UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Expressão e caracterização das quimases recombinantes
específicas de mastócitos de camundongos (mMCP4 e 5)**

Ana Carolina Santana

Ribeirão Preto

2014

ANA CAROLINA SANTANA

**Expressão e caracterização das quimases recombinantes
específicas de mastócitos de camundongos (mMCP4 e 5)**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências: Biologia
Celular e Molecular**

Ana Carolina Santana

Orientadora: Prof. Dra. Maria Célia Jamur

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

Santana, Ana Carolina

Expressão e caracterização das quimases recombinantes específicas de mastócitos de camundongos (mMCP4 e 5)

Ribeirão Preto, 2014

72 p.; il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Jamur, Maria Célia

1. Mastócitos
2. Quimases
3. *Pichia pastoris*
4. Angiogênese

Expressão e caracterização das quimases recombinantes específicas de mastócitos de camundongos (mMCP4 e 5)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Jamur.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*“... mãe não tem limite, é tempo sem hora,
luz que não se apaga, quando sopra o vento e chuva desaba...”*

(Para sempre – Carlos Drummond de Andrade)

*Dedico esta vitória à **mamãe Lourdes**, que sempre acreditou nos meus
sonhos e, além de sonhar comigo, foi fundamental nesta realização.*

AGRADECIMENTOS

Deus, em Ti guardei minha fé. Nos momentos em que já não havia chão, fui aos céus pedir o Teu auxílio. Em Ti, encontrei forças para caminhar de pés descalços em meio a tantos espinhos.

Aos essenciais, agradeço de coração:

*À **mamãe Lourdes**, que foi indispensável nesta conquista. Seus conselhos, sua atenção e sua capacidade de me acalmar foram essenciais nesta etapa. Você é um exemplo na minha vida. Obrigada pela confiança e por sempre acreditar que eu conseguiria alcançar mais esta vitória.*

*À **tia Edi**, pelo carinho, compreensão, conselhos e paciência nesta longa caminhada. Pelos abraços quentinhos e por todas as histórias infantis que me contou e fez aflorar minha imaginação.*

*Ao meu namorado **Felipe**, por ser meu porto seguro neste período. Você foi essencial nesta etapa, me escutando, apoiando e também dando sugestões no trabalho de dissertação. Agradeço por estar ao meu lado em todos os finais de semana, até naqueles de trabalho duro. Além disso, agradeço a ajuda com a predição das estruturas das quimases recombinantes. “**Eu te amo porque te amo. Amor é estado de graça e com amor não se paga.**”*

(As sem razões do amor –

Carlos Drummond de Andrade)

*À **Profa. Dra. Maria Célia Jamur**, por todo o conhecimento e aprendizados nestes dois anos. Pela paciência durante todo o meu projeto de mestrado e pela excelente orientação.*

*À **Profa. Dra. Constance Oliver**, pelo carinho, pelo conhecimento científico, pela ajuda com o inglês e photoshop.*

*Aos queridos amigos de laboratório, minhas **estrelas-guias**:*

***Tia Dri**, embora nunca tenha trabalhado com você,
admiro o seu sorriso e personalidade. Obrigada por
iluminar nossos dias com sua visita!*

***Tony**, obrigada pela acolhida, pelo carinho,
por tudo o que me ensinou de BioMol e também
pelos plasmídeos. Você, suas histórias e nossos
experimentos de sábado e feriado sempre estarão
em meus pensamentos.*

“Andar com fé eu vou, que a fé não costuma faia.”

***Gabs**, obrigada por sua alegria e por sua disposição.
Você faz falta em nossos dias de trabalho!*

***Vaval**, obrigada pelo carinho e por compartilhar
tantas experiências maravilhosas comigo.
Sucesso sempre!*

Claudinha, sua calma é um exemplo que eu sempre tento seguir. Obrigada por todo o ensinamento.

Vivi, obrigada pela acolhida, pelas caronas e por me ensinar tudo de eletroforese e blot. Você é uma pessoa que guardo com carinho em meu coração.

Clara, minha querida amiga, agradeço por todos os incentivos e por toda a fé que você depositou em mim. Sem você, eu não teria nem dado a largada. Sou eternamente grata a você.

Ed, é sempre bom rir e fazer umas belas faxinas no laboratório com você! Obrigada pelas palavras de carinho sempre presentes.

Júnior, obrigada por ser essa pessoa incrível que você é. Além disso, agradeço pela enorme ajuda no projeto, pelo conhecimento e carinho.

William, gostaria de transformar o meu agradecimento em um abraço (tipo Will) e entregar a você. Nele está toda minha gratidão e carinho que sinto por você.

***Elaine**, quando eu crescer quero ser igual a
você. Obrigada pela amizade, pelas conversas
e discussões sobre experimentos e também por
me apresentar histórias incríveis de outros países.
Muito obrigada!*

“I’ve got sunshine on a cloudy day...”

***Vanis**, você foi o meu sol nesse
mestrado. A sua alegria de viver e a sua luz
me fizeram bem mais felizes durante estes
dois anos. Foi muito bom caminhar e
aprender com você!*

*“Para fazer um bom café, meu bem
Como se faz, lá no Brasil
Precisa ter um bom café, também
Como se tem, lá no Brasil”*

(Samba do Café – Vinicius de Moraes)

Aos **amigos** que tornaram meu **trabalho possível**:

Aos amigos das *Drosophilas*, **Carlos e Maiaro**,
pelas dicas de protocolos, auxílios em experimentos,
pelas conversas e pela enorme amizade. Vocês foram
muito especiais nesta etapa! Espero ter vocês por perto sempre.

Às amigas **Gabi, Mari e Paula**, por estarem sempre
dispostas a ajudar. Sem a disponibilidade de vocês,
nem metade dos experimentos teria sido realizado.

Ao **Dr. Gilvan Pessoa Furtado**, por ser primordial
na discussão final da dissertação. Agradeço todo o
seu interesse, disponibilidade e conhecimento de
proteínas. Você me deu a segurança necessária
para a defesa deste trabalho. Fica aqui minha
eterna gratidão.

Aos amigos de pós, **Flávia, Leila, Relber, Ju, Frank,**
Mário e Rui, pela amizade e por tornarem esses
anos mais agradáveis.

“O saber a gente aprende com os mestres e
os livros. A sabedoria se aprende é com a
vida e com os humildes.”

(Cora Coralina)

“Friends will be friends. When you through with life and all hope is lost. Hold out your hand, cos friends will be friends right till the end.” (Queen)

*Às amigas e companheiras de casa **Deia, Camila e Ligia**, por me receberem tão bem em Ribeirão Preto e por fazerem da nossa casa, o meu lar. O carinho e compreensão de vocês foi muito importante neste período.*

*Às amigas de Barretos, **Sayuri, Bia e Marina**, por serem tão compreensivas com a minha ausência. Obrigada pelos conselhos, abraços e orações, e também por entenderem a distância e a falta de tempo. Vocês me fazem sentir como se eu não estivesse ausente sequer um dia.*

*Aos meus loucos amigos **Goonies Barretenses**, por me lembrarem todos os dias que a “zoeira never ends” e por arrancarem gargalhadas de mim todos os dias.*

*Às amigas de graduação, **Carina e Camila**, por toda a torcida, apoio e amizade.*

Agradecimentos especiais:

A Prof. Dra. Maria Laura Pinto Rodrigues
*por acender esse perfil curioso, de querer
saber como tudo funciona. Agradeço também
por todas as discussões científicas que tivemos
durante a minha graduação. Tenho certeza de
que elas influenciam até hoje o meu pensar.
Além disso, gostaria de agradecer a indicação
do laboratório para a realização da pós-graduação.*

A Dra. Élia Claudia de Souza Almeida *por tudo. Você
foi importantíssima no meu crescimento científico e
pessoal. Lembrarei sempre de seus conselhos e de seu
sorriso contagiante.*

Ao Ms. Ilcione Ribeiro de Sousa Filho,
*que me ensinou todas as noções básicas
e aplicadas de laboratório. Além disso,
você me contagiou com o espírito de
companheirismo no laboratório.
Muito obrigada!*

Agradeço também:

*Ao técnico **Anderson Roberto de Souza** pelo apoio técnico e pelos momentos de descontração.*

*À técnica **Claudia Regina Maranghetti Faggion**, por todo o carinho, compreensão e por se preocupar como uma mãe. Além disso, por não deixar que faltasse nenhum material para a realização dos experimentos de expressão de proteínas.*

*À técnica **Mara Silvia Alexandre Costa** pela disponibilidade e carinho. Muito obrigada!*

*À técnica **Roberta Ribeiro Costa Rosales**, do Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifóton (LMMM), do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, por todo o conhecimento compartilhado durante os experimentos in vivo no microscópio Multifóton.*

*À técnica **Sandra Maria Oliveira Thomaz**, pela ajuda com alguns experimentos e pelo carinho.*

*Ao técnico **Valdir Mazzucato**, por toda disposição, disponibilidade e carinho. Muito obrigada!*

*Ao “**Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer**”, por abrir as portas para a realização dos experimentos de clonagem.*

*Ao “**Laboratório de Micologia Molecular**”, por disponibilizar toda a estrutura necessária para a realização da expressão das proteínas recombinantes em *P. pastoris*.*

*À secretária do programa de pós-graduação de Biologia Celular e Molecular, **Gabriela Bunhoto Zamoner**, por toda ajuda nas questões de prazos, papéis e normas. Agradeço sua disponibilidade e atenção.*

*À agência de fomento **CAPES**, pelo auxílio financeiro.*

Agradeço a todos os professores, técnicos e colegas do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

“Look at the stars. Look how they shine for you...”

(Yellow – Coldplay)

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO	2
MASTÓCITOS	2
QUIMASES	7
MASTÓCITOS E ANGIOGÊNESE.....	16
OBJETIVOS	21
Objetivo Geral	21
Objetivos Específicos	21
MATERIAS E MÉTODOS	23
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

RESUMO

Os mastócitos, em associação com outras células inflamatórias se acumulam em locais de tumor. Entretanto, pouco é conhecido sobre o papel exato dos mastócitos e de seus mediadores na progressão tumoral e angiogênese. Resultados recentes do nosso laboratório mostraram que a expressão das triptases específicas de mastócitos está correlacionada com a progressão tumoral (de Souza, Jr, PLoSOne 7(7): e40790). Além do mais, existe uma associação entre mastócitos e a angiogênese tumoral. Então, tornou-se interessante investigar o papel das quimases específicas de mastócitos (mMCP-4 e -5) neste processo. Visto que estas quimases não são disponíveis comercialmente, a primeira etapa deste estudo foi produzir as quimases mMCP-4 e -5 recombinantes. Assim, as sequências dos genes respectivos para mMCP-4 e -5, além das sequências para seis resíduos de His e do sítio suscetível a enteroquinase foram clonadas no vetor de expressão pPIC9. A cepa GS115 de *Pichia pastoris* foi transformada com o respectivo vetor para mMCP-4 ou -5. Os clones transformados foram crescidos em meio BMMY e induzidos com várias concentrações de metanol para a produção de mMCP-4 ou -5 recombinantes. Depois de 96 horas, o meio foi centrifugado e as quimases mMCP-4 ou -5 foram purificadas do sobrenadante usando resina de níquel. A identidade das proteínas foi confirmada por *Western Blotting* usando o anticorpo anti-his, assim como os anticorpos anti-mMCP-4 e -5. As proteases foram ativadas pela clivagem do sítio suscetível a enteroquinase por cinco horas, a 22°C. A ativação das enzimas foi confirmada através da degradação de seus substratos específicos. Estes resultados mostram que *P. pastoris* é um organismo eficiente para a expressão de ambas as proteases. Estas proteases recombinantes se constituem em ferramentas importantes para se elucidar o papel da mMCP-4 ou -5 na angiogênese.

Palavras-chave: mastócitos, quimases, angiogênese

ABSTRACT

ABSTRACT

Mast cells, in association with other inflammatory cells, are known to accumulate at tumor sites. However, little is known about the exact role that mast cells and their mediators play in tumor progression and angiogenesis. Recent results from our laboratory have shown that expression of mast cell specific tryptases correlates with tumor progression (de Souza, Jr, PLoSOne 7(7): e40790). Furthermore, there is an association between mast cells and tumor angiogenesis. It then became of interest to investigate the role of mast cell specific chymases (mMCP-4 and -5) in this process. Since these chymases are not commercially available, the first step in this study was to produce recombinant mMCP-4 and -5. The gene sequences for these chymases along with the sequence for six His residues and an enterokinase susceptible peptide were cloned into the expression vector pPIC9. The GS115 strain of *Pichia pastoris* was transformed with the respective vector for either rmMCP-4 or -5. The transformed clones were grown in BMMY media and induced to produce rmMCP-4 or -5 with various concentrations of methanol. After 96 hours, the medium was centrifuged and rmMCP-4 or -5 was purified from the supernatant using nickel-nitrilotriacetic acid agarose beads. The identity of the proteins was confirmed by Western blotting using an anti-his antibody as well as anti-mMCP-4 and -5. These results show that *P. pastoris* is an efficient organism in which to express both proteases.

Key words: mast cells, chymases, angiogenesis

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

MASTÓCITOS

Em 1878, Paul Ehrlich descreveu os mastócitos, pela primeira vez, como células repletas de grânulos corados em tons magenta e denominou os mastócitos de “*Mastzellen*”, por acreditar que estas células possuíam atividade fagocítica (EHRlich, 1878). Nesta época a composição química dos grânulos era desconhecida e não se sabia qual o componente granular reagia com corantes a base de anilina. Atualmente, sabe-se que a metacromasia dos mastócitos é devido à interação dos corantes básicos (catiônicos) com os resíduos ácidos (aniônicos) das cadeias de glicosaminoglicanas (GAGs) sulfatadas (heparina e sulfato de condroitina) da proteoglicana serglicina, presente em abundância nos grânulos destas células (JORPES, 1935; RANSON; GALLAGHER, 1992; ABRINK et al., 2004). Atualmente, os mastócitos são identificados como células multifuncionais residentes no tecido conjuntivo (RIBATTI & CRIVELLATO, 2014; DA SILVA, et al., 2014).

Os mastócitos estão envolvidos em mecanismos de defesa do organismo e participam em reações alérgicas, inflamatórias e na eliminação de parasitas (WEDEMEYER & GALLI, 2000; KRISHNASWAMY et al., 2006; DA SILVA, et al., 2014). A capacidade dos mastócitos em produzir e liberar uma variedade de mediadores químicos está relacionada com a fisiopatologia de reações alérgicas e de processos inflamatórios (PEJLER et al., 2010).

- **Localização, morfologia e heterogeneidade**

Os mastócitos estão distribuídos de forma ubíqua no tecido conjuntivo, sobretudo nas regiões subepiteliais e nas proximidades dos vasos sanguíneos, nervos, células musculares lisas, glândulas mucosas e folículos pilosos. A localização dos mastócitos no tecido perivascular e

próximos a outros sítios de interface ambiente-organismo está relacionada com a proteção do hospedeiro contra parasitas e outros patógenos (GALLI, 1993; DA SILVA, et al., 2014).

A morfologia dos mastócitos varia de acordo com a sua localização. Os mastócitos de lavado peritoneal são arredondados. Já os mastócitos do tecido conjuntivo localizados próximos aos vasos sanguíneos são alongados ou ovóides, enquanto que os mastócitos da derme são estrelados ou fusiformes (YONG, 1997). O diâmetro dos mastócitos varia entre 3 a 20 μm dependendo da sua localização ou do seu estágio de maturação (BIENENSTOCK et al., 1982; JAMUR et al., 2001). Os mastócitos de lavado peritoneal possuem um diâmetro médio de 12,6-13,5 μm (YONG, 1997).

A ultraestrutura dos mastócitos maduros mostra um núcleo central não segmentado com cromatina condensada na periferia, com 4-7 μm de diâmetro. O citoplasma contém numerosos grânulos elétron-densos (DVORAK, 1989), poucas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido e ribossomos livres.

Diferentes tipos de mastócitos foram descritos com base em suas características funcionais, estruturais e bioquímicas. A heterogeneidade dos mastócitos é influenciada pelo microambiente ou pelos mediadores e patógenos com os quais estas células interagem. Em humanos, os mastócitos são classificados de acordo com as proteases presentes no grânulo. Os mastócitos que estocam triptase (α e β) em seus grânulos são conhecidos como mastócitos T ou *mast cell T* (MC_T), enquanto que os mastócitos que estocam quimase e triptase em seus grânulos são classificados como mastócitos CT ou *mast cell CT* (MC_CT) (IRANI et al., 1986; METCALFE et al., 1997). Os MC_CT são encontrados na pele, linfonodos e submucosa do estômago e intestino, enquanto que os MC_T são predominantes nos pulmões e mucosa intestinal, próximos às células T (GOLDSTEIN et al.,

1987; IRANI et al., 1987). Dois tipos de mastócitos foram descritos em roedores: os MMCs (*mucosal mast cells*) são encontrados na lâmina própria das mucosas e contém dois tipos de β -quimases (mMCP-1 e mMCP-2) ligadas a sulfato de condroitina e os CTMCs (*connective tissue mast cells*) que residem nos demais tecidos conjuntivos, como na pele e na cavidade peritoneal. CTMCs contém nos grânulos duas triptases tetraméricas (mMCP-6 e mMCP-7) e quimases ligadas à heparina (uma α -quimase mMCP-5 e uma β -quimase mMCP-4), além da carboxipeptidase A (ENERBÄCK et al., 1986; WELLE, 1997; METCALFE et al., 1997). Estes subtipos variam quanto à sensibilidade de ativação e ao perfil de mediadores (GALLI et al., 2005).

- **Liberação de Mediadores**

A ativação dos mastócitos culmina na liberação de uma gama de mediadores inflamatórios (METCALFE et al., 1997). Esta liberação pode levar à liberação de três classes distintas de mediadores: os mediadores pré-formados, estocados nos grânulos citoplasmáticos (Tabela 1); os mediadores neoformados, derivados de precursores lipídicos presentes na membrana plasmática e em corpos lipídicos, tais como leucotrienos e prostaglandinas e os mediadores neosintetizados que são produzidos após a ativação transcricional, tais como citocinas pró-inflamatórias IL-1, -4, -5, -6, -10 (associadas a resposta Th2), IFN- γ , IL-2, -3, -12, -18 e TNF- α (associadas a resposta Th1) e quimiocinas como CCL5 e CXL8. A regulação da liberação de mediadores neosintetizados depende do tipo de estímulo e do receptor envolvido no processo de ativação (GALLI et al., 1999; STINCHCOMBE; GRIFFITHS, 2001).

Alguns dos mediadores pré-formados presentes nos grânulos de mastócitos (Tabela 1) também são produzidos por outros tipos celulares como fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, linfócitos, entre outras. Diferentemente, as quimases, triptases e carboxipeptidase A,

denominadas *mast cell proteases*, são expressas somente por mastócitos e estocadas em seus grânulos. Os mastócitos também sintetizam e secretam outras proteases, como as metaloproteases de matriz extracelular (MMPs), catepsina D, C e E.

Tabela 1: Componentes pré-formados estocados em grânulos secretores de mastócitos*

Aminas Biogênicas	Histamina, serotonina, dopamina e poliaminas
Enzimas Lisossomais	β -hexosaminidase, β -glucuronidase, β -D-galactosidase, arylsulfatase A e catepsinas C, B, L, D e E
Proteoglicanas	Serglicina (com cadeias GAGs heparina e sulfato de condroitina)
Proteases	Quimase**, Triptase**, Carboxipeptidase A**, Catepsina G, Granzima B, MMP-9 e Renina
Citocinas	TNF- α , IL-4, TGF- β , bFGF-2, IL-15, NGF, VEGF e SCF
Outros	Heparanase, MBP, Peroxidase e LL-37/Catelicina

* O padrão específico de expressão de mediadores varia consideravelmente entre mastócitos de diferentes espécies e de acordo com o subtipo de mastócito. ** Proteases específicas de mastócitos. Fonte: Lundquist & Pejler, 2011.

Os níveis de expressão de proteases específicas de mastócitos são muito altos e os níveis de mRNA são próximos ou até maiores do que os níveis de mRNA dos genes constitutivos clássicos (PEJLER et al., 2010). As proteases específicas de mastócitos estocadas nos seus grânulos secretores somam cerca de 25% do conteúdo total de proteínas de mastócitos. A pele humana contém cerca de 16 μ g de triptase e quimase por 10^6 células (SCHWARTS et al., 1987).

As proteases de mastócitos são estocadas no grânulo como enzima ativa (Figura 1), ou seja, os pró-peptídeos são removidos antes das proteases serem estocadas. Esta remoção de pró-

peptídeos pode, estruturalmente, favorecer a interação das proteases com as proteoglicanas (HUANG et al., 2000; SCHWARTS et al., 1987). Durante o processo de desgranulação são liberados complexos de proteases com proteoglicanas. Este processo evita a difusão destas proteases pelo tecido. A desgranulação dos mastócitos culmina na liberação de grandes quantidades de proteases e de outros mediadores que irão atuar nos diferentes processos.

Figura 1: Armazenamento e liberação das proteases de mastócitos. As proteases são sintetizadas como pré-pró-enzimas, onde ambos os peptídeos-sinais são clivados intracelularmente, resultando na ativação das enzimas. As proteases ativas são estocadas nos grânulos de mastócitos. Fonte: Pejler et al., 2010.

As proteases específicas de mastócitos estão relacionadas com artrite, inflamação alérgica das vias aéreas, angiogênese tumoral, formação de aneurisma aórtico abdominal e glomerulonefrite e na defesa contra bactérias e parasitas (SHIN et al., 2008; MCNEIL et al., 2008; SUN et al., 2009;

WAERN et al., 2009; SCANDIUZZI et al., 2010; SOUZA-JUNIOR et al., 2012). As proteases também possuem um papel modulador nas reações alérgicas, onde a β -triptase liberada durante a ativação dos mastócitos cliva a molécula de IgE limitando a inflamação alérgica (RAUTER et al., 2008).

QUIMASES

As quimases são proteases específicas de mastócitos que pertencem à família das serino-proteases. Esta é a maior família conhecida e caracterizada por possuir um resíduo de serina no sítio ativo (HEUTINCK et al., 2010). Durante a evolução, a estrutura das serino-proteases evoluiu várias vezes para formar estruturas biológicas que tivessem sucesso em sua função. As proteases são agrupadas em categorias de acordo com a similaridade estrutural e de atividade catalítica. Os quatro maiores grupos são compostos por: PA (*proteases of mixed nucleophile, superfamily A*) tendo como membro representativo a quimiotripsina; SB (*subtilisin-like*), que inclui a subtilisina e os grupos SC e SF que contém várias peptidases.

As três subfamílias das proteases PA podem ser distinguidas de acordo com a especificidade ao substrato. As *trypsin-like serine proteases*, incluindo certas granzimas e triptase de mastócitos, clivam substratos depois de resíduos de arginina e lisina carregados positivamente. Já os membros da subfamília *chymotrypsin-like* clivam substratos depois de aminoácidos hidrofóbicos grandes, como alanina e leucina. Ainda, as *elastase-like serine proteases* clivam substratos após resíduos hidrofóbicos pequenos, como a valina.

As quimases são proteases monoméricas e possuem especificidade para substrato *chymotrypsin-like*. Baseado na homologia da sequência de aminoácidos e de sua localização imunológica, foram identificadas 18 quimases em diferentes espécies, as quais foram divididas em

dois grupos: as α -quimases e as β -quimases (CHANDRASEKHARAN et al., 1996). Até o presente, somente a α -quimase foi identificada em humanos, macacos, babuínos e cães. Por outro lado, em roedores, múltiplas quimases estão presentes sendo a maioria β -quimases. Como α -quimases foram identificadas a *mouse mast cell protease 5* (mMCP-5), a *rat mast cell protease 3* (rmCP-3) e a *hamster chymase 2* (WU et al., 2005).

O gene da quimase humana (CMA1) está localizado no cromossomo 14q11.2 na extremidade de um pequeno *cluster* de quatro genes que abrange cerca de 130kb (CAUGHEY et al., 1993). Esse *cluster* contém o gene que codifica a catepsina G (CTSG), 65 kb *upstream* a CMA1 e os genes que codificam as granzimas H e B (GZMH e GZMB), localizados 30 e 55kb *upstream* a CTSG (Figura 2). As orientações de transcrição desses genes são as mesmas e a organização genética é conservada em roedores, cão e gado (GALLWITZ et al., 2006a; GALLWITZ et al., 2006b). Entretanto, ocorreu uma expansão espécie-específica do locus que o dividiu em uma região de quimase e outra região de granzima e, particularmente, em roedores é evidente uma ampla expansão na região da quimase.

A quimase humana é sintetizada como uma pré-pró-enzima, ou seja, com um peptídio sinal N-terminal que a direciona para o lúmen do retículo endoplasmático. A pré-pró-enzima de 274 aminoácidos consiste em 19 aminoácidos de peptídeo sinal, dois aminoácidos de pró-peptídeos e um domínio catalítico de 226 aminoácidos (CAUGHEY et al., 1991; URATA et al., 1991). O domínio catalítico contém a tríade catalítica, isto é, 3 resíduos de aminoácidos que funcionam juntos no centro do sítio ativo de uma enzima, resíduos conservados de cisteína e dois sítios de glicosilação N-ligados. O peso molecular da quimase humana é de aproximadamente 30 kDa. Assim como os outros membros da família *chymotrypsin-like*, a quimase humana apresenta o enovelamento de tripsina canônico, que consiste de dois barris (cada um formado por seis folhas

β), que cerca o sítio ativo e possui uma especificidade para substrato, o que favorece resíduos de fenilalanina, tirosina, triptofano e leucina na posição P1. Análises cristalográficas mostram que o subsítio S1 da quimase humana é uma fenda profunda, com um interior hidrofóbico que abriga uma cadeia lateral aromática (MCGRATH et al., 1997; REILING et al., 2003). Comparada a quimotripsina, a quimase humana tem uma especificidade mais seletiva ao substrato, o que é atribuído à sua estrutura exclusiva, que envolve o sítio de ligação ao substrato (WU et al., 2005).

Figura 2: Locus da quimase em humanos, camundongos e ratos. Nota-se que há somente um gene para a quimase humana. Em roedores, ocorre uma ampla expansão no locus da quimase. Fonte: Pejler et al., 2007.

No interior dos grânulos de mastócitos, as pró-quimases são empacotadas com a heparina e seus precursores enzimáticos inativos (zimógenos), então, são ativados pela *dipeptidyl peptidase I*, a qual requer as interações entre a heparina e as pró-quimases. As quimases são proteases neutras com atividade ótima entre pH 8 e 9. No grânulo, as proteases estão estocadas em meio ácido (pH 5,5), o que inibe sua atividade impedindo a auto-digestão e o dano intracelular. Nos mastócitos, as proteases são estocadas na forma ativa, fato que tem uma importante relação com a sua função biológica. O estoque de grandes quantidades de proteases ativas sugere uma ação destas proteases na fase inicial da resposta a agentes patogênicos (PEJLER et al., 2007).

Diferentemente de murinos, em humanos existe somente um gene que codifica a quimase (CMA1). Assim sendo, é difícil determinar qual das quimases de murino é similar, funcionalmente, à quimase humana. Baseado em suas sequências, a quimase mMCP-5 de camundongo é o homólogo mais próximo da quimase humana (Figura 3). Entretanto, a análise da especificidade de clivagem da mMCP-5 mostra que esta quimase possui atividade de elastase, ao invés de atividade

chymotrypsin-like existente em humanos, camundongos e ratos (KUNORI et al., 2002). Assim, a mMCP-5 não pode ser considerada um homólogo funcional da quimase humana.

Figura 3: Dendrograma das α - e β -quimases de mamíferos. Análises filogenéticas das sequências de aminoácidos de proteínas maduras obtidas através do algorítmico ClustalW. O comprimento de cada ramo é proporcional ao número de resíduos diferentes entre os grupos ou pares de sequências. A granzima A foi utilizada como ramo externo. M: murino; R: rato; S: ovelha; MCP: *mouse mast cell protease*; CMA: α -quimase. Adaptado de Pejler et al., 2007.

Por outro lado, a quimase mMCP-4 de murino possui especificidade ao substrato muito similar à da quimase humana (ANDERSSON et al., 2008; ANDERSSON et al., 2009). Além disso, mMCP-4 possui propriedades de ligação à serglicina e distribuição tecidual (em CTMCs) similares a da quimase humana. Levando em consideração as características descritas acima, a quimase mMCP-4 pode ser considerada o homólogo funcional mais próximo da quimase humana.

A quimase mMCP-1 exibe menor afinidade para serglicina e sua especificidade de clivar o substrato é ligeiramente diferente da quimase humana (ANDERSSON et al., 2008). Já a quimase

mMCP-2, não possui, praticamente, atividade enzimática e está presente em mastócitos de mucosa (MMCs), diferindo da localização tecidual da quimase humana encontrada em M_{CT} (PEMBERTON et al., 2003).

- **Estrutura Tridimensional**

A resolução das estruturas tridimensionais veio de estudos de modelagem molecular. As quimases de camundongo mMCP-1, -2, -4 e -5 foram modeladas e os resultados mostraram que estas quimases diferem, entre si, em relação à distribuição de carga elétrica na superfície molecular (SALI et al., 1993). As quimases mMCP-4 e mMCP-5 foram similares à quimase humana (MCGRATH et al., 1997; PEREIRA et al., 1999), preditas por possuírem dois pontos de carga positiva (resíduos de lisina e arginina). Assim sendo, foi proposto que estas regiões medeiam interações fortes com as PGs altamente negativas presentes nos CTMCs. Por outro lado, as quimases mMCP-1 e mMCP-2 não possuem um desses pontos positivos, o que explica a interação menor com as PGs presentes nos MMCs (ENERBÄCK et al., 1985).

A estrutura cristalográfica para rMCP-2 foi solucionada por REMINGTON et al., 1988. A estrutura tridimensional da quimase humana revelou uma alta similaridade com a quimotripsina pancreática, rMCP-2 e catepsina G. Uma característica notável da quimase humana, mas não da rMCP-2, é a presença de um grande número de resíduos de aminoácidos básicos (lisina/arginina) em dois *clusters* distintos na superfície molecular. Estes resíduos básicos estão envolvidos na interação da quimase com GAGs aniônicas.

- **O papel das quimases em diferentes patologias**

- **Infecção por parasitas**

Com camundongos *knockout* para mMCP-1 foi possível demonstrar que a ausência desta protease afeta a cinética do recrutamento de MMCs após infecção por *Nippostrongylus brasiliensis*

(WASTLING et al., 1998). Estudos posteriores mostraram que os camundongos com deficiência para esta protease eram mais susceptíveis a infecções por *Trichinella spiralis* (KNIGHT et al., 2000).

- Artrite reumatoide

Os mastócitos estão envolvidos na artrite reumatoide, uma doença inflamatória crônica das articulações (LEE et al., 2002). A contribuição da quimase nesta doença foi demonstrada através de um modelo de artrite induzida por imunização com colágeno tipo II em camundongos *knockout* para mMCP-4. Estes animais exibiram uma taxa menor de incidência da doença e sinais de danos teciduais menores em relação aos animais selvagens. Além disso, a ausência de mMCP-4 resultou em níveis menores de IgG anticolágeno II no plasma, sugerindo que esta protease possa contribuir com a fase inicial na artrite reumatoide (MAGNUSSON et al., 2009).

- Inflamação alérgica das vias aéreas

Estudos com modelos animais mostraram que a quimase mMCP-4 possui uma função protetora na alergia, inflamação das vias aéreas e durante a hiper-reatividade brônquica (WAERN et al., 2009). Evidências também sugerem que a quimase mMCP-4 pode limitar o espessamento da camada de células musculares lisas dos brônquios, o que acontece nas respostas em reações alérgicas das vias aéreas. Estes resultados indicam que, embora os mastócitos contribuam para a patologia da inflamação das vias aéreas, a quimase mMCP-4 pode neutralizar o impacto nocivo dos mastócitos. A função protetora da quimase nas respostas alérgicas das vias aéreas é demonstrada pela clínica, onde se observa que a quimase está relacionada com a preservação da função pulmonar em pacientes asmáticos (BALZAR et al., 2005). O mecanismo associado a quimase com a preservação da função pulmonar ainda é desconhecido. As pesquisas sugerem que a quimase possua a habilidade de ativar metaloproteinases, TGF- β e angiotensina II e inativar a

trombina, além de degradar componentes da matriz extracelular, como fibronectina e vimentina (LINDSTEDT et al., 2001; TCHOUGOUNOVA & PEJLER, 2001; MILLER & PEMBERTON, 2002).

- Fibrose

Estudos mostram uma correlação entre a presença da quimase e a fibrose, em modelos de diabetes experimental (JONES et al., 2004) e na fibrose hepática autoimune (SATOMURA et al., 2003). Inibidores de quimase podem reduzir a fibrose em modelos animais (TAKAI et al., 2003; TOMIMORI et al., 2003; SAKAGUCHI et al., 2004). Ainda se desconhece os mecanismos pelos quais a quimase contribui para fibrose. Existem indícios de uma atividade mitogênica da quimase sobre fibroblastos da artéria pulmonar bovina e fibroblastos da cápsula de Tenon de cães (PEMBERTON et al., 1997; MARUICHI et al., 2004). Por outro lado, a quimase pode liberar o TGF- β 1 que está ligado à matriz extracelular (TAIPALE et al., 1995) e ativar o TGF- β 1 latente da matriz extracelular (LINDSTEDT et al., 2001), o que pode explicar a contribuição da quimase na fibrose.

- Doenças Cardiovasculares

Existem evidências de que os mastócitos cardíacos estão envolvidos nas doenças coronarianas. Estes mastócitos participam no desenvolvimento da aterosclerose, inflamação coronária e isquemia cardíaca (PATELLA et al., 1995). Os mastócitos são observados na túnica adventícia das artérias coronárias e também estão acumulados na região das placas ateroscleróticas, o que pode estar relacionado com a deposição de lipídeos na parede dos vasos sanguíneos (KAARTINEN et al., 1994; CONSTANTINIDES, 1995; UEHARA et al., 2002). A quimase é a principal enzima conversora de angiotensina I, levando a produção do constritor coronariano angiotensina II (URATA et al., 1990; JENNE; TSCHOPP, 1991). Vários estudos com quimase

foram desenvolvidos com o objetivo de conhecer a sua exata função nas doenças cardiovasculares. O aneurisma aórtico abdominal (AAA) foi induzido em camundongos *knockout* para mMCP-4. Os resultados mostraram que estes animais apresentaram menor formação de AAA, quando comparados aos camundongos selvagens. Estes resultados foram similares aos observados com camundongos deficientes em mastócitos, indicando que mMCP-4 é o efector molecular principal na formação de AAA mediada por mastócitos. Estes estudos mostraram que a mMCP-4 contribui para a reação inflamatória observada no AAA induzindo apoptose das células vasculares, o crescimento de microvasos e da degradação de elastase (SUN, et al., 2009).

- Câncer

Os mastócitos se acumulam na periferia de tumores murinos e de humanos. (CONTI et al., 2007). A presença destes mastócitos está relacionada com progressão tumoral (TAKANAMI et al., 2000). Este acúmulo de mastócitos é associado a um prognóstico não promissor para muitos tipos de câncer. Por outro lado, em alguns cânceres de mama, os mastócitos são recrutados por fatores derivados dos tumores, como o SCF. A infiltração de mastócitos e a sua ativação pelo SCF resulta na liberação de mediadores inflamatórios, que atuam no remodelamento tecidual e na imunossupressão. A atuação dos mastócitos na tumorigênese pode ocorrer através da secreção de fatores pró-angiogênicos, como: heparanase, angiopoetina-1, TNF, FGF-2, VEGF, IL-18 e pelas proteases triptase e quimase, que auxiliam na degradação da matriz extracelular e, subsequentemente, na invasão tumoral (RIBATTI et al., 2001; MALTBY et al., 2009). Estudos do nosso laboratório mostraram um aumento na expressão de triptase e quimase durante a progressão tumoral. Os resultados mostram um envolvimento dos mastócitos na indução da angiogênese e progressão tumoral (SOUZA-JUNIOR et al., 2012).

MASTÓCITOS E ANGIOGÊNESE

A angiogênese é um processo dinâmico que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes. A angiogênese acompanha o indivíduo desde o período embrionário até a vida pós-natal. Este processo foi descrito pela primeira vez, em tumores por Ausprunk e Folkman em 1977 e denominado angiogênese tumoral. Os autores dividiram o processo de angiogênese em diferentes estágios de acordo com a progressão tumoral. Outros estudos mostraram que estes estágios são controlados diretamente por fatores estimuladores e inibidores da angiogênese (KERBEL, 2000).

A angiogênese é estimulada por fatores, tais como: VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), FGF (fator de crescimento dos fibroblastos), TGF- β (*transforming growth factor*), PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), interleucina-8 e angiopoietina-1. Por outro lado, fatores como: angiopoietina-2, interleucina-4, inibidores teciduais das metaloproteinases (TIM-1, -2 e -3), angiostatina, endostatina, trombospondina e fator plaquetário IV atuam como inibidores da angiogênese. Estes fatores são regulados através de um equilíbrio entre os mesmos, sua interação com os componentes da matriz extracelular, com moléculas de adesão e com forças mecânicas (FOLKMAN, 1995; BUSCHMANN et al., 1999; KERBEL, 2000; PAPETTI et al., 2002; JUSSILA & ALITALO, 2002).

Várias pesquisas têm relacionado, funcionalmente, os mastócitos ao processo de angiogênese. Estes estudos demonstraram que alguns mediadores como, heparina, histamina, TNF- α , bFGF, estimulam a proliferação de células endoteliais (SAWATSUBASHI et al., 2000; TALREJA et al., 2004). Starkey e colaboradores (1988) investigando o papel dos mastócitos em tumores observaram que camundongos deficientes de mastócitos possuem uma menor incidência

de resposta à indução de tumor e metástase. No entanto, quando estes animais tiveram a população de mastócitos reconstituída, a incidência de metástase aumentou e os resultados foram semelhantes aos animais controle (+/+). Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado ainda que determinados fatores angiogênicos como VEGF, PDGF e bFGF exercem um efeito de quimiotaxia em mastócitos (GRUBER et al., 1995). Estudos *in vivo* com membrana corioalantóide demonstraram que triptase e quimase estimularam a angiogênese e que esta resposta foi similar a obtida com VEGF, que é um indutor da angiogênese (RIBATTI et al., 2011).

A participação dos mastócitos na angiogênese parece estar relacionada com os componentes granulares que são liberados após a sua desgranulação (RIBATTI et al., 2004; CRIVELLATO et al., 2008; RIBATTI & CRIVELLATO, 2012). Porém, alguns componentes produzidos pelos mastócitos também são produzidos por outros tipos celulares como macrófagos, células endoteliais, fibroblastos entre outros. Este fato dificulta determinar o papel específico dos mastócitos em processos como a angiogênese. Portanto, para se correlacionar a participação dos mastócitos com um determinado processo, se faz necessário analisar o papel das substâncias específicas de mastócitos.

Resultados do nosso laboratório mostram que subtipos de triptase são capazes de induzir *in vitro* a formação de tubos pelas células endoteliais. Os resultados também mostraram que a expressão de quimase, triptase e carboxypeptidase A aumentam com a progressão tumoral, bem como a atividade de quimase e triptase (SOUZA-JUNIOR et al., 2012). Portanto, estes resultados mostram o envolvimento dos mastócitos no processo de formação de vasos sanguíneos e/ou na sua manutenção. Estudos detalhados sobre o papel das quimases na angiogênese foram dificultados pela falta de disponibilidade comercial destas proteases recombinantes. Por esta razão, o nosso

laboratório deu início, com o pós-doutorando Dr. Antônio Carlos Borges, a uma estratégia para a obtenção das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 (Figura 4).

Figura 4: Estratégia de clonagem das quimases mMCP-4 e mMCP-5. O esquema demonstra as seqüências das quimases que foram amplificadas a partir do cDNA de mastócitos derivados da medula óssea de camundongos e clonadas em vetor de estocagem pJet1.2/blunt. As seqüências de interesse foram subclonadas no vetor pPIC9 para a expressão em levedura, com o sítio susceptível a enteroquinase (EkCs) e o tag de histidina (6xHis).

As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 possibilitarão a investigação do seu papel não só na angiogênese, como em outros processos. Assim sendo, no presente trabalho foram produzidas quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 no sistema eucariótico de *Pichia pastoris*. Ainda, linhagens de células endoteliais SVEC4-10 e mastócitos P815 expressando EGFP foram produzidas. A produção destas células possibilita analisar com facilidade experimentos que envolvem o seu co-cultivo. O presente trabalho contribui com ferramentas importantes para os estudos das quimases e dos mastócitos na angiogênese.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Produzir as quimases recombinantes de camundongo mMCP-4 e mMCP-5.

Objetivos Específicos:

- Expressar as quimases recombinantes de camundongo mMCP-4 e mMCP-5 em *Pichia pastoris*;
- Purificar as quimases recombinantes de camundongo mMCP-4 e mMCP-5 por cromatografia de afinidade em resina de níquel;
- Ativar as quimases recombinantes de camundongo mMCP-4 e mMCP-5 através da digestão com a enzima enteroquinase.

MATERIAIS e MÉTODOS

MATERIAS E MÉTODOS

1. Produção, expressão e purificação das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 em *Pichia pastoris*

Os plasmídeos contendo as sequências para as quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 (EkCS-mMCP-4-His/PIC9 e EkCS-mMCP-5-His/PIC9) utilizados para a transformação de *Pichia pastoris* foram produzidos no nosso laboratório pelo pós-doutorando Dr. Antônio Carlos Borges.

1.1 Transformação de *P. pastoris*

Uma cultura da cepa GS115 ($\Delta his4$) (*Pichia* Expression Kit – Invitrogen, Life Technologies) em fase estacionária de crescimento foi diluída 1:100 em 100 mL de meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose, pH 6,5) e incubada sob agitação de 180 rpm, à temperatura de 30°C, até atingir a OD₆₀₀ = 1,3- 1,5. As células foram centrifugadas a 4000 g, por 5 minutos, a 4°C e ressuspendidas em água MilliQ estéril, a 4°C. Este procedimento foi repetido duas vezes. A seguir, as células foram lavadas com 20 mL de sorbitol 1M, a 4°C, centrifugadas por 5 minutos e ressuspendidas em 1 mL de sorbitol 1M, a 4°C. Alíquotas de 80 µL foram transformadas com 5-20 µg de plasmídeo vazio (pPIC9), utilizado como controle de transformação, ou com os plasmídeos recombinantes (EkCS-mMCP-4-His/PIC9 ou EkCS-mMCP-5-His/PIC9), os quais foram previamente linearizados pela enzima de restrição *Sal I*.

A transformação de *P. pastoris* foi realizada por eletroporação em aparelho Bio-Rad *E. coli* Pulser com resistência de 200 Ohms, capacitância de 25 µF e voltagem de 1,8 KV/cm, em cuvetas com fenda de 0,2 centímetros. Após o choque, as leveduras foram colocadas em 1 mL de sorbitol 1M, a 4°C. Deste volume, 200 µL de leveduras já concentradas por centrifugação a 5000 rpm, por

30 segundos, foram plaqueadas em meio MD (1,34% de YNB, 4×10^{-5} % de biotina e 2% dextrose). As placas foram incubadas a 30°C, por 20 horas. As leveduras contendo o plasmídeo integrado no genoma foram capazes de crescer em meio sem histidina. O DNA genômico das leveduras transformadas foi extraído e a integração dos plasmídeos no genoma de *P. pastoris* foi confirmada por PCR utilizando os *primers* 5' *AOX1 Primer* e 3' *AOX1 Primer*.

1.2 Extração de DNA Genômico

Para extrair o DNA genômico, as cepas transformadas (EkCS-mMCP-4-His/PIC9 e EkCS-mMCP-5-His/PIC9) foram crescidas em 10 mL de meio MD, a 30°C, até atingirem uma $OD_{600} = 5-10$. As células foram coletadas por centrifugação (1500 g, por 5 minutos, em temperatura ambiente) e lavadas em 10 mL de água MilliQ estéril por centrifugação, como no passo anterior. As células lavadas foram ressuspensas em 2 mL de tampão SCED (Sorbitol 1M, citrato de sódio 10mM, pH 7,5, EDTA 10 mM e DTT 10 mM) e, então, foi adicionado 0,2 mg de zimoliase. As células em tampão SCED e zimoliase foram incubadas a 37°C, por 50 minutos, com a finalidade da parede celular ser digerida. A seguir, foi adicionado 2 mL de SDS 1% e as leveduras foram colocadas no gelo por cinco minutos. 1,5 mL de acetato de potássio 5M, pH 8,9 foi adicionado e, a seguir, as células foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos, a 4°C. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante processado.

Dois volumes de etanol foram adicionados ao total de sobrenadante, e a solução foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. A solução foi centrifugada a 10000g, por 20 minutos, a 4°C. O *pellet* foi cuidadosamente ressuspensado em 700µL de tampão TE, pH 7,4 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo para extração do DNA genômico com fenol/clorofórmio (v/v), seguido da adição de clorofórmio/ álcool

isoamil (24/1). A fase aquosa foi dividida em dois tubos e foram adicionados um volume de acetato de amônio 7,5M, pH 7,5 e dois volumes de etanol em cada tubo. As soluções foram incubadas a -20°C, por 60 minutos.

A seguir, a solução foi centrifugada a 10000g, por 20 minutos, a 4°C e os *pellets* foram lavados uma vez com 1 mL de etanol a 70%. Os *pellets* foram secos ao ar livre e cada um deles foi reidratado com 50 µL de tampão TE, pH 7,5 e tratados com RNase por 15 minutos a 65°C. A extração fenol/clorofórmio e a precipitação do DNA genômico foram repetidas por mais uma vez. O DNA genômico foi ressuspensionado em tampão TE pH 7,5, dosado e armazenado a -20°C.

1.3 Amplificação por *Polimerase Chain Reaction*

Com a finalidade de confirmar a transformação de *P. pastoris* foi realizado um PCR para o gene AOX1. Para tal, foi feita uma reação com 5 a 10 ng de DNA, uma mistura de dNTPs 0,2 mM, 5 pmoles de cada *primer* (5' AOX1 e 3' AOX1) e 1,25 unidades de *Taq DNA Polimerase Platinum High Fidelity* (Life Technologies) ou *Taq DNA Polimerase* (Thermo Scientific). As condições básicas de amplificação incluíram um ciclo de 94°C, por 2 minutos, seguido por 29 ciclos correspondendo a desnaturação (94°C, 1 minuto), anelamento (55°C, 1 minuto) e extensão (72°C, 1 minuto), finalizando com um ciclo a 72°C, por 7 minutos, seguindo as características dos *primers*.

Para todas as amplificações as temperaturas ideais de anelamento foram determinadas, bem como, o menor número de ciclos necessários para a observação do produto de PCR. Estes procedimentos visaram minimizar os possíveis anelamentos inespecíficos e uma menor probabilidade de ocorrência de mutações pontuais que poderiam interferir com a expressão proteica.

1.4 Expressão das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

Uma colônia simples de cada cepa transformada com as sequências para a quimase 4 (EkCS-mMCP-4-His/PIC9) e outra com a sequência para a quimase 5 (EkCS-mMCP-5-His/PIC9) foram inoculadas em 5 mL de meio YPD a 30°C, 180 rpm por 18 horas. Após este período, 50 μ L de leveduras foram incubadas em meio k-BMGY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6, 1% de YNB, 4×10^{-5} % de biotina, 1% de glicerol; acrescido de 0,4M de acetato de potássio), a 30°C, 210 rpm até atingir uma OD_{600nm} de 2-6, onde as células atingem a fase logarítmica.

As leveduras foram centrifugadas a 1500g, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram ressuspensas para uma OD₆₀₀ de 1,0 em meio indutor s-BMMY (1% extrato de levedura, 2% de peptona, 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6, 1% de YNB, biotina, 1% de metanol; acrescido de 0,2M de sorbitol), a 30°C ou a 20°C, 210 rpm por 96 horas. A cada 24 horas, 0,5%, 1,5% ou 3% de metanol foi adicionado para a manutenção da expressão. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas nos tempos zero, 24, 48, 72 e 96 horas para a confirmação da indução da expressão em diferentes concentrações. As leveduras retiradas após 96 horas foram centrifugadas a 3000 g, por 10 minutos, e o sobrenadante foi processado ou armazenado a -20°C para posterior purificação. A indução da expressão foi confirmada por *Western Blot* (seção 1.5).

1.5 Eletroforese e *Western Blot*

Para confirmar a expressão das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, as alíquotas coletadas em vários tempos de expressão (zero, 24, 48, 72 e 96 horas) foram diluídas em tampão de amostra, com 5% de β -mercaptoetanol e fervidas por dez minutos. A eletroforese das proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida 10%, em condições redutoras e dissociantes a 120 volts.

Como marcador de migração eletroforética, foi utilizado *BenchMark Protein Ladder* ou *SeeBlue pre-stained marker* (Invitrogen, Life Technologies). Após a separação das proteínas através de SDS-PAGE, as bandas proteicas foram eletrotransferidas para a membrana de nitrocelulose (TOWBIN et al., 1979).

Para a eletrotransferência, as membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences) foram coradas com Ponceau Red (Sigma Aldrich) para verificar a eficiência da transferência e marcação do padrão. As membranas foram então lavadas em TBS-Tween (NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8 e 0,05% de Tween-20) e bloqueadas por uma hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,05% acrescido de 5% de leite em pó desnatado). As membranas foram lavadas três vezes de dez minutos com TBS-Tween 0,05%. A imunomarcação foi realizada com o anticorpo anti-His-HRP (Qiagen, Alameda, CA). Assim sendo, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-His-HRP (diluído 1:1500 em TBS-Tween 0,05%) durante 60 minutos, em temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes de dez minutos com TBS-Tween 0,05% e reveladas por quimiluminescência utilizando o sistema ECL – *Enhanced ChemiLuminescence* (GE Healthcare).

Para a confirmação da identidade das proteínas recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, foram utilizados os anticorpos anti-mMCP-4 e anti-mMCP-5 (diluídos 1:500 em TBS-Tween 0,05%). A imunomarcação foi realizada como descrito acima. Por fim, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-cabra (Jackson Immunoresearch), diluído 1:20000 em TBS-Tween 0,05%, por 30 minutos, em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas dez vezes de cinco minutos cada com TBS-Tween 0,05% e reveladas como descrito acima.

1.6 Purificação das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

- **Protocolo 1:**

A purificação das quimases recombinantes mMCP-4 e de mMCP-5, as quais são fusionadas com uma cauda de seis histidinas, foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de níquel. O sobrenadante armazenado de 96 horas, após a confirmação da expressão, foi dialisado em membrana de diálise (Pierce Chemical Company), em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, 10mM Na₂HPO₄ e 2mM KH₂PO₄, pH 7,4), concentrado em Amicon de 10 kDa (Merck Millipore) e incubado por uma hora sob agitação a 4°C com a resina de níquel (Probond – Invitrogen, Life Technologies), em coluna de 10 mL. Após este período, a resina foi lavada duas vezes com o tampão de ligação. Em seguida, frações de 1 mL das proteínas recombinantes foram eluídas com tampão de eluição (PBS, pH 7,4; imidazol 200mM). As frações eluídas foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% ou por *Western blot* pela marcação com o anticorpo anti-His (Qiagen, Alameda, CA).

- **Protocolo 2:**

A purificação das quimases recombinantes mMCP-4 e de mMCP-5 foi realizada novamente por cromatografia de afinidade em resina de níquel. O sobrenadante do meio após 96 horas de expressão foi dialisado em membrana de diálise, em PBS, como no protocolo anterior. Entretanto, a ligação à resina de níquel foi feita gota a gota em bomba peristáltica (GE Healthcare Life Sciences), em temperatura ambiente. Após todo o volume ter passado pela resina, esta foi lavada duas vezes com PBS. Por fim, alíquotas de 1 mL das proteínas recombinantes foram eluídas com tampão de eluição (PBS, pH 7,4; imidazol 200mM). As frações eluídas foram analisadas como no protocolo anterior.

• **Protocolo 3:**

Para testar se os tampões utilizados na diálise influenciariam na atividade catalítica das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, o sobrenadante do meio após 96 horas de expressão de mMCP-4 foi concentrado em Amicon 10 vezes, aliquotado e dialisado nos seguintes tampões:

- 1) Hepes 100 mM, NaCl 1M, Glicerol 10%, Heparina 0,01 mg/mL, Triton-X100 0,01% - pH 7,5;
- 2) Bicina 50mM – pH 8,2;
- 3) Mes 50mM – pH 5,8, Glicerol 20%;
- 4) Tris-HCl 100 mM – pH 8;
- 5) Tris-HCl 450 mM – pH 8;
- 6) Tris 50mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 150mM, Brij 0,05% - pH 7,5;
- 7) Mes 50 mM, NaCl 100 mM – pH 6,5.

O sobrenadante foi dialisado em cada tampão e incubado com a resina de níquel por uma hora, sob rotação, a 4°C. Após a incubação, a resina foi lavada com o tampão selecionado, incubada com a enzima enteroquinase *overnight*, a 4°C (seção 2) e lavada novamente. As proteínas recombinantes foram, então, eluídas com o mesmo tampão selecionado contendo 200mM de imidazol. As frações foram utilizadas na realização de ensaio de atividade de quimase (seção 4).

2. Ativação das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

2.1 Digestão com a Enzima Enteroquinase

- **Protocolo 1:**

A digestão das quimases recombinantes (mMCP-4 e mMCP-5) com a enzima enteroquinase (EK) tem como objetivo clivar o sítio susceptível a enteroquinase para deixar livre a extremidade amino-terminal, que possui a atividade catalítica. Para tal, 20 µg de cada proteína recombinante (mMCP-4 e mMCP-5) foram incubadas com diversas concentrações (0,2, 1, 2 e 4 unidades) de EK (Invitrogen, Life Technologies) diluídas em tampão de reação por 5 horas, a 22°C.

Após a reação, as proteínas recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram re-purificadas em resina de níquel. O produto de reação pela EK (30 µL) foi adicionado à resina de níquel, previamente equilibrada com PBS. As amostras foram ligadas à resina de níquel por 60 minutos, a temperatura ambiente sob rotação. Após a reação de ligação, as proteínas recombinantes ligadas à resina foram centrifugadas a 400g por 1 minuto, a 20°C. Em seguida, as resinas foram lavadas três vezes com PBS, por centrifugação (400g, um minuto, 20°C). As proteínas recombinantes foram eluídas em tampão (PBS, pH 7,4 e imidazol 200mM) em uma única fração de 30 µL.

- **Protocolo 2:**

As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram digeridas pela enzima EK *in situ*, ou seja, ainda ligadas à resina de níquel. Para tal, as quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 ligadas à resina de níquel foram digeridas pela enzima EK, em um volume suficiente para cobrir toda a resina no tubo *ependorf*, e incubadas sob rotação, a 4°C, *overnight*. Após a digestão, as quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram eluídas.

3. Predição da estrutura tridimensional das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

Para avaliar a influência das estruturas do sítio susceptível a enteroquinase e do *tag* de His na conformação das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, foi realizada a predição das estruturas através do webservice RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>). Esta ferramenta permite elucidar as estruturas de interesse através da identificação de sequências de aminoácidos homólogas a estruturas já definidas nos bancos de dados. A predição de estrutura foi realizada utilizando a sequência de aminoácidos das quimases (mMCP-4 ou mMCP-5), bem como a sequência de aminoácidos das quimases somadas ao sítio susceptível a enteroquinase e ao *tag* de His (EK/mMCP-4/His ou EK/mMCP-5/His) e, também, com a sequência das quimases e o *tag* de His (mMCP-4/His ou mMCP-5/His).

As sequências de aminoácidos submetidas ao webservice RaptorX seguem abaixo:

mMCP-4:

IIGGVESRPHSRPYMAHLEITTERGFTATCGGFLITRQFVLTAAHCSGREITVTLGAHDVS
KTESTQQKIKVEKQIVHPKYNFYSNLHDIMLLKLQKKAKETPSVNVIPRLPRPSDFIKPGKM
CRAAGWGRTGVTEPTSDILREVKLRLMDKEACKNYWHYDYNLQVCVGSPRKKRSAYK
GDSSGPLLCAAGVAHGIVSYGRGDAKPPAVFTRISSYVPWINRVIKGG

EK/mMCP-4/His

DDDDKIIIGGVESRPHSRPYMAHLEITTERGFTATCGGFLITRQFVLTAAHCSGREITVTLG
 AHDVSKTESTQQKIKVEKQIVHPKYNFYSNLHDIMLLKLQKKAKETPSVNVIPRPSDFI
 KPGKMCRAAGWGRTGVTEPTSDILREVKLRLMDKEACKNYWHYDYNLQVCVGSRRKK
 RSAYKGDSGGPLLCAAGVAHGIVSYGRGDAKPPAVFTRISSYVPWINRVIKGKGGGHHHH
 HH

mMCP-4/His

IIIGGVESRPHSRPYMAHLEITTERGFTATCGGFLITRQFVLTAAHCSGREITVTLGAHDVS
 KTESTQQKIKVEKQIVHPKYNFYSNLHDIMLLKLQKKAKETPSVNVIPRPSDFIKPGKM
 CRAAGWGRTGVTEPTSDILREVKLRLMDKEACKNYWHYDYNLQVCVGSRRKKRSAYK
 GDSGGPLLCAAGVAHGIVSYGRGDAKPPAVFTRISSYVPWINRVIKGKGGGHHHHHH

mMCP-5

IIIGTECIPHSRPYMAYLEIVTSENYLSACSGFLIRNFVLTAHCAGRSITVLLGAHNKTS
 KEDTWQKLEVEKQFLHPKYDENLVVHDIMLLKLKEKAKLTLGVGTLPLSANFNFIPPGR
 MCRAVGWGRTNVNEPASDTLQEVKMRLQEPQACKHFTSFRHNSQLCVGNPKKMQNVY
 KGDSGGPLLCAAGIAQGIASVHRNAKPPAVFTRISHYRPWINKILREN

EK/mMCP-5/His

DDDDKIIIGGTECIPHSRPYMAYLEIVTSENYLSACSGFLIRNFVLTAHCAGRSITVLLG
 AHNKTSKEDTWQKLEVEKQFLHPKYDENLVVHDIMLLKLKEKAKLTLGVGTLPLSANF
 NFIPPGRMCRAVGWGRNTNVNEPASDTLQEVKMRLQEPQACKHFTSFRHNSQLCVGNPK
 KMQNVYKGDSGGPLLCAQIAQGIASYVHRNAKPPAVFTRISHYRPWINKILRENGGGHH
 HHHH

mMCP-5/His

IIGGTECIPHSRPYMAYLEIVTSENYLSACSGFLIRNFVLTAHCAGRSITVLLGAHNKTS
 KEDTWQKLEVEKQFLHPKYDENLVVHDIMLLKLKEKAKLTLGVGTLPLSANFNFIPPGR
 MCRAVGWGRNTNVNEPASDTLQEVKMRLQEPQACKHFTSFRHNSQLCVGNPKKMQNVY
 KGDSGGPLLCAQIAQGIASYVHRNAKPPAVFTRISHYRPWINKILRENGGGHHHHHH

As glicinas sublinhadas (GGG) foram utilizadas como um “neck” entre a sequência de aminoácidos das proteínas recombinantes e a cauda de 6 resíduos de histidina.

4. Ensaio de atividade das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram avaliadas quanto a sua atividade através do ensaio de atividade de quimase com uso do *kit Chymase Activity Assay* (Sigma Aldrich), conforme recomendações do fabricante. A reação utiliza como substrato o N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide e a medida é realizada a 405nm.

5. Produção de linhagem de células endoteliais SVEC4-10 e mastócitos P815 expressando EGFP

As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 serão utilizadas em ensaios de angiogênese *in vitro*. Nestes ensaios serão utilizadas a linhagem de células endoteliais de camundongo SVEC4-10 e a linhagem de mastócitos de camundongo P815 (ATCC – American Type Culture Collection). Com o objetivo de diferenciar estas duas linhagens celulares durante o processo de formação de tubo na angiogênese *in vitro*, foram produzidas as linhagens celulares SVEC4-10 e P815 expressando EGFP. Primeiramente as células foram infectadas com o vetor lentiviral FugW que contém o gene para EGFP. As partículas virais foram empacotadas em células HEK293T (ATCC – American Type Culture Collection), co-transfectando os plasmídios pFugW, pVSV e pDelta8.9 (LOIS et al., 2002). O sobrenadante das células contendo partículas lentivirais foi aplicado sobre as células SVEC4-10 ou células P815. A infecção foi confirmada por microscopia de fluorescência e as células foram submetidas a *sorting* celular. Após o *sorting* celular, as células com maiores níveis de expressão foram mantidas em cultura ou congeladas para uso posterior.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Produção, expressão e purificação das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 em *Pichia pastoris*

1.1 Transformação de *P. pastoris*

As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram expressas no sistema eucariótico de *P. pastoris*, o qual permite modificações pós-traducionais, tais como glicosilação. Com a finalidade de gerar cepas estáveis de *P. pastoris* que expressassem as quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, o vetor de expressão pPIC9 contendo as sequências para as quimases recombinantes (EkCS-mMCP-4-His/PIC9 ou EkCS-mMCP-5-His/PIC9) foi linearizado através da digestão com a enzima de restrição *Sall*. Assim, uma cultura da cepa GS115 ($\Delta his4$) foi transformada com o vetor linearizado (EkCS-mMCP-4-His/PIC9 ou EkCS-mMCP-5-His/PIC9) por eletroporação. Por recombinação homóloga, o *locus* *his4* no cromossomo é substituído pelo gene intacto HIS4 do vetor (Figura 5). Após a recombinação, o fenótipo das cepas recombinantes foi testado para confirmar a sua capacidade de crescer em meio sólido MD, sem histidina (Figura 6).

Figura 5: O plasmídeo pPIC9 contendo as sequências para a quimase recombinante mMCP-4 ou quimase recombinante mMCP-5 funciona como um cassete de transformação. Após digestão com a enzima de restrição *SalI*, ocorre a linearização do gene *HIS4*, liberando as regiões 5' e 3', as quais, por recombinação homóloga, insere o vetor pPIC9 no locus contendo o gene *his4** mutado.

Figura 6: As cepas recombinantes podem crescer em meio sólido sem histidina. Nas placas se observa as que as cepas transformadas recombinantes para mMCP-4 e mMCP-5 crescem em meio sólido sem histidina. As colônias (setas) foram escolhidas aleatoriamente para posterior extração do DNA genômico.

1.2 Amplificação por *Polimerase Chain Reaction* (PCR)

Com a finalidade de confirmar a integração do DNA recombinante no genoma de *P. pastoris*, as cepas recombinantes, crescidas em meio sólido sem histidina, foram selecionadas aleatoriamente para extração do DNA genômico. A integração do DNA no genoma das cepas transformadas foi confirmada por PCR com *primers* para o gene AOX1. O PCR confirmou um clone recombinante positivo de *P. pastoris* para a quimase mMCP-4 (clone 1) e quatro clones recombinantes (clones 1, 3, 4 e 8) para a quimase mMCP-5 (Figura 7).

Figura 7: Colônias de *Pichia pastoris* positivas para as quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5. Colônias de *P. pastoris* isoladas após a transformação foram testadas por PCR com *primers* específicos para o gene AOX1. No gel de agarose se observa quatro clones positivos para a quimase mMCP-5: raias 1, 3, 4 e 8; e apenas um clone positivo para a quimase mMCP-4: raia 1. Gel representativo de um experimento.

1.3 Expressão das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

O clone 1 da cepa recombinante para mMCP-4 e o clone 1 da cepa recombinante para mMCP-5 foram induzidos por metanol (0,5%, 1,5% e 3%) em diferentes tempos (0, 24, 48, 72 e 96 horas) a 30°C e os sobrenadantes foram analisados por *Western blot* com o anticorpo anti-His. Não foi observada nenhuma banda com as concentrações de metanol e nos tempos de indução utilizados (dados não mostrados).

Com base nos resultados negativos obtidos anteriormente, nos próximos experimentos a temperatura de indução da expressão das proteínas recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foi diminuída de 30°C para 20°C. Após esta modificação, uma banda de aproximadamente 35 kDa foi identificada após 24 horas de indução, para a expressão da quimase recombinante mMCP-4. Além disso, as bandas são mais intensas com 48 e 72 horas quando a indução da expressão para a quimase recombinante mMCP-4 foi realizada com 1,5% de metanol no meio indutor (Figura 8B). Nesta mesma concentração de metanol foram observadas bandas de aproximadamente 37 kDa para a

expressão da quimase recombinante mMCP-5 nos tempos de 48, 72 e 96 horas (Figura 9B). O clone 3 da cepa recombinante para mMCP-5 também foi testado e exibiu o mesmo perfil de expressão que o clone 1 (dados não mostrados). Após a confirmação da expressão das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 através de *Western blot* com o anticorpo anti-His foi realizado a purificação destas quimases por cromatografia de afinidade em resina de níquel.

Figura 8: Expressão da quimase recombinante mMCP-4. A indução da expressão da quimase recombinante mMCP-4 com 1,5% de metanol apresentou bandas mais intensas após 48 e 72 horas. O sobrenadante foi obtido do cultivo do clone 1 cultivado em meio s-BMMY. Indução: metanol a 0,5, 1,5 e 3% por 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Gel de poliacrilamida SDS 10%. *Western blot* com anticorpo anti-His (1:1500). Gel representativo de dois experimentos.

Figura 9: Expressão da quimase recombinante mMCP-5. A indução da expressão da quimase recombinante mMCP-5 com 1,5% de metanol apresentou bandas após 24, 48, 72 e 96 horas. O sobrenadante foi obtido do cultivo do clone 1 cultivado em meio s-BMMY. Indução: metanol a 0,5, 1,5 e 3% por 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Gel de poliacrilamida SDS 10%. *Western blot* com anticorpo anti-His (1:1500). Gel representativo de dois experimentos.

1.4 Purificação das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

Os sobrenadantes dos meios de indução s-BMMY para as recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram dialisados em PBS, concentrados em Amicon e incubados com resina de níquel por 1 hora, a 4°C, sob rotação. Após a purificação por cromatografia de afinidade com a resina de níquel, as proteínas recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 não foram recuperadas. (Protocolo 1, M&M). A partir deste experimento algumas mudanças metodológicas foram realizadas. Após diálise em PBS, o sobrenadante de expressão foi incubado lentamente, gota a gota, à resina de níquel com o auxílio de uma bomba peristáltica e a temperatura ambiente. Para a lavagem da resina a solução foi adicionada a coluna cuidadosamente, enquanto, o tampão de eluição foi colocado com

mais vigor. Durante a eluição foram coletadas frações de 1mL (Figuras 10 e 11). Com este procedimento foi obtido 1 mg de cada quimase recombinante purificada (Protocolo 2, M&M).

Purificação da quimase recombinante mMCP-4

Figura 10: Purificação da quimase recombinante mMCP-4. Durante a eluição foram coletadas 10 frações de 1 mL. A proteína recombinante mMCP-4 é eluída nas primeiras 5 frações. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade com coluna de níquel. Gel de poliacrilamida SDS 10%. Anticorpo anti-His (1:1500). Gel representativo de três experimentos.

Figura 11: Purificação da quimase recombinante mMCP-5. Durante a eluição foram coletadas 10 frações de 1 mL. A proteína recombinante mMCP-5 é eluída nas primeiras 6 frações. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade com coluna de níquel. Gel de poliacrilamida SDS 10%. Anticorpo anti-His (1:1500). Gel representativo de três experimentos.

2. Predição da estrutura tridimensional das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

A predição das estruturas através do webservice RaptorX teve como objetivo avaliar a influência das estruturas do sítio susceptível a enteroquinase e do *tag* de His na conformação das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5. Através das análises das sequências de aminoácidos, as estruturas das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram elucidadas. Os resultados da predição das sequências de EK/mMCP-4/His e EK/mMCP-5/His sugerem que o *tag* de His (localizado na extremidade carboxi-terminal das proteínas recombinantes) e o sítio susceptível a enteroquinase (localizado na extremidade amino-terminal das proteínas recombinantes) não alteram a conformação geral das proteínas recombinantes. Estas predições

apresentam a conformação geral das estruturas que obtivemos para as quimases mMCP-4 e mMCP-5 nativas, o que é semelhante ao descrito por Sali et al., (1992). Porém, o sítio susceptível a enteroquinase está localizado no centro do sítio ativo das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, o que pode interferir na atividade enzimática destas quimases. A predição das sequências mMCP-4/His e mMCP-5/His mostram que o *tag* de His se localiza na extremidade oposta do sítio catalítico das enzimas e não altera a conformação estrutural das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5. Portanto, o *tag* de His não influencia na atividade enzimática destas quimases recombinantes.

Figura 12: Predição da estrutura conformacional das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5. As predições foram feitas pelo webservice RaptorX, através da análise das sequências dos aminoácidos. Nota-se que o *tag* de His, localizado na extremidade carboxi-terminal (asteriscos) e o sítio susceptível a enteroquinase (setas) não alteram a conformação geral das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5. O sítio susceptível a enteroquinase está localizado no centro do sítio ativo das quimases.

3. Ensaio de atividade das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 obtidas pela purificação em coluna de níquel foram submetidas a digestão por enteroquinase para retirar o sítio suscetível a enteroquinase, que estava bloqueando o sítio catalítico das proteases. Neste ensaio foi utilizado PBS, pH 7,4 nas lavagens da coluna, no tampão de eluição e nas lavagens da coluna de níquel durante a re-purificação, após a reação da enteroquinase. No entanto, as quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 continuaram inativas após a reação com enteroquinase (Tabela 2). Com base nestes resultados negativos, realizamos algumas mudanças no protocolo experimental. Inicialmente, concentramos em 10x o sobrenadante do meio de indução para mMCP-4. Também utilizamos sete diferentes tampões (Protocolo 3, M&M) durante a purificação, as lavagens antes e após a digestão com a enzima enteroquinase. Ainda, o passo da digestão foi simultâneo com a purificação em coluna de níquel. Isto foi possível devido ao uso de amostras reduzidas de apenas 1,5 mL meio/tampão. Neste experimento foi testada somente a quimase recombinante mMCP-4 e a atividade foi avaliada imediatamente após o ensaio e também com um intervalo de 20 horas. A atividade da mMCP-4 foi melhor com o tampão Tris-HCl 450mM, pH 8 (Figura 15). A purificação das amostras em diferentes tampões resultou em apenas 0,6 µg da quimase recombinante mMCP-4 por tampão (Tabela 2). O baixo rendimento já era esperado, uma vez que o volume inicial de sobrenadante do meio de expressão era de apenas 100 mL (Protocolo3, M&M).

Tabela 2: Comparação entre os tampões usados na purificação e ativação das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5.

Tampão	Concentração do Meio de Expressão	Proteína Purificada	Atividade Enzimática
PBS	1x	0,0	-
PBS	1x	1 mg	Nula
7 diferentes tampões	10x	0,6 µg	Variável
Tris-HCl 450 mM	1x	8 µg	-
Tris-HCl 450 mM e 100 mM	1x	30 µg	-

Figura 15: Ensaio de atividade da quimase recombinante mMCP-4. Atividade da quimase recombinante mMCP-4 após diálise e purificação em diferentes tampões. Colunas: 1, quimase recombinante humana (controle); 2: Hepes 100 mM, NaCl 1M, glicerol 10%, heparina 0,01 mg/mL, Triton X-100 0,01%, pH 7,5; 3: Bicina 50mM, pH 8,2; 4: Mes 50mM, pH 8, glicerol 20%; 5: Tris-HCl 100 mM, pH 8; 6: Tris-HCl 450 mM, pH 8, 7: Tris 50mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 150mM, Brij 0,05%, pH 7,5; 8: Mes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5. Absorbância medida imediatamente e 20 horas após o ensaio de ativação, a 405 nm. Todos os valores de absorbância foram normalizados em relação à quimase recombinante humana (controle) no tempo 0h.

Baseado nos resultados da Figura 15 que mostram que o tampão pode influenciar na atividade enzimática da quimase mMCP-4, novas expressões para a quimase mMCP-4 e para a quimase mMCP-5 foram realizadas de acordo com o Protocolo 2, mas utilizando o tampão Tris-HCl 450 mM, pH 8. Ao contrário do esperado, o rendimento desta purificação foi muito baixo,

com cerca de 8 μ g para cada proteína recombinante. A análise do *flow through* através de *Western blot* com o anticorpo anti-His (Figura 16) detectou uma quantidade considerável de proteína que não havia se ligado à resina de níquel. Porém, a eluição com o tampão Tris-HCl 450 mM com imidazol pH 8 foi eficiente, como mostra a figura 16. A interferência na ligação da proteína à coluna pode ser atribuída a alta molaridade do tampão utilizado (450mM) que poderia ter interferido na ligação das proteínas recombinantes à resina, embora o fabricante da resina afirme que esta molaridade não interfere na ligação da proteína recombinante à resina. Para evitar a perda de proteínas no *flow through*, pela falta de ligação com a resina, este foi dialisado em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8, antes de ser aplicado a resina. O rendimento desta purificação foi de cerca de 30 μ g para cada quimase recombinante. Esta quantidade de proteína é maior que a do ensaio anterior, embora o rendimento ainda seja baixo (Tabela 2).

Figura 36: Purificação da quimase recombinante mMCP-4. Análise do dialisado (Dial) e do *flow through* (FT). Após a primeira lavagem (L1) ainda se observa uma banda de 35 kDa, que não se identifica após a segunda Lavagem (L2). Banda de 35 kDa (RA) ligada a resina. Resina após a eluição (RD). Gel de poliacrilamida SDS 10%. *Western blot* com anticorpo anti-His (1:1500).

4. Caracterização das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5

Após a purificação, as proteínas recombinantes foram analisadas por *Western blot* com os anticorpos anti-mMCP-4 e anti-mMCP-5. Os resultados mostraram uma banda de cerca de 35 kDa para a quimase recombinante mMCP-4 e uma banda de cerca de 37 kDa para a quimase recombinante mMCP-5 (Figura 17).

Figura 17: Detecção das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5. Gel de poliacrilamida SDS 10%. *Western blot* com anticorpos anti-mMCP-4 e anti-mMCP-5 (1:500).

5. Linhagem de células endoteliais SVEC4-10 e mastócitos P815 expressando EGFP

Estudos anteriores de nosso laboratório mostrando a ação de triptases na angiogênese (SOUZA-JUNIOR et al., 2012) mostraram a necessidade de se co-cultivar células endoteliais SVEC4-10 com mastócitos da linhagem P815 durante os ensaios de angiogênese *in vitro*. Dando continuidade a estes estudos, o papel das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 na angiogênese também será analisado. A obtenção de linhagens de células endoteliais SVEC4-10 e

mastócitos P815 expressando EGFP, facilitaria o seu reconhecimento durante os ensaios de co-cultivo. As células endoteliais SVEC4-10 foram transduzidas com partículas lentivirais que carregavam a sequência de EGFP e, assim, passaram a expressar a proteína verde fluorescente. A população de células SVEC4-10^{EGFP} foi enriquecida através de *sorting* celular em citômetro de fluxo. O mesmo procedimento de transdução e *sorting* foi realizado com a linhagem de mastócitos P815. Os resultados foram confirmados por microscopia de fluorescência que a produção destas células facilita as análises de resultados experimentais que envolvem o co-cultivo (Figura 18).

Figura 18: Células endoteliais SVEC4-10 e mastócitos P815 expressando EGFP após transdução lentiviral e *sorting*. Microscopia de Contraste de Interferência (DIC) e de fluorescência.

Figura 19: Células SVEC4-10 EGFP estão espalhadas no substrato (verde) e mastócitos P815 (setas) são arredondados e se localizam ao redor dos tubos (cabeça de seta) e loop (asterisco). Microscopia de Contraste de Interferência (DIC) e de fluorescência.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No presente trabalho foram produzidas e caracterizadas as quimases recombinantes de camundongos específicas de mastócitos, mMCP-4 e mMCP-5. Estas proteases foram produzidas no sistema eucariótico de *Pichia pastoris*. A expressão heteróloga de proteínas é uma técnica amplamente utilizada para estudos funcionais de proteínas. Entretanto, existe uma dificuldade em expressar proteínas recombinantes em um microambiente diferente do natural (endógeno). As ORFs referentes a essas proteínas podem apresentar códons raramente utilizados no organismo hospedeiro ou conter elementos regulatórios no interior da sua sequência codificadora que limitam a expressão (GUSTAFSSON et al., 2004).

O fungo *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica, ou seja, é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono. Assim, *P. pastoris* se tornou um hospedeiro promissor para a produção de proteínas heterólogas (CREGG et al., 1985; ROMANOS et al., 1995). Este fungo possui um forte promotor do gene álcool oxidase (AOX1), altamente regulado, que pode ser utilizado para direcionar uma alta expressão de proteínas heterólogas; o rendimento das proteínas recombinantes tende a ser maior em comparação às proteínas produzidas em *Saccharomyces cerevisiae* (ROMANOS et al., 1995). Este é um método simples e barato e, embora o mecanismo de secreção de *P. pastoris* seja altamente desenvolvido, o baixo nível de proteínas nativas secretadas de *P. pastoris* simplifica a purificação das proteínas recombinantes secretadas (THORPE et al., 1999),

Assim sendo, as sequências para as quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram clonadas no vetor de expressão pPIC9 e foram ativadas pelo promotor do gene AOX1. Em *P. pastoris*, o promotor do gene AOX1 é o promotor mais utilizado para controlar a expressão das proteínas heterólogas. A enzima álcool oxidase representa até 30% do total de proteína solúvel nas

leveduras induzidas por metanol, enquanto que nas leveduras cultivadas com outras fontes de carbono, esta enzima é praticamente inexistente (CREGG et al., 1993). O promotor regula a expressão através de um mecanismo de repressão/desrepressão, ou seja, a presença de fontes de carbono não oriundas do metanol, como o glicerol, irá reprimir fortemente a expressão da enzima álcool oxidase, enquanto que a ausência desta fonte de carbono, associada a presença de baixos níveis de metanol, irá rapidamente induzir a expressão da enzima álcool oxidase. Este mecanismo de regulação permite a utilização simultânea do metanol e outras fontes de carbono, desde que estas fontes de carbono alternativas sejam utilizadas em quantidades limitadas (EGLI et al., 1986). Além disso, sabe-se que o sorbitol é uma fonte de carbono menos repressora que o glicerol (SREEKRISHNA et al., 1997). Baseado nestes conhecimentos, as cepas transformadas para as quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 cresceram em meio BMMY, acrescido de sorbitol. Nossos resultados mostraram que estas cepas recombinantes tiveram uma alta taxa de crescimento, resultando em uma biomassa considerável. Portanto, a estratégia escolhida para o crescimento das cepas recombinantes para as quimases mMCP-4 e mMCP-5 foi eficiente como também foi demonstrado em outros estudos (SREEKRISHNA et al., 1997; THORPE et al., 1999; INAN; MEAGHER, 2001; NIU et al., 2013).

A expressão das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foi induzida por metanol em várias concentrações e em diferentes tempos. Nossos dados mostraram que metanol a 1,5% resultou em uma melhor indução da expressão tanto para a quimase mMCP-4, quanto para a quimase mMCP-5. Esta concentração de metanol é a maior do que a sugerida pelo fabricante do kit de expressão. Entretanto, nossos achados estão de acordo com resultados de estudo anterior que mostrou que quanto maior a concentração de metanol utilizada na indução da expressão, maior o rendimento de proteínas heterólogas. (KHATRI & HOFFMANN, 2006).

As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram expressas, inicialmente, a 30°C. A análise dos sobrenadantes dos meios de expressão revelou ausência de expressão das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, embora 30°C seja a temperatura ótima de crescimento para *P. pastoris* (GASSER et al., 2007). Com objetivo de obter as quimases recombinantes, a temperatura de expressão foi diminuída para 20°C, o que promoveu a expressão das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5. Nossos resultados estão de acordo com estudos que mostraram que o crescimento de *P. pastoris* a 23°C aumentou em 3 vezes o teor de proteína produzida, comparado com 30°C (LI et al., 2001). Outro estudo mostrou que o uso de baixas temperaturas durante a fase de indução diminui a atividade proteolítica e a lise celular (JAHIC et al., 2003).

As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 foram secretadas para o meio de expressão s-BMMY, assim como outras proteínas expressas em *P. pastoris* (SU et al., 2011; XIA et al., 2012; ALIAS et al., 2014). Este resultado indica a eficiência do sinal de secreção presente no vetor comercial de expressão em levedura pPIC9.

A estratégia elaborada pelo pós-doutorando Dr. Antônio Carlos Borges consistiu em produzir as quimases recombinantes com dois elementos importantes: um *tag* de His que possibilitasse a identificação das proteínas recombinantes e sua purificação em resina de níquel; e um sítio susceptível a enteroquinase, que possibilitaria a retirada do sinal de secreção das proteínas recombinantes mMCP-4 e mMCP-5. A sequência que codifica este sinal de secreção já estava inserida no vetor de expressão em levedura pPIC9. Entretanto, este sinal de secreção que possibilita a secreção das proteínas recombinantes no sobrenadante de expressão é clivado durante a via secretora destas proteínas (ALBERTS et al., 2007; DELIC et al., 2013), não havendo necessidade, então, da adição de um sítio susceptível a enteroquinase às proteínas recombinantes mMCP-4 e

mMCP-5. As análises de predição realizadas deste estudo mostram que o *tag* de His está localizado nas extremidades carboxi-terminal de ambas as proteínas recombinantes e não altera a estrutura conformacional destas proteínas. Entretanto, o sítio susceptível a enteroquinase, localizado nas extremidades amino-terminal das proteínas recombinantes, se encontra no centro ativo das enzimas recombinantes, alterando a conformação do sítio catalítico, o qual foi removido pela enteroquinase. A predição das estruturas conformacionais das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 corroboram com os resultados de SALI et al., (1993).

Os sítios susceptíveis a enteroquinase são, geralmente, adicionados às proteínas recombinantes antes da adição de um *tag*, como o de His. Na produção das quimases recombinantes rMCP-1 e mMCP-4, Andersson et al., (2008) clonaram a sequência que codifica o sítio susceptível a enteroquinase e a sequência que codifica as seis histidinas (*tag* de His) *in frame* com as sequências que codificam as quimases ativas rMCP-1 e mMCP-4. Assim, após a purificação, as proteínas recombinantes foram digeridas pela enzima enteroquinase e houve a liberação do sítio susceptível a enteroquinase e também do *tag* de His. Isto resulta na necessidade de uma segunda purificação, entretanto, esta purificação não pode ser realizada pelo *tag* de His em coluna de níquel.

Embora os *tags* utilizados para identificação e purificação das proteínas recombinantes sejam considerados usuais e inofensivos, estes *tags* podem influenciar na atividade e função destas proteínas recombinantes (LEDENT et al., 1997; PERRON-SAVARD et al., 2005; QUAGLIA et al., 2012). Por este motivo, os *tags* geralmente são retirados após a purificação das proteínas recombinantes e, para tal, diversas estratégias podem ser utilizadas, como a inserção de um sítio susceptível a enteroquinase, como descrito acima. No caso das proteínas recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, o *tag* de His está localizado na extremidade carboxi-terminal, na extremidade oposta ao sítio susceptível a enteroquinase, portanto, não pôde ser retirado. No nosso caso, as quimases

recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, por possuírem o *tag* de His, puderam ser repurificadas com a resina de níquel. Em proteínas em que o *tag* de His foi retirado, as proteínas recombinantes devem ser repurificadas em uma coluna de heparina (ANDERSSON; PEMBERTON; et al., 2008), o que resulta em gastos adicionais no processo de purificação.

Após a purificação das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 com PBS, pH 7,4, foi obtido 1 mg de cada uma dessas quimases. Porém estas quimases não estavam ativas. Quando a purificação foi realizada com diferentes tampões utilizados na purificação de outras serino-proteases ou proteínas produzidas em *P. pastoris* (CHAN et al., 1999; PARAMASIVAM et al., 2002; DESCAMPS et al., 2003; LOCKHART et al., 2005; GUO & MA, 2008) o rendimento caiu, no mínimo, 10 vezes. Porém, com estes tampões a quimase recombinante mMCP-4 apresentou atividade enzimática. Este fato pode ser explicado pelas diferentes concentrações de sal e pelos diferentes pHs dos tampões (UGWU & APTE, 2004).

As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 purificadas foram reconhecidas por anticorpos anti-mMCP-4 e anti-mMCP-5, o que confirmou a sua identidade. Estudos anteriores mostraram uma relação entre quimases específicas de mastócitos e a angiogênese (SOUZA-JUNIOR et al., 2012). Portanto, as quimases recombinantes obtidas com este trabalho irão auxiliar na investigação do papel da mMCP-4 e mMCP-5 na angiogênese.

Durante esta pesquisa também foram produzidas linhagens celulares estáveis de células endoteliais SVEC4-10 e mastócitos P815 expressando EGFP. A identificação destes tipos celulares pode ser facilitada em ensaios de co-cultivo, na angiogênese *in vitro*.

A produção das quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5, bem como, a obtenção das linhagens de células endoteliais SVEC4-10 e de mastócitos P815 expressando EGFP são ferramentas decisivas no entendimento do papel de mastócitos na angiogênese.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- O organismo eucariótico *P. pastoris* é eficiente para a expressão quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5;
- As quimases recombinantes mMCP-4 e mMCP-5 poderão ser utilizadas em ensaios funcionais que investigam as suas ações em diferentes processos;
- As linhagens celulares estáveis de células endoteliais SVEC4-10 e mastócitos P815 expressando EGFP produzidas neste trabalho permitem a identificação destes tipos celulares em ensaios de co-cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRINK, M.; GRUJIC, M.; PEJLER, G. Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40897–905, 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition, 2007.

ALIAS, N.; AHMAD MAZIAN, M.; SALLEH, A. B.; BASRI, M.; RAHMAN, R. N. Z. R. A. Molecular Cloning and Optimization for High Level Expression of Cold-Adapted Serine Protease from Antarctic Yeast *Glaciozyma antarctica* PI12. **Enzyme research**, v. 2014, p. 197938, 2014.

ANDERSSON, M. K.; ENOKSSON, M.; GALLWITZ, M.; HELLMAN, L. The extended substrate specificity of the human mast cell chymase reveals a serine protease with well-defined substrate recognition profile. **International immunology**, v. 21, n. 1, p. 95–104, 2009.

ANDERSSON, M. K.; KARLSON, U.; HELLMAN, L. The extended cleavage specificity of the rodent beta-chymases rMCP-1 and mMCP-4 reveal major functional similarities to the human mast cell chymase. **Molecular immunology**, v. 45, n. 3, p. 766–75, 2008.

ANDERSSON, M. K.; PEMBERTON, A. D.; MILLER, H. R. P.; HELLMAN, L. Extended cleavage specificity of mMCP-1, the major mucosal mast cell protease in mouse-high specificity indicates high substrate selectivity. **Molecular immunology**, v. 45, n. 9, p. 2548–58, 2008.

AUSPRUNK, D.H. & FOLKMAN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvascular Research**, v. 14, n. 9, p. 53-65, 1977.

BALZAR, S.; CHU, H. W.; STRAND, M.; WENZEL, S. Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 5, p. 431–9, 2005.

BIENENSTOCK, J.; BEFUS, A.; PEARCE, F. Mast cell heterogeneity: derivation and function, with emphasis on the intestine. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 70, n. 6, p. 407–12, 1982.

BUSCHMANN, I.; SCHAPER, W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. **News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 14, n. June, p. 121–125, 1999.

CAUGHEY, G. H.; ZERWECK, E. H.; VANDERSLICE, P. Structure, chromosomal assignment, and deduced amino acid sequence of a human gene for mast cell chymase. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 20, p. 12956–63, 1991.

CAUGHEY, G.; SCHAUMBERG, T. The human mast cell chymase gene (CMA1): mapping to the cathepsin G/granzyme gene cluster and lineage-restricted expression. **Genomics**, v. 15, p. 614–620, 1993.

CHAN, H.; ELROD, K. C.; NUMEROF, R. P.; SIDERIS, S.; CLARK, J. M. Expression and characterization of recombinant mast cell tryptase. **Protein expression and purification**, v. 15, n. 3, p. 251–7, 1999.

CHANDRASEKHARAN, U. M.; SANKER, S.; GLYNIAS, M. J.; KARNIK, S. S.; HUSAIN, A. Angiotensin II-forming activity in a reconstructed ancestral chymase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5248, p. 502–5, 1996.

CONSTANTINIDES. Infiltrates of Activated Mast Cells at the Site of Coronary Atheromatous Erosion or Rupture in Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 92, n. 5, p. 1084–1088, 1995.

CONTI, P.; CASTELLANI, M. L.; KEMPURAJ, D.; et al. Role of mast cells in tumor growth. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 37, n. 4, p. 315–22, 2007.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. Pichia pastoris as a host system for transformations. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 12, p. 3376–85, 1985.

CRIVELLATO, E.; NICO, B.; RIBATTI, D. Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. **Cancer letters**, v. 269, n. 1, p. 1–6, 2008.

DELIC, M.; VALLI, M.; GRAF, A. B.; et al. The secretory pathway: exploring yeast diversity. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 6, p. 872–914, 2013.

DA SILVA, E. Z. M. DA; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. **Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell**. 2014.

DESCAMPS, F.; BROUTA, F.; VERMOUT, S.; et al. Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5-kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 29–34, 2003.

DVORAK, A.M.; Human mast cells. **Advances in anatomy, embryology, and cell biology**, v. 114, p. 1-107, 1989.

EGLI, T.; BOSSHARD, C.; HAMER, G. Simultaneous utilization of methanol-glucose mixtures by *Hansenula polymorpha* in chemostat: Influence of dilution rate and mixture composition on utilization pattern. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 11, p. 1735-41, 1986.

- ENERBÄCK, L.; KOLSET, S. O.; KUSCHE, M.; HJERPE, A.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans in rat mucosal mast cells. **The Biochemical journal**, v. 227, n. 2, p. 661–8, 1985.
- ENERBÄCK, L.; PIPKORN, U.; GRANERUS, G. Intraepithelial migration of nasal mucosal mast cells in hay fever. **International archives of allergy and applied immunology**, v. 80, n.1, p. 44–51, 1986.
- EHRlich, P. Beiträge zur Theorie und Praxis der Histologischen Färbung. Thesis, Leipzig University, 1878.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 1, n. 2, p. 120–2, 1995.
- GALLI, S. New concepts about the mast cell. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 328, n. 4, p. 257–65, 1993.
- GALLI, S. J.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, M. A.; et al. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 749–86, 2005.
- GALLI, S. J.; MAURER, M.; LANTZ, C. S. Mast cells as sentinels of innate immunity. **Current opinion in immunology**, v. 11, n. 1, p. 53–9, 1999.
- GALLWITZ, M.; HELLMAN, L. Rapid lineage-specific diversification of the mast cell chymase locus during mammalian evolution. **Immunogenetics**, v. 58, n. 8, p. 641–54, 2006.
- GALLWITZ, M.; REIMER, J. M.; HELLMAN, L. Expansion of the mast cell chymase locus over the past 200 million years of mammalian evolution. **Immunogenetics**, v. 58, n. 8, p. 655–69, 2006.
- GASSER, B.; MAURER, M.; RAUTIO, J.; et al. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. **BMC genomics**, v. 8, p. 179, 2007.
- GRUBER, B. L.; MARCHESE, M. J.; KEW, R. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. **Blood**, v. 86, n. 7, p. 2488–93, 1995.
- GUO, J.-P.; MA, Y. High-level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 58, n. 2, p. 301–8, 2008.
- GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 346–53, 2004.

HEUTINCK, K. M.; BERGE, I. J. M. TEN; HACK, C. E.; HAMANN, J.; ROWSHANI, A. T. Serine proteases of the human immune system in health and disease. **Molecular immunology**, v. 47, n. 11-12, p. 1943–55, 2010.

HUANG, C.; MORALES, G.; VAGI, A.; et al. Formation of Enzymatically Active, Homotypic, and Heterotypic Tetramers of Mouse Mast Cell Trypsases: DEPENDENCE ON A CONSERVED Trp-RICH DOMAIN ON THE SURFACE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 351–358, 2000.

INAN, M.; MEAGHER, M. M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 585–9, 2001.

IRANI, A.A.; SCHECHTER, N.M.; CRAIG, S.S; DEBLOIS, G.; SCHWARTZ, L.B. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 12, p. 4464-8, 1986.

IRANI, A.M.; CRAIG, S.S.; DEBLOIS, G.; ELSON, C.O.; SCHECHTER, N.M.; SCHWARTZ, L.B. Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. **Journal of Immunology**, v. 138, n. 12, p. 4381-6, 1987.

JAHIC, M.; GUSTAVSSON, M.; JANSEN, A.-K.; MARTINELLE, M.; ENFORS, S.-O. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 45–53, 2003.

JAMUR, M. C.; GRODZKI, A. C. G.; MORENO, A. N.; et al. Identification and Isolation of Rat Bone Marrow-derived Mast Cells Using the Mast Cell-specific Monoclonal Antibody AA4. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 219–228, 2001.

JENNE, D.; TSCHOPP, J. Angiotensin II-forming heart chymase is a mast-cell-specific enzyme. **Biochemical Journal**, v. 276, p. 567–568, 1991.

JONES, S. E.; GILBERT, R. E.; KELLY, D. J. Tranilast reduces mesenteric vascular collagen deposition and chymase-positive mast cells in experimental diabetes. **Journal of diabetes and its complications**, v. 18, n. 5, p. 309–15, 2004.

JORPES, B. Y. E. CCXIII . THE CHEMISTRY OF HEPARIN . , p. 38–41, 1935.

JUSSILA, L.; ALITALO, K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. **Physiological reviews**, v. 82, n. 3, p. 673–700, 2002.

KAARTINEN, M.; PENTTILA, A.; KOVANEN, P. T. Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. **Circulation**, v. 90, n. 4, p. 1669–1678, 1994.

KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 505–15, 2000.

KHATRI, N. K.; HOFFMANN, F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 93, n. 5, p. 871–9, 2006.

KNIGHT, P. A; WRIGHT, S. H.; LAWRENCE, C. E.; PATERSON, Y. Y.; MILLER, H. R. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 12, p. 1849–56, 2000.

KRISHNASWAMY, G.; AJITAWI, O.; CHI, D.S. The human mast cell: an overview. **Methods in molecular biology**, v. 315, p. 13–34, 2006.

KUNORI, Y.; KOIZUMI, M.; MASEGI, T.; et al. Rodent α -chymases are elastase-like proteases. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 23, p. 5921–5930, 2002.

LEDENT, P.; DUEZ, C.; VANHOVE, M.; et al. Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. **FEBS Letters**, v. 413, n. 2, p. 194–196, 1997.

LEE, D. M.; FRIEND, D. S.; GURISH, M. F.; et al. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5587, p. 1689–92, 2002.

LI, Z.; XIONG, F.; LIN, Q.; D'ANJOU, M. Low-Temperature Increases the Yield of Biologically Active Herring Antifreeze Protein in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 21, n. 3, p. 438–45, 2001.

LINDSTEDT, K. A; WANG, Y.; SHIOTA, N.; et al. Activation of paracrine TGF-beta1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 8, p. 1377–88, 2001.

LOCKHART, B. E.; VENCILL, J. R.; FELIX, C. M.; JOHNSON, D. A. Recombinant human mast-cell chymase: an improved procedure for expression in *Pichia pastoris* and purification of the highly active enzyme. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 41, n. Pt 1, p. 89–95, 2005.

LOIS, C.; HONG, E. J.; PEASE, S.; BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 295, n. 5556, p. 868–72, 2002.

- MAGNUSSON, S. E.; PEJLER, G.; KLEINAU, S.; ABRINK, M. Mast cell chymase contributes to the antibody response and the severity of autoimmune arthritis. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 3, p. 875–82, 2009.
- MALTBY, S.; KHAZAIE, K.; MCNAGNY, K. M. Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1796, n. 1, p. 19–26, 2009.
- MARUICHI, M.; TAKAI, S.; SUGIYAMA, T.; et al. Role of chymase on growth of cultured canine Tenon's capsule fibroblasts and scarring in a canine conjunctival flap model. **Experimental eye research**, v. 79, n. 1, p. 111–8, 2004.
- MCGRATH, M. E.; MIRZADEGAN, T.; SCHMIDT, B. F. Crystal structure of phenylmethanesulfonyl fluoride-treated human chymase at 1.9 Å. **Biochemistry**, v. 36, n. 47, p. 14318–24, 1997.
- MCNEIL, H. P.; SHIN, K.; CAMPBELL, I. K.; et al. The mouse mast cell-restricted tetramer-forming tryptases mouse mast cell protease 6 and mouse mast cell protease 7 are critical mediators in inflammatory arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 58, n. 8, p. 2338–46, 2008.
- METCALFE; BARAM D, M. Y. Mast Cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033–79, 1997.
- MILLER, H. R. P.; PEMBERTON, A. D. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. **Immunology**, v. 105, n. 4, p. 375–90, 2002.
- NIU, H.; JOST, L.; PIRLOT, N.; et al. A quantitative study of methanol/sorbitol co-feeding process of a *Pichia pastoris* Mut+/pAOX1-lacZ strain. **Microbial cell factories**, v. 12, n. 33, p. 1–8, 2013.
- PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 282, n. 5, p. C947–70, 2002.
- PARAMASIVAM, M.; SARAVANAN, K.; UMA, K.; et al. Expression, purification, and characterization of equine lactoferrin in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 26, n. 1, p. 28–34, 2002.
- PATELLA, V.; DE CRESCENZO, G. CICCARELLI, A.; MARINÒ, I.; ADT M.; MARONE, G. Human heart mast cells: a definitive case of mast cell heterogeneity. **International archives of allergy and immunology**, v. 106, n. 4, p. 386–93, 1995.
- PEJLER, G.; ABRINK, M.; RINGVALL, M.; WERNERSSON, S. Mast cell proteases. **Advances in immunology**, v. 95, p. 167–255, 2007.

PEJLER, G.; RÖNNBERG, E.; WAERN, I.; WERNERSSON, S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. **Blood**, v. 115, n. 24, p. 4981–90, 2010.

PEMBERTON, A D.; BROWN, J. K.; WRIGHT, S. H.; et al. Purification and characterization of mouse mast cell proteinase-2 and the differential expression and release of mouse mast cell proteinase-1 and -2 in vivo. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 33, n. 7, p. 1005–12, 2003.

PEMBERTON, A.; BELHAM, C.; HUNTLEY, J. Sheep mast cell proteinase-1, a serine proteinase with both tryptase-and chymase-like properties, is inhibited by plasma proteinase inhibitors and is mitogenic for bovine pulmonary artery fibroblasts. **The Biochemical journal**, v. 323, p. 719–725, 1997.

PEREIRA, P. J.; WANG, Z. M.; RUBIN, H.; et al. The 2.2 Å crystal structure of human chymase in complex with succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-chloromethylketone: structural explanation for its dipeptidyl carboxypeptidase specificity. **Journal of molecular biology**, v. 286, n. 1, p. 163–73, 1999.

PERRON-SAVARD, P.; CRESCENZO, G. DE; MOUAL, H. LE. Dimerization and DNA binding of the Salmonella enterica PhoP response regulator are phosphorylation independent. **Microbiology (Reading, England)**, v. 151, n. Pt 12, p. 3979–87, 2005.

QUAGLIA, D.; IRWIN, J. A; PARADISI, F. Horse liver alcohol dehydrogenase: new perspectives for an old enzyme. **Molecular biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 244–50, 2012.

RANSON, M.; GALLAGHER, J. Proteoglycans in Cellular Recognition and Secretory Functions in the Haemopoietic System. **Modern Trends in Human Leukemia IX**, v. 35, n. type C, p. 121–139, 1992.

RAUTER, I.; KRAUTH, M.-T.; WESTRITSCHNIG, K.; et al. Mast cell-derived proteases control allergic inflammation through cleavage of IgE. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121, n. 1, p. 197–202, 2008.

REILING KK, KRUCINSKI J, MIERCKE LJ, RAYMOND WW, CAUGHEY GH, S. R. Structure of human pro-chymase: a model for the activating transition of granule-associated proteases. **Biochemistry**, v. 42, p. 2616–2624, 2003.

REMINGTON, S.J.; WOODBURY, R.G.; REYNOLDS, R.A.; MATTEWS, B.W.; NEURATH, H. The structure of rat mast cell protease II at 1.9-Å resolution. **Biochemistry**, v. 27, n. 21, p. 8097–105, 1988.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1822, n. 1, p. 2–8, 2012.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. Mast cell ontogeny: an historical overview. **Immunology letters**, v. 159, n. 1-2, p. 11–4, 2014.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E.; ROCCARO, A M.; RIA, R.; VACCA, A. Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 34, n. 11, p. 1660–4, 2004.

RIBATTI, D.; RANIERI, G.; NICO, B.; BENAGIANO, V.; CRIVELLATO, E. Tryptase and chymase are angiogenic in vivo in the chorioallantoic membrane assay. **The International journal of developmental biology**, v. 55, n. 1, p. 99–102, 2011.

RIBATTI, D.; VACCA, A; NICO, B.; et al. The role of mast cells in tumour angiogenesis. **British journal of haematology**, v. 115, n. 3, p. 514–21, 2001.

ROMANOS, M.; HUGHES, F.; COMERFORD, S.; SCORER, C. Production of a phosphorylated GST:: HPV-6 E7 fusion protein using a yeast expression vector and glutathione S-transferase fusions. **Gene**, v. 152, p. 137–138, 1995.

SAKAGUCHI, M.; TAKAI, S.; JIN, D.; et al. A specific chymase inhibitor, NK3201, suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. **European journal of pharmacology**, v. 493, n. 1-3, p. 173–6, 2004.

SALI, A.; MATSUMOTO, R.; MCNEIL, H. Three-dimensional models of four mouse mast cell chymases. Identification of proteoglycan binding regions and protease-specific antigenic epitopes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 12, p. 9023–9034, 1993.

SATOMURA, K.; YIN, M.; SHIMIZU, S. Increased chymase in livers with autoimmune disease: colocalization with fibrosis. **Journal of Nippon Medical School**, v. 70, n. 6, p. 490–495, 2003.

SAWATSUBASHI, M.; YAMADA, T.; FUKUSHIMA, N.; et al. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 436, n. 3, p. 243–8, 2000.

SCANDIUZZI, L.; BEGHDAI, W. Mouse mast cell protease-4 deteriorates renal function by contributing to inflammation and fibrosis in immune complex-mediated glomerulonephritis. **The Journal of immunology**, v. 185, n. 1, p. 624–633, 2010.

SCHARTZ, L.B.; BRADFORD, T.R.; IRANI, A.M.; DEBLOIS, G. CRAIG, S.S. The major enzymes of human mast cell secretory granules. **The American review of respiratory disease**, v. 135, n. 5, p. 1186-9, 1987.

SHIN, GERALD F. M. WATTS, HANS C. OETTGEN, DANIEL S. FRIEND, A. D. P.; MICHAEL F. GURISH, AND D. M. L. Mouse mast cell tryptase mMCP-6 is a critical link

between adaptive and innate immunity in the chronic phase of *Trichinella spiralis* infection. **The Journal of immunology**, v. 180, n. 7, p. 4885–4891, 2008.

SOUZA, D. A. DE; TOSO, V. D.; CAMPOS, M. R. D. C.; et al. Expression of mast cell proteases correlates with mast cell maturation and angiogenesis during tumor progression. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e40790, 2012.

SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R. G.; KROPP, K. E.; et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 55–62, 1997.

STARKEY, J.R.; CROWLE, P.K. et al. Mast-cell-deficient W/W^v mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis. **International journal of cancer**, v. 42, n. 1, p. 48-52, 1988.

STINCHCOMBE, J. C.; GRIFFITHS, G. M. Normal and abnormal secretion by haemopoietic cells. **Immunology**, v. 103, n. 1, p. 10–6, 2001.

SU, D. X.; ZHANG, A L.; YI, G. H.; et al. Inducible expression of calreticulin-N58 in *Pichia pastoris* by high density cell culture. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 8, p. 5003–8, 2011.

SUN, J.; ZHANG, J.; LINDHOLT, J. S.; et al. Critical role of mast cell chymase in mouse abdominal aortic aneurysm formation. **Circulation**, v. 120, n. 11, p. 973–82, 2009.

SUN, J.; ZHANG, J.; LINDHOLT, J.; SUKHOVA, G.; LIU, J. Critical role of mast cell chymase in mouse abdominal aortic aneurysm formation. **Circulation**, v. 120, n. 11, p. 973–982, 2009.

TAIPALE J, LOHI J, SAARINEN J, KOVANEN PT, K.-O. J. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4689–4696, 1995.

TAKAI, DENAN JIN, MASATO SAKAGUCHI, SATORU KATAYAMA, MICHIKO MURAMATSU, MINORU SAKAGUCHI, EIKO MATSUMURA, SHOKEI KIM, AND M. M. A Novel Chymase Inhibitor , 4- [1- { [bis- (4-Methyl-phenyl) - yloxy] -benzoic acid (BCEAB), Suppressed Cardiac Fibrosis in Cardiomyopathic Hamsters. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 1, p. 17–23, 2003.

TAKANAMI, I.; TAKEUCHI, K.; NARUKE, M. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. **Cancer**, v. 88, n. 12, p. 2686–92, 2000.

TALREJA, J.; KABIR, M. H.; B FILLA, M.; STECHSCHULTE, D. J.; DILEEPAN, K. N. Histamine induces Toll-like receptor 2 and 4 expression in endothelial cells and enhances sensitivity to Gram-positive and Gram-negative bacterial cell wall components. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 224–33, 2004.

TCHOUGOUNOVA, E.; PEJLER, G. Regulation of extravascular coagulation and fibrinolysis by heparin-dependent mast cell chymase. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 14, p. 2763–5, 2001.

THORPE, E.; D'ANJOU, M.; DAUGULIS, A. Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology letters**, v. 21, p. 669–672, 1999.

TOMIMORI, Y.; MUTO, T.; SAITO, K.; et al. Involvement of mast cell chymase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, n. 2-3, p. 179–185, 2003.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

UEHARA, Y.; URATA, H.; IDEISHI, M.; ARAKAWA, K.; SAKU, K. Chymase inhibition suppresses high-cholesterol diet-induced lipid accumulation in the hamster aorta. **Cardiovascular research**, v. 55, n. 4, p. 870–6, 2002.

UGWU, S.; APTE, S. The effect of buffers on protein conformational stability. **Pharmaceutical Technology**, , n. March, 2004.

URATA, H.; KINOSHITA, A.; PEREZ, D. M.; et al. Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 26, p. 17173–9, 1991.

URATA, H.; KINOSHITA, A.; MISONO, K. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 36, p. 22348–22357, 1990.

WAERN, I.; JONASSON, S.; HJOBERG, J.; et al. Mouse mast cell protease 4 is the major chymase in murine airways and has a protective role in allergic airway inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 10, p. 6369–76, 2009.

WASTLING, J. M.; KNIGHT, P.; URE, J.; et al. Histochemical and Ultrastructural Modification of Mucosal Mast Cell Granules in Parasitized Mice Lacking the β -Chymase, Mouse Mast Cell Protease-1. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 2, p. 491–504, 1998. American Society for Investigative Pathology.

WEDEMEYER, J.; GALLI, S. J. Mast cells and basophils in acquired immunity. **British medical bulletin**, v. 56, n. 4, p. 936–55, 2000.

WELLE, M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. **Journal of leukocyte biology**, v. 61, n. March, p. 233–245, 1997.

WU, Q.; KUO, H.-C.; DENG, G. G. Serine proteases and cardiac function. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1751, n. 1, p. 82–94, 2005.

XIA, W.-R.; FU, W.-L.; CAI, L.; et al. Expression, purification and characterization of recombinant human angiogenin in *Pichia pastoris*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 76, n. 7, p. 1384–8, 2012.

YONG, L. C. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 49, n. 6, p. 409–24, 1997. Gustav Fischer Verlag.

YOSHIKAWA, T.; IMADA, T.; NAKAKUBO, H.; NAKAMURA, N.; NAITO, K. Rat mast cell protease-I enhances immunoglobulin E production by mouse B cells stimulated with interleukin-4. **Immunology**, v. 104, n. 3, p. 333–40, 2001.