

**FELLIPE BRONZE DOS SANTOS**

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL  
DAS PROTEÍNAS DERMICIDINA-1 E SUA SPLICE  
VARIANTE EM SISTEMA BIOMIMÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2014

**Fellipe Bronze dos Santos**

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS  
DERMICIDINA-1L E SUA SPLICE VARIANTE  
EM SISTEMA BIOMIMÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para Obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Ernesto Belizário

Versão Original

São Paulo  
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Santos, Fellipe Bronze dos.

Análises bioquímica e estrutural das proteínas Dermicidina-1L e sua splice variante em sistema biomimético / Fellipe Bronze dos Santos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. José Ernesto Belizário.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Estrutura e função de peptídeos antimicrobianos.

Versão do título para o inglês: Biochemical and structural analysis of Dermicidin-1L and its splice variant in biomimetic system.

1. Dermicidina 2. Estrutura de proteínas 3. Splice variante  
4. Sistema biomimético 5. Peptídeo antimicrobiano I. Belizário,  
Prof. Dr. José Ernesto II. Universidade de São Paulo. Instituto de  
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
III. Título.

ICB/SBIB05/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Fellipe Bronze dos Santos.

Título da Dissertação: Análises bioquímica e estrutural das proteínas Dermicidina-1L e sua splice variante em sistema biomimético.

Orientador(a): Prof. Dr. José Ernesto Belizário.

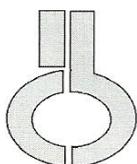
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**       **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 515/12 referente ao projeto intitulado: “*Estudos bioquímicos e estruturais da proteína Dermicidina e das suas interações com mediadores de resposta celular*” sob a responsabilidade de **Fellipe Bronze dos Santos**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 14 de agosto de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Agradeço a Deus pelas oportunidades

E a minha família que está sempre

Ao meu lado para o que der e vier.

Muito Obrigado!!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nada disso seria possível;

A minha família por ter me aturado por todo este tempo sem me mandar pra fora de casa, e ainda dizerem que sou lindo e que me amam;

Ao meu Orientador Prof. Dr. Belizário pela oportunidade e orientação mesmo em momentos delicados;

Ao Prof. Dr. Vitor de Oliveira por abrir as portas do seu laboratório e pelos momentos passados e vindouros;

À Profa. Dra. Karin Riske, pela colaboração e paciência nos momentos que passamos trabalhando ou conversando;

Aos amigos Marcelo Marcondes, Mauricio Machado, Ricardo Torquato e Kátia, por terem se tornado em tão pouco tempo meus amigos que me aconselham e passam tanto por bons quanto maus momentos. Por tudo o que me ensinaram e ensinam diariamente, pela companhia, amizade e companheirismo;

Aos amigos do atual Laboratório de Enzimologia, Pollyana, Larissa, Paloma, Yudi, Raquel, Gaby, Sarah, Caio, Alexandre e Thaysa, além dos que por ele já passaram, Piero e Gabu, pela convivência e por todas as risadas e lágrimas, e por tudo o que me ensinaram;

Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Adriana Carmona e Nilana Barros por sempre que preciso me ajudarem, pessoal ou profissionalmente e pelo tratamento tão gentil a mim oferecido;

Às secretárias, Mônica e Camila, do Depto de Farmacologia por literalmente salvarem a minha Pós-Graduação;

À banca de Qualificação e Doutorado que prestigiaram o trabalho, com críticas, questões e sugestões, mesmo que não sejam tão agradáveis ao ouvido;

Ao Depto de Biofísica da UNIFESP, nas pessoas de Professores, técnicos e alunos sempre prontos a ajudarem;

Aos outros Professores, técnicos e estudantes que conviveram comigo nesse período do mestrado;

Às Agências de fomento, CNPq, Capes e Fapesp, pelo suporte financeiro direta ou indiretamente.

Meu muito obrigado!!!

O que é ter sucesso?

Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter tido sucesso.

Ralph Waldo Emerson

## RESUMO

Bronze F. Análises bioquímica e estrutural das proteínas Dermicidina-1L e sua splice variante em sistema biomimético [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Dermicidina (DCD) é um gene mapeado no cromossomo 12, locus 12q13.1, cuja mensagem de 503 bp codifica uma proteína de 110 aminoácidos. O RNAm do gene foi inicialmente identificado em melanócitos benignos e malignos, e células epiteliais das glândulas écrinas da pele. A forma precursora, presente no suor e em certas secreções biológicas, sofre um processamento proteolítico, gerando vários peptídeos ativos. O peptídeo N-terminal (Y-P30) de 30 aminoácidos exerce função protetora de morte celular induzida pelo estresse oxidativo. O peptídeo C-terminal (DCD-1L) de 48 aminoácidos tem uma carga -2, e exerce função antibacteriana e antifúngica, sendo assim classificado como peptídeo antimicrobiano aniônico. Um peptídeo C-terminal splice variante, denominado DCD-SV de 59 aminoácidos, tem carga neutra, e suas propriedades bioquímicas e biológicas ainda não foram estabelecidas. Na primeira parte do trabalho são apresentados os resultados da expressão, purificação e sequenciamento da forma recombinante nativa da DCD. Na segunda parte são descritos os resultados das análises físico-químicas e bioquímicas que mostraram diferenças significantes na interação dos peptídeos sintéticos DCD-1L e DCD-SV com vesículas lipídicas gigantes (GUVs) e vesículas unilamelar pequenas (SUVs) sintetizadas com POPC, que simulam as propriedades biológicas e físicas das membranas biológicas. Ambos os peptídeos, nas doses de 5 a 40  $\mu\text{M}$ , promoveram, de maneira tempo dependente, um aumento progressivo da permeabilidade, opacidade e extrusão de “buds” de GUVs de POPC em solução aquosa. Os eventos foram mais acentuados e rapidamente induzidos na presença de DCD-SV. As análises de preferências estruturais dos peptídeos foram investigadas por dicróismo circular (CD). Na presença de POPC e  $\text{Zn}^{2+}$ , ambos peptídeos apresentaram ganho de sinal positivo e negativo, porém o ganho foi mais acentuado na presença de  $\text{Zn}^{2+}$ . Nossos resultados sugerem que a DCD-SV tem alta propensão para adotar uma estrutura helicoidal permitindo sua inserção e oligomerização em membranas biomiméticas, e a formação de canais de condutância molecular.

**Palavras-chave:** Dermicidina. Estrutura de Proteínas. Splice variante. Sistema Biomimético. Peptídeo antimicrobiano.

## ABSTRACT

Bronze F. Biochemical and structural analysis of Dermcidin-1L and its splice variant in biomimetic system [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Dermcidin (DCD) is mapped a gene on chromosome 12, locus 12q1.13 whose message of 503 bp encodes to 110 amino acids protein. DCD mRNA was first identified in benign and malignant melanocytes, and then epithelial cells of sweat glands of the skin. In the human sweat and biological fluids, DCD precursor is proteolytically processed to N and C-terminal peptides. The 30 amino acid N-terminal peptide (Y- P30) is known to exert neuronal protection under conditions of oxidative stress. The 48-amino acid C-terminal peptide (DCD-1L) has -2 net charges at physiological pH and display antibacterial and antifungal properties. It has been classified as anionic antimicrobial peptide. The 59-amino acid splice variant C-terminal peptide (DCD-SV) has neutral net charge; however, its structure and biological function are unknown. In the first part of this study we show the results of expression, purification and amino acid sequencing of recombinant DCD protein produced in *E.coli* transformed with pAE. In the second part, we describe the results of physical-chemical and biochemical analyses showing the visible differences between the interactions of DCD-1L and DCD-SV synthetic peptides with giant unilamellar vesicles (GUVs) and large unilamellar vesicles (SUVs) made of POPC, used as biomimetic membranes. Both peptides promoted increases of permeability, rapid opacity and extrusion of buds of GUVs, in a dose (5-40  $\mu\text{M}$ ) and time- (4-12 min) dependent. The structural preferences of peptides were analyzed by circular dichroism (CD) spectroscopy. CD spectra showed that DCD-1L and DCD-SV has minimal gain of secondary structure in the presence of  $\text{Zn}^{2+}$  (200  $\mu\text{M}$ ) and POPC (200  $\mu\text{M}$ ). Our results suggest that DCD-SV peptide has higher propensity to adopt helicoidal structure enabling it to insert into mimetic membranes, undergo oligomerization and formation of conductance channel.

**Keywords:** Dermcidin. Protein structure. Splice variant. Biomimetic system. Antimicrobial peptide.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DCD – Dermicidina

DCD-1L – Porção C-terminal da Dermicidina

DCD-SV – Splice variante da porção C-terminal da Dermicidina

rDCD – Dermicidina recombinante

Y-P30 – Peptídeo de proteção neuronal

PIF – Fator de Indução de Proteólise

AA – Aminoácido

PAM – Peptídeo antimicrobiano

LPS – Lipopolissacarídeo

Abs – Absorbância

OD – Densidade óptica

IPTG – Isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo

TEMED – Tetrametiletenodiamina

GUV – Vesícula Unilamelar Gigante

SUV – Vesícula Unilamelar Pequena

POPC – Palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina

POPG - Palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol

CD – Dicroísmo circular

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

BME –  $\beta$ -mercaptoetanol

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 A sequência de nucleotídeos do mRNA e sequências de aminoácidos da proteína DCD e sua splice variante DCD-SV. ....	16
Figura 2 Conformação helicoidal da DCD-1L (4,7 kDa). Os retângulos pretos indicam aminoácidos hidrofílicos, retângulos brancos indicam aminoácidos hidrofóbicos, e retângulos cinzas os aminoácidos anfifílicos. Números indicam a ordem dos aminoácidos na cadeia peptídica. A linha preta indica a porção hidrofílica e a linha cinza indica a porção hidrofóbica. ....	18
Figura 3 Diagrama esquemático do gene e do processamento da DCD gerando peptídeos com funções biológicas distintas. Adaptado de (9).....	19
Figura 4 Esquema demonstrando os possíveis passos que um PAM poderia seguir desde a interação inicial na membrana, e seus possíveis mecanismos de ação (21).....	28
Figura 5 Gel de poliacrilamida mostrando a expressão da proteína rDCD produzida por <i>E. coli</i> , transformada pelo plasmídeo pAE-DCD. No gel nota-se um aumento crescente na banda de 16 kDa após a adição de IPTG nas concentrações indicadas. ....	42
Figura 6 Sequenciamento de N-terminal por degradação de Edman, reconhecimento da Metionina inicial, além das histidinas do Tag da proteína expressa. ....	44
Figura 7 Ensaio de Western-blot confirmando a presença de rDCD com aproximadamente 16 kDa .....	44
Figura 8 Gel de agarose mostrando resultado do ensaio de PCR de amplificação do produto de 330 bp corresponde ao cDNA da DCD clonada em vetor pTYB2. Os clones 1, 2, 3 e 5 são positivos.....	45
Figura 9 Gel de poliacrilamida mostrando a ausência de indução de expressão da proteína rDCD em lisado de <i>E. coli</i> , transformada pelo plasmídeo pTYB2-DCD.....	46
Figura 10 Gel de poliacrilamida mostrando vários tipos de tratamento para diminuir contaminantes e proteases que degradavam a proteína rDCD em lisado de <i>E. coli</i> , transformada pelo plasmídeo pAE-DCD. Neste ensaio foram feitos os seguintes tratamentos, pH diminuído a 4, elevação da temperatura a 60°C e precipitações das proteínas com sulfato de amônio 25%, 35% e 45%.....	47
Figura 11 Gel de poliacrilamida mostrando os passo de purificação com a adição do aumento da temperatura e o BME. Os dois picos apresentados na cromatografia de afinidade, P1 e P2, e a recuperação dos picos apresentados na cromatografia de troca iônica e as concentrações de NaCl, 150, 250 e 300 mM. ....	48
Figura 12 Cromatograma de lisado de <i>E.coli</i> transformado com o plasmídeo pAE-DCD mostrando as proteínas eluídas com 10% de imidazol.....	49
Figura 13 Análise eletroforética da expressão e purificação após as modificações nos protocolos. (A) NI e IND Não Induzido e Induzido. LIS e NR Lisado e Não Retido, com a banda diminuindo a intensidade entre elas para serem eluídas. Porcentagens de imidazol para a eluição. (B) cromatografia de exclusão com o pico de 10% saindo apenas rDCD no pico 349	
Figura 14. Sequência de aminoácidos da rDCD sublinhada mostrando peptídeos identificados pelo programa Mascot, conforme Apêndice 1.....	50

Figura 15 Estrutura helicoidal dos peptídeos DCD-1L e DCD-SV mostrando a porção inferior hidrofóbica, e porção superior hidrofílica, e distribuição dos ácidos hidrofílicos, polares e básicos (vermelho e azul) e aminoácidos polares hidrofóbicos (amarelo e cinza). Notar a presença de apenas uma histidina na cadeia de aminoácidos da DCD-1L enquanto na cadeia de DCD-SV estão presentes três prolinas (verde), uma fenilalanina, uma asparagina, uma arginina e uma treonina. O gráfico foi obtido com o software Heliquest ( <a href="http://heliquest.ipmc.cnrs.fr">http://heliquest.ipmc.cnrs.fr</a> ). .....	51
Figura 16 Espectro de CD dos peptídeos DCD-1L (○) e DCD-SV (●) em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160 μM. O perfil é característico de peptídeo sem estrutura secundária definida. Os resultados são apresentados como média de 3 leituras consecutivas.....	52
Figura 17 Demonstração gráfica da interação do zinco e a DCD-1L, uma possível explicação é a presença da Histidina na sequência primária do peptídeo, recortado de Song e colaboradores 2013 (6). .....	53
Figura 18 Espectros de CD do peptídeo DCD-1L em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160 μM, na ausência (—) e na presença de Zn <sup>2+</sup> concentração 200 μM, no tempo zero (○) e no tempo 30 min (▼). Nota-se um leve ganho de estrutura na presença de Zn <sup>2+</sup> . Os resultados são apresentados como média de 3 leituras consecutivas.....	54
Figura 19 Espectros de CD do peptídeo DCD-SV em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160 μM (—), na presença de Zn <sup>2+</sup> 200 μM, nos tempos zero minuto (○) e 15 minutos (▼). Nota-se aumento progressivo de ganho de estrutura secundária com o aumento de tempo de incubação. Os resultados são apresentados como média de 3 leituras consecutivas.....	55
Figura 20 Foto mostrando o efeito de íons Zn <sup>2+</sup> sobre GUVs de POPC.....	56
Figura 21 Estrutura do palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina - POPC (Neutro), o grupamento fosfato pode ser reativo tanto quando o grupamento amino da molécula. ....	56
Figura 22 Foto ilustrativa mostrando efeito tempo-dependente do peptídeo DCD-1L (40 μM) sobre a permeabilidade de GUVs de POPC após sua adição em solução. Nota-se um aumento progressivo de opalescência (perda de contraste interior/exterior) da vesícula ao longo dos tempos observados: 6 min (A), 8 min (B), 9 min (C) e 12 min (D). .....	57
Figura 23 Foto ilustrativa mostrando o efeito tempo-dependente da DCD-1L (200 μM) sobre a permeabilidade de GUVs de POPC após microinjeção próxima a GUV. Notar aumento da opalescência e extrusão de “buds” a partir dos tempos observados (A) 0”, (B) 32”, (C) 44”, (D) 54”, (E) 1’ e 12”, (F) 1’ e 37”. .....	58
Figura 24: Espectros de CD do peptídeo DCD-1L em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160 μM, na ausência (—) e na presença de SUVs 200 μM, nos tempos zero minuto (●) e 15 minutos (□). Nota-se a diminuição do pico negativo máximo de sinal de acordo com o tempo, indicando ganho de estrutura secundária. ....	59
Figura 25 Espectros de CD do peptídeo DCD-1L em solução aquosa, glicose 200 mM, na concentração 160 μM, na ausência (—) e na presença de Zn <sup>2+</sup> 200 μM (●) e na presença de SUVs (□), no tempo 30 minutos. Nota-se redução mais acentuada de sinal negativo quando da incubação com Zn <sup>2+</sup> e SUVs. ....	60
Figura 26 Efeito tempo-dependente da DCD-SV sobre a permeabilidade de GUVs de POPC após adição do peptídeo em solução. Nota-se um aumento gradativo de opalescência da	

vesícula ao longo dos tempos observados (A) 1' e 27", (B) 4' e 27", (C) 4' e 42", (D) 4' e 56", (E) 5' e 57" e (F) 7' e 11".....	61
Figura 27 Efeito tempo-dependente do peptídeo DCD-SV sobre a permeabilidade de GUVs de POPC após microinjeção próxima a GUV. Nota-se um aumento gradativo de opalescência e extrusão de "buds" ao longo dos tempos observados (A) 0', (B) 3", (C) 10", (D) 24", (E) 27" e (F) 36".....	62
Figura 28 Espectros de CD do peptídeo DCD-SV em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160 µM, na ausência (—) e na presença de SUVs 200 µM, nos tempos zero minuto (●) e 15 minutos (□). Nota-se que houve redução do sinal negativo na presença de SUVs.....	63
Figura 29 Espectros de CD do peptídeo DCD-SV em solução aquosa, glicose 200 mM, na concentração 160 µM, na ausência (—) e na presença de Zn <sup>2+</sup> 200 µM (●) e na presença de SUVs (□), coletados após 30 minutos da incubação. Nota-se redução acentuada de sinal negativo (elipticidade -30) na presença de SUVs, enquanto que na presença de Zn <sup>2+</sup> ocorre um deslocamento para comprimentos de ondas maiores, entre 205 e 220 nm.....	64

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Características bioquímicas da proteína Dermicidina (DCD) .....	16
1.2 Homologia entre Dermicidina e PIF .....	17
1.3 Expressão e efeitos biológicos da proteína DCD em células epiteliais normais .....	18
<u>1.3.1 Expressão e efeitos da porção C-terminal da DCD</u> .....	19
<u>1.3.2 Expressão e efeitos da porção N-terminal da DCD</u> .....	20
<u>1.3.3 Expressão e efeitos biológicos da proteína da DCD em células cancerígenas</u> .....	21
1.4 Peptídeos antimicrobianos .....	21
<u>1.4.1 Classificação estrutural dos PAM</u> .....	23
<u>1.4.1.1 Peptídeos helicoidais</u> .....	24
<u>1.4.1.2 Peptídeos folha-β</u> .....	24
1.5 Interação com lipídios .....	25
1.6 Relevância biológica das formas splices variantes de proteínas .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 Objetivos específicos .....	31
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
3.1 Clonagem, sequenciamento e expressão e purificação da DCD nativa .....	32
<u>3.1.1 Clonagem</u> .....	32
<u>3.1.2 pAE-DCD</u> .....	32
<u>3.1.3 pTYB2-DCD</u> .....	33
3.2 Sequenciamento de oligonucleotídeos .....	34
3.3 Cultivo e expressão .....	34
3.4 Lise celular .....	35
<u>3.4.1 Lise inicial</u> .....	35
<u>3.4.2 Lise secundária</u> .....	35
3.5 Ensaio de purificação de proteínas .....	35
<u>3.5.1 Purificação por cromatografia de afinidade em resina Ni<sup>2+</sup>-sepharose</u> .....	36
<u>3.5.2 Preparação das frações para etapa de cromatografia de troca iônica</u> .....	36
<u>3.5.3 Cromatografia de troca iônica</u> .....	36
<u>3.5.4 Cromatografia de exclusão por massa molecular</u> .....	37
3.6 Metodologias confirmativas .....	37
<u>3.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</u> .....	37

<i>3.6.2 Western blotting</i> .....	38
<b><u>3.6.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</u></b> .....	38
<b><u>3.6.2.2 Eletrotransferência</u></b> .....	38
<b><u>3.6.2.3 Ensaio de revelação de membrana de nitrocelulose</u></b> .....	38
<i>3.6.3 Sequenciamento N-Terminal de proteínas</i> .....	39
<i>3.6.4 Espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF MS/MS</i> .....	39
<i>3.7 Metodologias para análise da interação de peptídeos e sistema biomimético</i> .....	39
<i>3.7.1 Preparação de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) e pequenas (SUVs)</i> .....	40
<i>3.7.2 Visualização de vesículas unilamelares gigantes</i> .....	40
<b><u>3.7.2.1 Visualização de deformações de GUVs induzidas após a adição de peptídeos</u></b> .....	41
<b><u>3.7.2.2 Visualização de deformações de GUVs induzidas após a microinjeção de peptídeos</u></b> ....	41
<i>3.8 Espectroscopia por Dicroísmo circular (Far UV)</i> .....	41
<b>4 RESULTADOS</b> .....	43
<i>4.1 Expressão, lise e purificação da proteína rDCD</i> .....	43
<i>4.2 Confirmação da rDCD</i> .....	45
<i>4.3 Clonagem e expressão da rDCD no vetor pTYB2</i> .....	46
<i>4.4 Modificações no protocolo de lise e purificação</i> .....	47
<i>4.5 Sequenciamento da rDCD</i> .....	51
<i>4.6 Estudos físico-químicos e estruturais dos peptídeos sintéticos DCD-1L e DCD-SV</i> .....	52
<i>4.6.1 Estudos da diferença comportamental dos peptídeos</i> .....	53
<b><u>4.6.1.1 Estudo da estrutura</u></b> .....	53
<b><u>4.6.1.2 Estudos conformacionais dos peptídeos</u></b> .....	53
<b><u>4.6.1.3 Estudo do comportamento dos peptídeos com o sistema biomimético</u></b> .....	57
<b><u>4.6.1.3.1 Experimentos biomiméticos com a DCD-1L</u></b> .....	58
<b><u>4.6.1.3.2 Experimentos biomiméticos com a DCD-SV</u></b> .....	62
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	67
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	70
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71
<b>APÊNDICE – Dados completos do sequenciamento pelo ORBITRAP e controle do CD</b> .....	77

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Características bioquímicas da proteína Dermicidina (DCD)

No ano 2000, o RNAm do gene DCD foi identificado em uma biblioteca de cDNA obtido da pele de feto humano e linhagens de melanócitos normais e malignos (1). Em seguida o gene foi mapeado no cromossomo 12, locus 12q13.1 (2). O transcrito codifica um polipeptídeo de 110 aminoácidos que origina uma proteína de 11 kDa que posteriormente é processada em vários fragmentos derivados das porções N-terminal e C-terminal. A figura 1 mostra a sequência de nucleotídeos do mensageiro e de aminoácidos da proteína DCD.

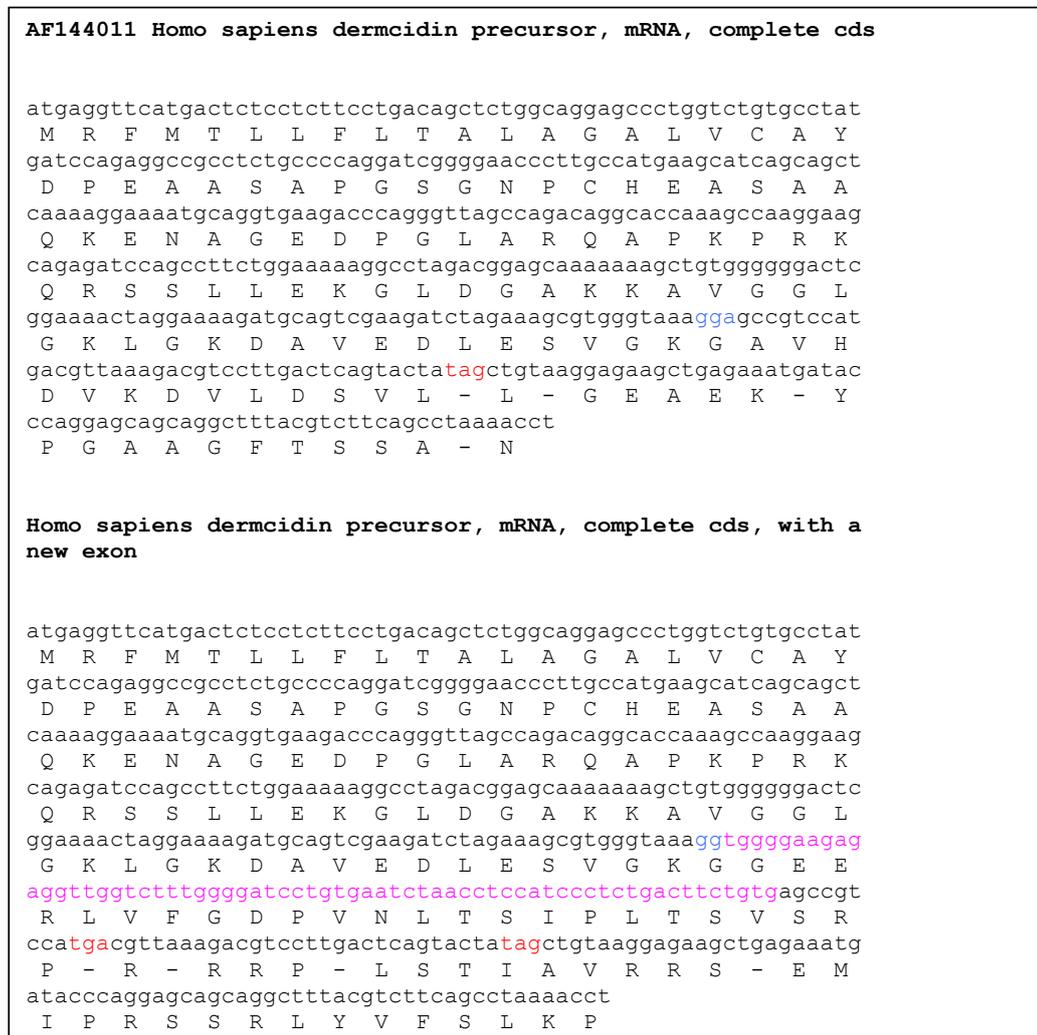


Figura 1 A sequência de nucleotídeos do mRNA e sequências de aminoácidos das proteínas DCD e sua splice variante DCD-SV.

Algumas propriedades físicas e químicas da proteína DCD recombinante nativa (11 kDa) foram investigadas por métodos de biologia estrutural, espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e ressonância magnética nuclear (NMR). Estes estudos revelaram que a proteína DCD é resistente à denaturação sob a temperatura até 60 °C (3). Os estudos de CD mostram que a proteína nativa de 11 kDa não tem uma conformação secundária estável em tampão aquoso na presença de Tris-HCl, pH 8,0, mas adquire a conformação tanto  $\beta$ -pregueada quanto  $\alpha$ -hélice na presença do detergente dodecil-sulfato de sódio (SDS) e trifluoroetanol (TFE). Concluiu-se que a DCD apresenta uma estrutura típica de uma proteína intrinsecamente desestruturada (3). Os estudos de dicroísmo circular do peptídeo DCD-1L (4,7 kDa) derivado da porção do terminal carboxílico revelaram a presença de estrutura secundária tipo  $\alpha$ -hélice anfipática (4). A figura 2 mostra a estrutura em  $\alpha$ -hélice anfipática e a distribuição dos aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos da proteína DCD-1L. Esta estrutura tem uma carga negativa de -2 em pH neutro. A parte negativa hidrofóbica contém apenas 4 tipos de aminoácidos, que são os seguintes: leucina, alanina, valina e glicina. A parte positiva hidrofílica não apresenta os seguintes aminoácidos: cisteína, prolina, arginina e os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. A estrutura tridimensional da porção carboxila-terminal da DCD-1L foi resolvida em um estudo de ressonância magnética nuclear na presença de uma solução de trifluoroetanol à 50% (5). Em 2013, Song e colaboradores apresentaram novos dados sobre a estrutura tridimensional do peptídeo DCD-1L que revelaram que as moléculas do peptídeo se organizam na forma de um hexâmero na presença de  $Zn^{2+}$ , dando origem a um canal de condutância permeável a moléculas de sódio (6). Estas informações serão discutidas ao longo desta dissertação.

## 1.2 Homologia entre Dermicidina e PIF

Todorov e colaboradores em 1996 apresentaram evidências bioquímicas de uma nova glicoproteína entre proteínas liberadas por tumores de pacientes com caquexia, o qual foi denominada PIF (Proteolysis-Inducing Factor). Em razão da correlação direta entre perda de massa muscular e a presença do PIF na urina dos pacientes, os autores concluíram que esta glicoproteína exerce função-chave na indução da caquexia. Por outro lado, em 1998, Cunningham e colaboradores identificaram a expressão de um peptídeo denominado YP-30 entre as proteínas secretadas por células de neuroblastoma humana e em células do hipocampo do cérebro de ratos após um processo oxidativo (7). Estes autores mostraram que este fator promove a sobrevivência de células neuronais em ratos que foram submetidos a



(2, 3). Esta atividade da proteína parece ser exercida pela proteína nativa, isto é, não processada.

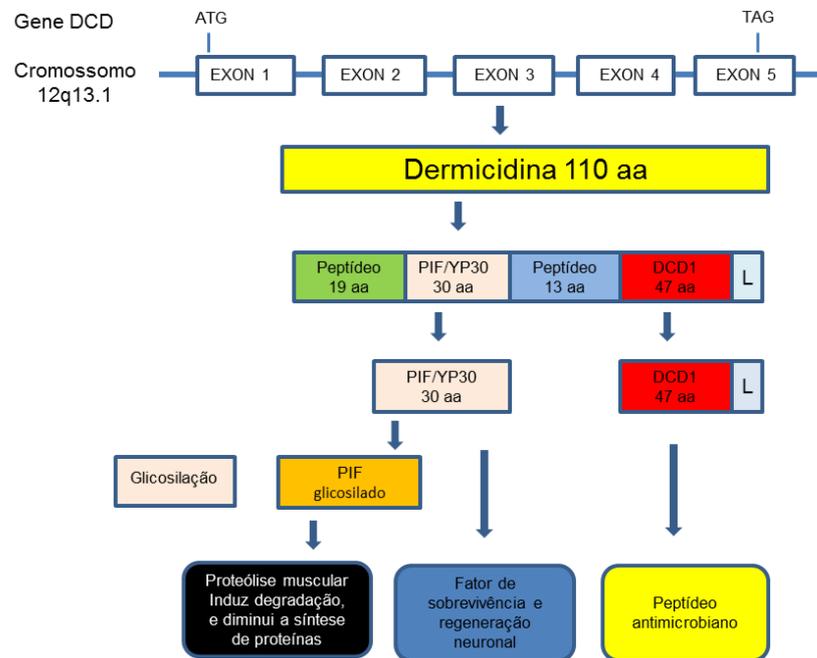


Figura 3 Diagrama esquemático do gene e do processamento da DCD e dos peptídeos que são gerados e suas funções biológicas. Adaptado de (9)

### 1.3.1 Expressão e efeitos da porção C-terminal da DCD

Os estudos de Schitteck e colaboradores em 2001 mostraram que a porção C-terminal da DCD de massa molecular de 4,7 kDa é a forma predominante secretada entre as proteínas do suor. O suor é um fluido biológico produzido principalmente pelas glândulas écrinas e tem por função a regulação térmica. O suor é uma solução hipotônica contendo eletrólitos, especialmente de cloreto de sódio e potássio, lactato, ureia e amônia, os quais são distribuídas pela hipoderme e camada interna da pele (10).

A DCD-1L e outros peptídeos antibióticos em geral têm funções no controle da flora bacteriana e das doenças dermatológicas (11). Porém, a atividade do peptídeo DCD-1L é mantida ao longo de um largo intervalo de pHs e em concentrações salinas elevadas que se assemelhavam as condições químicas do suor humano.

Os estudos demonstraram que DCD-1L (48 aminoácidos) e DCD-1 (47 aminoácidos, ausência da leucina terminal) apresentam atividade antimicrobiana contra uma variedade de microorganismos patogênicos, incluindo o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Cândida Albicans* em condições in vitro que se assemelharam o suor humano (12). Investigações posteriores revelaram um espectro estendido antimicrobiano,

incluindo *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas putida*, resistente à meticilina *Staphylococcus aureus*, a rifampicina e isoniazida-resistente *Mycobacterium tuberculosis* (13), *Listeria monocytogenes* e *Salmonella entérica sorovar Typhimurium* (14). No suor humano existe uma concentração de cerca de 1-10 µg/ml de DCD-1L que parece ser tóxica para a maioria dos microorganismos testados (1, 15).

### 1.3.2 Expressão e efeitos da porção N-terminal da DCD

A expressão da proteína DCD foi detectada nos neurônios da ponte (locus ceruleus), núcleos contínuos da rafe, substância negra (mesencéfalo) e núcleos hipotalâmicos laterais (2, 16). Um peptídeo derivado da porção N-terminal da DCD, nomeado de Y-P30, se mostrou como um fator de sobrevivência neuronal identificado no sobrenadante de células neuronais após estresse oxidativo. O Y-P30 foi identificado inicialmente em células do neuroblastoma humano SH-SY5Y após exposição à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7). Este peptídeo de 30 aminoácidos age como um potente indutor de regeneração de lesões no córtex cerebral após sua administração local e sistêmica em ratos lesionados (7, 17). Landgraf e colaboradores em 2005 (16) mostraram a produção do Y-P30 pelas células mononucleares do sangue periférico do sistema imune materno durante a gravidez de ratos. O polipeptídeo pode atravessar a barreira placentária e se acumular nos neurônios do cérebro infantil em desenvolvimento, e aonde pode aumentar a sobrevivência de neurônios talâmicos. A presença de transcritos de Y-P30 no nervo óptico após uma lesão pode ser mais provavelmente explicada pela infiltração de macrófagos no local da lesão. Em contraste, ativação de macrófagos induzida por LPS não levou a níveis detectáveis de mRNA da Y-P30 em células do sangue, o que exclui a possibilidade de que qualquer tipo de inflamação induzida por Y-P30. Além disso, este resultado aponta para a presença de um processo ainda desconhecido de sinalização mediada a partir de tecido neural danificado que regula a transcrição do gene Y-P30 em cérebro de rato adulto. É importante mencionar que o gene DCD não foi encontrado no genoma de roedores.

O Y-P30 através de oligomerização espontânea pode levar a formação de complexos contendo a proteína pleiotropina (PTN) e os proteoglicanos sindecana -2 e -3. PTN promove o crescimento de neurônios no tálamo através da sua associação com o proteoglicano sindecana-3. AY-P30 estimula a atividade neurogênica em cultura de neurônios talâmicos na presença de PTN e sindecanas. Assim, o crescimento de neurônios pelas ações de Y-P30 durante o desenvolvimento do cérebro parecem ser, essencialmente, devido a sua associação com o complexo de sinalização PTN/sindecanas (18).

### 1.3.3 Expressão e efeitos biológicos da proteína da DCD em células cancerígenas

O gene DCD têm a sua expressão amplificada em vários tipos de cânceres de mama e por isso é considerado um possível oncogene (2). Em um estudo foi sugerido que a DCD participa de cascata de sinalização que leva a reorganização da actina do citoesqueleto e a aumento de mobilidade celular em casos de carcinoma hepatocelular. A sua função se deve a interação com o grupamento SH2 do Nck1, uma proteína adaptadora que possui um domínio que pode se ligar ao resíduo da fosfotirosina na posição 20 da porção N-terminal da DCD. Além disso, neste estudo ficou demonstrado que a superexpressão de DCD foi capaz de promover a ativação Rac1 e Cdc42 que estão envolvidas na migração celular e metástase tumoral (19).

Em 2003, Porter e colaboradores (2) analisaram os genes expressos nos diversos tipos de tumores de mama. Neste estudo foram analisadas amostras de pacientes em todos os estadiamentos clínicos da doença com o objetivo de identificar genes envolvidos na iniciação e progressão da tumorigênese da mama. Esta abordagem levou à identificação do gene IBC 1 (Invasive Breast Cancer 1) com 100% de homologia ao gene DCD. Neste estudo foi sugerido que a DCD age como um fator de crescimento e sobrevivência uma vez que a proteína está superexpressa em uma fração significativa de carcinomas invasivos da mama com características de mau prognóstico. Por outro lado, foi demonstrado que a proteína não é expressa normalmente em células mamárias normais. Assim é possível que a DCD atue por mecanismo autócrino e/ou parácrino (2).

### *1.4 Peptídeos antimicrobianos*

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas proteicas curtas com menos de 100 aminoácidos com atividade antimicrobiana de amplo espectro, podendo incluir efeito bacteriostático, microbicida e citolítico. Devido à ampla distribuição em todo o reino animal e vegetal acredita-se que os PAMs tenham tido um papel fundamental na evolução dos organismos (20, 21). Peptídeos antimicrobianos são considerados as armas defensivas da mais alta eficiência. Partindo do contexto sobre o desenvolvimento de mecanismos de defesa dos microrganismos contra substâncias lesivas, acredita-se que os PAMs também tiveram uma evolução que poderia ser chamada de “calcanhar de Aquiles microbiano”. O estudo deste braço da imunologia inata tem fornecido grandes novidades que por sua vez geraram

considerável esforço comercial para criar novas classes de agentes terapêuticos anti-infecciosos (20). Apesar dos PAMs serem a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos, ironicamente, este é um tópico muito negligenciado pelos imunologistas, e normalmente só é abordado em passagens dos livros didáticos de imunologia (21, 22). A imunidade adaptativa tem a plasticidade que permite uma espécie explorar novos ambientes. No entanto, os efetores da imunidade adaptativa são mais onerosos e a resposta mais lenta as infecções, se comparado com os peptídeos antimicrobianos envolvidos na resposta inata (23, 24).

Todos os PAMs são derivados de precursores maiores. Modificações pós-traducionais que podem incluir o processamento proteolítico, e em alguns casos, a glicosilação, amidação do terminal carboxila, isomerização do ácido aminado e a halogenação (25, 26). Um exemplo é a defensina isolada de neutrófilos de macacos da espécie *Rhesus*. Neste caso é necessária a presença de cátions para a ciclização de dois peptídeos curtos adotando a forma da letra U (27). Vários outros exemplos de peptídeos são derivados por proteólise a partir de proteínas precursoras, tais como a buforina II de histona 2A e lactoferrina (28, 29).

Existem várias hipóteses para tentar explicar os mecanismos de ação dos PAMs; as estudadas mais profundamente são as seguintes: a despolarização fatal da membrana bacteriana; a formação de poros físicos causando desequilíbrio osmótico (30, 31), a ativação de processos líticos por indução de hidrolases que degradam a parede celular levando a morte; má distribuição de lipídios entre os folhetos da bicamada resultando na perturbação das funções da membrana, e por último, a ocorrência de danos intracelulares em componentes vitais da bactéria após internalização do peptídeo (32-34).

A diversidade de sequências de PAMs é tão grande que raramente a mesma sequência de peptídeo é vista em duas espécies mesmo que próximas, por exemplo, homem e primatas. Uma exceção pode ser os peptídeos processados por enzimas proteolíticas como a buforina II citada acima. Porém, a conservação de algumas sequências, ou até pró-regiões reconhecidas de algum precursor similar, pode sugerir que existam restrições com relação às sequências envolvidas na tradução, secreção ou endereçamento intracelular (26, 35).

A diversidade de PAMs já descobertos é tão grande que tem gerado dificuldades para a sua classificação. Em 2003 pesquisadores da Universidade de Trieste criaram um banco de dados de PAMs que contabiliza cerca de 500 PAMs (20). Talvez uma das formas de se tentar achar um ponto em comum para a classificação seria com base na sua estrutura secundária. Estudos com PAMs sugerem que a sua ação seja fundamentalmente na capacidade de estruturação da cadeia peptídica, adotando uma forma onde os aminoácidos hidrofóbicos e

catiônicos são organizados discretamente em uma molécula com característica anfipática. Alguns peptídeos lineares só conseguem adotar uma conformação de estruturação helicoidal a partir do momento em que há o contato com a membrana, enquanto alguns PAMs têm a necessidade de adição de cofatores. Com respeito à diversidade criada por síntese em laboratório, quase todas as moléculas ativas são compostos por aminoácidos hidrofílicos, hidrofóbicos e catiônicos dispostos em uma molécula que pode se organizar em uma estrutura anfipática (36).

Os PAMs têm diferenças no que se trata a alvos de ação; em geral estes alvos desempenham atividade fundamental nas membranas de microrganismos e animais multicelulares. Membranas bacterianas são organizadas de tal modo que o lado externo da bicamada, a superfície exposta ao mundo exterior, é densamente povoada por lipídios, como os fosfolipídios carregados negativamente. Em contraste, o exterior das membranas de plantas e animais é composto principalmente de lipídios sem carga. A maioria dos lipídios com carga negativa está localizada no interior da mesma e voltada para o citoplasma (34). Um modelo que ajuda a explicar a atividade da maioria dos PAMs é o modelo de Shai-Matsuzaki-Huang (31, 34, 37). O modelo propõe que a interação do peptídeo com a membrana segue com um deslocamento de lipídeos alterando a estrutura da membrana, podendo haver a internalização de peptídeo na célula alvo. Um dos fatores que pode atrapalhar a atividade é a presença de colesterol, pois pode haver interação entre o colesterol e o PAM, podendo diminuir a sua atividade. Outro fator que pode causar diminuição é o aumento da força iônica no meio em que se encontra, pois isto pode causar enfraquecimento das interações eletrostáticas necessárias para a interação. Este modelo geralmente é capaz de causar atividade com concentração na ordem de micromolar.

#### 1.4.1 Classificação estrutural dos PAM

Muitos PAMs compartilham características semelhantes, como uma carga líquida positiva e anfipaticidade, portanto, não é inteiramente simples de classificá-los com base apenas nas características físicas. Além disso, os PAMs estão presentes em todos os seres vivos; as formas e diversidade de sequência entre eles é tão grande, que é difícil classificá-los com base na similaridade de sequência (38, 39). Como uma alternativa, a conformação adotada por um peptídeo na interação com membranas bacterianas, pode por vezes, ser uma base útil e mais apropriada para a sua classificação.

Alguns PAMs podem exibir uma estrutura randômica. Os PAMs podem apresentar uma grande carga catiônica representada pelos resíduos de lisina e arginina, enquanto os aniônicos apresentam os resíduos de aspártico e glutâmico ácido, porém estes são relativamente raros. A maioria dos PAMs pode apresentar uma carga positiva, em média +4. A preferência para certos aminoácidos em diversos PAMs leva em conta suas características específicas que conferem um desempenho específico ao peptídeo. Por exemplo, a carga catiônica da grande maioria dos PAMs é um resultado da anionicidade presente da maioria dos microrganismos. Devido a presença de cargas opostas, os PAMs podem atingir a concentração lítica em bactérias com membranas aniônicas. Além disso, é importante para anfifilicidade de muitos PAMs, a fim de adsorver e perturbar membranas, mas para isso é necessário que o comportamento dos aminoácidos seja o mais específico para que ocorra a interação (21).

#### **1.4.1.1 Peptídeos helicoidais**

Peptídeos helicoidais são mais distribuídos e seus estudos mais proeminentes na literatura, constituindo aproximadamente 27% de todos os PAMs com estrutura secundária conhecida (40, 41). Muitos desses peptídeos exibem características anfifílicas distintas, sendo quase na maioria com cerca de 50% de resíduos hidrofóbicos. A explicação encontrada para responder a este fato é a necessidade da estrutura  $\alpha$ -helicoidal em que os resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos se encontram em lados opostos da hélice, resultando assim em uma anfifilicidade dependente da conformação. Frequentemente, estes peptídeos são estruturados em um ambiente aquoso, mas adotam uma conformação helicoidal em membranas lipídicas (42). PAMs pertencentes a este grupo usualmente matam microrganismos criando “defeitos” na membrana, o que produz uma perda de eletrólitos. Um dos peptídeos mais bem estudado desta classe é a catelicidina (43). Ela faz parte do grande grupo de PAMs catiônicos. Existem também peptídeos aniônicos e hidrofóbicos, com exemplos, a lisenina e a DCD (1, 44). No entanto, devido à sua fraca solubilidade, esta classe apresenta uma seletividade menor para certos micróbios e células de mamíferos (45).

#### **1.4.1.2 Peptídeos folha- $\beta$**

Em contraste aos peptídeos helicoidais, peptídeos folha- $\beta$  são frequentemente moléculas cíclicas estruturadas por pontes de dissulfeto. Os peptídeos mais bem estudados

neste grupo são as defensinas e as protegrinas (PG). Protegrinas, originalmente isoladas de leucócitos, são ricas em arginina e apresentam entre 16 e 18 resíduos de aminoácidos, com duas pontes dissulfeto de cistinas intramoleculares, apresentando uma estrutura de folha- $\beta$ -anti-paralela (46). Devido à restrição desta estrutura, as PGs possuem uma natureza anfipática comum à maioria dos PAMs. No entanto, esta estrutura rígida, impede as PGs de se submeter a significativas mudanças conformacionais após a associação com membranas; ou após a oligomerização, refletindo em maior toxicidade contra células eucarióticas (47). Esta propriedade não é observada com as defensinas. A manutenção do balanço hidrofóbico e hidrofílico bem como a ciclização são importantes para a atividade antimicrobiana deste grupo de peptídeos (48, 49).

### 1.5 *Interação com lipídios*

Já nos primeiros estudos com peptídeos foi verificado que as interações proteicas podem acontecer por diversos tipos de interações, tais como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, entre outras. As interações são de extrema importância para a manutenção da estrutura e função dos peptídeos. Podemos ter desde pontes de hidrogênio para a manutenção de hélices e folha- $\beta$ , como também outras diversas interações que colaboram na estruturação de proteínas globulares (50).

Os lipídios são estruturas carbônicas com tamanho variado que vão desde quatro carbonos até dezenas de carbonos. A definição dada por diversos livros é que lipídios são moléculas orgânicas solúveis em solventes orgânicos e insolúvel em água. Dada a sua ampla distribuição pelo corpo, sua importância é vital para a sobrevivência. Em sua vasta gama de utilidades podemos citar entre os muitos exemplos, a síntese de hormônios e vitaminas, transportadores endógenos e membranas celulares. Podem ser encontrados no corpo de diversas formas e associados com a estrutura de outras moléculas, permitindo que seja utilizado para todas as funções acima descritas e muitas outras não citadas. Algumas das moléculas que podemos citar que diferenciam estes lipídios são os ácidos graxos, que são a base de praticamente todos os lipídios. São alguns exemplos: triacilgliceróis que tem em sua estrutura um grupo acil esterificado com três ácidos graxos; glicerofosfolipídios que é um componente lipídico muito presente em membranas; esfingolipídios que são muito frequentes em neurônios, e o colesterol que é o componente mais abundante das membranas biológicas (51).

A interação proteica com lipídios está muito presente nas células, desde receptores de membrana, como canais e transportadores, até proteínas de membranas, que ajudam na manutenção do citoesqueleto celular. As proteínas podem tanto fazer parte das membranas, bem como ficar ancoradas a elas por diversos tipos de ligações. Um dos tipos comuns de ligação é a interação eletrostática. Um dos exemplos é a ativação do citocromo *c* no interior de mitocôndrias, na qual as micelas de fosfolipídios podem interagir eletrostaticamente com proteínas básicas, formando complexos estáveis. Cada molécula de citocromo *c* conta em sua estrutura com uma carga +8 que se liga em grupamentos negativos dos fosfolipídios. Este exemplo citado é extremamente importante na cadeia respiratória durante a transferência de elétrons para a formação de ATP. Outro tipo de molécula que pode se complexar com fosfolipídios são os metais bivalentes, como exemplo, o íon  $\text{Ca}^{2+}$ . As interações eletrostáticas são importantes, mas não são as principais fontes de interação que podem ser vistas e nem as ligações que mais definem a complexação entre proteínas e lipídios.

Outro tipo de interação muito presente e que pode ser definida como a mais importante para o evento, é a interação hidrofóbica do complexo proteína-lipídio. Essas interações são praticamente resistentes à força iônica do meio, como também podem ajudar na manutenção da estrutura, mesmo em grandes temperaturas. Uma das particularidades para que a interação hidrofóbica seja ainda mais estável é a presença de insaturações na molécula dos lipídios. Green e colaboradores publicaram que apenas a cinética de ligação que modificava com a quantidade de insaturações, sugerindo certa plasticidade molecular nos sítios de ligação, pois não havia diferença quando o lipídio era mono ou poli-insaturado (52).

A membrana celular é reconhecida como uma parede que pode servir de separação e proteção celular. Elas fornecem barreiras de permeabilidade especializadas para as células e suas organelas, nos quais a interação de lipídios e membranas proteicas facilita os processos básicos como respiração, fotossíntese, transporte de solutos e outras moléculas maiores, transdução de sinal, motilidade, entre outros processos. A bicamada lipídica impede a difusão de íons, um pré-requisito para a geração de potenciais eletroquímicos utilizados para a síntese de ATP ou transporte ativo (53, 54).

A composição lipídica entre os tipos celulares são significativamente distintos entre as membranas de procariotos e eucariotos bem como entre os tipos celulares. Membranas bacterianas são feitas de fosfolipídios carregados negativamente, como as protegrinas citadas anteriormente e cardiolipina, que são estabilizados por cátions bivalentes tais como  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (55). As bactérias gram-negativas diferem das gram-positivas, as primeiras apresentam uma camada reduzida de glicanos e uma membrana exterior que é rica em LPS

(lipopolissacarídeo), um composto que atua na manutenção da permeabilidade de membranas (56). Curiosamente, alguns PAMs conseguem desestabilizar o arranjo das membranas induzindo o íon  $Mg^{2+}$  e se deslocar entre as moléculas de LPS (57). Em contraste, os fungos têm as membranas mais ricas em fosfomananas e outros componentes relacionados, como exemplos, o fosfatidil-inositol e o difosfatidil-glicerol, que são elementos que dão uma maior superfície de carga negativa para as membranas (58, 59).

Vários estudos têm demonstrado os requisitos específicos de lipídios para a integridade estrutural e a função adequada das proteínas de membrana. Os efeitos e tipos de interações proteína-lipídio são diversas, como já citadas anteriormente. Elas podem ser necessárias para a estabilidade de proteínas de membrana e ter uma função semelhante à chaperoninas no dobramento e estruturação de processos de transporte através da membrana. A bicamada lipídica que exerce pressão lateral afeta a integridade estrutural das proteínas da membrana. A desestabilização provocada pela a solubilização induzida por detergentes pode, em geral, diminuir a pressão lateral e aumentar liberdade conformacional das proteínas (60).

Os lipídios e componentes proteicos de uma membrana biológica podem perfeitamente ter evoluído conjuntamente para permitir a manutenção de proteínas de membrana no ambiente fornecido pela bicamada lipídica e para permitir que a inserção de proteínas de membrana na bicamada sem nenhuma perda de função e/ou estrutura. Ao longo dos últimos anos, informações mais precisas sobre as interações lipídio-proteína começaram a emergir dos estudos estruturais de alta resolução de proteínas de membrana, que por suas vezes incluem também moléculas lipídicas (61).

A noção amplamente aceita é a de que interações eletrostáticas entre os aminoácidos carregados positivamente e as moléculas de LPS carregadas negativamente, no caso o grupo da cabeça dos fosfolipídios, estão envolvidos na ligação e acumulação dos peptídeos na superfície da membrana (38). Embora a orientação específica de um peptídeo possa variar entre sistemas, o que normalmente pode ocorrer é um aumento na concentração de peptídeo na membrana até que um limiar de concentração seja alcançado (58). Entre os parâmetros que influenciam o limiar de concentração podem incluir a propensão do PAM em auto-estruturação, a carga do peptídeo, anfipaticidade e hidrofobicidade, como também a fluidez e a composição da membrana (31, 58). A ligação de peptídeos e a sua incorporação à membrana lipídica são vitais para que se iniciem os “defeitos” na membrana, como representado na Figura 4.

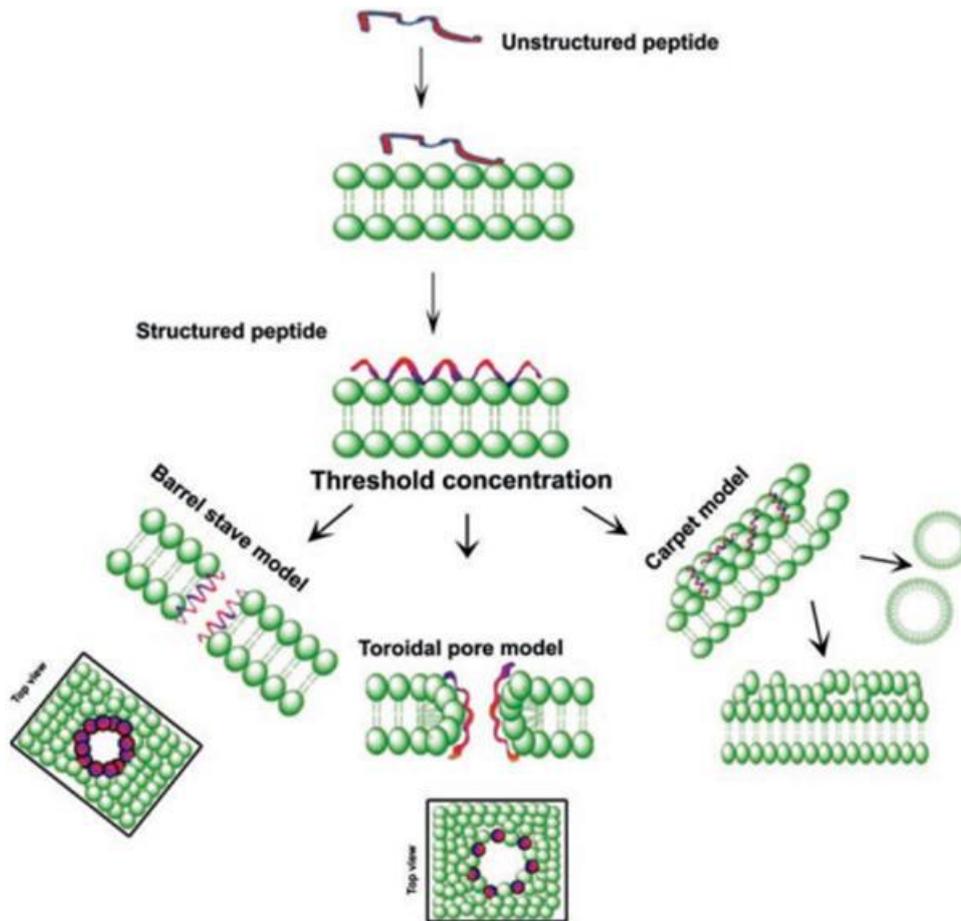


Figura 4 Esquema demonstrando os possíveis passos que um PAM poderia seguir desde a interação inicial com a membrana até seus possíveis mecanismos de ação (21)

Os peptídeos após a sua interação com a membrana podem adquirir diferentes estruturas conformacionais que induzem certos defeitos que desestabilizam o equilíbrio osmótico celular. Os três modelos mais conhecidos para explicar o mecanismo de ação dos PAMs são apresentado na figura 4. O modelo barril sugere que cada peptídeo se comporta como uma ripa de um barril (Barrel-stave), também conhecido por pacotes de  $\alpha$ -hélices. Este mecanismo foi proposto por Ehrenstein e Lecar em 1977 (62). Este modelo pressupõe que um número variável de peptídeos individuais interage para formar um poro ou canal (Figura 4). Neste mecanismo, a porção hidrofóbica pode interagir com as cadeias lipídicas na membrana, gerando um poro linear aquoso contendo pelo menos quatro peptídeos (62, 63). Um passo fundamental neste modelo é que os peptídeos têm reconhecer um ao outro, quando ligado a membrana. Ele é energeticamente muito desfavorável para um único peptídeo atravessar a membrana, portanto, os peptídeos devem se agregar na superfície até que a concentração limite seja alcançada, e, em seguida, inserir o núcleo hidrofóbico na membrana, passando por

uma fase de transição conformacional, forçando os grupos de cabeça polar de fosfolipídios para os lados da membrana (64).

O modelo toroidal pode ser formado por uma variedade maior de peptídeos. Primeiramente o peptídeo é adsorvido paralelamente a membrana lipídica, até certa concentração de peptídeo, após isto, o peptídeo deve produzir na membrana uma curvatura resultando em uma abertura chamada de poro toroidal. No mecanismo de formação de carpete, as moléculas de peptídeo são adsorvidas paralelamente na superfície da membrana, formando um agregado que cobre a superfície da bicamada lipídica, como um “carpete” de moléculas. Neste modelo propõe-se que seja necessário um acúmulo de grande quantidade de peptídeos na superfície da bicamada lipídica e, ao atingi-la, ocorre um tipo de ação detergente, causando a solubilização de fragmentos da bicamada (processo de micelização).

### *1.6 Relevância biológica das formas splices variantes de proteínas*

Embora as funções e papéis biológicos sejam conhecidos para muitas proteínas, o conhecimento de certas isoformas proteicas oriundas de splicing variante (SV) ou alternativo de uma proteína particular, é muitas vezes escasso. Apenas um gene da origem a distintas proteínas que diferem apenas em seus padrões de expressão e propriedades (65, 66). Isto inclui como e por que uma isoforma verificada de uma proteína pode apresentar diferentes padrões de expressão, como por exemplo:

- I) É expressa, e, se assim for, em qual o tipo de célula e em que fase do desenvolvimento;
- II) É alterada com a doença;
- III) Tem localização celular distinta e função específica.

O processo de splicing é citado como um único gene, que normalmente seria responsável pela tradução de apenas um tipo de proteína, pode ser responsável por um número maior. Fisiologicamente temos muitos exemplos de splicing que ocorrem de maneira natural e predita. Entre os mais estudados estão os splices variantes dos seguintes fatores de crescimento e citocinas: fatores de crescimento de fibroblastos (FGF-1 e FGF-2); fatores de crescimento transformantes (TGF- $\beta$ 1, TGF-2 e TGF- $\beta$ 3); fatores de crescimento insulín-like (IGF-1 e IGF-2); fatores estimuladores de colônias de macrófagos (CSF-1 e CSF-4); interleucinas (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e fatores de crescimento derivados de plaquetas; da placenta e do endotélio vascular (PDGF, PGF e VEGF). Estes fatores de crescimento e citocinas, bem

como os seus splices variantes, estão envolvidos em uma vasta série de processos biológicos e patologias. Alguns deles têm sido apontados como alvos para agentes terapêuticos (67, 68).

Desde o início dos estudos com o VEGF, houve um grande interesse no desenvolvimento de estratégias farmacológicas que vai desde o bloqueio dos receptores, diminuição do nível sérico circulante, até a inibição da via de sinalização intracelular. Embora os splices variantes de VEGF apresentem propriedades pró-angiogênicas, vários novos variantes de VEGF com propriedades anti-angiogênicas foram identificados e testados para a busca por moléculas mais eficientes na terapia anti-angiogênica em pacientes oncológicos (65, 69).

Outro estudo foi dedicado ao fator de crescimento IGF- I teve por objetivo melhor compreender o mecanismo de ação das três formas variantes da família (IGF-IEA, IGF-IEB e IGF-IEC, conhecido também por MGF). O IGF-I produzido no músculo esquelético é conhecido por desempenhar um papel no desenvolvimento do músculo esquelético, crescimento e reparação. Já as formas variantes são expressas nos músculos de idosos e após o exercício físico. A família da IL-1, por exemplo, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , é bem conhecida por ser mais importante no desenvolvimento e regulação da inflamação. Por outro lado, a função da IL-37 não foi bem explicada ainda. Boraschi e colaboradores publicaram em 2011 novas evidências mostrando que IL- 37 é de fato uma nova citocina da família da IL-1 que exerce ação anti-inflamatória (70, 71).

## 2 OBJETIVOS

A elucidação e compreensão de aspectos biofísicos e bioquímicos durante a interação do peptídeo dermicidina e da sua forma variante com vesículas lipídicas visando entender seus mecanismos de ação.

### 2.1 *Objetivos específicos*

- Clonagem, expressão, purificação e sequenciamento da proteína recombinante por métodos de cromatografia, gel filtração, troca iônica, cromatografia líquida de alta pressão e espectrometria de massa;

- Caracterização físico-química, funcional e estrutural dos peptídeos sintéticos DCD-IL e DCD-SV durante a interação com vesículas unilamelares gigantes empregando-se a microscopia óptica e de fluorescência, e a espectroscopia de dicroísmo circular.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 *Clonagem, sequenciamento e expressão e purificação da DCD nativa*

##### 3.1.1 *Clonagem*

As clonagens do cDNA do mRNA da DCD sem sua sequência sinal foram feitas nos vetores pAE e pTYB2, conforme descrito abaixo.

##### 3.1.2 *pAE-DCD*

O cDNA do gene da DCD foi obtido do clone pTripEX2-DKFZp313H1523 (German Cancer Research Center, DKFZ, Alemanha) que contém a EST AL598959 correspondente ao mRNA completo do gene DCD. Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) para a amplificação por PCR de um produto de 330 bp estão indicados abaixo. Nestes primers foram adicionados, nos extremos 5' e 3', os sítios de restrição para as enzimas BamH1 e EcoR1, que apresentam as seguintes sequências palindrômica de clivagem: G↓GATCC e G↓AATTC, respectivamente, conforme sublinhados abaixo.

*Sense:* 5' - GGATCCCAAGATCTCCAAGGATTCG-3'  
**BamH1**

*Antisense:* 5' - GAATTCTTTTTACAGATGCTTTCAG-3'  
**EcoR1**

Com a finalidade de gerar um segundo inserto sem a região 5' do cDNA que codifica a sequência do peptídeo sinal da proteína, que inviabiliza a expressão em bactérias, uma nova subclonagem foi realizada com os seguintes primers:

*Sense:* 5' - GGATCCGATGATCCAGACGCCGCC-3'  
**BamH1**

*Antisense:* 5' - GAATTCTTTTTACAGATGCTTTCAG-3'  
**EcoR1**

Para realizar a subclonagem do produto de PCR (inserto), uma amostra de plasmídeo pAE foi digerida com as mesmas enzimas de restrição acima, em tampão R [Tris HCl 10 mM, pH 8.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 100 mM e BSA 0.1 mg/mL] durante 4 h, a 37 °C, utilizando-se 1-10 unidades de cada enzima. A reação de ligação foi feita incubando-se uma mistura do inserto e plasmídeo (3:1) com a enzima T4 ligase (Invitrogen) em tampão 2x Quick Ligation

Buffer [Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1 mM, dithiothreitol 10 mM, pH 7.5]. A mistura foi incubada por 16 horas a 15°C. O vetor pAE foi escolhido porque contém em sua matriz o sistema pET (Novagen) e o sistema pRSETA (Invitrogen). Este vetor também possui parte do vetor pRSETA de alto poder de replicação e o promotor Fago T7 RNA polimerase de alta expressão e confiabilidade.

Posteriormente os produtos de ligação foram usados para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5α (Novagen) utilizando método de choque térmico, conforme descrito (72). As bactérias quimiocompetentes foram submetidas à temperatura de 42 °C por 90 segundos (promove a abertura de poros facilitando a entrada do plasmídeo), seguida da incubação por 2 minutos em banho de gelo (fechamento dos poros). O DNA dos clones transformantes foi isolado e purificado usando o kit Concert Miniprep Extraction System (Invitrogen). A correta inserção do cDNA e a ausência de possíveis mutações foram confirmadas por sequenciamento de DNA usando o sistema Big Dye Terminator e sequenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosciences). Os resultados obtidos mostraram que o plasmídeo pAE-DCD continha em sua sequência o cDNA íntegro do gene DCD associado a sequência codificadora da cauda de 6 resíduos histidina na região 5'.

### 3.1.3 pTYB2-DCD

O vetor pTYB2 (NEB) escolhido foi mesmo utilizado em um artigo anterior que descreve a expressão e purificação da DCD-1L recombinante (14). Foram sintetizados pares de primers com o sítio de clonagem para as enzimas de restrição NdeI e XhoI que contém como sequência de clivagem palindrômica CA|TATG e C|TCGAG, respectivamente. Os primers desenhados foram os seguintes:

Sense: 5'- GGTGGT**CA**TATG****TATGATCCAGAGGCCGCCTCTGCCCA -3'  
**NdeI**

Antisense: 5'- TTGACC**C**TCGAG****CTATAGTACTGAGTCAAGGACGTCTTT -3'  
**XhoI**

O inserto foi amplificado por PCR usando os primers acima. As etapas da reação foram a seguinte: reação de desnaturação, 95 °C por 10 minutos, reação de desnaturação, 63 °C por 30 segundos; reação de extensão, 72 °C por 90 segundos, passos estes repetidos por 35 ciclos, e reação de extensão final, 72 °C por 5 minutos. Em seguida, o vetor e inserto foram clivados por digestão dupla com as enzimas de restrição NdeI e XhoI utilizando tampão R

[Tris HCl 10 mM, pH 8.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 100 mM e BSA 0.1 mg/mL] e incubação por 4 h à 37°C, utilizando-se 1-10 unidades de cada enzima. A reação de ligação foi feita utilizando-se 1 µl da enzima T4 ligase (Invitrogen) em tampão 2x Quick Ligation Buffer, e uma alíquota da mistura vetor : inserto, na relação 1:3, 1:1 e 3:1, à 30 °C durante 4 horas. Para a transformação, foi incubada uma alíquota de 2 µl da reação de ligação com uma alíquota de *E. coli* DH5α, cepa escolhida por não fazer recombinação do DNA plasmidial inserido. As colônias positivas foram cultivadas em meio LB e, em seguida, foi feita purificação de DNA plasmidial, amplificação por PCR e análise de restrição, nas mesmas condições já descritas acima.

### 3.2 Sequenciamento de oligonucleotídeos

As reações de sequenciamento foram feitas segundo o método de terminação de cadeia com dideóxi-nucleotídeos utilizando-se o kit Big Dye (Applied Biosystems) e sequenciador automático ABI Prisma 377. Para o preparo das amostras para sequenciamento foram utilizados 500 ng de DNA, 10 µM de oligonucleotídeo, 4 µL de tampão de reação 2.5x [200 mM Tris-HCl, pH 9, e 5 mM MgCl<sub>2</sub>] e 2µL da solução Big Dye Terminator Ready Reaction Mix. A reação de PCR seguiu os seguintes passos: 30 ciclos com variações consecutivas de temperaturas 95 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 60 °C por 3 minutos. Após amplificação, o DNA foi precipitado em placa de 96 poços, usando uma mistura de 25 µL de etanol absoluto gelado, 1 µL de acetato de sódio 3 M em pH 5,2 e 1 µL de glicogênio 1 g/L. Após agitação breve, a placa contendo as amostras a serem sequenciadas foram incubadas em banho de gelo por 15 minutos e centrifugadas por 20 minutos a 7 000 rpm à temperatura de 25 °C. O sobrenadante foi removido e as amostras secas através de centrifugação por *spin* invertido com as placas apoiadas sobre papel de filtro. Depois de lavado rapidamente com 25 µL de etanol 70 % gelado, o DNA resultante, precipitado no fundo da placa, foi ressuspense em 2,5 µl de formamida ILoading buffer (Kit BigDye) e incubado durante 5 minutos a 60 °C. As amostras foram homogeneizadas em vortex, desnaturadas a 90 °C durante 2 minutos, e em seguida, incubadas em banho de gelo por mais dois minutos. Após a desnaturação, as amostras foram processadas em sequenciador automático ABI Prisma 377.

### 3.3 Cultivo e expressão

As bactérias foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) [Tryptona 10 g, extrato de levedura 5 g e NaCl 10 g, volume 1 L], à 37 °C na presença dos antibióticos de seleção ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 50 µg/mL. A cultura foi mantida sob agitação constante até atingir uma OD entre 0,4 e 0,6, no comprimento de onda de 600 nm. Em seguida, foi adicionado IPTG 0,5 mM; a incubação foi continuada por mais 12 h a temperatura entre 20-25°C. A adição de IPTG promove a indução da expressão da enzima T7 RNA polimerase que é responsável pelo início da síntese proteica bacteriana (72-74).

### 3.4 *Lise celular*

#### 3.4.1 *Lise inicial*

O pellet bacteriano foi colhido por precipitação a 3000 rpm em centrífuga SORVAL, modelo 5810R. O pellet foi lavado por centrifugação 2x com 20 mL de tampão de ligação I [Tris 50 mM, NaCl 100 mM em pH 7,5]. A lise do extrato foi feita utilizando-se o equipamento French Pressure Cell Press (Thermo Softronics) com pressão interna de 2000 psi, seguindo por pulsos de ultra-som com frequência de 60 Hz e adição de 10 µl da solução BugBuster (Novagen, Inc). O sobrenadante foi colhido após centrifugação a 15.000 rpm e filtrado em filtro de 0,45 µm (Millipore), conforme descrito (72).

#### 3.4.2 *Lise secundária*

O pellet bacteriano foi colhido por precipitação a 3000 rpm em centrífuga SORVAL, modelo 5810R. O pellet obtido foi lavado 2x com 20 mL de tampão de ligação II [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 100 mM, BME 1 mM e PMSF 5 µM, pH 7,0]. Em seguida, o lisado foi aquecido a 60 °C por 30 minutos, seguido da adição de 5 µM de PMSF, inibidor de proteases, e 5 µM de benzonase que promove a clivagem do DNA bacteriano. A lise do extrato bacteriano foi continuada pelo método mecânico, utilizando-se o equipamento French Pressure Cell Press (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) ajustada para a pressão interna de 2000 PSI. O sobrenadante foi colhido após a centrifugação a 15 000 rpm e filtrado em filtro de 0,45 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

### 3.5 *Ensaio de purificação de proteínas*

Nesta etapa, utilizou-se o sistema de cromatografia líquida de desempenho rápido para proteína (Fast Protein Liquid Chromatography) modelo AKTA FLPC Purifier (GE Healthcare), localizado no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo.

### 3.5.1 Purificação por cromatografia de afinidade em resina Ni<sup>2+</sup>-sepharose

Nestes ensaios foi empregada a resina de afinidade de Níquel-Sepharose HiTrap™ Chelating (GE Healthcare) de 1 mL de volume de coluna (CV). A coluna de sepharose acoplada a moléculas de níquel promove a retenção de proteínas contendo calda de resíduos de histidina. A eluição das proteínas ligadas à coluna ocorre por competição com imidazol – uma molécula que apresenta uma estrutura com grande similaridade com o anel presente na estrutura da histidina. Em resumo, a coluna foi previamente tratada com sulfato de níquel e equilibrada com tampão de ligação I [Tris 50 mM, NaCl 100 mM em pH 7,5]. Uma alíquota do lisado bacteriano foi injetado na coluna a uma vazão de 0,5 mL / min, em seguida, a resina foi lavada com 5 CVs do tampão de ligação I. As proteínas recombinantes retidas na coluna foram eluídas com gradiente linear de imidazol, nas concentrações: 50 mM, 100 mM, 250 mM e 500 mM, respectivamente. Similar protocolo foi realizado utilizando o tampão de fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (73).

### 3.5.2 Preparação das frações para etapa de cromatografia de troca iônica

As frações de proteínas coletadas na etapa acima foram purificadas através da cromatografia de troca iônica e de exclusão por massa molecular. Para tanto, as frações coletadas foram primeiramente cromatografadas em uma resina de exclusão de massa molecular P10 Desalting coluna (GE Healthcare) equilibrada com o tampão de ligação [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 100 mM em pH 7,5]. Esta etapa serviu para eliminação do imidazol que interfere com as etapas seguintes da purificação.

### 3.5.3 Cromatografia de troca iônica

Nestes experimentos foi empregada a coluna de troca iônica Resource Q 1 mL (CV) (GE Healthcare) preparada com resina de poliestireno trocadora de ânions. A purificação foi realizada ligando-se as proteínas à resina através do tampão de ligação de baixa concentração

de salina [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 100 mM em pH 7,5], seguida de várias lavagens para retirada de ligantes inespecíficos com 5 CV do tampão de ligação. As proteínas recombinantes retidas na coluna foram eluídas com gradiente linear de NaCl, nas concentrações 100 mM, 250 mM, 500 mM e 1 M, respectivamente.

#### 3.5.4 Cromatografia de exclusão por massa molecular

Nestes experimentos foram empregadas colunas de exclusão por massa molecular (ou gel-filtração) preparadas com resina Superose 12 com um volume de coluna de 24 mL, e colunas preparadas com Superdex 75 com volume de coluna de 90 mL (GE Healthcare). As proteínas de maior massa molecular passam mais rapidamente enquanto as menores demoram devido retenção dentro dos poros da resina. A purificação foi realizada por fluxo contínuo utilizando tampão  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM ou  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM (73).

### 3.6 Metodologias confirmativas

#### 3.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O método empregado foi conforme descrito por Laemmli (1970) utilizando-se sistema mini-gel vertical (BioRad). Os géis de poliacrilamida foram preparados na concentração de 14-16% pois apresentam uma malha mais adequada para separação de proteínas de baixa massa molecular. Na preparação do gel foram usadas as seguintes soluções: acrilamida 30% [acrilamida 29,2%, bis-acrilamida 0,8% (p/v)], SDS 10% (p/v); TEMED 0,12%, persulfato de amônio (100 mg/ml, p/v) e tampão Tris/HCl 1 M em pH 8,8. O gel de empacotamento foi preparado na concentração de 5% de poliacrilamida, conforme descrito acima, diferindo apenas a solução tampão Tris/HCl que foi substituída para Tris/HCl 0,5 M em pH 6,8.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra contendo a seguinte composição: Tris/HCl 60 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 5% (v/v) e ureia 400 mM, e no caso das amostras reduzidas, o tampão continha solução de beta-mercaptoetanol (BME) à 3% (v/v). As amostras foram aquecidas a 99 °C por 10 minutos. A separação das proteínas foi realizada na presença de tampão de corrida [Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1%, pH 8,5] a uma amperagem de 75 mA por aproximadamente 2 h utilizando-se uma fonte de energia de 200 V (BioRad).

### 3.6.2 Western Blotting

#### 3.6.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O procedimento utilizado segue o mesmo descrito acima no item 3.6.1.

#### 3.6.2.2 Eletrotransferência

As amostras separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose através do sistema de transferência úmida na presença do tampão Tris/HCl 24 mM, glicina 192 mM, metanol 4% em pH 8,3. A transferência foi realizada em voltagem constante 100 V e amperagem variável início 250 mA e final 500 mA. Ao término da transferência, o papel de nitrocelulose ou PVDF foi corado com solução de Ponceau S 0,2 % dissolvido em ácido tricloro acético (TCA) 3% (p/v) para verificar a eficiência da transferência.

#### 3.6.2.3 Ensaio de revelação de membrana de nitrocelulose

A detecção das proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose foi feita através de duas lavagens com tampão PBS de bloqueio [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM em pH 7,4, Tween 20 0,01% e albumina 0.5% (p/v)]. Em seguida foram realizadas mais 3 lavagens de 10 minutos com tampão PBS-T [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM em pH 7,4, Tween 20 0,01%]. A membrana de nitrocelulose foi incubada em solução com anticorpo policlonal produzido em coelhos contra DCD (Abgent, San Diego, CA, USA), diluição 1:1000, em tampão PBS-T [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM em pH 7,4, Tween 20 0,01%] a 4 °C por aproximadamente 12 h. Após este período foram realizadas lavagens em PBS-Tween 20 como descrito anteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG acoplado com peroxidase (diluição 1:5,000) a temperatura ambiente em tampão de bloqueio por 1 hora. Em seguida, a membrana foi submetida a duas lavagens com PBS-Tween e outras duas lavagens em tampão PBS, 10 minutos cada. A revelação foi realizada pelo método de quimioluminescência utilizando-se o Kit SuperSignal-West Pico (Pierce).

### 3.6.3 Sequenciamento do N-terminal de proteínas

O sequenciamento da porção N-terminal das proteínas purificadas foi obtido pelo método de degradação de Edman usando um sequenciador PPSQ-23 (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan), localizado no Instituto de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo. A eluição dos aminoácidos derivatizados foi feita com o reagente PITC (Phenyl isothiocyanate) utilizando um HPLC em sistema isocrático.

#### 3.6.4 Espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF MS/MS

As frações purificadas pelos métodos acima foram submetidas ao sequenciamento em espectrômetro MALDI-TOF MS, Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), localizado no Centro de Terapia Celular e Molecular da UNIFESP. Uma amostra contendo 1  $\mu\text{L}$  da amostra em tampão  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50-100 mM foi adicionado à 1  $\mu\text{L}$  em de solução matriz  $\alpha$ -cyano-4-hidroxycinnaminico (10 mg/mL) depositada em placa de aço inoxidável (Bruker Daltonics, Alemanha), conforme protocolo do fabricante.

O espectro de massa foi obtido no modo linear de íons positivos ajustados e verificados pelo software Flex Control 3.3. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: atraso na extração do pulso iônico de 350 ns, primeira fonte iônica de voltagem ajustada em 19,5 kV e a segunda fonte ajustada para 18,3 kV e lente de fonte iônica de voltagem em 7 kV. O espectrômetro foi calibrado utilizando o padrão de calibração proteica I (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) contendo a faixa de massa que varia de 4 kDa a 20 kDa. Para cada amostra, o espectro de massa foi adquirido com a contagem de 4.000 tiros de laser em potência variando de 30 a 70% em amostras com massa de 2 kDa a 40 kDa.

### *3.7 Metodologias para análise da interação de peptídeos e sistema biomimético*

#### 3.7.1 Preparação de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) e pequenas (SUVs)

Vesículas unilamelares gigantes foram preparadas com palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) usando o método da eletroformação. Resumidamente, 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de POPC solubilizada em clorofórmio (2mg/ml) foram borrifadas sobre as superfícies de duas placas condutoras de FTO (revestidas com óxido de flúor titânio). Em seguida, elas foram submetidas à secagem por vácuo por aproximadamente 2 horas para remover todos os traços do solvente orgânico. As placas condutoras foram então colocadas em frente uma da outra, e separadas por uma armação de Teflon de 2 mm de espessura para formar uma sela,

cujo espaço livre foi preenchido com solução de sacarose 0,2 M. As placas foram ligadas a um gerador de função e submetidas à corrente alternada de 1 V, com uma frequência de 10 Hz, aplicada durante cerca de 2 h. Em seguida, as vesículas em solução de sacarose foram diluídas em solução de glicose 0,2 M, na razão 1:10, criando-se assim uma assimetria com vesículas contendo no seu interior sacarose e no exterior glicose diluída. As osmolaridades das soluções de sacarose e glicose foram medidas com um osmômetro crioscópico (Osmomat Gonotec 030, Berlim, Alemanha) e cuidadosamente combinadas para evitar os efeitos de pressão osmótica. As GUVs formadas com soluções de sacarose e de glicose de mesma osmolaridade, devido à ação gravitacional, se acomodam e se estabilizam no fundo da câmara de observação, apresentando um melhor contraste quando examinadas por microscopia de contraste de fase (75).

As SUVs para CD foram preparadas por hidratação das películas fosfolipídicas com H<sub>2</sub>O e glicose 200 mM, duplamente destilada, à temperatura ambiente, para dar uma concentração de lipídio em torno de 10 mM. Os fosfolipídios foram hidratados, seguido por 50 minutos de sonicação, com um sonificador de ponta, e centrifugação para remover detritos. As amostras foram extrusadas a 45 °C, acima da temperatura de transição de fase, por 11 vezes através de membranas de policarbonato com tamanho de poros de 50 nm (Nuclepore TrackEtch Membrane, Whatman), utilizando um mini-extrusor Avanti. As SUVs foram refrigeradas e protegidas da luz. O tamanho da vesícula foi confirmado pela dispersão dinâmica de luz (DLS) com um Nano Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, RU), com um diâmetro médio de SUV de 80 nm (75).

### 3.7.2 Visualização de vesículas unilamelares gigantes

A estabilidade das GUVs de POPC foi monitorada através de microscopia de contraste de fase e de fluorescência em um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200 (Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com uma câmera digital AxioCam HSM Zeiss (Jena, Alemanha). Os experimentos foram realizados utilizando diferentes configurações do equipamento. Um campo de observação representativo foi escolhido, e uma vesícula foi filmada em fase de contraste durante 10-15 min. Somente GUVs maiores que 10 µm foram examinadas. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C.

#### 3.7.2.1 Visualização de deformações de GUVs induzidas após a adição de peptídeos

Para esta análise foi preparada uma solução de glicose 0,2 M contendo as concentrações de 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  dos peptídeos DCD-1L ou DCD-SV. Em seguida, alíquotas dos peptídeos eram adicionadas a mistura de GUVs para um volume final de 100  $\mu\text{l}$ . A estabilidade das vesículas foi monitorada em microscópio invertido Zeiss Axiovert 200 com lâmpada de mercúrio HBO 103 W na objetiva de 63x Ph2, no modo de contraste de fase e fluorescência e filtros com excitação a 540-552 nm e banda de emissão de 575-640 nm.

### **3.7.2.2 Visualização de deformações de GUVs induzidas após a microinjeção de peptídeos**

O processo de formação de GUVs foi similar ao do item 3.7.2.1. A injeção de peptídeos foi feita a uma distância de 50  $\mu\text{m}$  da GU. Em cada experimento realizado foi adicionado um volume de 200  $\mu\text{M}$  do peptídeo DCD-1L ou DCD-SV com uma micropipeta de vidro com aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro. As micropipetas foram preparadas utilizando um extrator vertical PC-10 Narishige (Tóquio, Japão). As micropipetagens foram controladas com um micromanipulador MP-225 (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). O fluxo de injeção foi ajustado manualmente por um micrômetro seringa Hamilton de 10  $\mu\text{l}$  (Sutter Instruments, Novato, CA, USA).

## **3.8 Espectroscopia por Dicroísmo circular (Far UV)**

Os experimentos de Dicroísmo Circular (CD) foram realizados utilizando um espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co. Ltd., Tóquio, Japão), acoplados a um sistema para controle da temperatura Peltier Jasco PFD-425S. Os espectros de CD foram coletados em Far UV entre os comprimentos de onda de 190 e 260 nm, e uma média de 4-8 scans, com uma célula de quartzo de caminho óptico de 1 mm. A resolução utilizada foi de 0,5 nm, velocidade de 50 nm/min, tempo de resposta de 8-s e largura de banda de 1 nm. Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente com 160  $\mu\text{M}$  de peptídeo em solução aquosa e glicose 0,2 mM. A elipticidade observada foi normalizada para unidades de graus  $\times$  centímetros<sup>2</sup>  $\times$   $\text{dmol}^{-1}$ . As gravações de base de dados foram feitas rotineiramente na presença de glicose.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Expressão, lise e purificação da proteína rDCD

Nestes experimentos foi utilizado o vetor pAE-DCD e a cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que é uma cepa desenvolvida para uso exclusivo na expressão de proteínas recombinantes. No seu genoma foram incorporados os genes auxiliares: *ompT* que causa inibição da produção de endoproteases de membrana responsáveis pela proteólise, *hsdS<sub>B</sub>*(*r<sub>B</sub>*-*r<sub>B</sub>*-) que inibe a ação de endonucleases de restrição endógenas sobre o plasmídeo inserido causando a sua inatividade; *dcm* que melhora na replicação do plasmídeo na bactéria transformada; *gal* mutação que impede a produção de galactose responsável pelo controle de replicação do plasmídeo;  $\lambda$ (DE3) fago responsável pela produção de T7 RNA Polimerase sob controle do promotor lacUV5; *pLysS*(*cm<sup>R</sup>*) que expressa lisozima responsável pela lise da parede bacteriana, e por fim, o gene de resistência a cloranfenicol que permite sua seleção. O processo de transformação foi feito pelo choque térmico a 42 °C por 2 minutos. Em seguida, amostras de 10% e 90% de bactérias transformadas foram transferidas em 2 placas LB-Ágar contendo AMP (100 µg/mL) e/ou CAM (50 µg/mL) e incubadas por 16 horas. Em seguida, uma colônia com aspecto visível mais brilhante foi isolada das demais para cultivo pré-inóculo de 5 mL. Após incubação de 12 a 16 horas para a visualização de densidade bacteriana no pré-inóculo, foi transferido 1 mL para 1 L de meio LB líquido também contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL), foram retiradas alíquotas em períodos de 30 minutos para a realização de leitura fotométrica em 600nm, quando alcançou uma OD de 0,6 foi transferido para outro shaker com temperatura de 20°C e foi adicionado Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 mM e cultivo por mais 12 horas, segundo os protocolos descritos (72, 76-78), vide figura 5 abaixo.

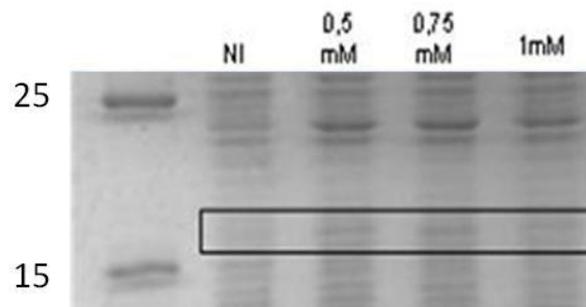


Figura 5 Gel de poliácridamida mostrando a expressão da proteína rDCD produzida por *E. coli*, transformada pelo plasmídeo pAE-DCD. No gel nota-se um aumento crescente na banda de 16 kDa após a adição de IPTG nas concentrações indicadas.

As bactérias foram centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm para a coleta das bactérias sem a presença do meio LB. O meio foi descartado e as bactérias foram suspendidas em 20 mL de tampão de ligação (BB) Tris 50 mM, NaCl 100 mM em pH 7,5. O extrato bacteriano lisado foi centrifugado, apresentando sobrenadante com a aparência de um amarelo límpido, e filtrado em membrana de 0,45 µm para a retirada de fragmentos bacterianos leves tais como fragmentos de parede celular, DNA e organelas.

Com o lisado filtrado foi feita a purificação utilizando cromatografia de afinidade em coluna empacotada Histrap FF com 1 mL de volume de coluna (CV) acoplada a um FPLC Äkta com coletor de frações. A coluna foi equilibrada com 15 CV e eluída com tampão de eluição (EB) Tris 50mM, NaCl 100 mM e imidazol 500 mM em pH 7,5 em modo isocrático com 5 CV e cada concentração do eluente. O cromatograma foi avaliado pelo software Unicorn utilizando como medidas fotométricas de comprimento de onda de 220, 254 e 280 nm, respectivamente. Os picos de eluição da separação em colunas de afinidade foram coletados e armazenados e em seguida submetido a eletroforese em gel SDS-PAGE para verificar em quais picos se encontrava a rDCD.

A purificação foi continuada com a visualização de banda visível com massa de aproximadamente 16 kDa. Uma das explicações para essa diferença de massa molecular (esperado seria 11 kDa) deve-se a carga dos resíduos apolares que a DCD contém em sua estrutura primária, uma vez que na técnica de SDS-PAGE as cargas elétricas podem não ser totalmente anuladas o que colabora para a distribuição errônea das proteínas na malha de acrilamida do gel. Um pequeno resquício foi visto e continuamos com a purificação até observar apenas bandas visíveis no SDS-PAGE, com massas aproximadas de 16 e 22 kDa.

O segundo passo da purificação inicial foi realizar uma cromatografia de troca iônica em uma coluna Resource Q contendo 1 mL de CV. A cromatografia de troca iônica é um dos métodos modernos e eficientes de separação e determinação na produção de macromoléculas biológicas. Este método oferece um alto rendimento de separação, seletividade, eficiência e a recuperação da atividade biológica. A ligação e lavagem foram feitas com 5 CV de tampão de ligação Tris 50 mM pH 7,5 e eluição em gradiente com tampão Tris 50 mM, NaCl 1M pH 7,5 observando pico em aproximadamente 300 mM de NaCl. Porém a quantidade obtida ao final da purificação foi ínfima, uma vez que a rDCD sofre com a ação de proteases que a degradam e tem como destino corpos de inclusão, uma vez que a mesma pode apresentar propriedade bactericida (77).

#### 4.2 Confirmação da rDCD

Como pode ser visto na Figura 7, o ensaio de western-blot com anticorpo específico contra a DCD-1L mostrou a banda de 16 kDa no gel. O sequenciamento do N-terminal por reação de Edman da banda visualizada na eletroforese mostrou a presença da metionina iniciadora, o Tag de 6 histidinas e sequência do poli-linker do pAE (Figura 6). Esta análise serviu para demonstrar que no processo de clonagem da DCD o resíduo inicial de tirosina que serviria para confirmação fotométrica estava ausente.

[Sequence]												
	Met	His	His	His	His	His	His	Leu	Glu	Glu		
[Estimated Sequence]												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1st	Met	His	His	His	His	His	His	His	Leu	Glu	Glu	
2nd	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	Asp	Pro	Glu	Glu	Leu	Gly	
3rd	Gln	Glu	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Ala	
4th	Asn	Pro	Val	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Asp	Ala		
Reliability(%)	14.8	100.0	42.2	84.8	100.0	100.0	57.3	10.2	39.8	25.7		

**Figura 6 Sequenciamento de N-terminal por degradação de Edman**, reconhecimento da Metionina inicial, além das histidinas do Tag da proteína expressa.

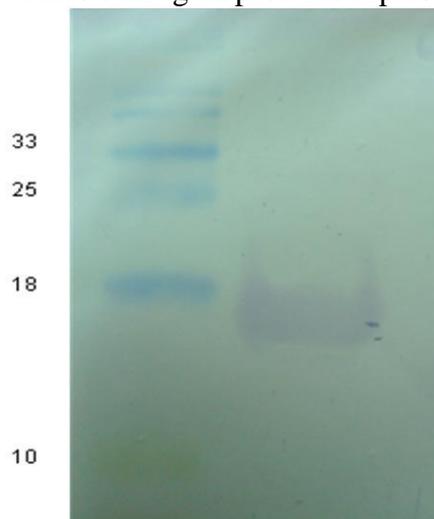


Figura 7 Ensaio de Western-blot confirmando a presença de rDCD com aproximadamente 16 kDa

#### 4.3 Clonagem e expressão da rDCD no vetor pTYB2

Foram feitas novas tentativas de expressão da rDCD, respeitando o protocolo já antes utilizado, porém, não foi obtido nenhum sucesso. Então, escolhemos refazer a clonagem no vetor descrito por Cipakova (14) como o mais apropriado para proteínas que podem possuir alguma atividade danosa a cepa de expressão, como a DCD. Foi utilizado vetor do kit IMPACT System (NEB), pTYB2, pois o mesmo contém como Tag uma inteína que se liga ao C-terminal da proteína, a proteína expressa é liberada sendo eluída integralmente apenas com a

redução do linker entre Tag e proteína, redução essa que pode ser feita pela presença de cistina, BME ou DTT. A inteína serviria como forma de inibir a atividade antibacteriana que a porção antibacteriana da DCD apresenta.

A clonagem foi realizada como já descrito anteriormente no item 3.1 dos Materiais e Métodos. A transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$  e então foi realizado um PCR de colônia e análise de restrição foram realizados para confirmação dos clones positivos. O resultado da clonagem, assim como descrito por Cipakova, et al, 2005 (14) observado na Figura 8. Após ser realizada a replicação e purificação dos clones, foram transformadas em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS para testes de indução variando a concentração e tempo na presença de indutor, 1, 0,5 e 0,1 mM de IPTG em 4 a 16 horas de indução, variando a temperatura de 20 °C a 37 °C. Porém não foi observada nenhuma indução em todas as concentrações e temperaturas, como pode ser observada em corrida eletroforética na Figura 8. Foram trocados todos os reagentes, assim como a busca por outras cepas de bactéria testando com a *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, Rosetta Origami (DE3) pLysS, BL21 (DE3) além de nova cepa de BL21 (DE3) pLysS. Ainda assim não foi observada nenhum tipo de indução, mesmo com o plasmídeo de expressão padrão pMYB5. Foi então realizado um teste de indução apenas da inteína de 22 kDa, presente no vetor mesmo sem o inserto, e verificou-se que o vetor apresentava problemas de fabricação, pois nenhuma indução foi observada em nenhum dos vetores presentes no kit (Figura 9). Todas as clonagens que o grupo fez com este kit não apresentou sucesso na expressão.

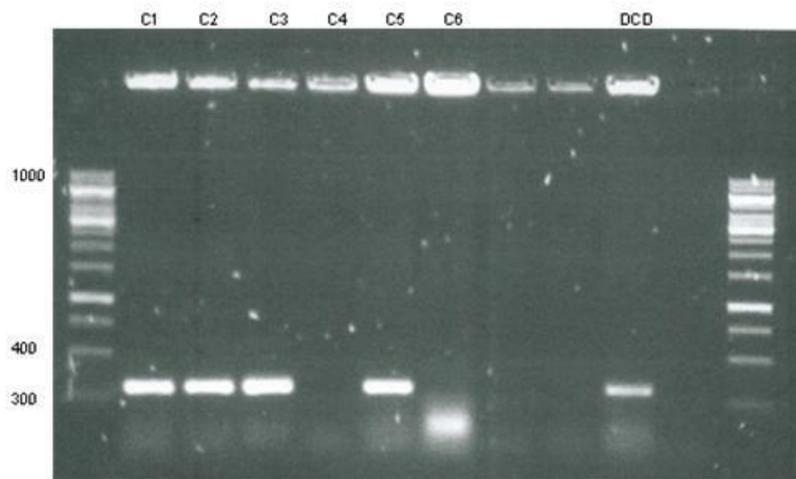


Figura 8 Gel de agarose mostrando resultado do ensaio de PCR de amplificação do produto de 330 bp corresponde ao cDNA da DCD clonada em vetor pTYB2. Os clones 1, 2, 3 e 5 são positivos

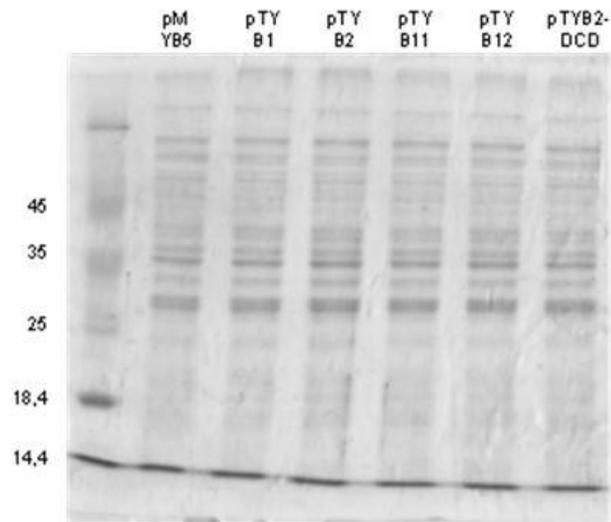


Figura 9 Gel de poli-acrilamida mostrando a ausência de indução de expressão da proteína rDCD em lisado de *E. coli*, transformada pelo plasmídeo pTYB2-DCD.

#### 4.4 Modificações no protocolo de lise e purificação

Reiniciamos o protocolo de expressão proteica, porém desta vez com alterações com o intuito de voltar a produzir a rDCD e obter maior quantidade de proteína solúvel para os estudos necessários. As bactérias seguiram o mesmo protocolo de expansão e indução anteriormente utilizado, porém no momento da lise foi adicionado PMSF que inibe irreversivelmente serino proteases presentes em maior quantidade na bactéria, evitando a degradação prévia. Foi removido o EDTA que antes era utilizado, pois o mesmo tem propriedade quelante o que pode remover o zinco presente na resina da coluna da cromatografia de afinidade. Notamos com os resultados que grande parte da rDCD tinha como destino possíveis corpos de inclusão, além de grande número de contaminantes que tinham grande afinidade pelo níquel uma vez que continham em sua estrutura primária grande número de resíduos de histidina. Foi então testada maneiras de se melhorar a lise, aumentar a recuperação de rDCD e diminuir a quantidade de contaminantes.

O primeiro passo foi testes simples como diminuir o pH da solução tampão em que a rDCD estava, levando em consideração o ponto isoelétrico da DCD com valor de 5,86 para então diminuirmos da solução o pH a um valor em torno de 3,8, resultando numa grande quantidade de proteínas precipitadas incluindo a rDCD. Passamos para o passo de saturação via concentrações crescentes de sulfato de amônia  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , de característica oxidante. A rDCD não teve o comportamento previsto e foi precipitada juntos com as outras proteínas da bactéria. A terceira e última tentativa foi utilizar altas temperaturas para inativar as proteases e

outros contaminantes proteicos. Foi testada inicialmente a temperatura de 60°C, e observou-se que a rDCD suportava com grande facilidade enquanto os contaminantes foram degradados. Os que resistiram restaram em baixa concentração conforme demonstrado na Figura 10. Outro passo inserido foi à adição de BME, um oxidante que auxilia na desestruturação de proteínas, a atividade proteolítica das proteases é fortemente ligado a sua estruturação. A falta de estrutura pode ajudar tanto na diminuição do número de contaminantes e também a já citada inativação de proteases, pois uma vez desestruturada elas tem grandes chances de agregar e precipitar quando centrifugadas a altas rotações como a proposta de 15,000 rpm. O passo possibilitou uma purificação mais simples e com menor número de contaminantes. Outro resultado inesperado desta intervenção foi a visualização de proteínas antes nos corpos de inclusão bacterianos, aumentando a concentração de rDCD, visualizado em todas as corridas eletroforéticas em sequência.

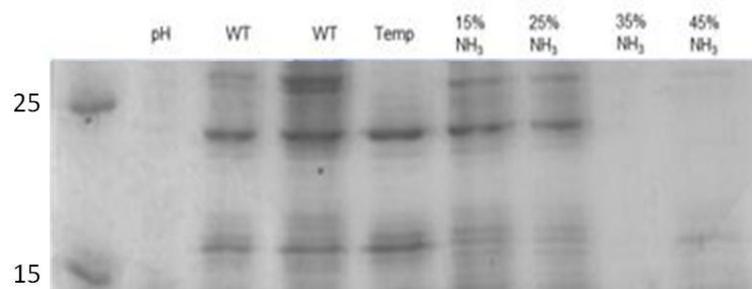


Figura 10 Gel de poliacrilamida mostrando vários tipos de tratamento para diminuir contaminantes e proteases que degradavam a proteína rDCD em lisado de *E. coli*, transformada pelo plasmídeo pAE-DCD. Neste ensaio foram feitos os seguintes tratamentos, pH diminuído a 4, elevação da temperatura a 60°C e precipitações das proteínas com sulfato de amônio 25%, 35% e 45%.

Com a lise e a desnaturação proteica por temperatura, iniciamos novamente com a cromatografia de afinidade, a cromatografia de troca iônica foi então realizada, porém utilizando-a de maneira inversa, isto é, a rDCD foi conduzida com NaCl no tampão de ligação, utilizamos a proteína em tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 100 mM, BME 1 mM, pH 7,5 e verificamos que após equilibrar a coluna ResourceQ com 10 CV em tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, BME 1 mM, pH 7,5 a rDCD não ficava retida na coluna passando direto pela fração não coletada. A avaliação em SDS-PAGE foi aparentemente perfeita, pois o gel apresentava banda única, enquanto os picos eluídos em gradiente com o tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 1 M, BME 1 mM, pH 7,5 eram vistos como bandas muito fracas, as mesmas bandas visualizadas no SDS-PAGE da cromatografia de afinidade, Figura 11.

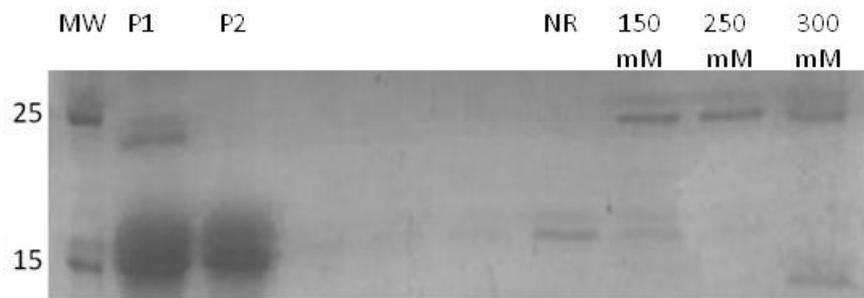


Figura 11 Gel de poliacrilamida mostrando os passo de purificação com a adição do aumento da temperatura e o BME. Os dois picos apresentados na cromatografia de afinidade, P1 e P2, e a recuperação dos picos apresentados na cromatografia de troca iônica e as concentrações de NaCl, 150, 250 e 300 mM.

Foi então realizada a outro sequenciamento de N-terminal por degradação de Edman, e a tentativa de sequenciar os fragmentos gerados pela presença de tripsina. Para este passo foi trocado o tampão, realizado por coluna HiTrap Desalting 5mL, para  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mM. O sequenciamento de N-terminal mostrou a presença da rDCD, porém um contaminante. Novas análises foram feitas para a localização deste contaminante, mas o mesmo só foi localizado quando realizada uma cromatografia de exclusão por massa molecular, e mesmo os contaminantes separados pela GF os contaminantes que foram verificados pelo sequenciamento não foram visualizados em SDS-PAGE.

Foi também realizada a tentativa de clivagem da rDCD por tripsina para a tentativa da verificação do fragmentos da rDCD utilizando-se MALDI LIFT TOF/TOF. Foi impossível de verificar os fragmentos gerados pela tripsina, possivelmente pelo mesmo contaminante encontrado no sequenciamento do N-terminal. Todos os fragmentos encontrados não combinavam com a massa dos fragmentos teóricos dos possíveis pontos de clivagem da tripsina na rDCD, realizada pelo aparelho. Apenas a rDCD intacta foi visualizada de forma que a proteína por ter carga e de alto peso, comparada com peptídeos menores, porem apresentou a  $mz+2$ ,  $mz+3$  e superior.

Foi então realizado novamente o protocolo de transformação, expressão e purificação, tomando a decisão de excluir a etapa da cromatografia de troca iônica no intuito de minimizar a perda de proteínas entre os processos e a diminuição de custos. Para tal não fizemos a retirada do imidazol utilizado para a eluição na cromatografia de afinidade e nem a troca de tampão, além de reduzir o fluxo e mudar o tipo de resina. Nas cromatografias de exclusão por massa molecular coluna que utilizamos anteriormente foi uma Superose 12 contendo 24 mL CV de resina, enquanto na última vez foi utilizada uma coluna com 90 mL de resina Superdex 75 (Figura 12).

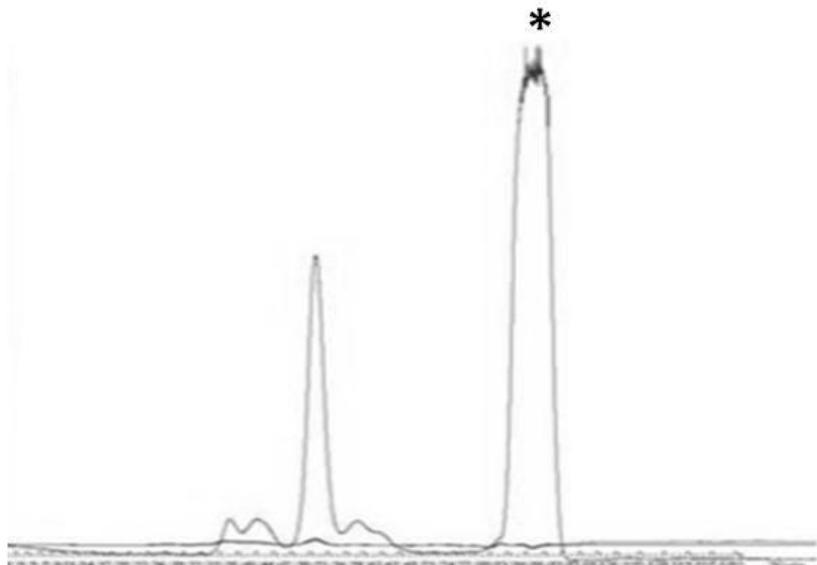


Figura 12 Cromatograma de lisado de E.coli transformado com o plasmídeo pAE-DCD mostrando as proteínas eluídas com 10% de imidazol.

Esta alteração ajudou na separação dos contaminantes menores além de retirar o imidazol e minimizar o NaCl, que impede a utilização da rDCD tanto em técnicas fotométricas como o dicroísmo circular, além da espectrometria de massa. O resultado mostrou uma banda única visualizada em SDS-PAGE (Figura 13 A e B).

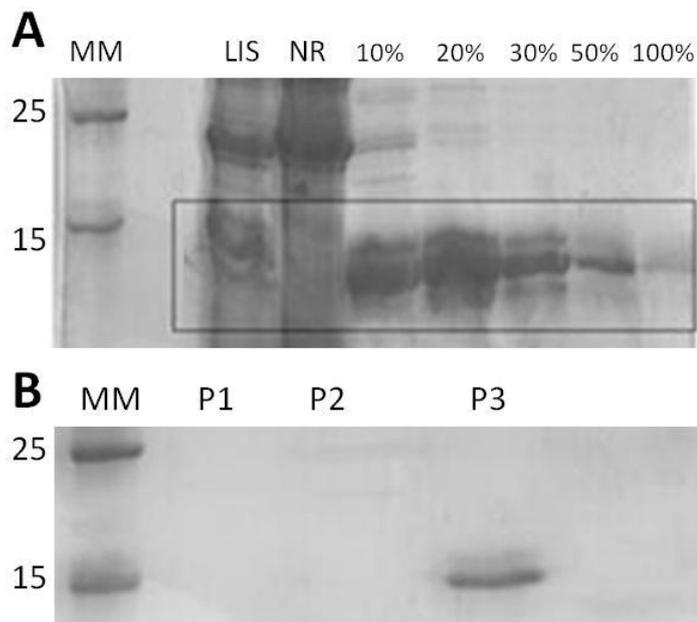


Figura 13 Análise eletroforética da expressão e purificação após as modificações nos protocolos. (A) NI e IND Não Induzido e Induzido. LIS e NR Lisado e Não Retido, com a banda diminuindo a intensidade entre elas para serem eluídas. Porcentagens de imidazol para a eluição. (B) cromatografia de exclusão com o pico de 10% saindo apenas rDCD no pico 3

A última purificação gerou cerca de 2 mg de rDCD que será dada continuidade aos testes de estabilidade térmica, estruturação e a possibilidade de adição de compostos que possam auxiliar uma possível estruturação, pois a DCD purificada, que teve como um dos passos da lise o aquecimento a 60 °C, dificilmente terá uma estrutura secundária bem definida.

#### 4.5 Sequenciamento da rDCD

A confirmação e último passo para a verificação foi a análise após digestão com tripsina. A tripsina é uma serino protease que faz parte da super família A das proteases, tem como principais pontos de clivagem os resíduos lisina ou arginina em P1', com exceção a quando estes resíduos estão após um resíduo de prolina. O protocolo está bem estabelecido, e é o modelo utilizado para o sequenciamento de proteínas na espectrometria de massas Orbitrap XL velos do Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) do ICB. O resultado obtido foi o sequenciamento de 53% da proteína inteira, partindo da premissa que a proteína analisada não continha o peptídeo sinal, que compreende 19 resíduos, o score obtido foi superior, com cerca de 65% (Figura 14), dados completos são apresentados no anexo 1.

1	<u>MRFMTLLFLT</u> ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNPCH <del>E</del> ASAA QKENAGEDPG
51	LARQAPKPRK <u>QRSSLLEKGL</u> <u>DGAKKAVGGL</u> <u>GKLGKDAVED</u> <u>LESVKGAVH</u>
101	<u>DVKDVLDSVL</u>

Figura 14. Sequência de aminoácidos da rDCD sublinhada mostrando peptídeos identificados pelo programa Mascot, conforme Apêndice.

O resultado também demonstrou a presença de peptídeos de uma das chaperonas de *E. coli* na amostra. As chaperonas são proteínas que se ligam a proteínas para que a proteína possa apresentar uma estrutura definida, a presença destas proteínas pode servir como uma predição biológica de que a proteína expressa não tem uma estrutura definida. Uma das possíveis explicações para a presença destas proteínas na amostra é a de que o peptídeo inicial da DCD nativa, Y-P30, não apresenta estrutura definida. Uma vez que a DCD nativa pode ser degradada no meio intracelular por sua atividade antimicrobiana a sequência primária poderia estar complexada com as chaperonas.

#### 4.6 Estudos físico-químicos e estruturais dos peptídeos sintéticos DCD-IL e DCD-SV

A primeira evidência da DCD-SV foi publicada na dissertação de Markovic (2003) e confirmada por Motoyama e colaboradores (79). A DCD-1L tem uma cadeia de 48 aminoácidos. A forma variante DCD-SV contém uma sequência de 59 aminoácidos, dois quais 23 resíduos (GEE RLVFGAPVNL TSIPLTSVSRP) diferem da DCD-1L. Esta sequência C-terminal substitui a sequência terminal (AVH DVKDVLDLSDVL) da DCD-1L (Figura 15). Os dois peptídeos foram sintetizados pela Peptide, Inc, com pureza superior a 98%.

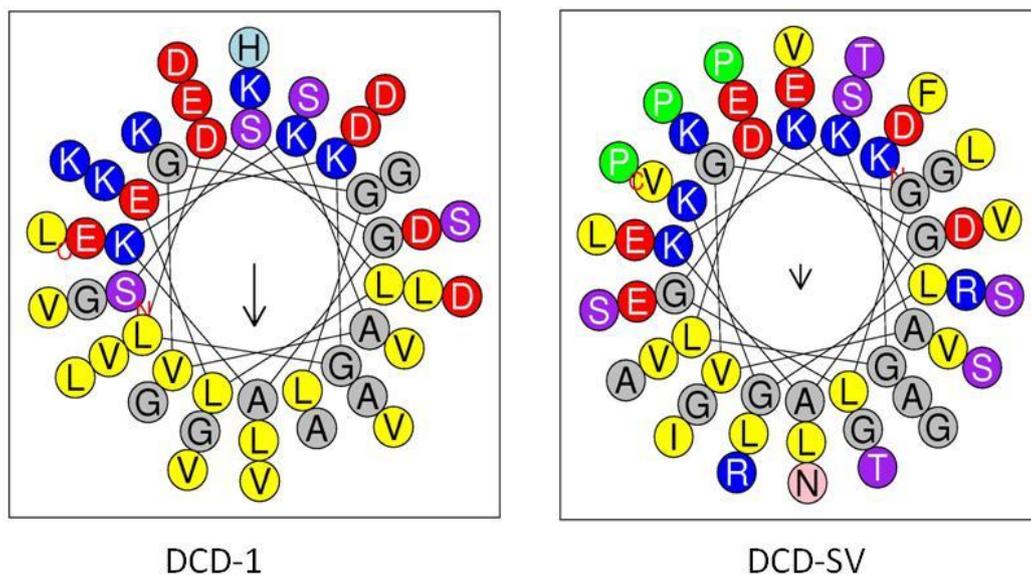


Figura 15 Estrutura helicoidal dos peptídeos DCD-1L e DCD-SV mostrando a porção inferior hidrofóbica, e porção superior hidrofílica, e distribuição dos ácidos hidrofílicos, polares e básicos (vermelho e azul) e aminoácidos polares hidrofóbicos (amarelo e cinza). Notar a presença de apenas uma histidina na cadeia de aminoácidos da DCD-1L enquanto na cadeia de DCD-SV estão presentes três prolínas (verde), uma fenilalanina, uma asparagina, uma arginina e uma treonina. O gráfico foi obtido com o software Heliquest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>).

#### 4.6.1 Estudos da diferença comportamental dos peptídeos

##### 4.6.1.1 Estudo da estrutura

Estudos para confirmar a estrutura tridimensional dos peptídeos DCD-1L e DCD-SV e possível interação dos peptídeos durante a estruturação estão sendo realizados no Centro de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM), Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas, com a colaboração da Dra Andrea Balan Fernandes.

#### 4.6.1.2 Estudos conformacionais dos peptídeos

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma das técnicas bioquímicas que permite visualizar alterações estruturais de proteínas. O CD baseia-se na absorção diferencial da radiação polarizada circularmente para esquerda e direita por cromóforos ou por moléculas que possuem quiralidade intrínseca. As proteínas possuem certo número de cromóforos que podem dar origem a sinais de CD. Na região distante UV (240-180 nm), o que corresponde à absorção da ligação peptídica, o espectro de CD pode ser analisado para obter o teor de características estruturais secundárias regulares, tais como  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha (80).

O primeiro passo após a obtenção dos peptídeos foi tentar verificar uma diferença estrutural entre os dois peptídeos. A Figura 16 demonstra resultados obtidos com o CD. Todos os experimentos de luz polarizada foram realizados no equipamento JASCO J-810, localizado no Instituto de Farmacologia (INFAR) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

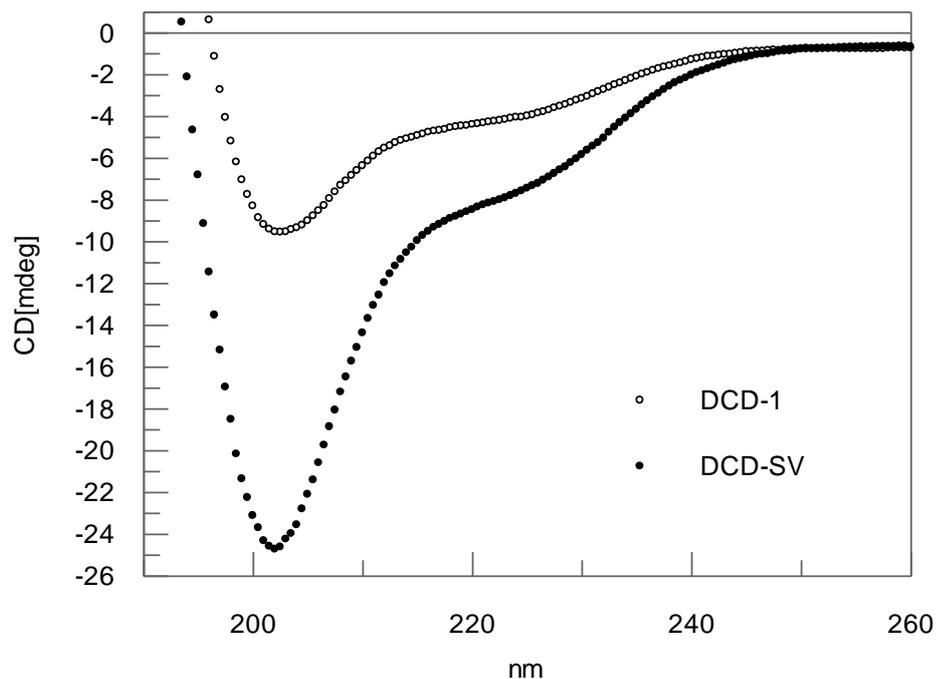


Figura 16 Espectro de CD dos peptídeos DCD-1L (○) e DCD-SV (●) em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160  $\mu$ M. O perfil é característico de peptídeo sem estrutura secundária definida. Os resultados são apresentados como média de 3 leituras consecutivas.

A Figura 16 demonstra que não há diferenças conformacionais entre os dois peptídeos. As alças demonstradas poderiam ser explicadas por uma predição de falta de estruturação, isto é, random coiled que demonstra ausência de estrutura definida nos peptídeos. O que podemos

visualizar é a diferença de sinais aonde a DCD-SV foi claramente superior a DCD-1L mesmo na mesma concentração, uma possível explicação é a presença de alguns resíduos com o comportamento mais sensível frente a uma fonte de luz, outra explicação seria a presença de peptídeos com certo grau de complexação. Todas as leituras foram realizadas com 160  $\mu\text{M}$  de peptídeo.

Em 2012 Paulmann e colaboradores publicaram que o zinco poderia ser utilizado como cofator para a estruturação e atividade da DCD-1L. Em 2013 Song demonstrou que o zinco poderia hexa-coordenar as  $\alpha$ -hélice de forma que formaria um pequeno canal (Figura 17), por onde poderia passar moléculas pequenas como eletrólitos causando um desequilíbrio osmótico, causando a morte de microorganismos (6, 81).

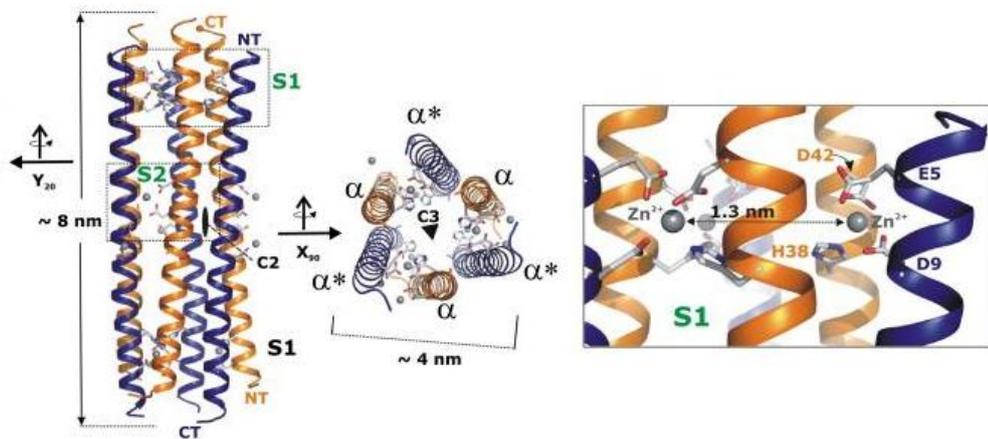


Figura 17 Demonstração gráfica da interação do zinco e a DCD-1L, uma possível explicação é a presença da Histidina na sequência primária do peptídeo, recortado de Song e colaboradores 2013 (6).

Com base no trabalho citado anteriormente, foi então realizado o experimento de dicroísmo circular, porém, agora utilizando o zinco como cofator. A Figura 18 mostra que DCD-1L quando adicionada juntamente com o zinco pode ter uma pequena modificação estrutural avaliada com diferença de 15 minutos. Foi verificado que houve um pequeno deslocamento do máximo de leitura que antes era próximo a 200 nm e com o tempo de 15 minutos houve um deslocamento em direção a 220 nm que pode demonstrar uma possível estruturação, porém mesmo com o aumento do tempo de incubação esse deslocamento do pico não continuou. Este resultado nos leva a crer que o zinco pode ser importante para a estruturação e conseqüente atividade, uma vez que o peptídeo já esteja em contato com a membrana. Assim que o limiar de concentração de peptídeo na membrana seja alcançado o

zinco pode vir a ser um dos fatores que organizam os peptídeos durante a inserção entre a camada lipídica até a formação do poro toroidal, como demonstrado por Song (6).

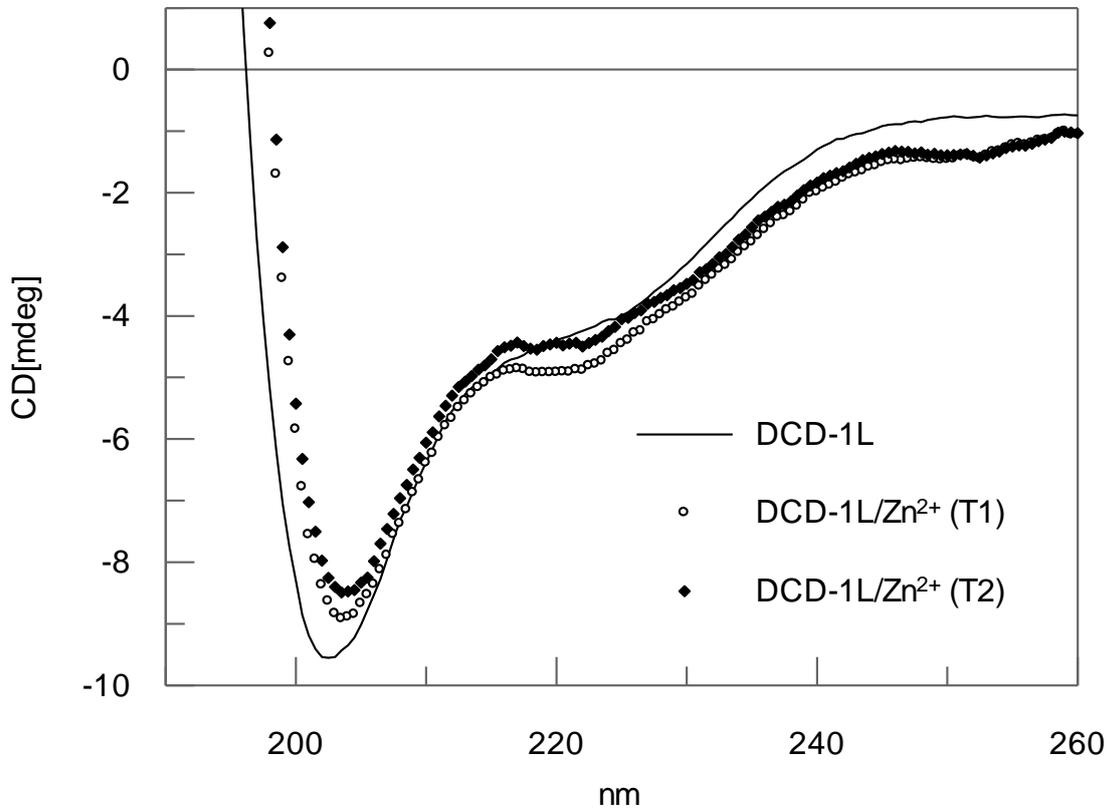


Figura 18 Espectros de CD do peptídeo DCD-1L em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160  $\mu\text{M}$ , na ausência (—) e na presença de  $\text{Zn}^{2+}$  concentração 200  $\mu\text{M}$ , no tempo zero (O) e no tempo 30 min ( $\blacktriangledown$ ). Nota-se um leve ganho de estrutura na presença de  $\text{Zn}^{2+}$ . Os resultados são apresentados como média de 3 leituras consecutivas.

O comportamento da DCD-SV foi diferente na presença de zinco (Figura 19), o perfil das curvas se alterou, e esta alteração foi ainda mais proeminente quando analisadas após 15 minutos de incubação. Podemos visualizar que o deslocamento foi mais proeminente que o observado para DCD-1L. Este resultado pode demonstrar que o comportamento fisiológico dos dois peptídeos pode ser complementar uma vez que o aparente ganho conformacional da DCD-SV é superior à DCD-1L, mesmo em mesma concentração de peptídeo e cofator. Um splice variante pode causar um aditivo de atividade, e/ou atividade sinérgica, ou até antagônica. Neste momento não sabendo se a DCD-SV apresenta a mesma atividade antibiótica que DCD-1L.

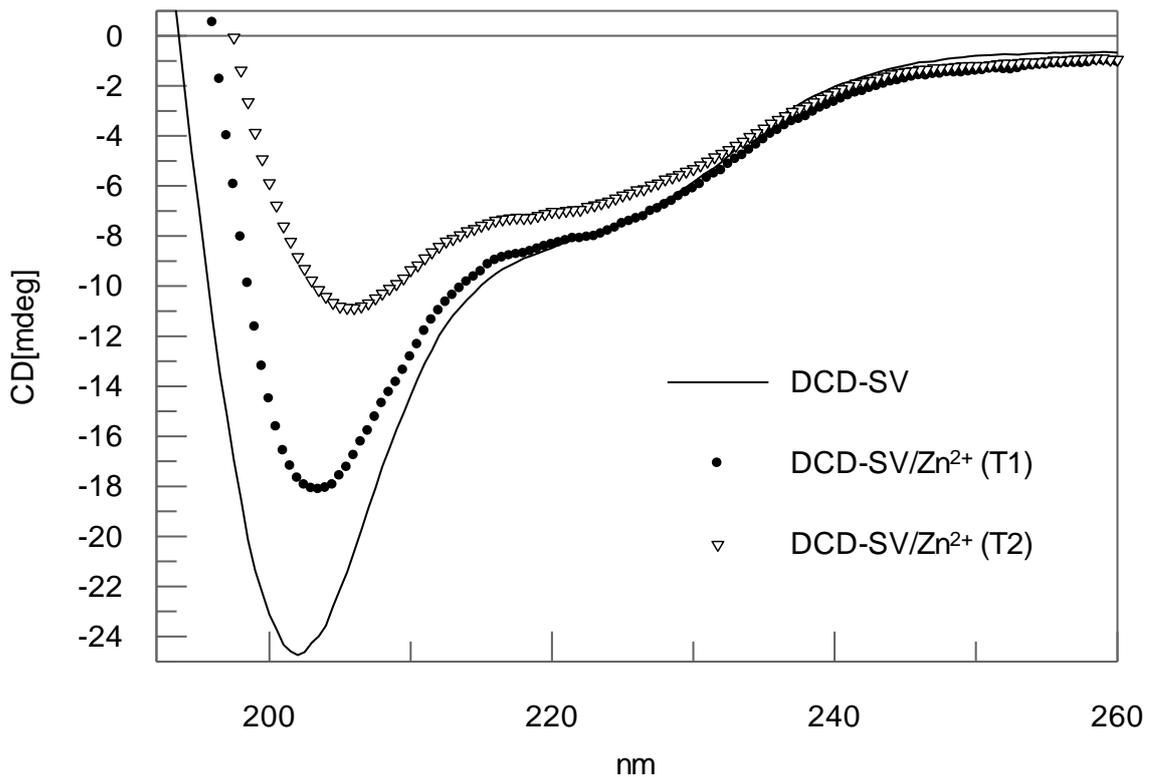


Figura 19 Espectros de CD do peptídeo DCD-SV em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160  $\mu\text{M}$  (—), na presença de  $\text{Zn}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$ , nos tempos zero minuto (O) e 15 minutos ( $\blacktriangledown$ ). Nota-se aumento progressivo de ganho de estrutura secundária com o aumento de tempo de incubação. Os resultados são apresentados como média de 3 leituras consecutivas.

#### **4.6.1.3 Estudo bioquímico e funcional dos peptídeos em sistema biomimético**

O estudo da interação dos peptídeos DCD-1L e DCD-SV com GUVs de fosfolipídios neutros foi realizado através da microscopia de fluorescência com contraste de fases. Primeiro, investigou-se o efeito permeabilizante dos peptídeos em solução aquosa e glicose 200 mM. As GUVs demonstravam inicialmente um elevado contraste óptico devido ao índice de refração do sistema sacarose/glicose através da bicamada. A adição de todos os peptídeos induziu a perda de contraste óptico em uma pequena fração das GUVs, porém com a preservação da estrutura vesicular global, e, ocasionalmente, foi observado o rompimento e/ou explosão das vesículas. Os buds aparecem quando a vesícula tem um aumento de curvatura espontânea ou ganha um excesso de área muito rapidamente. O aumento da permeabilidade da bicamada, que permite a mudança de tonalidade cinza escuro no interior da

GUV, sugere a abertura de canais ou mesmo a indução de deformação na bicamada. Este efeito foi observado apenas para as concentrações de peptídeos entre 20 e 40  $\mu\text{M}$ .

Para avaliar o efeito de extravasamento do conteúdo intracelular, foi realizada com GUVs preparadas com POPC. Conseguimos visualizar um aumento da permeabilidade da membrana, com a preservação da estrutura global da vesícula e a posterior formação de regiões com maiores depósitos de lipídio/peptídeo. As vesículas estourando ou já estouradas foram vistas ocasionalmente, mais frequentemente nas maiores concentrações de DCD-SV ou quando da adição de zinco (Figura 20).

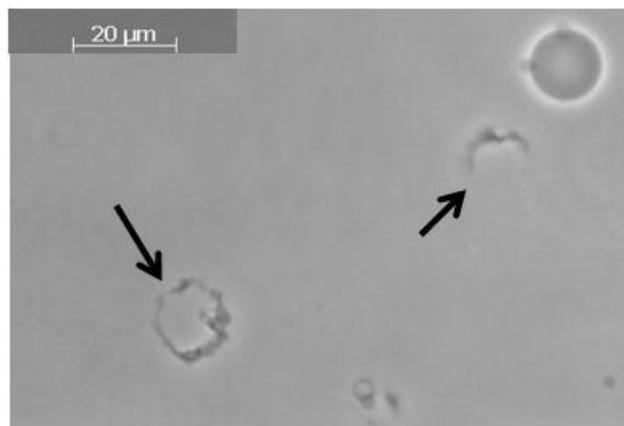


Figura 20 Foto ilustrativa mostrando o efeito permeabilizante de íons  $\text{Zn}^{2+}$  sobre GUVs de POPC.

A resposta encontrada para essa instabilidade frente ao  $\text{Zn}^{2+}$  se baseia na estrutura dos fosfolipídios que tem o grupamento  $\text{PO}_4$  (Figura 21) que poderia facilmente reagir com o  $\text{Zn}^{2+}$  livre. Os experimentos não poderiam ser feitos na presença do zinco, utilizado como cofator de atividade, conforme descrito por Song e colaboradores (6).

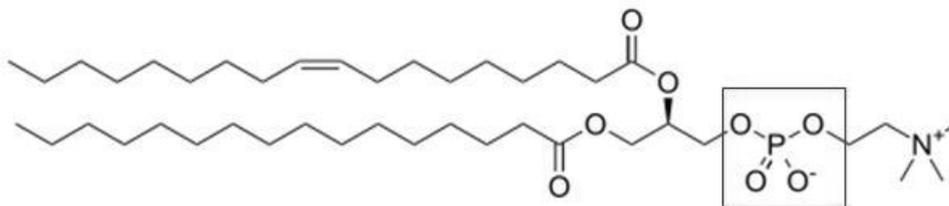


Figura 21 Estrutura do palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina - POPC (Neutro), o grupamento fosfato pode ser reativo tanto quando o grupamento amino da molécula.

#### **4.6.1.3.1 Experimentos biomiméticos com a DCD-1L**

Nestes experimentos foram testadas as concentrações 5, 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente, concluindo-se que a concentração de 40  $\mu\text{M}$  do peptídeo apresenta a maior

atividade. Os dois peptídeos se comportaram de maneira muito similar nos experimentos. Nos primeiros minutos não houve modificação, porém com o tempo começamos a ver GUVs com perda de contraste (Figura 22), levando a crer que a teoria descrita por Pasupuleti poderia existir uma concentração limiar de peptídeo necessário para desencadear a atividade (21).

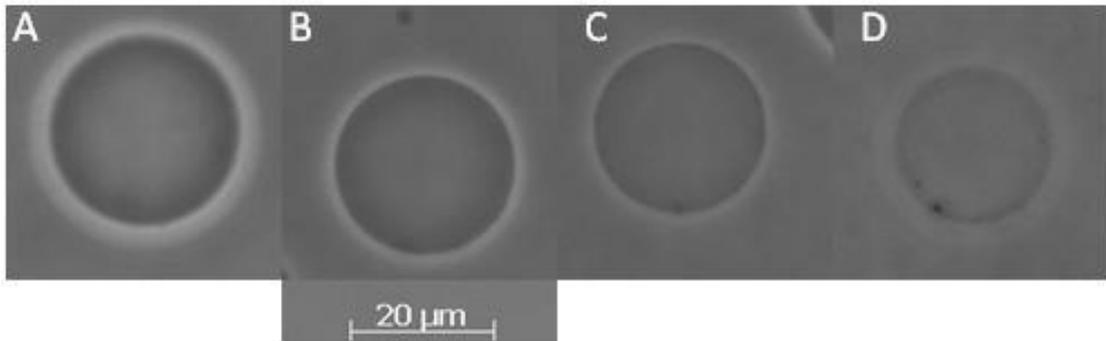


Figura 22 Foto ilustrativa mostrando efeito tempo-dependente do peptídeo DCD-1L ( $40 \mu\text{M}$ ) sobre a permeabilidade de GUVs de POPC após sua adição em solução. Nota-se um aumento progressivo de opalescência (perda de contraste interior/exterior) da vesícula ao longo dos tempos observados: 6 min (A), 8 min (B), 9 min (C) e 12 min (D).

Após o resultado da DCD-1L incubada com as GUVs, foi realizado o experimento com a microinjeção de peptídeo próximo as GUVs no intuito de verificar a perda de contraste com maior certeza, uma vez que o experimento de incubação era demasiado lento e de difícil acompanhamento de uma vesícula individual. O experimento foi realizado com a concentração de  $200 \mu\text{M}$  (Figura 23).

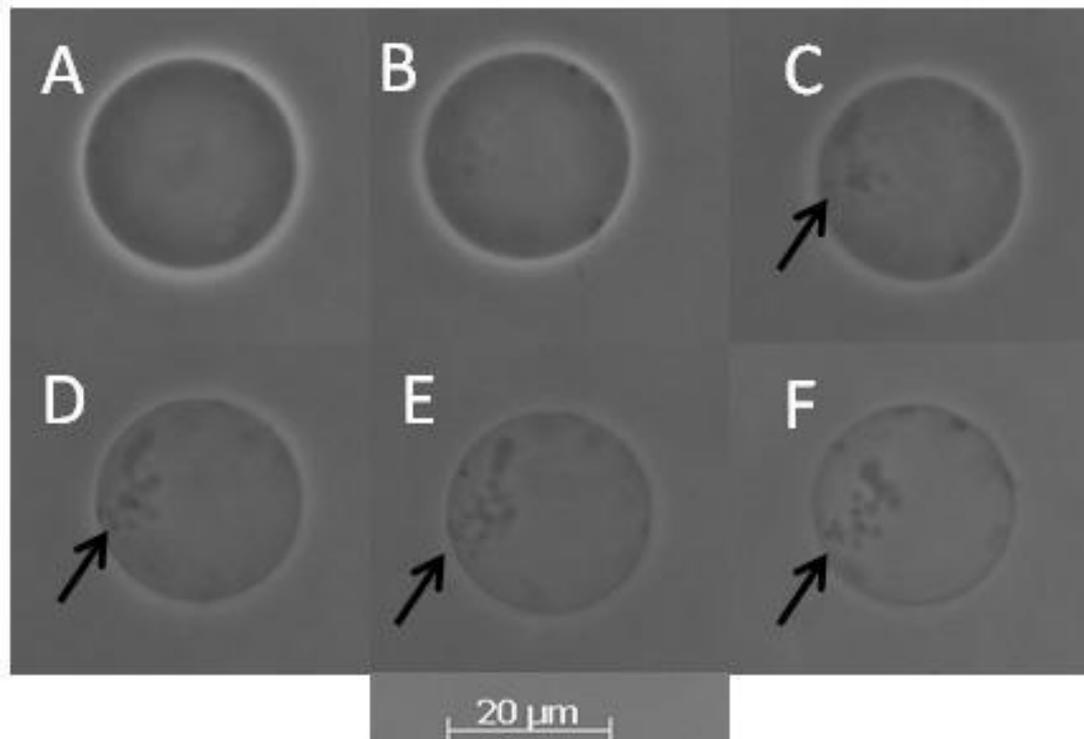


Figura 23 Foto ilustrativa mostrando o efeito tempo-dependente da DCD-1L (200  $\mu\text{M}$ ) sobre a permeabilidade de GUVs de POPC após microinjeção próxima a GUV. Notar aumento da opalescência e extrusão de “buds” a partir dos tempos observados (A) 0”, (B) 32”, (C) 44”, (D) 54”, (E) 1’ e 12”, (F) 1’ e 37”.

Foi realizado então o experimento de CD com as vesículas unilamelares pequenas (SUV), o método de preparo é similar, porém, as vesículas são menores para que o limiar de concentração seja menor e também para que ocorra menos espalhamento de luz oferecendo maior confiabilidade aos resultados. A metodologia empregada para a obtenção do espectro de CD foi similar ao anteriormente citado, utilizando a concentração de SUV de 200  $\mu\text{M}$ .

O resultado que obtido foi conflitante, pois o resultado obtido no experimento de visualização no microscópio demonstrava que a concentração de 40  $\mu\text{M}$  era suficiente para que houvesse extravasamento do conteúdo do interior das vesículas. Song e colaboradores em 2013 mostram que agrupamento de 6 moléculas de DCD-1L formam um canal, que seria suficiente para causar o desequilíbrio osmótico e consequente morte de microrganismo. Mas nosso resultado mostrou, como visto na Figura 24, apenas uma diminuição no máximo de leitura, mas não um ganho estrutural mesmo que mínimo. Foi efetuada também leituras com diferentes tempos de incubação, na tentativa de mimetizar o experimento com as GUVs no qual a DCD-1L também mostrou que a dependência do tempo para que ocorresse a estruturação. O resultado que obtivemos foi à diminuição do sinal quando incubadas variando

o tempo, tendo como ponto que não houve mais mudanças mesmo incubando mais do que 30 minutos.

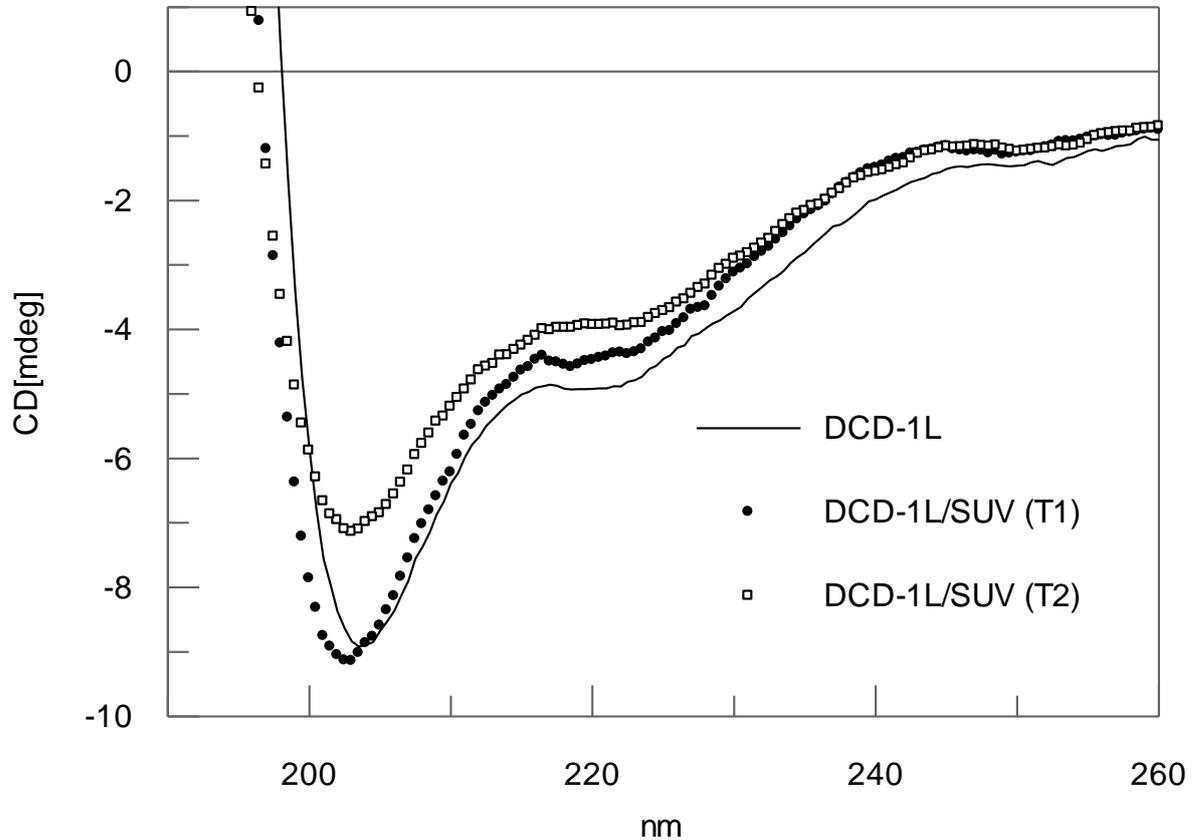


Figura 24: Espectros de CD do peptídeo DCD-1L em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160  $\mu\text{M}$ , na ausência (—) e na presença de SUVs 200  $\mu\text{M}$ , nos tempos zero minuto (●) e 15 minutos (□). Nota-se a diminuição do pico negativo máximo de sinal de acordo com o tempo, indicando ganho de estrutura secundária.

Quando comparamos os dois tratamentos,  $\text{Zn}^{2+}$  e as vesículas, conseguimos verificar que mesmo em maiores concentrações não houve significativa mudança estrutural com relação a presença da vesícula (Figura 25). O problema que não poderemos fazer os experimentos com todas as variáveis concomitantemente, o que talvez nos desse uma perspectiva totalmente diferente de interpretação dos dados.

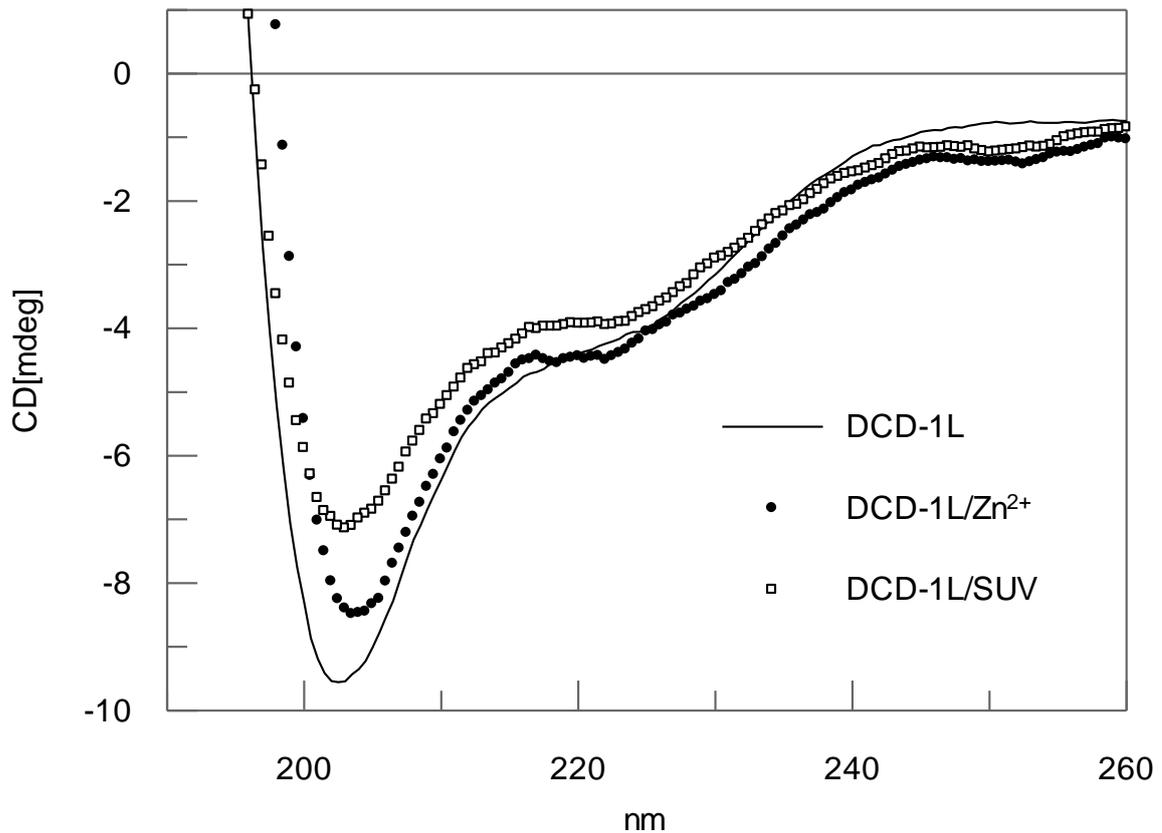


Figura 25 Espectros de CD do peptídeo DCD-1L em solução aquosa, glicose 200 mM, na concentração 160  $\mu\text{M}$ , na ausência (—) e na presença de  $\text{Zn}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  (●) e na presença de SUVs (□), no tempo 30 minutos. Nota-se redução mais acentuada de sinal negativo quando da incubação com  $\text{Zn}^{2+}$  e SUVs.

Em se tratando do comportamento da DCD-1L, com base nos experimentos realizados, como um PAM que precise de estrutura para a atividade, podemos citar que o mais importante para a estruturação é o zinco. Este comportamento também corrobora com Yount & Yeaman que cita a necessidade de um limiar de concentração de PAM necessária para que então haja a atividade (58). Nossa hipótese se suporta nessa ideia, e então, após o limiar alcançado ocorre a estruturação baseada no microambiente mesmo que lenta, e com a presença do zinco esta estruturação possa ocorrer de maneira mais rápida.

#### **4.6.1.3.2 Experimentos biomiméticos com a DCD-SV**

O mesmo delineamento experimental foi realizado com o peptídeo DCD-SV. O resultado observado foi muito interessante, pois houve a mesma perda de contraste das GUVs quando comparadas aos observado com o peptídeo DCD-1L (Figura 26).

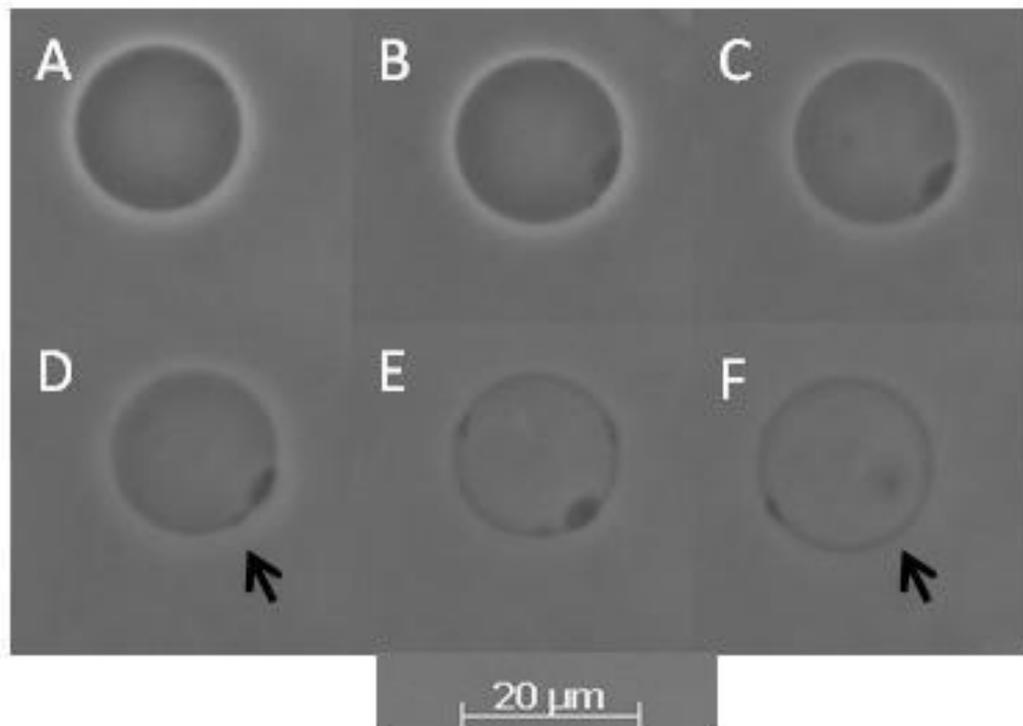


Figura 26 Efeito tempo-dependente da DCD-SV sobre a permeabilidade de GUVs de POPC após adição do peptídeo em solução. Nota-se um aumento gradativo de opalescência da vesícula ao longo dos tempos observados (A) 1' e 27'', (B) 4' e 27'', (C) 4' e 42'', (D) 4' e 56'', (E) 5' e 57'' e (F) 7' e 11''.

Após a perda de contraste, muitos GUVs mostraram uma diminuição no volume, como pode ser visto pelo aparecimento de vesículas flexíveis, até que as estruturas densas visualizadas na superfície da vesícula. A DCD-SV também apresentou um comportamento interessante no que condiz com a aparente densidade da vesícula. Verificamos que as vesículas após a incubação com a DCD-SV demonstram uma maior interação aderindo com o vidro da placa, este comportamento não foi notado com a DCD-1L. Uma das possíveis explicações para o fato pode ser a rede de carga da DCD-SV, uma vez que a DCD-1L tem a carga de -2, e a DCD-SV é neutra. Esta pode ser uma das respostas de por que a DCD-1L, como demonstrado anteriormente, tem uma molécula de zinco a cada duas moléculas de peptídeo na formação do poro toroidal (6, 21). Enquanto a DCD-SV poderia interagir com apenas uma molécula de fosfolípido, adicionando este comportamento às vesículas.

Foi realizado também o experimento com a micropipeta de injeção para verificar de maneira similar a DCD-1L, a atividade em apenas uma vesícula. O resultado sugere que a DCD-SV diminuíu a viabilidade das GUVs, pois as mesmas se tornavam altamente instáveis a partir do momento que fazíamos a administração de DCD-SV. Porém, o resultado foi bastante

animador, pois conseguimos notar que a atividade foi mais pronunciada, causando a opalescência da vesícula bem mais rapidamente, como demonstrada na Figura 27.

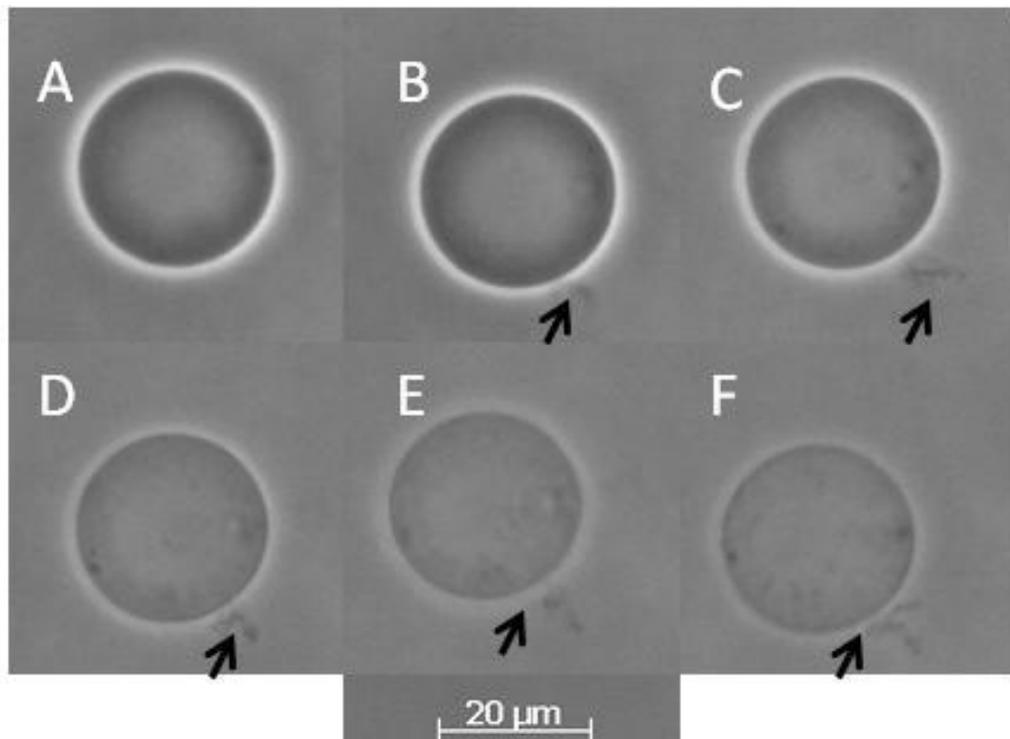


Figura 27 Efeito tempo-dependente do peptídeo DCD-SV sobre a permeabilidade de GUVs de POPC após microinjeção próxima a GUV. Nota-se um aumento gradativo de opalescência e extrusão de “buds” ao longo dos tempos observados (A) 0’, (B) 3’’, (C) 10’’, (D) 24’’, (E) 27’’ e (F) 36’’.

Este resultado pode vir a corroborar como o demonstrado no item 5.6.1.2. O zinco vem sendo colocado como um importante cofator para a atividade da DCD-1L, mas com a DCD-SV pode demonstrar que o zinco não participa da sua atividade. As mutações da splice variante, por exemplo, a ausência da histidina pode responder essa característica visualizada na DCD-SV.

Também foi realizado o experimento de estruturação com a DCD-SV, porém uma vez que o comportamento foi mais pronunciado quando comparado a DCD-1L nos experimentos biomiméticos, também esperávamos ver diferenças significativas na aquisição do espectro do CD (Figura 28). Se o tratamento com zinco foi claramente mais efetivo no deslocamento do pico em direção a 220 nm, como visto anteriormente, a incubação com as SUVs, o resultado foi similar a DCD-1L. Houve deslocamento do pico em direção a 200 nm, demonstrando que a DCD-SV embora apresentasse um comportamento mais rápido e até mais eficiente que a DCD-1L, ela pode apresentar o mesmo comportamento se tratando de mimetizar sua atividade biológica.

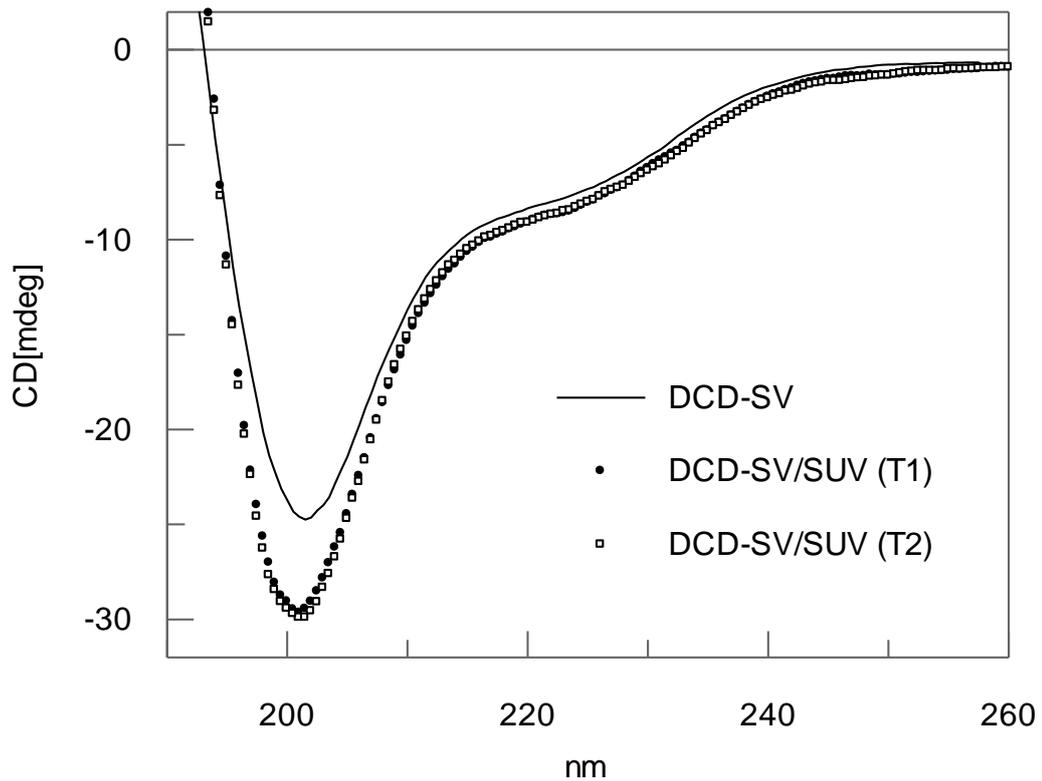


Figura 28 Espectros de CD do peptídeo DCD-SV em solução aquosa e glicose 200 mM, na concentração de 160  $\mu\text{M}$ , na ausência (—) e na presença de SUVs 200  $\mu\text{M}$ , nos tempos zero minuto (●) e 15 minutos (□). Nota-se que houve redução do sinal negativo na presença de SUVs.

Na Figura 29 apresentamos o resumo dos espectros que mostram claramente as diferenças de sinais após a incubação do peptídeo DCD-SV com zinco e com SUVs. Estes resultados sugerem que a DCD-SV tem uma tendência maior para adquirir estrutura helicoidal na presença de  $\text{Zn}^{2+}$  que na presença de SUVs, pois ocorre um deslocamento para bandas centradas em 220 nm, que é típico de estruturação de  $\alpha$ -hélices. Por motivos técnicos não foi possível realizar o experimento para avaliar a interação do peptídeo na presença concomitante de  $\text{Zn}^{2+}$  e SUVs.

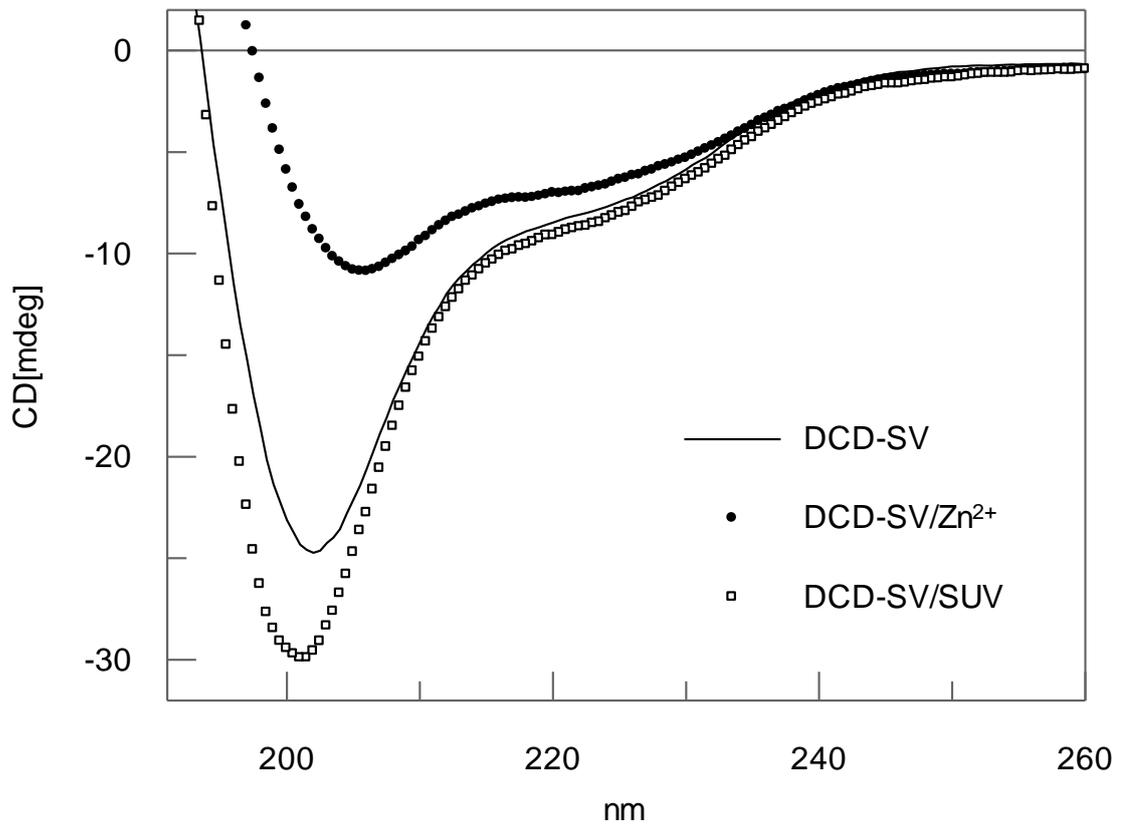


Figura 29 Espectros de CD do peptídeo DCD-SV em solução aquosa, glicose 200 mM, na concentração 160  $\mu\text{M}$ , na ausência (—) e na presença de  $\text{Zn}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  (●) e na presença de SUVs (□), coletados após 30 minutos da incubação. Nota-se redução acentuada de sinal negativo (elipticidade -30) na presença de SUVs, enquanto que na presença de  $\text{Zn}^{2+}$  ocorre um deslocamento para comprimentos de ondas maiores, entre 205 e 220 nm.

## 5 DISCUSSÃO

Frequentemente a purificação de proteínas emprega diferentes tipos de métodos cromatográficos, escolhidos a partir de propriedades específicas das proteínas, tais como o tamanho, a carga e a hidrofobicidade. Uma purificação rápida e eficiente de proteínas pode ser conseguida com vetores recombinantes que direcionam as proteínas com uma calda de histina facilitando sua purificação com colunas a base de níquel. Este foi o recurso usado neste estudo. Nos experimentos de expressão e purificação da rDCD no seu estado nativo, sem a sequência sinal (9,5 kDa), clonada no plasmídeo pAE, conseguimos isolar pequenas quantidades da proteína. A identidade foi obtida através do sequenciamento da porção N-terminal pelo método de Edman e análise de peptídeos por espectrometria de massa. Foram feitas modificações nos protocolos de expressão, como exemplo, diminuição da quantidade de IPTG; lise, aumentando a temperatura; e a adição de BME, porém, estes não resultaram em recuperação satisfatória da proteína recombinante para futuras análises. O aumento do tamanho da banda visualizada na Figura 11, quando realizada com o novo protocolo de lise, possivelmente tenha recuperado a proteína de corpos de inclusão. As proteínas presentes em corpos de inclusão não são simples de se manter e recuperar, uma vez que estão instáveis por conta do ambiente (82).

Esperávamos usar a proteína nativa madura, sem nenhuma clivagem, para entender como a proteína é processada e distribuída pelas várias partes da pele do corpo. Um estudo mostrou que a catepsina D presente no suor é responsável pela clivagem do precursor DCD gerando os peptídeos ativos (12), mas não existe um consenso sobre se existe outras proteases envolvidas neste processo (12). Devido à baixa eficiência de produção da proteína nativa, os estudos apresentados neste trabalho foram realizados com os peptídeos sintéticos da DCD-1L (48 aminoácidos) e a DCD-SV (59 aminoácidos). Os peptídeos foram sintetizados pela empresa Peptide 2.0 com uma pureza acima de 96%. Ainda não existem informações sobre as atividades biológicas DCD-SV, por exemplo, se o peptídeo exerce atividade antimicrobiana. No artigo de Motoyama e colaboradores em 2007 foi apresentada evidências que a DCD (forma nativa), e possivelmente, a sua splice variante, produzidas na placenta humana exerceria função proteolítica, mas não foram divulgados novos dados que confirmasse tal descoberta (79).

Neste trabalho são apresentados resultados em que comparamos alguns aspectos bioquímicos e biofísicos que confirmam o mecanismo antimicrobiano similar para ambos DCD-1L e DCD-SV. A diferença na sequência de aminoácidos dos peptídeos e a ausência do

resíduo de histidina na DCD-SV que pensávamos ser extremamente importante para a manutenção da função antimicrobiana e ativação via cofatores parece não ter influenciado nesta função (59).

Os experimentos com as GUVs demonstraram que a DCD-1L e a DCD-SV podem causar o extravasamento do conteúdo intravesicular. Os resultados com DCD-SV foi surpreendente, pois o efeito permeabilizante foi superior. Publicações anteriores descreveram que o  $Zn^{2+}$  atuaria como um co-factor e aumentaria a estruturação do peptídeo e a formação de um poro toroidal causando um desequilíbrio osmótico no microrganismo. Quando comparados nas mesmas condições a DCD-SV foi claramente superior à DCD-1L. Nossos resultados não são suficientes para podermos inferir se existem diferenças no tamanho e estabilidade dos poros formados pelos peptídeos. Os estudos de caracterização da estrutura secundária adotadas na presença de lipídios e  $Zn^{2+}$  pela espectroscopia de dicroísmo circular confirma os resultados com as GUVs. Este resultado foi uma surpresa pois imaginávamos que por conta da perda do resíduo de histidina na DCD-SV resultaria em menor ganho de estruturação. Os resultados indicam o contrário. A nossa hipótese é a carga neutra deste peptídeo facilite sua inserção nas membranas.

Na presença de cargas negativas presentes na superfície de bactérias, o N-terminal catiônico provavelmente é atraída eletrostaticamente, de modo similar a este proposto o DCD-1L se liga a superfície da membrana como uma  $\alpha$ -hélice anfifílica. Com a medida do passar do tempo a ligação é também maior o estado de oligomerização que a proteína se encontra quando ligada à membrana. Estruturalmente, o mais interessante, no caso da oligomerização da DCD-1L, é o fato de que o comprimento do peptídeo quando estruturada formar uma  $\alpha$ -hélice contínua de cerca de 7 nm. Fato este que a hélice tem um pouco mais que o dobro do comprimento de uma membrana, que tem cerca de 3 nm, uma inserção transmembranar como uma hélice contínua. O pH ácido pode ajudar funcionalmente a atividade do  $Zn^{2+}$ , pois aumenta o momento onde as cargas básicas do peptídeo, como histidina, arginina ou lisina, disponíveis para ligação. Foi demonstrado que este aumento do momento polar pode aumentar a atividade antimicrobiana em peptídeos ricos em histidinas (83). Podemos citar também que a presença do  $Zn^{2+}$  poderia aumentar a interação da DCD-1L com a superfície da membrana microbiana formando uma ligação por meio dos sais presentes entre peptídeo-lipídio, como já mostrada por outros PAMs como a kappacina ou peptídeos surfactantes aniônicos (44).

Outro detalhe que os resultados obtidos não eram os esperados foram os estudos biomiméticos, uma vez que esperávamos uma atividade da DCD-1L maior. O que

visualizamos foi o oposto pois a DCD-SV foi claramente superior à DCD-1L. Realizamos os experimentos com vesículas constituídas de POPC, um fosfolipídio neutro com a parte polar constituída de colina, foi também realizada a tentativa com POPG, fosfolipídio com a cabeça polar contendo um glicerol. Apenas as vesículas de POPC mostraram atividade de extravasamento do conteúdo intracelular, ficando cada vez mais opalescentes, as vesículas incubadas com a DCD-1L foram demonstrar uma atividade a partir do oitavo minuto, tendo como resultado final por volta de 12 minutos de filmagem. A DCD-SV até então era uma incógnita, por não haver resultados na literatura para comparar, o resultado foi que sob mesmas condições a DCD-SV precisou de apenas 7 minutos para mostrar um total extravasamento do conteúdo intravesicular e uma opalescência condizente com o fato (6, 75).

Foi realizada também análise termodinâmica para entender melhor qual o possível mecanismo de interação entre a vesícula e os peptídeos, porém o resultado foi totalmente incompreensível. O funcionamento do equipamento se deve a uma plataforma onde uma molécula fica imobilizada, no caso a vesícula, e outra em um compartimento similar a uma seringa a outra molécula para que seja adicionado em cima da plataforma, aonde o equipamento consegue mensurar mesmo minúsculas quantidades de energia sendo geradas ou retiradas deste sistema fechado. Existem duas explicações plausíveis para o caso de não ter apresentado uma leitura satisfatória, a primeira é de que a interação entre a vesícula e o peptídeo tenha uma entalpia que a interação seja quase instantânea, a segunda explicação é uma interação tão lenta e que apresente uma leitura tão baixa e inconstante que o equipamento não consegue mensurar. Uma vez que a atividade dos peptídeos tenha sido tão lenta quando visualizados no microscópio, levantamos a hipótese de que essa ligação seja fraca e inconstante, e que demande um grande tempo e uma energia muito baixa para que ocorra.

Outro resultado obtido com as vesículas foi com relação ao CD na presença das vesículas, nosso intuito foi o de verificar qual o perfil estrutural quando em presença das vesículas. As vesículas utilizadas no CD são menores do que as utilizadas nos experimentos de microscopia, porém, são preparadas da mesma forma e com o mesmo material. Com a DCD-1L houve apenas uma perda de magnitude de sinal, mas não um deslocamento do pico de sinal, a DCD-SV teve o resultado ainda mais pronunciado de não estruturação. Uma das possibilidades é que pode ter havido a interação entre as vesículas e os peptídeos, mas não o suficiente para que o limiar de concentração de peptídeo forme o tapete como citado anteriormente por Yeaman, isto poderia explicar a diminuição na magnitude do sinal assim como a falta de estruturação (64). Outra hipótese citada por outros pesquisadores é a de que o

passo mais importante é a interação entre a membrana e o peptídeo, uma vez que existem outros fatores endógenos que podem servir para iniciar essa estruturação.

Com base nos resultados levantamos a hipótese de que a presença da DCD-SV possa ser uma proteína que sempre esteve presente, porém, nossos conhecimentos não eram suficientes ou tão aprofundados para visualizar esta proteína. Outra hipótese é que essa possa ser uma mutação do sistema imunológico para combater estes micro-organismos que se tornam resistentes às novas classes de medicamentos. Nós não sabemos o mecanismo de ação deste possível novo PAM, mas podemos conjecturar que talvez ele haja sinergicamente com a DCD-1L, uma vez que os resultados apresentados pelos dois peptídeos nos experimentos biofísicos são similares.

## 6 CONCLUSÕES

É necessário frisar que dados bioquímicos, como os apresentados previamente, são uteis para melhor entender o comportamento das moléculas, porém sua utilização em sistemas mais complexos requer mais estudos. Algumas das conclusões que obtivemos foram:

- 1- A expressão da DCD por sistema procarioto pode não ser a melhor opção pela presença de possíveis modificações pós-traducionais;
- 2- Os resultados demonstram que a atividade em sistema biomimético é bem similar entre os dois peptídeos, com ênfase na maior velocidade apresentada pela DCD-SV;
- 3- Os resultados com a incubação dos peptídeos com as vesículas, aonde pode ser notada a opalescência das vesículas pode ser um ponto de que há a formação de pequenos poros, e não um defeito que causasse um rompimento das membranas;
- 4- O experimento aonde as vesículas fossem incubadas na presença do peptídeo e o cofator não foi realizada por conta da limitação da técnica, mas baseado nos experimentos de CD e outras publicações seria provável ver uma atividade bem mais rápida e agressiva;
- 5- O comportamento frente aos experimentos para a visualização de possíveis ganhos estruturais pode demonstrar que os dois peptídeos, em ambiente fisiológico, podem ter uma atividade sinérgica;
- 6- Experimentos como testes antimicrobianos com diferentes cepas e concentração, poderia confirmar este tipo resultado, ama vez que a DCD-1L tem sido descrita também como efetiva contra micro-organismos, mas esses testes nunca foram feitos apenas com a DCD-SV;
- 7- Os resultados obtidos com o CD poderiam talvez ser mais pronunciados uma vez que tivéssemos testado outras concentrações de peptídeos e membranas, um aumento da razão entre vesículas e peptídeos possa nos ajudar melhor;
- 8- Faz-se necessário o teste de outros possíveis cofatores endógenos para a realização de testes de estruturação

Outros experimentos se fazem necessários até sabermos a amplitude da diferença entre os dois peptídeos. Vale citar que esta linha de pesquisa não está restrita a apenas o período de Pós-Graduação (Mestrado) que agora se encerra. Vamos continuar trabalhando para que melhor entendamos e contribuir com resultados para que possam ser inseridos na história da Dermicidina e sua splice variante e ajudar no melhor entendimento do papel fisiológico desta proteína.

## REFERÊNCIAS\*

1. Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol.* 2001 Dec;2(12):1133-7.
2. Porter D, Weremowicz S, Chin K, Seth P, Keshaviah A, Lahti-Domenici J, et al. A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16;100(19):10931-6.
3. Majczak G, Lilla S, Garay-Malpartida M, Markovic J, Medrano FJ, de Nucci G, et al. Prediction and biochemical characterization of intrinsic disorder in the structure of proteolysis-inducing factor/dermcidin. *Genet Mol Res.* 2007;6(4):1000-11.
4. Lai YP, Peng YF, Zuo Y, Li J, Huang J, Wang LF, et al. Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-1L, a human antimicrobial peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Mar 4;328(1):243-50.
5. Jung HH, Yang ST, Sim JY, Lee S, Lee JY, Kim HH, et al. Analysis of the solution structure of the human antibiotic peptide dermcidin and its interaction with phospholipid vesicles. *BMB Rep.* 2010 May;43(5):362-8.
6. Song C, Weichbrodt C, Salnikov ES, Dynowski M, Forsberg BO, Bechinger B, et al. Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 19;110(12):4586-91.
7. Cunningham TJ, Hodge L, Speicher D, Reim D, Tyler-Polsz C, Levitt P, et al. Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin. *J Neurosci.* 1998 Sep 15;18(18):7047-60.
8. Schittek B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. *J Innate Immun.* 2012;4(4):349-60.
9. Stewart GD, Skipworth RJ, Ross JA, Fearon K, Baracos VE. The dermcidin gene in cancer: role in cachexia, carcinogenesis and tumour cell survival. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008 May;11(3):208-13.
10. Valdes-Rodriguez R, Torres-Alvarez B, Gonzalez-Muro J, Almeda-Valdes P. [The skin and the endocrine system]. *Gac Med Mex.* 2012 Mar-Apr;148(2):162-8.
11. Yamasaki K, Gallo RL. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol.* 2008 Jan-Feb;18(1):11-21.
12. Rieg S, Seeber S, Steffen H, Humeny A, Kalbacher H, Stevanovic S, et al. Generation of multiple stable dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of different body sites. *J Invest Dermatol.* 2006 Feb;126(2):354-65.

\*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

13. Lai Y, Villaruz AE, Li M, Cha DJ, Sturdevant DE, Otto M. The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol Microbiol*. 2007 Jan;63(2):497-506.
14. Čipáková I, Gašperík J, Hostinová E. Expression and purification of human antimicrobial peptide, dermcidin, in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2006;45(2):269-74.
15. Flad T, Schiestel T, Brunner H, Tolson J, Ouyang Q, Pawelec G, et al. Development of an MHC-class I peptide selection assay combining nanoparticle technology and matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *J Immunol Methods*. 2003 Dec;283(1-2):205-13.
16. Landgraf P, Sieg F, Wahle P, Meyer G, Kreutz MR, Pape HC. A maternal blood-borne factor promotes survival of the developing thalamus. *FASEB J*. 2005 Feb;19(2):225-7.
17. Cunningham TJ, Jing H, Wang Y, Hodge L. Calreticulin binding and other biological activities of survival peptide Y-P30 including effects of systemic treatment of rats. *Exp Neurol*. 2000 Jun;163(2):457-68.
18. Landgraf P, Wahle P, Pape HC, Gundelfinger ED, Kreutz MR. The survival-promoting peptide Y-P30 enhances binding of pleiotrophin to syndecan-2 and -3 and supports its neurotogenic activity. *J Biol Chem*. 2008 Sep 5;283(36):25036-45.
19. Shen SL, Qiu FH, Dayarathna TK, Wu J, Kuang M, Li SS, et al. Identification of Dermcidin as a novel binding protein of Nck1 and characterization of its role in promoting cell migration. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jun;1812(6):703-10.
20. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002 Jan 24;415(6870):389-95.
21. Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol*. 2012 Jun;32(2):143-71.
22. Hancock RE, Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Jan 10;206(2):143-9.
23. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005 Mar;3(3):238-50.
24. Vizioli J, Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 Nov;23(11):494-6.
25. Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G, et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15;268(20):14893-7.
26. Simmaco M, Mignogna G, Barra D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers*. 1998;47(6):435-50.

\*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

27. Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):498-502.
28. Kim HS, Yoon H, Minn I, Park CB, Lee WT, Zasloff M, et al. Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I. *J Immunol*. 2000 Sep 15;165(6):3268-74.
29. Ulvatne H, Vorland LH. Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(7):507-11.
30. Westerhoff HV, Juretic D, Hendler RW, Zasloff M. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(17):6597-601.
31. Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, Huang HW. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J*. 2000 Oct;79(4):2002-9.
32. Bierbaum G, Sahl HG. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol*. 1985 Apr;141(3):249-54.
33. Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L, Jr. The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*. 2001 Mar 13;40(10):3016-26.
34. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 15;1462(1-2):1-10.
35. Zanetti M, Gennaro R, Scocchi M, Skerlavaj B. Structure and biology of cathelicidins. *Adv Exp Med Biol*. 2000;479:203-18.
36. Maloy WL, Kari UP. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*. 1995;37(2):105-22.
37. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 15;1462(1-2):55-70.
38. Epand RF, Epand RM, Monaco V, Stoia S, Formaggio F, Crisma M, et al. The antimicrobial peptide trichogin and its interaction with phospholipid membranes. *Eur J Biochem*. 1999 Dec;266(3):1021-8.
39. van 't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, Amerongen AV. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem*. 2001 Apr;382(4):597-619.
40. Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:61-92.

41. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2000;55(1):4-30.
42. Gesell J, Zasloff M, Opella SJ. Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *J Biomol NMR*. 1997 Feb;9(2):127-35.
43. Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep;1758(9):1408-25.
44. Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci*. 2009 Dec;10(6):585-606.
45. Kobayashi H, Ohta N, Umeda M. Biology of lysenin, a protein in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Int Rev Cytol*. 2004;236:45-99.
46. Kokryakov VN, Harwig SS, Panyutich EA, Shevchenko AA, Aleshina GM, Shamova OV, et al. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett*. 1993 Jul 26;327(2):231-6.
47. Ostberg N, Kaznessis Y. Protegrin structure-activity relationships: using homology models of synthetic sequences to determine structural characteristics important for activity. *Peptides*. 2005 Feb;26(2):197-206.
48. Matsuzaki K, Yoneyama S, Fujii N, Miyajima K, Yamada K, Kirino Y, et al. Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin I, and its linear analog. *Biochemistry*. 1997 Aug 12;36(32):9799-806.
49. Powers JP, Hancock RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 2003 Nov;24(11):1681-91.
50. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 6th ed. New York: W.H. Freeman; 2013.
51. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2011.
52. Green DE, Tzagoloff A. Role of lipids in the structure and function of biological membranes. *J Lipid Res*. 1966 Sep;7(5):587-602.
53. Palsdottir H, Hunte C. Lipids in membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 3;1666(1-2):2-18.
54. Stevens TJ, Arkin IT. Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins*. 2000 Jun 1;39(4):417-20.
55. Cronan JE. Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:203-24.

56. Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.* 2001 Oct;1(3):156-64.
57. Takahashi D, Shukla SK, Prakash O, Zhang G. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie.* 2010 Sep;92(9):1236-41.
58. Yount NY, Yeaman MR. Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep;1758(9):1373-86.
59. Jiang Z, Kullberg BJ, van der Lee H, Vasil AI, Hale JD, Mant CT, et al. Effects of hydrophobicity on the antifungal activity of alpha-helical antimicrobial peptides. *Chem Biol Drug Des.* 2008 Dec;72(6):483-95.
60. Sudbrack TP, Archilha NL, Itri R, Riske KA. Observing the solubilization of lipid bilayers by detergents with optical microscopy of GUVs. *J Phys Chem B.* 2011 Jan 20;115(2):269-77.
61. Lee AG. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2003 May 2;1612(1):1-40.
62. Ehrenstein G, Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys.* 1977 Feb;10(1):1-34.
63. Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents.* 2004 Dec;24(6):536-47.
64. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003 Mar;55(1):27-55.
65. Bates DO, Harper SJ. Therapeutic potential of inhibitory VEGF splice variants. *Future Oncol.* 2005 Aug;1(4):467-73.
66. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci.* 2001 Mar;114(Pt 5):853-65.
67. Atamas SP. Alternative splice variants of cytokines: making a list. *Life Sci.* 1997;61(12):1105-12.
68. Blair CA, Zi X. Potential molecular targeting of splice variants for cancer treatment. *Indian J Exp Biol.* 2011 Nov;49(11):836-9.
69. Hilmi C, Guyot M, Pages G. VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *J Nucleic Acids.* 2012;2012:162692.
70. Velloso CP, Harridge SD. Insulin-like growth factor-I E peptides: implications for aging skeletal muscle. *Scand J Med Sci Sports.* 2010 Feb;20(1):20-7.

71. Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, et al. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw.* 2011 Sep;22(3):127-47.
72. Sambrook J, Russell DW. *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.
73. Nallamsetty S, Waugh DS. A generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* using a combinatorial His6-maltose binding protein fusion tag. *Nat Protoc.* 2007;2(2):383-91.
74. Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS, Samuelson JC. Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Jul;77(13):4634-46.
75. Cabrera MP, Alvares DS, Leite NB, de Souza BM, Palma MS, Riske KA, et al. New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: lytic activity and clustering observed with giant vesicles. *Langmuir.* 2011 Sep 6;27(17):10805-13.
76. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning : a laboratory manual.* 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
77. Vincentelli R, Cimino A, Geerlof A, Kubo A, Satou Y, Cambillau C. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. *Methods.* 2011 Sep;55(1):65-72.
78. Babu M, Kagan O, Guo H, Greenblatt J, Emili A. Identification of protein complexes in *Escherichia coli* using sequential peptide affinity purification in combination with tandem mass spectrometry. *J Vis Exp.* 2012(69).
79. Lee Motoyama JP, Kim-Motoyama H, Kim P, Nakagama H, Miyagawa K, Suzuki K. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 15;357(4):828-33.
80. Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci.* 2000 Dec;1(4):349-84.
81. Paulmann M, Arnold T, Linke D, Ozdirekcan S, Kopp A, Gutschmann T, et al. Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic antimicrobial peptide present in human sweat. *J Biol Chem.* 2012 Mar 9;287(11):8434-43.
82. Graslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, et al. Protein production and purification. *Nat Methods.* 2008 Feb;5(2):135-46.
83. Kacprzyk L, Rydengard V, Morgelin M, Davoudi M, Pasupuleti M, Malmsten M, et al. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Nov;1768(11):2667-80.

## APÊNDICE – Dados completos do sequenciamento pelo ORBITRAP e controles do CD

Apêndice 1 - Dados completos do sequenciamento via ORBITRAP realizado no CEFAP-ICB.

### MASCOT Search Results

#### Protein View: DCD\_HUMAN

Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2

Database: SwissProt  
 Score: 337  
 Nominal mass (M<sub>r</sub>): 11391  
 Calculated pI: 6.08  
 Taxonomy: Homo sapiens

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of DCD\\_HUMAN against nr.](#)

#### Search parameters

MS data file: D:\Data\Belizario\Belizario\_1.mgf  
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Variable modifications: Oxidation (M)

#### Protein sequence coverage: 53%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNPCHASAA QKENAGEDPG
51 LARQAPKPRK QRSSLLEKGL DGAKKAVGGL GKLKDAVED LESVGKGAVH
101 DVKDVLDSVL

```

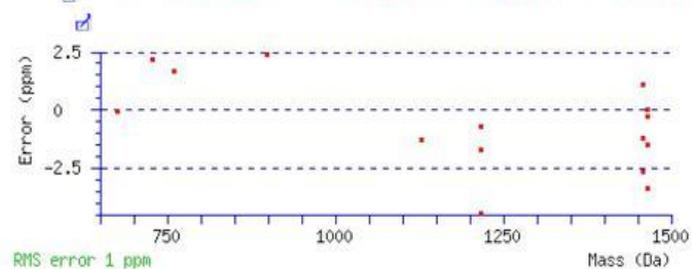
Sequência encontrada após análise por tratamento trípico, em vermelho peptídeos encontrados

Unformatted sequence string: [110 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort peptides by  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

Show predicted peptides also

Query	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
<a href="#">1632</a>	43 - 53	564.7669	1127.5192	1127.5207	-1.28	0	65	7.8e-006	1	U	K.ENAGEDPGLAR.Q
<a href="#">500</a>	63 - 68	338.6974	675.3802	675.3803	-0.047	0	46	0.0018	1	U	R.SSLLEK.G
<a href="#">1981</a>	63 - 74	609.3377	1216.6608	1216.6663	-4.47	1	16	0.39	1	U	R.SSLLEKGLDGAK.K
<a href="#">1982</a>	63 - 74	406.5620	1216.6642	1216.6663	-1.74	1	19	0.81	1	U	R.SSLLEKGLDGAK.K
<a href="#">1985</a>	63 - 74	609.3400	1216.6654	1216.6663	-0.69	1	27	0.039	1	U	R.SSLLEKGLDGAK.K
<a href="#">1986</a>	63 - 74	609.3400	1216.6654	1216.6663	-0.69	1	17	0.079	1	U	R.SSLLEKGLDGAK.K
<a href="#">592</a>	75 - 82	365.2353	728.4560	728.4545	2.17	1	28	0.41	7	U	K.KAVGGLGK.L
<a href="#">931</a>	76 - 85	300.5280	898.5622	898.5600	2.42	1	28	0.16	1	U	K.AVGGLGKLGK.D
<a href="#">2984</a>	83 - 96	1459.7600	1458.7527	1458.7566	-2.64	1	84	3.1e-007	1	U	K.LGKDAVEDLESVKG.(
<a href="#">2985</a>	83 - 96	730.3847	1458.7548	1458.7566	-1.19	1	74	2.9e-006	1	U	K.LGKDAVEDLESVKG.(
<a href="#">2986</a>	83 - 96	487.2600	1458.7582	1458.7566	1.09	1	16	0.26	1	U	K.LGKDAVEDLESVKG.(
<a href="#">3018</a>	97 - 110	1466.7800	1465.7727	1465.7777	-3.38	1	98	5e-009	1	U	K.GAVHDVKDVLDSVL.-
<a href="#">3020</a>	97 - 110	733.8950	1465.7754	1465.7777	-1.52	1	59	4.5e-006	1	U	K.GAVHDVKDVLDSVL.-
<a href="#">3021</a>	97 - 110	489.5997	1465.7773	1465.7777	-0.28	1	13	0.32	1	U	K.GAVHDVKDVLDSVL.-
3022	97 - 110	733.8961	1465.7776	1465.7777	-0.021	1	72	1.1e-006	1	U	K.GAVHDVKDVLDSVL.-
<a href="#">644</a>	104 - 110	760.4100	759.4027	759.4014	1.69	0	23	0.068	1	U	K.DVLDSVL.-



Peptídeos verificados e seus respectivos Scores

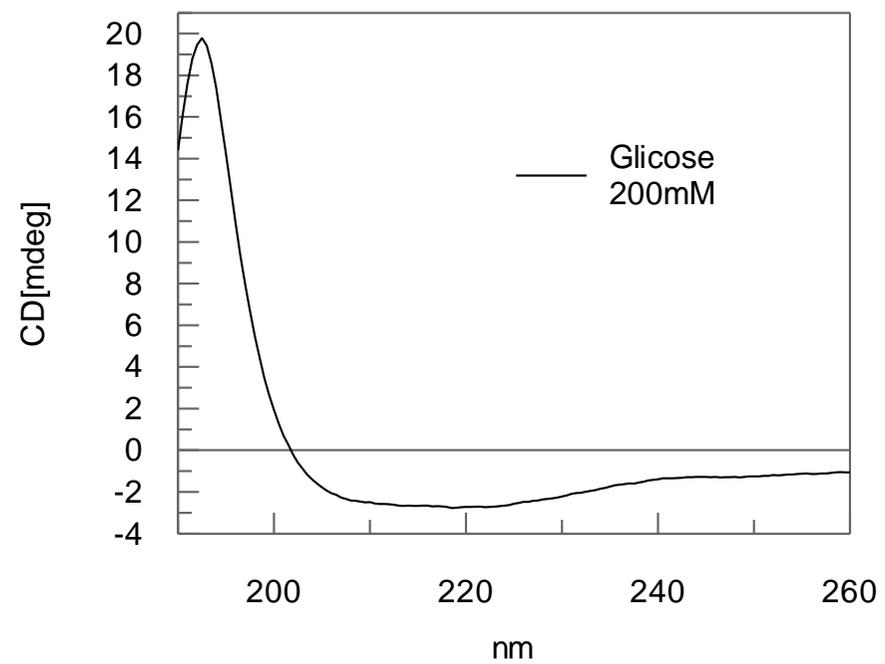
<u>Dupes</u>	Expect	Rank	U	1	2	Peptide	
	0.037	▶	2			<b>GAYSLSLR</b>	significant
	9	▶	1			<b>GFFLFVEGGR</b>	top ranking
	6.4e-005	▶	1			<b>GSSIFGLAPGK</b>	significant and top ranking
	1.3e-006	▶	1	■		<b>SSGTSYDPVLK</b>	peptide is found in all proteins in family member 1
	6.2e-007	▶	1	■		<b>VCNYVSWIK</b>	peptide is found in some but not all proteins in family member 2
	6.4e-005	▶	1	U		<b>GSSIFGLAPGK</b>	unique
▶	2			▶	1	<b>LNTLETEEWFFK</b>	peptide has two duplicates
	0.18	▶	1			<b>LNTLETEEWFFK</b>	duplicate peptide

### Protein families

▶	<u>1</u>		DCD_HUMAN	337	Dermcidin...
▶	<u>2</u>		CH60_BUCTS	80	60 kDa ch...
▶	<u>3</u>				
		1	CH60_CITK8	67	60 kDa ch...
		2	CH60_ENT38	54	60 kDa ch...
▶	<u>4</u>		FUR_ECOLI	56	Ferric upt...
▶	<u>5</u>		DGAL_CITFR	54	D-galacto...
▶	<u>6</u>		HUTI_FUSNN	36	Imidazolo...
▶	<u>7</u>		CUX2_HUMAN	29	Homeobo...
	<u>8</u>		SELD_MYXXD	26	Selenide, ...
	<u>9</u>		SYBU_MOUSE	20	Syntabuli...
▶	<u>10</u>		FH1_ARATH	19	Formin-lik...

Outras proteínas encontradas no sequenciamento trípico

Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]	112,54	60,00	1	3	15	58	110	11,3	6,54
P0A9B1	Ferric uptake regulation protein OS=Escherichia coli O157:H7 GN=fur PE=3 SV=1 - [FUR_ECO57]	17,69	29,73	2	1	4	6	148	16,8	6,11
Q8KIX2	60 kDa chaperonin OS=Buchnera aphidicola subsp. Thelaxes suberi GN=groL PE=3 SV=1 - [CH60_BUCTS]	14,77	7,09	2	1	2	9	550	57,8	5,10
P0A957	KHG/KDPG aldolase OS=Escherichia coli O157:H7 GN=eda PE=3 SV=1 - [ALKH_ECO57]	11,50	31,92	1	1	2	4	213	22,3	5,67
C5P7A7	Extracellular metalloproteinase 10 OS=Coccidioides posadasii (strain C735) GN=MEP10 PE=3 SV=1 - [MEP10_COCP7]	10,84	2,54	1	1	1	4	629	69,4	7,56
O66196	60 kDa chaperonin (Fragment) OS=Enterobacter amnigenus GN=groL PE=3 SV=1 - [CH60_ENTAM]	9,11	14,66	23	1	4	4	539	56,6	4,96
P00760	Cationic trypsin OS=Bos taurus PE=1 SV=3 - [TRY1_BOVIN]	5,77	11,38	1	1	2	2	246	25,8	8,07
Q32BY6	Phosphoglycerate kinase OS=Shigella dysenteriae serotype 1 (strain Sd197) GN=pgk PE=3 SV=1 - [PGK_SHIDS]	5,75	12,40	25	1	2	2	387	41,1	5,22
Q252W8	50S ribosomal protein L18 OS=Chlamydomophila felis (strain Fe/C-56) GN=rplR PE=3 SV=1 - [RL18_CHLFF]	5,50	30,89	2	1	3	3	123	13,5	10,54
B6IRP6	DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Rhodospirillum centenum (strain ATCC 51521 / SW) GN=rpoB PE=3 SV=1 - [RPOB_RHOCS]	5,16	7,09	1	1	5	5	1397	156,3	5,49
P23925	D-galactose-binding periplasmic protein OS=Citrobacter freundii GN=mgIB PE=3 SV=1 - [DGAL_CITFR]	5,11	9,64	1	1	2	2	332	35,8	6,29
P39172	High-affinity zinc uptake system protein ZnuA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=znuA PE=1 SV=4 - [ZNUA_ECOLI]	4,54	6,77	1	1	1	1	310	33,8	5,99
P30859	Putative ABC transporter arginine-binding protein 2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=arti PE=1 SV=3 - [ARTI_ECOLI]	3,93	13,17	1	1	1	1	243	26,9	6,10
Q3IU78	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone) OS=Nastronomonas pharaonis (strain DSM 2160 / ATCC 35678) GN=pvrD PE=3 SV=1 - [PYRD_NATPD]	3,71	12,00	1	1	2	2	350	37,1	4,64
Q6R5A3	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 OS=Cavia porcellus GN=Trpv1 PE=2 SV=1 - [TRPV1_CAVPO]	3,43	2,98	1	1	1	1	839	95,2	8,02
C6BSG3	Uracil phosphoribosyltransferase OS=Desulfovibrio salexigens (strain ATCC 14822 / DSM 2638 / NCIB 8403 / VKM B-1763) GN=upp PE=3 SV=1 - [UPP_DESAD]	3,40	8,17	1	1	1	1	208	22,5	5,48
P21656	Tryptophan--tRNA ligase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=trpS PE=1 SV=2 - [SYW_BACSU]	3,24	4,85	1	1	1	1	330	37,2	6,95
D4A5U3	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E OS=Rattus norvegicus GN=Tgm3 PE=2 SV=1 - [TGM3_RAT]	2,23	1,88	1	1	1	1	693	77,2	6,89



Espectro padrão da glicose (200mM) em H<sub>2</sub>O