proteínas citosólicas é essencial para a função normal do cérebro, incluindo desenvolvimento e migração neural (OZEKI et al., 2003), enquanto sua atividade peptidásica sugere um papel na regulação da ação de neuropeptídeos no sistema nervoso central. Sabe-se que a NUDEL liga-se ao produto do gene do fator de risco à esquizofrenia, a proteína DISC1 (do inglês *disrupted-in-schizophrenia 1*) (BRANDON et al., 2004). A DISC1 foi identificada como fator de risco para esquizofrenia por meio de um estudo com uma família escocesa apresentando a translocação (1;11)(q42.1;q14.3) que resulta no locus DISC1 interrompido e acarreta essa doença psíquica (MILLAR et al., 2001). O mutante hipotético proveniente da translocação no gene origina uma DISC1 que não se complexa à NUDEL. Sugere-se que a atividade da NUDEL pode ser regulada por meio de interações proteína-proteína e que o rompimento dessas interações, como postulado para a translocação no locus DISC1, promoveria uma regulação aberrante da atividade da NUDEL, acarretando, possivelmente, a gênese da esquizofrenia. Nesse sentido, estudos

estruturais são fundamentais para desvendar o mecanismo catalítico e prover mais informações sobre a inibição por DISC1.

Nas seções seguintes desse capítulo será feita uma descrição mais detalhada de cada um dos sistemas estudados nesse trabalho. Brevemente, o capítulo 2 apresenta os objetivos do trabalho e o capítulo 3 a metodologia empregada nos estudos desenvolvidos. Os resultados e discussões são abordados no capítulo 4 e, finalmente, as conclusões e perspectivas são apresentadas no capítulo 5. Em cada capítulo, a primeira parte refere-se à proteína precursora de BPPs e a segunda à NUDEL.

1.1 Regulação da Pressão Arterial

O controle da pressão arterial é feito por dois sistemas: o sistema nervoso central e o sistema que envolve rins e fluidos corporais. O controle de curto prazo da pressão arterial (minutos a horas) é exercido pelo sistema simpático com sua ação sobre a resistência vascular periférica total e ritmo cardíaco. Já o controle em longo prazo está relacionado ao equilíbrio entre o ganho e a perda de fluidos corporais, esse determinado, majoritariamente, pelos rins por meio da regulação da excreção de água e sal. Adicionalmente, os rins possuem outro mecanismo, que também resulta na regulação da excreção de água e sal, ainda mais poderoso no controle da pressão arterial: o sistema renina-angiotensina (GUYTON; HALL, 2006).

Renina é uma enzima liberada pelos rins quando a pressão arterial atinge valores muito baixos. A renina é sintetizada e armazenada em sua forma inativa, pró-renina, nas células justa-glomerulares dos rins. Quando há uma redução na pressão arterial, ocorre a conversão da pró-renina em renina e, por conseguinte, sua liberação no sangue. A renina, então, age enzimaticamente sobre angiotensinogênio, liberando um peptídeo de 10 aminoácidos, angiotensina I. Após poucos minutos da formação da angiotensina I, esse peptídeo é processado nos pulmões pela ECA, presente no endotélio dos vasos sanguíneos, com a consequente liberação de angiotensina II. A angiotensina II é um poderoso vasoconstritor e, durante sua presença no sangue, exerce dois efeitos principais que resultam na elevação da pressão arterial. O primeiro deles, vasoconstrição em várias regiões do corpo, ocorre rapidamente. A constrição nas arteríolas eleva a resistência periférica total,

conseqüentemente, aumentando a pressão arterial. A segunda via pela qual a angiotensina II leva ao aumento da pressão arterial é por meio da diminuição da excreção de sais e água pelos rins. Isso eleva vagarosamente o volume de líquido extracelular e aumenta a pressão arterial durante os dias subseqüentes (Figura 1). Esse efeito de longo prazo, que age por meio do mecanismo de regulação do volume de fluidos extracelulares, é mais eficaz que o mecanismo vasoconstritor para elevação da pressão arterial e, conseqüente, manutenção da mesma (GUYTON; HALL, 2006).

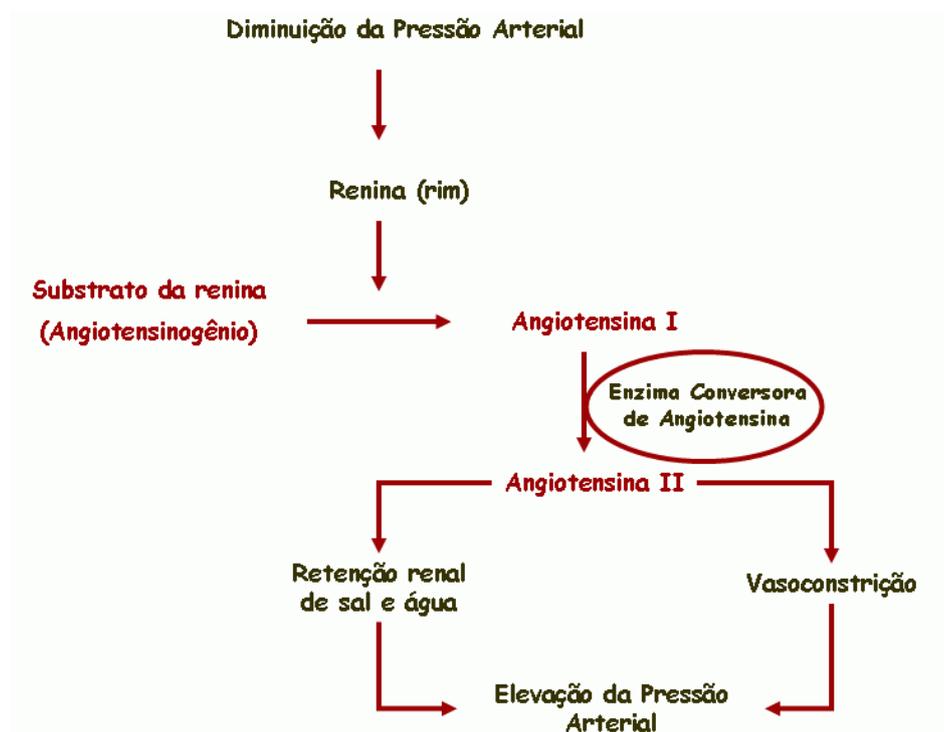


Figura 1: Mecanismo vasoconstritor do Sistema Renina-Angiotensina para controle da pressão arterial. O desenho ilustra as principais etapas da ativação do sistema Renina-Angiotensina, por meio da liberação da renina e sua posterior ação sobre o angiotensinogênio plasmático resultando na formação de angiotensina I. Essa, por sua vez, é convertida em angiotensina II que atua na elevação da pressão arterial de duas maneiras, a vasoconstrição e a retenção de sais e água.

A hipertensão arterial destaca-se como um dos principais problemas de saúde mundial. No Brasil, 10 a 15 % da população é hipertensa. Nos Estados Unidos da América, cerca de um em três adultos são hipertensos e, aproximadamente, um terço dessas pessoas não sabe que possui a doença.

Hipertensão arterial é a pressão arterial acima de 140 x 90 mmHg (milímetros de mercúrio), medida em repouso de quinze minutos e confirmada três vezes consecutivas e em várias visitas médicas. A hipertensão arterial sistêmica é uma doença crônica que,

quando não tratada e controlada adequadamente, pode levar a complicações que atingem o sistema nervoso central, o coração, os rins, entre outros órgãos.

1.1.2 Os BPPs e o controle da pressão arterial

Duas grandes contribuições para o entendimento dos processos envolvidos no controle da pressão arterial advindas dos estudos dos mecanismos moleculares do envenenamento por *Bj* foram a descoberta do peptídeo hipotensivo bradicinina (Bk do inglês *Bradykinin*) (ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949) e dos BPPs (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970). A ação sinérgica da bradicinina endógena, produzida pela ação de serino-proteases de *Bj*, com os BPPs causa um choque vascular na presa, geralmente pequenos animais (HAYASHI; CAMARGO, 2005).

A Bk faz parte do grupo de proteínas conhecido como cininas. A Bk é um nonapeptídeo (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), com ação hipotensiva e estimulatória de músculos lisos (MEKI; NASSAR; ROCHA, 1995), sendo liberada pela ação de cininogenases endógenas ou exógenas sobre o cininogênio plasmático. A Bk causa queda na pressão arterial sistêmica devido a sua habilidade em elevar a permeabilidade vascular e induzir alterações nas propriedades contráteis de músculos lisos (JOHNSON, 1979; NEEDELMAN; MARSHALL; SABEL, 1975). O controle da Bk nos fluidos corporais é exercido por meio de sua hidrólise pela ação da ECA ou cininase II (LERNER, 1996).

Caracteristicamente, os BPPs contêm de 5 a 13 resíduos de aminoácidos apresentando um resíduo piroglutâmico no N-terminal e uma prolina no C-terminal. Todos os BPPs, com exceção de três (BPP-5a, BPP-5b e BPP-6a), são ricos em prolina e apresentam o tripeptídeo Ile-Pro-Pro no C-terminal (MURAYAMA et al., 1997).

Os BPPs presentes no veneno de *Bj* foram os primeiros inibidores naturais da ECA descritos e, também, os primeiros compostos capazes de bloquear eficientemente a ECA *in vivo*, prevenindo, assim, o aumento da pressão arterial induzida pela injeção de Angiotensina I (KRIEGER et al., 1971; MILLER et al., 1972; GAVRAS et al., 1974; CASE et al., 1977). Devido às propriedades farmacológicas dos BPPs relacionadas à ECA, essa metaloproteína endotelial foi apontada, nos anos 70, como alvo metabólico crítico pela indústria farmacêutica para elaboração de drogas anti-hipertensivas (NG; VANE, 1970). Portanto, os BPPs foram essenciais para o desenho racional do primeiro inibidor

direcionado ao sítio ativo da ECA, chamado Captopril, usado no tratamento da hipertensão humana (ONDETTI; CUSHMAN, 1981). Os inibidores da ECA são amplamente usados no tratamento de pacientes que apresentam hipertensão, deficiência cardíaca e nefropatia diabética (BRUNNER; NUSSBERGER; WAEBER, 1994). A ação anti-hipertensiva dos inibidores da ECA é explicada, em parte, pelo impedimento da formação de Angiotensina II (peptídeo vasoconstritor) e pela potencialização dos efeitos hipotensivos da Bk (LINZ et al., 1995).

A ECA (peptidil dipeptidase A, EC 3.4.15.1) é uma peptidase da membrana citoplasmática de células endoteliais responsável pela conversão de Angiotensina I em Angiotensina II assim como pela degradação de bradicinina. A ECA é expressa, principalmente, nas células endoteliais vasculares, nas células epiteliais, nos tubos proximais do fígado, no cérebro e nas células da bordadura em escova do intestino (TURNER; HOOPER, 2003)

Desde o início dos anos 90, sabe-se que a ECA somática apresenta dois sítios ativos funcionais e homólogos, um no domínio N (sítio-N) e outro no domínio C (sítio-C), sendo que cada sítio ativo é caracterizado pela presença da seqüência consenso de metaloprotease zinco-dependente (WEI et al., 1991). Mostrou-se que, *in vitro*, os dois sítios ativos são altamente eficientes na conversão de angiotensina I em angiotensina II e também na degradação da Bk (JASPARD; WEI; ALHENC-GELAS, 1993; VILLARD; SOUBRIER, 1996).

Recentemente, foi mostrado que algumas seqüências de BPPs de *Bj* possuem alta especificidade por um dos sítios ativos da ECA somática. Dois BPPs (*bBPP-11e* e *bBPP-12b*) destacam-se pela potência de inibição e seletividade aos sítios ativos da ECA (HAYASHI; CAMARGO, 2005).

O *bBPP-12b* está entre os melhores potenciadores de bradicinina, mostrando uma preferência 30 vezes maior para o sítio-N da ECA. Por outro lado, o inibidor mais seletivo para o sítio-C da ECA (*bBPP-10c*) apresentou o efeito de potencialização da bradicinina com duração mais longa. O inibidor menos efetivo da ECA é o pentapeptídeo (BPP5-a), embora apresente o efeito potenciador de bradicinina mais surpreendente em íleo isolado de cobaia (HAYASHI et al., 2003). Coincidentemente, o Captopril, utilizado clinicamente como inibidor da ECA, bem como o *bBPP-12b* e o BPP-5a são os mais seletivos para o

sítio-N da ECA, além de serem fortes potenciadores da bradicinina. (HAYASHI; CAMARGO, 2005).

Até o momento, não são conhecidos os motivos pelos quais ocorre ligação preferencial de BPPs altamente similares aos diferentes sítios ativos da ECA, nem os mecanismos para explicar a inibição da ECA pelos inibidores direcionados ao sítio ativo. Dessa forma, estudos adicionais de estrutura-função dos peptídeos com a ECA se fazem necessários para que sejam desvendados os elementos estruturais críticos na interação seletiva dos BPPs com os domínios C e N da ECA e os mecanismos de inibição dos BPPs.

1.1.3 O precursor de BPP-CNP da glândula de veneno de *Bj*

Em 1997, um cDNA de 1,8 kb foi isolado da glândula de veneno de *Bj* codificando uma única proteína precursora de 256 resíduos de aminoácidos contendo peptídeos potenciadores de bradicinina e um peptídeo natriurético tipo-C (CNP, do inglês *C-type natriuretic peptide*). O pré-propolipeptídeo potenciador de bradicinina é composto de quatro domínios distintos (figura 2) (MURAYAMA et al., 1997):

- Um peptídeo sinal hipotético de 22 resíduos de aminoácidos localizado na porção N-terminal do precursor.
- Uma seqüência progenitora dos BPPs de 102 resíduos de aminoácidos (26-127) contendo sete BPPs arranjados em *tandem*, formando uma estrutura “tipo rosário”.
- Uma seqüência de conexão (resíduos 128-225) com função desconhecida (*Linker*).
- Uma região progenitora (31 resíduos) do peptídeo de 22 resíduos de aminoácidos, homólogo ao CNP de mamífero, localizado na porção C-terminal da molécula.

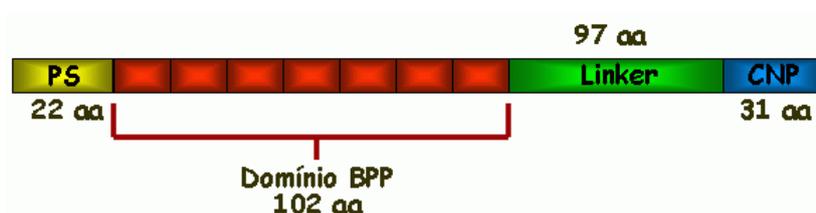


Figura 2: Esquema da proteína precursora de BPPs da glândula de veneno de *Bj* separada em domínios segundo MURAYMA et al., 1997. PS: Peptídeo Sinal; Linker: seqüência de conexão; CNP: Peptídeo Natriurético Tipo-C.

O domínio BPP é rico em triptofano (9,2 %), prolina (26,2 %) e glutamina (18,5 %). O mesmo contém cinco cópias de BPPs de 10 a 13 resíduos de aminoácidos, flanqueados por

seqüências conservadas de 5 resíduos de aminoácidos (VQQWA), e duas repetições de BPPs de 5 resíduos de aminoácidos. Cada BPP possui um resíduo de glutamina no N-terminal e um resíduo de prolina no C-terminal, segundo a seqüência derivada do cDNA (MURAYAMA et al., 1997) (Figura 3).

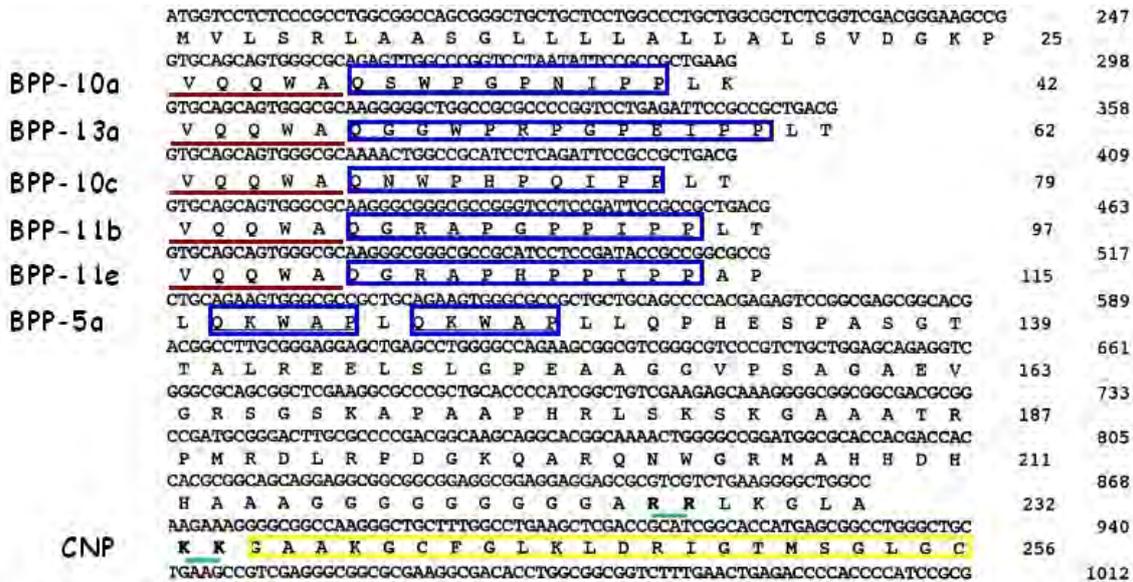


Figura 3: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, esta deduzida, do clone codificando BPPs e CNP de *Bj*. A seqüência de 1733 nucleotídeos codifica um precursor de 256 resíduos de aminoácidos composto de 7 BPPs alinhados em *tandem* (caixas azuis) e um CNP no C-terminal (caixa amarela). A região correspondente aos primeiros cinco BPPs está alinhada de forma a mostrar os resíduos conservados entre as seqüências de BPPs (grifados em vermelho). Os pares de resíduos dibásicos, sinais para o processamento do CNP, nas posições 226-227 e 233-234 estão grifados em verde (MURAYAMA et al., 1997).

No entanto, acredita-se que, para a completa biossíntese dos BPPs, o resíduo N-terminal deva ser ciclizado pela ação de uma piroglutaminil ciclase, uma vez que a maioria dos BPPs apresenta um resíduo de piroglutamato no N-terminal. Por fim, não há nenhum sinal de processamento característico de pró-hormônio flanqueando as seqüências de BPPs (MURAYAMA et al., 1997)

Os peptídeos natriuréticos constituem outro grupo de hormônios peptídicos de ocorrência natural envolvido na regulação da pressão arterial e volume sanguíneo (DAVIDSON; BAR; STRUTHERS, 1996). Em contraste com os outros peptídeos natriuréticos, o CNP é sintetizado no cérebro e apresenta efeitos hipotensivos, sem ações diurética ou natriurética significantes (CHO; SOMER; AMATYA, 1999).

Em mamíferos, as formas precursoras de CNP são altamente conservadas. No entanto, o precursor de CNP da glândula de veneno de *Bj* não apresenta similaridade significativa com seu correlato encontrado em mamíferos, com exceção da região C-terminal de 22 aminoácidos. Essa região corresponde ao peptídeo natriurético maduro é marcadamente similar ao CNP22 de mamíferos: 19 dos 22 resíduos são compartilhados (MURAYAMA et al., 1997).

Análises de Northern Blot (MURAYAMA et al., 1997) e estudos de hibridização *in situ* (HAYASHI et al., 2001) confirmaram a expressão da proteína precursora de BPP-CNP no sistema nervoso central e revelaram a presença da mesma em diversas regiões do cérebro de serpente, tais como o hipotálamo ventromedial, núcleo paraventricular, órgão paraventricular e órgão subcomissural. Essas regiões, provavelmente, estão envolvidas no controle neuroendócrino e regulação cardiovascular, assim como é descrito para o sistema nervoso de mamíferos. Mais recentemente, um cDNA altamente similar ao encontrado na glândula de veneno que codifica para um precursor de BPP-CNP (91,2% de identidade) foi isolado do cérebro de *Bj* (HAYASHI et al., 2003). Três das cinco isoformas de *bBPP* (*brain-BPP*) presentes no precursor do cérebro de *Bj* (*bBPPs* de 5, 10 e 13 resíduos de aminoácidos) são idênticas àquelas encontradas no precursor da glândula de veneno de *Bj*. As outras duas seqüências de *bBPPs*, constituídas por 11 e 12 resíduos de aminoácidos (*bBPP-11e* e *bBPP-12b*), ainda não haviam sido descritas (HAYASHI et al., 2003).

A distribuição do precursor nessas regiões do cérebro de *Bj* corrobora a hipótese da existência de funções neuroendócrinas para esses peptídeos. Assim, a presença desse RNAm em regiões do cérebro de *Bj* correlacionadas com funções neuroendócrinas e a co-expressão de BPPs de *Bj* com o regulador endócrino CNP sugerem, fortemente, que os BPPs provenientes de cérebro de *Bj* sejam novos hormônios peptídicos, possivelmente envolvidos na regulação da pressão arterial (HAYASHI et al., 2003).

Uma comparação mais detalhada das seqüências de nucleotídeos e dos aminoácidos correspondentes dos precursores de BPP-CNP do cérebro e glândula de veneno de *Bj* revelou inserções/deleções e mutações pontuais no precursor isolado da glândula de veneno, a maioria delas encontradas nas regiões codificantes para os BPPs, acarretando, assim, em uma grande variedade de peptídeos ativos gerados pela glândula de veneno (HAYASHI; CAMARGO, 2005). Esse processo de mutações aceleradas, no caso dentro do

domínio BPP, tem sido amplamente observado em toxinas, como fosfolipases A₂, sendo descrito como um efeito de evolução acelerada do tipo-Darwiniana (NAKASHIMA et al., 1995; OHNO et al., 1998).

Dessa forma, a aquisição de tal diversidade de isoformas de BPP bioativas no veneno deve proporcionar uma grande vantagem evolutiva além de refletir as variações ambientais, como, por exemplo, as experiências alimentares. Conseqüentemente, os precursores de BPP-CNP na glândula de veneno provêm um arsenal de toxinas eficientes na ruptura da integridade fisiológica das presas, servindo ao propósito da alimentação e defesa contra predadores, enquanto a seqüência do precursor cerebral deve preencher as necessidades fisiológicas das serpentes, agindo como peptídeos endógenos.

Por fim, conclui-se que os BPPs interferem decisivamente na homeostase da circulação sanguínea, a princípio inibindo a atividade da ECA. No entanto, são desconhecidos a estrutura tri-dimensional do precursor, a maneira pela qual os BPPs são liberados da proteína precursora e os preceitos envolvidos na inibição da ECA. Portanto, a caracterização estrutural da proteína precursora de BPPs é de valor inestimável para a elucidação do mecanismo envolvido no processamento do precursor, evidenciando regiões da proteína mais expostas que, provavelmente, estariam mais propícias à primeira clivagem enzimática para a liberação dos peptídeos.

1.2. Esquizofrenia e doenças neurológicas relacionadas

A esquizofrenia é uma desordem psíquica que afeta cerca de 1 % da população mundial (BRANDON et al., 2004) sendo caracterizada por distúrbios do funcionamento emocional e social e psicose. É considerada também uma doença genética complexa, com herdabilidade consideravelmente alta, que se relaciona a mal-formações do hipocampo e córtex dorsolateral (LIPSKA et al., 2006). A doença se manifesta, na maioria das vezes, na adolescência e início da fase adulta, mas, raramente, na infância. Recentemente, vários genes foram identificados como genes candidatos para a suscetibilidade à esquizofrenia, incluindo *neuregulin 1* (STEFANSSON et al., 2002), *dysbindin* (STRAUB et al., 2002), *G72* (CHUMAKOV et al., 2002), *catechol-O-methyltransferase* (EGAN et al., 2001; BILDER et al., 2002; SHIFMAN et al., 2002), e outros (CRADDOCK et al., 2005;

HARRISON; WEINBERGER, 2005). Embora esses genes candidatos tenham sido identificados, os mecanismos moleculares nos quais se baseia a doença são desconhecidos.

DISC1 é um dos genes candidatos mais prováveis para a suscetibilidade à esquizofrenia e doenças relacionadas (MILLAR et al., 2000; BLACKWOOD et al., 2001; CRADDOCK et al., 2005). Em uma família escocesa, a translocação cromossômica (1;11)(q42.1;q14.3) foi associada com doenças psíquicas graves, como a esquizofrenia, desordem bipolar e depressão recorrente, porém com predominância da sintomatologia da esquizofrenia (BLACKWOOD et al., 2001). Essa translocação interrompe a seqüência que codifica para a proteína DISC1, acarretando em uma diminuição na expressão dessa proteína ou na deleção de 257 resíduos de aminoácidos da região C-terminal da mesma (MILLAR et al., 2005). Análises usando polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) da região 1q42 indicaram que o gene *DISC1* tem um papel importante na etiologia da esquizofrenia (HENNAH et al., 2003; HODGKINSON et al., 2004; CALLICOTT et al., 2005).

O gene *DISC1* codifica uma proteína de 854 aminoácidos que não apresenta homologia com outras proteínas conhecidas e pouca homologia entre espécies (MILLAR et al., 2005). A seqüência de aminoácidos da DISC1 prediz que esta pode atuar como uma “plataforma” de interação com múltiplos motivos de ligação, facilitando a formação de complexos com outras proteínas. O domínio N-terminal, supostamente globular, (aminoácidos 1-347) contém sinais de localização nuclear enquanto o C-terminal (aminoácidos 348-854) é formado por *coiled coil*, o que sugere um papel de interação com outras proteínas, além de ser importante para o endereçamento de complexos para os microtúbulos. Em culturas celulares, mutantes da DISC1 que possuem o C-terminal truncado (como predito pela translocação no cromossomo 1q42) dificultam ou impedem o transporte intracelular, a arquitetura e migração neural. A hipótese de que a forma patológica da DISC1 encontrada na família escocesa seja incapaz de interagir com proteínas parceiras recebeu suporte de estudos de duplo-híbrido em levedura que confirmaram as proteínas NUDEL (OZEKI et al., 2003; MILLAR et al., 2003; MORRIS et al., 2003), *Fasciculation and elongation protein zeta 1* (FEZ1) (MIYOSHI et al., 2003), *lissencephaly isolated sequence 1* (LIS1) (BRANDON et al., 2004) e fosfodiesterase 4B (PD4B) (MILLAR et al., 2005) como ligantes da DISC1. Entre essas proteínas, a associação com a NUDEL e LIS1 confirma o fato de que a DISC1 contribui para a o desenvolvimento e morfologia neural

(KHOLMANSKIKH et al., 2003). Atualmente, assume-se que a DISC1 é um fator de risco genético geral para doenças psíquicas.

1.2.1 DISC1 e sua interação com NUDEL

Devido ao fato de a DISC1 ter emergido como o elemento fundamental na etiologia de doenças mentais e na manutenção de processos cerebrais normais, a procura dos mecanismos pelos quais a DISC1 exerce essas funções tornou imperativa a busca por proteínas de interação. Como descrito acima, a DISC1 interage com várias proteínas que possuem algum papel neurobiológico, destacando-se a proteína NUDEL.

A proteína NUDEL associa-se com componentes do citoesqueleto e assume importante papel na estabilização do citoesqueleto, mitose celular, tráfego de membranas e migração neuronal. Devido ao fato de a DISC1 interagir com a NUDEL, supõe-se que a DISC1 também deva contribuir para esses eventos (BRANDON et al., 2003, NIETHAMMER et al., 2000, SASAKI et al., 2000, TAYA et al., 2007, TOYO-OKA et al., 2003, OZEKI et al., 2003).

O complexo DISC1/NUDEL existe no cérebro de camundongo e é regulado de acordo com os estágios do desenvolvimento neural. O complexo é expresso no córtex cerebral e está, majoritariamente, presente na embriogênese tardia, quando ocorre o desenvolvimento do córtex no embrião, apresentando-se em nível bem reduzido na vida pós-natal. Importantes evidências que relacionam a translocação em DISC1 com anormalidades corticais provêm de estudos que mostram que a DISC1 mutante afeta a migração neural.

Além de seu papel na migração neural, o complexo DISC1/NUDEL também está envolvido nos mecanismos que acarretam o crescimento neural (alongamento axonal), uma vez que a NUDEL foi, primeiramente, identificada como uma proteína de ligação à LIS1 (NIETHAMMER et al., 2000; SASAKI et al., 2000) por meio de sua porção amino-terminal, uma região de *coiled coil* que compreende o sítio de ligação para a LIS1. Mutações em LIS1 acarretam lisencefalia tipo 1, que é caracterizada por má formação do cérebro humano devido a uma redução ou ausência das convoluções do córtex cerebral devido à interrupção na migração e crescimento cerebral (REINER et al., 1993; HATTORI et al., 1994, KHOLMANSKIKH et al., 2003). Essas mesmas mutações impedem a

interação entre LIS1 e NUDEL, correlacionando a não formação do complexo DISC1/NUDEL/LIS1 com a doença (FENG et al., 2000; SASAKI et al., 2000; SWEENEY et al., 2001).

O complexo NUDEL/LIS1 inicialmente se distribui nos centros organizadores de centrômero e microtúbulo e, então, é transportado para os cones de crescimento do axônio (NIETHAMMER et al., 2000; SASAKI et al., 2000). 14-3-3 ϵ se liga à NUDEL fosforilada pela quinase dependente ciclina (cdk5) e mantém a mesma fosforilada, livre da ação de fosfatases (TOYO-OKA et al., 2003). A deficiência de 14-3-3 ϵ causa defeitos no desenvolvimento cerebral os quais estão relacionados à má localização do complexo NUDEL/LIS1 nos neurônios, sugerindo que a 14-3-3 ϵ regula a localização axonal do complexo por meio da manutenção da NUDEL fosforilada (TOYO-OKA et al., 2003). A regulação do transporte do complexo NUDEL/LIS1/14-3-3 ϵ aos axônios, que causa o alongamento axonal, é feita por meio da interação da DISC1 com a NUDEL presente no complexo NUDEL/LIS1/14-3-3 ϵ . A DISC1 liga-se à NUDEL e à proteína motoras, favorecendo, assim, a correta localização do complexo no cone axonal (TAYA et al., 2007).

Um zíper de leucina na região C-terminal da DISC1 é essencial para a interação com NUDEL. Essa região seria inexistente em uma proteína afetada pela translocação anteriormente descrita, o que impediria as funções celulares dependentes do complexo DISC1/NUDEL. O sítio de ligação da DISC1 na NUDEL é altamente conservado entre espécies, sendo os resíduos L266 e E267, essenciais para a interação DISC1/NUDEL, conservados em todos os homólogos conhecidos (SWEENEY et al., 2001). Esse domínio de ligação da NUDEL com a DISC1 é compartilhado com a cadeia pesada da dineína (proteína motora) (SASAKI et al., 2000), sugerindo que a DISC1 pode inibir ou modular a interação da NUDEL com a dineína e, conseqüentemente, interferir na localização celular do complexo.

Analisando-se todas as associações do complexo DISC1/NUDEL com processos celulares relacionados à migração e crescimento neural que, por sua vez, dependem de interações importantes com componentes do citoesqueleto (proteínas motoras) e do sistema de fosforilação/desfosforilação celular, conclui-se que DISC1 e NUDEL formam um complexo de alto peso molecular consistente com o tamanho do complexo no qual a DISC1 é encontrada no cérebro de camundongo (BRANDON et al., 2004), sugerindo, então, uma

rede complexa de interações protéicas no citoplasma dos neurônios. Esse fato origina uma conexão não precedente do complexo primário DISC1/NUDEL com a etiologia da esquizofrenia, da lisencefalia e, potencialmente, de outras doenças psíquicas relacionadas.

1.2.2 NUDEL

Neuropeptídeos que desempenham uma multiplicidade de funções neuroquímicas são abundantes no sistema nervoso central. A modulação de suas ações específicas depende da atividade de enzimas proteolíticas presentes no tecido nervoso. Essas enzimas podem causar completa inativação ou conversão desses neuropeptídeos em homólogos menores e ativos (HAYASHI et al., 2000). A NUDEL é uma oligopeptidase ativada por tiol que cliva oligopeptídeos de 7 a 13 resíduos de aminoácido. O resíduo C273 é essencial para a atividade enzimática, sugerindo que a NUDEL pertença à família das cisteíno-peptidases. A NUDEL foi, primeiramente, isolada devido à sua habilidade em inativar peptídeos bioativos, como a bradicinina e neurotensina e, também, em converter peptídeos opióides em encefalinas (OLIVEIRA et al., 1976, CAMARGO et al., 1979). A NUDEL é responsável por cerca de 70% da atividade peptidásica encontrada no cérebro de rato e coelho, sendo essa atividade enzimática maior no cérebro de rato e coelho do que em qualquer tecido periférico, o que é consistente com as análises imunológicas, *western* e *northern blotting* e hibridização *in situ* (HAYASHI et al., 2000). A NUDEL está, possivelmente, envolvida na modulação da atividade neuropeptídica, uma vez que essa enzima não está confinada somente no citosol de neurônios, sendo encontrada também fora da célula. Esse fato, suportado pela forte correlação entre a localização do RNAm da NUDEL e a ocorrência de seus substratos no cérebro de rato, sugere que a NUDEL pode ter um papel parácrino e assim modular a ação de neuropeptídeos por meio de sua atividade peptidásica (HAYASHI et al., 2001).

A NUDEL é homóloga à proteína nudE de *Aspergillus*, a qual é produto do gene *nudE*, membro de um grupo de genes importantes na migração nuclear em fungos (EFIMOV; MORRIS, 2000; KITAGAWA et al., 2000). Análises da sua seqüência revelaram a presença de um motivo típico de metaloprotease [HEXXH] na porção C-terminal (H483, E484 e H487). Além das duas histidinas do motivo coordenando o zinco catalítico, postula-

se a existência de um terceiro resíduo responsável pela coordenação do metal. Na NUDEL, especula-se que o terceiro resíduo seja o ácido glutâmico localizado a 10 resíduos da H487 (E497) (HAYASHI *et al.*, 2000). A atividade de oligopeptidase da NUDEL é exercida pela sua forma monomérica, sugerindo que, quando presente em complexos, como DISC1/NUDEL, a proteína não apresenta atividade enzimática. A inibição da atividade enzimática perante ligação com DISC1 é explicada pela proximidade entre o sítio de ligação da DISC1 na NUDEL (L266 e E267) e o sítio catalítico situado próximo ao resíduo 273 (HAYSHI *et al.*, 2005). Dessa forma, a translocação em DISC1 produz uma proteína mutante incapaz de ligar à NUDEL e, conseqüentemente, de inibir sua atividade, acarretando em um aumento da atividade oligopeptidásica da NUDEL e em alterações no nível de seus substratos. Sabe-se que, dentre os substratos da NUDEL, existem alguns neuropetídeos que estão implicados na patofisiologia da esquizofrenia, como a neurotensina (HAYSHI *et al.*, 2005).

Assim, pode-se concluir que a NUDEL possui dois papéis fisiológicos fortemente entrelaçados. O primeiro relaciona-se a sua associação com proteínas citosólicas como DISC1, LIS1, 14-3-3 ϵ , essencial para o funcionamento normal do cérebro devido ao envolvimento em processos como crescimento e migração neural. O segundo diz respeito à sua atividade peptidásica, sugerindo sua participação na regulação da ação de neuropetídeos do sistema nervoso central. Esses dois papéis desempenhados pela NUDEL associam-na a pelo menos duas doenças relacionadas ao desenvolvimento do córtex cerebral: esquizofrenia e lisencefalia. Portanto, estudos estruturais da proteína NUDEL podem confirmar as predições sobre a disposição e organização dos motivos importantes para interação com DISC1, LIS1, 14-3-3 ϵ e dineína, esclarecer detalhes do sítio de ligação à zinco e do sítio de fosforilação pela cdk5, bem como elucidar seu mecanismo catalítico. Essas informações estruturais podem complementar os dados funcionais da proteína e propiciar um melhor entendimento da dinâmica neural responsável pela etiologia de doenças mentais.

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Proteína Precursora de BPPs

O objetivo geral deste trabalho foi expressar e purificar, em quantidade e pureza suficientes para estudos cristalográficos, duas construções da proteína precursora de BPPs provenientes da glândula de veneno de *Bj*, o domínio BPP e os domínios BPP+CNP. Com o fim de obter a produção das construções em larga escala e alto grau de pureza, duas estratégias foram utilizadas. A primeira consistiu na reprodução em larga escala do método de expressão e purificação estabelecido pela Prof^a. Dr^a. Mirian Hayashi do CAT-CEPID (Instituto Butantan) por meio da produção de muitos litros de cultura da bactéria portando o gene das proteínas recombinantes. A segunda estratégia promoveu modificações no método de expressão para maior rendimento e pureza das proteínas por litro de cultura. Como objetivos específicos têm-se:

- Expressão das construções em sistema de expressão procariótico (*Escherichia coli*);
- Purificação por cromatografia de afinidade;
- Análise da pureza por SDS-PAGE e identificação por *Western Blotting*;
- Renaturação (quando necessário);

- Análises espectroscópicas das proteínas por dicroísmo circular e emissão intrínseca de fluorescência;
- Ensaio de cristalização.

2.2 NUDEL

O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para expressão e purificação da proteína recombinante em quantidade, pureza e enovelamento adequados para estudos estruturais. Como objetivos específicos têm-se:

- Expressão das construções em sistema de expressão procariótico (*Escherichia coli*);
- Purificação por cromatografia de afinidade;
- Análise da pureza por SDS-PAGE;
- Renaturação (quando necessário);
- Análises espectroscópicas das proteínas por dicroísmo circular e emissão intrínseca de fluorescência;
- Análise de espalhamento dinâmico de luz;
- Ensaio de cristalização na ausência e presença de aditivos.

Capítulo 3. Procedimentos Experimentais

3.1 Proteína Precursora de BPPs

Os clones da proteína percussora do domínio BPP e dos domínios BPP+CNP provenientes da glândula de veneno *Bj* foram gentilmente cedidos pelo grupo do Prof. Dr. Antônio Carlos Martins de Camargo - Instituto Butantan/CAT/CEPID. Para a expressão e purificação das construções da proteína precursora utilizaram-se dois procedimentos diferentes. A primeira metodologia (Metodologia A) consiste na aplicação, em grande escala, dos procedimentos previamente determinados pela Prof^a. Dr^a. Mirian Hayashi com pequenas modificações. A segunda metodologia (Metodologia B) descreve os procedimentos utilizados para a maximização da expressão da proteína recombinante e aumento da pureza após purificação.

3.1.1 Metodologia A

3.1.1.1 Transformação de bactérias competentes por choque térmico.

Materiais

- Meio SOC: 0,5 % de extrato de levedura, 2 % de tripton, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose.

Métodos

50 µl de células competentes **BL21 (DE3) Codon Plus** foram incubados, em banho de gelo, por 30 minutos com 50 µg do clone contendo o inserto ligado ao vetor pProEx (Invitrogen). Após esse período, a mistura de células e DNA foi incubada por 2 minutos em banho a 42 °C e, em seguida, incubada no gelo por 3 minutos. Após o choque térmico, acrescentou-se 950 µl de meio SOC à mistura de células e DNA e seguiu-se incubação por 1 hora sob agitação (200 rpm) a 37 °C. As células foram, então, plaqueadas em placa contendo meio LB + ágar (LB Agar – Lennox L Agar – GIBCO BRL) com ampicilina a 100 µg/ml. A placa foi incubada em estufa a 42 °C por 18 horas. As bactérias que cresceram foram selecionadas para a indução da expressão protéica.

3.1.1.2 Expressão

Métodos

Uma colônia selecionada da placa de transformação foi usada para preparação do inóculo em 20 ml de LB (LB Broth Base – Lennox L Broth Base – GIBCO BRL) com 100 µg/ml de ampicilina, em tubo com capacidade para 50 ml. O inóculo foi incubado sob agitação por 18 horas a 37 °C. Após a incubação, o inóculo foi diluído (1:50) em 1 L de meio LB e, em seguida, a cultura foi incubada sob agitação a 37 °C até o crescimento celular ser observado por meio da densidade óptica no valor de 0,6.

A indução da expressão das proteínas foi feita pela adição de IPTG (Isopropylthio-B-D-galactoside – Invitrogen) utilizando-se uma concentração final de 0,5 mM (para domínio BPP) ou 1 mM (para domínios BPP+CNP) por litro de cultura por 4 horas sob agitação (200 rpm) a 30 °C. Após a indução, a cultura foi centrifugada em tubos com capacidade para 250 ml a 4000 x g, 20 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias foi ressuspensão em salina 0,9 % e transferido para tubo com

capacidade para 50 ml. Seguiu-se outra centrifugação a 4000 x g, 20 minutos, 4 °C. O precipitado de bactérias foi, então, congelado em tubos com capacidade para 50 ml no freezer a -20 °C.

3.1.1.3 Purificação

Materiais

- Tampão A (usado na Purificação do Domínio BPP): 100 mM de KCl, 20 mM de imidazol, 10 % de glicerol e 20 mM de Tris-HCl pH 8,5.
- Tampão A1 (usado na Purificação dos Domínios BPP + CNP): 100 mM de KCl, 40 mM de imidazol, 10 % de glicerol e 20 mM de Tris-HCl pH 8,5.
- Tampão B: 100 mM de KCl, 250 mM de imidazol, 10 % de glicerol e 20 mM de Tris-HCl pH 8,5.

Métodos

O precipitado de bactérias proveniente da expressão foi ressuspensão em 20 ml de Tampão A, no gelo. Em seguida, a sonicação foi feita no gelo (pulsos de 40 %, por 30 segundos, 6 repetições com intervalos de 30 segundos entre os pulsos) no aparelho VirSonic.

Seguiu-se a centrifugação a 4 °C por 15 minutos a 8000 x g em tubos de centrífuga de 50 ml. O sobrenadante foi incubado, em tubo com capacidade para 50 ml, sob agitação por 10 minutos a 4 °C em um volume de resina *Ni-NTA (Nitrilo triacetato) Agarose Beads* (Quiagen) de 500 µl, já equilibrado com tampão A.

Após a incubação, seguiu-se a centrifugação a 1100 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e a resina foi lavada 5 vezes de 10 ml com tampão A.

A resina foi, então, transferida para tubo com capacidade para 2ml com 500 µl tampão A e uma alíquota de 20 µl foi retirada para análise por SDS-PAGE. Centrifugou-se a resina com Tampão A por 5 minutos a 1100 x g a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e a resina foi incubada com 1 ml de Tampão B por 1 hora sob agitação a 4 °C. Centrifugou-se a resina com Tampão B por 5 minutos a 1100 x g a 4 °C e reservou-se o Eluato 1. Acrescentou-se mais 1 ml de tampão B à resina para incubação por 14 horas sob agitação a 4 °C.

No dia seguinte, reservou-se o Eluato 2 e adicionou-se mais 500 µl de Tampão B. Seguiu-se a centrifugação por 5 minutos a 1100 x g a 4 °C e os 500 µl do sobrenadante foram adicionados ao Eluato 2.

A resina foi lavada com 500 µl de Tampão A e uma alíquota de 20 µl da mistura da resina mais Tampão A foi retirada para análise em SDS-PAGE para verificar se toda proteína recombinante desejada foi eluída da resina.

3.1.1.4 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Materiais

- Aparato de eletroforese da Bio-Rad (cuba, fonte, placas de vidro).
- Solução do Gel Separador 12,5 %:
Para preparação de uma placa: 4,17 ml de 30 % acrilamida/0,8 % bis-acrilamida, 5 ml de Tris-HCl/SDS pH 8,8 (1,5 M Tris-HCl contendo 0,4 % de SDS), 0,8 ml de água, 50 µl de persulfato de amônio a 10 % e 15 µl de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina).
- Solução do Gel Concentrador 4 %:
Para preparação de duas placas: 0,75 ml de 30 % acrilamida/0,8 % bis-acrilamida, 2,5 ml de Tris-HCl/SDS pH 6,8 (0,5 M Tris-HCl contendo 0,4 % de SDS), 1,83 ml de água, 30 µl de persulfato de amônio a 10 % e 6 µl de TEMED.
- Tampão de Amostra: 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 mM EDTA, 1 % SDS, 5 % β-mercaptoetanol, 8 % glicerol, 0,025 % azul de bromofenol.
- Tampão de corrida: 25 mM Tris base, 250 mM glicina, 0,1 % (w/v) SDS
- Corante Comassie Blue: 50 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) ácido acético e 0,25 % (v/v) *Commassie Blue*
- Descorante: 12,5 % (v/v) de metanol e 5 % (v/v) ácido acético.

Métodos

Após a montagem das placas de vidro segundo as instruções do fabricante, a solução do gel separador foi preparada e imediatamente aplicada entre as placas de vidro. A superfície da solução do gel separador foi, então, coberta com uma camada de butanol até a apropriada polimerização do gel. Removeu-se, em seguida, a camada de butanol e a solução do gel concentrador foi preparada e aplicada sobre a camada do gel separador. O pente foi

encaixado na superfície do gel concentrador e esperou-se até a apropriada polimerização do mesmo.

Seguindo-se à montagem e preparação do gel, o mesmo foi colocado na cuba de eletroforese com tampão de corrida de forma que os poços do gel concentrador estivessem imersos em tampão.

A preparação da amostra para aplicação no gel consistiu na diluição da proteína na proporção de 1:1 em tampão de amostra seguida do aquecimento a 100 °C por 5 minutos. Após a aplicação da amostra nos poços, a cuba foi conectada à fonte e uma corrente de 30 mA (120 V) foi aplicada para a corrida do gel. Para visualização, os géis foram corados com Coomassie blue por 30 minutos e descorados em solução de 5% de ácido acético e 12,5% de metanol.

3.1.1.5 Western Blotting

Materials

- Marcador molecular: Full-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker RPN800V GE Healthcare
- Esponja
- Papel de filtro
- Membrana de transferência de nitrocelulose
- Aparato de eletroblotting.
- Tampão de Transferência: 14,4 g Glicina, 3 g de Tris, 200 ml de metanol e 800 ml de água.
- Tampão TTBS (Tween 0,05 % + Tris Buffered Saline): 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,9 % NaCl, Tween 0,05 %.
- Tampão do substrato da Fosfatase Alcalina: 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl e 5 mM de MgCl₂.
- Albumina (BSA) 3 % (diluída em TTBS)
- Anticorpo Primário Anti-CNP (diluição 1:1000 em TTBS) e anti His-tag (diluição 1:1000 em TTBS)
- Anticorpo Secundário (diluição 1:5000 em TTBS)
- Solução estoque de NBT (Nitroblue terazolium)- 0,05 g em 1 ml de DMF 100 %

- Solução estoque de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate) – 0,05 g em 1 ml de DMF 70 %

Métodos

Primeiramente, um gel 12 % desnaturante foi preparado para a separação da amostra. Para tanto, usou-se marcador molecular pré-corado com o objetivo de indicar o sucesso da transferência, a orientação da membrana e o peso molecular da amostra.

O sandwich de transferência foi montado imerso em tampão de transferência e colocado no aparato de *eletroblotting* de forma que o gel ficasse posicionado do lado do cátodo e a membrana de nitrocelulose do lado do ânodo. A transferência foi feita por 14 horas a 30 volts. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com uma solução contendo BSA (BSA 3 %) por 2 horas sob agitação. Retirou-se a albumina e a membrana foi incubada com anticorpo primário por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. A membrana foi, então, lavada 3 vezes de 15 minutos com TTBS sob agitação. Colocou-se o anticorpo secundário e seguiu-se incubação por 1 hora. A membrana foi novamente lavada com TTBS por 3 vezes de 15 minutos e logo a visualização cromogênica foi feita pela adição de 66 µl da solução estoque de NBT e 33 µl da solução estoque de BCIP em 10 ml de Tampão do substrato da Fosfatase Alcalina. Parou-se a reação com a adição de TTBS e secou-se a membrana.

3.1.1.6 Diálise e Concentração

Materiais

- Tampão de Diálise: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM NaCl, 5 % glicerol, 1 mM Azida.

Métodos

Os eluatos foram concentrados e dialisados utilizando-se os concentradores Amicon Ultra –15 de 10000 Da (Millipore) contra tampão de diálise a 4°C a uma rotação de 5000 x g.

3.1.1.7 Quantificação (BRADFORD, 1976)

Materiais

- Solução de coomassie brilliant blue – dissolver 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 ml de etanol 95 %. Adicionar 100 ml de ácido fosfórico 85 %. Adicionar água até completar 1 L. Filtrar com filtro 0,22 µm.

Métodos

Em dez tubos com capacidade para 1,5 ml foram colocadas alíquotas da solução de BSA (Bovin Serum Albumin) a 2 mg/ml em duplicata (2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5 µl) e essas alíquotas foram diluídas para 20 µl com tampão e adicionou-se 200 µl de 1 M de NaOH. Em outros dois tubos com capacidade para 1,5 ml, foram colocados 200 µl de 1 M de NaOH e 20 µl de tampão (branco).

Adicionou-se, então, 1 ml da solução de coomassie brilliant blue e misturou-se bem.

Determinou-se a absorbância a 595 nm usando uma cubeta de poliestireno de caminho ótico de 1 cm e fez-se uma curva padrão plotando a absorbância a 595 nm versus a concentração da BSA.

Determinou-se a absorbância das amostras das proteínas recombinantes e usou-se a curva padrão para determinar a concentração das amostras.

3.1.1.8 Dicroísmo Circular (CD)

Métodos

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro *JASCO J-810* (JASCO), com um controlador de temperatura *Peltier type control system* PFD 425S. O programa utilizado para registro dos dados foi o Spectra manager[®] (JASCO). Os espectros de dicroísmo circular no UV distante (260-190 nm) foram adquiridos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 2 mm de caminho ótico, em temperatura ambiente, com velocidade de varredura de 20 nm/minuto e tempo de resposta de 1 segundo. O espectro final foi obtido pela acumulação de 6 varreduras. A contribuição do solvente foi eliminada subtraindo seu espectro daquele da proteína. As proteínas recombinantes foram utilizadas na concentração de 0,1 mg/ml em tampão 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 .

Os valores obtidos na leitura de CD (mili graus) foram convertidos em elipticidade molar residual $[\theta]$ através dada pela expressão (ADLER *et al.*, 1973):

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 L C N}$$

onde θ é a elipticidade medida (graus), L é o caminho ótico em centímetros (cm), C é a concentração molar (M) e N é o número de aminoácidos da proteína. Os dados convertidos foram graficados utilizando-se o programa *ORIGIN 7.1*. Para determinar a porcentagem de estrutura secundária da proteína de fusão, utilizou-se o programa *CDNN deconvolution* (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdmn/>), e uma base de dados contendo 33 espectros de CD de diferentes proteínas. Os erros intrínsecos ao cálculo de porcentagem de estrutura secundária foram indicados em cada tabela.

3.1.1.9 Emissão intrínseca de fluorescência

Métodos

Os estudos de emissão intrínseca de fluorescência foram realizados no espectrômetro de fluorescência *AMINCO-Bowman Series 2*, utilizando-se uma cubeta de quartzo 1 x 0,4 cm em temperatura ambiente.

A proteína foi excitada com uma radiação incidente de 295 nm (excitação do aminoácido triptofano, de forma majoritária) e os espectros de emissão foram coletados em um intervalo de comprimento de onda de 300 e 500 nm, com velocidade de varredura de 1 nm/segundo e tempo de resposta automático. A contribuição do solvente foi eliminada subtraindo seu espectro daquele da proteína. Os dados foram graficados utilizando-se o programa *ORIGIN 7.1*. Os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão foram obtidos dos espectros de emissão de fluorescência.

As proteínas recombinantes estavam em uma concentração de 0,05 mg/ml em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

3.1.1.10 Cristalização

Métodos

Os ensaios iniciais de cristalização foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) utilizando-se o *Cartesian Honeybee crystallization robot* (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, USA).

Utilizou-se a estratégia da matriz esparsa (ou fatorial incompleto) (Jancarik & Kim, 1991), cujas condições são baseadas em experimentos de cristalização de sucesso encontrados nos bancos de dados, e do *grid screen*, que avalia sistematicamente dois fatores, como o precipitante, em várias concentrações e diferentes valores de pH.

Foram testadas 672 condições de cristalização, preparadas pelo robô Matrix Maker (Emerald BioSystems), pelo método de difusão de vapor em gota sentada em placa de 96 poços, sendo o volume de proteína usado por poço de 0,3 µl. A concentração da proteína concentrada foi de 7 mg/ml.

3.1.2 Metodologia B

3.1.2.1 Transformação de bactérias competentes por choque térmico

Métodos

50 µL de bactérias competentes **BL21 (DE3)** foram incubadas com o plasmídeo contendo o inserto do domínio BPP em pProEx (Invitrogen) por 30 minutos, em banho de gelo, antes de prosseguir com o choque térmico: 42 °C por 2 minutos, gelo por 3 minutos. Após a adição de 950 µL de meio SOC, as bactérias foram mantidas sob agitação a 200 rpm, a 37 °C por 1 hora. A suspensão de bactérias foi, então, inoculada em placa LB-ágar contendo ampicilina e cloranfenicol (concentração de 100 µg/ml e 34 µg/ml, respectivamente), e mantidas em estufa a 37 °C por 18 horas. As colônias de bactérias resistentes aos antibióticos foram selecionadas para os testes de indução da expressão protéica.

3.1.2.2 Testes de expressão

Materiais

- Meio Fermentativo: 10 g de Peptona, 5 g de extrato de levedura, 7,7 g de K_2HPO_4 , 2 g de KH_2PO_4 , 2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g de citrato de sódio, 2 mM de $MgSO_4$, 0,2 mM de $CaCl_2$, 0,1 % de glicose
- Meio 2YT: 16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl.

Métodos

Duas colônias da placa de transformação foram utilizadas para preparação de dois inóculos de 3 ml, um em meio 2YT e outro em meio Fermentativo, com ampicilina (concentração final de 100 μ g/ml) e cloranfenicol (concentração final de 34 μ g/ml) em tubos com capacidade para 15 ml. Os inóculos foram incubados sob agitação (200 rpm) por 18 horas a 37 °C. Após a incubação, 100 μ l de cada inóculo foram diluídos em 3 tubos contendo 20 ml de meio 2YT e 3 tubos contendo 20 ml de meio Fermentativo em frascos com capacidade para 100 ml e, em seguida, a cultura foi incubada sob agitação (200 rpm) a 37 °C até o crescimento celular ser observado por meio da densidade óptica (O.D.).

Para cada meio de cultura, foram testadas três diferentes densidades ópticas de indução (0,8, 1,5 e 2,0) e, para cada densidade óptica, três tempos de indução diferentes para (4 h, 8 h e 16 h). A utilização de altas densidades ópticas (1,5 e 2,0) e de longos tempos de indução utilizados (8h e 16h) teve como objetivo testar a indução das proteínas recombinantes fora da fase logarítmica como descrito por Flick et al. 2004.

A indução foi feita utilizando-se uma concentração final de IPTG de 1 mM sob agitação (200 rpm) a 37 °C. Uma amostra de 1 ml correspondendo ao controle não-induzido foi retirada antes da indução de cada um dos frascos. Após 4, 8 e 16 h de indução, amostras de 1 ml foram retiradas. Todas as amostras foram centrifugadas a 10000 x g, 5 minutos, 4 °C e ressuspensas em 50 μ l de tampão de amostra para análise da expressão em SDS-PAGE.

3.1.2.3 Teste de solubilidade

Materiais

- Tampão de lise: 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 10 % de glicerol e 20 mM de Tris-HCl pH 8,0.

Métodos

Uma colônia da placa de transformação foi utilizada para preparação de um inóculo de 3 ml em meio 2YT com ampicilina (concentração final de 100 µg/ml) e cloranfenicol (concentração final de 34 µg/ml) em tubos com capacidade para 15 ml. Os inóculos foram incubados sob agitação (200 rpm) por 18 horas a 37 °C. Após a incubação, 100 µl do inóculo foram diluídos em tubos contendo 20 ml de meio 2YT em frascos com capacidade para 100 ml e, em seguida, a cultura foi incubada sob agitação (200 rpm) a 37 °C até o crescimento celular ser observado por meio da densidade óptica.

Foram testadas três diferentes temperaturas (37, 30 e 25 °C) e tempos de indução (4 h, 8 h e 16 h) para a densidade óptica de indução de 1,5. Dois frascos foram utilizados para testar densidades ópticas de indução no valor de 2,5 e 3,0 a 37 °C por 4 h (Flick et al. 2004).

A indução foi feita utilizando-se uma concentração final de IPTG de 1 mM sob agitação (200 rpm). Uma amostra de 1 ml correspondendo ao controle não-induzido foi retirada antes da indução de cada um dos frascos. Após a indução, os 20 ml de cultura foram centrifugados a 10000 x g, 15 minutos, 4 °C. A ressuspensão foi feita em 1,5 ml de tampão de lise para cada uma das culturas. As amostras foram sonicadas no gelo (pulsos de 40 %, por 15 segundos, 5 repetições com intervalos de 30 segundos entre os pulsos) no aparelho VirSonic e centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 18600 x g. O sobrenadante foi reservado e uma alíquota foi utilizada para análise em SDS-PAGE. A fração insolúvel foi ressuspensa em 200 µl de tampão de amostra e uma alíquota foi utilizada para análise em SDS-PAGE.

3.1.2.4 Expressão

Métodos

Uma colônia da placa de transformação foi usada para preparação do inóculo em 20 ml de 2YT com 100 µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol, em frasco com capacidade para 100 ml. O inóculo foi incubado sob agitação por 18 horas a 37 °C. Após a incubação, o inóculo foi diluído (1:50) em 1 L de meio 2YT e, em seguida, a cultura foi

incubada sob agitação a 37 °C até o crescimento celular ser observado por meio da densidade óptica no valor de 1,5.

A indução da expressão protéica foi feita utilizando-se IPTG em uma concentração final de 1 mM por 16 horas sob agitação (200 rpm) a 37 °C. Após o tempo ótimo de indução, a cultura foi centrifugada em tubos com capacidade para 250 ml a 4000 x g, 20 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias foi, então, congelado no freezer a -20° C.

3.1.2.5 Isolamento e purificação de corpos de inclusão

Materiais

- Tampão de Lise: 20 mM de Tris-HCl pH 7,5
- Tampão A: 100 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 8 M de uréia.
- Tampão B: 100 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 8 M de uréia.

Métodos

As bactérias coletadas por centrifugação após 16 horas de indução foram ressuspensas 25 ml de tampão de lise. Em seguida, a lise bacteriana foi feita por sonicação, em banho de gelo, (pulsos de 40 %, por 30 segundos, 10 repetições com intervalos de 30 segundos entre os pulsos) no aparelho VirSonic e centrifugada por 15 minutos a 18600 x g, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 3 vezes com 30 ml de tampão de lise. A fração insolúvel foi então ressuspensa em 20 ml de tampão de extração (tampão A) e centrifugada a 13700 x g, 4 °C, por 20 minutos.

O sobrenadante contendo o domínio BPP em fusão com a cauda de poli-histidina foi, então, purificado por cromatografia de afinidade utilizando-se a resina comercial *Ni-NTA (Nitrilo triacetato) Agarose Beads* (Quiagen), sob condições desnaturantes.

A 1 ml de resina Ni-NTA, sendo essa equilibrada com 10 volumes de coluna (vc) com tampão A, acrescentou-se a amostra desnaturada e a fração da mesma não retida na matriz foi coletada e reservada. Lavou-se a coluna com 30 vc de tampão A sem imidazol, e, em seguida, eluiu-se a proteína com 10 ml de tampão B em frações de 1 ml.

3.1.2.6 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Métodos

Alíquotas das frações solúveis e insolúveis dos lisados bacterianos e das frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE, em géis de poliacrilamida a 12,5%. As amostras foram diluídas na proporção de 1:1 com tampão de amostra, e foram desnaturadas a 100 °C, por cinco minutos, antes de serem aplicadas nos géis. As eletroforeses foram realizadas à temperatura ambiente a 30 mA. Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram corados por 30 minutos em uma solução de *Coomassie Blue* e descorados em solução de 5% de ácido acético e 12,5% de metanol como especificado na seção 3.1.1.4.

3.1.2.7 Experimentos de Renaturação

i. Renaturação em Coluna

Materiais

- Tampão A: 100 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 8 M de uréia.
- Tampão B: 100 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 0 M de uréia.
- Tampão C: 100 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 0 M de uréia.

Métodos

Após purificação do domínio BPP sob condições desnaturantes e análise da pureza por SDS-PAGE, as frações puras da eluição foram dialisadas contra tampão A e incubadas em coluna de níquel. Executou-se um gradiente linear de 8M de uréia (Tampão A) a 0M de uréia (Tampão B) sob fluxo de 0,5 ml/min por 8 horas a 4 °C em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). A proteína foi, então, eluída da coluna com 10 ml de tampão C em frações de 1ml.

ii. Renaturação por diálise

Materiais

- Tampão A: 100 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 % de glicerol e 4 M de uréia.
- Tampão B: 100 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 % de glicerol e 2 M de uréia.
- Tampão C: 100 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 % de glicerol e 0 M de uréia.

Métodos

Após purificação do domínio BPP sob condições desnaturantes e análise da pureza por SDS-PAGE, as frações puras da eluição foram colocadas em membranas semi-permeáveis de 10000 Da e dialisadas por 12 horas contra tampão A, seguida de mais 12 horas contra tampão B e, então, tampão C a 4 °C.

iii. Renaturação por Diluição

Materiais

- Tampão de Diluição: 100 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 30 % de glicerol, 1 mM de Glutathione Reduzida, 1 mM de EDTA, 500 mM de L-Arginina.
Aditivos: PEG 4000, etilenoglicol, triton-X, guanidine, glicina.

Métodos

Após purificação do domínio BPP sob condições desnaturantes e análise da pureza por SDS-PAGE, as frações puras da eluição foram diluídas 60 vezes, gota a gota, em tampão de diluição por 24 horas a 4 °C sob agitação.

3.2 NUDEL

O clone da proteína NUDEL (do inglês *Nuclear Distribution Element-Like*) de *Rattus norvegicus* foi gentilmente cedido pelo grupo do Prof. Dr. Antônio Carlos Martins de Camargo - Instituto Butantan/CAT/CEPID. Para a obtenção de proteína recombinante para estudos cristalográficos, almejou-se a determinação de um protocolo de expressão e purificação para a obtenção de proteína enovelada em grande quantidade e alta pureza.

3.2.1 Transformação de bactérias competentes por choque térmico

Métodos

Para a transformação de *E. coli* **BL21 (DE3)** competente, 50 µL de bactérias foram incubados com 2 µL (~400 ng) de DNA plasmideal contendo o inserto de interesse ligado ao vetor pET21 (Novagen) e a mistura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos, antes de prosseguir com o choque térmico: 42 °C por 2 minutos, banho de gelo por 3 minutos. Após a adição de 950 µL de meio LB, as bactérias foram mantidas sob agitação a 200 rpm, a 37 °C por 1 hora. A suspensão de bactérias foi inoculada em placas LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml), e as placas foram mantidas em estufa a 42° C por 18 horas. As bactérias que cresceram foram selecionadas para os testes de indução da expressão protéica.

3.2.2 Expressão

Materiais

- Tampão de Lise: 20 mM de Tris-HCl pH 7,5

Métodos

Uma colônia da placa de transformação foi pré-inoculada em LB com 100 µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol. O inóculo foi incubado sob agitação por 18 horas a 37 °C. Após diluição 1:50 da pré-cultura em meio fresco LB+antibióticos, as bactérias foram incubadas sob as mesmas condições, acima indicadas, até atingirem a fase logarítmica ($OD_{600} = 0,8$) ou pós-logarítmica ($OD_{600} = 1,5$).

Para a expressão da proteína, adicionou-se IPTG na concentração final de 1 mM. Após incubação a 30 °C, por um período de 4 horas, as bactérias foram coletadas por centrifugação (4000 x g, 20 minutos, 4 °C). Alíquotas de 1 mL da cultura não-induzida e induzida por 2 e 4 horas com IPTG foram retiradas e centrifugadas (10.000 x g, 5 minutos, 4 °C). O precipitado de bactérias foi ressuscitado em 500 µl de tampão de lise e a lise bacteriana foi feita por meio de sonicação (pulsos de 40 %, por 15 segundos, 2 repetições com intervalos de 30 segundos entre os pulsos) no aparelho VirSonic. Seguiu-se centrifugação a 18600 x g, por 10 minutos a 4 °C separando-se as frações solúvel e insolúvel para posterior análise da expressão das proteínas através de SDS-PAGE.

3.2.3 Purificação da Fração Solúvel

Materiais

- Tampão de Lise: 20 mM de Tris-HCl pH 7,5
- Tampão A: 100 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5
- Tampão B: 100 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5.

Métodos

As bactérias coletadas por centrifugação após 4 horas de indução foram ressuspensas em 25 ml de tampão de lise. Em seguida, a lise bacteriana foi feita por sonicação, em banho de gelo, (pulsos de 40 %, por 30 segundos, 10 repetições com intervalos de 30 segundos entre os pulsos) no aparelho VirSonic e centrifugada por 15 minutos a 18600 x g, 4 °C.

O sobrenadante contendo a proteína NUDEL em fusão com a cauda de poli-histidina foi, então, purificado por cromatografia de afinidade utilizando-se a resina comercial *Ni-NTA (Nitrilo triacetato) Agarose Beads* (Quiagen).

A 1 ml de resina Ni-NTA, sendo essa equilibrada com 10 volumes de coluna (vc) com tampão A, acrescentou-se a amostra e a fração da mesma não retida na matriz foi coletada e reservada. Lavou-se a coluna com 30 vc de tampão A, e, em seguida, eluiu-se a proteína com 10 ml de tampão B em frações de 1 ml.

3.2.4 Isolamento e purificação de corpos de inclusão

Materiais

- Tampão de Lise: 20 mM de Tris-HCl pH 7.5
- Tampão A: 100 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 8 M de uréia e 5 mM de β -mercaptoetanol.
- Tampão B: 100 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 8 M de uréia e 5 mM de β -mercaptoetanol.

Métodos

O protocolo de isolamento e purificação de corpos de inclusão foi elaborado com base em outros protocolos descritos na literatura (TSUMOTO et al., 2003, CHOW et al., 2006, LIU et al., 2007, WARNER et al., 2007, MARK et al., 2007, ARAKAWA et al.,

2007), e adaptado para a purificação da proteína NUDEL. As bactérias coletadas por centrifugação após o período de 4 horas de indução por IPTG foram re-suspendidas em tampão de lise. A amostra foi, então, sonicada (pulsos de 40 %, por 30 segundos, 10 repetições com intervalos de 30 segundos entre os pulsos) no aparelho VirSonic e centrifugada por 15 minutos a 18600 x g, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi re-suspendido em 30 ml de tampão de lise, repetindo o mesmo procedimento de centrifugação e lavagem por mais três vezes. Depois da última lavagem com o tampão de lise, o precipitado foi resuspendido em tampão de extração (tampão A) e a amostra foi centrifugada a 13700 x g, 4 °C, por 20 minutos. O sobrenadante contendo a proteína NUDEL em fusão com a cauda de poli-histidina foi, então, purificado por cromatografia de afinidade utilizando-se a resina comercial *Ni-NTA* (Nitrilo triacetato) *Agarose Beads* (Quiagen), sob condições desnaturantes.

A 1 ml de resina Ni-NTA, sendo essa equilibrada com 10 volumes de coluna (vc) com tampão A, acrescentou-se a amostra da proteína NUDEL desnaturada e a fração da mesma não retida na matriz foi coletada e reservada. Lavou-se a coluna com 30 vc de tampão A sem imidazol e, em seguida, com 20 vc de tampão A. Eluiu-se a proteína com 10 ml de tampão B em frações de 1 ml para posterior análise em SDS-PAGE.

3.2.5 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Métodos

Alíquotas das frações solúveis e insolúveis dos lisados bacterianos e das frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE, em géis de poliacrilamida a 12,5 %. As amostras foram diluídas na proporção de 1:1 com tampão de amostra, e foram desnaturadas a 100 °C, por cinco minutos, antes de serem aplicadas nos géis. As eletroforeses foram realizadas à temperatura ambiente a 30 mA. Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram corados por 30 minutos em uma solução de *Coomassie Blue* e descorados em solução de 5 % de ácido acético e 12,5 % de metanol como especificado na seção 3.1.1.4.

3.2.6 Experimentos de Renaturação

Materiais

- Tampão de Diluição: 100 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 30 % de glicerol, 1 mM de Glutathione Reduzida, 1 mM de EDTA, 500 mM de L-arginina.
- Tampão de Diálise: 100 mM de NaCl e 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 na presença ou ausência de 0,1 mM de ZnCl₂.

Métodos

Após purificação da NUDEL sob condições desnaturantes e análise da pureza por SDS-PAGE, as frações puras da eluição foram diluídas 60 vezes, gota a gota, em tampão de diluição por 24 horas a 4 °C sob agitação. A solução de diluição foi, então, dialisada contra 2 L de tampão de diálise por 12 horas, seguidos de mais 2 L de tampão por 12 horas, a 4 °C.

3.2.7 Concentração

Métodos

Após a diálise, a amostra foi concentrada a 4 °C utilizando o concentrador Amicon Ultra –15 de 10000 Da (Millipore) a uma rotação de 5000 x g.

3.2.8 Quantificação

Métodos

A concentração da proteína de fusão foi determinada através da medida de absorbância da mesma a 280 nm. Os espectros de absorbância foram obtidos em um espectrofotômetro *Spectronic Genesys 2*, com varredura de comprimento de onda de 340-200 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. O espectro de absorbância da proteína foi corrigido com a subtração do espectro de absorbância do tampão correspondente (“branco”) contendo 100 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e, em alguns casos, 0,1 mM de ZnCl₂. Os valores dos coeficientes de extinção molar (ϵ) foram calculados segundo a fórmula:

$$\epsilon (\text{Prot}) = \text{Num.}(\text{Tyr}) \times \epsilon(\text{Tyr}) + \text{Num.} (\text{Trp}) \times \epsilon(\text{Trp}) + \text{Num.}(\text{Cistina}) \times \epsilon(\text{Cistina})$$

Sabendo-se que os coeficientes de extinção usados acima são:

$$\epsilon (\text{Tyr}) = 1490, \epsilon (\text{Trp}) = 5500, \epsilon (\text{Cistina}) = 125$$

onde Num é o número de tirosinas (Tyr), triptofanos (Trp) e cistinas e ϵ é o coeficiente de extinção molar. Esses valores foram confirmados através do programa *ProtParam*

(<http://ca.expasy.org>). A partir dos coeficiente de extinção molar das proteínas e dos valores de absorvância a 280 nm, determinou-se a concentração molar da proteína através da fórmula:

$$A_{280} = \varepsilon \times L \times C$$

onde A_{280} é a absorvância medida a 280 nm, ε é o coeficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$), L é o caminho ótico em centímetros (cm) e C é a concentração molar da amostra de proteína. A amostra de proteína foi centrifugada a 5000 x g por 10 minutos antes de ser utilizada para medir a concentração.

3.2.9 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Métodos

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi empregada para a análise das soluções de proteína provenientes da renaturação por diluição para a observação do grau de homogeneidade da amostra para ensaios de cristalização.

As medidas de DLS foram realizadas em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico utilizando-se o equipamento ProteinSolutions Dynapro 99 (Dynapro *Molecular Sizing Instrument*), portando um controlador de temperatura, em comprimento de onda de 781,2 nm e ângulo de detecção do espalhamento de 90°. O programa usado para a execução das medidas do raio hidrodinâmico foi o Dynamics V6.3.4.

Duas concentrações da proteína foram utilizadas durante os experimentos: 1 mg/ml e 10 mg/ml. A proteína na concentração de 1 mg/ml foi testada em diferentes pHs (4,5; 6,0; 7,5; 8,5 e 9,5), já a amostra a 10 mg/ml foi analisada na presença e ausência de 0,1 mM de $ZnCl_2$ e 1 mM DTT, em tampão 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mM de NaCl.

Amostras de 50 μ l da proteína foram incubadas por 24 horas nas diferentes condições testadas e, então, centrifugadas por 1 hora a 4 °C e 20.000 x g antes da execução das medidas. Foram realizadas vinte acumulações de 10 segundos para cada uma das condições em temperatura ambiente.

3.2.10 Dicroísmo Circular (CD)

Métodos

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados como descrito na seção 3.1.18. A proteína recombinante foi utilizada na concentração de 0,1 mg/mL em tampão 30 mM de NaCl e 15 mM de Tris-HCl pH 7,5, na presença e ausência de 0,1 mM de ZnCl₂ e 1 mM de DTT.

Para a determinação da porcentagem de estrutura secundária da proteína utilizou-se o programa *CDNN deconvolution* (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>), e uma base de dados contendo 33 espectros de CD de diferentes proteínas. Os erros intrínsecos ao cálculo de porcentagem de estrutura secundária foram indicados em cada tabela.

3.2.11 Emissão intrínseca de fluorescência

Métodos

Os estudos de emissão intrínseca de fluorescência foram realizados como descrito na seção 3.1.1.9. A proteína recombinante estava em uma concentração de 0,05 mg/ml em tampão 30 mM de NaCl e 15 mM de Tris-HCl pH 7,5, na presença e ausência de 0,1 mM de ZnCl₂ e 1 mM de DTT.

3.2.12 Cristalização

Métodos

Os ensaios iniciais de cristalização foram realizados a 18 °C, testando-se 50 condições de cristalização obtidas dos Kits comerciais da Hampton Research (Crystal Screen 1 e 2), pelo o método de difusão de vapor em gota pendurada em placas de cultura Linbro de 24 poços, sendo o volume de proteína usado por poço de 1 µl. As concentrações da proteína utilizadas para os experimentos foram de 8,5 mg/ml (em tampão 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mM de NaCl) e 10,0 mg/ml (em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM de NaCl e 0,1 mM de ZnCl) e 10,0 mg (em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM de NaCl, 0,1 mM de ZnCl e 1 mM de DTT).

Capítulo 4. Resultados e Discussão

4.1 Proteína Precursora de BPP-CNP

Como mencionado na seção 3.1, duas abordagens diferentes foram utilizadas para a expressão e purificação dos dois domínios da proteína precursora de BPPs (figura 4). A metodologia utilizada pela Prof^a. Dr^a. Mirian Hayashi foi estabelecida com o objetivo de produzir anticorpos que, geralmente, não necessita de grandes quantidades de proteína. Assim, para a obtenção de quantidades suficientes (tipicamente, alguns miligramas) de proteína para ensaios de cristalização, aplicaram-se diversas repetições dessa metodologia (Metodologia A). Com o objetivo de maximizar a expressão e a pureza das proteínas recombinantes, assim como diminuir os gastos envolvidos nesses processos, uma nova metodologia foi estabelecida (Metodologia B). Os principais resultados obtidos por cada abordagem são apresentados e discutidos a seguir.

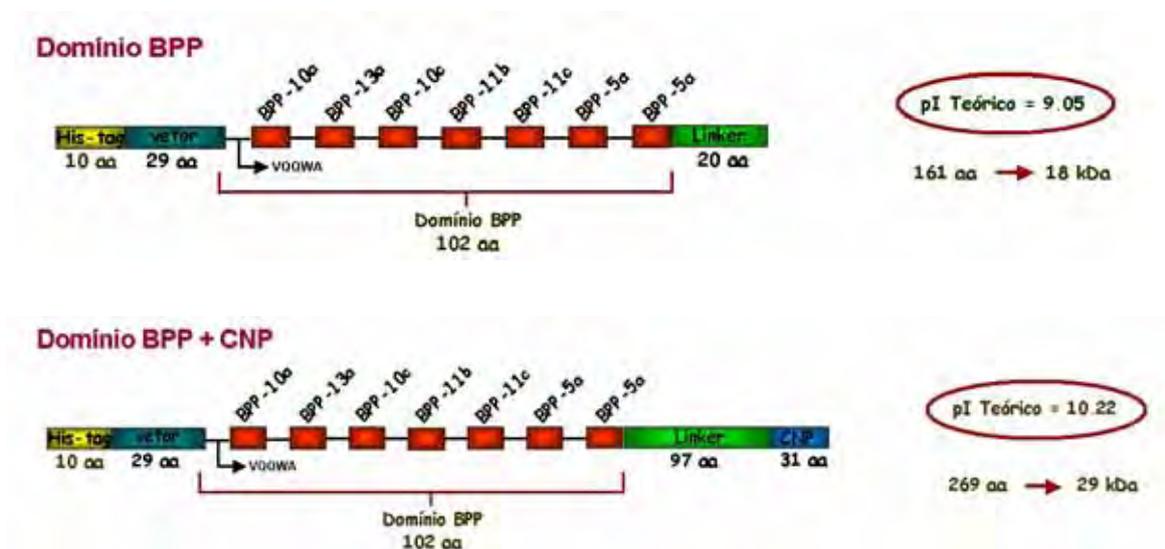


Figura 4: Representação esquemática das duas construções da proteína precursora de BPP-CNP mostrando os dois domínios expressos. Em ambas construções, a cauda de histidina está no N-terminal. Em vermelho está enfatizado o domínio BPP com os sete BPPs alinhados. Em verde parte ou toda a região de conexão (linker) e em azul o domínio CNP. His-Tag: Cauda de poli-histidinas; CNP: Peptídeo Natriurético Tipo-C.

4.1.1 Expressão e Purificação

A expressão e purificação em larga escala do domínio BPP e BPP+CNP, segundo o procedimento estabelecido pela Dr^a. Mirian Hayashi, foram realizadas com o objetivo de obter proteína pura em quantidade suficiente para os ensaios de cristalização. Devido ao baixo rendimento da expressão do domínio BPP obtido para 1 L de cultura induzida em testes preliminares, 20 litros de cultura foram preparados para a expressão dessa construção. Em seguida, realizou-se a purificação por cromatografia de afinidade utilizando resina Ni-NTA em coluna (figura 5A) e, finalmente, a confirmação da identidade da banda por *western blotting* (figura 5B). Como observado na figura 5A, uma banda de aproximadamente 18 kDa em SDS-PAGE está presente nas duas eluições obtidas da purificação por afinidade de 1 L de cultura induzida a 0,5 mM de IPTG. A mesma banda foi identificada por *western blotting* (figura 5B) usando-se anticorpos anti-penta-His contra

a cauda de poli-histidina, confirmando-se, assim, que a proteína expressa e purificada corresponde à proteína recombinante de interesse.

Após a obtenção da proteína, correspondente ao domínio BPP, purificada a partir de 20 L de cultura, todas as frações correspondentes às eluições 1 e 2 foram, conjuntamente, dialisadas e concentradas. Devido à precipitação da proteína observada no concentrador, a concentração máxima alcançada, medida pelo método de Bradford, foi de 7 mg/ml. O rendimento total, a partir dos 20 L de cultura induzidos, foi de aproximadamente 3 mg de proteína.

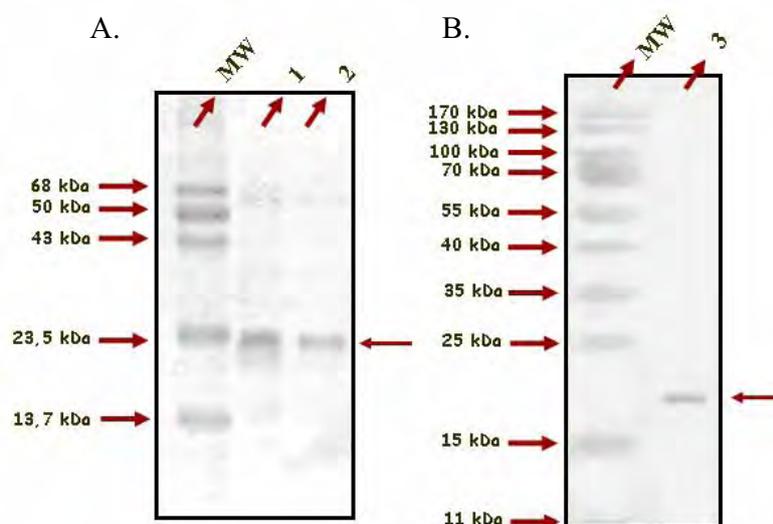


Figura 5: Análise da purificação do domínio BPP por cromatografia de afinidade de Ni-NTA em SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Blue (A). *Western blotting* mostrando o reconhecimento da banda, correspondente à proteína recombinante (domínio BPP) de aproximadamente 18 kDa, pelo anticorpo anti-cauda de histidinas, após a purificação (B). Canaleta MW refere-se ao marcador de peso molecular, canaletas 1 e 2, 1º e 2º Eluatos do domínio BPP correspondendo às bandas de aproximadamente 18 kDa, canaleta 3, domínio BPP após purificação. O peso molecular da proteína recombinante está indicado com seta.

O mesmo procedimento de expressão e purificação (metodologia A) adotado para a construção referente ao domínio BPP+CNP resultou na observação de uma pequena banda de aproximadamente 29 kDa em SDS-PAGE nas duas eluições da purificação por afinidade da proteína produzida pela indução de 1 L de cultura (figura 6A). Essa mesma banda foi reconhecida, por *western blotting*, usando-se anticorpo primário anti-CNP, confirmando a identidade do domínio BPP+CNP como a proteína recombinante de interesse isolada (figura 6B). A partir da quantificação da proteína pura dialisada, observou-se que o rendimento da expressão do domínio BPP+CNP foi ainda menor do que o obtido para o

domínio BPP por um fator de 3. Ao final da purificação da proteína resultante da indução de 1 L de cultura, foram obtidos apenas 50 μ g do domínio BPP+CNP, enquanto para o domínio BPP foram obtidos 150 μ g. Devido à menor expressão observada para o domínio BPP+CNP, os esforços para produção de quantidades suficientes de amostra para cristalização, desse momento em diante, foram concentrados na proteína correspondente ao domínio BPP.

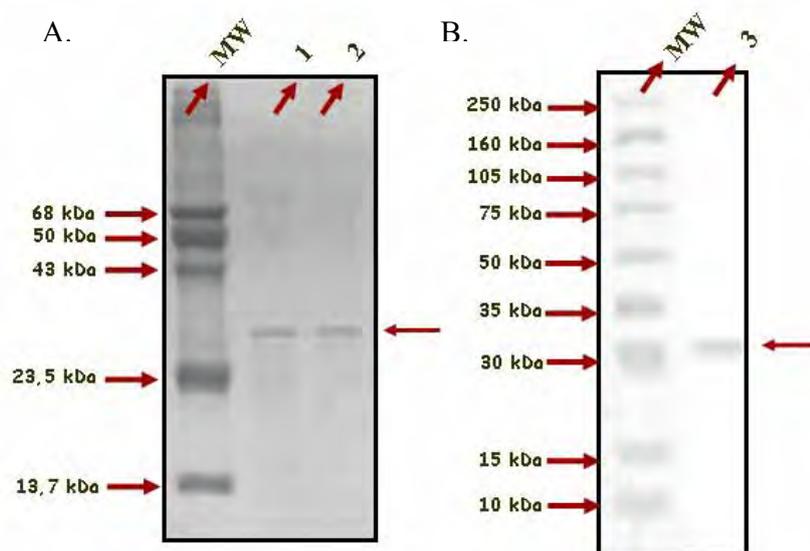


Figura 6: Análise da purificação do domínio BPP+CNP por cromatografia de afinidade de Ni-NTA em SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Blue (A). *Western blotting* mostrando o reconhecimento da banda, correspondente à proteína recombinante (domínio BPP+CNP) de aproximadamente 29 kDa, pelo anticorpo anti-CNP, após a purificação (B). Canaleta MW refere-se ao marcador de peso molecular, canaletas 1 e 2, 1º e 2º Eluatos do domínio BPP+CNP correspondendo às bandas de aproximadamente 29 kDa, canaleta 3, domínio BPP+CNP após purificação. O peso molecular da proteína recombinante está indicado com seta.

4.1.2 Dicroísmo Circular e Emissão Intrínseca de Fluorescência

Experimentos de dicroísmo circular (CD) e emissão intrínseca de fluorescência foram realizados com o objetivo de verificar se as proteínas exibem algum enovelamento após expressão heteróloga, acessar o conteúdo de estrutura secundária existente por meio dos espectros de CD no UV distante (190-260 nm) e determinar a acessibilidade dos resíduos aromáticos ao solvente a partir da posição do pico do máximo de emissão de fluorescência. Medidas de CD e fluorescência fornecem informações estruturais úteis, uma vez que mostram se a proteína recombinante apresenta-se enovelada nas condições testadas (por

exemplo, pH e concentração de sal), que permitem o prosseguimento dos experimentos de cristalização.

Os espectros de CD no UV distante (190 a 260 nm) das proteínas recombinantes são apresentados na figura 7. Uma análise qualitativa dos espectros indica que ambas proteínas exibem um enovelamento com estrutura secundária composta de α -hélices e folhas β . A observação dos espectros mostra que os dois picos negativos próximos de 208 nm e 222 nm não estão bem definidos, indicando que não há presença majoritária de α -hélices. Comparando-se as duas curvas, pequenas diferenças na forma dos espectros podem ser observadas. Verifica-se que, no espectro do domínio BPP+CNP (figura 7B), os picos negativos próximos de 208 e 222 nm estão mais proeminentes, sendo que o pico a 208 nm apresenta-se mais definido, quando comparado com o espectro do domínio BPP (figura 7A). Essas diferenças sugerem que o conteúdo de estruturas secundárias para o domínio BPP e domínio BPP+CNP seja um pouco diferente, refletindo, provavelmente, o fato de que o domínio BPP e o domínio CNP contenham estruturas secundárias diferentes. Para compreender melhor os espectros, uma análise quantitativa do conteúdo de estrutura secundária das proteínas, apresentando a porcentagem de cada tipo de estrutura secundária predita, foi feita utilizando o programa *CDNN deconvolution* e é apresentada na tabela 1.

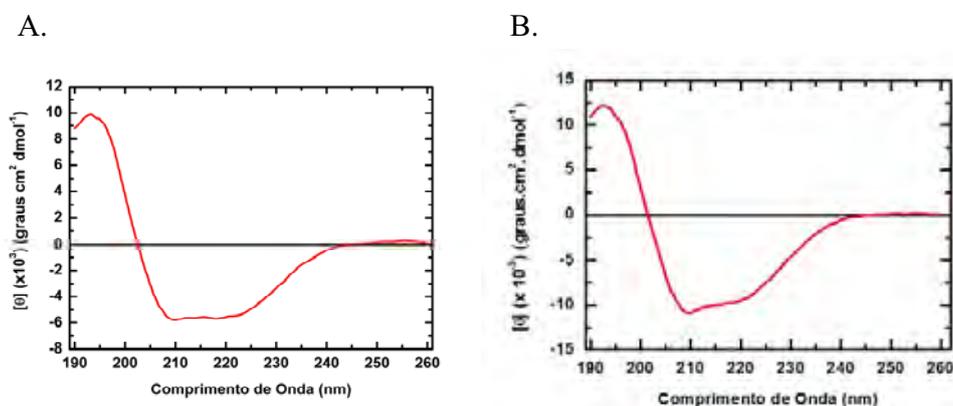


Figura 7: Espectros de CD no UV distante do domínio BPP (A) e domínios BPP+CNP (B) na presença de 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 em temperatura ambiente.

Os dados apresentados na tabela 1 mostram que há uma diminuição de estrutura secundária do tipo *random coil* (não definida ou aleatória) para o domínio BPP+CNP em relação às porcentagens obtidas do espectro do domínio BPP. Observa-se que os valores das porcentagens de α -hélice, folha- β antiparalela e β -turn na predição de estrutura

secundária dos domínios BPP+CNP são maiores quando comparados com a predição do domínio BPP, porém esse aumento está dentro do erro estimado da deconvolução pelo programa CDNN. De maneira geral, os experimentos de CD indicam que as duas proteínas recombinantes apresentam estrutura secundária definida, composta majoritariamente de folhas- β , porém com pequenas diferenças na composição.

As proteínas recombinantes correspondendo ao domínio BPP e domínios BPP+CNP possuem 10 e 11 resíduos de triptofano, respectivamente, na sua estrutura primária. Esses triptofanos foram utilizados como uma sonda intrínseca de fluorescência para observação das proteínas na condição testada. Após a excitação do resíduo triptofano com radiação de 295 nm, foram coletados os espectros de emissão de fluorescência em temperatura ambiente.

Tabela 1: Composição de estrutura secundária do domínio BPP e domínios BPP+CNP. Os valores são dados em porcentagem (%) e o erro é de 5,57 % para as medidas adquiridas de 190 a 260 nm.

Proteínas Recombinantes	Alfa-Hélice	Folha Beta Antiparalela	Folha Beta Paralela	Beta-turn	Random Coil
Domínio BPP	12,8	39,0	5,9	17,4	26,8
Domínio BPP+CNP	16,1	42,3	5,0	18,2	20,9

Os espectros de emissão de fluorescência do domínio BPP (figura 8A) e dos domínios BPP+CNP (figura 8B) mostraram um máximo de emissão em 335 e 331 nm, respectivamente. Esses dados indicam que as proteínas recombinantes apresentam enovelamento e não possuem resíduos de triptofano acessíveis ao solvente, já que seus espectros não mostram um pico a 350 nm, típico de proteína desnaturada ou da presença de resíduos aromáticos na superfície de proteínas. Dessa forma, a presença do pico de máximo de emissão para ambas as proteínas na faixa de 330 a 340 nm constitui uma evidência de que os resíduos aromáticos contidos nas mesmas apresentam pouca acessibilidade ao solvente, ou seja, apresentam-se enterrados no núcleo hidrofóbico da proteína.

Deve-se observar que o pico de máximo de emissão dos resíduos de triptofano desloca-se de 335 (figura 8A) para 331 nm (figura 8B) com a adição do domínio CNP à proteína. Isso indica que, na presença do domínio CNP, os triptofanos ficam ainda menos acessíveis ao solvente, ou seja, mais enterrados no núcleo da proteína inteira. Conjuntamente, os

experimentos de CD e emissão intrínseca de fluorescência indicam que ambas proteínas recombinantes apresentam estrutura secundária definida e resíduos de triptofano pouco acessíveis ao solvente, favorecendo, assim, no caso do domínio BPP, o início dos ensaios de cristalização.

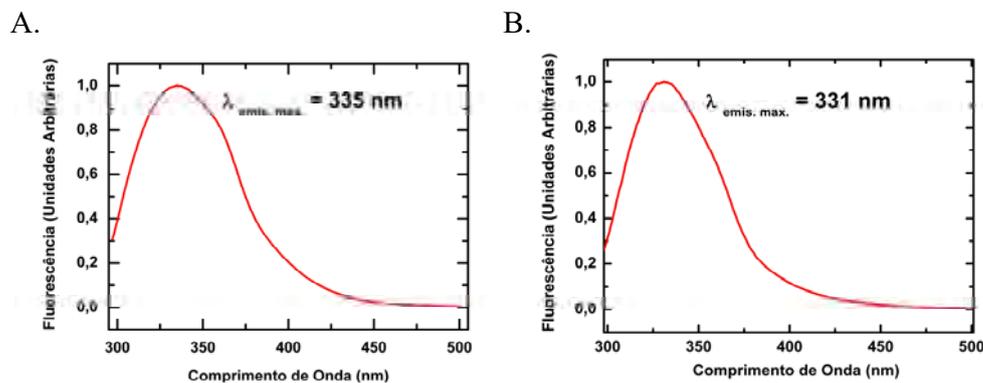


Figura 8: Espectro de emissão de fluorescência do domínio BPP (A) e dos domínios BPP+CNP (B) na presença de 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 em temperatura ambiente.

4.1.3 Ensaios de Cristalização

Uma vez que os experimentos de CD mostraram que as proteínas possuem estrutura secundária composta majoritariamente de folhas- β , o que possivelmente indica que as proteínas recombinantes estão enoveladas após expressão heteróloga em BL21 (DE3) Códon Plus, seguiram-se as tentativas de cristalização do domínio BPP. Os ensaios de cristalização foram realizados com o sistema automatizado HoneyBee utilizando-se a técnica de difusão de vapor por gota sentada em placas de 96 poços, sendo a proteína presente na concentração de 7 mg/mL.

Analisando-se as 672 soluções testadas, uma solução apresentou esferolitas (figura 9A) e, outra, cristais em forma de agulha (figura 9B). A condição, na qual as esferolitas apareceram, foi refinada por meio de variações no pH (pH 3,0 a 10,0, com intervalos de 1 unidade de pH) e variações na concentração de formato de magnésio (20 a 200 mM com intervalos de 20 mM), sem sucesso na mudança da forma dos cristais. Os cristais em forma de agulha foram submetidos a experimentos de difração por raios X com objetivo de determinar se o cristal era de constituição protéica ou salina, resultando num padrão de difração característico de cristais de sal.

A maioria das gotas de cristalização apresentou-se clara, sem evidência de precipitado, indicando a necessidade de aumentar a concentração da proteína usada para cristalização. Porém, até o momento não foi possível aumentar a concentração da proteína para novas tentativas de cristalização em mais alta concentração, uma vez que se observa a precipitação da proteína no concentrador para concentrações acima de 7 mg/ml.

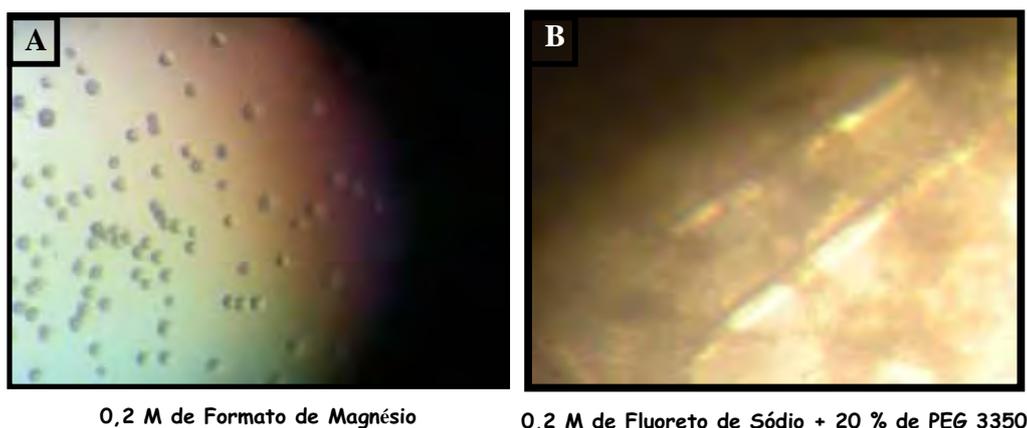


Figura 9: Cristais obtidos por meio do sistema automatizado de cristalização HoneyBee.

4.1.4 Otimização da Expressão em larga escala do Domínio BPP

Com o objetivo de conseguir maior rendimento da expressão da proteína recombinante correspondente ao domínio BPP por litro de cultura para a obtenção de proteína para os ensaios de cristalização, foram realizados testes visando o aumento do nível de expressão do domínio BPP. A primeira estratégia consistiu em variações na densidade óptica e tempo de indução, associada à utilização de diferentes meios de cultura (metodologia B). Para cada meio de cultura (2YT e Fermentativo), variou-se a densidade óptica de indução (O.D. – do inglês *optical density*) (0,8, 1,5 e 2,0) e para cada densidade óptica, testaram-se 3 diferentes tempos de indução (4 h, 8 h e 16 h (O.N. – do inglês *over night*)) (figura 10) a 37 °C. A concentração final de IPTG usada nos experimentos foi de 1 mM.

Dois meios mais ricos em nutrientes que o utilizado na metodologia A (LB) foram testados, meio 2YT e meio Fermentativo, em vista da utilização de tempos mais longos de indução (8 h e 16 h) e altas densidades ópticas (1,5 e 2,0).

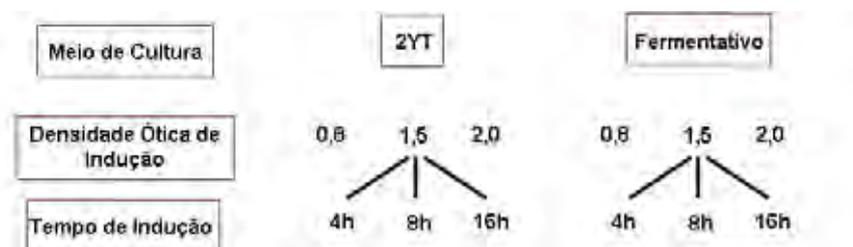


Figura 10: Esquema representativo dos testes de expressão do domínio BPP, utilizando dois meios de cultivo diferentes e três densidades ópticas e tempos de indução.

A figura 11 apresenta os géis para as condições de expressão protéica testadas, com exceção da condição relativa a 8 horas de indução, uma vez que não houve diferença relevante entre 4 e 8 horas de indução. Comparando-se os géis, que mostram os padrões de expressão em meio 2YT (figura 11A) e fermentativo (11B), verifica-se que a condição constituída pelo meio 2YT, indução por 16 horas em O.D. de 1,5, favoreceu a maior expressão do domínio BPP, resultando em um aumento significativo da quantidade de proteína obtida de 1 L de cultura (figura 11A).

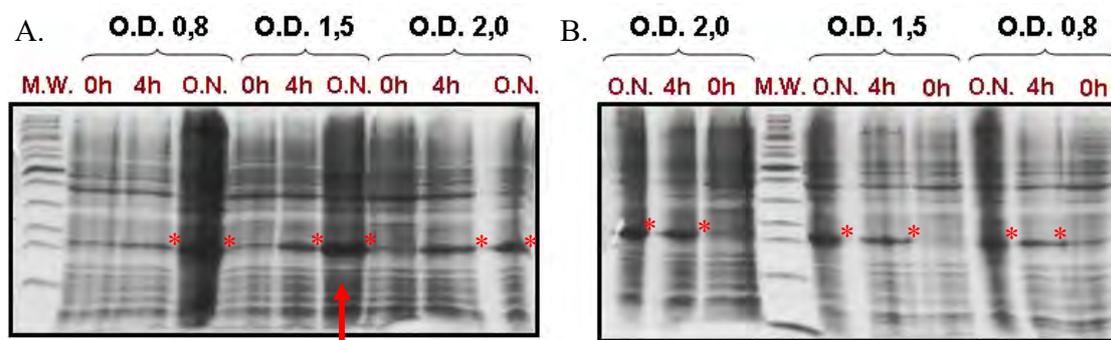


Figura 11: Análise da expressão do domínio BPP em meio 2YT (A) e Fermentativo (B) em três densidades ópticas (0,8, 1,5 e 2,0) e dois tempos de indução diferentes (4 e 16 h (O.N.)), em BL21 (DE3) a 37 °C, por SDS-PAGE 12,5 %. Canaleta MW, marcador de peso molecular; 0h, amostra de bactérias antes da indução; canaletas 4h, O.N., tempos de 4 e 16 h de indução. As bandas relativas à proteína induzida estão indicadas por asteriscos (*). Observa-se maior expressão da proteína na condição de indução em meio 2YT, por 16 horas a 37 °C, como assinalado pela seta.

4.1.5 Análise de Solubilidade

Ensaio de solubilidade com o domínio BPP, obtido com a condição otimizada de expressão protéica, foi realizado com o intuito de determinar se a proteína, na situação de alta expressão, é expressa na fração solúvel ou insolúvel.

Da observação da banda de aproximadamente 18 kDa na canaleta F.I (fração insolúvel) no gel da figura 12A canaleta O.N., o teste de solubilidade mostrou que o domínio BPP, expresso na condição otimizada (meio 2YT, densidade óptica de 1,5, 16 h de indução, 37 °C), apresenta-se, majoritariamente, na fração insolúvel. A partir dessa informação, foram testados tempos de indução menores (4 e 8 h) em meio 2YT, em densidade óptica de 1,5 e 37 °C (figura 12A), com o objetivo de obter proteína na fração solúvel, embora a expressão da NUDEL em menores tempos de indução seja menor. Independentemente do tempo de indução (4, 8 e 16 h (O.N.)), o domínio BPP é expresso na fração insolúvel (figura 12A).

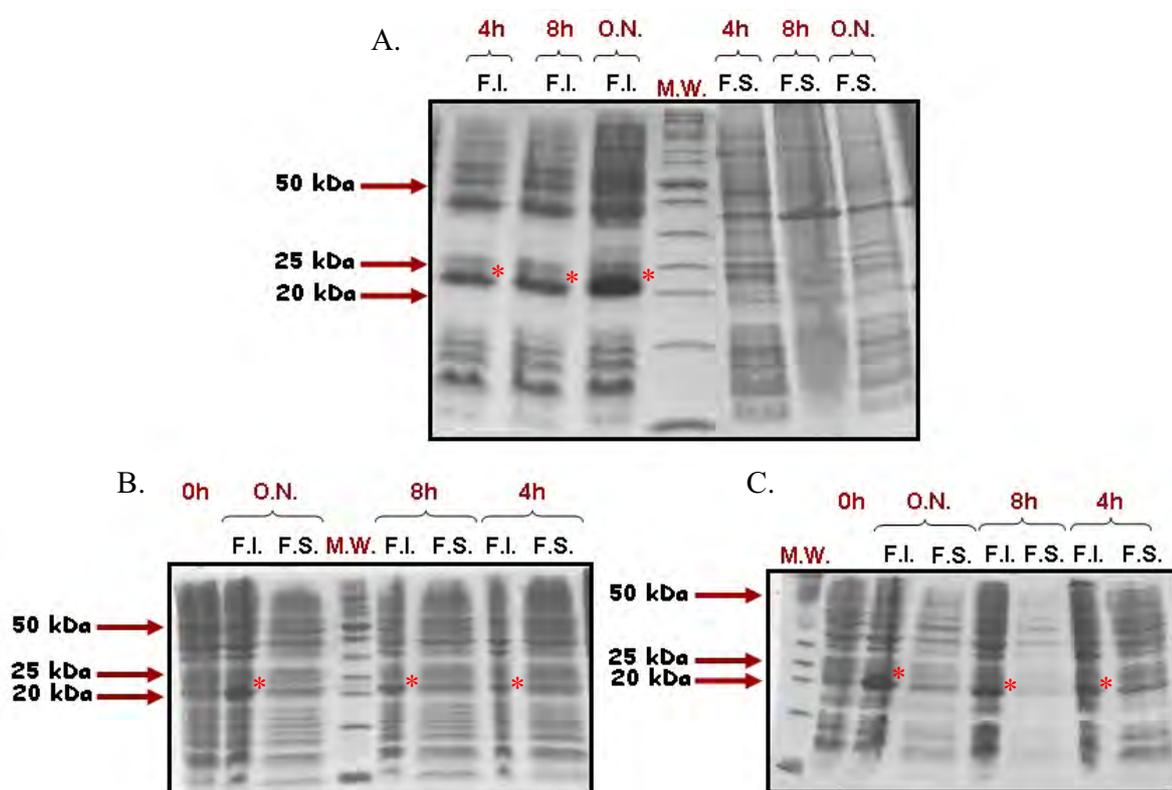


Figura 12: Análise da solubilidade do domínio BPP a partir da indução em meio 2YT a 37 (A), 25 (B) e 30 °C (C), apresentando as amostras, após lise celular, das frações solúvel (F.S.) e insolúvel (F.I.), em diferentes tempos de indução (4, 8 e 16 h), por meio de SDS-PAGE 12,5 %. Canaleta MW, marcador de peso molecular; 0h, amostra de bactérias antes da indução; canaletas 4h, 8h e O.N., tempos de 4, 8 e 16 h de indução. As bandas relativas à proteína induzida estão indicadas por asteriscos (*).

A fim de maximizar a quantidade de proteína na fração solúvel tentando manter níveis de expressão mais altos que os observados na metodologia A, testes de solubilidade foram realizados utilizando-se amostras induzidas no mesmo meio de cultura da condição

otimizada (2YT) e mesma densidade óptica (1,5), porém em temperaturas mais baixas (30 e 25 °C) e em diferentes tempos de indução (4, 8 e 16 h) (figuras 12B e 12C). Um esquema representativo das condições testadas é apresentado na figura 13. O uso de temperaturas mais baixas pode reduzir a taxa de produção da proteína recombinante pela maquinaria celular, o que favorece um melhor enovelamento da mesma e evita, assim, a exposição de regiões hidrofóbicas da proteína, as quais facilitam interações mútuas, principalmente, quando em situações de alta concentração protéica no citoplasma. Essas interações entre as proteínas recombinantes, mal ou não enoveladas, levam à formação dos corpos de inclusão (fração protéica insolúvel). No entanto, os resultados indicam que a maior parte da proteína está na fração insolúvel, após lise celular, não obstante variação do tempo de indução ou da temperatura (figuras 12B e 12C).

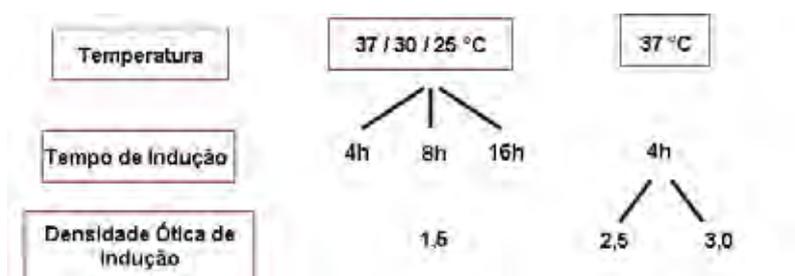


Figura 13: Esquema representativo dos testes de solubilidade para o domínio BPP, mostrando as diferentes condições de temperatura, tempo e densidades ópticas de indução utilizadas.

Outra tentativa para se obter proteína na fração solúvel em maiores quantidades em relação ao obtido pela metodologia A, foi a indução da expressão em altas densidades ópticas (2,5 e 3,0) em meio 2YT por 4 horas a 37 °C segundo Flick et al., 2004 (figura 14). A análise de SDS-PAGE (figura 14) mostrou, porém, que a proteína continuou presente na fração insolúvel nos experimentos utilizando ambas densidades ópticas.

Dessa forma, esses resultados indicam que, independentemente da temperatura, tempo de indução e densidade óptica celular utilizados para a indução da expressão protéica em meio 2YT, a proteína permanece em corpo de inclusão, ou seja, na fração insolúvel.

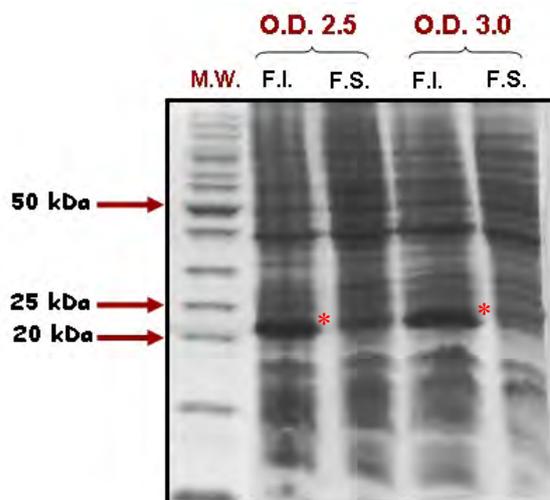


Figura 14: Análise de solubilidade do domínio BPP avaliando a influência de altas densidades ópticas (2,5 e 3,0) na solubilidade da proteína recombinante após indução da expressão por 4 h a 37 °C por SDS-PAGE 12,5 %. Fração solúvel (F.S.); Fração insolúvel (F.I.). Canaleta MW, marcador de peso molecular; canaletas O.D. 2,5 e O.D. 3,0., densidades ópticas de indução protéica de 2,5 e 3,0. As bandas relativas à proteína induzida estão indicadas por asteriscos (*).

4.1.6 Expressão, Purificação e Renaturação

Os ensaios de solubilidade indicaram que a maior parte da proteína sempre permanece em corpo de inclusão, independentemente das variações de temperatura, densidade óptica celular e tempo de indução. Decidiu-se, então, pela utilização da proteína em corpo de inclusão produzida a partir da condição otimizada para a expressão de altas quantidades do domínio BPP e, posterior, abordagem de renaturação do mesmo para nova tentativa de ensaios de cristalização.

Dessa forma, a expressão do domínio BPP foi feita nas condições determinadas previamente pelo teste de expressão (meio 2YT, 37 °C, O.D. 1,5 e 16 h de indução). Seguiu-se, então, a purificação por afinidade em coluna de níquel sob condições desnaturantes (8 M de uréia). A fração insolúvel, após lise celular por sonicação, foi solubilizada e aplicada na coluna. A proteína de interesse correspondente ao domínio BPP foi eluída da matriz em 10 ml de tampão com 500 mM de imidazol e 8 M de uréia e coletada, separadamente, em frações de 1 ml.

A partir da análise das amostras da purificação por SDS-PAGE (figura 15), observou-se que a proteína apresentou excelente grau de pureza, apresentando-se ainda mais pura quando comparada ao domínio BPP purificado utilizando-se a metodologia A (figura 5). A banda da proteína pura também foi identificada por *western blotting* (figura 5B), usando-se anticorpos contra a cauda de poli-histidina, confirmando-se, assim, que a proteína expressa e purificada refere-se à proteína recombinante desejada. O resultado obtido mostrou que a quantidade de proteína recuperada após purificação de 1 L de cultura induzida com 1 mM de IPTG (rendimento de 0,9 mg de proteína por litro de cultura) também foi, evidentemente, maior (Figura 15) quando comparada ao método anterior (metodologia A, figura 5).

A primeira tentativa de renaturação do domínio BPP foi feita utilizando-se o método de renaturação em coluna. A proteína correspondente a 1 L de cultura induzida, após purificação por afinidade de Ni-NTA, foi dialisada contra tampão A (procedimentos experimentais, seção 3.1.2.5) para retirada do imidazol e, então, aplicada novamente na coluna. Observou-se que, após o gradiente de 8 M a 0 M de uréia, realizado em temperatura ambiente e também a 4 °C em HPLC, a proteína precipitou na matriz (Ni-NTA), uma vez que a recuperação da proteína enovelada da coluna por meio da eluição com 500 mM de imidazol e 0 M de uréia foi mínima. Para a retirada da proteína precipitada da matriz, a mesma foi lavada com tampão desnaturante contendo 8 M de uréia na presença de 500 mM de imidazol.

A segunda tentativa de renaturação do domínio BPP foi realizada por meio do método da diálise a 4 °C, que se mostrou tão pouco eficiente quanto o método anterior. A proteína começa a precipitar na troca de tampão contendo 8 M para 4 M de uréia, apresentando-se totalmente precipitada após diálise contra tampão sem agente desnaturante.

A terceira abordagem de renaturação consistiu na aplicação do método da diluição. Observou-se que a solução de diluição começa a ficar turbida no momento em que as gotas da proteína são diluídas no tampão até o momento em que a precipitação é visível depois de atingida certa concentração da proteína no tampão de diluição. O método foi, então, testado com vários aditivos diferentes como 50 mM de glicina, 0,01 % de triton-X, 5 % de etilenoglicol, 0,05 % de PEG 4000, 30 % glicerol, 1 mM de EDTA, 400 mM de guanidina

com o objetivo de tentar aumentar a solubilidade e estabilidade da proteína durante a renaturação, porém, sem sucesso.

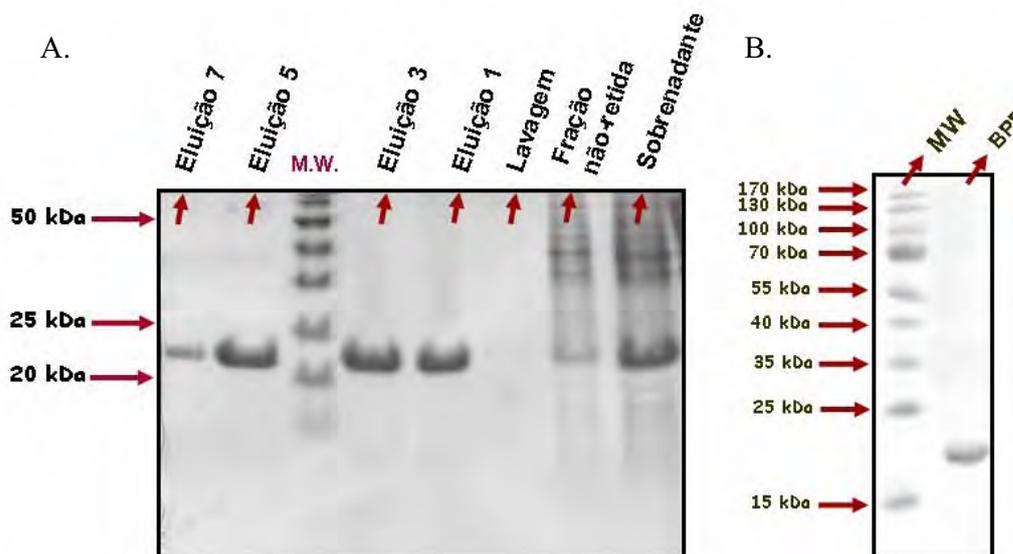


Figure 15: Análise por SDS-PAGE 12,5 % das frações eluídas da purificação por cromatografia de afinidade de Ni-NTA do domínio BPP a partir de corpos de inclusão sob condições desnaturantes (8 M de uréia) (A). *Western blotting* mostrando o reconhecimento da banda, correspondente à proteína recombinante (domínio BPP) de aproximadamente 18 kDa, pelo anticorpo anti-cauda de histidinas, após a purificação sob condições desnaturantes (B). Canaleta MW, marcador de peso molecular; Sobrenadante, amostra solubilizada em uréia antes da aplicação na coluna; Fração não-retida, fração de proteínas não retida na coluna; Lavagem, amostra das proteínas eluídas da coluna durante a lavagem, Eluição 1, 3, 5 e 7, eluições da proteína recombinante com 500 mM de imidazol da coluna.

Após as várias tentativas de renaturação da proteína, não foi possível conseguir a proteína enovelada para os testes de cristalização. As dificuldades encontradas para concentração do domínio BPP, obtido pela metodologia A, acima de 7 mg/ml, indicando pouca estabilidade dessa proteína em solução, associadas àquelas enfrentadas para a renaturação dessa proteína podem indicar que o domínio BPP não é um domínio independente, de forma que as sequências relativas ao domínio BPP, região *linker* e CNP formem um único domínio cuja integridade seja fundamental para o processo de renaturação.

4.1.7 Análise do alinhamento entre seqüências da proteína precursora

A partir do alinhamento, utilizando-se o programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), entre as seqüências de precursores de BPP e CNP disponíveis em bancos de dados (NCBI- *Nucleotide and Protein Sequences*), observou-se que as oito seqüências existentes de precursores de BPP e CNP provenientes de serpentes apresentam alta similaridade entre si (96 a 74 %). Deve-se mencionar, no entanto, que o domínio BPP é a região que apresenta mais modificações e, conseqüentemente, menor similaridade. Para a análise do alinhamento, utilizou-se a classificação das regiões da proteína precursora de BPP e CNP feita por Murayama et al. 1997 (figura 16).

A região correspondente aos primeiros 22 resíduos de aminoácidos, tida como peptídeo sinal, é bem conservada (77,2 % dos resíduos são conservados) em todas as seqüências analisadas (resíduos idênticos estão demonstrados em negrito e em fundo cinza na figura 16). A região do peptídeo sinal apresenta homologia de 100 % entre as seqüências do gênero *Bothrops*. O mesmo ocorre para as seqüências do gênero *Crotalus*. As seqüências do peptídeo sinal de *L. muta* e *G. blomhoffi* apresentam aproximadamente 90 % de similaridade com as seqüências do gênero *Crotalus* e 80 % com as seqüências do gênero *Bothrops*.

Observando-se a região correspondente ao domínio BPP (resíduos 26 a 127), percebe-se que esse domínio é relativamente menor nos precursores provenientes da glândula de veneno das serpentes do gênero *Crotalus* (*C. durissus terrificus* – isoformas 1 e 2 - e *C. durissus collilineatus*) (HIGUCHI et al., 2006), possuindo apenas 24 resíduos, 23 dos quais são conservados. Os precursores das serpentes desse gênero possuem apenas três BPPs em suas seqüências (as seqüências que codificam para BPPs estão em vermelho na figura 16), sendo que um deles está fora do domínio BPP, apresentando-se na região que é denominada de *linker* entre o domínio BPP e o CNP (resíduos 128 a 225). Os BPPs encontrados nos precursores da glândula de veneno (MURAYAMA et al., 1997) e cérebro de *Bj* (HAYASHI et al., 2003) e na glândula de veneno de *B. insularis* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002) são bastante similares entre si e também são encontrados em número de 7. As seqüências do domínio BPP do gênero *Bothrops* apresentam similaridade próxima de 90 %. As seqüências de precursores da glândula de veneno de *A. blomhoffi*

(MURAYAMA et al., 2000) e *L. muta* (SOARES et al., 2005) apresentam 6 e 5 BPP, respectivamente. As seqüências do domínio BPP de *A. blomhoffi* e *L. muta* apresentam aproximadamente 65 e 62 % de similaridade com as seqüências do domínio BPP do gênero *Bothrops*, respectivamente. É importante salientar que todos os BPP apresentam um resíduo pirolutâmico no N-terminal e uma prolina no C-terminal, com exceção do primeiro BPP do precursor da isoforma 2 de *C. durissus terrificus*, que possui uma histidina no lugar do pirolutâmico, e dos três BPPs encontrados na região *linker* dos precursores das serpentes do gênero *Crotalus* (HIGUCHI et al., 2006). Esses últimos não apresentam o resíduo pirolutâmico e a prolina nas extremidades dos BPP, possuindo uma seqüência bastante diferenciada.

Ainda no domínio BPP é interessante ressaltar a presença da seqüência de cinco resíduos de aminoácidos (XQQWY) (mostrado em caixa na figura 16), presente nos oito precursores alinhados, que precede o início do domínio BPP, sendo a posição X ocupada por resíduos L ou V e Y, S ou A. Essa seqüência de cinco resíduos repete-se no início de cada seqüência de BPP nos precursores provenientes dos gêneros *Bothrops* (MURAYAMA et al., 1997, HAYASHI et al., 2003, JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002) e *Agkistrodon* (MURAYAMA et al., 2000), aparecendo num total de cinco vezes no domínio BPP dessas serpentes. No entanto, essa seqüência (XQQWY) precede à dos BPPs somente uma vez (no início do domínio BPP como citado acima) nos precursores do gênero *Crotalus* (HIGUCHI et al., 2006) e três vezes no precursor de *L. muta* (SOARES et al., 2005). Outro resíduo conservado que se apresenta conservado no fim de todas as seqüências de BPPs é a leucina (L), com exceção dos BPPs da região *linker* do gênero *Crotalus* (HIGUCHI et al., 2006).

A seqüência da região *linker* apresenta 60,82 % de seus resíduos conservados entre as seqüências dos precursores. Já a região do domínio CNP (226 – 256), no entanto, é a região que apresenta maior similaridade entre as seqüências dos oito precursores de BPPs (77,5 % dos resíduos são conservados), indicando que o CNP é bastante conservado não apenas entre essas espécies de serpente, mas também entre seu homólogo de mamíferos (CNP22), 17 dos 22 resíduos de aminoácidos são idênticos.

C. coll.	MFVSRLAASGLLLLALLAVSLDGKPLQQWSQR-WP--HLEIPPLVVQNWKSP-----	49
C. terrif.1	MFVSRLAASGLLLLALLAVSLDGKPLQQWSQR-WP--HLEIPPLVVQNWKSP-----	49
C. terrif.2	MFVSRLAASGLLLLALLAVSLDGKPLQQWSHR-WP--HPEIPPLVVQNWKSP-----	49
L. muta	MFVSRLAASGLLLLALLAVSLDGKPLVQWSHKGWPP-RPQIPPLVVQWWSQ-----	50
A. blomhoffi	MFVSRLAASGLLLLALLAVSLDGKPLVQWSQG-RPP-GPPIPRLLVVQWWSQG--LPPGPPIPRLVVQWWS	66
B. jararaca	MVLSRLAASGLLLLALLAVSLDGKPLVQWSQS-WP--GPNIPPLKVVQWWSQGGWPRPGPEIIPPLTVQQWA	67
B. jararaca (b)	MVLSRLAASGLLLLALLAVSLDGKPLVQWSQGGWPRPGPEIIPPLKVVQWWSQGGWPRPGPEIIPPLTVQQWA	70
B. insularis	MVLSRLAASGLLLLALLAVSLDGKPLVQWSQGGWPRPGPEIIPPLKVVQWWSQGGWPRPGPEIIPPLTVQQWA	70
C. coll.	-----TQLQARESP	58
C. terrif.1	-----TQLQARESP	58
C. terrif.2	-----TQLQARESP	58
L. muta	KFNPPGHHIPPVVQEW---PPGHHIPPLVVQWWSQKKWPPGHHIPPLVVQKWDPPIISPPLLKPHESP	116
A. blomhoffi	QGLPPGPPIPPLVVQWWSQGLPPRPKIPPLVVQWWSQGLPPRPKIPPLVVQKWDPPIISPPLLKPHESP	136
B. jararaca	QNWPHQPPLTVQQWASQ-GRAPGPPIPPLTVQQWASQGRAPHPPIPPAPLQKWAP-LQKWAPLLQPHESP	135
B. jararaca (b)	QNWPHQPPLTVQQWASQWRPPGPPIPPLTVQQWASQARPPHPPIPPAPLQKWAP-VQKWAPLLQPHESP	139
B. insularis	QNWPHQPPLTVQQWASQGLPPRPQIPPLTVQQWASQGRAPHPPIPPAPLQKWAP-VQKWAPLLQPHESP	139
C. coll.	AGGTTALREELSLGPEAALDTPFAGPDGGPRGSKAAAAAPQRLSKSKGASATSA-ASR---DLRTDGKQA	124
C. terrif.1	AGGTTALREELSLGPEAALDTPFAGPDGGPRGSKAAAAAPQRLSKSKGASATSA-ASR---DLRTDGKQA	124
C. terrif.2	AGGTTALREELSLGPEAALDTPFAGPDGGPRGSKAAAAAPQRLSKSKGASATSA-ASR---DLRTDGKQA	124
L. muta	AGGTTALREELSLGPEAALDTPFAGPDVGPGRGSK-APAAPHRLPKSKGASATSA-ASRPMRDLRTDGKQA	184
A. blomhoffi	AGGTTALREELSLGPEAASGPAAAGADGGRSGSK-APAALHRLSKSKGASATSAASRPMRDLRTDGKQA	205
B. jararaca	ASGTTALREELSLGPEAASGVPSAGAEVGRSGSK-APAAPHRLSKSKGAARAT----RPMRDLRPDGKQA	199
B. jararaca (b)	ASGTTALREELSLGPEAASGVPSAGAEVGRSGSK-APAAPHRLSKSKGAARATSA-ASRPMRDLRPDGKQA	207
B. insularis	ASGTTALREELSLGPEAASGVPSAGAEVGRSGSK-APAAPHRLSKSKGAARATSA-ASRPMRDLRPDGKQA	207
C. coll.	RQNWGRVSPDHHSAAAGGGCG-GGGGARLLKGLAKKRAGNGCFGLKLDRIQMSGLGC	181
C. terrif.1	RQNWGRVSPDHHSAAAGGGGG-GGGGARLLKGLAKKRAGNGCFGLKLDRIQMSGLGC	181
C. terrif.2	RQNWGRVSPDHHSAAAGGGGG-GGGGARLLKGLAKKRAGNGCFGLKLDRIQMSGLGC	181
L. muta	RQNWGRMMPDHHAVGGGG---GGGGARLLKGLAKKRVGDGCFGLKLDRIQMSGLGC	239
A. blomhoffi	RQNWARMVNPDDHHAAGCCCGGGGGGARLLKGLVKKRVGARGCFGLKLDRIQMSGLGC	263
B. jararaca	RQNWGRMAHDDHHAAGGGGGGGG-AARLLKGLAKKGAAGCFGLKLDRIQMSGLGC	256
B. jararaca (b)	RQNWGRMVHDDHHAAGGGGGGGGGARLLKGLAKKGAAGCFGLKLDRIQMSGLGC	265
B. insularis	RQNWGRMVHDDHHAAGGGGGGGGGARLLKGLAKKGAAGCFGLKLDRIQMSGLGC	265

Figura 16: Alinhamento utilizando-se as oito seqüências de precursores de BPP e CNP presentes no banco de dados realizado usando o programa ClustalW2. As linhas abaixo das seqüências demarcam os domínios do precursor segundo Murayama et al., 1997: verde – peptídeo sinal; vermelho - domínio BPP; preto – linker; azul – domínio CNP. Os resíduos marcados com fundo cinza e em negrito são resíduos conservados. A caixa restringe a seqüência XQQWY. A identificação das seqüências no banco de dados é: C. durissus terrificus 1 – gi|15824634; C. durissus terrificus 2 – gi|15824636; C. durissus collilineatus – gi|84778490; L. muta – gi|118575167; A. blomhoffi – gi|4127227; B. jararaca - gi|82202072; B. jararaca brain – gi|82223405; B. insulares – gi|20069129.

Devido à grande variação entre os precursores presente na região correspondente ao domínio BPP, adicionada à descoberta dos BPPs na região *linker* do precursor do gênero *Crotalus* (HIGUCHI et al., 2006), é difícil nomear seqüências que poderiam exercer algum papel fundamental de reconhecimento durante o processo de liberação dos BPPs da proteína precursora.

4.2 NUDEL

4.2.1 Expressão e Purificação

Com o objetivo de determinar uma condição de alta expressão da proteína NUDEL para a obtenção de quantidades suficientes para os ensaios de cristalização, testou-se a expressão da proteína de rato em densidades ópticas de 0,8 e 1,5, a 30 °C, por 4 horas, induzida com 1 mM de IPTG em BL21 (DE3). Alíquotas de 1 ml foram retiradas após 2 e 4 horas de indução para observar a expressão da proteína e determinar a presença da mesma nas frações solúveis e insolúveis após lise celular por sonicação.

Como observado na figura 17, a NUDEL foi expressa em alta quantidade em ambas densidades ópticas (0,8 e 1,5) após 4 horas de indução. Após lise celular por sonicação para verificação da solubilidade da proteína, determinou-se que a NUDEL está presente em maior quantidade na fração solúvel (F.S) em relação à fração insolúvel (F.I.) para as duas densidades ópticas utilizadas e para os dois tempos de indução observados (2 e 4 h) (figuras 17A e 17B).

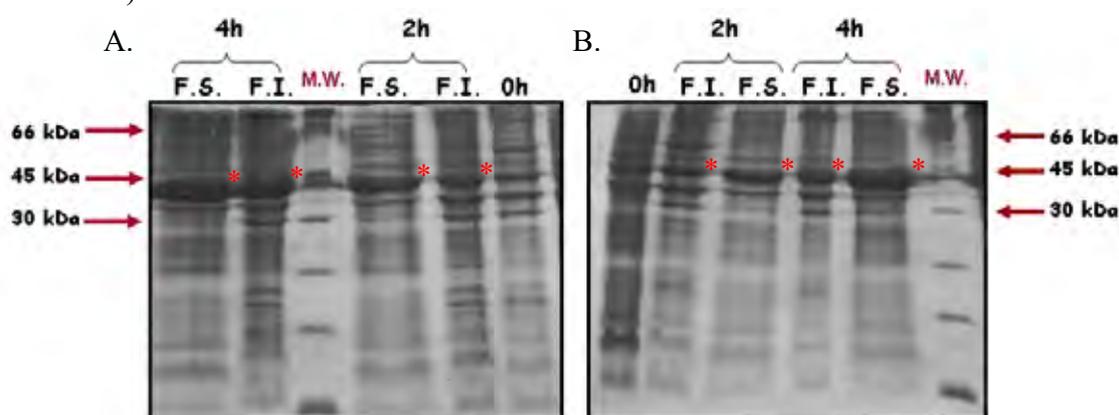


Figura 17: Análise da expressão e solubilidade da proteína NUDEL, induzida em meio LB e densidade óptica de 0,8 (A) e 1,5 (B) por 4 horas em BL21 (DE3) a 30 °C, por SDS-PAGE 12,5 %. Canaleta MW, marcador de peso molecular; 0h, amostra de bactérias antes da indução; canaletas 2h, 4h, tempos de 2 e 4 h de indução. F.S. – Fração solúvel. F.I. – Fração insolúvel. As bandas relativas à proteína induzida estão indicadas por asteriscos (*).

Primeiramente, a NUDEL obtida da fração solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade de Ni-NTA em coluna. Para isso, a proteína foi expressa em densidade óptica de 0,8 a 30 °C, por 4 horas, por meio de indução com 1 mM de IPTG em BL21 (DE3) (figura 18). Analisando-se o SDS-PAGE (figura 19) das amostras da purificação, observou-se que

a maior parte da proteína recombinante solúvel não se liga à resina Ni-NTA, concentrando-se na fração não retida. As frações eluídas com 500 mM de imidazol da coluna contêm proteína pura, porém em baixa quantidade quando comparada à quantidade de proteína presente no sobrenadante.

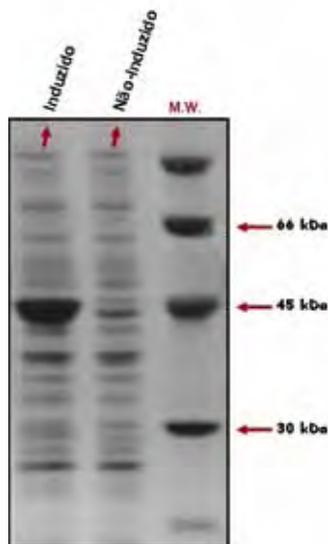


Figura 18: Análise da expressão da proteína NUDEL, induzida em meio LB e densidade óptica de 0,8 por 4 horas em BL21 (DE3) a 30 °C, por SDS-PAGE 12,5 %. Canaleta MW, marcador de peso molecular; canaletas induzido e não induzido, amostras da bactéria antes da indução da expressão da proteína e após 4h de indução por ITPG.

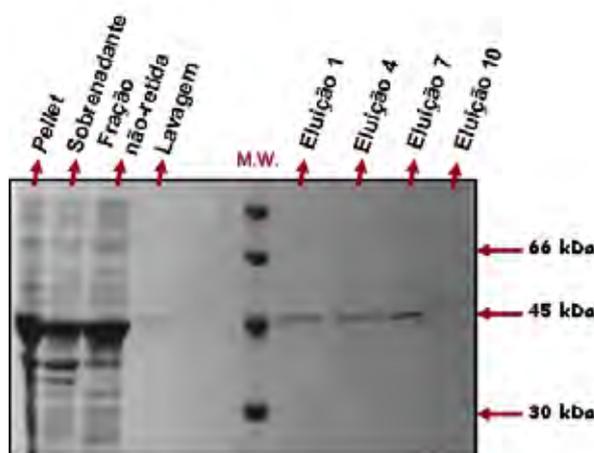


Figura 19: Análise por SDS-PAGE 12,5 % das frações eluídas da purificação por cromatografia de afinidade de Ni-NTA da proteína NUDEL obtida a partir da fração solúvel. Canaleta MW, marcador de peso molecular; *Pellet*, amostra da fração insolúvel; *Sobrenadante*, amostra da fração solúvel antes da aplicação na coluna; *Fração não-retida*, fração de proteínas não-retida na coluna; *Lavagem*, amostra das proteínas eluídas da coluna durante a lavagem, *Eluição 1* a *10*, eluições da proteína recombinante com 500 mM de imidazol da coluna.

Como a proteína também está presente em grandes quantidades na fração insolúvel, tentou-se purificar a NUDEL a partir do corpo de inclusão. A proteína foi expressa em BL21 (DE3), na densidade óptica de 0,8 a 30 °C, por 4 horas, por meio de indução com 1 mM de IPTG (figura 20). Após a lise celular por sonicação de bactérias correspondentes a 1 L de cultura, seguida de centrifugação, o precipitado celular foi lavado, para a retirada de proteínas bacterianas solúveis ainda presentes no corpo de inclusão, como descrito acima (seção 3.2.4), e solubilizado em tampão de extração contendo 8 M de uréia.

A purificação foi feita por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA em coluna e a análise da purificação por SDS-PAGE está exposta na figura 21. Como observado na figura 21B, a proteína foi purificada em alto grau de pureza e apresentou-se em maiores quantidades nessas frações eluídas do que naquelas obtidas da fração solúvel (figura 19).

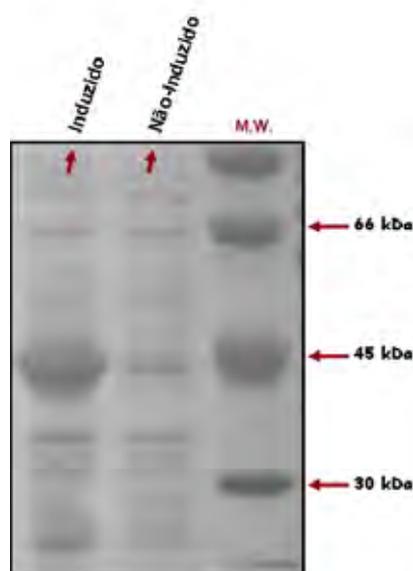


Figura 20: Análise da expressão da proteína NUDEL, induzida em meio LB e densidade óptica de 0,8 por 4 horas em BL21 (DE3) a 30 °C por SDS-PAGE 12,5 %. Canaleta MW, marcador de peso molecular; canaletas induzido e não induzido, amostras da bactéria antes da indução da expressão da proteína e após 4h de indução por IPTG.

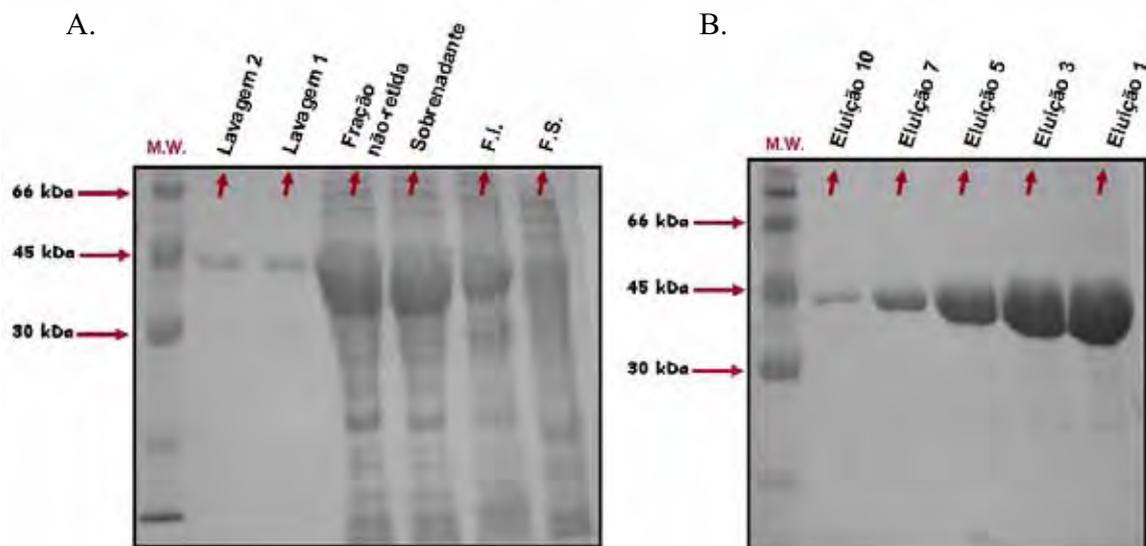


Figura 21: Análise por SDS-PAGE 12,5% das alíquotas das etapas do processo de purificação por cromatografia de afinidade de Ni-NTA sob condições desnaturantes (A) SDS-PAGE 12,5% das frações eluídas com 500 mM de imidazol (B). Canaleta MW, marcador de peso molecular; F.S. amostra da fração solúvel; F.I., amostra da fração insolúvel; Sobrenadante, amostra da fração insolúvel solubilizada em uréia antes da aplicação na coluna; Fração não-retida, fração de proteínas não-retida na coluna; Lavagem 1 e 2, amostra das proteínas eluídas da coluna durante a lavagem; Eluição 1 a 10, eluições da proteína recombinante com 500 mM de imidazol da coluna.

A renaturação da proteína foi feita na presença de 500 mM de L-arginina (LIU *et al.*, 2007, ARAKAWA *et al.*, 2007), aditivo usado para a estabilização dos estágios intermediários do processo de renaturação, utilizando-se o método da diluição. Não houve precipitação durante a diluição da amostra no tampão de renaturação. Após 24 horas de incubação sob agitação no tampão de diluição, a solução contendo a proteína diluída foi dividida em dois volumes iguais e dialisada em dois tampões diferentes:

- 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mM de NaCl
- 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mM de NaCl, 0,1 mM de cloreto de níquel.

A proteína proveniente da diálise contra os tampões descritos acima foi concentrada a 10 mg/ml e essas amostras submetidas a ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e CD.

4.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz é uma técnica muito usada como diagnóstico para determinar se uma amostra de proteína é adequada para cristalização. O DLS fornece informações sobre a distribuição de tamanhos e estado de agregação da proteína em

solução. Essas informações são importantes, pois estão intimamente relacionadas ao processo de cristalização, já que quanto mais homogênea (monodispersa) for a amostra, maior é a probabilidade de nucleação e crescimento dos cristais.

Primeiramente, medidas com a proteína em baixa concentração foram realizadas para determinar os efeitos do pH na distribuição de tamanhos da proteína (presença de monômeros e/ou oligômeros). A proteína foi diluída para 1 mg/ml, a partir da solução da proteína concentrada a 10 mg/ml, em tampões com 100 mM de NaCl e diferentes pHs (pH 4,5, 6,0, 7,5, 8,5 e 9,5). Observou-se que no pH 4,5, a proteína precipita da solução, indicando a proximidade desse pH ao pI da proteína (pI teórico de 5,3). As medidas de DLS foram feitas utilizando-se 20 acumulações de 10 segundos para cada condição de pH testada em temperatura ambiente. A figura 22 apresenta os resultados obtidos em termos do percentual de massa em função do raio hidrodinâmico médio das distribuições de tamanho. As distribuições de tamanho obtidas para os quatro diferentes pHs avaliados indicam que a proteína apresenta-se, majoritariamente, em estado monodisperso (aproximadamente 5 % de agregados de alto peso molecular) nos pHs 8,5, 7,5 e 6,0, mostrando-se polidispersa em pH 9,5. Observa-se que a proteína apresenta um raio hidrodinâmico em torno de 11,5 nm (agregados da ordem de 1017 kDa) em pH 8,5 e 6,5, enquanto que em pH 7,5, (peso molecular calculado de 143 kDa) o raio hidrodinâmico é da ordem de 5 nm (figura 22).

Para os ensaios de cristalização são, geralmente, utilizadas concentrações de proteínas acima de 1 mg/ml. Condições de alta concentração protéica favorecem a interação entre as proteínas o que pode levar a uma diferente distribuição de tamanho da amostra em solução. Assim a caracterização da proteína em alta concentração se faz necessária. Para esses estudos, a condição de pH 7,5 foi escolhida, pois apresentou agregados menores e monodispersos. Além disso, estudos de atividade da NUDEL indicam que a proteína encontra-se em sua forma ativa em pH 7,4 (HAYASHI et al., 2005) e 7,5 (HAYASHI et al., 2000).

As medidas em alta concentração (10,0 mg/ml) também foram realizadas com 20 acumulações de 10 segundos cada em temperatura ambiente. A curva de distribuição de tamanhos obtida é mostrada na figura 23a. Como pode ser visto, aproximadamente 92,5 % da proteína em solução, em tampão pH 7,5 com 100 mM de NaCl, apresentou-se na forma de agregados com raio hidrodinâmico de 15,7 nm e 7,5 % com raio de 100 nm, mostrando

que ocorre agregação perante aumento da concentração da NUDEL nas mesmas condições de pH e concentração de sal.

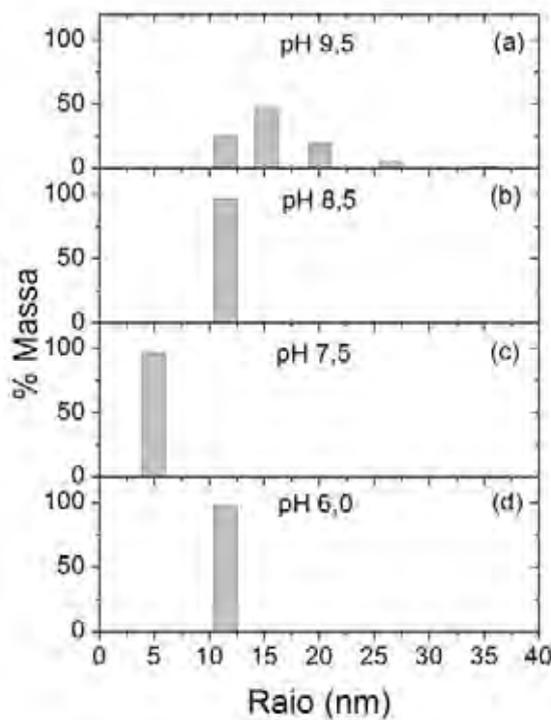


Figura 22: Medidas de DLS da proteína NUDEL a 1 mg/ml em diferentes pHs, pH 9,5 (a); pH 8,5 (b); pH 7,5 (c) e pH 6,0 (d). O gráfico exemplifica a porcentagem (eixo Y) da proteína que apresenta determinado raio hidrodinâmico (eixo X).

Uma alternativa para reduzir a formação de múltiplos oligômeros em solução é aplicação de aditivos que interagem com a proteína. Sabendo-se que a NUDEL possui um sítio predito de ligação a zinco em sua seqüência e que essa proteína é ativada na presença de DTT, zinco e DTT foram os aditivos escolhidos. Dessa forma, experimentos em alta concentração (10 mg/ml) foram realizados nas mesmas condições (pH 7,5 e 100mM NaCl) na presença de cloreto de zinco (0,1 mM) e DTT (1 mM). Os resultados estão apresentados na figuras 23b e 23c.

Observou-se que a presença de cloreto de zinco no tampão de diálise, após renaturação da proteína, reduziu o raio hidrodinâmico para 3,7 nm (peso molecular calculado 74 kDa) (figura 23b). A proteína na presença de zinco mostrou-se relativamente homogênea de forma que 90,0 % da mesma apresentou-se com raio hidrodinâmico de 3,7 nm. Os outros

10 % consistem de 7 % do total de proteínas portando um raio de 15 nm e 3 % com raio de 20 nm.

A adição de 1 mM de DTT na amostra concentrada a 10 mg/ml proveniente da diálise com tampão contendo zinco (incubada por 24 horas a 4 °C após adição de DTT) forneceu a medida de 2,8 nm do raio hidrodinâmico, correspondente ao peso molecular calculado de 39 kDa, aproximadamente o peso molecular predito para o monômero da NUDEL rato (39,187 kDa). A proteína nessa condição demonstrou-se monodispersa, pois 88,9 % da amostra apresentou um raio hidrodinâmico de 2,8 nm, 6,8 % com raio de 11,5 nm e 4,3 % com raio de 15 nm (figura 23c). Acredita-se que essa seja a melhor condição para os ensaios de cristalização, uma vez que é a proteína monomérica que apresenta atividade em pH 7,5 na presença de 0,5 ou 1 mM de DTT (HAYASHI et al., 2000, HAYASHI et al., 2005).

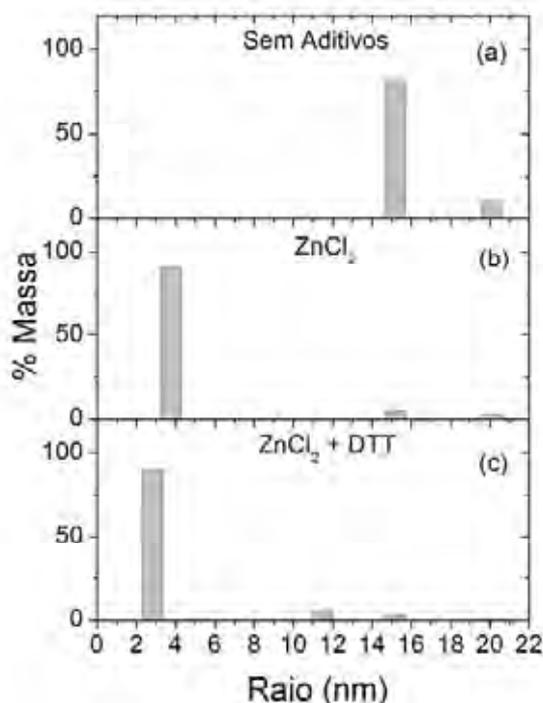


Figura 23: Medidas de DLS da proteína NUDEL a 10 mg/ml em pH 7,5 na ausência de aditivos (a); presença de zinco a 0,1 mM (b) e presença de zinco e DTT (c). O gráfico exemplifica a porcentagem (eixo Y) da proteína que apresenta determinado raio hidrodinâmico (eixo X).

A condição da proteína na presença de 0,1 mM de cloreto de zinco e 1 mM de DTT também foi testada em baixa concentração (1 mg/ml) e o mesmo resultado obtido a 10

mg/ml foi observado, ou seja, 90 % da proteína em solução apresentando raio hidrodinâmico de 2,8 nm.

É importante ressaltar que a NUDEL possui outras funções, além da atividade oligopeptidásica, que se relacionam à formação de complexos macromoleculares, tais como os formados com LIS1 e DISC1. Assim, na condição em que a NUDEL apresenta-se em estado oligomérico monodisperso, as interações entre os monômeros podem favorecer a estabilização de possíveis regiões mais flexíveis de associação com outras proteínas citoplasmáticas. Isto faz com que a NUDEL em estados oligoméricos monodispersos seja, também, um bom candidato para ensaios de cristalização.

4.2.3 Dicroísmo Circular e Emissão Intrínseca de Fluorescência

Para complementar as informações obtidas dos experimentos de DLS da proteína NUDEL, espectros de CD foram obtidos das amostras de proteína na presença e ausência dos aditivos zinco e DTT. Os experimentos de CD podem fornecer informações sobre uma possível relação entre mudanças no conteúdo de estrutura secundária da proteína nas diferentes condições e a formação dos agregados observados na amostra sem DTT e zinco.

Experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados para verificar a presença de estruturas secundárias após o processo de desnaturação/renaturação utilizado durante a purificação da proteína e, principalmente, para avaliar o conteúdo de estrutura secundária da NUDEL na condição ótima indicada pelos experimentos de DLS.

Os espectros de CD no UV distante (195 a 260 nm) da proteína NUDEL sem aditivos, na presença de zinco e na presença de zinco e DTT são mostrados na figura 24. Observa-se que os espectros da proteína na ausência de aditivos e na presença de zinco são bastante similares (curvas em preto e vermelho). Ambos espectros não apresentam picos negativos bem definidos próximos a 208 e 222 indicando que a proteína é composta de α -hélices e folhas- β nas duas condições. Porém, na presença de zinco e DTT, algumas diferenças podem ser observadas no espectro. A curva do espectro da proteína na presença de DTT cruza o eixo $x=0$ em 205 nm e não em 202 como nos espectros da proteína na ausência de aditivos e presença de zinco. Além disso, há uma mudança nas intensidades relativas dos picos. O pico negativo em torno de 210 nm é menos proeminente no espectro da proteína na presença de DTT, enquanto o pico negativo em 225 nm é mais bem definido (figura 24).

Para compreender melhor a influência do DTT e do zinco, análises quantitativas do conteúdo de estrutura secundária das proteínas foram realizadas. Os resultados da quantificação, apresentados na tabela 2, mostram que o conteúdo de estrutura secundária da proteína NUDEL na ausência e presença dos aditivos zinco e DTT é bem similar. Assim, infere-se que os aditivos não estão envolvidos na estruturação, mas sim na estabilidade na proteína. Algumas peculiaridades do espectro da proteína na presença de zinco e DTT refletem um pequeno aumento de α -hélices acompanhado de uma diminuição de β -turns no conteúdo de estrutura secundária quando os valores da tabela 2 são comparados aos valores obtidos da deconvolução dos espectros da proteína na presença de zinco e ausência de aditivos. Porém, deve-se ressaltar que esse aumento dos valores das porcentagens de α -hélices e β -turns está dentro do erro predito pelo programa.

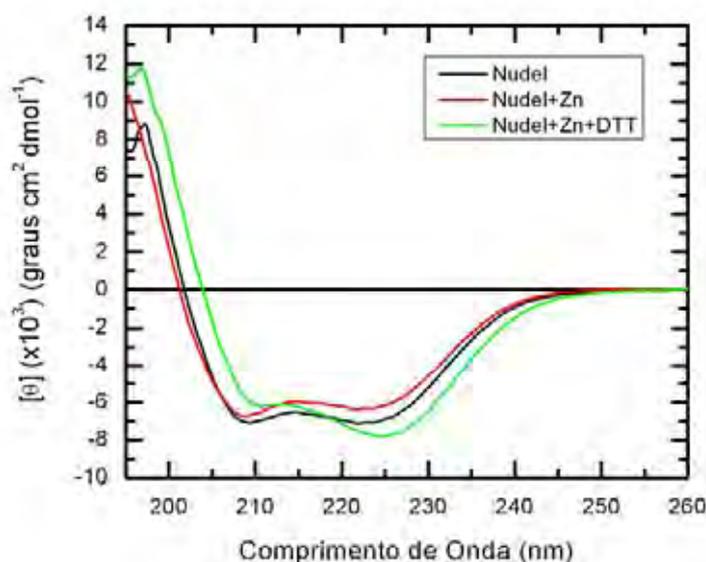


Figura 24: Espectros de CD no UV distante da proteína NUDEL na ausência de aditivos (preto), presença de Zinco (vermelho) e DTT+Zinco (verde) em 15 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 30 mM de NaCl em temperatura ambiente.

Experimentos de emissão intrínseca de fluorescência também foram realizados na ausência/presença de aditivos, com o objetivo de obter informações sobre distribuição dos 7 resíduos de triptofano na estrutura terciária. Os espectros na figura 25 mostram que a adição de aditivos causa um deslocamento do máximo de emissão, o que pode estar relacionado à mudança do estado oligomérico da amostra. Um pico em 332 nm é observado

na ausência de aditivos, enquanto picos em 334 e 336 nm, são observados na presença de zinco e zinco e DTT, respectivamente.

Tabela 2: Composição de estrutura secundária da proteína nudel na ausência e presença de aditivos. Os valores são dados em porcentagem (%) e o erro é de 6,20 % para as medidas adquiridas de 195 a 260 nm.

Proteínas Recombinantes	Alfa-Hélice	Folha Beta Antiparalela	Folha Beta Paralela	Beta-turn	Random Coil
Nudel	17,7	23,2	6,1	18,4	33,8
Nudel+Zn	17,5	24,6	6,2	18,7	32,6
Nudel+Zn+DTT	19,3	23,8	6,7	16,4	33,1

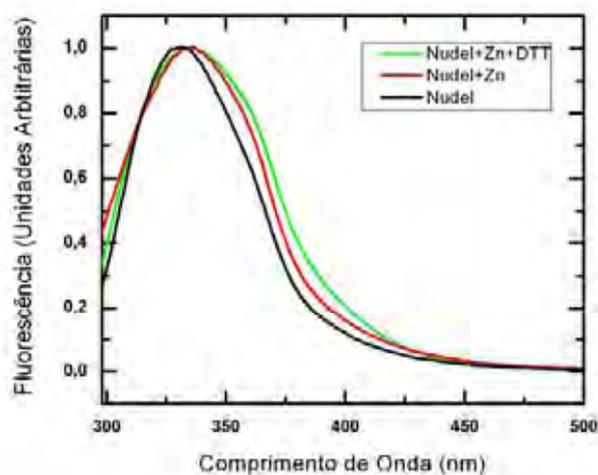


Figura 25: Espectro de emissão de fluorescência da proteína NUDEL na ausência de aditivos (preto), presença de Zinco (vermelho) e presença de Zinco e DTT (verde) em 15 mM de Tris-HCl pH 7,3 e 30 mM de NaCl em temperatura ambiente. Os máximos de emissão observados para a proteína na ausência de aditivos é 332 nm, na presença de Zinco e Zinco/DTT é 334 e 336 nm, respectivamente.

Esses resultados indicam que a proteína encontra-se enovelada e que seus resíduos de triptofano apresentam-se pouco acessíveis ao solvente, já que seus espectros não mostram um pico a 350 nm, típico de proteína desnaturada ou da presença de aromáticos na superfície de proteínas. Dessa forma, a presença do pico de máximo de emissão para ambas as proteínas na faixa de 330 a 340 nm, constitui uma evidência de que os resíduos de triptofano contidos nas mesmas apresentam pouca acessibilidade ao solvente, ou seja, apresentam-se enterrados no núcleo hidrofóbico da proteína (figura 25).

De maneira geral, os experimentos de CD e emissão intrínseca de fluorescência mostram que a proteína apresenta uma estrutura secundária definida composta, majoritariamente, de folhas- β , e os resíduos de triptofano pouco acessíveis ao solvente, sendo que o conteúdo de estrutura secundária e a localização dos resíduos de triptofano permanecem pouco alterados na presença de aditivos. Isto indica que as mudanças na distribuição de tamanhos da proteína em solução induzidas pelos aditivos, como observado pelos experimentos de DLS (figura 23), não são acompanhadas por mudanças expressivas na composição de estrutura secundária da proteína.

Dessa forma, as medidas de CD e fluorescência forneceram informações estruturais úteis da proteína nas condições testadas que favorecem o prosseguimento dos experimentos de cristalização.

4.2.4 Cristalização

Após a análise conjunta dos experimentos de DLS, CD e fluorescência, concluiu-se que a proteína NUDEL na ausência de aditivos, presença de zinco e zinco + DTT em pH 7,5 apresenta-se estruturada e monodispersa. Assim, as três amostras constituem soluções protéicas com potencial de cristalização. Os testes iniciais de cristalização foram feitos com a proteína nas seguintes condições:

- 8,5 mg/ml em 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mM de NaCl.

- 10,0 mg/ml em 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 100 mM de NaCl e 0,1 mM de cloreto de zinco.

- 10,0 mg/ml em 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 100 mM de NaCl, 0,1 mM de cloreto de zinco e 1 mM de DTT.

Os ensaios de cristalização foram feitos em placas de 24 poços utilizando-se os kits comerciais da Hampton Research Crystal Screen e Crystal Screen 2.

Os experimentos de cristalização estão em andamento e estamos aguardando os resultados.

Capítulo 5. Conclusões e Perspectivas

5.1 Proteína Precursora de BPP-CNP

As proteínas recombinantes, referentes às construções mostradas na figura 4, obtidas utilizando-se a metodologia A foram expressas, purificadas e as amostras finais analisadas por *western blotting*.

A proteína correspondente ao domínio BPP foi expressa e purificada em quantidade suficiente para os ensaios de cristalização. Porém, o mesmo não se repetiu para a proteína contendo os domínios BPP+CNP devido ao baixíssimo nível de expressão apresentado utilizando-se essa metodologia, inviabilizando a obtenção de proteína em maiores quantidades.

Caracterizações espectroscópicas foram realizadas em ambas as amostras com o intuito de verificar a presença de enovelamento após expressão heteróloga. Os resultados de CD mostraram que as proteínas correspondentes ao domínio BPP e domínio BPP+CNP apresentam estrutura secundária composta de α -hélices e folhas- β com predominância de folhas- β , favorecendo o início aos ensaios de cristalização do domínio BPP.

Pequenos cristais foram observados a partir dos ensaios preliminares de cristalização do domínio BPP utilizando-se o robô Honey Bee (LNLS). Porém, experimentos de difração por raios X indicaram que os mesmos eram cristais de sal. A maioria das gotas de cristalização apresentou-se clara, sem evidência de precipitado, indicando a necessidade de aumentar a concentração da proteína presente na gota de cristalização. Porém, as limitações impostas pelo baixo rendimento da expressão e pela precipitação da proteína para concentrações acima de 7 mg/ml, inviabilizaram a realização de ensaios de cristalização adicionais usando a proteína em maiores concentrações.

Com o objetivo de aumentar o rendimento do domínio BPP por litro de cultura assim como diminuir os gastos envolvidos na produção dessa proteína recombinante, testes de expressão do domínio BPP variando condições como temperatura, densidade óptica de indução, meio de cultura e tempo de indução levaram à identificação de uma condição de alto rendimento. Porém, nessa condição otimizada de expressão, o domínio BPP foi expresso na fração insolúvel. Obteve-se ótimo rendimento e pureza da proteína a partir da purificação, sob condições desnaturantes, de apenas 1 L de cultura induzida. No entanto, até o momento não houve sucesso na renaturação desse domínio embora vários métodos e aditivos tenham sido usados.

As dificuldades de renaturação observadas podem ser uma indicação de que, isolado, o domínio BPP não seja estável o suficiente durante as etapas intermediárias da renaturação. Nesse sentido, a presença do restante da proteína (*linker* e domínio CNP) poderia aumentar a estabilidade da proteína como um todo e favorecer sua renaturação.

Uma alternativa para obtenção da proteína precursora em maiores quantidades, seria a utilização das condições otimizadas de expressão do domínio BPP para testar a produção dos domínios BPP+CNP. Caso a proteína contendo os dois domínios apresente-se, também, em corpos de inclusão, existe a possibilidade de que o domínio CNP favoreça, de alguma forma, a reestruturação do domínio BPP e, conseqüentemente, de toda proteína.

Outra alternativa para a cristalização da proteína precursora de BPPs seria a tentativa de expressão dessa proteína em sistemas de expressão eucarióticos que podem favorecer, conjuntamente, maior rendimento e enovelamento adequados da proteína para estudos estruturais.

5.2 NUDEL

A metodologia aplicada para a expressão da proteína NUDEL em sistema heterólogo foi bem sucedida na obtenção de altas quantidades da proteína tanto na fração solúvel quanto na insolúvel. Devido ao baixo rendimento de proteína obtido na purificação a partir da fração solúvel, a purificação da NUDEL foi realizada sob condições desnaturantes a partir da proteína presente no corpo de inclusão. Além da grande quantidade de proteína purificada sob condições desnaturantes, a NUDEL eluída da coluna de Ni-NTA apresentou alto grau de pureza.

Não houve precipitação da proteína durante a renaturação pelo método da diluição usando-se L-arginina ou diálise na presença e ausência de cloreto de níquel. A proteína foi concentrada a 10 mg/ml para os experimentos de DLS que mostraram que a proteína apresenta-se monomérica e monodispersa (89,9%) na presença de zinco e DTT. Os espectros de CD e fluorescência indicaram que a proteína apresenta-se estruturada após a renaturação nas condições testadas. Tentativas de cristalização da proteína na ausência de aditivos, na presença de 0,1 mM de cloreto de zinco ou cloreto de zinco e 1 mM de DTT foram realizadas.

Uma possibilidade promissora para futuros experimentos seria a prévia caracterização espectroscópica da solução protéica na presença de inibidores e posteriores ensaios de cristalização com a adição dos mesmos.

Capítulo 6. Reconhecimento

Para a realização desse trabalho, o apoio e a orientação do Prof. Dr. Camargo e da Prof^a. Dr^a. Mirian Hayashi do CAT/CEPID – Instituto Butantan foram de fundamental importância. A participação do Dr. Lars Redecke (Universidade de Hamburgo) também se destacou durante as dificuldades enfrentadas no projeto. Finalmente, agradecemos à FAPESP pela aprovação do projeto (2006/01841-5) e conseqüente apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, A. J., Greenfield, N.J., Fasman, G.D. 1973. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol.* 27:675-735.

Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., Timasheff, N. 2007. Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects. *Protein Expr. Purif.* 127, 1-8.

Bilder, R.M., Volavka, J., Czobor, P., Malhotra, A.K., Kennedy, J.L., Ni, X., Goldman, R.S., Hoptman, M.J., Sheitman, B., Lindenmayer, J.P., Citrome, L., McEvoy, J.P., Kunz, M., Chakos, M., Cooper, T.B., Lieberman, J.A. 2002. Neurocognitive correlates of the COMT Val(158)Met polymorphism in chronic schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 52: 701-707.

Blackwood, D.H., Fordyce, A., Walker, M.T., St. Clair, D.M., Porteous, D.J., Muir, W.J. 2001. Schizophrenia and affective disorders-cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 428-433.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.

Brandon, N. J., Hanford, E. J., Schurov, I., Rain, J.-C., Pelling, M., Duran- Jimenez, B., Camargo, M., Oliver, K. R., Beher, D., Shearman, M. S., Whiting, P. J. 2004. Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders. *Mol. Cell. Neurosci.* 25: 42–55.

Brunner HR, Nussberger J, Waeber B. 1994. Dose-response relationships of ACE inhibitors and angiotensin II blockers. *Eur Heart J. D*, 123-128.

Callicott, J.H., Straub, R.E., Pezawas, L., Egan, M.F., Mattay, V.S., Hariri, A.R., Verchinski, B.A., Meyer-Lindenberg, A., Balkissoon, R., Kolachana, B., Goldberg, T.E., Weinberger, D.R. 2005. Variation in DISC1 affects hippocampal structure function and increases risk for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8627-8632.

Camargo, A.C., Reis, M.L., Caldo, H. 1979. Susceptibility of a peptide derived from bradykinin to hydrolysis by brain endo-oligopeptidases and pancreatic proteinases. *J. Biol. Chem.* 254: 5304-5307.

Case, D.B., Wallace, J.M., Keim, H.J., Weber, M.A., Sealey, J.E., Laragh, J.H. 1977. N. Possible role of renin in hypertension as suggested by renin-sodium profiling and inhibition of converting enzyme. *Engl. J.Med.* 296: 641-646.

CDNN deconvolution – Program for Circular Dichroism data deconvolution. Disponível em: <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/> Acesso em 20 Jul. 2007.

Cho, Y. Somer, B.G., Amatya, A. 1999. Natriuretic peptides and their therapeutic potencial. *Heart Dis.* 1: 305-328.

Chow, M.K.M., Amin, A.A., Fulton, K.F., Whisstock, J.C. 2006. Refold: An analytical database of protein refolding methods. *Protein Expr. Purif.* 46: 166-171.

Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guerassimenko, O., Cavarec, L., Palicio, M., Abderrahim, H., Bougueleret, L., Barry, C., Tanaka, H., La Rosa, P., Puech, A., Tahri, N., Cohen-Akenine, A., Delabrosse, S., Lissarrague, S., Picard, F.P., Maurice, K., Essioux, L., Millasseau, P., Grel, P. 2002. Genetic and physiological data implicating the new human gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13675-13680.

ClustalW2 - EBI server for multiple sequence alignment on the web. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> Acesso em 20 dec. 2007.

Cotton, J., Hayashi, M.A., Cuniasse, P., Vazeux, G., Ianzer, D., Camargo, A.C.M., Dive, V., 2002. Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry* 41: 6065–6071.

Craddock, N., O'Donovan, M.C., Owen, M.J. 2005. The genetics of schizophrenia bipolar disorder: dissecting psychosis. *J. Med. Genet.* 42: 193-204.

Davidson, N.C., Bar C.S. Struthers, A.D. 1996. C-type natriuretic peptide: an endogenous inhibitor of vascular angiotensin converting enzyme activity. *Circulation* 93: 1155-1159.

Efimov, V. P., Morris, N. R. 2000. The LIS1-related NUDF protein of *Aspergillus nidulans* interacts with the coiled-coil domain of the NUDE/RO11 protein. *J. Cell Biol.* 150: 681–688.

Egan, M.F., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Callicott, J.H., Mazzanti, C.M., Straub, R.E., Goldman, D., Weinberger, D.R. 2001. Effect of COMT Val108/158 Met genotype

on frontal lobe function and risk for schizophrenia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6917-6922.

Feng, Y., Olson, E.C., Stukenberg, P.T., Flanagan, L.A., Kirschner, M.W., Walsh, C.A. 2000. LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. Neuron 28: 665-679.

Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., Greene, L.J. 1970. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bj* venom. Biochemistry 9: 2583-2593.

Flick, K., Ahuja, S., Chenel, A., Bejaranol, Chen, Q. 2004. Optimized expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein I domains in *Escherichia coli*. Malaria Journal. 3:50

Gavras, H., Brunner, H.R., Laragh, J.H., Searley, S.E., Gavras, I., Vukovich, R.A. 1974. An angiotensin converting enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. N. Engl. J. Med. 291: 817-821.

Guyton, Arthur C., Hall, John E. Dominant Role of the Kidney in Long-Term Regulation of Arterial Pressure and in Hypertension: The Integrated System for Pressure Control. In: **Text Book of Medical Physiology**. 7. ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2006. Cap. 19.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J.Mol.Biol. 166: 557-580.

Harrison, P.J., Weinberger, D.R. 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. Mol. Psychiatry 10: 40-68.

Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., Inoue, K. 1994. Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. Nature 370: 216-218.

Hayashi, M.A.F., Portaro, F.C.V., Tambourgi, D.V., Sucupira, M., Yamane, T., Fernandes, B.L., Ferro, E.S., Rebouças, N.A., Camargo, A.C.M. 2000. Molecular and immunochemical evidences demonstrate that endooligopeptidase A is the predominant cytosolic oligopeptidase of rabbit brain, Biochem. Biophys. Res. Commun. 269: 7-13.

Hayashi, M.A., Pires, R.S., Rebouças, N.A., Britto, L.R.G., Camargo, A.C.M. 2001. Expression of endo-oligopeptidase A in the rat central nervous system: a non-radioactive in situ hybridization study. Mol. Brain Res. 89: 86-93.

Hayashi, M.A., Murbach, A.F., Ianzer, D., Portaro, F.C., Prezoto, B.C., Fernandes, B.L., Silveira, P.F., Silva, C.A., Pires, R.S., Britto, L.R., Dive, V., Camargo, A.C.M. 2003. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J. Neurochem.* 85 (4): 969–977.

Hayashi, M.A., Camargo, A.C.M. 2005. The Bradikinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly specific inhibitors of the somatic angiotensin converting enzyme. *Toxicon* 45: 1163-1170.

Hayashi, M.A.F., Portaro, F.C.V., Bastos, M.F., Guerreiro, J.R., Gorrão, S.S., Tambourgi, D.V., Sant'Anna, O.A., Camargo, L.M., Brandon, N.J., Camargo, A.C.M. 2005. Inhibition of NUDEL-oligopeptidase activity by the schizophrenia risk factor Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 3828-3833.

Hennah, W., Varilo, T., Kestila, M., Paunio, T., Arajärvi, R., Haukka, J., Parker, A., Martin, R., Levitzky, S., Partonen, T., Meyer, J., Lonnqvist, J., Peltonen, L., Ekelund, J. 2003. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum. Mol. Genet.* 12: 3151-3159.

Higuchi, S., Murayama, N., Saguchi, K., Ohi, H., Fujita, Y., Silva, N.J., Siqueira, R.J.B., Lahlou, S., Aird, S. 2006. A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursor in the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. *Comp Biochem Physiol C* 144: 107-121.

Hodgkinson, C.A., Goldman, D., Jaeger, J., Persaud, S., Kane, J.M., Lipsky, R.H., Malhotra, A.K. 2004. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 75: 862-872.

Ianzer, D., Konno, K., Marques-Porto, R., Portaro, F.C.V., Stoëcklin, R., Camargo, A.C.M., Pimenta, D.C. 2004. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides.* 25: 1085–1092.

Jancarik, J., Kim, S.H. 1991. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24: 409–411.

Jaspard, E., Wei, L., Alhenc-Gelas, F. 1993. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J. Biol. Chem.* 268: 9496–9503.

Johnson, A.R. 1979. Effects of kinins on organ systems. In: Erdos, E.D., ed. Bradikinin, kallidin and kallikrein 25: 357-399.

Junqueira-de-Azevedo, I., Ho, P.L. 2002. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expresses sequence tags (ESTs). *Gene* 299: 279-291.

Kitagawa, M., Umezu, M., Aoki, J., Koizumi, H., Arai, H., Inoue, K. 2000. Direct association of LIS1, the lissencephaly gene product, with a mammalian homologue of a fungal nuclear distribution protein, rNUDE. *FEBS Lett.* 479: 57-62.

Kholmanskikh, S.S., Dobrin, J.S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P.C., Ross, M. 2003. Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. *J. Neurosci.* 23: 8673-8681.

Krieger, E.M., Salgado, H.C., Assan, C.J., Greene, L.J., Ferreira, S.H. 1971. Potential screening test for detection of overreactivity of renin-angiotensin system. *Lancet* 1: 269-271.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lerner, U.H. 1996. Kinins and neuropeptides. *Principles Bone Biol.* 51: 581-595.

Linz, W., Wiemer, G., Gohlke, P., Unger, T., Scholkens, B.A. 1995. Contribution of kinins to the vascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 47: 25-49.

Lipska, B.K., Tricia Peters, T., Hyde, T.M., Halim, N., Horowitz C., Mitkus, S., Weickert, C.S., Matsumoto, M., Sawa, A., Straub, R.E., Vakkalanka, R., Herman, M.H., Weinberger, D. R., Kleinman, J. E. 2006. Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Hum. Mol. Genet.* 15 (8): 1245-1258.

Liu, Y., Li, J., Wang, F., Chen, J., Li, P., Su, Z. 2007. A newly proposed mechanism for arginine-assisted protein refolding- not inhibiting soluble oligomers although promoting a correct structure. *Protein Expr. Purif.* 51: 235-242.

Mark, J.K., Smith, S., Hefford, M.A. 2007. Over-expression and refolding of MAP kinase phosphatase 3. *Protein Expr. Purif.* 54: 253-260.

Meki, A. M.A., Nassar, A.Y., Rocha, H. 1995. A bradykinin-potentiating peptide (Peptide K12) from the venom of egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides* 16: 1359-1365.

Millar, J.K., Wilson-Annan, J.C., Anderson, S., Christie, S., Taylor, C.A., Semple, C.A., Devon, R.S., Clair, D.M., Muir, W.J., Blackwood, D.H., Porteous, D.J. 2000. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 9: 1415-1423.

Millar, J. K., Christie, S., Anderson, S., Lawson, D., Hsiao-Wei Loh, D., Devon, R. S., Arveiler, B., Muir, W. J., Blackwood, D. H., Porteous, D. J. 2001. Genomic structure and localisation within a linkage hotspot of Disrupted In Schizophrenia 1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 6: 173–178.

Millar, J.K., Christie, S., Porteous, D.J. 2003. Yeast two-hybrid screens implicate DISC1 in brain development and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 1019-1025.

Millar, J.K., Pickard, B.S., Mackie, S., James, R., Christie, S., Buchanan, S.R., Malloy, M.P., Chubb, J.E., Huston, E., Baillie, G.S., Thomson, P.A., Hill, E.V., Brandon, N.J., Rain, J.C., Camargo, L.M., Whiting, P.J., Houslay, M.D., Blackwood, D.H., Muir, W.J., Porteous, D.J. 2005. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science* 310: 1187-1191.

Miller, E.D., Jr., Samuels, A.I., Haber, E., Barger, A.C. 1972. Inhibition of angiotensin conversion in experimental renovascular hypertension. *Science* 177: 1108-1109.

Miyoshi, K., Honda, A., Baba, K., Taniguchi, M., Oono, K., Fujita, T., Kuroda, S., Katayama, T., Tohyama, M. 2003. Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth. *Mol Psychiatry* 8: 685-694.

Morris, J.A., Kandpal, G., Ma, L., Austin, C.P. 2003. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum. Mol. Genet.* 12: 1591-1608.

Murayama, N., Hayashi, M.A., Ohi, H., Ferreira, L.A., Fernandes, B.L., Yamane, T., Camargo, A.C.M. 1997. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94 (4): 1189–1193.

Murayama, N., Michel, G.H., Yanoshita, R., Samejima, Y., Saguchi, K., Ohi, H., Fujita, Y., Higuchi, S. 2000. cDNA cloning of bradykinin-potentiating peptides-C-type Natriuretic peptide precursor, and characterization of the novel peptide Leu3-Blomhotin from the venom of *Agkistrodon blomhoffi*. Eur. J. Biochem. 267: 4075-4080.

Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Nakai, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, M., Sakaki, Y., Hattori, S., Ohno, M. 1995. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92 (12): 5605–5609.

Needelman, P., Marshall, G., Sabel, B.E. 1975. Hormones interactions in the isolated rabbit heart: synthesis and coronary vasomotor effects of prostaglandins, agiotensin and bradykinin. Circ. Res. 37: 802-808.

Ng, K.K., Vane, J.R. 1970. Some properties of angiotensin converting enzyme in the lung in vivo. Nature 225: 1142–1144.

Niethammer, M., Smith, D.S., Ayala, R., Peng, J., Ko, J., Lee, M.-S., Morabito, M., Tsai, L.-H. 2000. Nudel is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. Neuron 28: 697-711.

Ohno, M., Menez, R., Ogawa, T., Danse, J.M., Shimohigashi, Y., Fromen, C., Ducancel, F., Zinn-Justin, S., Le Du M, H., Boulain, J.C., Tamiya, T., Me'nez, A. 1998. Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution?. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 59: 307–364.

Oliveira, E.B., Martins, A.R., Camargo, A.C.M. 1976. Isolation of brain endopeptidases: influence of size and sequence of substrates structurally related to bradykinin, Biochemistry 16: 1967-1974.

Ondetti, M.A., Cushman, D.W., 1981. Angiotensin converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological activities. In: Soffer, R.L. (Ed.), Biochemical Regulation of Blood Pressure. Wiley, New York, pp. 165–204.

Ozeki, Y., Tomoda, T., Kleiderlein, J., Kamiya, A., Bord, L., Fujii, K., Okawa, M., Yamada, N., Hatten, M. E., Snyder, S. H. 2003. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 289–294.

Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T., Ledbetter, D.H. 1993. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364: 717-721.

Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., Rosenfeld, G. 1949. Bradykinin, a hypotensive and a smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261–270.

Rousseau, A., Michaud, A., Chauvet, M.T., Lenfant, M., Corvol, P. 1995. The haemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 270: 3656–3661.

Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M.J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A., Hirotsune, S. 2000. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* 28: 681-696.

Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisante-Shalom, A., Lev-Lehman, E., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisaru, N., Karp, L., Schiffer, R., Kotler, M., Strous, R.D., Swartz-Vanetik, M., Knobler, H.Y., Shinar, E., Beckmann, J.S., Yakir, B., Risch, N., Zak, N.B. 2002. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1296-1302.

Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M., Xie, Z., Gleeson, J. G., Tsai, L-H. 2004. Ndel1 Operates in a Common Pathway with LIS1 and Cytoplasmic Dynein to Regulate Cortical Neuronal Positioning. *Neuron*, 44: 263–277.

Soares, M.R., Oliveira-Carvalho, A.L., Wermelinger, L.S., Zingali, R.B., Ho, P.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Diniz, M.R.V. 2005. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. *Toxicon* 46: 31-38.

Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., Woody, R.W. 1999. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* 8:370-80.

Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T.T., Hjaltason, O., Birgisdottir, B., Jonsson, H., Gudnadottir, V.G., Gudmundsdottir, E., Bjornsson, A., Ingvarsson, B., Ingason, A., Sigfusson, S., Hardardottir, H. 2002. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 877-892.

Straub, R.E., Jiang, Y., MacLean C.J., Ma, Y., Webb, B.T., Myakishev, M.V., Harris-Kerr, C., Wormley, B., Sadek, H., Kadambi, B., Cesare, A.J., Gibberman, A., Wang, X., O'Neill, F.A., Walsh, D., Kendler, K.S. 2002. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 337–348.

Sweeney, K.J., Prokscha, A., Eichele, G. 2001. NudE-L, a novel Lis1- interacting protein, belongs to a family of vertebrate coiled-coil proteins. *Mech. Dev.* 101: 21-33.

Turner, A.J., Hooper, N.M. 2003. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol.* 23 (4): 177–183.

Taya, S., Shinoda, T., Tsuboi, D., Asaki, J., Nagai, K., Hikita, T., Kuroda, S., Kuroda, K., Shimizu, M., Hirotsune, S., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. 2007. DISC1 Regulates the Transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3 Complex through Kinesin-1. *J. Neurosci.* 27 (1):15-26.

Toyo-oka, K., Shionoya, A., Gambello, M.J., Cardoso, C., Leventer, R., Ward, H.L., Ayala, R., Tsai, L.H., Dobyns, W., Ledbetter, D., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris, A. 2003. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat. Genet.* 34: 274-285.

Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T. 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusions bodies. *Protein Expr. Purif.* 28: 1-8.

Villard, E., Soubrier, F., 1996. Molecular biology and genetics of the angiotensin-I-converting enzyme: potential implications in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 32 (6): 999–1007.

Warner, L.R., Blasick, C.M., Brown, R.J., Oxford, J.T. 2007. Expression, purification and refolding of recombinant collagen alpha 1 (XI) amino terminal domain splice variants. *Protein Expr. Purif.* 52: 403-409.

Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P., Clauser, E. 1991. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J. Biol. Chem.* 266 (14): 9002–9008.

WHO (World Health Organization) – The World Health Report 2002 – Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/en/> Acesso em: 20 jul. 2007.