UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

DANIELA BETON

Estrutura e função das cisteína proteinases intestinais do besouro *Tenebrio molitor*

São Paulo

Data de Depósito na SPG:
09/10/2009

DANIELA BETON

Estrutura e função das cisteína proteinases intestinais do besouro *Tenebrio molitor*

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

São Paulo

2009

DANIELA BETON

Estrutura e função das cisteína proteinases intestinais do besouro *Tenebrio molitor*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Dedico...

...a meus pais que sempre me

incentivaram para a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra, pelos ensinamentos, conselhos e competente orientação que tornaram possível a execução deste trabalho.

A Prof^{a}. Dr^{a}. Clélia Ferreira, pelas discussões durante este projeto e pelo tratamento carinhoso.

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah e a sua aluna Cristiane Guzzo, pela ajuda essencial na cristalização, obtenção e coleta de dados de difração de raios-X dos cristais e na determinação das estruturas cristalográficas das pró-catepsinas L digestivas.

Ao Prof. Alberto de Freitas Ribeiro e ao Waldir pela colaboração nos experimentos de imunocitolocalização.

Ao Prof. Luiz Juliano, à Prof^{a}. Dr^{a}. Maria Juliano e a Isaura Yoshico Hirata pelo seqüenciamento N-terminal.

Ao Prof. Sandro Roberto Marana, pelas dicas e protocolos de expressão em levedura e pelo vetor de expressão pET28a.

A Prof^{a}. Dr^{a}. Aline Maria da Silva pelas cepas bacterianas BL21(DE3) e BL21(DE3)PLysS .

Ao Dr. Julio Cesar Levano Garcia pelas dicas valiosas da cepa bacteriana OrigamiB(DE3).

A Dr^{a}. Fabiane Chaves Cançado pela valiosa ajuda no programa PyMol.

A Luci Deise Navarro pelo seqüenciamento de DNA.

Aos amigos que me acompanharam desde o começo, Daniela C. Gonzalez Kristeller, Juliana M. de Souza Canavez, Andréa C. Fogaça, Michelle Susin, Alexandre Sanchez e Raquel Bagattini pela dedicação, carinho e amizade.

Aos amigos Layla F. Martins, Maria Cícera P. da Silva, Fabiane Chaves Cançado, Lúcio M. Ferreira de Mendonça e Luci Deise Navarro pela ajuda e amizade.

Aos amigos do laboratório Nathália Ramalho, Fábio Tamaki, Thaís Bifano, Érica Moreira, Fernando Genta, Ana Gómez Duran, Alexandra Dumont, Lucas

Guerra, Ivan Bragatto, Marcelo Padilha, André Pimentel, Walciane da Silva, Adriana Lopes, Bruno Lira, Fábio Mendes, Pedro Tizei, Thiago Alegria, Augusto Crivellari e Flávia Bartolleti, pelo apoio e convivência.

À Luiza Nakabayashi, M. Ivanilde Marcelino e Christiane Cardoso pelo apoio técnico e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos do bloco 9, Luciana, Alessandra, Milton, Érica, Sara, Alessandro, Humberto, Carol, Paloma, Flávia Terzini, Flávia e Ana Claudia pelo apoio e principalmente pelos momentos de descontração.

Aos demais amigos do Instituto: Renato Raposo, Patrícia, Chico, Yvone, Karina, Rafaela, Silvia, Sandra, Rogério, André, Ana Laura, Diogo, Prof^{a}. Dr^{a}. Regina, Isaura, Flávia, Renato, Julio C.L. Garcia, Denise, Adriana, Diorge, Max, Priscila, Maira, Larissa, Júlio, Lúcia e Juliana.

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP pela infraestrutura para realização deste trabalho.

Ao laboratório Nacional de luz Síncroton pela infraestrutura para a coleta de dados de difração de raios-X dos cristais da pró-catepsinas L digestivas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

Beton, D. **Estrutura e função das cisteína proteinases intestinais do besouro *Tenebrio molitor*** . 2009.165p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

A catepsina L é uma cisteína proteinase da família da papaína (clã CA, família C1), sendo esta família a mais conhecida entre as cisteína proteinase. A catepsina L, como outras proteinases da família C1, é sintetizada como uma pró-enzima inativa que é ativada através da remoção do pró-peptídeo. Os pró-peptídeos das catepsinas da subfamília catepsina L apresentam um motivo consenso, denominado motivo ERFNIN. A catepsina L corresponde a principal proteinase digestiva em *Tenebrio molitor*. No nosso laboratório 3 pró-catepsinas L (pCALs) foram clonadas e seqüenciadas a partir de uma biblioteca de cDNA de intestino médio de larvas de *T. molitor:* pCAL1 (CAL lisossomal), pCAL2 e pCAL3 (enzimas digestivas). Estas proteinases apresentam o motivo ERFNIN e os resíduos envolvidos na catálise: Cys25, His169, e Asn175 com Gln19 (numeração da papaína). Neste trabalho descrevemos a clonagem em vetores de expressão e a expressão em bactérias das sequências codificadoras de pCAL1, pCAL2 e pCAL3. As pró-catepsinas L recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade e a incubação em pH ácido resultou na formação das enzimas maduras CAL1, CAL2 e CAL3 com atividade sobre o substrato Z-FR-MCA. O anticorpo policlonal anti-pCAL2 foi produzido em coelho e reconheceu pCAL2 e CAL2 em *immunoblots*. Experimentos de *immunoblots* com diferentes tecidos de *T. molitor* mostraram que o anticorpo policlonal anti-pCAL3 reconheceu pCAL3 e CAL3 nos dois terços anteriores do intestino médio de larvas de *T. molitor*. Estudos de imunocitolocalização indicam que

a catepsina L 3 ocorre em vesículas no intestino médio anterior e em microvilosidades no intestino médio posterior. Para os experimentos de cristalização, nós expressamos pCAL1, pCAL2 e pCAL3 como mutantes Cys25→Ser inativos. pCAL3Cys26Ser foi cristalizada por difusão de vapor (gota sentada) contra 0,1–1,6M de dihidrogênio fosfato de amônio. Os cristais são monoclínicos com grupo espacial C2 e parâmetros de célula: a=57,634 Å, b=89,322 Å, c=70,076 Å, $\alpha=\gamma=90°$, $\beta=92,502°$ e uma molécula na unidade assimétrica. A e strutura foi determinada por substituição molecular usando a estrutura de *Fasciola hepatica* (42% de identidade) como modelo. O modelo foi refinado a 2,1 Å com fator R final de 16,19% (R_{free}=20,5%). pCAL2Cys25Ser foi cristalizada por difusão de vapor (gota sentada) contra acetato de sódio 0,2M, cacodilato de sódio 0,1M pH6,6-6,7 e 20% de PEG 8000. Os cristais são triclínicos com grupo espacial P1 e parâmetros de célula: a=51,669 Å, b=52,37 Å, c=59,716 Å, α= 91,278°, γ=109,586°, β=91,547° e duas moléculas na unidade assimétrica. A estrutura foi determinada por substituição molecular usando a estrutura da pCAL3 (44% de identidade) como modelo. O modelo foi refinado a 2,0 Å com fator R final de 17,61% (R_{free}=22,48%). A estrutura terciária da pró-catepsinas L digestivas é muito similar as estruturas de cisteína proteinases da família da papaína.

Palavras chave: pró-catepsina L, catepsina L, *Tenebrio molitor*

ABSTRACT

Beton, D. **Structure and function of intestinais cysteine proteinases of *Tenebrio molitor* beetle. 2009**. 165p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cathepsin L is a cysteine proteinase of the papain family (clan CA, family C1), which is the most known among the cysteine proteinases. Cathepsin L, like other proteinases of family C1, is synthesized as an inactive proenzyme that is activated by propeptide removal. The propeptide of cathepsin L-like subfamily contain a highly conserved motif, the so called ERFNIN motif. Cathepsin L corresponds to the major digestive proteinase in *Tenebrio molitor*. In our laboratory, 3 procathepsins L (pCALs) were cloned and sequenced from a cDNA library prepared from *T. molitor* larval midguts: pCAL1 (lysosomal CAL), pCAL2 and pCAL3 (digestive enzymes). These proteinases have ERFNIN motif and 3 residues directly involved in catalysis: Cys25, His169, Asn175 with Gln19 (papain numbering). In this work we report the cloning into the expression vector and bacterial expression of the sequences coding pCAL1, pCAL2 and pCAL3. The recombinant procathepsins L were purified by affinity chromatography and activation of these enzymes occurs under acidic conditions. The cathepsins L (CAL1, CAL2 and CAL3) were able to hydrolyse Z-FR-MCA. The polyclonal antibody anti-pCAL2 was produced in rabbit and recognized pCAL2 and CAL2 on immunoblots. Immunoblot analyses of different *T. molitor* larval tissues demonstrated that the polyclonal antibody anti-pCAL3 recognised pCAL3 and CAL3 in the anterior two-thirds of midgut tissue of *T. molitor* larvae. Immunolocalization studies indicate that cathepsin L 3 occurs in vesicles in the anterior midgut and microvilli in posterior midgut. To crystallographic studies we expressed pCAL1, pCAL2 and pCAL3 as inactive Cys25→Ser mutants. pCAL3Cys26Ser was

crystallized by vapor diffusion in sitting drops against 0.1-1.6 M mono-ammonium dihydrogen phosphate. The crystals are monoclinic, belonging to space group C2, with cell parameters: a = 57.634 Å, b = 89.322 Å, c = 70.076 Å, $\alpha = \gamma = 90°$, $\beta = 92.502°$ and contain one molecule in the asymmetric unit. The structure was determined by molecular replacement using the structure of *Fasciola hepatica* procathepsin L (42.5% identity) as a model. The model was refined at 2.1 Å resolution with an R factor of 16.19% (R_{free} = 20.5%). pCAL2Cys25Ser was crystallized by vapor diffusion in sitting drops against 0.2M sodium acetate, 0.1M sodium cacodylate pH 6.6-6.7 and 20% polyethylene glycol 8,000. The crystals are triclinic, belonging to space group P1, with cell parameters: a = 51.669 Å, b = 52.37 Å, c = 59.716 Å, $\alpha = 91.278°$ $\gamma = 109.586°$, $\beta = 91.547°$ and contain two molecules in the asymmetric unit. The structure was determined by molecular replacement using the structure of procathepsin L 3 (44 % identity) as a model. The model was refined at 2.0 Å resolution with an R factor of 17.61% (R_{free} = 22.48%). The tertiary structure ofdigestive procathepsins L is very similar to papain-like cysteine proteinases structures.

Keywords: procathepsins L, cathepsin L, *Tenebrio molitor*

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs: absorbância

BSA: albumina de soro bovino

CAL: catepsina L

CAL1: catepsina L 1 de *Tenebrio molitor*

CAL2: catepsina L 2 de *Tenebrio molitor*

CAL3: catepsina L 3 de *Tenebrio molitor*

cDNA: DNA complementar

dNTP: desoxirridonucleotídeo 5’ trifosfato

DO: densidade óptica

DTT: ditiotreitol

E-64: L-trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido (4-guanidinobutano)

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

kb: quilobases

K_{cat}: constante catalítica

kDa: quilodalton

K_i: constante de inibição

K_m: constante de Michaelis

IPTG: isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncroton

pCAL: pró-catepsina L

pCAL1: pró-catepsina L 1 de *Tenebrio molitor*

pCAL2: pró-catepsina L 2 de *Tenebrio molitor*

pCAL3: pró-catepsina L 3 de *Tenebrio molitor*

pCAL1Cys26Ser: pró-catepsina L 1 mutante Cys26→Ser

pCAL2Cys25Ser: pró-catepsina L 2 mutante Cys25→Ser

pCAL3Cys26Ser: pró-catepsina L 3 mutante Cys26→Ser

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDB: "*Protein Data Bank*"

PEG: polietileno glicol

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Tris: tris-(hidroximetil)-aminometano

Z-FR-MCA: carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amino-4-metil-coumarina

Z-RR-MCA: carbobenzoxi-Arg-Arg-MCA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Cisteína proteinases 16
1.1.1. Estrutura e mecanismo catalítico das cisteína proteinases lisossomais 20
1.1.2. Mecanismos de regulação das cisteína proteinases lisossomais 25
1.2. Cisteína proteinases em insetos 27
1.2.1. Catepsinas L em insetos 28
2. OBJETIVOS 32
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 33
3.1. Procedimentos para manipulação de *Tenebrio molitor* 33
3.1.1. Manutenção dos animais 33
3.1.2. Preparação de amostras para os experimentos de *immunoblot* 33
3.2. Procedimentos para manipulação de bactérias 34
3.2.1. Manutenção e cultivo de bactérias 34
3.2.2. Preparação de bactérias competentes para transformação por $CaCl_2$ 35
3.2.3. Transformação de bactérias por choque térmico 35
3.3. Procedimentos para manipulação de leveduras 36
3.3.1. Manutenção e cultivo de leveduras 36
3.3.2. Preparação de leveduras competentes para transformação por eletroporação 36
3.3.3. Transformação de leveduras por eletroporação 37
3.4. Procedimentos de manipulação e análise de DNA 37
3.4.1. Descrição dos oligonucleotídeos 38
3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) 41
3.4.3. Mutagênese sítio-dirigida 41
3.4.4. Eletroforese em gel de agarose 43
3.4.5. Eluição de fragmentos de DNA 43
3.4.6. Métodos de preparação de plasmídeos 44
3.4.7. Sequenciamento automatizado de DNA 44
3.5. Clonagem das pró-catepsinas L de *T. molitor* em vetores de expressão 45
3.5.1. Clonagem da sequência codificadora da pró-catepsina L 2 (pCAL2) de *T. molitor* no vetor pPIC9 para expressão em levedura 45
3.5.2. Clonagem da sequência codificadora da pró-catepsina L 1 (pCAL1) de *T. molitor* no vetor pPIC9 para expressão em levedura 47
3.5.3. Subclonagem de pCAL2 no vetor pET28a para expressão em bactérias 47
3.5.4. Clonagem de pCAL2 no vetor pAE para expressão em bactéria 49
3.5.5. Clonagem da seqüencia codificadora da pró-catepsina L 3 (pCAL3) de *T. molitor* no vetor pAE para expressão em bactéria 51
3.5.6. Clonagem de pCAL1 no vetor pAE para expressão em bactéria 54
3.5.7. Clonagem de pCAL2 mutante no vetor de expressão pAE 54
3.5.8. Clonagem de pCAL3 mutante no vetor de expressão pAE 57
3.5.9. Clonagem de pCAL1 mutante no vetor de expressão pAE 59
3.6. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas 61
3.6.1. Expressão de pCAL1 e pCAL2 recombinantes em levedura 61
3.6.2. Expressão de pCAL2 recombinante em BL21(DE3)PLysS 62
3.6.3. Expressão de pCAL2 recombinante em BL21(DE3) 63

3.6.4. Expressão de pCAL1, pCAL2, pCAL3, pCAL1Cys26Ser, pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser recombinantes em OrigamiB(DE3) 64
3.6.5. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) 65
3.6.6. Teste de solubilidade da proteína recombinante 65
3.6.7. Dosagem de proteínas 66
3.6.8. Ensaio enzimático para determinação da atividade de cisteína proteinase 66
3.6.9. Purificação de pCAL1, pCAL2, pCAL3, pCAL1Cys26Ser, pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser 67
3.6.10. Transferência eletroforética para membrana de PVDF 68
3.6.11. Produção de anticorpos policlonais 69
3.6.12. Detecção imunológica de proteínas 70
3.6.13. Imunocitolocalização nas células do intestino médio de *T. molitor* 71
3.7. Determinação das estruturas das pró-catepsinas L de *T. molitor* 71
3.7.1. Concentração das pró-catepsinas L para os ensaios de cristalização 71
3.7.2. Ensaios de cristalização 72
3.7.3. Coleta de dados de difração de raios-X dos cristais de pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser 72
3.7.4. Processamento dos dados de difração de raios-X 73
3.7.5. Refinamento das estruturas terciárias de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser recombinantes 73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 75
4.1. Expressão de pCAL2 em levedura 75
4.2. Expressão de pCAL2 em bactérias 78
4.3. Expressão de pCAL2 em BL21(DE3)PLysS 80
4.4. Expressão de pCAL2 em BL21(DE3) 82
4.5. Expressão de pCAL2 em OrigamiB(DE3) 82
4.6. Clonagem da sequência codificadora de pCAL2 no vetor de expressão pAE *e* obtenção de pCAL2 recombinante 85
4.7. Purificação e ativação de pCAL2 recombinante 87
4.8. Expressão de pCAL3 em bactérias 90
4.9. Purificação e ativação de pCAL3 recombinante 94
4.10. Determinação do pH ótimo e estudos cinéticos de CAL2 e CAL3 98
4.11. Obtenção de anticorpos policlonais anti-pCAL2 102
4.12. Obtenção de anticorpos policlonais anti-pCAL3 104
4.13. Análise da expressão da pró-catepsina L 3 (pCAL3) e da catepsina L 3 (CAL3) de *T. molitor* com anticorpos policlonais 106
4.14. Imunocitolocalização da pró-catepsina L 3 (pCAL3) 108
4.15. Expressão de pCAL2 e pCAL3 mutantes em bactéria 108
4.16. Processamento de pCAL3Cys26Ser por adição de CAL3 madura ativa 115
4.17. Cristalização de pCAL3Cys26Ser e pCALCys25Ser 117
4.18. Determinação da estrutura cristalográfica de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser 126
4.19. Expressão e purificação de pCAL1 e pCAL1 mutante de *T. molitor* 144
5. CONCLUSÕES 150
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 154

1. INTRODUÇÃO

O grupo de insetos é o mais bem sucedido táxon, reconhecido pelo fato de conter mais de 70% das espécies vivas e apresentar vasta distribuição geográfica. Em vista disso, eles têm sido estudados como modelo biológico (p. ex. na genética) e por suas implicações como pragas agrícolas e por afetar a saúde dos animais, inclusive do homem.

O estudo dos insetos teve desenvolvimento vigoroso no início do século passado, mas foi atenuado após a descoberta dos inseticidas químicos sintéticos na década de 40. Mais tarde, com os problemas ambientais causados pelos inseticidas químicos, novos enfoques para o controle de insetos foram investigados. Os estudos do intestino foram estimulados pelo reconhecimento que esse era uma interface grande e relativamente não protegida entre o inseto e o ambiente. Dessa forma, o conhecimento do intestino passou a ser considerado importante para o desenvolvimento de novos métodos de controle dos insetos (Terra & Ferreira, 2005).

Duas linhas principais de investigação foram desenvolvidas. Uma relativa à superfície intestinal, procurando substâncias que afetem o sistema absortivo em um sentido geral e outra estudando as enzimas digestivas, em pesquisa por inibidores. As enzimas digestivas mais pesquisadas são as peptidases (Terra & Ferreira, 2005).

As peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. Essas enzimas se dividem em proteinases (endopeptidases) e exopeptidases. As endopeptidases hidrolisam ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica, enquanto as exopeptidases atuam nas extremidades do polipeptídeo. As proteinases são divididas em subclasses com base no mecanismo catalítico: serina, cisteína, aspartil e metaloproteinases. As serina proteinases apresentam um resíduo de serina e um de histidina no sítio ativo, as cisteína proteinases possuem um resíduo

de cisteína no sítio ativo, as aspartil proteinases são ativas em pH ácido devido à presença de um resíduo carboxila na catálise e as metaloproteinases necessitam de um íon metálico no sítio ativo (Terra & Ferreira, 2005).

A maioria dos insetos, assim como os outros animais, possuem serina proteinases como enzimas digestivas. Em vista disso, essas enzimas têm sido muito estudadas. Embora apresentem peculiaridades em relação aos vertebrados e difiram um pouco entre as diferentes ordens de insetos (Lopes *et al*., 2004), existem várias plantas modificadas para se tornarem resistentes aos insetos, por expressarem inibidores dessas enzimas (Jovanin *et al*., 1998).

Entretanto, um importante grupo de besouros e todos percevejos e pulgões possuem cisteína proteinases como principal ou única proteinase digestiva (Terra & Ferreira, 2005). O estudo em detalhe dessas enzimas é problema relevante não só para orientar a busca de inibidores para controlar esses insetos, como para estudar as adaptações de uma enzima de funções intracelulares para funções extracelulares na digestão. Os insetos são os únicos animais, além de uns poucos aracnídeos, como os carrapatos, que incluem grupos que usam cisteína proteinases como enzimas digestivas.

1.1. Cisteína proteinases

Rawlings e Barrett, com base na sequência de aminoácidos, classificaram as cisteína proteinases em clãs e famílias. O termo família é utilizado para descrever um grupo de enzimas no qual cada proteína apresenta similaridade da sua sequência primária inteira ou da sequência responsável pela atividade catalítica, com pelo menos uma outra enzima do grupo. O clã compreende um grupo de famílias que apresenta sinais de relação evolutiva (Rawllings & Barrett, 1993;

Rawllings & Barrett, 1994). As cisteína proteinases estão agrupadas em 5 clãs (CA, CB, CC, CD e CE).

A família C1 (família da papaína), pertencente ao clã CA, é a mais conhecida das cisteína proteinases. Essa família compreende além da papaína, outras proteinases de planta e as catepsinas lisossomais também encontradas em animais. Essas enzimas são monômeros e apresentam massa molecular entre 20 e 35kDa (Rawllings & Barrett, 1994; Turk *et al*., 1997; Turk *et al*., 1998), com exceção da catepsina C que é um tetrâmero com uma massa molecular de 200kDa (Dolenc *et al*., 1995).

Muitos membros da família C1 apresentam propriedades semelhantes à papaína. As sequências das proteinases da família papaína são divididas em 3 partes: uma sequência sinal (peptídeo sinal) na região N-terminal com 10 a 20 aminoácidos que é seguida por uma pró-sequência de 38 a 250 aminoácidos e pela enzima madura que é constituída por 220 a 260 aminoácidos (Wiederanders, 2003).

As proteinases intracelulares costumam ser chamadas catepsinas. Todas as cisteína proteinases lisossomais são catepsinas, mas nem todas as catepsinas são lisossomais ou cisteína proteinases. As catepsinas A e G são serina proteinases, as catepsinas D e E são aspartil proteinases e as catepsinas E e G não são proteinases lisossomais (Turk & Guncar, 2003). Com base na sequência primária são conhecidas 11 cisteína proteinases lisossomais humanas: B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W (Turk *et al*., 2000). As catepsinas B, C, H, L e O são encontradas em quase todos os tecidos e células, enquanto outras catepsinas (S, K, V, F, X e W) apresentam distribuição restrita, sugerindo funções específicas (Wiederanders, 2003). As catepsinas B e L de mamíferos são as melhores caracterizadas. Em humanos e em camundongos foram identificados aproximadamente 600 genes

codificantes de proteinases, sendo que aproximadamente 150 são cisteína proteinases (Puente *et al*., 2003). Para identificar novas cisteína proteinases da família da papaína foi feita uma análise das sequências do genoma humano e foram analisados os níveis de expressão do mRNA. Novas catepsinas não foram encontradas, sugerindo a existência das cisteína proteinases funcionais já descritas (Rossi *et al*., 2004).

As catepsinas L, S, K, V, F, H e B são endopeptidases (Barret *et al*., 1998; Turk *et al*., 2001), enquanto a catepsina X é uma carboxipeptidase (Nagler *et al*., 1999). As catepsinas H e B apresentam atividades de endo e exopeptidases, sendo que a catepsina C age somente como uma aminopeptidase (Turk *et al*., 1997; Turk *et al*., 2001).

As catepsinas lisossomais são sintetizadas como “pré-pró-enzimas” no retículo endoplasmático. Após a tradução o peptídeo sinal é removido durante a translocação da proteína no retículo endoplasmático. A ativação ocorre posteriormente, no ambiente ácido dos lisossomos, através da clivagem proteolítica de um fragmento presente na região N-terminal denominado pró-peptídeo (Turk *et al*., 2000). A ativação *in vitro* é facilitada pelo processamento autocatalítico em pH ácido ou pela ação de diferentes proteinases como a pepsina e a catepsina D (Turk *et al*., 2000; Turk *et al*., 2001) Os pró-peptídeos além de agirem como inibidores da atividade enzimática, bloqueando o acesso do substrato ao sítio ativo, apresentam outros papéis. Foi demonstrado para catepsinas L de diferentes fontes que o pró-peptídeo funciona como uma chaperona intramolecular promovendo o dobramento correto da enzima (Yamamoto *et al*., 1999).

Ensaios de inibição realizados com os pró-peptídeos das catepsinas K, L e S expressos em bactérias mostraram que estas pró-regiões são inibidores

relativamente potentes das catepsinas K, L e S, exceto da catepsina B e da papaína (K_i>600nM). O pró-peptídeo da catepsina L foi mais eficiente na inibição das catepsinas L (K_i=0,12nM) e K (K_i=0,27nM) em relação a catepsina S (K_i=65nM). É interessante notar que o pró-peptídeo da catepsina S foi um inibidor mais seletivo para catepsina L (K_i=0,46nM) se comparado com a catepsina S (K_i=7,6nM) (Guay *et al*., 2000). Estudos com o pró-peptídeo da cruzipaína, principal cisteína proteinase de *Trypanosoma cruzi*, expressa em *E. coli* mostraram que esta pró-região não foi capaz de inibir a atividade das catepsinas S, K, B e da papaína e foi um fraco inibidor das catepsinas L e V. No entanto, este pró-peptídeo é um potente inibidor da catepsina F (Reis *et al*., 2007). Por outro lado, o pró-peptídeo da catepsina de *Fasciola hepatica* apresentou alta seletividade para enzimas de parasitas, sendo praticamente incapaz de inibir as catepsinas L, K e B de mamíferos e a papaína (Roche *et al*., 1999). Estudos posteriores com os pró-peptídeos das catepsinas K, L e S mostraram que a função de chaperona intramolecular do pró-peptídeo é mais seletiva em relação à função inibitória (Schilling *et al*., 2009). Assim, as funções de chaperona e inibidor são independentes.

As catepsinas B, C, H, L e S foram as primeiras a serem descobertas através de técnicas bioquímicas, sendo a catepsina C a primeira. Mais recentemente, outras catepsinas foram descobertas a partir de técnicas de biologia molecular (Turk & Guncar, 2003).

Através do alinhamento das sequências de aminoácidos dos domínios catalíticos, as cisteína proteinases de humanos e parasitas foram agrupadas em 3 subfamílias principais: catepsina B, catepsina L e catepsina F. O agrupamento é baseado no grau de identidade das sequências (Lecaille *et al*., 2002a). Essas 3 subfamílias também refletem um motivo conservado dentro das pró-regiões. A partir

da comparação de sequências de aminoácidos deduzidas de cisteína proteinases conhecidas foi possível identificar um motivo consenso na pró-região, denominado motivo ERFNIN. Esse motivo foi encontrado em 15 das 20 cisteína proteinases analisadas (Karrer *et al*., 1993). As 5 proteinases que não apresentam o motivo consenso são catepsinas B. Assim, o grupo de Karrer identificou duas subfamílias dentro das cisteína proteinases: a subfamília catepsina L que contém o motivo ERFNIN e a catepsina B que não possui o motivo. Nas catepsinas F e W os resíduos Ile e Asn do motivo ERFNIN são substituídos por Ala e Gln formando uma terceira subfamília caracterizada pelo motivo ERFNAQ. Essa subfamília é denominada catepsina F (Wex *et al*., 1999; Wiederanders, 2003).

1.1.1. Estrutura e mecanismo catalítico das cisteína proteinases lisossomais

As cisteína proteinases apresentam sequências primárias similares e estruturas tridimensionais altamente conservadas. A maior parte dessas enzimas tem estrutura espacial conhecida. As estruturas cristalográficas das enzimas de planta como papaína (Drenth *et al*., 1968), glicil endopeptidase (O' Hara *et al*., 1995), caricaína (Pikersgill *et al*., 1991), calotropina D1 (Heinemann *et al*., 1982), actinidina (Baker, 1980) e a cruzaína de *Trypanosoma cruzi* (McGrath *et al*., 1995) foram determinadas sozinhas ou complexadas com inibidores análogos de substratos. Mais recentemente foi determinada a estrutura cristalográfica de uma cisteína proteinase da planta tropical *Jacaratia mexicana* complexada com o inibidor E-64 (Gavira *et al*., 2007). A estrutura cristalográfica da cisteína proteinase SPE31 isolada a partir da semente da planta leguminosa *Pachrizhus erosus* foi determinada e a análise desta estrutura mostrou a substituição do resíduo altamente conservado Cys25 por Gly (Zhang *et al*., 2006). As estruturas das catepsina B, C, F, H, L, K, S, V

e X de mamíferos também foram determinadas (Musil *et al*., 1991; Olsen *et al*., 2001; Turk *et al*., 2001; Somoza *et al*., 2002; Guncar *et al*., 1998; Guncar *et al*., 1999; McGrath *et al*., 1997; Turkenburg *et al*., 2002; Somoza *et al*., 2000; Guncar *et al*., 2000). Os zimogênios das catepsinas B, L, K, X e S de mamíferos têm suas estruturas conhecidas (Cygler *et al*., 1996; Turk *et al*., 1996; Podobnik *et al*., 1997; Coulombe *et al.*, 1996b; LaLonde *et al*., 1999; Sivaraman *et al*., 1999; Sivaraman *et al*., 2000; Kaulmann *et al*., 2006).

O estudo de cisteína proteinases em helmintos e protozoários tem aumentado, pois os principais fatores de virulência identificados são derivados de proteinases. Assim, estas enzimas são consideradas potenciais alvos no tratamento de contaminações por estes parasitas (McKerrow *et al*., 2006). *Fasciola hepatica* é um parasita helminto que secreta cisteína proteinases para facilitar a invasão de tecidos, migração e desenvolvimento dentro do hospedeiro mamífero. As catepsinas L1 e L2 correspondem as duas principais proteinases secretadas pela larva infecciosa. Estas catepsinas L foram expressas em sistema heterólogo e caracterizadas bioquimicamente (Collins *et al*., 2004; Stack *et al*., 2008). A estrutura cristalográfica da pró-catepsina L1 de *Fasciola hepática* foi determinada a partir de difração de raios-X do mutante Cys25→Gly e mostrou-se similar a outras cisteína proteinases da família da papaína (Stack *et al*., 2008). Também foi determinada a estrutura cristalográfica da principal cisteína proteinase de *Plasmodium falciparum*. Esta proteinase é um potente alvo para o tratamento da malaria (Wang *et al*., 2006; Hogg *et al*., 2006). A estrutura tridimensional da catepsina L do protozoário parasita *Toxoplasma gondei* foi determinada por cristalografia. Como a pró-enzima sofreu autoativação antes dos ensaios de cristalização e não foi possível separar o pró-

peptídeo da enzima madura, a catepsina L foi cristalizada complexada com o seu pró-peptídeo (Larson *et al*., 2009).

A enzima madura é constituída por dois domínios de tamanho similar. O domínio N-terminal (domínio L) é composto principalmente por α-hélices e o domínio C-terminal (domínio R) contém predominantemente folhas β (figura 1A). Os resíduos envolvidos diretamente na catálise são: Cys25, His159 e Asn175 com Gln19 (numeração da papaína) auxiliando na estabilização do intermediário da reação. Este sítio está localizado numa interface entre os dois domínios (Barrett *et al*., 1998; Turk *et al*., 2000). Os resíduos catalíticos Cys25 e His159 estão localizados em domínios diferentes. A estrutura tridimensional da pró-catepsina L (figura 1B) mostra que o pró-peptídeo interage com uma grande extensão da enzima, incluindo os sítios de ligação com o substrato. Assim, o pró-peptídeo age como um inibidor da atividade enzimática bloqueando o acesso do substrato ao sítio ativo.

A papaína é uma cisteína proteinase amplamente estudada, sendo considerada um modelo nos estudos cinéticos dessas enzimas. O mecanismo de hidrólise dos peptídeos consiste no ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína sobre o átomo de carbono carbonílico liberando uma amina ou um álcool se o grupo funcional for uma amida ou um éster respectivamente. Nesta etapa ocorre a acilação da enzima formando o intermediário acil-enzima que vai sofrer um ataque nucleofílico da molécula de água ocorrendo a deacilação. Na acilação ocorre a liberação da porção C-terminal do substrato e na deacilação a porção N-terminal é eliminada. Tanto na acilação como na deacilação ocorre a formação de intermediários tetraédricos (Storer & Ménard, 1994).

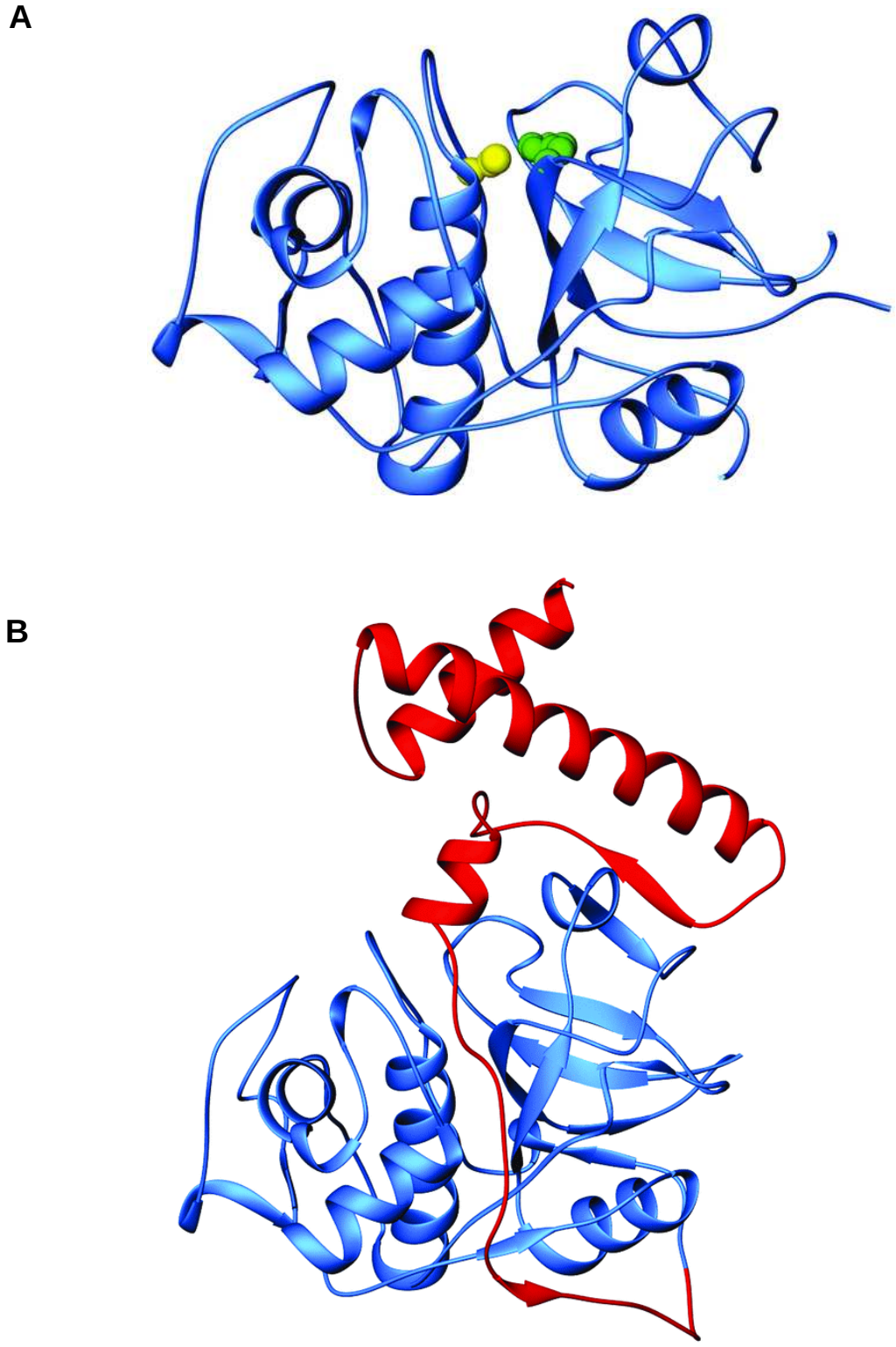


Figura 1. **Estruturas tridimensionais da catepsina L e da pró-catepsina L.** Retirado de Turk & Guncar (2003). (A) estrutura tridimensional da catepsina L. Em amarelo está representado a cadeia lateral da cisteína 25 e em verde a cadeia lateral da histidina 159. (B) estrutura tridimensional da pró-catepsina L. Em azul está representado a parte da enzima madura e em vermelho o pró-peptídeo.

O sítio catalítico está localizado dentro de uma região de ligação ao substrato que possui subsítios de ligação na direção C-terminal e N-terminal da ligação que vai ser hidrolisada. De acordo com a nomenclatura proposta por Schechter e Berger os subsítios são chamados S1, S2, S3...Sn na direção N-terminal e S1', S2', S3'...Sn' na direção C-terminal do peptídeo substrato. No peptídeo substrato (ou inibidor) as posições são: P1, P2, P3...Pn e P1', P2', P3'...Pn'.

Recentemente, com o aumento do número de estruturas de proteinases complexadas a inibidores, a definição de Schechter e Berger sobre os sítios de ligação ao substrato foram revisadas e redefinidas (Turk *et al*., 1998). Os sítios de ligação ao substrato formam quatro segmentos na cadeia. No domínio L encontram-se duas alças curtas (19-25, 61-69) e no domínio R duas alças longas (136-162, 182-213). Uma terceira alça no domínio L pode ser chamada de dissulfeto (Cys22-Cys65) e conecta as duas alças no domínio L. As estruturas mostram que os substratos peptídicos se ligam ao longo da fenda do sítio ativo numa conformação estendida. Os resíduos do substrato P2, P1 e P1' ligam-se a sítios de ligação bem definidos dentro da fenda do sítio ativo. A interação desses resíduos do substrato com a enzima envolvem tanto a cadeia principal como os átomos das cadeias laterais. A interações entre a enzima e o resíduo P3 do substrato são baseadas apenas em interações entre as cadeias laterais. O sítio de ligação do resíduo P2' é bastante definido. A posição dos sítios de ligação do substrato além de S3 e S2' permanece incerta (Turk *et al*., 1995; Turk *et al*., 1998; Turk & Guncar, 2003).

Análises cristalográficas têm mostrado que as pró-regiões das catepsinas L, K e da caricaína apresentam estruturas idênticas, o que reflete a identidade significativa entre suas sequências primárias. Essas pró-regiões possuem aproximadamente 100 resíduos. A pró-região da catepsina B é mais curta (~60

resíduos), mas a sua estrutura é similar a das enzimas citadas acima, apesar da falta de identidade da sequência primária (Cygler & Mort, 1997).

1.1.2. Mecanismos de regulação das cisteína proteinases lisossomais

A atividade das cisteína proteinases pode ser regulada de várias maneiras, sendo a inibição por inibidores protéicos endógenos e pelo pH os mais importantes.

As catepsinas humanas, com exceção da catepsina S, têm um pH ótimo ácido, permitindo atividade máxima no lisossomo. A maioria das cisteína proteinases da família C1 é inativada em pH neutro, sugerindo que esse possa ser o principal mecanismo de regulação para catepsinas que saiam dos lisossomos. Contudo, muitas cisteína proteinases de parasitas possuem pH ótimo neutro ou ligeiramente alcalino. Isso esta de acordo com a atividade extracelular observada para essas enzimas (Lecaille *et al*., 2002a).

As catepsinas B, S e L podem ser desnaturadas irreversivelmente em pHs muito baixos (Turk *et al*., 1999; Turk *et al*., 2000). Na maturação dos lisossomos ocorre uma queda no valor do pH podendo chegar a 3,8. Isso faz com que todos os ligantes (substrato, inibidores e pró-peptídeos) se liguem fracamente. Assim, essas enzimas podem ser desnaturadas nos lisossomos maduros (Turk *et al*., 2000). Foi demonstrado que a catepsina L desnaturada irreversivelmente é degradada pela catepsina D, principal aspartil proteinase lisossomal, que é muito ativa em pH ácido. Assim, o grupo de Turk sugere que a inativação induzida pelo pH seguida por degradação proteolítica possa ser um processo comum a todas as cisteína proteinases lisossomais (Turk *et al*., 1999). Os diferentes pHs ótimos das proteinases lisossomais como catepsina H (pH ótimo próximo do neutro) e catepsina

D (pH ótimo entre 3,0 e 4,0), sugerem que as proteinases lisossomais são ativas em certos estágios da vida do lisossomo (Turk *et al*., 1999).

O principal mecanismo de regulação das proteinases maduras ocorre através da inibição por inibidores protéicos endógenos. Esses inibidores podem estar envolvidos no mecanismo de controle responsável pela quebra de ligações peptídicas e/ou podem proteger a célula de proteólise inapropriada. As cistatinas, um exemplo desses inibidores, ligam-se fortemente e de maneira reversível as cisteína proteinases (Turk & Bode, 1991; Turk *et al*., 1997). Estudos mostraram uma nova classe de inibidores de cisteína proteinases (Kurata *et al*., 2001). A comparação das sequências primária destas proteínas com as sequências dos pró-peptídeos de certas cisteína proteinases revelou similaridade significativa. Estudos iniciais identificaram duas proteínas com alta similaridade em relação ao pró-peptídeo da catepsina L de camundongo. Uma destas proteínas foi expressa e capaz de inibir cisteína proteinases como papaína e catepsina L (Denizot *et al*., 1989; Delaria *et al*., 1994). Em *Bombyx mori* foi encontrado um inibidor protéico com sequência similar à pró-peptídeos de cisteína proteinases. Esta proteinase foi expressa em *E. coli* e mostrou-se um inibidor seletivo de catepsina L (Kurata *et al*., 2001). A partir de pesquisas de sequências depositadas no GenBank, foi encontrada em *Drosophila melanogaster* uma sequência que codifica uma proteína com similaridade significativa em relação às proteínas citadas acima e ao pró-peptídeo da cisteína proteinase de *Drosophila*. Esta proteína também foi expressa em *E. coli* e mostrou-se um inibidor seletivo da catepsina L (Rathnayaka *et al*., 2007).

1.2. Cisteína proteinases em insetos

Em insetos as cisteína proteinases podem ser digestivas (Terra & Ferreira, 1994) ou estarem envolvidas na degradação embrionária (Cho *et al*., 1999), na metamorfose (Takahashi, 1993) e no processo de mudas (Liu *et al*., 2006).

Os substratos mais utilizados nos ensaios de cisteína proteinases em conteúdos do intestino médio de insetos em pH 5 a 6 são B-R-pNA (benzoil-Arg-p-nitroanilida), B-R-NA (benzoil-Arg-β-naftalamida), caseína e hemoglobina. A ativação por ditiotreitol (DTT) ou cisteína e a inibição por L-trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido (4-guanidinobutano) (E-64) são também utilizadas na identificação de cisteína proteinases (Terra & Ferreira, 2005). A hidrólise dos substratos citados acima e a inibição por E-64 não são suficientes para identificar uma enzima como cisteína proteinase, pois a tripsina hidrolisa os mesmos substratos e pode ser inibida de modo reversível por E-64 (Novillo *et al*., 1997; Terra & Ferreira, 2005). O peptídeo ACLB-Cys-MCA (ε-amino-caproil-leucil-(S-benzil) cisteinil-MCA) é o melhor substrato utilizado na identificação de cisteína proteinases, pois ele é um substrato específico para essas enzimas (Alves *et al*., 1996).

Com base em experimentos como os citados acima, as cisteína proteinases foram descritas em Hemiptera Heteroptera (percevejos) e em espécies pertencentes às séries Cucujiformia de Coleoptera (besouros) (Terra & Ferreira, 1994). As exceções a esta regra são a identificação de cisteína proteinases em Hemiptera Auchenorrhyncha (pulgões) (Cristofoletti *et al*., 2003) e a falta dessas enzimas em besouros Cucujiformia Cerambycidae (Johnson & Rabosky, 2000).

A ocorrência de cisteína proteinases como enzima digestiva, no lugar das serina proteinases de ocorrência universal, parece ter resultado de passos evolutivos diferentes entre os Hemiptera e Coleoptera, o que pode significar que elas

tenham diferenças estruturais e de especificidade. Assim, as cisteína proteinases de Hemiptera parecem ser o resultado de dois eventos evolutivos (Houseman *et al*., 1985; Cristofoletti *et al*., 2003). O primeiro foi à perda das serina proteinases em sequência à adaptação de Hemiptera similar aos Auchenorrhyncha (pulgões) de hoje a ingestão de seivas carentes de macromoléculas. O segundo evento foi o uso de uma proteinase lisossômica pelos Hemipteras sugadores de seiva ao retornar para um hábito ingestor de proteína. Essa situação é observada tanto entre percevejos que atacam tecidos de plantas ou animais e entre os pulgões que sugam as mais ou menos raras seivas ricas em proteínas (Terra & Ferreira, 2005). As cisteína proteinases de Coleoptera parecem ser resultado de uma adaptação que permitiu esses insetos de se nutrirem de sementes ricas em inibidores de serina proteinases (Terra & Ferreira, 2005).

Por outro lado, a catepsina L é uma verdadeira endopeptidase que hidrolisa preferencialmente ligações peptídicas com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em P2, enquanto as catepsinas B preferem Arg na mesma posição. Portanto, o uso de substratos como Z-FR-MCA (carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amino-4-metil-coumarina) e Z-RR-MCA (carbobenzoxi-Arg-Arg-MCA) facilitam a distinção entre as duas enzimas (Terra & Ferreira 2005).

1.2.1. Catepsinas L em insetos

Inicialmente, as cisteína proteinases do intestino médio de insetos foram denominadas catepsinas B, uma vez que a catepsina B foi a primeira cisteína proteinase de animal descrita. Mais recentemente foi demonstrado que a catepsina B é mais importante como peptidil dipeptidase do que como uma endopeptidase (Barrett *et al*., 1998; Terra & Ferreira, 2005).

Estudos recentes têm demonstrado que as catepsinas L são as únicas cisteína proteinases de insetos quantitativamente importantes (Terra & Ferreira, 2005). Apesar da óbvia importância das enzimas digestivas de insetos semelhantes a catepsina L (CALs), do ponto de vista de possível desenvolvimento de técnicas de controle de insetos e da possibilidade de apresentarem novidades enzimológicas, a caracterização molecular dessas enzimas não progrediu muito. Isto é uma consequência das: (1) dificuldades em assegurar que uma CAL ensaiada em homogeneizados intestinais tenha sido secretada para o lúmen intestinal, podendo em consequência ser considerada uma enzima digestiva verdadeira; (2) dificuldades no isolamento, purificação e caracterização cinética de CALs obtidas de conteúdos intestinais devido à autólise frequente nos passos finais da purificação; (3) dificuldades em relacionar ao processo digestivo CALs codificadas por cDNAs clonados a partir de células intestinais, já que muitas dessas enzimas devam ser lisossômicas e, portanto, jamais deixar as células.

Por outro lado, catepsinas L digestivas foram purificadas até a homogeneidade apenas a partir de *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Cucujiformia) (Koiwa *et al*., 2000), *Leptinotarsa decemlieta* (Coleoptera: Chysomelidae) (Gruden *et al*., 2003), *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera: Auchenorrhyncha) (Cristofoletti *et al*., 2003) e *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Cucujiformia) (Cristofoletti *et al*., 2005). A enzima de *A. pisum* está ligada a membrana plasmática da célula intestinal e encontra-se de frente ao conteúdo luminal, enquanto as catepsinas de *D. virgifera* e *T. molitor* são proteínas solúveis secretadas para o lúmen do intestino médio. Essas purificações foram realizadas por cromotagrafias de afinidade ou por combinações de cromatografias de troca iônica. Essas enzimas apresentam pHs ótimos entre 5 e 6 e massas moleculares variando de 20 a 40kDa. Essas catepsinas L preferem

substratos com Phe no lugar de Arg em P2, são inibidas por E-64 e ativadas por cisteína ou DTT (Terra & Ferreira, 2005).

O extrato do intestino de larvas de *Diabrotica virgifera* hidrolisa os substratos Z-FR-MCA e Z-RR-MCA. Duas sequências codificantes de catepsina L (DvRS5 e DvRS30) e uma codificante de catepsina B (DvRS40) foram clonadas e expressas em levedura. DvRS5 e DvRS30 apresentaram diferença de especificidade em P2. DvRS30 foi capaz de hidrolisar os substratos Z-FR-MCA e Z-RR-MCA enquanto DvRS5 hidrolisou apenas Z-FR-MCA (Bown et al., 2004). O afídeo *Acyrthosiphon pisum* foi selecionado como modelo para estudos de sequenciamento de genoma e ESTs (Sabater-Muñoz *et al*., 2006; Gauthier *et al*., 2007). O silenciamento da expressão da catepsina L através de RNAi em *A. pisum* não resultou num fenótipo claro (Jaubert-Possamar *et al*., 2007). Por outro lado, no afídeo *Myzus persicae* a inibição das catepsinas por um inibidor de cisteína proteinase gerou uma moderada inibição no crescimento e na fertilidade (Rahbé *et al*., 2003). Um fenótipo similar ao citado acima era esperado no silenciamento da catepsina L de *A. pisum*. No entanto, a ausência de fenótipo pode ser explicada pela eficiência do silenciamento (30% de inibição).

No nosso laboratório 5 pró-catepsinas L (pCALs) foram clonadas e sequenciadas a partir de uma biblioteca de cDNA de intestino médio de *T. molitor*. As pró-catepsinas pCAL1a (com isoformas pCAL1b e pCAL1c), pCAL2 e pCAL3 apresentam os resíduos envolvidos na catálise Cys 25, His 169 e Asn 175 com Gln 19 (numeração da papaína), além do motivo ERFNIN no pró-peptídeo. A pCAL1a foi expressa e sua ativação resultou na enzima madura CAL1a com propriedades cinéticas e sequência N-terminal idênticas à enzima previamente isolada de hemócitos. Anticorpos gerados contra CAL1a confirmaram a ocorrência dessa

enzima em lisossomos de todos os tecidos de *T. molitor*. CAL2 corresponde a CAL isolada do conteúdo intestinal, portanto corresponde à enzima digestiva principal. CAL3 que é transcrita somente no intestino e é mais semelhante a CAL2 que CAL1 e pode corresponder a CAL digestiva minoritária. Cladograma preparado com as CALs intestinais de insetos mostraram que as CALs de Hemiptera grupam-se com a CAL lisossômica CAL1a, enquanto que as CALs de Coleoptera separam-se em dois grupos como observado em *T. molitor:* parte reúne-se com a CAL lisossômica e parte forma grupo separado com CAL2 digestiva verdadeira (Cristofoletti *et al*., 2005). Essa descoberta apóia a existência de diferenças importantes entre as CALs digestivas de Hemiptera e Coleoptera inferidas de sua história evolutiva mencionada acima.

Análises realizadas com bibliotecas de cDNA de intestino anterior, posterior e inteiro de *T. molitor* mostraram que os transcritos codificantes de cisteína proteinases ocorrem principalmente no intestino anterior (Prabhakar *et al.*, 2007). Estes resultados são consistentes com estudos anteriores de caracterização bioquímica de cisteína proteinases no intestino anterior de *T. molitor* (Cristofoletti *et al*., 2005; Vinokurov *et al*., 2006). O grupo de Prabhakar também reforçou a importância das serina e cisteína proteinases no crescimento, fisiologia e desenvolvimento de *T. molitor* com análises dos níveis de expressão do mRNA através de *Northern blot* (Prabhakar *et al*., 2007).

2. OBJETIVOS

Neste trabalho tivemos como objetivos:

1) Expressão das pró-catepsinas L digestivas (pCAL2 e pCAL3) em sistema heterólogo.
2) Purificação de pCAL2 e pCAL3.
3) Ativação *in vitro* de pCAL2 e pCAL3 recombinantes com a formação das enzimas maduras CAL2 e CAL3.
4) Obtenção de anticorpos policlonais anti-pCAL2 e anti-pCAL3 para análise do nível de expressão e imunolocalização das enzimas no intestino de *T. molitor*.
5) Determinação da estrutura cristalina de pCAL1, pCAL2 e pCAL3.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. Procedimentos para manipulação de *Tenebrio molitor*

3.1.1. Manutenção dos animais

As culturas estoque de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) foram mantidas sob condições naturais de fotorregime em farelo de trigo a 24-26℃ e umidade relativa de 70-75%. Foram utilizadas larvas completamente desenvolvidas (cada uma pesando cerca de 0,12g) e de ambos os sexos.

3.1.2. Preparação de amostras para os experimentos de *immunoblot*

Para os experimentos de *immunoblot* foram preparados extratos protéicos de *T. molitor* de diferentes tecidos: intestino médio, carcaça, corpo gorduroso, hemolinfa e túbulos de Malpighi**.** O intestino médio das larvas foi isolado e dividido em três porções iguais: ventrículo anterior, ventrículo médio e ventrículo posterior. O epitélio ventricular foi separado do conteúdo luminal.

As larvas de *T. molitor* foram imobilizadas no gelo e em seguida foram dissecadas em solução de NaCl 342mM gelada. O material dissecado foi homogeneizado em Potter-Elvehjem em água Milli-Q. Em seguida, o material foi submetido à centrifugação a 20.000xg por 30 minutos a 4℃. O sobrenadante foi recolhido e foi feita a determinação do conteúdo protéico nas amostras segundo o método descrito por Smith (1985) e modificado por Morton e Evans (1992) tendo como padrão BSA (albumina de soro bovino).

3.2. Procedimentos para manipulação de bactérias

3.2.1. Manutenção e cultivo de bactérias

Para a clonagem e preparação das construções plasmidiais foi utilizado *Escherichia coli* cepa XL1 Blue (*sup*E44 *hsd*R17 *rec*A1 *endA1 gyrA46 thi rel*A1 *lac*-F'[*pro*AB$^+$ *lac*^{q} *lacZ*ΔM15 Tn*10*(tet^r)]. Para a expressão de proteínas recombinantes foram utilizadas as cepas BL21(DE3) [F$^-$ *ompT hsd* S_B ($r_B^-m_B^-$) *gal dcm* (DE3)], BL21(DE3)PLysS {BF$^-$*dcm ompT hsdS* ($r_B^-m_B^-$) galλ (DE3) [pLysS Cam^r]} e OrigamiB(DE3) [F$^-$ *ompT hsd* S_B ($r_B^-m_B^-$) gal *dcm lacY1gor522*::Tn *10*(Tc^R) *trxB*::kan (DE3)].

As culturas das bactérias *E. coli* XL1 Blue, BL21(DE3), BL21(DE3)PLysS ou OrigamiB(DE3) foram mantidas em meio LB ou 2x TY contendo glicerol 20% (v/v) a –80℃. Alíquotas destes estoques de XL1 Blue e BL21 (DE3) foram semeadas em placas de meio LB [triptona 1% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v) e ágar 1,5% (p/v), pH 7,5] ou, no caso da OrigamiB(DE3), em placas LB contendo canamicina 20µg/mL. Alíquotas de BL21(DE3)PLysS foram semeadas em placas 2x TY [Triptona 1,6% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v), NaCl 8,5mM e agar 1,5% (p/v), pH 7,4] contendo cloranfenicol 34µg/mL. As placas foram mantidas a 37℃ por uma noite.

Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia foi inoculada em 3mL de meio LB ou 2x TY líquido e crescida a 37℃ por u ma noite a 200rpm. Uma fração desta cultura foi utilizada como pré-inóculo para obtenção de culturas em maior volume para obtenção de bactérias competentes, preparação de plasmídeos e obtenção de proteínas recombinantes.

3.2.2. Preparação de bactérias competentes para transformação por $CaCl_2$

Cerca de 2mL de pré-inóculo obtido como descrito no item anterior foram transferidos para 100mL de meio LB líquido ou 2x TY líquido frescos e crescidos por 2-3 horas com agitação a 200rpm, até DO_{600nm} atingir 0,5-0,6.

As células bacterianas foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis e coletadas por centrifugação 4.000xg por 20 minutos a 4℃. O sedimento foi suspenso em 40mL de $CaCl_2$ 0,1M estéril gelado, incubado em banho de gelo por 1 hora e posteriormente centrifugado nas condições anteriores. As bactérias foram suspensas em 1mL de $CaCl_2$ 0,1M para uso imediato e para serem congeladas foi adicionado glicerol para concentração final de 15% (v/v), distribuídas em alíquotas de 100µL, congeladas em banho de gelo seco/etanol e armazenadas a –80℃.

3.2.3. Transformação de bactérias por choque térmico

Aproximadamente, 0,2µg de DNA (plasmídeos ou produtos de reações de ligação de DNA) foi adicionado a 100µL de bactérias competentes e a mistura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos. As células foram submetidas a choque térmico a 42℃ por 90 segundos e imediatamente incu badas em banho de gelo por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 500µL de meio LB ou meio 2x TY e a suspensão bacteriana foi transferida para tubo de cultura e incubada a 37℃ por 1 hora a 200rpm. Após essa recuperação alíquotas de 50µL, 100µL e 350µL foram semeadas em placas de meio LB contendo carbenicilina 100µg/mL ou canamicina 50µg/mL ou meio 2x TY contendo cloranfenicol 34µg/mL e carbenicilina 100µg/mL ou cloranfenicol 34µg/mL e canamicina 50µg/mL . As placas foram incubadas a 37℃ por uma noite.

As colônias transformantes foram inoculadas em 3mL de meio LB ou meio 2x TY contendo os antibióticos necessários. As culturas líquidas foram incubadas a 37℃ por uma noite a 200rpm. Essas culturas líquidas foram utilizadas para minipreparação de plasmídeos e para experimentos de indução da expressão da proteína recombinante, como descrito adiante.

3.3. Procedimentos para manipulação de leveduras

3.3.1. Manutenção e cultivo de leveduras

Para a expressão da proteína recombinante foi utilizada a linhagem GS115 de *Pichia pastoris*. A cultura de *P. pastoris* foi mantida em meio YPD contendo glicerol 20% (v/v) a –80℃. Alíquotas deste estoque foram semeadas em placas de meio YPD [extrato de levedura 1% (p/v); peptona 2% (p/v); dextrose 2% e ágar 2% (p/v)] e incubadas a 28℃ por 48 horas.

Para obtenção de culturas em meio líquido, uma colônia foi inoculada em 5mL de meio YPD líquido e crescida a 28℃ por uma noite a 160rpm. Uma fração desta cultura foi utilizada como pré-inóculo para obtenção de culturas em maior volume para preparação de células competentes e obtenção de proteínas recombinantes.

3.3.2. Preparação de leveduras competentes para transformação por eletroporação

Cerca de 250µL de pré-inóculo obtido como descrito no item anterior foram transferidos para 500mL de meio YPD líquido fresco e crescidos a 28℃ por uma noite com agitação a 160rpm, até DO_{600nm} = 1,3-1,5.

As células foram transferidas para garrafas de polipropileno estéreis e coletadas por centrifugação 1.500xg, 5 minutos a 4°C. O sedimento foi suspenso em

250mL de água Milli-Q estéril gelada e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de lavagem foi repetida mais uma vez com 125mL de água Milli-Q estéril gelada. As células foram suspensas em 20mL de sorbitol 1M e centrifugada nas condições anteriores. Por fim, as células foram suspensas em 1mL de sorbitol 1M e foram feitas alíquotas de 80µL.

3.3.3. Transformação de leveduras por eletroporação

Aproximadamente 20µg das construções pPIC9-pCAL2 e pPIC9-pCAL1, previamente linearizadas com a enzima de restrição *Sac*I, foram adicionadas a 80µL de células competentes e a mistura foi transferida para uma cubeta (gene pulser cuvette 0,2cm, BIO-RAD) previamente resfriada. Em seguida as células foram submetidas a eletroporação nas seguintes condições: 1500V, 25µF e 200Ω (BIO-RAD GenePulser). Imediatamente, foi adicionado 1mL de sorbitol 1M gelado. Em seguida alíquotas de 500µL foram semeadas em placas MD [YNB 1,34% (v/v); biotina 4 x10^{-5}% (v/v); dextrose 2% (p/v) e ágar 1,5% (p/v)]. As placas foram incubadas a 28℃ por 48 horas. As colônias obtidas foram transferidas para placas YPD e incubadas a 28℃ por uma noite, e diretamente utilizadas em reações de PCR de colônia para análise de integrantes.

3.4. Procedimentos de manipulação e análise de DNA

Os procedimentos experimentais de técnicas de DNA recombinante são de uso corrente em nosso laboratório e foram adaptados de manuais dos fabricantes e de protocolos descritos por Sambrook e colaboradores (Sambrook *et al*., 1989).

As reações de digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição (1U/µg DNA) foram incubadas a 37℃ por 2 horas, acompanhadas do tampão apropriado.

As reações de ligação de DNA foram feitas utilizando a enzima T4 DNA ligase (1U/µg DNA) utilizando o tampão apropriado. As reações de ligação foram incubadas a 16℃ por uma noite.

3.4.1. Descrição dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados em reações em cadeia da polimerase de DNA (PCR) foram encomendados a dialab e sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT). As cisteína proteinases foram clonadas nos vetores de expressão na forma de pró-enzimas.

a) Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA da pró-catepsina L 1 (pCAL1) para clonagem no vetor pPIC9 . A sequência de clivagem das proteases KEX e STE13 (descrito no item 3.5.1) e o códon de terminação TAA estão sublinhados. Os sítios para enzimas de restrição estão grifados:

pCAL1F1:5'CCGCTCGAG**AAAAGAGAGGCTGAAGCT**GTGTCGTTTTTTGACCTG GTC 3'

*Xho*I

pCAL1R1: 5'ATAAGAATGCGGCCGC**TTA**CACCAGAGGGTAACTAGC 3'

*Not*I

b) Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA da pró-catepsina L 2 (pCAL2) para clonagem no vetor pPIC9 . Os sítios para enzimas de restrição estão grifados e o códon de terminação TAA está sublinhado:

pCAL2F1: 5' GGAATTCGCCTTGCCAAGCACATTCGTGGC 3'

*Eco*RI

pCAL2R1: 5' ATAAGAATGCGGCCGC**TTA**CAAAGTTGGAACGCTGGC 3'

*Not*I

c) Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA de pCAL1 para clonagem no vetor pAE. Os sítios para enzimas de restrição estão grifados e o códon de terminação TAA está sublinhado:

pCAL1F2: 5’ CGGGATCCGTGTCGTTTTTTGACCTGGTC 3’

*Bam*HI

pCAL1R2: 5’ GGGGTACC**TTA**CACCAGAGGGTAACTAGCTTCA3’

*Kpn*I

d) Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA de pCAL2 para clonagem no vetor pAE. Os sítios para enzimas de restrição estão grifados e o códon de terminação TAA está sublinhado:

pCAL2F2: 5’ CGGGATCCGCCTTGCCAAGCACATTC 3’

*Bam*HI

pCAL2R2: 5’ GGAATTC**TTA**CAAAGTTGGAACGCTGGC 3’

*Eco*RI

e) Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA da pró-catepsina L 3 (pCAL3) para clonagem no vetor pAE. Os sítios para enzimas de restrição estão grifados e o códon de terminação TAA está sublinhado:

pCAL3F:5’ AACTGCAGCCTGCCAAAATCGCTCTTCC 3'

*Pst*I

pCAL3R: 5’ CCCAAGCTT**TTA**CAAAGCAGGGTATGAAGCAG 3’

*Hind*III

f) Oligonucleotídeos utilizados para gerar o mutante pCAL1Cys26Ser. O nucleotídeo mutado está sublinhado:

pCAL1Cys25SerF: 5’ TGCGGGTCCAGCTGGAGTTTC3’

pCA1Cys25SerR: 5’ GAAACTCCAGCTGGACCCGCA 3’

g) Oligonucleotídeos utilizados para gerar o mutante pCAL2Cys25Ser. O nucleotídeo mutado está sublinhado:

pCAL2Cys25SerF: 5’ CTGCGGGTCCAGCTGGGCCTTC 3’

pCAL2Cys25SerR: 5’ GAAGGCCCAGCTGGACCCGCA 3’

h) Oligonucleotídeos utilizados para gerar o mutante pCAL3Cys26Ser. O nucleotídeo mutado está sublinhado:

pCAL3Cys25SerF: 5’ GTGCGGATCTAGCTGGAGTTTC 3’

pCAL3Cys25SerR: 5’ GAAACTCCAGCTAGATCCGCAC 3’

i) Oligonucleotídeos que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor pPIC9:

5AOX1: 5’ GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3’

3AOX1: 5’ GCAAATGGCATTCTGACATCC 3’

j) Oligonucleotídeos que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor pAE e do vetor pET28a:

T7: 5’ TAATACGACTCACTATAGGGCGA 3’

T7 Terminador: 5’ GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG 3’

3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificação das sequências codificadoras das pró-enzimas pCAL1, pCAL2 e pCAL3 utilizamos a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) em reações de 50µL contendo oligonucleotídeos 0,5µM, dNTPs 0,2mM (para cada nucleotídeo), tampão da Taq DNA polimerase, $MgCl_2$ 1,5mM e 50-200ng de DNA molde. As reações foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) com desnaturação inicial por 4 minutos a 94℃, seguindo-se 30 ciclos de 94℃ por 30 segundos, 60-64℃ (variável de acordo com a Tm do oligonucleotídeo) por 60 segundos e 72℃ por 90 segundos. Como molde nestas reações de PCR utilizamos as construções pT7-7/pCAL2 e pSE420/pCAL1 ou uma biblioteca de cDNA de *T. molitor* disponíveis em nosso laboratório.

As reações de PCR de colônia foram realizadas como descrito acima, exceto o tempo de desnaturação inicial que foi de 10 minutos para que as células pudessem ser rompidas.

3.4.3. Mutagênese sítio-dirigida

Como um dos objetivos do projeto é a obtenção da estruturas cristalográficas das pró-enzimas, pCAL1, pCAL2 e pCAL3 foram expressas como formas inativas através da substituição da Cys25 do sítio ativo por Ser25. Essas mutações foram necessárias para evitar a autoativação que ocorre em valores de pH ácido. A construção dos mutantes de pCAL1, pCAL2 e pCAL3 foi realizada pelo método da sobreposição na região mutada (Higuchi *et al*., 1988; Ho *et al*., 1989). A mutagênese é realizada em duas etapas de reações de PCR (figura 2). Na primeira etapa são realizadas duas reações de PCR separadas para cada mutante. Na reação de PCR1 é utilizado um iniciador específico correspondente ao começo da sequência (I1) e

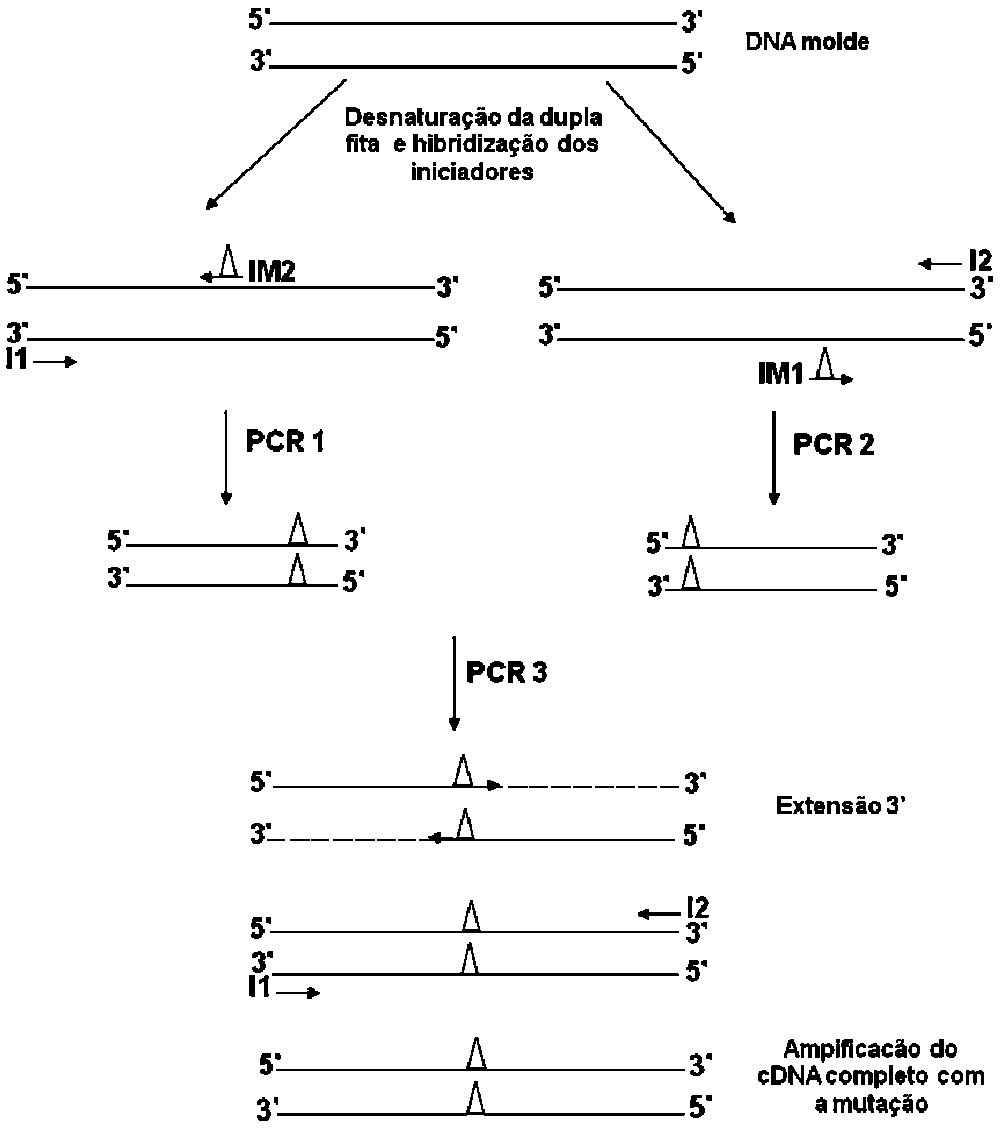


Figura 2. Mutagênese sítio dirigida por sobreposição na região mutada. Na primeira etapa ocorre a amplificação de dois fragmentos do DNA alvo (PCR 1 e PCR 2). Os fragmentos contendo as regiões de sobreposição são purificados e adicionados em quantidades iguais na segunda etapa (PCR 3). O heteroduplex formado pelo anelamento dos dois fragmento fornece o molde para gerar o cDNA completo com a mutação. Adaptado de Higuchi (1989).

um iniciador específico mutagênico reverso (IM2). Na reação de PCR2 é utilizado um iniciador específico correspondente ao final da sequência (I2) e um iniciador específico mutagênico da outra fita de DNA (IM1). Estes iniciadores vão amplificar fragmentos que se sobrepõem na região mutada. Na segunda etapa os fragmentos produzidos acima são utilizados em quantidades iguais para gerar o cDNA completo com a mutação.

As reações de PCR1 e PCR2 foram realizadas em soluções contendo 0,5µM de cada oligonucleotídeo, 0,2mM de cada dNTP, tampão DNA polimerase, Taq DNA polimerase (Fermentas Life Science), 1,5mM de $MgCl_2$ 1,5mM e 100ng de DNA molde em um volume final de 50µL. Na reação de PCR3 a composição da reação foi a mesma da citada acima, exceto a quantidade de DNA que foi aproximadamente 2ng para cada fragmento. As condições de programação dos ciclos do termociclador foram às mesmas das descritas no item anterior.

3.4.4. Eletroforese em gel de agarose

A amostra de DNA a ser analisada foi previamente misturada com 0,1 volume de tampão de amostra [azul de bromofenol 0,25% (p/v) e sacarose 40% (p/v)] e a eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,0% (p/v) a 100 Volts em TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH8). O gel foi fotografado sob luz ultravioleta e os tamanhos dos fragmentos foram estimados mediante comparação com a mobilidade de fragmentos de DNA conhecidos.

3.4.5. Eluição de fragmentos de DNA

A purificação de fragmentos de DNA a partir do gel de agarose foi feita utilizando o *kit* QIAquick gel extraction kit (Qiagen) de acordo com o protocolo

sugerido pelo fabricante. Uma alíquota da amostra de DNA obtida foi analisada por eletroforese em gel de agarose e a quantidade de DNA obtida foi estimada por comparação com fragmento de DNA de tamanho e quantidade conhecida.

3.4.6. Métodos de preparação de plasmídeos

As minipreparações de plasmídeos e a preparação de plasmídeos em grande escala foram realizadas com reagentes dos *kits* DNA purification system (Promega) e QIAGEN plasmid midikit (Qiagen) de acordo com os protocolos sugeridos pelo fabricante. Nas preparações em grande escala a determinação da quantidade de DNA foi feita pela medida da absorbância a 260nm, onde Abs_{260nm} = 1 equivale a 50μg de DNA fita dupla/mL.

3.4.7. Sequenciamento automatizado de DNA

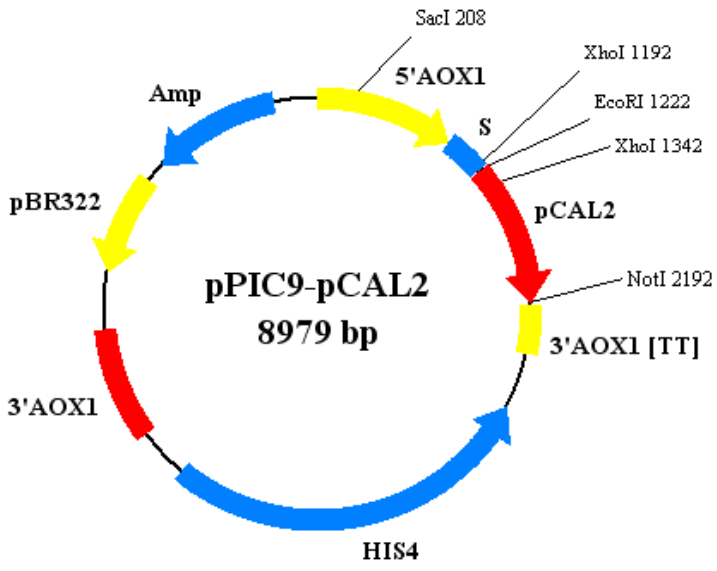
O sequenciamento foi realizado no aparelho ABI PRISM™ 3100 (Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se 2μL da mistura da reação Big Dye terminator mix (Applied Biosystems), 100-200ng de DNA, 9,6pmol de cada oligonucleotídeo, Tris-HCl 200mM pH 9,0 e $MgCl_2$ 5mM em um volume final de 15μL. A reação foi incubada por 2 minutos a 95ºC, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 96℃, 30 segundos a 50℃ e 4 minutos a 60℃. Terminada a reação, as amostras foram precipitadas com etanol 100% e glicogênio 1mg/mL, lavadas com etanol 70%, suspensas em formamida, desnaturadas a 94℃ por 5 minutos e aplicadas no seqüenciador automatizado. A qualidade das sequências geradas foi analisada no programa Chromas lite versão 2.01. A análise de similaridade foi feita no programa BLAST disponível em bancos de dados públicos como o NCBI (http://www.ncbi.nlm.nhi.gov).

3.5. Clonagem das pró-catepsinas L de *T. molitor* em vetores de expressão

3.5.1. Clonagem da sequência codificadora da pró-catepsina L 2 (pCAL2) de *T. molitor* no vetor pPIC9 para expressão em levedura

Com o objetivo de produzir CAL2 recombinante ativa, foi amplificada por PCR a sequência codificadora da pró-catepsina L 2 utilizando oligonucleotídeos específicos (pCAL2F1 e pCAL2R1) que possibilitaram que pCAL2 estivesse em fase no vetor de expressão pPIC9. O vetor apresenta um gene de resistência a ampicilina (Amp) para seleção em *E. coli* e pode ser replicado em bactérias (pBR322). O vetor também contém o gene da histidinol desidrogenase (HIS4) que confere uma marca de seleção em *Pichia* e a sequência 3' do gene AOX1 (3' AOX1). A expressão da proteína recombinante está sob controle do promotor AOX1 (5'AOX1), sendo sua expressão obtida pela adição de metanol à cultura de levedura. A presença do pró-peptídeo é necessária para o correto dobramento da enzima. A clonagem de pCAL2 neste vetor está em fase com uma sequência do vetor que codifica uma sequência sinal de secreção (α-fator sinal de secreção) que vai ser responsável pela secreção da proteína de interesse para o meio de cultura (S). Esse peptídeo sinal é removido proteoliticamente pelas proteases KEX e STE13 durante a secreção (Cereghino & Cregg, 2000).

Para a obtenção da construção pPIC9-pCAL2 (figura 3) o produto de PCR digerido com *Eco*RI e *Not*I foi ligado no vetor pPIC9 linearizado com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada na bactéria XL1Blue seguida de seleção com carbenicilina. A figura 3 mostra a digestão de um dos clones obtidos com *Eco*RI e *Not*I. O sequenciamento de dois clones com oligonucleotídeos específicos (5AOX1 e 3AOX1) para o vetor pPIC9 mostrou que a sequência obtida estava intacta e que a



Esquema da construção pPIC9-pCAL2

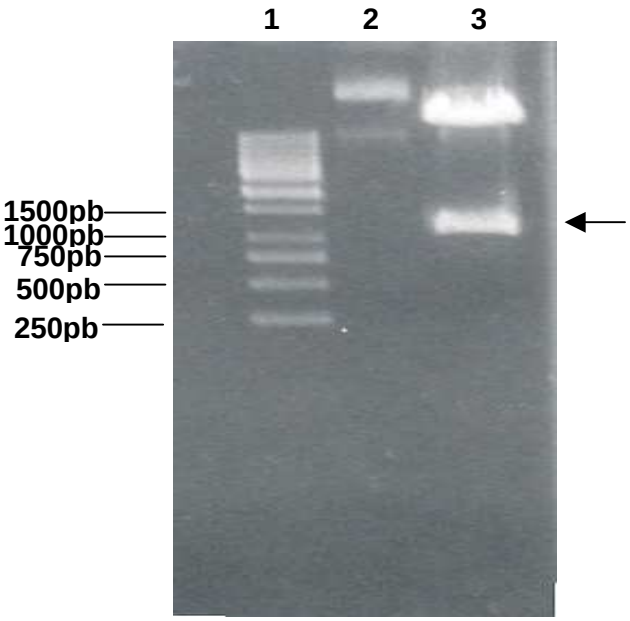


Figura 3. Análise da construção pPIC9-pCAL2. A construção pPIC9-pCAL2 (canaleta 2) foi digerida com *Eco*RI e *Not*I. A seta aponta para o fragmento de ~963pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaleta 3). A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho *1Kb DNA ladder*. O tamanho de alguns fragmentos em pb está indicado à esquerda.

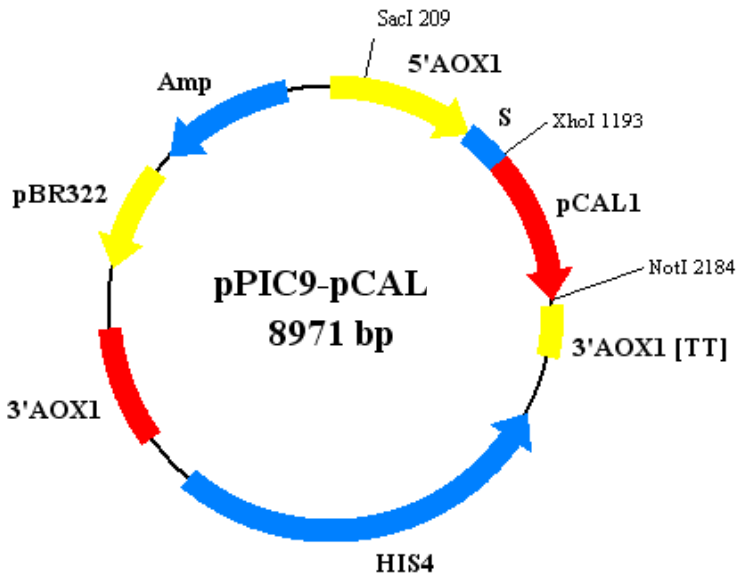
sua amplificação por PCR não introduziu nenhuma alteração na sua sequência de bases (dados não mostrados). Um clone foi utilizado para preparação de plasmídeos em larga escala.

3.5.2. Clonagem da sequência codificadora da pró-catepsina L 1 (pCAL1) de *T. molitor* no vetor pPIC9 para expressão em levedura

Com o objetivo de produzir uma maior quantidade de CAL1 recombinante para os experimentos de cristalografia, foi amplificada por PCR a sequência codificadora da pró-catepsina L 1 utilizando oligonucleotídeos específicos (pCAL1F1 e pCAL1R1) que possibilitaram que pCAL1 estivesse em fase no vetor de expressão pPIC9. Na obtenção da construção pPIC9-pCAL1 (figura 4) o produto de PCR digerido com *Xho*I e *Not*I foi ligado no vetor pPIC9 linearizado com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada na bactéria XL1Blue seguida de seleção com carbenicilina. A figura 4 mostra a digestão de um dos clones obtidos com *Xho*I e *Not*I para confirmação da presença do inserto. O sequenciamento de dois clones com oligonucleotídeos específicos (5AOX1 e 3AOX1) para o vetor pPIC9 mostrou que a sequência obtida estava intacta e que a sua amplificação por PCR não introduziu nenhuma alteração na sua sequência de bases (dados não mostrados). Um clone foi utilizado para preparação de plasmídeos em larga escala.

3.5.3. Subclonagem de pCAL2 no vetor pET28a para expressão em bactérias

O vetor pET28a apresenta como marca de seleção a resistência a canamicina (Kan). No vetor pET28a a expressão da sequência de interesse está sobre o controle do promotor T7 que é reconhecido pela T7 RNA polimerase. Nas cepas utilizadas na expressão de proteínas a T7 RNA polimerase está sobre o controle do



Esquema da construção pPIC9-pCAL1

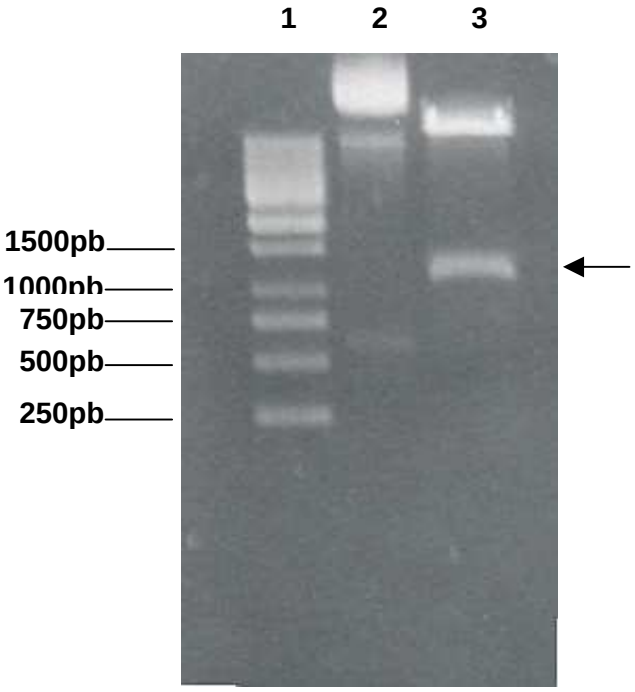


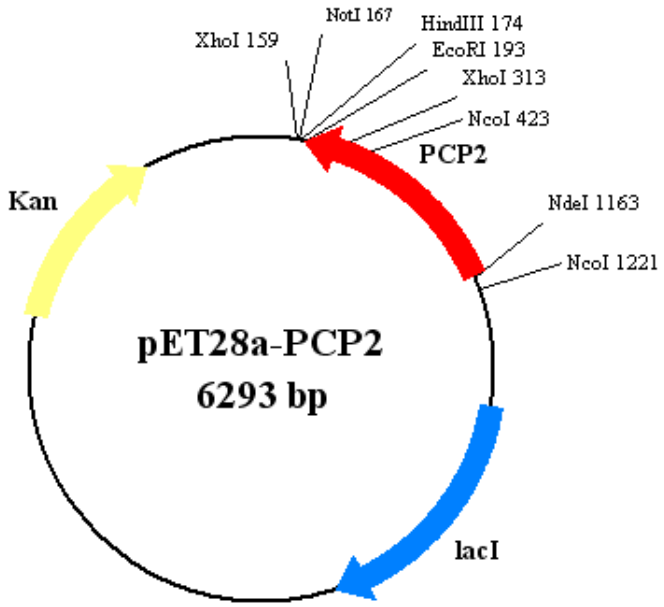
Figura 4. Análise da construção pPIC9-pCAL1. A construção pPIC9-pCAL1 (canaleta 2) foi digerida com *Xho*I e *Not*I. A seta aponta para o fragmento de ~966pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaleta 3). A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho *1Kb DNA ladder*. O tamanho de alguns fragmentos em pb está indicado à esquerda.

promotor lacUV5 e a sua expressão é induzida pela adição de IPTG à cultura bacteriana. Este promotor apresenta um certo vazamento e alguma expressão da T7 RNA polimerase pode ser observada em bactérias não induzidas. Na cepa BL21(DE3)PLysS a presença do plasmídeo pLysS codifica para a lisozima, um inibidor natural da T7 RNA polimerase, impedindo o vazamento da expressão da proteína recombinante. A clonagem de pCAL2 no vetor pET28a está em fase na extremidade amino terminal com uma sequência do vetor que codifica para os seis resíduos de histidina. Assim, no processo de ativação do zimogênio a cauda de histidina é eliminada junto com o pró-peptídeo.

Para a subclonagem de pCAL2 no vetor pET28a, a construção pT7-7-pCAL2 foi digerida com *Nde*I e *Eco*RI para liberação do inserto e o vetor foi linearizado com *Nde*I e *Eco*RI. A construção pET28a-pCAL2 (figura 5) foi transformada na bactéria XL1Blue e a partir de algumas colônias os plasmídeos foram isolados e submetidos à digestão com *NdeI* e *EcoRI* para checar o sucesso da clonagem (figura 5). O sequenciamento de dois clones com oligonucleotídeos específicos (T7 e T7 Terminador) mostrou que a sequência estava em fase com a cauda de histidina.

3.5.4. Clonagem de pCAL2 no vetor pAE para expressão em bactéria

Para facilitar a purificação das pró-catepsinas por cromatografia de afinidade os seus cDNAs foram clonados no vetor de expressão pAE (Ramos *et al*., 2004). As clonagens no vetor pAE estão em fase na porção amino terminal com uma sequência do vetor que codifica para seis resíduos de histidina. No vetor pAE, a expressão da proteína recombinante está sob controle do promotor T7, que é reconhecido pela T7 RNA polimerase.



Esquema da construção pET28a-pCAL2

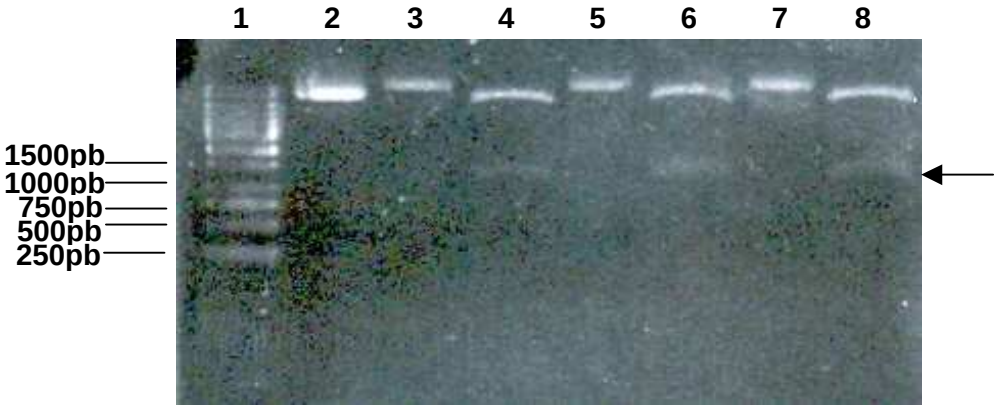


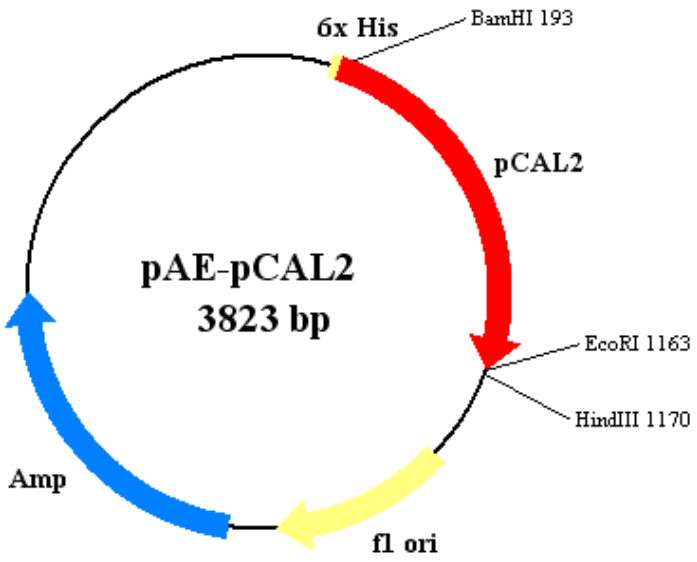
Figura 5. Análise da construção pET28a-pCAL2. Para verificação do sucesso da subclonagem de pCAL2, a construção pET28a-pCAL2 mostrada acima (canaletas 3, 5 e 7) foi digerida com as enzimas *Nde*I e *Eco*RI. A seta aponta para o fragmento de ~963pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaletas 4, 6 e 8). A digestão foi analisada em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho molecular *1Kb DNA ladder* e a canaleta 2 ao vetor pET28a. O tamanho de alguns fragmentos em pb está indicado à esquerda.

O vetor apresenta como marca de seleção um gene de resistência a ampicilina (Amp). No processo de ativação do zimogênio a cauda de histidina é eliminada junto com o pró-peptídeo.

O produto de PCR (~963pb) foi digerido com *Bam*HI e *Eco*RI e ligado no vetor pAE previamente linearizado com *Bam*HI e *Eco*RI (figura 6). A ligação foi transformada na bactéria XL1Blue seguida de seleção com carbenicilina. A figura 6 mostra a digestão de um dos clones obtidos com *Bam*HI *e Eco*RI para confirmação da presença do inserto. O sequenciamento de dois clones com oligonucleotídeos específicos para o vetor pAE mostrou que a sequência obtida estava intacta e que a sua amplificação por PCR não introduziu nenhuma alteração na sua sequência de bases (dados não mostrados). Um clone foi utilizado para preparação de plasmídeos em larga escala.

3.5.5. Clonagem da seqüencia codificadora da pró-catepsina L 3 (pCAL3) de *T. molitor* no vetor pAE para expressão em bactéria

Com o objetivo de clonar o cDNA de pCAL3 no vetor de expressão pAE , realizamos reações de PCR com os oligonucleotídeos pCAL3F e pCAL3R utilizando como molde uma biblioteca de cDNA de *T. molitor*. O produto de PCR de ~936pb foi digerido com *Pst*I e *Hind*III e ligado no vetor pAE previamente linearizado com *PstI* e *Hind*III (figura 7). A ligação foi transformada na bactéria XL1Blue seguida de seleção com carbenicilina. A figura 7 mostra a digestão de um dos clones obtidos com *Pst*I e *Hind*III. O sequenciamento de dois clones com oligonucleotídeos específicos para o vetor pAE mostrou que a sequência obtida estava intacta e que a sua amplificação por PCR não introduziu nenhuma alteração na sua sequência de bases (dados não mostrados). Um clone foi utilizado para preparação de plasmídeos em larga escala.



Construção pAE-pCAL2

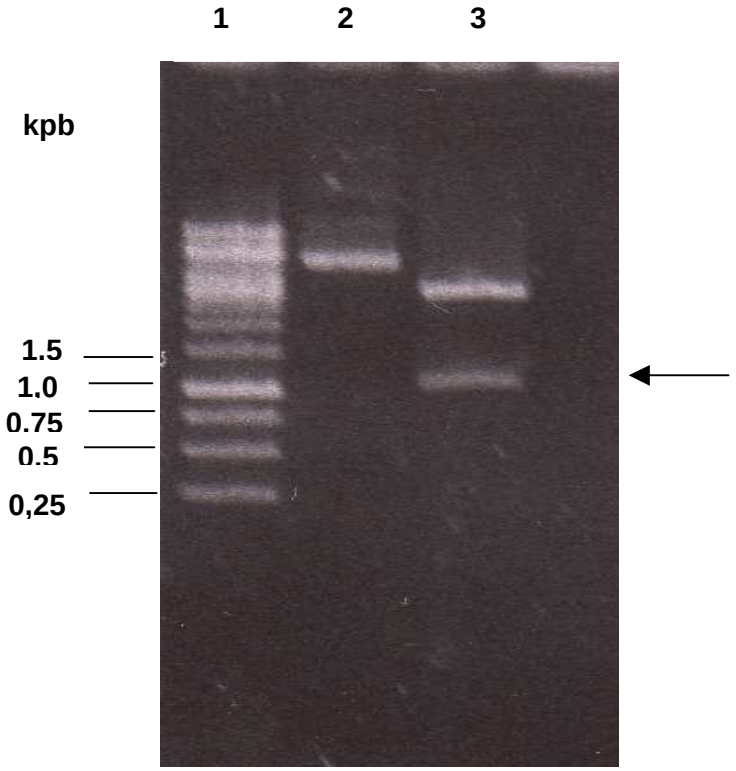
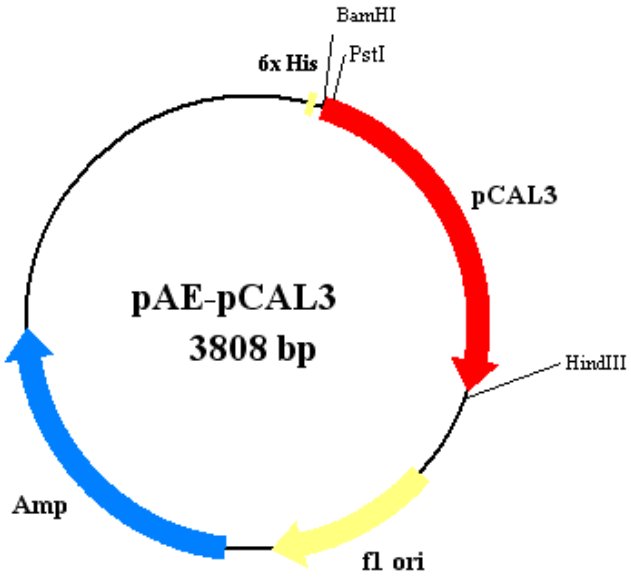


Figura 6. Análise da construção pAE-pCAL2. A construção pAE-pCAL2 (canaleta 2) foi digerida com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. A seta aponta para o fragmento de ~963pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaleta 3). A digestão foi analisada em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho *1Kpb DNA ladder*.



Construção pAE-pCAL3

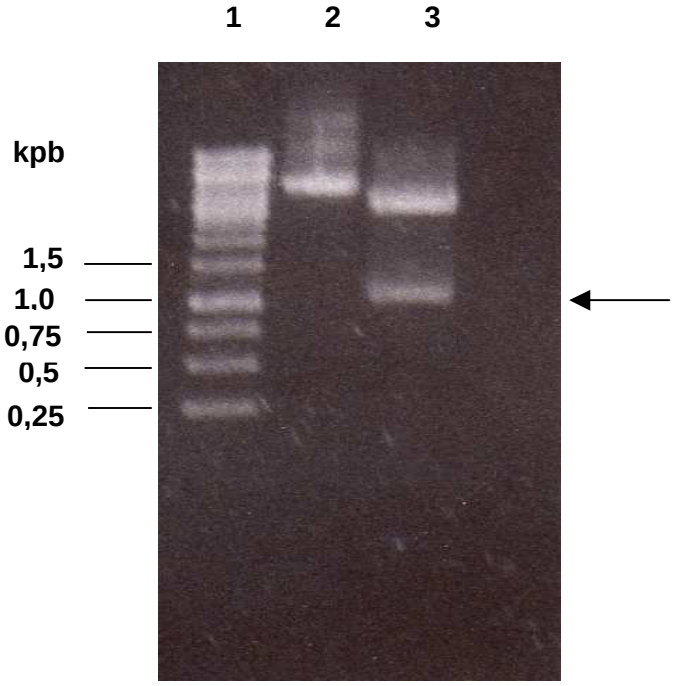


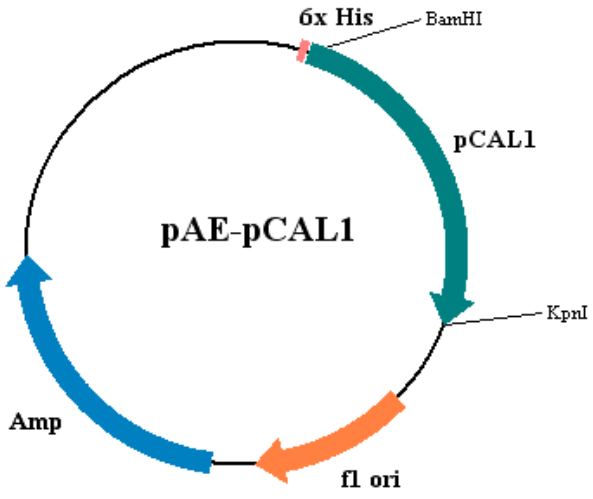
Figura 7. Análise da construção pAE-pCAL3. Para confirmar o sucesso da clonagem de pCAL3, a construção pAE-pCAL3 (canaleta 2) foi digerida com as enzimas de restrição *Hind*III e *Pst*I. A seta aponta para o fragmento de ~936pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaleta 3). A digestão foi analisada em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho *1Kpb DNA ladder*.

3.5.6. Clonagem de pCAL1 no vetor pAE para expressão em bactéria

Na clonagem do cDNA de pCAL1 foram utilizados oligonucleotídeos específicos (pCAL1F2 e pCAL1R2). O produto de PCR obtido de ~966pb foi purificado e digerido com *Bam*HI e *Kpn*I. O vetor pAE foi linearizado com *Bam*HI e *Kpn*I. A construção pAE-pCAL1 (figura 8) foi transformada na bactéria XL1Blue e a partir de algumas colônias os plasmídeos foram isolados e submetidos a digestão com *Bam*HI e *Kpn*I para checar o sucesso da clonagem (figura 8). O sequenciamento de dois clones com oligonucleotídeos específicos para o vetor pAE mostrou que a sequência obtida estava intacta e que a sua amplificação por PCR não introduziu nenhuma alteração na sua sequência de bases (dados não mostrados). Um clone foi utilizado para preparação de plasmídeos em larga escala.

3.5.7. Clonagem de pCAL2 mutante no vetor de expressão pAE

Para a obtenção da construção pAE-pCAL2Cys25Ser (figura 9), foram realizadas duas etapas de reações de PCR (dados não mostrados). Na primeira etapa foram obtidos dois fragmentos de tamanho esperado utilizando os oligonucleotídeos pCAL2F e pCAL2Cys25SerR na reação de PCR1 (~400pb) e os oligonucleotídeos pCAL2R e pCAL2Cys25SerF na reação de PCR2 (~600pb). Na segunda etapa o produto de PCR foi obtido a partir dos fragmentos purificados (~2ng de cada fragmento) com os oligonucleotídeos pCAL2F e pCAL2R (~963pb). O produto de PCR foi digerido com *Bam*HI e *Eco*RI e ligado no vetor pAE previamente linearizado com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada na bactéria XL1Blue seguida de seleção com carbenicilina. A figura 9 mostra a digestão de um dos clones obtidos com *Bam*HI *e Eco*RI para confirmação da presença do inserto.



Construção pAE-pCAL1

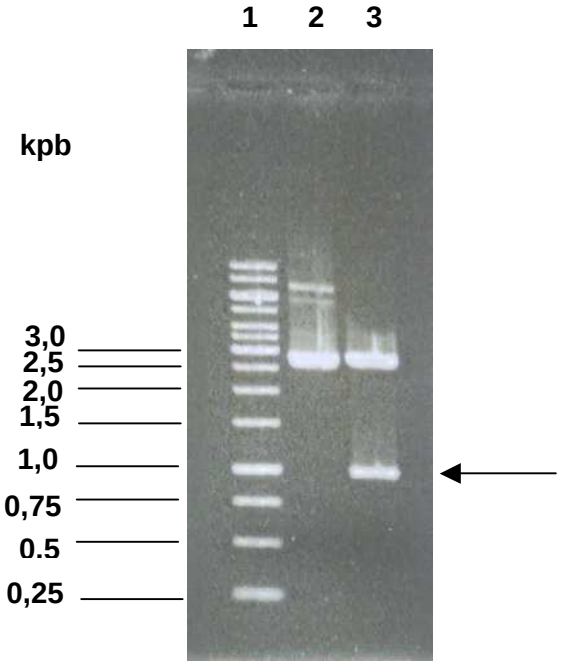
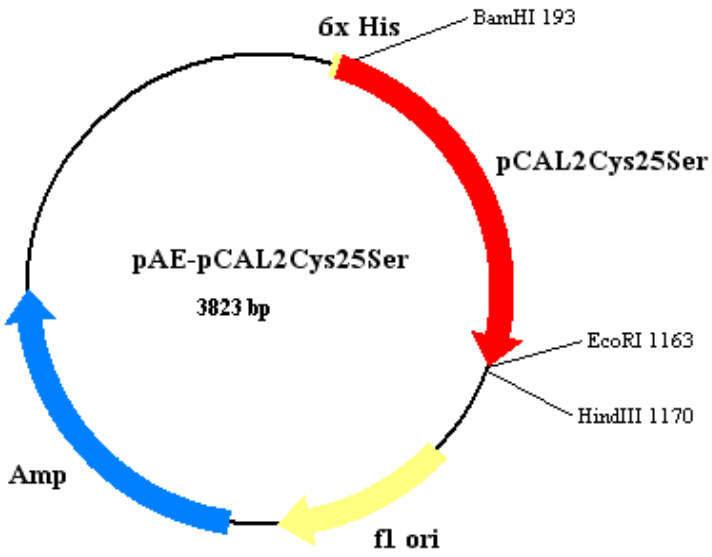


Figura 8. Análise da construção pAE-pCAL1. A construção pAE-pCAL1 (canaleta 2) foi digerida com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I. A seta aponta para o fragmento de ~966pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaleta 3). A digestão foi analisada em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho *1Kpb DNA ladder*.



Construção pAE-pCAL2Cys25Ser

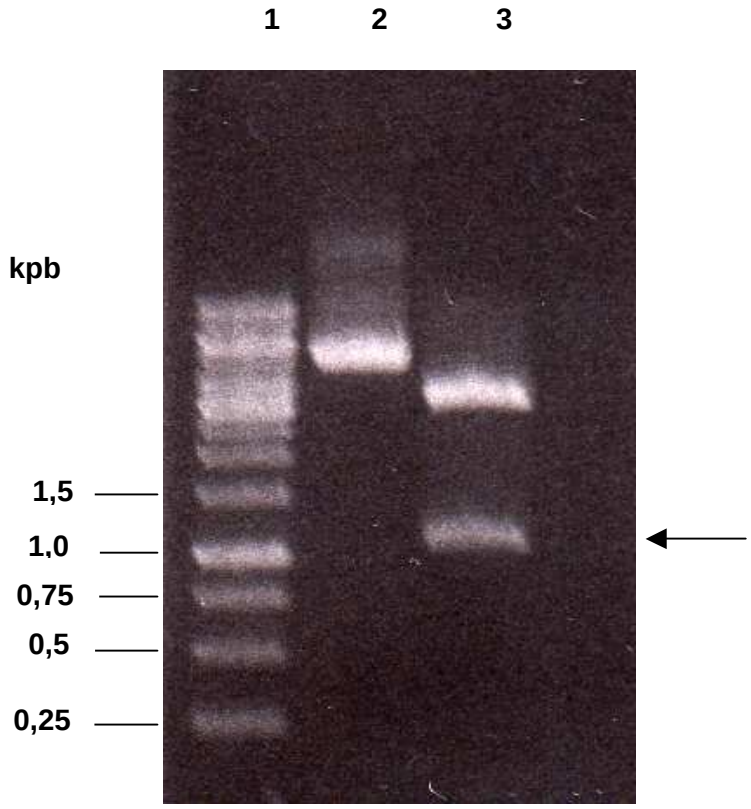
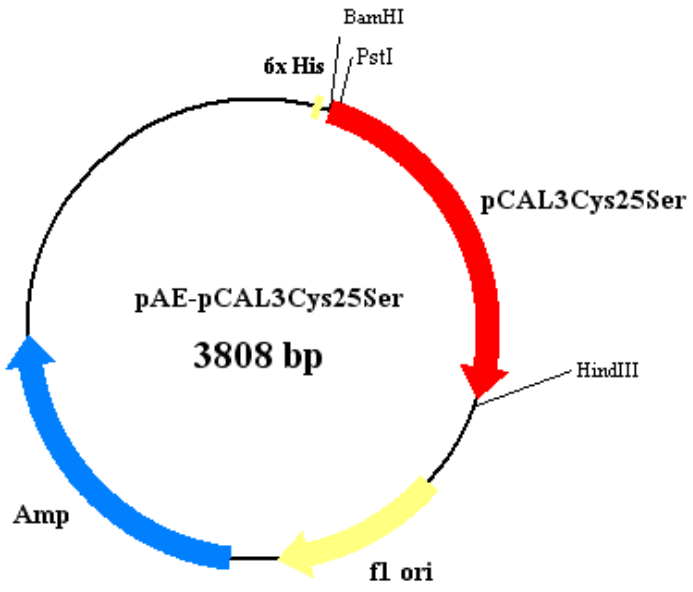


Figura 9. Análise da construção pAE-pCAL2Cys25Ser. A construção pAE-pCAL2 Cys25Ser (canaleta 2) foi digerida com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI.* A seta aponta para o fragmento de ~936pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaleta 3). A digestão foi analisada em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho *1Kpb DNA ladder*.

O sequenciamento de 5 clones com oligonucleotídeos específicos para o vetor pAE mostrou que a mutação desejada foi inserida e que nenhuma mutação ocasional devido a erros da Taq polimerase ocorreu.

3.5.8. Clonagem de pCAL3 mutante no vetor de expressão pAE

Na clonagem do mutante pCAL3Cys26Ser foram realizadas duas etapas de reações de PCR separadas (dados não mostrados). Na primeira etapa foram obtidos dois fragmentos de tamanho esperado utilizando os oligonucleotídeos pCAL3F e pCAL3Cys26SerR na reação de PCR1 (~400pb) e os oligonucleotídeos pCAL3R e pCAL3Cys26SerF na reação de PCR2 (~600pb). Na segunda etapa o produto de PCR foi obtido a partir dos fragmentos purificados (~2ng de cada fragmento) com os oligonucleotídeos pCAL3F e pCAL3R (~936pb). O produto de PCR de foi digerido com *Pst*I e *Hind*III e ligado no vetor pAE linearizado com *Pst*I e *Hind*III. A ligação foi transformada na bactéria XL1Blue seguida de seleção com carbenicilina. A figura 10 mostra a digestão de um dos clones obtidos com *Pst*I e *Hind*III. O sequenciamento de 5 clones com oligonucleotídeos específicos para o vetor pAE mostrou que a mutação desejada foi inserida e que nenhuma mutação ocasional devido a erros da Taq polimerase ocorreu.



Construção pAE-pCAL3Cys26Ser

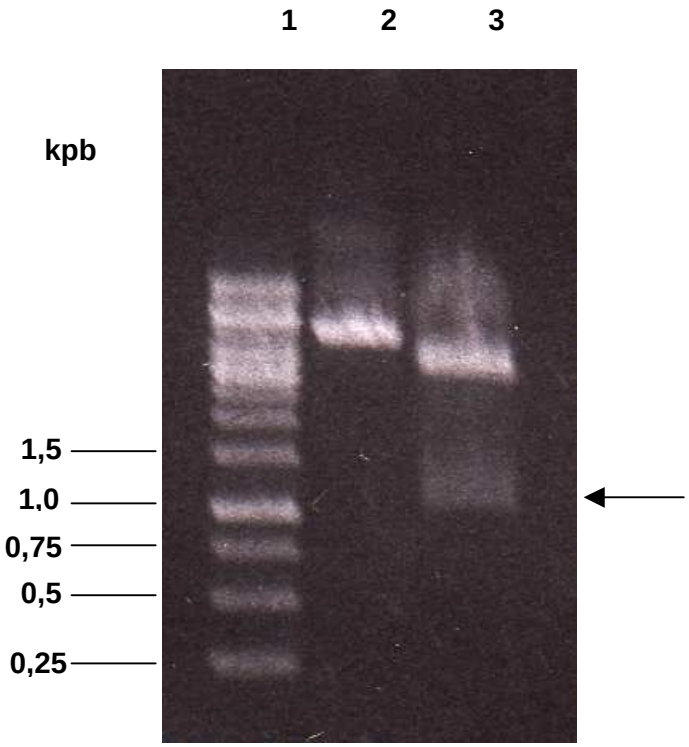
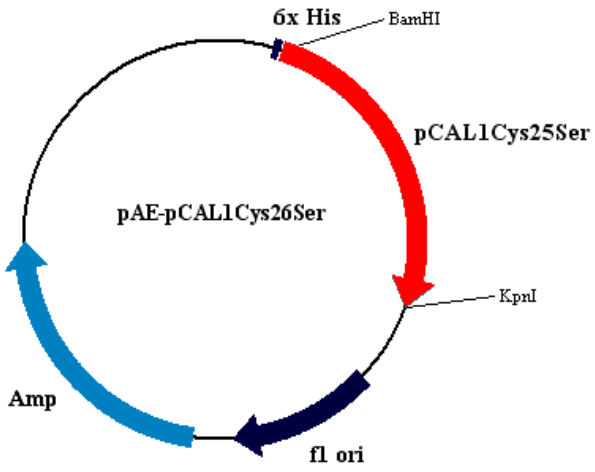


Figura 10. Análise da construção pAE-pCAL3Cys26Ser. Para confirmar o sucesso da clonagem de pCAL3, a construção pAE-pCAL3Cys26Ser (canaleta 2) foi digerida com as enzimas de restrição *Hind*III e *Pst*I. A seta aponta para o fragmento de ~936pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaleta 3). A digestão foi analisada em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho *1Kb DNA ladder*. O tamanho de alguns fragmentos em kpb está indicado à esquerda.

3.5.9. Clonagem de pCAL1 mutante no vetor de expressão pAE

Para a construção do mutante pAE-pCAL1Cys26Ser foram feitas duas etapas de reações de PCR (dados não mostrados). Na primeira etapa foram obtidos dois PCR foi obtido a partir dos fragmentos purificados (~2ng de cada fragmento) com os oligonucleotídeos pCAL1F2 e pCAL1R2 (~966pb). O produto de PCR de foi digerido com *Bam*HI e *Kpn*I e ligado no vetor pAE linearizado com as mesmas enzimas. A ligação foi transformada na bactéria XL1Blue seguida de seleção com carbenicilina. A figura 11 mostra a digestão de um dos clones obtidos com *Bam*HI *e Kpn*I para confirmação da presença do inserto. O sequenciamento de 6 clones com oligonucleotídeos específicos para o vetor pAE mostrou que a mutação desejada foi inserida e que nenhuma mutação ocasional devido a erros da Taq polimerase ocorreu.



Construção pAE-pCAL1Cys26Ser

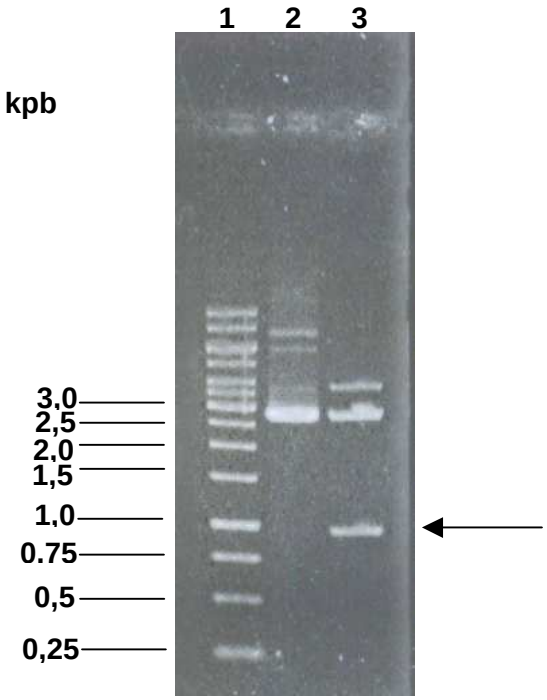


Figura 11. Análise da construção pAE-pCAL1Cys26Ser. A construção pAE-pCAL1Cys26Ser (canaleta 2) foi digerida com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I. A seta aponta para o fragmento de ~966pb correspondente ao inserto liberado da construção (canaleta 3). A digestão foi analisada em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. A canaleta 1 corresponde ao marcador de tamanho *1Kpb DNA ladder*.

3.6. Procedimentos para manipulação e análise de proteínas

3.6.1. Expressão de pCAL1 e pCAL2 recombinantes em levedura

Para a expressão de pCAL1 e pCAL2 foi utilizada *P. pastoris* transformada com as construções pPIC9-pCAL1 e pPIC9-pCAL2, obtidas como descrito no item 3.3.3.

Inicialmente 20 clones foram inoculados separadamente em 10mL de meio YPD e crescidos a 28℃ por uma noite a 160rpm. As células obtidas foram coletadas por centrifugação 2.500xg, 5 minutos a temperatura ambiente. O sedimento foi suspenso em 10mL de água Milli-Q estéril e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes e as células foram suspensas em 10mL de meio BMMY [extrato de levedura 1% (p/v); peptona 2% (p/v); fosfato de potássio 100mM; YNB 1,34% (v/v) e biotina $4x10^{-5}$% (v/v), pH 6,0], seguindo-se incubação a 28℃ a 160rpm. Para a indução da proteína recombinante foi adicionado metanol para concentração final de 1% a cada 12 h. Alíquotas de 1mL foram coletadas após 0, 24, 48, 72 e 96 horas de indução, submetidas à centrifugação 16.000 x g por 5 minutos a 4℃. O sobrenadante contendo a enzima secretada foi coletado e o sedimento descartado. O perfil de indução das proteínas recombinantes foi avaliado através de ensaios enzimáticos sobre o substrato Z-FR-MCA.

O clone que apresentou maior atividade enzimática foi crescido em meio YPD sólido e inoculado em 10mL de meio YPD a 28℃, por uma noite a 160rpm. Em seguida 100µL desta cultura foi diluído em 100mL de meio YPD e incubado a 28℃, por 24 horas a 160rpm. As células obtidas foram coletadas por centrifugação 2.500 x g, 5 minutos a temperatura ambiente. O sedimento foi suspenso em 100mL de água Milli-Q estéril e centrifugado nas condições anteriores. A etapa de lavagem foi

repetida por mais duas vezes e as células foram suspensas em 50mL de meio BMMY e 50mL de meio BMM [fosfato de potássio 100mM; YNB 1,34% (v/v) e biotina $4x10^{-5}$% (v/v), pH 6,0], seguindo-se incubação a 28℃ a 160rpm com adição de metanol para concentração final de 1% a cada 12 h. O tratamento das amostras induzidas foi realizado como descrito acima. Para a determinação do ótimo tempo de indução o perfil da indução foi analisado através da atividade enzimática com o substrato Z-FR-MCA e por eletroforese em SDS-PAGE com coloração com prata (item 3.6.5).

3.6.2. Expressão de pCAL2 recombinante em BL21(DE3)PLysS

Para a expressão de pCAL2 em BL21(DE3)PLysS foram utilizadas as construções pT7-7-pCAL2 e pET28a-pCAL2.

Após a transformação em BL21(DE3)PLysS, 10 clones foram inoculados em 3mL de meio 2x TY contendo carbenicilina 100μg/mL e cloranfenicol 34μg/mL ou canamicina 50μg/mL e cloranfenicol 34μg/mL e crescidos a 37ºC por uma noite a 200rpm. Em seguida as culturas foram diluídas para DO_{600nm} = 0,1 em 10mL de meio 2x TY fresco contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo incubadas a 37℃. Quando a cultura atingiu uma DO_{600nm} = 0,4, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida), submetida à centrifugação 16.000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias suspenso em 100μL de tampão de amostra para eletroforese 1X (descrito no item 3.6.5). O IPTG (Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) foi então adicionado a essa cultura para concentração final de 1mM e alíquotas da suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 3 horas de incubação e processadas da mesma forma, exceto que o sedimento de bactérias foi suspenso em 200μL de

tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras de cultura não induzida e induzida foram armazenadas a -20℃ até a sua utiliz ação.

Para testar a indução de pCAL2 recombinante em diferentes temperaturas partimos do clone que apresentou melhor indução conforme descrito acima. Este clone foi crescido em meio 2x TY sólido com os antibióticos necessários. Previamente à indução, o clone de interesse foi inoculado em 10mL de meio 2x TY contendo carbenicilina 100μg/mL e cloranfenicol 34μg/mL ou canamicina 50μg/mL e cloranfenicol 34μg/mL e crescido a 37℃, por uma noite a 200rpm. Em seguida a cultura foi diluída para DO_{600nm} = 0,1 em 50mL de meio 2x TY contendo antibiótico na mesma concentração anterior, sendo incubado em diferentes temperaturas (25, 30 e 37℃). Quando a cultura atingiu uma DO_{600nm} = 0,4, uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida), o IPTG foi adicionado para concentração final de 1mM e alíquotas de suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 3 horas de incubação. Amostras das culturas induzidas e não induzidas foram processadas como já descrito. O restante da cultura foi submetido à centrifugação 4.000xg por 20 minutos a 4℃ e armazenado a -80℃.

O perfil de indução da proteína recombinante foi analisado em gel de poliacrilamida a 12% contendo SDS (SDS-PAGE) e coloração com Coomassie Blue (item 3.6.5).

3.6.3. Expressão de pCAL2 recombinante em BL21(DE3)

Para a expressão de pCAL2 em BL21(DE3) foram utilizadas as construções pT7-7-pCAL2 e pET28a-pCAL2.

Os clones de interesse foram inoculados em 10mL de meio LB contendo carbenicilina 100μg/mL ou canamicina 50 μg/mL e crescidos a 37℃, por uma noite a

200rpm. Em seguida, esta cultura foi diluída para DO_{600nm} = 0,1 em 50mL de meio LB contendo antibiótico na mesma concentração anterior, prosseguindo-se a incubação em diferentes temperaturas (25, 30 e 37℃). Quando a cultura atingiu uma DO_{600nm} = 0,6 uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida), o IPTG foi adicionado para concentração final de 1mM e alíquotas de suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retiradas após 3 horas de incubação a 25, 30 e 37℃. Amostras das culturas induzidas e não induzidas foram processadas como descrito no item 3.6.5. O restante da cultura foi submetido à centrifugação 4.000xg por 20 minutos a 4℃ e armazenado a -80℃. O perfil de indução da proteína recombinante foi analisado como descrito no item anterior.

3.6.4. Expressão de pCAL1, pCAL2, pCAL3, pCAL1Cys26Ser, pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser recombinantes em OrigamiB(DE3)

Para a expressão de pCAL1, pCAL2, pCAL3, pCAL1Cys26Ser, pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser recombinantes foi utilizada a cepa OrigamiB(DE3), respectivamente transformada com as construções pAE-pCAL1, pAE-pCAL2, pAE-pCAL3, pAE-pCAL1Cys26Ser, pAE-pCAL2Cys25Ser e pAE-pCAL3Cys26Ser.

Os clones de interesse foram inoculados em 10mL de meio LB contendo carbenicilina 100μg/mL e crescidos a 37℃, por uma noite a 200rpm. Em seguida, esta cultura foi diluída para DO_{600nm} = 0,1 em 50mL de meio LB contendo antibiótico na mesma concentração anterior, prosseguindo-se a incubação em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 37℃). Quando a cultura atingiu uma DO_{600nm} = 0,6 uma alíquota de 1mL foi retirada (cultura não induzida), o IPTG foi adicionado para concentração final de 1mM e alíquotas de suspensão bacteriana (cultura induzida)

foram retiradas após a incubação nos tempos requeridos para cada experimento e processadas como descrito no item 3.6.5. A indução dos mutantes pCAL1Cys26Ser, pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys2Ser foi realizada de acordo com procedimentos estabelecidos para as pró-catepsinas nativas.

3.6.5. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de separação de 12% de poliacrilamida e gel de empilhamento de 4,0% (Laemmli, 1970) em placas. As alíquotas foram suspensas em tampão de amostra para eletroforese 1X [Tris 60mM, pH 6,8; β-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v); SDS 2% (p/v) e azul de bromofenol 0,05% (p/v)], fervidas por 3 minutos e aplicadas no gel. A corrida foi realizada a 200V (fonte Bio-rad modelPowerPac^{TM}Basic) até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. As proteínas foram visualizadas através de coloração por prata (Blum *et al*., 1987) ou por coloração com azul de Coomassie R 0,2% (p/v), preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), seguido de descoloração com ácido acético 7% (v/v) em metanol 30% (v/v). Depois de descorados os géis foram mantidos em glicerol 3% (v/v), por 1 hora, e em seguida secos entre folhas de papel celofane a 70℃, por 45 minutos, em secador de gel (Bio-rad).

3.6.6. Teste de solubilidade da proteína recombinante

Para os testes de solubilidade as culturas bacterianas foram induzidas com IPTG 1mM em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 37ºC), o sedimento bacteriano foi suspenso em 1mL de tampão de lise (Tris-HCl 50mM, pH8,0; NaCl 100mM;

PMSF 1mM e EDTA 1mM) e submetido a sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, *out put* 3 (Branson Sonifier 450) com intervalos em gelo de 1 minuto entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 10.000xg por 30 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento suspenso em 1mL do tampão anterior, sendo ambos analisados em seguida por SDS-PAGE 12% e coloração com Coomassie Blue (item 3.6.5).

3.6.7. Dosagem de proteínas

A determinação do conteúdo protéico nas amostras obtidas a partir da expressão em levedura foi realizada segundo o método de Bradford (1976) tendo como padrão ovoalbumina. A determinação do conteúdo protéico nas amostras obtidas a partir da expressão em bactéria foi realizada segundo o método descrito por Smith (1985) e modificado por Morton & Evans (1992) tendo como padrão BSA (albumina de soro bovino).

3.6.8. Ensaio enzimático para determinação da atividade de cisteína proteinase

Nos ensaios de atividade de cisteína proteinase foram utilizados os seguintes substratos fluorogênicos: 10µM carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amino-4-metil-coumarina (Z-FR-MCA), 10µM carbobenzoxi-Arg-Arg-MCA (Z-RR-MCA) e 10µM carbobenzoxi-Arg-MCA (Z-R-MCA). A atividade foi medida através da fluorescência da metilcoumarina (excitação 380nm e emissão 460nm) (Espectrofluorímetro Hitachi F-2000). A reação foi realizada a 30℃ em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,0 contendo EDTA 3mM e cisteína 3mM (exceto em condições especificadas).

Para os cálculos foram utilizados ao menos quatro diferentes tempos e as taxas iniciais de hidrólise foram calculadas. Todos os ensaios da atividade

enzimática foram realizados sob condições em que a atividade era proporcional a concentração de proteína e ao tempo. Uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1μmol de substrato por minuto.

Na determinação do K_m e $V_{máx}$ foram escolhidos os tempos de 20 a 60 minutos, onde as velocidades se encontravam dentro da faixa de linearidade. A regressão linear da curva para a obtenção do gráfico de lineaver-Burk foi feita no programa Enzifitter versão 2.0.18.0.

3.6.9. Purificação de pCAL1, pCAL2, pCAL3, pCAL1Cys26Ser, pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser

Após indução da expressão de pCAL2, pCAL3, pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser com IPTG 1mM a 20℃ por 20 horas e pC AL1 e pCAL1Cys26Ser com IPTG 1mM a 25℃ por 15 horas, o sedimento bacte riano correspondente a 50mL de cultura foi coletado por centrifugação 4000xg por 20 minutos a 4℃ e suspenso em 1mL de tampão de lise [Tris-HCL 10mM, pH8,0; NaCl 100mM; imidazol 10mM; PMSF 1mM e glicerol 10% (v/v)]. A suspensão foi submetida a sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, posição 3 (Branson Sonifier 250) com intervalos de incubação por 1 minuto em gelo entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 10.000xg por 30 minutos a 4ºC. Aproximadamente 1mL de sobrenadante foi então incubado com 200μL de resina de Ni^{+2}-NTA agarose (Qiagen) previamente equilibrada com 2,5mL de tampão de lise a 4℃, por 1 hora em homogenizador (Heavy dietyrotator, Cole Parmer) em baixa velocidade. Foram realizadas 5 lavagens com 750μL de tampão de lise por centrifugação 16.000xg por 1 minuto. A proteína foi eluída com 150μL de tampão de lise acrescido de 25, 50, 75, 100, 150 e 300mM

de imidazol, seguindo-se incubação por 15 minutos em gelo, centrifugação nas condições anteriores e coleta do sobrenadante.

Para a obtenção de uma maior quantidade de proteína, 8 sedimentos correspondentes a 50mL de culturas bacterianas induzidas foram lisados e centrifugados separadamente, como descrito anteriormente. Cerca de 1,6mL de resina equilibrada com 20mL de tampão de lise foram incubadas com a fração solúvel do extrato bruto, nas mesmas condições anteriores. Após essa incubação, a resina foi transferida para uma coluna (Poly-Prep Chromatography Column, Bio-Rad Laboratories), onde foram feitas a lavagens e a eluição da proteína recombinante a 4℃ como já descrito. Na purificação para os testes de cristalização a concentração de imidazol no tampão de lise foi aumentada para 20mM e foram realizadas 7 lavagens.

3.6.10. Transferência eletroforética para membrana de PVDF

Após SDS-PAGE, os polipeptídeos foram transferidos para membrana de PVDF (Bio-Rad) como descrito por Matsuidara (1987). O gel após eletroforese foi incubado por 10 minutos em solução de metanol 10% em CAPS 10mM, pH 11 (tampão de transferência), e transferido para uma montagem na seguinte ordem: 3 folhas de papel Whatman, membrana de PVDF previamente tratada com metanol absoluto, gel de poliacrilamida e 3 folhas de papel Whatman. A transferência foi realizada em 30 minutos a 15V. Após a transferência, a membrana foi corada por 5 minutos em solução de Coomassie R-250 0,1% em metanol 50%, seguida de lavagens com metanol 50% para retirada do excesso de corante. A membrana corada foi seca ao ar e armazenada a -20℃. O micro sequenciamento foi feito na UNIFESP em colaboração com Profs. Luiz Juliano e Maria A. Juliano.

3.6.11. Produção de anticorpos policlonais

Na imunização de coelhos machos foram utilizadas 4 alíquotas de 300μg de pCAL2 recombinante purificada e 3 alíquotas de 300μg de pCAL3 recombinante purificada (dois coelhos para cada proteína). Antes da imunização, um volume total de 10mL de sangue foram retirados do coelho para a obtenção do soro pré-imune. Para a primeira imunização, seis alíquotas de 50μg de proteína recombinante purificada foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12%. O gel foi corado de acordo com protocolo já descrito (Yan *et al.,* 2000) e as seis bandas (~35kDa para pCAL2 e ~48kDa para pCAL3) foram cortadas do gel. Em seguida, o gel foi descorado com uma solução 1:1 de ferricianeto de potássio 30mmol/L e tiossulfato de sódio 100mmol/L. Após a coloração ser removida o gel foi lavado com água Milli-Q e homogenizado em água Milli-Q com um homogenizador do tipo Potter-Elvehjem. A amostra acima com um volume final de 800μL foi misturada a 800μL de adjuvante de Freund completo (Sigma) e injetada no coelho. Uma nova imunização foi repetida trinta dias após a primeira nas mesmas condições, exceto pelo uso do adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Após dez dias, o sangue do coelho foi coletado para a obtenção do soro imune. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez para pCAL3 e duas vezes para pCAL2.

O anticorpo foi semipurificado de acordo com procedimento já estabelecido (Jordão *et al*., 1996). O sangue coletado (pré-imune e imune) foi incubado por 1 hora a 37℃, seguindo-se incubação a 4℃ por uma noite. Esse material foi submetido à centrifugação a 3.000xg por 10 minutos a 4℃. Ao sobrenadante (soro) foi adicionada uma solução de sulfato de amônio saturada pH 6,8 numa proporção 1:1. Essa etapa foi seguida de incubação por uma noite a temperatura ambiente e

centrifugação 5.000xg por 15 minutos a 4℃. O precipitado obtido foi suspenso em solução 50% saturada de sulfato de amônio pH 6,8 e submetido à centrifugação nas mesmas condições anteriores. O precipitado final foi suspenso em 2mL de NaCl 0,1M e submetido à diálise por 20 horas contra 1.000 volumes de 0,1M de NaCl a 4℃ com uma troca. Por fim, o material obtido foi distribuído em microtubos e mantido a -80℃.

3.6.12. Detecção imunológica de proteínas

Após SDS-PAGE, foi feita a transferência eletroforética dos polipeptídeos para a membrana de nitrocelulose em sistema semi- seco como descrito por Harlow & Lane (1988). As membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau-S 0,1% (p/v) dissolvido em ácido acético 10% (v/v) para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, as membranas foram descoradas por lavagem com água destilada e incubadas por 1 hora, sob agitação lenta, em TBS 1X (Tris.HCl 10mM pH7,4 e NaCl 150mM) contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado. Após esta etapa, a membrana foi incubada por uma noite com diferentes concentrações dos anticorpos policlonais anti-pCAL2 e anti-pCAL3 de *T. molitor* em TBS 1X contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado à temperatura ambiente sob agitação. No dia seguinte, as membranas foram submetidas a seis lavagens de 10 minutos cada com TBS 1X contendo Tween 20 0,1% (v/v). Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (1:1000) diluído em TBS 1X contendo Tween 20 0,1% (v/v). As membranas foram novamente submetidas a seis lavagens com TBS 1X acrescido de Tween 20 0,1% (v/v) pelo período de 1 hora. Finalmente as proteínas que reagiram com o anticorpo foram detectadas com 4-cloro-naftol

previamente dissolvido em metanol adicionado ao tampão TBS 1X contendo 0,075% de água oxigenada.

3.6.13. Imunocitolocalização nas células do intestino médio de *T. molitor*

A imunocitolocalização foi feita no Instituto de Biociências da USP-SP em colaboração com o Prof. Alberto de Freitas Ribeiro.

As larvas de *T. molitor* foram dissecadas e o intestino médio foi dividido em três partes iguais: ventrículo anterior, ventrículo médio e ventrículo posterior. O epitélio ventricular (tecido) foi separado do conteúdo luminal. As amostras de tecido foram fixadas (paraformaldeído/glutaraldeído) e embebidas em resina acrílica L.R. White. Em seguida, foi feita a incubação com os anticorpos policlonais anti-pCAL2 e anti-pCAL3. Após essa etapa, foi feita a incubação com o anticorpo secundário anti IgG de coelho. Todos os cortes foram visualizados em um microscópio eletrônico Zeiss EM 900 como descrito em Silva (1995).

3.7. Determinação das estruturas das pró-catepsinas L de *T. molitor*

Os experimentos de determinação da estrutura terciária foram realizados em colaboração com o Prof. Shaker Chuck Farah do Instituto de Química da USP-SP.

3.7.1. Concentração das pró-catepsinas L para os ensaios de cristalização

Após a purificação de pCAL1Cys26Ser, pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser por cromatografia de afinidade, as amostras foram submetidas à diálise por 18 horas em 4L de tampão Tris-HCl 10mM pH 8,3 a 4℃ com 3 trocas de 4L. As amostras foram concentradas utilizando o sistema Amicon (YM10). A concentrações protéicas foram estimadas através da espectrofotometria (absorbância a 280 nm). Os

coeficientes de extinção molar foram calculados pelo programa Expasy ProtParam tool disponível no endereço Expasy Molecular Biology (http://www.expasy.org). Os coeficientes de extinção molar calculados para pCAL1Cys26Ser, pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser com seis resíduos de histidina nas extremidades amino terminal foram 55725$M^{-1}cm^{-1,}$ 67185$M^{-1}cm^{-1}$ e 72810 $M^{-1}cm^{-1}$ respectivamente.

3.7.2. Ensaios de cristalização

pCAL1Cys26Ser recombinante purificada (4mg/mL), pCAL2Cys25Ser recombinante purificada (10mg/mL) e pCAL3Cys26Ser recombinante purificada (9,7mg/mL) foram submetidas a testes de cristalização utilizando o método de difusão de vapor gota sentada (“sitting-drop”). Os testes iniciais foram realizados utilizando os *kits* comerciais Crystal Screen, Crystal Screen II, Index I e Index II da Hampton Research. Na placa Cryschem^{TM} foram adicionados 1,5µL da proteína e 1,5µL das soluções dos *kits* previamente adicionadas (300µL) no reservatório da placa. As condições que apresentaram estruturas cristalinas foram refinadas variando o pH do tampões e a concentração do agente precipitante.

3.7.3. Coleta de dados de difração de raios-X dos cristais de pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser

A coleta de dados de difração do cristal de pCAL3Cys26Ser foi feita na linha de luz D03B-MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP. Na gota contendo o cristal de pCAL3Cys25Ser foi adicionado 1µL de solução crioprotetora PEG 4000. Em seguida, o cristal foi capturado da placa Cryschem^{TM} com o auxílio de um “loop” e colocado em contato com nitrogênio líquido para minimizar lesões no cristal devido à exposição ao raio-X.

A coleta de dados de difração do cristal de pCAL2Cys25Ser foi feita na linha de luz W01B-MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP. O cristal de pCAL2Cys25Ser foi capturado da placa Cryschem™ com o auxílio de um “loop” e como a solução de cristalização continha PEG 8000 não foi preciso transferir o cristal para a solução crioprotetora. Em seguida foi colocado em contato com nitrogênio líquido para minimizar lesões no cristal devido à exposição ao raios-X.

3.7.4. Processamento dos dados de difração de raios-X

O processamento dos dados de difração de raios-X dos cristais da pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser recombinantes (indexação, integração e escalonamento) foi feito utilizando o programa HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997). Os modelos iniciais foram obtidos por substituição molecular usando o programa *Phaser* (Storoni *et al*., 2004; Read, 2001) dentro do programa CCP4 (Collaborative Computional Project, Number 4, 1994). Para a construção destes modelos foram utilizadas coordenadas atômicas das moléculas de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser recombinantes sem moléculas de água e ligantes.

3.7.5. Refinamento das estruturas terciárias de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser recombinantes

A pró-catepsina L de *fasciola hepatica* (código PDB: 2O6X) foi utilizada como modelo na substituição molecular para resolver o problema das fases na determinação da estrutura terciária da pCAL3Cys26Ser. Para a resolução do problema das fases na determinação da estrutura terciária da pCAL2Cys25Ser foi

utilizada também substituição molecular usando a estrutura da pCAL3Cys25Ser parcialmente refinada como modelo.

A interpretação dos mapas de densidade eletrônica e o refinamento das moléculas foram feitos utilizando os programas COOT (Emsley & Cowtan, 2004) e REFMAC (Murshudov *et al*., 1997). As moléculas de água e os ligantes foram adicionados pelo programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Expressão de pCAL2 em levedura

Para a obtenção de pCAL2 recombinante optamos por utilizar *Pichia pastoris* GS115. A construção pPIC9-pCAL2 foi linearizada com *Sac*I e em seguida eletroporada na levedura *P. pastoris*. Para verificar se a construção pPIC9-pCAL2 havia sido integrada no genoma da *Pichia*, 23 colônias foram selecionadas para reações de PCR de colônia. Nestas reações de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos usados na amplificação da sequência codificadora de pCAL2. Entre as 23 colônias analisadas em 14 ocorreu integração (dados não mostrados). Assim, a partir das colônias em que ocorreu integração foi feita uma indução em pequena escala com metanol 1% em meio BMMY. Para a análise do perfil de expressão o meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante livre de células foi utilizado em análises de SDS-PAGE e em ensaios de atividade da cisteína proteinase utilizando o substrato fluorogênico carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amino-4-metil-coumarina (Z-FR-MCA). Verificamos através de ensaios de atividade que pCAL2 foi expressa e secretada para o meio de cultura em todas as colônias analisadas e que existe uma variação de atividade entre as amostras analisadas (dados não mostrados).

A partir da colônia analisada que apresentou maior atividade enzimática foi feita uma indução com metanol 1% em meio BMMY e meio mínimo BMM para determinarmos um ótimo tempo de indução. Na figura 12 verificamos que o polipeptídeo de aproximadamente 41kDa no meio BMM é induzido a partir de 24h e que níveis maiores de indução e de atividade, utilizando o substrato Z-FR-MCA, são observados com o aumento do tempo de indução. O mesmo perfil de indução foi observado em meio BMMY.

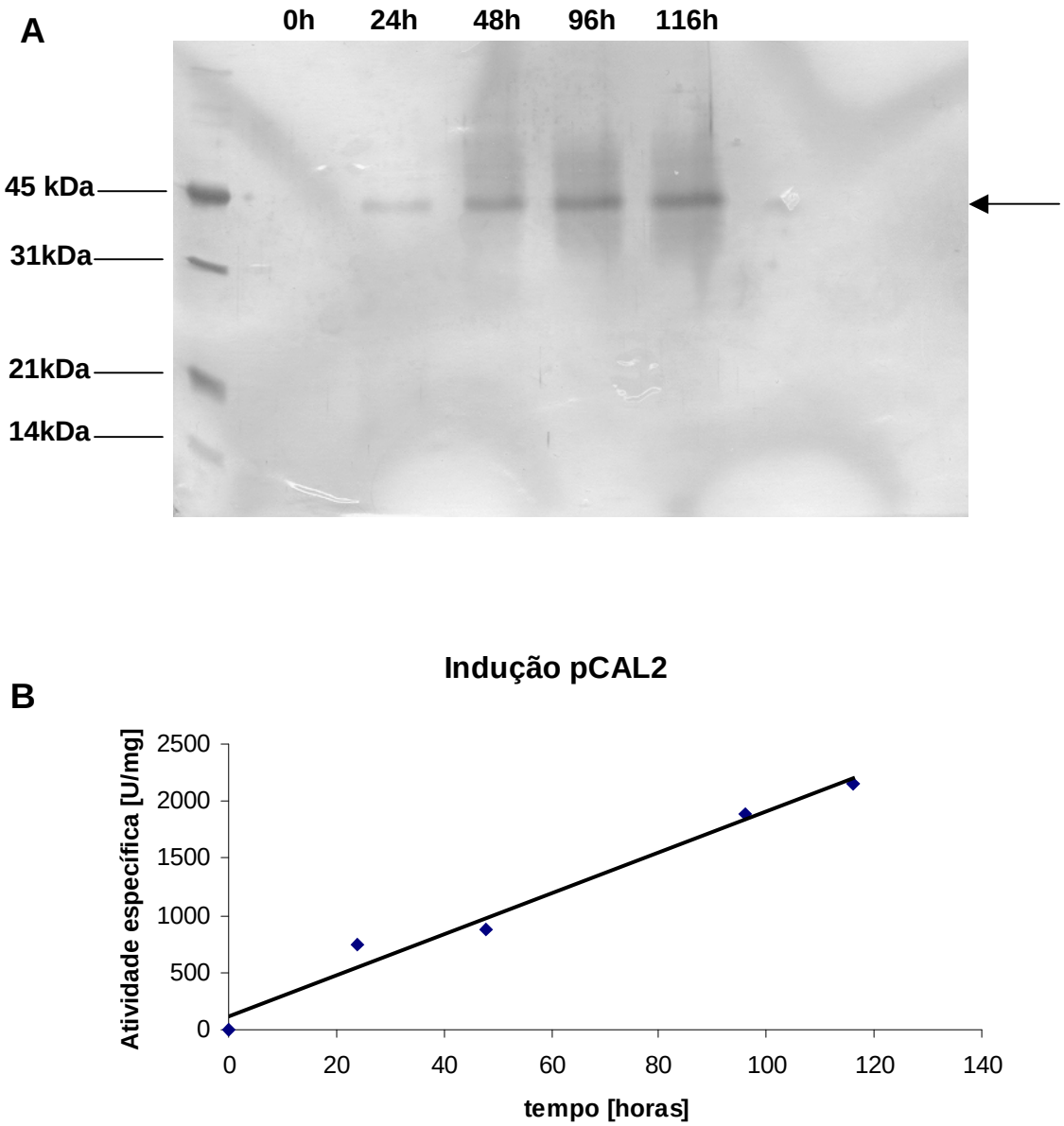


Figura 12. (A) Perfil de expressão de pCAL2 recombinante em *P. pastoris*. Para a expressão de pCAL2 foi utilizada *P. pastoris* transformada com a construção pPIC9-pCAL2. Para a indução de pCAL2 recombinante foi adicionado metanol para concentração final de 1% a cada 12 h. Alíquotas de 1mL foram coletadas após 0, 24, 48, 96 e 116 horas de indução, submetidas à centrifugação 16.000xg por 5 minutos a 4℃. O sobrenadante contendo a enzima secretada foi coletado e o sedimento descartado. As amostras foram separadas em SDS-PAGE 12% corado com prata. A seta indica pCAL2 recombinante. **(B) Atividade de CAL2 no meio de cultura de *P. pastoris*.** O perfil de indução das proteínas recombinantes foi avaliado através de ensaios enzimáticos sobre o substrato Z-FR-MCA.

Para a expressão de pCAL2 em *P. pastoris* optamos pelo meio BMM, pois na indução em meio BMMY a quantidade de proteínas endógenas secretadas é maior.

As cisteína proteinases são expressas como pró-enzimas proteoliticamente inativas e a ativação ocorre através da clivagem proteolítica do pró-peptídeo. O pró-peptídeo pode ser removido autocataliticamente por incubação em pH ácido. A cisteína proteinase obtida apresenta atividade de proteinase capaz de hidrolisar Z-FR-MCA antes de ser incubada em pH ácido. Assim, a enzima obtida foi incubada nos pHs 4,0 e 5,0. No entanto, a diminuição da massa molecular não foi observada como era esperado. Na incubação em pH 5,0 a atividade da enzima foi mantida estável e na incubação em pH 4,0 a enzima começou a perder atividade a partir de 120 minutos de incubação (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que a cisteína proteinase está sendo ativada após a sua síntese. Isso foi observado também para a catepsina L de *Diabrotica virgifera* expressa em *P. pastoris* (Bown *et al*., 2004). Neste artigo é sugerido que o pró-peptídeo pode ser removido devido à ação de proteinases da levedura. O peptídeo sinal de secreção, que foi clonado em fase com a sequência codificadora de pCAL2, é removido através da ação de proteinases endógenas da levedura (Cereghino & Cregg, 2000). Os autores também sugerem que uma vez que proteinases ativas estão sendo produzidas novas autoativações podem ocorrer.

O pH do meio de cultura diminui com o decorrer da indução (Brömme *et al*., 2004). Assim, o pH do meio foi mudado de 6,0 para 7,0 e 8,0. Em ambos os pHs testados a indução foi mais lenta, mas a enzima continuou a ser produzida ativa e verificamos também a indução de um polipeptídeo de ~41kDa que quando incubado em pH ácido não apresenta diminuição da massa molecular e nem aumento da atividade (dados não mostrados).

A análise da sequência que codifica para pCAL2 demonstrou a ocorrência de sítios teóricos para alterações pós-traducionais como glicosilação. A sequência apresenta dois sítios para N-glicosilação e um sítio para O-glicosilação. Como *P. pastoris* é capaz de adicionar oligossacarídeos N-ligados e O-ligados em proteínas secretadas (Cereghino & Cregg, 2000) pCAL2 pode estar sendo glicosilada. O *kit* de detecção de glicosilação em proteínas (Boehringer-Mannheim) mostrou que pCAL2 está sendo glicosilada (dados não mostrados). Assim, a glicosilação pode explicar a massa molecular maior em SDS-PAGE. Para confirmarmos que a banda que observamos em SDS-PAGE corresponde à enzima madura é necessário fazer o seqüenciamento N-terminal da proteína recombinante.

Como controle negativo das induções foi utilizada *P. pastoris* transformada com pPIC9 sem o inserto e linearizado com *Sac*I. No controle negativo não foi observado a banda de ~41kDa e não foi detectada atividade mensurável utilizando o substrato Z-FR-MCA.

4.2. Expressão de pCAL2 em bactérias

Para verificar a expressão de pCAL2 recombinante, utilizamos a construção disponível no laboratório pT7-7-pCAL2. Assim, a construção pT7-7-pCAL2 foi utilizada na transformação de bactérias da cepa BL21(DE3) e o nível de expressão de pCAL2 recombinante foi avaliado após indução com IPTG 1mM, a 25, 30 e 37℃ por 3 horas. Como controle negativo das induções foi utilizada bactéria BL21(DE3) transformada com o vetor pT7-7 sem o inserto (dados não mostrados). Na figura 13A verificamos que ocorreu a indução de um polipeptídeo de ~35kDa, que corresponde à massa molecular calculada a partir da sequência de aminoácidos. A solubilidade no extrato bacteriano foi analisada.

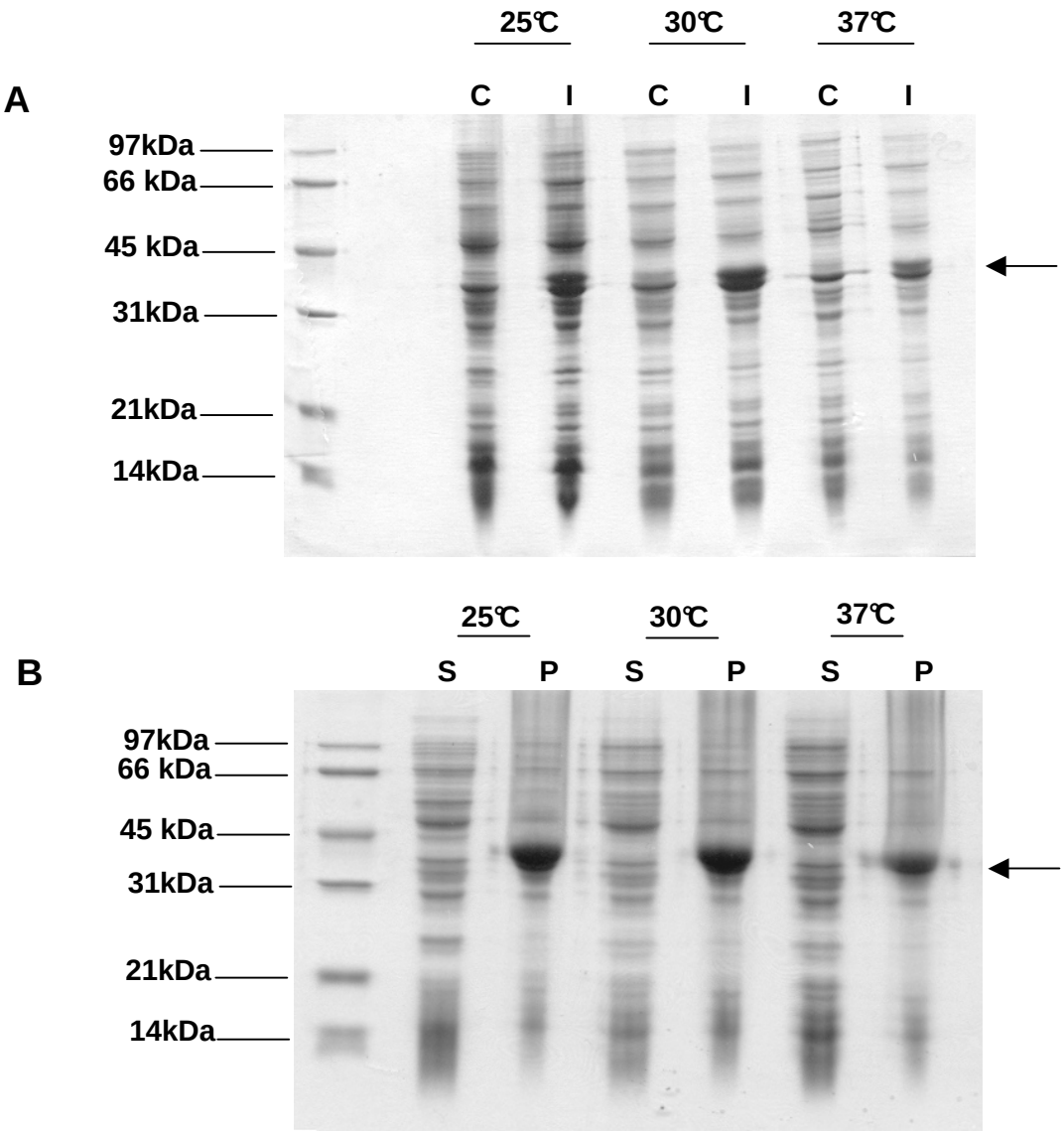


Figura 13. **(A) Expressão de pCAL2 recombinante em BL21(DE3).** A cultura de bactérias BL21(DE3) transformada com a construção pT7-7-pCAL2, crescida a 37℃, por uma noite, foi diluída para DO_{600nm} = 0,1 a 25, 30 e 37℃. Após DO_{600nm} atingir 0,6, foi adicionado IPTG 1mM, seguindo-se incubação por 3 horas nas temperaturas indicadas. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) foram separadas em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com *Coomassie Blue*. A seta indica pCAL2 recombinante. **(B) Solubilidade de pCAL2 recombinante em diferentes temperaturas**. As bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado. O sobrenadante (fração solúvel) foi removido e o sedimento (corpos de inclusão) suspenso no mesmo tampão utilizado na lise das bactérias. A fração solúvel (S) e o sedimento (P) foram analisados em SDS-PAGE como em (A).

Os sedimentos obtidos após a indução em diferentes temperaturas foram lisados por sonicação e submetidos à centrifugação. Os sobrenadantes foram recolhidos e os precipitados suspensos no mesmo tampão de lise. Na figura 13B temos a distribuição da proteína recombinante entre o sobrenadante (proteína solúvel) e o precipitado (proteína em corpo de inclusão) nas diferentes temperaturas de indução. A figura 13B mostra que a proteína recombinante encontra-se no precipitado em todas as temperaturas testadas. A fração solúvel não apresentou atividade sobre o substrato Z-FR-MCA.

4.3. Expressão de pCAL2 em BL21(DE3)PLysS

Como BL21(DE3)PLysS é a cepa mais utilizada na expressão de cisteína proteinase (Brömme *et al*., 2004), resolvemos testar esta cepa. A cepa BL21(DE3)PLysS foi transformada com a construção pET28a-pCAL2. Como controle negativo das induções foi utilizada bactéria BL21(DE3)PLysS transformada com o vetor pET28a sem o inserto (dados não mostrados). Como se observa um nível de expressão variável em colônias distintas da bactéria BL21(DE3)PLysS, foi feita uma indução em pequena escala de 10 colônias transformantes com IPTG 1mM a 37℃ por 3 horas (dados não mostrados). O clone que apresentou maior nível de expressão foi utilizado na indução com IPTG 1mM em maior escala a 25, 30 e 37℃ por 3 horas. Na figura 14A verificamos que ocorreu a indução de um polipeptídeo de ~35kDa que corresponde à massa molecular calculada a partir da sequência de aminoácidos. A solubilidade foi avaliada como no item 4.2 e a proteína recombinante encontra-se no precipitado em todas as temperaturas testadas, como mostra a figura 14B. A fração solúvel de todas as temperaturas testadas não apresentou atividade sobre o substrato Z-FR-MCA.

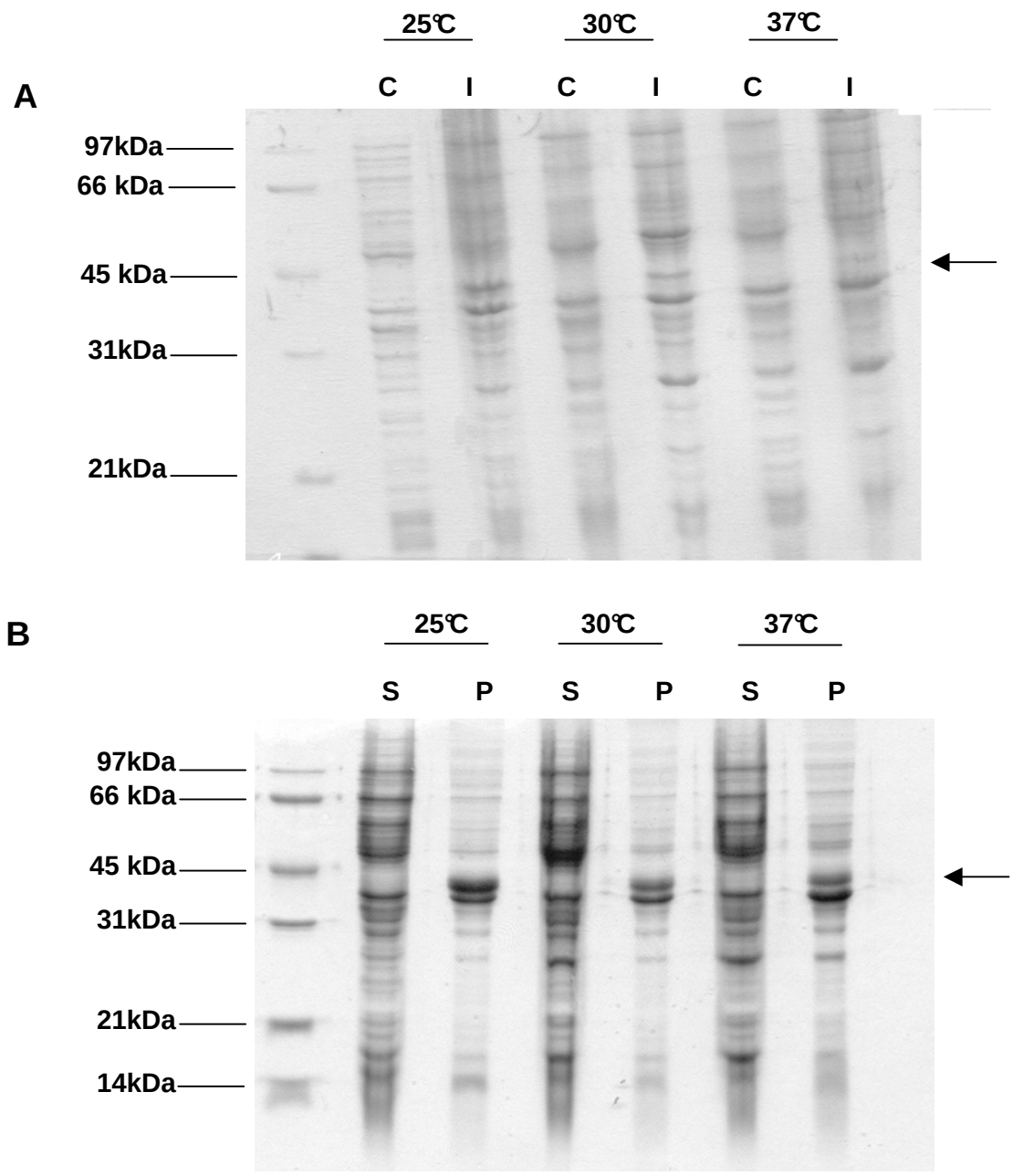


Figura 14. **(A) Expressão de pCAL2 recombinante em BL21(DE3)PLysS**. Para a indução de pCAL2 recombinante, a cultura de bactérias BL21(DE3)PLysS, transformada com a construção pET28a-pCAL2, crescida a 37℃, por uma noite, foi diluída para DO_{600nm} = 0,1 a 25, 30 e 37℃. Após DO_{600nm} atingir 0,4, foi adicionado IPTG 1mM, seguindo-se incubação por 3 horas nas temperaturas indicadas. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) foram separadas em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com *Coomassie Blue*. A seta indica pCAL2 recombinante. **(B) Solubilidade de pCAL2 recombinante em diferentes temperaturas**. As bactérias foram lisadas e centrifugadas. O sobrenadante (fração solúvel) foi removido e o sedimento (corpos de inclusão) suspenso no mesmo tampão utilizado na lise das bactérias. A fração solúvel (S) e o sedimento (P) foram analisados em SDS-PAGE como em (A).

A construção pT7-7-pCAL2 também foi testada com a cepa BL21(DE3)PLysS e o resultado foi semelhante (dados não mostrados).

4.4. Expressão de pCAL2 em BL21(DE3)

Bactérias da cepa BL21(DE3) foram transformadas com a construção pET28a-pCAL2. As induções e as solubilidades foram avaliadas como no item 4.2. Na figura 15A verificamos que o polipeptídeo de ~35kDa é induzido em todas as temperaturas. Como controle negativo das induções foi utilizada BL21(DE3) transformada com o vetor pET28a sem o inserto (dados não mostrados). A figura 15B mostra a distribuição da proteína recombinante entre o sobrenadante e o precipitado. A proteína recombinante foi recuperada na fração insolúvel em todas as temperaturas testadas. A fração solúvel de todas as temperaturas testadas não apresentou atividade sobre o substrato Z-FR-MCA.

4.5. Expressão de pCAL2 em OrigamiB(DE3)

Como não obtivemos sucesso na obtenção da proteína solúvel e ativa utilizando as cepas acima, decidimos testar a cepa OrigamiB(DE3) transformada com a construção pT7-7-pCAL2. A cepa bacteriana OrigamiB(DE3) apresenta mutações nos genes da tiorredoxina redutase e na glutationa redutase, favorecendo a formação de pontes dissulfeto (Prinz *et al*., 1997). Estudos cristalográficos das cisteína proteinases da família da papaína descrevem a presença de pontes dissulfeto nestas enzimas. Como esta cepa possui resistência a canamicina não foi possível utilizar a construção pET28a-pCAL2. As induções e as solubilidades foram avaliadas como no item 4.2. A figura 16A mostra que o polipeptídeo de ~35kDa foi induzido nas temperaturas testadas.

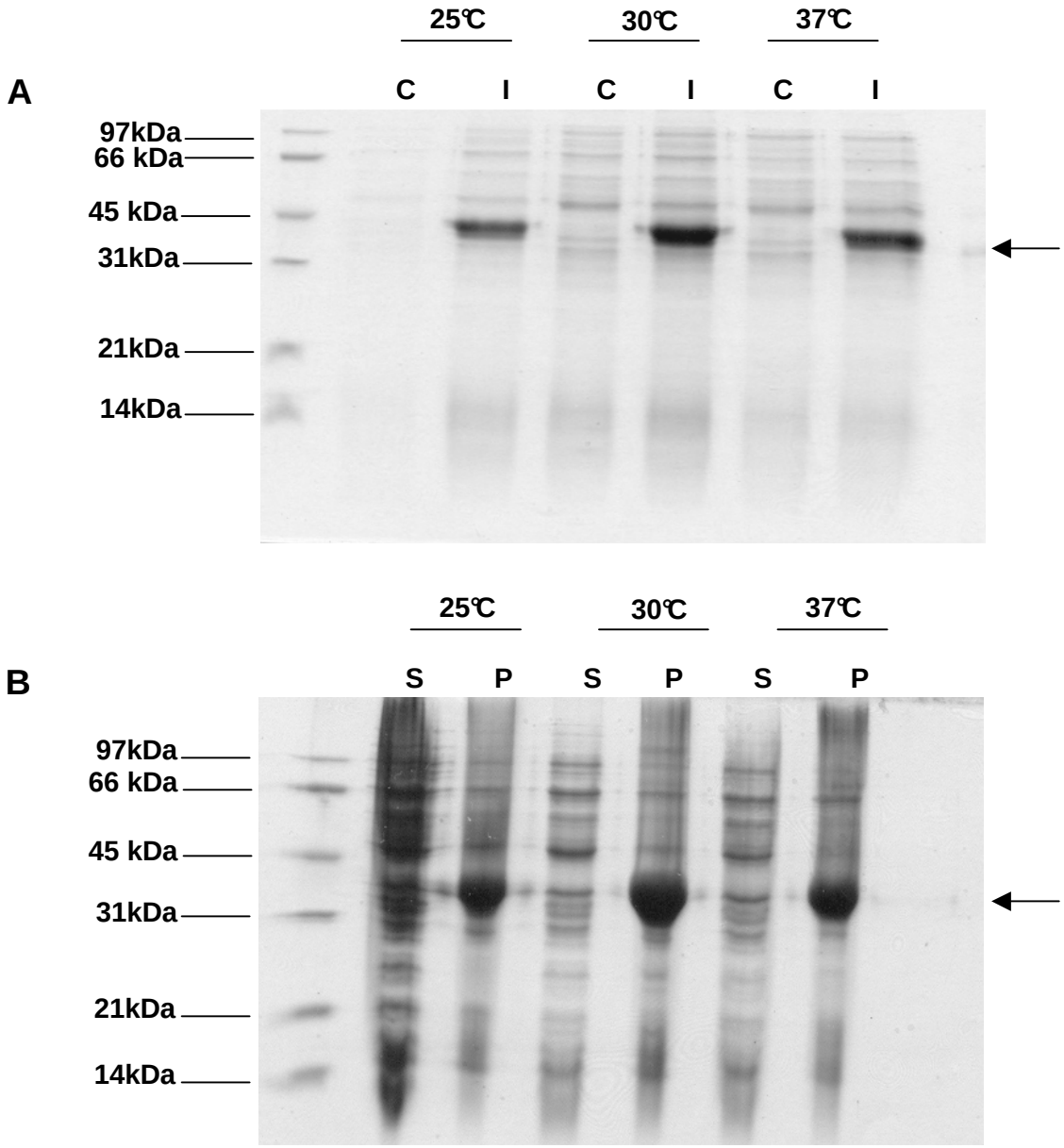


Figura 15. (A) Expressão de pCAL2 recombinante em BL21(DE3). A cultura de bactérias BL21(DE3) transformada com a construção pET28a-pCAL2, crescida a 37℃, por uma noite, foi diluída para DO_{600nm} = 0,1 a 25, 30 e 37℃. Após DO_{600nm} atingir 0,6, foi adicionado IPTG 1mM, seguindo-se incubação por 3 horas nas temperaturas indicadas. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) foram separadas em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com *Coomassie Blue*. A seta indica pCAL2 recombinante. **(B) Solubilidade de pCAL2 recombinante em diferentes temperaturas**. As bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado. O sobrenadante (fração solúvel) foi removido e o sedimento (corpos de inclusão) suspenso no mesmo tampão utilizado na lise das bactérias. A fração solúvel (S) e o sedimento (P) foram analisados em SDS-PAGE como em (A).

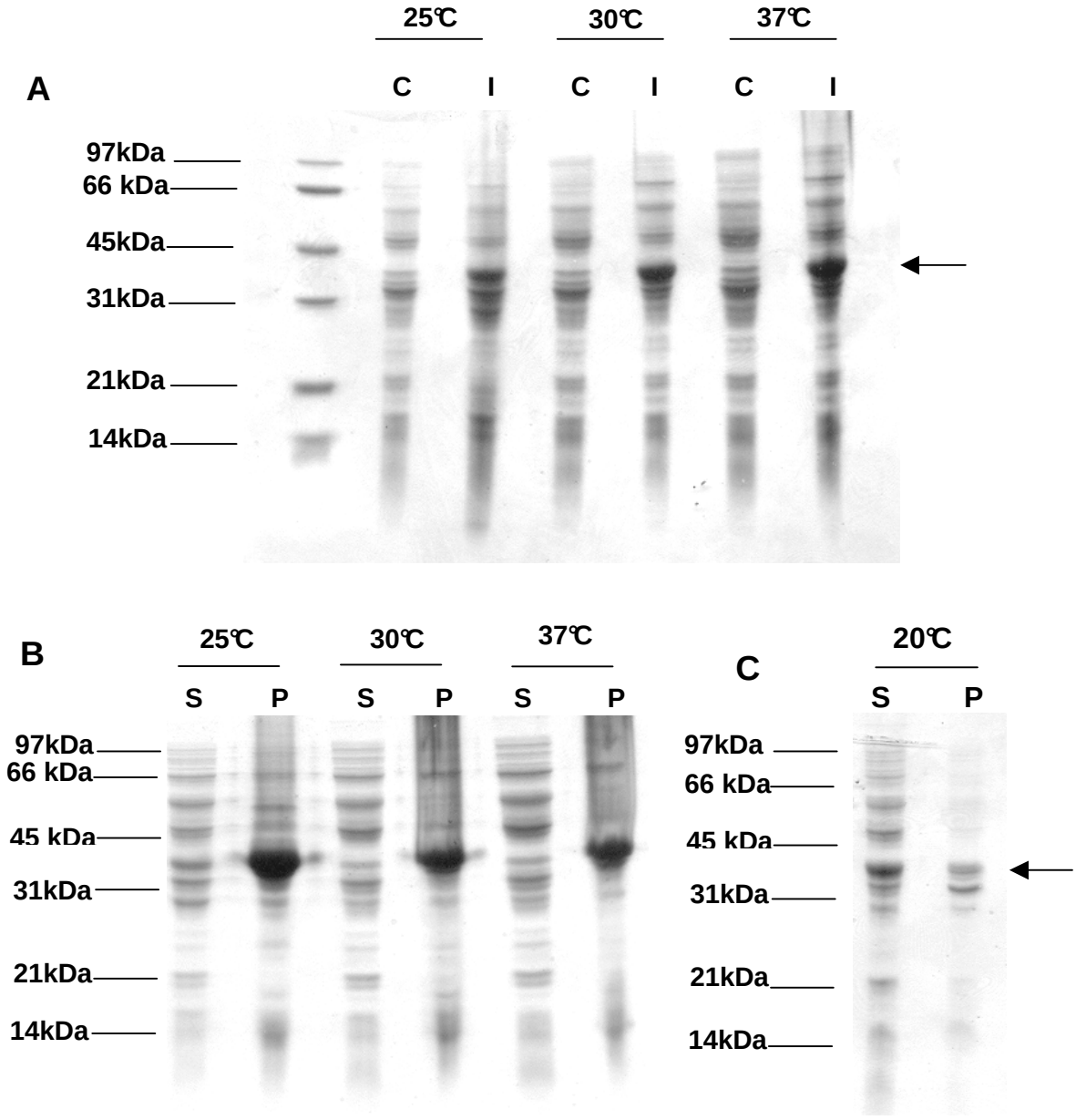


Figura 16. (A) Expressão de pCAL2 recombinante em OrigamiB(DE3). A cultura de bactérias OrigamiB(DE3), transformada com a construção pT7-7-pCAL2, crescida a 37℃, por uma noite, foi diluída para DO_{600nm} = 0,1 a 25, 30 e 37℃. Após DO_{600nm} atingir 0,6, foi adicionado IPTG 1mM, seguindo-se incubação por 3 horas nas temperaturas indicadas. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) foram separadas em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com *Coomassie Blue*. A seta indica pCAL2 recombinante. **(B) Solubilidade de pCAL2 recombinante em diferentes temperaturas**. As bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado. A fração solúvel (S) e o precipitado (P) foram analisados em SDS-PAGE como em (A). **(C) Solubilidade de pCAL recombinante a 20℃.** As bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado. A fração solúvel (S) e o precipitado (P) foram analisados em SDS-PAGE como em (A).

A figura 16B mostra um aumento da solubilidade com a redução da temperatura de indução. Nas temperaturas 30 e 37℃ a proteína recombinante encontra-se na fração insolúvel. Na temperatura de 25℃ embora a maior quantidade de proteína seja recuperada na fração insolúvel foi verificado uma pequena fração solúvel. A fração solúvel do extrato bacteriano da indução a 25℃ apresentou atividade sobre o substrato Z-FR-MCA. Com o objetivo de aumentar a fração de enzima recombinante solúvel, reduzimos a temperatura de indução para 20℃ por 20 horas. Como mostrado na figura 16C, ess e procedimento resultou em uma maior quantidade de pCAL2 recombinante solúvel em relação à indução a 25℃.

pCAL2 foi expressa na forma de pró-enzima inativa e a incubação em pH ácido leva a ativação do zimogênio com clivagem do pró-peptídeo. Alguns experimentos preliminares para determinação do pH e do tempo em que a ativação do zimogênio é máxima foram realizados e mostraram que a incubação em pHs ácidos leva a um aumento da atividade. Na figura 17A verificamos que a pré-incubação de 30 minutos leva a uma atividade ótima em pH 4,0 e não foi observada atividade em pH acima de 5,5. A figura 17B mostra que a pró-enzima foi ativada mais lentamente em pH 4,0. A pró-enzima foi ativada rapidamente com máximo em 5 minutos em pH 3,5, como mostra a figura 17C.

4.6. Clonagem da sequência codificadora de pCAL2 no vetor de expressão pAE *e* obtenção de pCAL2 recombinante

Para facilitar a purificação de pCAL2 por cromatografia de afinidade, o seu cDNA foi clonado no vetor de expressão pAE (Ramos *et al*., 2004).

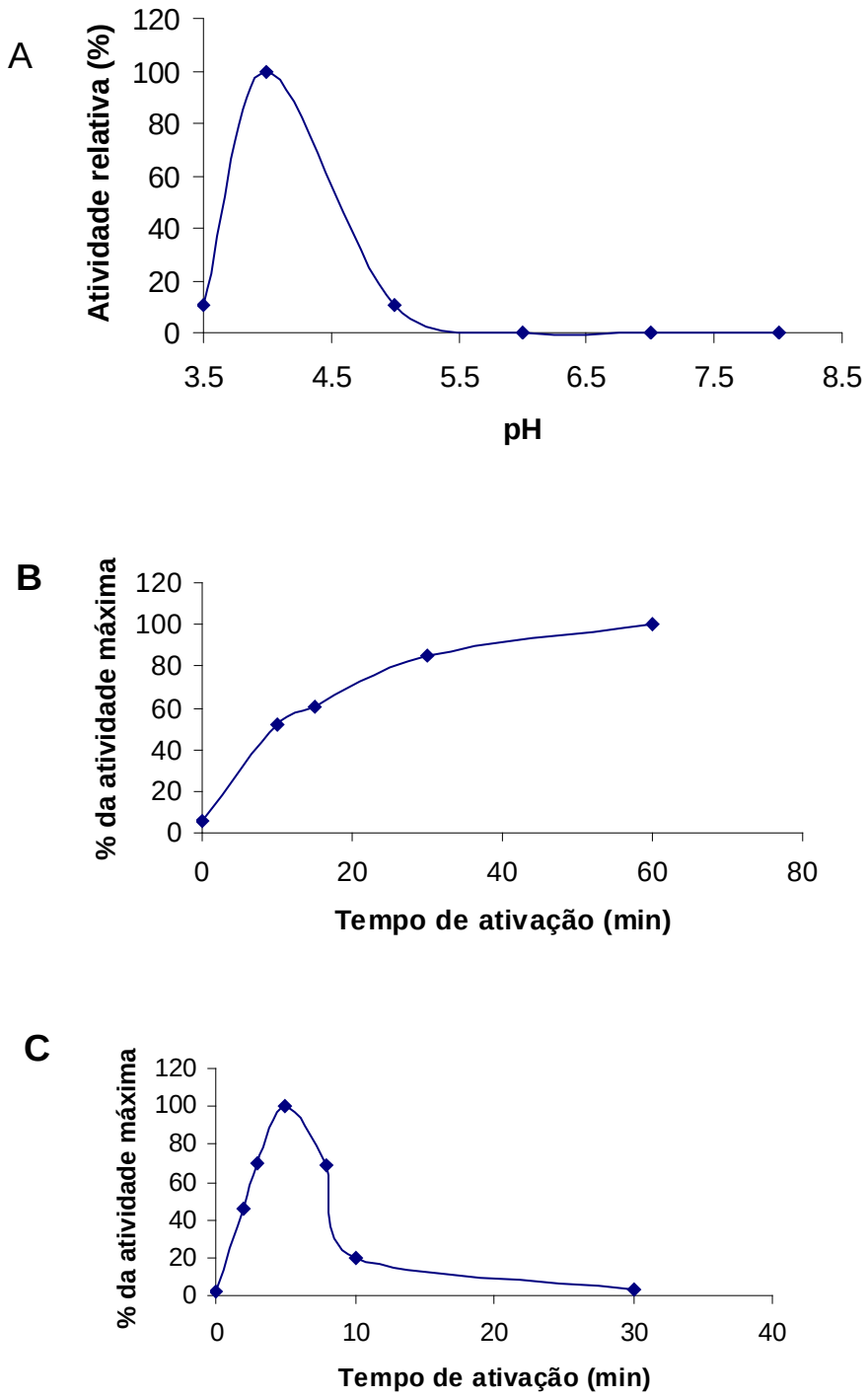


Figura 17. Ativação da pCAL2 recombinante de *T. molitor* pelo pH. (A) Efeito da pré-incubação de 30 minutos da fração solúvel do extrato bacteriano em diferentes pHs sobre a atividade de hidrólise de CAL2 utilizado como substrato Z-FR-MCA. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio 100mM pH 3,5-5,0 e fosfato de sódio 100mM pH 6,0-8,0. (B) Efeito de tempo de pré-incubação em pH 4,0 na ativação de pCAL2 recombinante. Após a incubação em pH ácido a enzima foi diluída em tampão citrato fosfato de sódio 100mM, pH 6,0 para interromper a reação de ativação e a atividade foi determinada utilizando o substrato Z-FR-MCA. (C) Efeito de tempo de pré-incubação em pH 3,5 na ativação de pCAL2 recombinante. O tempo de exposição ao pH ácido foi avaliado como em (A).

A clonagem de pCAL2 no vetor pAE está em fase na porção amino terminal com uma sequência do vetor que codifica para seis resíduos de histidina e para um espaçador de 4 aminoácidos. No processo de ativação do zimogênio a cauda de histidina é eliminada junto com o pró-peptídeo. A construção pAE-pCAL2 foi utilizada na transformação da OrigamiB(DE3) e foi feita uma indução a 37℃ (indução em pequena escala) para verificar se a proteína recombinante estava sendo expressa. De forma semelhante às induções anteriores, foi verificada a indução do polipeptídeo de ~35kDa (dados não mostrados).

Para obtenção da proteína recombinante na fração solúvel foi testado a indução a 25℃ por 3 horas e 15 horas (dados não mostrados) e a 20℃ por 20 horas (figura 18A). A maior quantidade de proteína solúvel foi obtida na indução a 20℃ por 20 horas (figura 18B). Como controle negativo das induções foi utilizada bactéria OrigamiB(DE3) transformada com o vetor pAE sem o inserto (dados não mostrados).

4.7. Purificação e ativação de pCAL2 recombinante

A fração solúvel de lisados bacterianos obtidos de culturas induzidas a 20℃ por 20 horas (figura 19, canaleta 1) foi submetida à cromatografia de afinidade em resina Ni^{+2}-NTA agarose. Foram feitas 5 lavagens (figura 19, canaletas 3 a 7) e a eluição do material adsorvido à resina foi realizada com concentrações crescentes de imidazol (figura 19, canaletas 8 a 13). A proteína começou a ser eluída com 25mM de imidazol e continuou a ser eluída em todas as concentrações de imidazol testadas. Todas as frações tiveram atividade sobre o substrato fluorogênico Z-FR-MCA. Assim, para experimentos posteriores resolvemos adotar um protocolo em que a proteína é eluída diretamente com 300mM de imidazol.

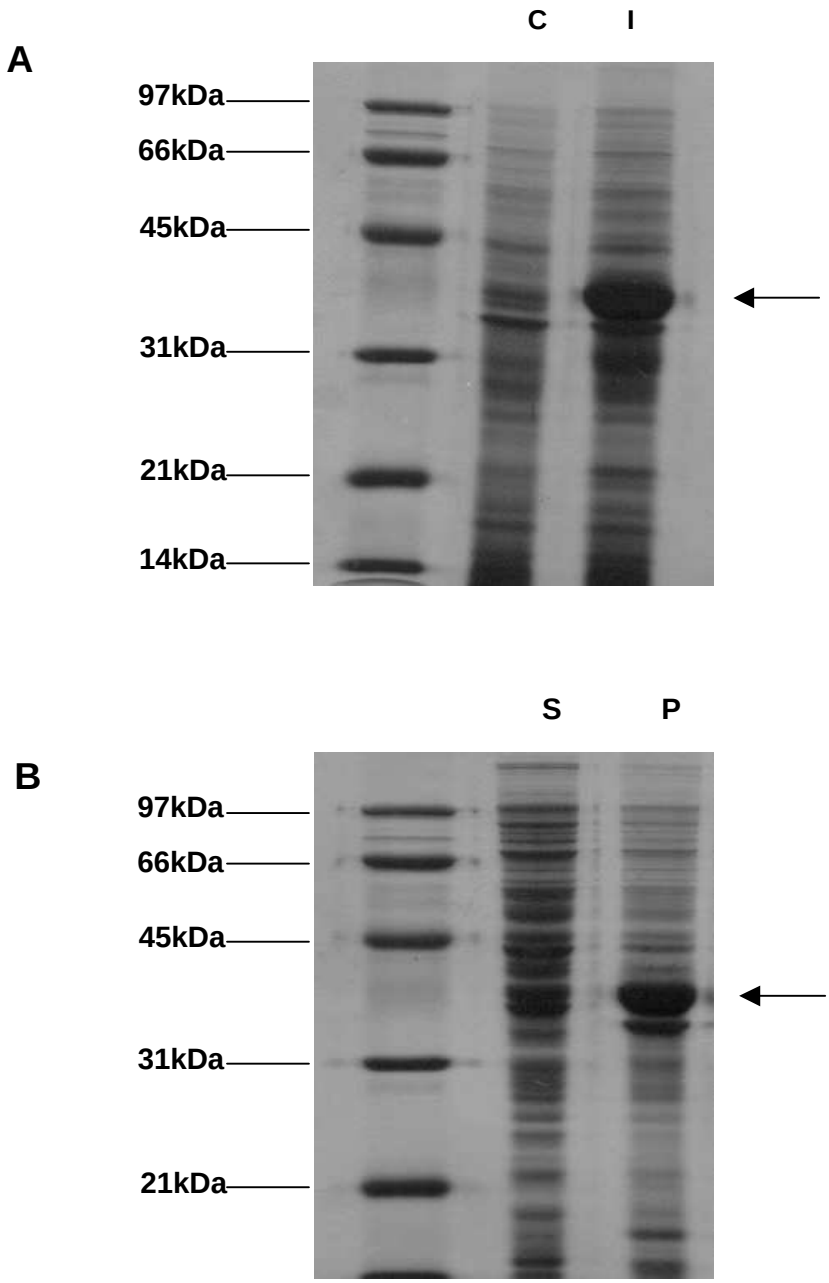


Figura 18. (A) Expressão de pCAL2 recombinante. Na expressão, a cultura de bactérias OrigamiB(DE3), transformada com a construção pAE-pCAL2, crescida a 37℃, por uma noite, foi diluída para DO_{600nm}=0,1 a 20℃. Após DO_{600nm} atingir 0,6, foi adicionado IPTG 1mM, seguindo-se incubação por 20 horas a 20℃. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) foram separadas em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com *Coomassie Blue*. A seta indica pCAL2 recombinante. **(B) Solubilidade de pCAL2 recombinante**. As bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado. A fração solúvel (S) e o precipitado (P) foram analisados em SDS-PAGE como em (A).

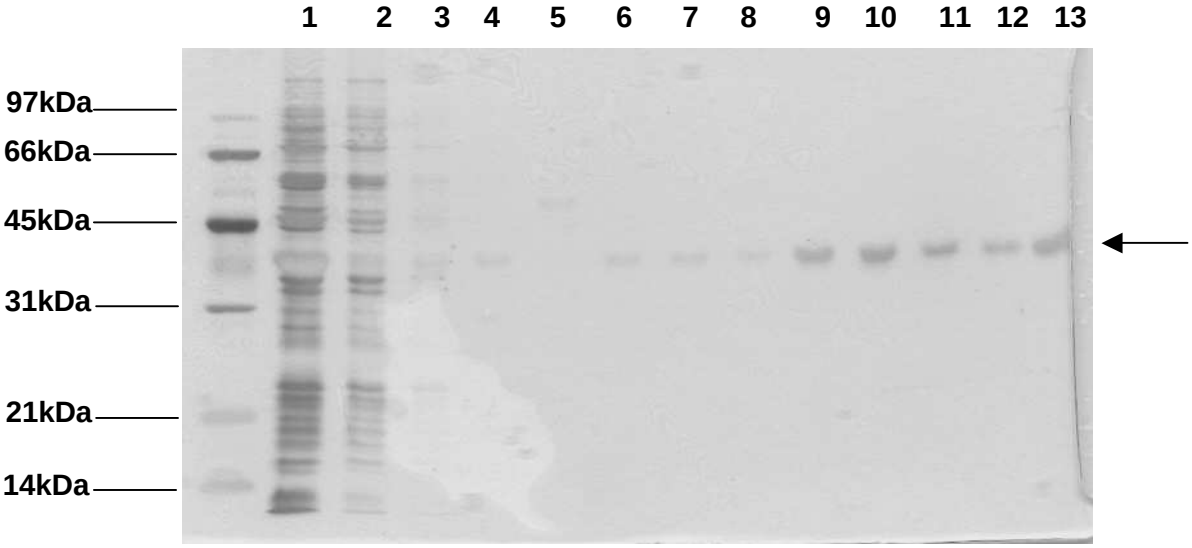


Figura 19. Purificação de pCAL2 recombinante por cromatografia de afinidade. A fração solúvel do lisado bacteriano (canaleta 1) foi incubada com a resina Ni^{+2}-NTA agarose por 1 hora a 4℃. A canaleta 2 mostra a fração não adsorvida a resina. A resina foi lavada com o mesmo tampão utilizado na lise das bactérias (canaletas 3 a 7). As eluições foram feitas com 25, 50, 75, 100, 150 e 300mM de imidazol (canaletas 8 a 13). A seta indica pCAL2 recombinante. As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 12% corado com prata.

As cisteína proteinases são expressas como pró-enzimas proteoliticamente inativas e a ativação ocorre através da clivagem proteolítica do pró-peptídeo. O pró-peptídeo pode ser removido autocataliticamente por incubação em pH ácido. pCAL2 foi expressa na forma de pró-enzima inativa e a incubação em pH ácido levou a ativação do zimogênio com clivagem do pró-peptídeo. A figura 20 mostra que a incubação em pH 4,0 levou a uma rápida ativação com atividade máxima em 10 minutos. A figura 21 mostra que a ativação resultou numa banda de ~31,6kDa. Esta massa molecular é semelhante àquela observada para CAL2 purificada a partir do conteúdo intestinal de *T. molitor* (Cristofoletti *et al*., 2005). Como o processamento autocatalítico de pCAL2 para formar a enzima madura CAL2 resultou em elevada autólise, não foi possível submeter CAL2 a seqüenciamento N-terminal.

4.8. Expressão de pCAL3 em bactérias

Para demonstrar que o cDNA de pCAL3 codifica uma proteína funcional, nós expressamos pCAL3 em bactéria para verificar suas propriedades bioquímicas. A clonagem de pCAL3 no vetor de expressão pAE está em fase na extremidade amino terminal com uma sequência do vetor que codifica seis resíduos de histidina e um espaçador de 10 aminoácidos.

A construção pAE-pCAL3 foi utilizada na transformação da cepa OrigamiB(DE3) e o nível de expressão foi avaliado após indução a 25 e 37℃ por 3 horas, a 25℃ por 15 horas (dados não mostrados) e a 20℃ por 20 horas (figura 22A). Como controle negativo das induções foi utilizada bactéria OrigamiB(DE3) transformada com o vetor pAE sem o inserto (dados não mostrados). A proteína recombinante foi induzida e migra com massa molecular de ~48kDa em SDS-PAGE, como mostra a figura 22A.

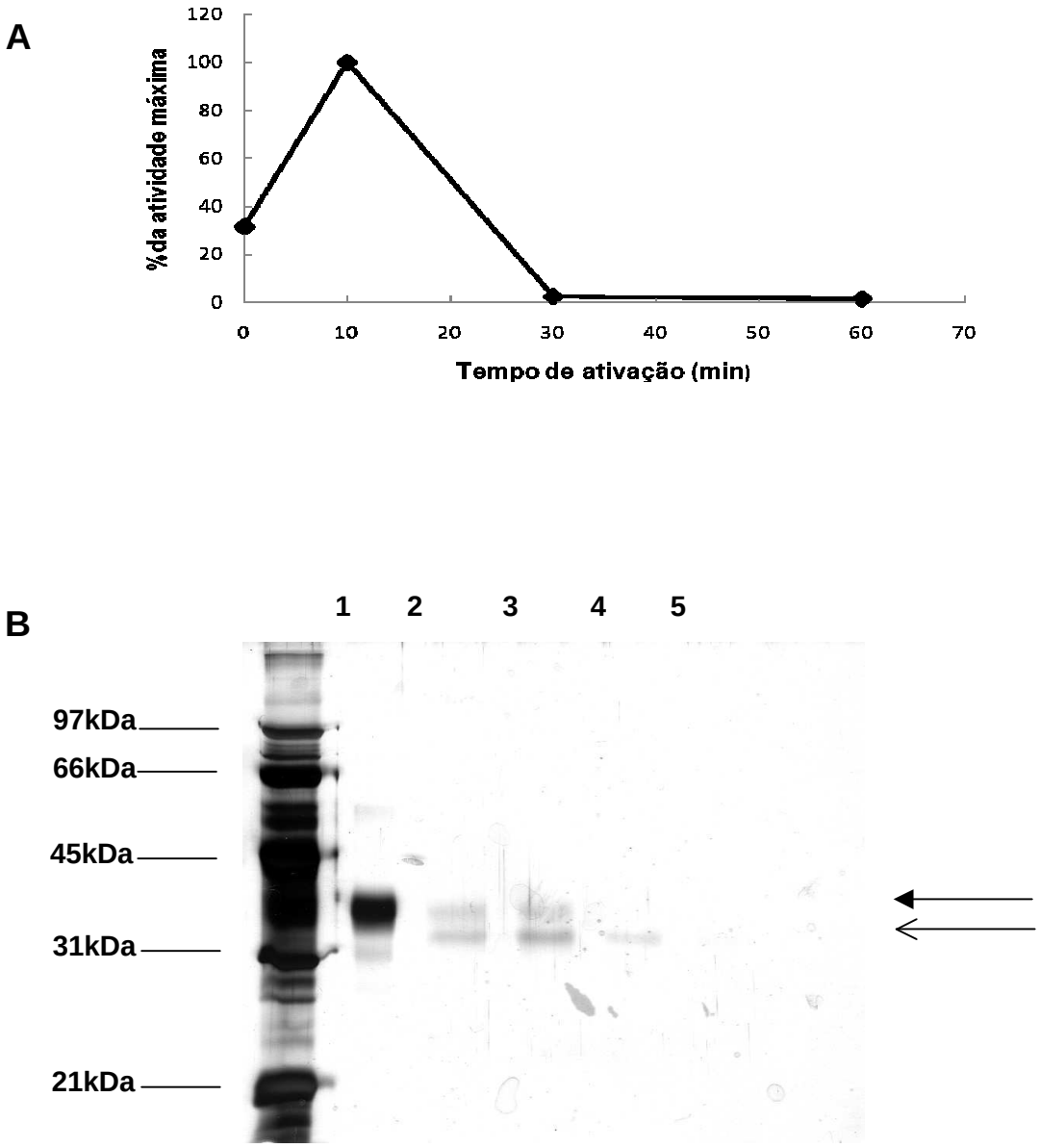


Figura 20. Ativação da pCAL2 recombinante de *T. molitor* pelo pH. (A) pCAL2 recombinante purificada foi incubada a 37℃ em tampão acetato de sódio 100mM pH 4,0 nos tempos 0, 10, 30 e 60 minutos. A atividade foi monitorada através de ensaios utilizando o substrato Z-FR-MCA . Os resultados estão expressos em função da maior atividade. **(B)** As amostras correspondentes aos tempos citados acima foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% corado com prata (canaletas 2-5). A canaleta 1 corresponde a pCAL2 purificada. As setas cheias e vazias indicam respectivamente pCAL2 e CAL2.

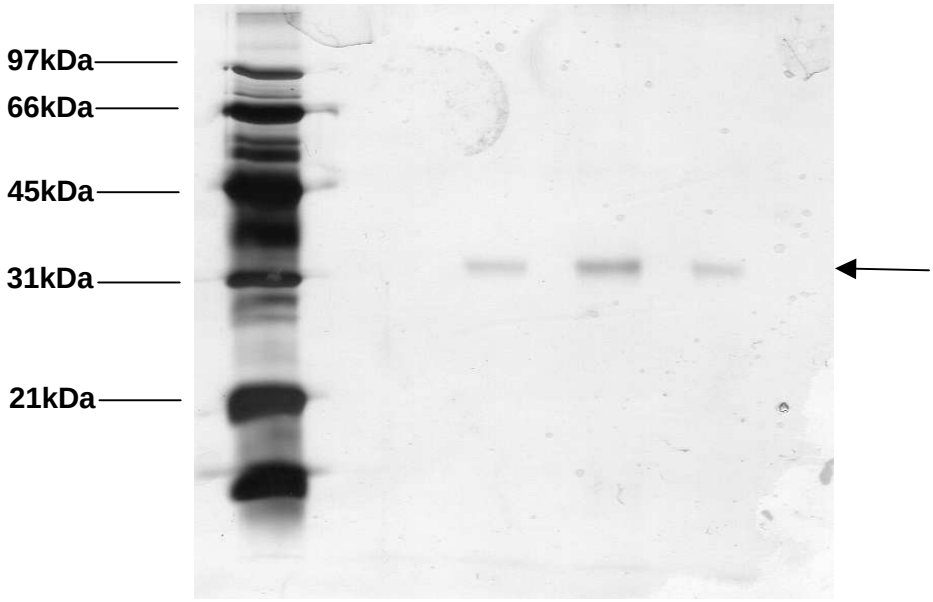


Figura 21. Ativação de pCAL2 em pH4,0. pCAL2 recombinante purificada foi incubada em tampão acetato de sódio 100mM por 30 minutos a 37℃. As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 12%. A seta indica o polipeptídeo de ~31,6kDa correspondente à CAL2 madura. O gel foi corado com prata.

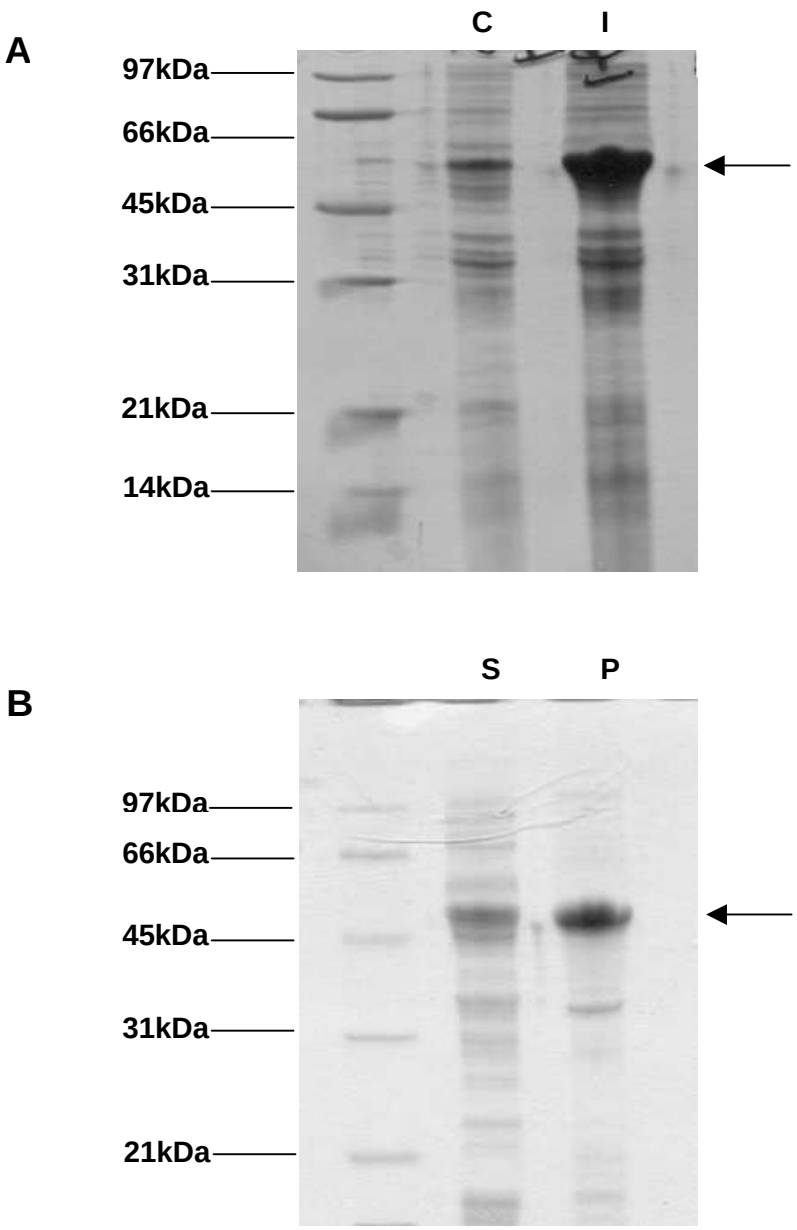


Figura 22. (A) Expressão de pCAL3 recombinante. Na expressão, a cultura de bactérias OrigamiB(DE3), transformada com a construção pAE-pCAL3, crescida a 37℃, por uma noite, foi diluída para DO_{600nm}=0,1 a 20℃. Após DO_{600nm} atingir 0,6, foi adicionado IPTG 1mM, seguindo-se incubação por 20 horas a 20℃. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) foram separadas em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com *Coomassie Blue*. A seta indica pCAL3 recombinante. **(B) Solubilidade de pCAL3 recombinante**. As bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado. A fração solúvel (S) e o precipitado (P) foram analisados em SDS-PAGE como em (A).

Esta massa não está de acordo com a calculada a partir da sequência de aminoácidos (~35kDa). A migração anômala em SDS-PAGE já foi descrita para outras pró-catepsinas L e catepsinas L. A massa molecular da pró-catepsina L de humano calculada a partir da sua sequência é 35,8kDa, mas esta proteína migra com uma massa molecular de 39kDa em SDS-PAGE. O mesmo ocorre com a catepsina L de humano que migra em SDS-PAGE com uma massa molecular de 30kDa, mas a massa calculada a partir da sua sequência é de 24,2kDa (Ménard *et al*., 1998).

A indução a 20℃ por 20 horas resultou numa fração significativamente maior de pCAL3 solúvel. Na figura 22B temos a distribuição da proteína recombinante entre o precipitado (proteína em corpos de inclusão) e o sobrenadante (proteína solúvel).

4.9. Purificação e ativação de pCAL3 recombinante

Optamos por purificar pCAL3 recombinante a partir de culturas induzidas com IPTG 1mM a 20℃ por 20 horas. A fração solúvel do lisado bacteriano (canaleta 1) foi submetida à cromatografia em Ni^{+2}-NTA agarose, uma vez que pCAL3 recombinante possui seis resíduos de histidina na sua porção N-terminal. A eluição foi realizada em diferentes concentrações de imidazol. A figura 23 mostra que a proteína começou a ser eluída com 25mM de imidazol e continuou a ser eluída até a concentração 150mM de imidazol. Todas as frações tiveram atividade sobre o substrato Z-FR-MCA. Assim, para experimentos posteriores resolvemos adotar um protocolo em que a proteína é eluída diretamente com 150mM de imidazol.

pCAL3 foi expressa na forma de pró-enzima inativa e a incubação em pH ácido leva a ativação com a formação da enzima madura.

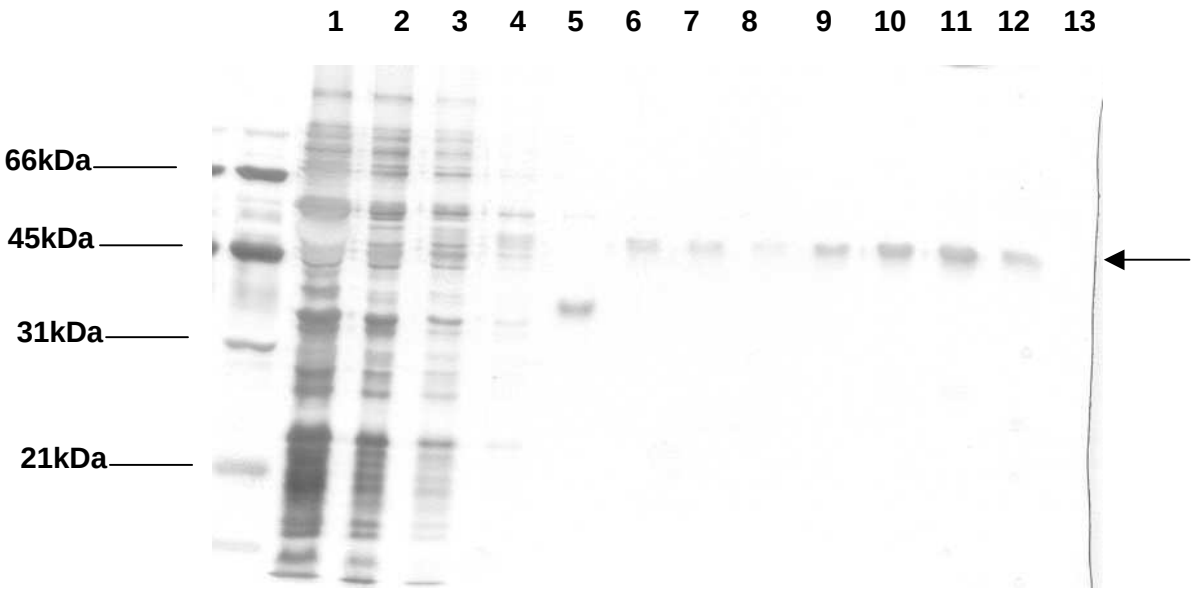


Figura 23. Purificação de pCAL3 recombinante por cromatografia de afinidade. A fração solúvel do lisado bacteriano (canaleta 1) foi incubada com a resina Ni^{+2}-NTA agarose por 1 hora a 4℃. A canaleta 2 mostra a fração não adsorvida a resina. A resina foi lavada com o mesmo tampão utilizado na lise das bactérias (canaletas 3 a 7). As eluições foram feitas com 25, 50, 75, 100, 150 e 300mM de imidazol (canaletas 8 a 13). A seta indica pCAL3 recombinante. As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 12% corado com prata.

Nas tentativas iniciais de ativação de pCAL3 observamos elevada autólise da proteína recombinante. Entre as condições de processamento testadas podemos citar a ativação em tampão acetato de sódio 100mM pH 4,0 contendo 5mM de cisteína e 2mM de EDTA a 30 ou 37℃, com elevada au tólise e em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 5mM de cisteína e 2mM de EDTA a 30 ou 37℃ com menos autólise. A figura 24 mostra a ativação da pCAL3 recombinante purificada em tampão citrato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA a 37℃. A ativação resultou na formação de uma banda de ~38kDa sem autólise. Tendo em vista este resultado optamos por adotar a ativação de pCAL3 recombinante purificada em tampão citrato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA com protocolo padrão para obtenção de CAL3 recombinante madura. Esta condição de ativação é uma adaptação do protocolo sugerido por Kramer *et al*. (2007). É interessante notar que esta é a mesma condição utilizada na ativação da pró-catepsina L de *Fasciola hepatica*, exceto a concentração de EDTA que era 2,5mM (Collins *et al*., 2004).

A massa molecular da CAL3 madura obtida (~38kDa) não está de acordo com a calculada a partir da sequência de aminoácidos da enzima madura (~24kDa). Como discutido acima, migração anômala em SDS-PAGE já foi descrita para outras pró-catepsinas L e catepsinas L. É bastante interessante notar que o grupo de Vinokurov identificou a presença de atividade de cisteína proteinase com aproximadamente 38kDa em *Tenebrio molitor* (Vinokurov *et al*., 2006).

Alguns relatos da literatura mostram que durante a ativação *in vitro* de pró-catepsinas L recombinantes, através da clivagem do pró-peptídeo, resulta numa enzima madura com aminoácidos adicionais na porção amino terminal, sugerindo

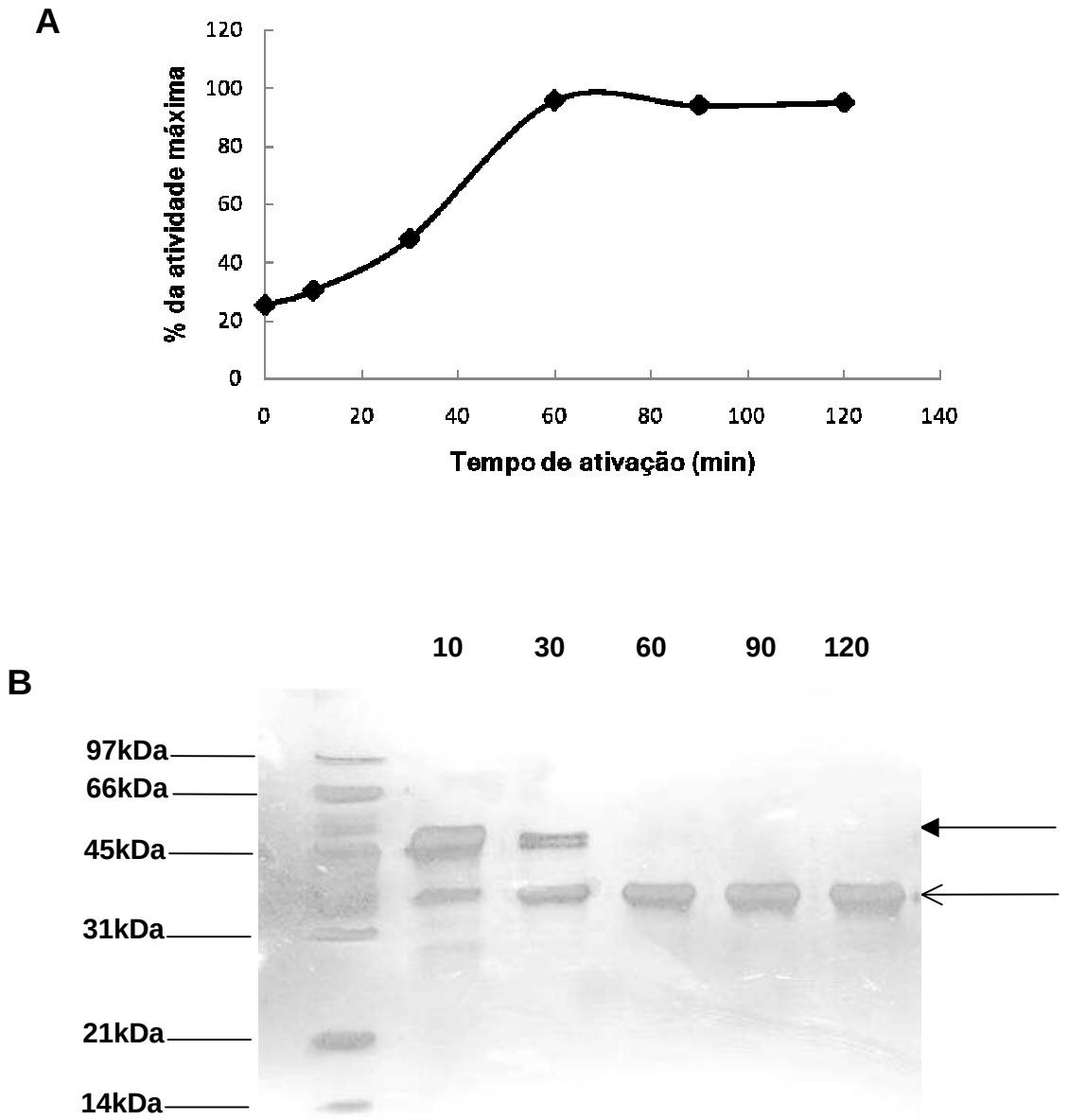


Figura 24. Processamento autocatalítico de pCAL3 a pH 5,0. (A) pCAL3 recombinante purificada foi incubada a 37℃ em tampão citrato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA nos tempos 0, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos. A atividade foi monitorada através de ensaios utilizando o substrato Z-FR-MCA. Os resultados estão expressos em função da maior atividade. **(B)** As amostras correspondentes aos tempos 10, 30, 60, 90 e 120 minutos foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% corado com prata. As setas cheias e vazias indicam respectivamente pCAL3 e CAL3.

que *in vivo* existam outras proteases responsáveis pela remoção destes aminoácidos (Turk *et al*., 2000).

Assim, submetemos a CAL3 madura ativada *in vitro* a seqüenciamento N-terminal. A sequência de aminoácido obtida foi: SKKPLAASVD. O seqüenciamento N-terminal da CAL3 mostrou que a clivagem ocorreu 2 aminoácidos antes do N-terminal da CAL3 madura, ou seja, o processamento autocatalítico de pCAL3 *in vitro* resultou numa enzima madura com 2 aminoácidos do pró-peptídeo.

4.10. Determinação do pH ótimo e estudos cinéticos de CAL2 e CAL3

Para determinação de pH ótimo e K_m , utilizamos CAL2 recombinante ativada (item 4.7) e CAL3 recombinante ativada (item 4.9). Para verificar o efeito do pH sobre a atividade de CAL2 recombinante de *T. molitor* ensaiamos a atividade sobre o substrato Z-FR-MCA em tampão acetato de sódio 100mM (pH 3,0-6,0) e tampão Tris-HCl 100mM (pH 6,0-9,0) a 30℃. Como pode ser visto na figura 25, a enzima apresentou atividade máxima em pH 6,0.

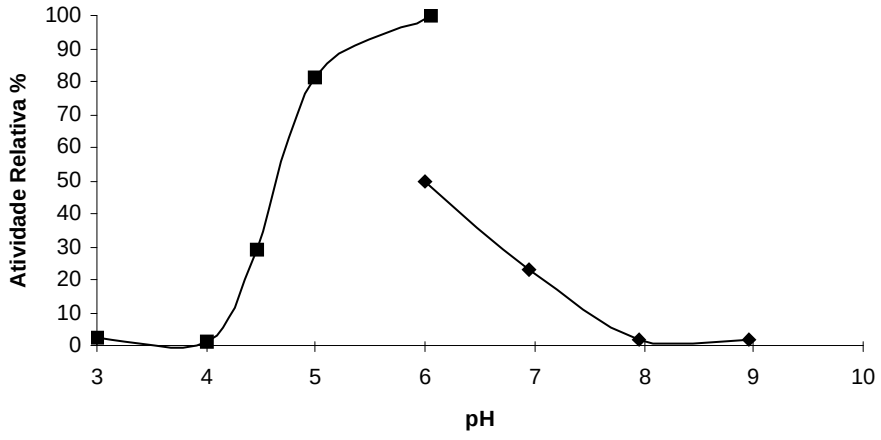


Figura 25. Efeito do pH na atividade de CAL2. CAL2 recombinante foi incubada em tampão acetato de sódio 100mM (■) e tampão Tris-HCl 100mM (♦), ambos contendo 3mM de cisteína e 3mM de EDTA. Os ensaios foram realizados utilizando o substrato Z-FR-MCA. Os resultados estão expressos em função da maior atividade.

Isso é condizente com os valores de pHs ótimos obtidos para CAL purificada a partir do conteúdo intestinal que exibe o pH ótimo de 6,0 ±0,4 com o substrato B-R-NA e 6,6 ± 0,7 com o substrato ACLB-Cys-MCA (Cristofoletti *et al*., 2005). Através da identificação da sequência N-terminal da CAL isolada do conteúdo intestinal foi mostrado que a sequência obtida corresponde a CAL2 (Cristofoletti *et al*., 2005). A atividade detectada no tampão acetato pH 6,0 foi maior que a detectada no tampão Tris-HCl pH 6,0. O uso do tampão acetato de sódio é comum em ensaios de atividade de catepsina L. Como mostra a tabela 1, CAL2 exibiu um K_m de 9,6 ± 1,3 µM. Este valor de K_m é condizente com o valor obtido para CAL2 purificada de *T. molitor* (8±1µM). Diferentemente de CAL2 purificada de *T. molitor*, CAL2 recombinante não foi capaz de hidrolisar o substrato Z-RR-MCA (carbobenzoxi-Arg-Arg-MCA) (tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de CAL2 e CAL3 sobre a hidrólise de substratos peptidil-MCA

Enzima	Substrato	K_m (µM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)
CAL2	Z-FR-MCA	9,6 ± 1,3	8,4 x10^5	8,75 x 10^4
	Z-RR-MCA	NH[1]	NH[1]	NH[1]
CAL3	Z-FR-MCA	16,4 ± 2,0	4,0 x 10^6	2,4 x 10^5
	Z-RR-MCA	20,9 ± 1,8	2,4 x10^3	1,2 x 10^2

[1] não ocorreu hidrólise
Os valores de V_{max} e K_m foram ajustados utilizando-se o programa Enziffiter

Para verificar o efeito do pH sobre a atividade de CAL3 recombinante de *T. molitor* foi ensaiada a atividade sobre o substrato Z-FR-MCA em tampão citrato fosfato de sódio 50mM e tampão Tris-HCl 50mM a 30℃ , ambos contendo 3mM de cisteína e 3mM de EDTA. A figura 26 mostra que a enzima apresentou atividade

máxima em pH 7,0. Isso é condizente com os valores de pHs ótimos obtidos para CAL purificada a partir do conteúdo intestinal que exibe o pH ótimo de 6,0 ±0,4 com o substrato B-R-NA e 6,6 ± 0,7 com o substrato ACLB-Cys-MCA (Cristofoletti *et al*., 2005).

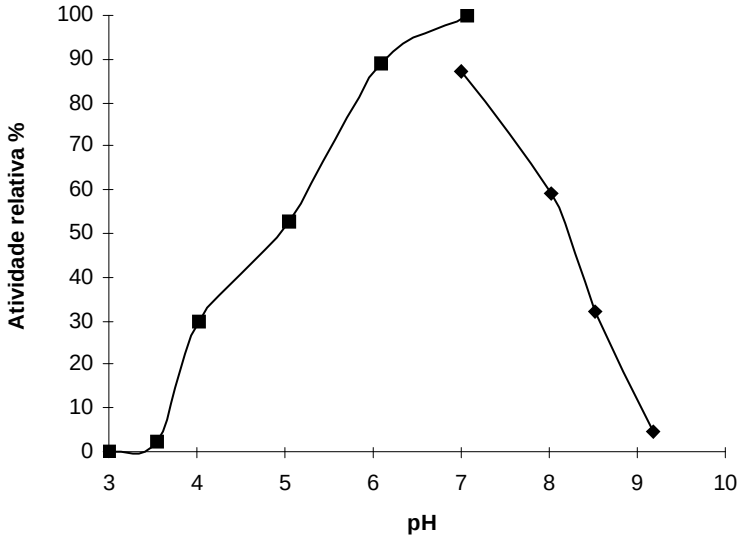


Figura 26. Efeito do pH na atividade de CAL3. CAL3 recombinante foi incubada em tampão acetato de sódio 100mM (■) e tampão Tris-HCl 100mM (♦), ambos contendo 3mM de cisteína e 3mM de EDTA. Os ensaios foram realizados utilizando o substrato Z-FR-MCA. Os resultados estão expressos em função da maior atividade.

CAL3 foi capaz de hidrolisar os substratos Z-FR-MCA e Z-RR-MCA. CAL3 exibiu um K_m de 16,4 ± 2,0μM sobre o substrato Z-FR-MCA e K_m de 20,9 ± 1,8μM sobre Z-RR-MCA como substrato. A CAL isolada do conteúdo intestinal é capaz de hidrolisar ambos os substratos acima com um K_m de 8 ± 1μM sobre o substrato Z-FR-MCA e K_m de 8 ± 1μM com o substrato Z-RR-MCA (Cristofoletti *et al*., 2005). Estudos com duas catepsinas L recombinantes purificadas de *Diabrotica virgifera* mostraram que uma das enzimas é capaz de hidrolisar apenas Z-FR-MCA com K_m de $3,4x10^{-5}$M enquanto a outra enzima é capaz de hidrolisar Z-FR-MCA com K_m de

$1,6x10^{-5}$M e Z-RR-MCA com K_m de $3,7x10^{-5}$M (Bown *et al*., 2004). Estes resultados sugerem que o conteúdo intestinal de *T. molitor* pode conter CAL2 e CAL3.

Entre diversos valores de K_m para o substrato Z-FR-MCA descritos para cisteína proteinases podemos citar os determinados para catepsina L recombinante humana (Smith & Gottesman, 1989), catepsina K recombinante humana (Lecaille *et al*., 2002b), cruzaína nativa de *T. cruzi* (Eakin *et al*., 1992), cruzaína recombinante de *T. cruzi* (Eakin *et al*., 1992), catepsina L de *Boophilus microplus* (Renard *et al*., 2000) e catepsinas L1 e L2 recombinantes de *Fasciola hepatica* (Stack *et al*., 2008) que são respectivamente 1,1, 7,4, 10, 0,96, 18,8, 24,18 e 39,94µM. Os valores de K_m determinados para CAL2 e CAL3 sobre Z-FR-MCA se inserem nesta faixa. Entre os valores de K_m descritos para Z-RR-MCA podemos mencionar para catepsina L recombinante humana (Lecaille *et al*., 2002b), catepsina K (Lecaille *et al*., 2002b) e catepsina L de *Boophilus microplus* (Renard *et al*., 2000) que são respectivamente 40, 25 e 23,6µM. O valor de K_m determinado para CAL3 sobre Z-RR-MCA se insere nesta faixa.

Os valores de constante catalítica (K_{cat}) de CAL2 e CAL3 sobre Z-FR-MCA e Z-RR-MCA são maiores se comparados aos valores de K_{cat} obtidos com a CAL isolada do conteúdo intestinal de *T. molitor* utilizando os mesmos substratos (K_{cat}=49 para o substrato Z-FR-MCA e K_{cat}=28 para o substrato Z-RR-MCA) (Cristofoletti *et al*., 2005). Uma possível explicação para um K_{cat} menor para a CAL purificada de conteúdo seria porque a amostra purificada se encontra degradada. Este fato pode ocorrer devido à dificuldade de purificar cisteína proteinases. É importante ressaltar que a concentração utilizada no cálculo do K_{cat} para CAL2 foi a da pró-enzima devido à instabilidade da enzima madura.

É interessante notar que os valores de K_{cat} obtidos para CAL2 e CAL3 utilizando os substratos Z-FR-MCA e Z-RR-MCA são maiores se comparados aos valores descritos na literatura. Os valores de K_{cat} para o substrato Z-FR-MCA descritos para as enzimas citadas acima são respectivamente 39, 0,73, 3,1, 4,49, 11,18 x 10^2, 24,69 e 1,7s^{-1}. Os valores de K_{cat} para o substrato Z-RR-MCA descritos para as enzimas citadas acima são respectivamente 0,07, 0,0025 e 15,5s^{-1}. No entanto, não existem dados de K_{cat} de enzimas digestivas recombinantes disponíveis na literatura para podermos comparar com as nossas enzimas recombinantes digestivas.

4.11. Obtenção de anticorpos policlonais anti-pCAL2

Na obtenção de anticorpos anti-pCAL2 foram utilizados dois coelhos imunizados com ~1,2mg (4 imunizações de 300µg) de pCAL2 recombinante purificada. Como pode ser mostrado na figura 27A, o anticorpo anti-pCAL2 produzido mostrou-se reativo contra pCAL2 recombinante. A figura 27A mostra que o anticorpo anti-pCAL2 produzido se mostrou também reativo contra pCAL3 recombinante (canaleta 3). O anticorpo anti-pCAL1 (Cristofoletti *et al*., 2005) não reconheceu pCAL2 recombinante e nem pCAL3 recombinante (dados não mostrados).

Para testar a especificidade do anticorpo produzido, o homogeneizado do ventrículo anterior mais o ventrículo médio do intestino médio de larvas de *T. molitor* foi submetido à separação eletroforética em gel SDS-PAGE 12%. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo.

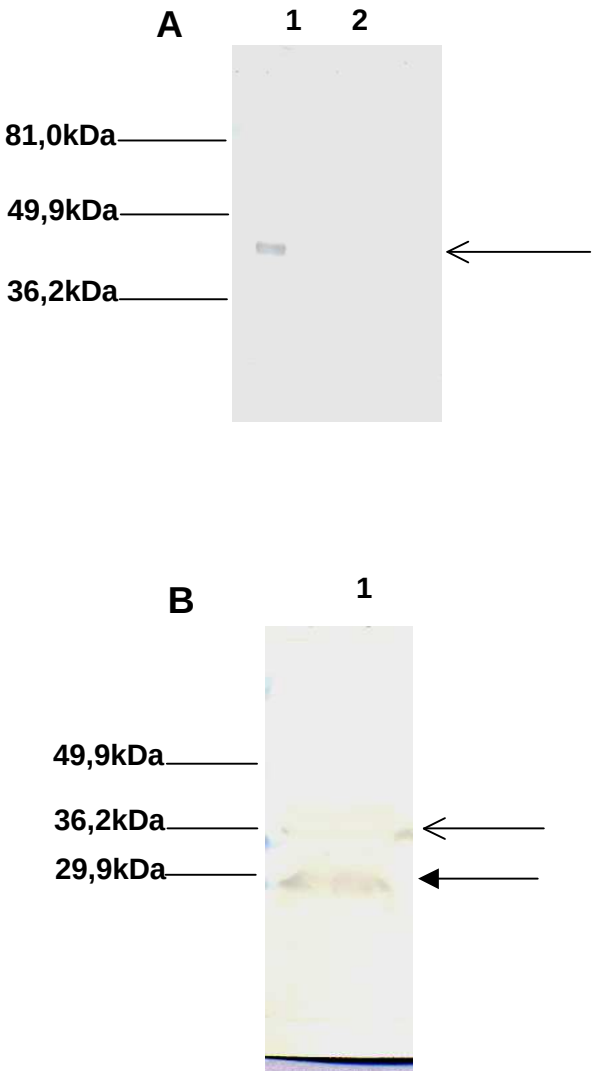


Figura 27. Obtenção dos anticorpos anti-pCAL2. Amostras de homogeneizado do ventrículo anterior mais o ventrículo médio do intestino médio (VA + VM) de larvas de *T. molitor* e amostras de pCAL2 recombinante purificada e pCAL3 recombinante purificada foram submetidas à análise por *immunoblots* para detecção de CAL2 e pCAL2. **(A)** pCAL2 recombinante purificada (canaleta 1) e pCAL3 recombinante purificada (canaleta 2) foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-pCAL2 (1:200). **(B)** Amostra de homogeneizado (VA + VM) foi incubada com o anticorpo policlonal anti-pCAL2 produzido (1:200). As setas cheias e vazias indicam respectivamente CAL2 e pCAL2. O reconhecimento das proteínas pelo anticorpo foi feito com TBS1X contendo 0,15% de água oxigenada e 1% de cloro-naftol previamente dissolvido em metanol.

A figura 27B mostra que o anticorpo anti-pCAL2 reconhece especificamente uma banda de ~31kDa correspondente a CAL2 madura e com menor intensidade uma banda de ~35kDa correspondente a pró-enzima.

4.12. Obtenção de anticorpos policlonais anti-pCAL3

Na obtenção de anticorpos anti-pCAL3 foram utilizados dois coelhos imunizados com ~900µg (3 imunizações de 300µg) de pCAL3 recombinante purificada. Para testar a especificidade do anticorpo produzido, o homogeneizado do ventrículo anterior mais o ventrículo médio do intestino médio de larvas de *T. molitor* foi submetido à separação eletroforética em gel SDS-PAGE 12%. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo.

A figura 28 mostra que o anticorpo anti-pCAL3 reconheceu bandas de dois tamanhos nas amostras de homogeneizado de *T. molitor*, sendo uma delas do tamanho esperado de acordo com a CAL3 recombinante madura obtida a partir de pCAL3 recombinante (~38kDa) e outra de tamanho maior (~39kDa). Estes dados sugerem que o polipeptídeo de ~39kDa possa ser CAL3 glicosilada, uma vez que a sequência de pCAL3 apresenta sítios de glicosilação. Assim, a glicosilação pode explicar o polipeptídeo com massa molecular maior em SDS-PAGE. O polipeptídeo de massa molecular maior também pode representar uma isoforma da catepsina L 3. A figura 28 mostra também que o anticorpo anti-pCAL3 produzido se mostrou reativo contra CAL3 recombinante madura purificada (canaleta 2) e pCAL3 recombinante purificada (canaleta 3). CAL3 recombinante madura foi obtida a partir de pCAL3 recombinante purificada como descrito no item 4.9.

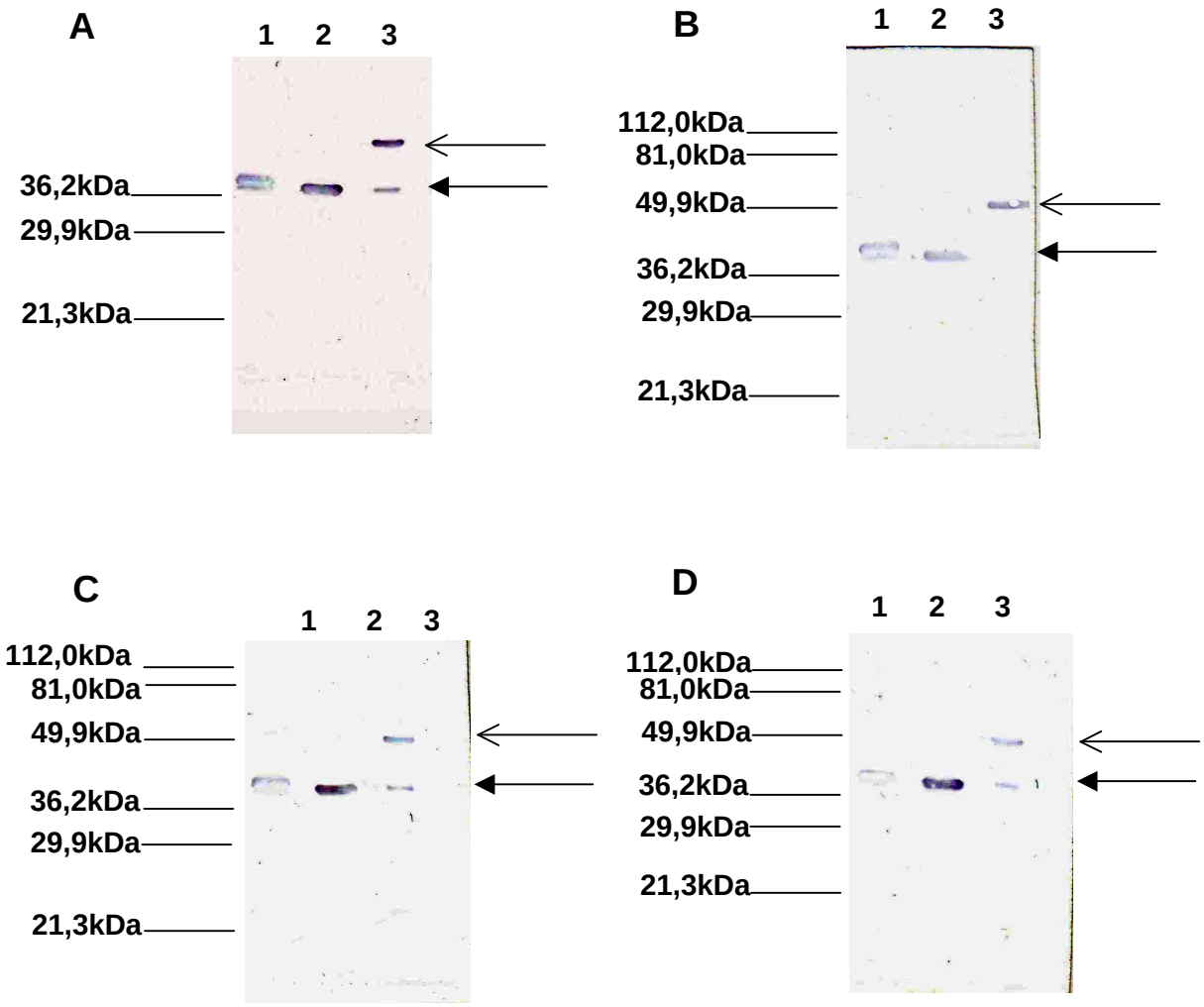


Figura 28. Obtenção dos anticorpos anti-pCAL3. Amostras de homogeneizado do ventrículo anterior mais o ventrículo médio do instestino médio (VA + VM) de larvas de *T. molitor* e amostras da pró-enzima pCAL3 recombinante purificada e da enzima recombinante madura CAL3 foram submetidas à análise por *immunoblot* para detecção de CAL3 e pCAL3. Amostras de homogeneizado (VA + VM) (canaleta 1), CAL3 recombinante (canaleta 2) e pCAL3 recombinante (canaleta 3) foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-pCAL3 produzido nas diluições (A) 1:500, (B) 1:1000, (C)1:1500 e (D) 1:2000. As setas cheias e vazias indicam respectivamente CAL3 e pCAL3 O reconhecimento das proteínas pelo anticorpo foi feito com TBS1X contendo 0,15% de água oxigenada e 1% de cloro-naftol previamente dissolvido em metanol.

Na canaleta 3 da figura 28 podemos observar que uma parte de pCAL3 sofreu autoativação antes da incubação em pH ácido, produzindo a forma madura da enzima. O anticorpo anti-pCAL3 não reconheceu pCAL1 recombinante e nem pCAL2 recombinante (dados não mostrados).

4.13. Análise da expressão da pró-catepsina L 3 (pCAL3) e da catepsina L 3 (CAL3) de *T. molitor* com anticorpos policlonais

Com o objetivo de analisarmos os níveis protéicos de pCAL3 e CAL3 em diferentes tecidos de *T. molitor*, preparamos extratos protéicos de carcaça, corpo gorduroso, hemolinfa, intestino médio e túbulos de Malpighi para a análise por *immunoblot* com anti-soro anti-pCAL3. O intestino médio foi dividido em três porções iguais: intestino médio anterior, intestino médio e intestino médio posterior. O tecido foi separado do conteúdo.

Como mostrado na figura 29, a tradução ocorre apenas no intestino médio. Nos tecidos do intestino médio anterior e do intestino médio o anticorpo reconheceu um polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 48kDa e um polipeptídeo com massa molecular de ~38kDa. Estas massas moleculares estão de acordo com as massas moleculares de pCAL3 recombinante (~48kDa) e CAL3 recombinante (~38kDa). Aqui também foi observado o polipeptídeo com aproximadamente 39kDa. No tecido do intestino médio posterior estas bandas não foram detectadas. Nas amostras de conteúdo luminal do intestino médio anterior, intestino médio e intestino médio posterior foi detectada apenas as bandas de ~38kDa e ~39kDa correspondentes a enzima madura.

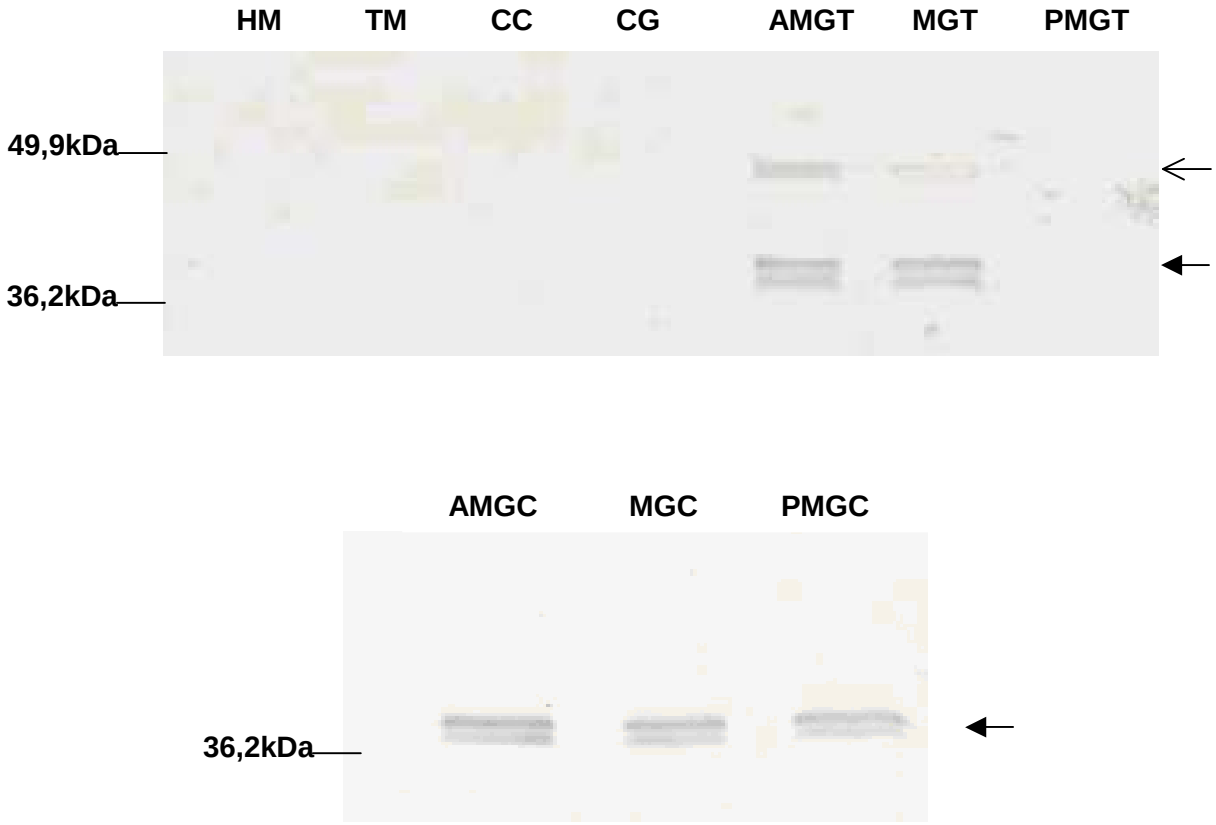


Figura 29. Análise dos níveis protéicos de pCAL3 e CAL3 em *T.* molitor. As amostras (20µg) de diferentes tecidos de *T. molitor* foram submetidas à separação eletroforética em gel de SDS (SDS-PAGE). Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo policlonal anti-pCAL3 (1:500), por uma noite, à temperatura ambiente. As setas cheias e vazias, indicam respectivamente CAL3 e pCAL3. O reconhecimento das proteínas pelo anticorpo foi feito com TBS1X contendo 0,15% de água oxigenada e 1% de cloro-naftol previamente dissolvido em metanol Na análise foram utilizadas as seguintes amostras: Hemolinfa (HM), túbulos de Malpighi (TM), carcaça (CC), corpo gorduroso (CG), tecido do intestino médio anterior (AMGT), tecido do intestino médio (MGT), tecido do intestino médio posterior (PMGT), conteúdo do intestino médio anterior (AMGC), conteúdo do intestino médio (MGC) e conteúdo do intestino médio posterior (PMGC).

Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório, utilizando a técnica de RT-PCR semiquantitativo, revelaram que a transcrição do gene pCAL3 ocorre nos tecidos de intestino médio anterior, intestino médio, intestino médio posterior e hemolinfa (Cristofoletti *et al*., 2005).

A presença de pCAL3 e CAL3 nos tecidos de intestino médio anterior e intestino médio sugere que esta enzima é secretada nos dois terços anteriores do tubo digestivo e que a ativação de pCAL3 ocorre provavelmente nas vesículas de secreção. Nas amostras de conteúdo luminal foi detectada apenas a presença de CAL3, sugerindo que a enzima secretada nos dois terços anteriores migra até o conteúdo do intestino posterior.

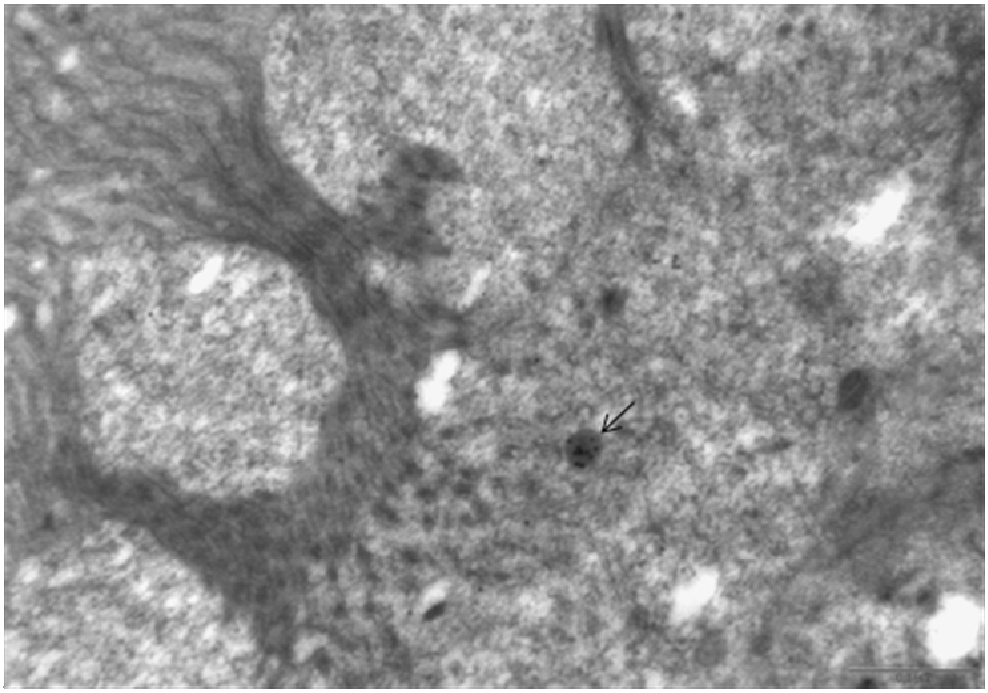
4.14. Imunocitolocalização da pró-catepsina L 3 (pCAL3)

A imunocitolocalização da pCAL3 foi feita com anti-soro anti-pCAL3. Como pode ser observado nas figuras 30A, 30B, 30C e 30D pCAL3 está presente em pequenas vesículas. As figuras 30E e 30F mostram que no intestino médio posterior pCAL3 está presente nas microvilosidades. Estes dados confirmaram os dados anteriores de *immunoblot* que sugerem que esta enzima é secretada no dois terços anteriores do intestino médio.

4.15. Expressão de pCAL2 e pCAL3 mutantes em bactéria

Como um dos objetivos do projeto é a obtenção da estruturas cristalográficas das pró-enzimas, pCAL2 e pCAL3 foram expressas como formas inativas através da substituição da cisteína da posição 25 (numeração da papaína) por uma serina. Essas mutações foram necessárias para evitar a autoativação que ocorre em valores de pH ácido. A mutação Cys25→Ser também foi necessária na cristalização

A



B

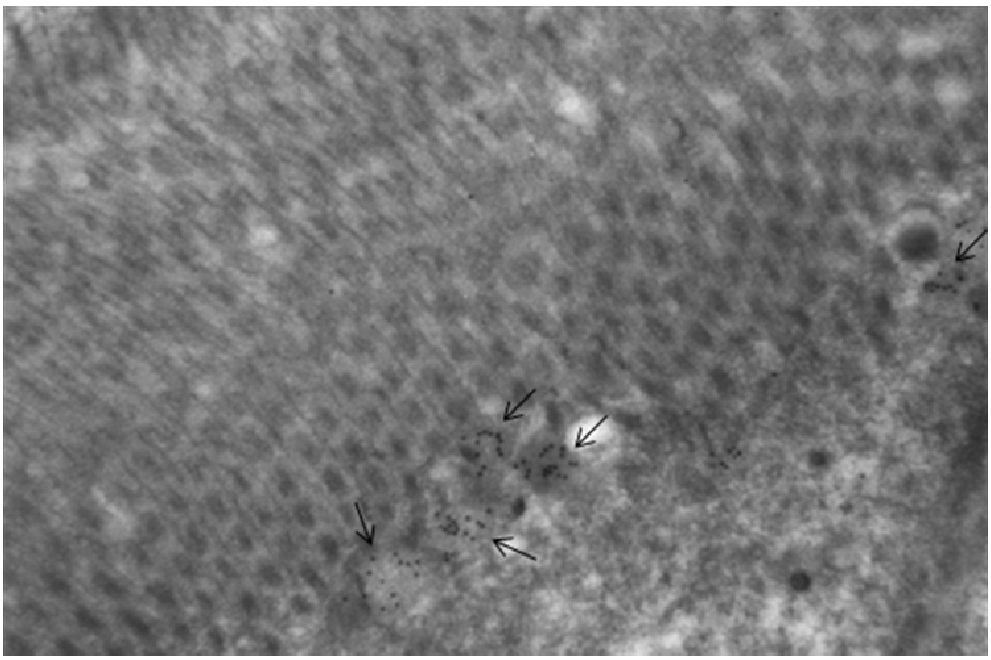
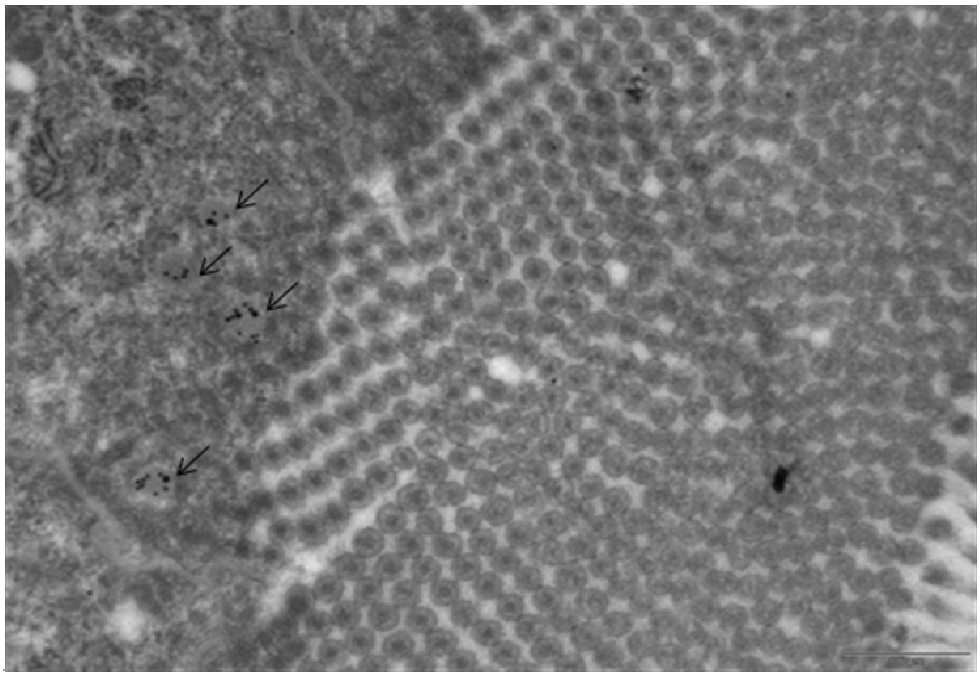


Figura 30...

C



D

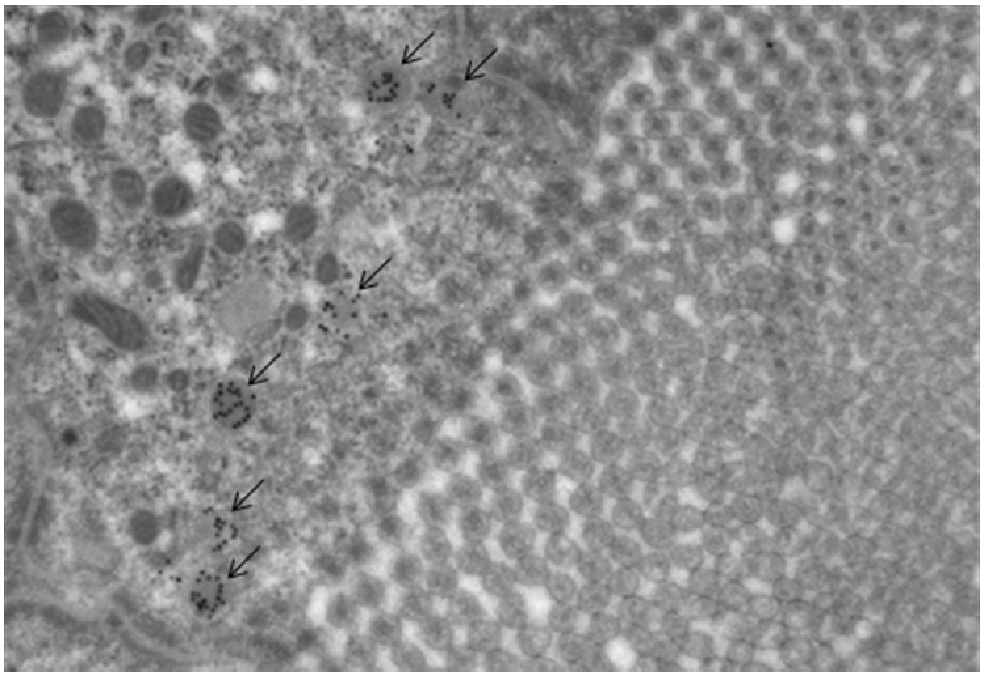
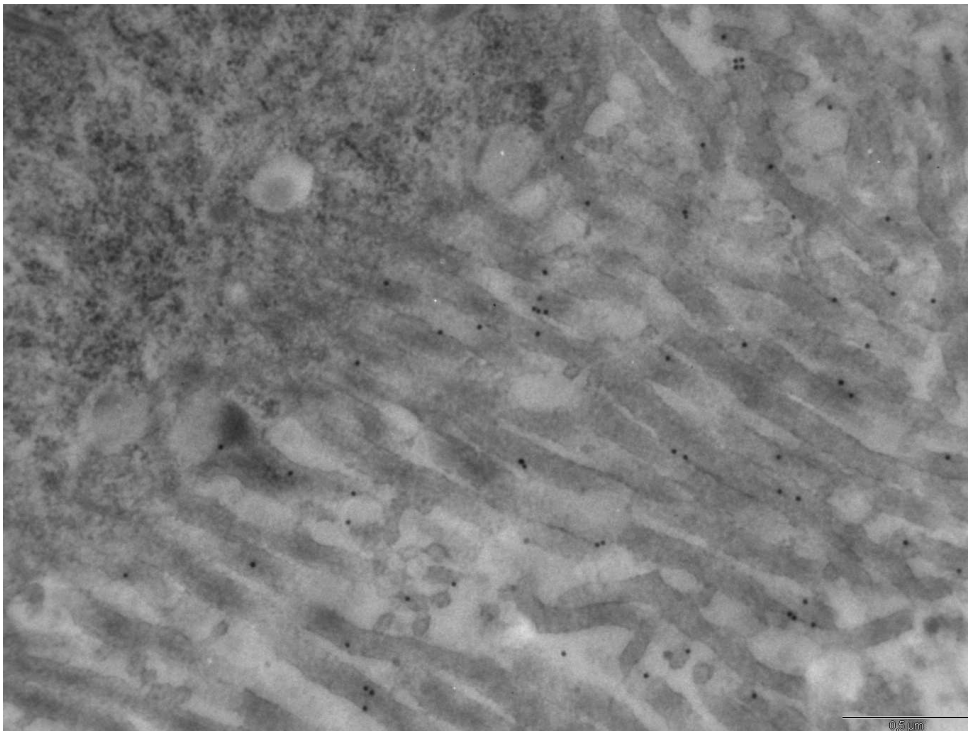


Figura 30...

E



F

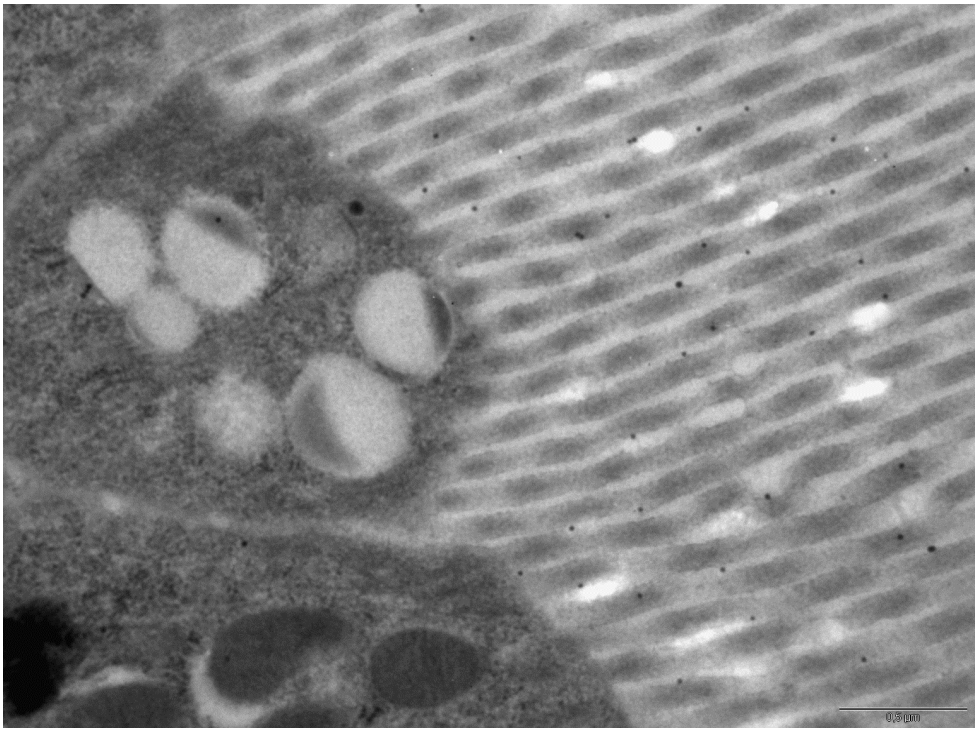


Figura 30. Imunocitolocalização de pCAL3 em larvas de *T. molitor*. (A) e (B) Células do epitélio do intestino médio anterior com marcação em pequenas vesículas (setas). (C) e (D) Células do epitélio do intestino médio com marcação em pequenas vesículas (setas). (E) e (F) Células do epitélio do intestino médio posterior com marcação em microvilosidades. O anti-soro anti-pCAL3 foi diluído 1:1500.Barras : 0.5µm.

da pró-catepsina L humana (Coulombe *et al*., 1996b). Na determinação das estruturas das pró-catepsinas S de humano e L 1 de *Fasciola hepatica* foram necessárias às mutações Cys25→Ala e Cys25→Gly, respectivamente (Kaulmann *et al*., 2006; Stack *et al*., 2008). A construção dos mutantes foi realizada através do método da sobreposição na região mutada (Higuchi, 1988) conforme apresentado no item 3.4.3.

A construção pAE-pCAL2Cys25Ser foi utilizada na transformação de bactérias da cepa OrigamiB(DE3) e a indução foi realizada com IPTG 1mM a 20℃ por 20 horas. A figura 31 mostra a indução de um polipeptídeo de ~35kDa, que assim como pCAL2 foi recuperado na fração solúvel dos lisados bacterianos. A purificação de pCAL2Cys25Ser foi realizada através de cromatografia de afinidade em resina de Ni^{+2}-NTA agarose seguindo os mesmos procedimentos utilizados na purificação de pCAL2 (Figura 31). A incubação de pCAL2Cys25Ser em pH 4,0 não resultou na autoativação observada para pCAL2 selvagem (item 4.7). pCAL2 mutante não apresentou atividade sobre o substrato Z-FR-MCA.

A construção pAE-pCAL3Cys26Ser foi utilizada na transformação de bactérias da cepa OrigamiB(DE3) e a indução foi realizada com IPTG 1mM a 20℃ por 20 horas. A figura 32 mostra a indução de um polipeptídeo de ~48kDa, que assim como pCAL3 foi recuperada na fração solúvel do extrato de bactérias. A purificação de pCAL3Cys25Ser foi realizada através de cromatografia de afinidade em resina de Ni^{+2}-NTA agarose seguindo os mesmos procedimentos utilizados na purificação de pCAL3 (Figura 32). A incubação de pCAL3Cys26Ser em tampão citrato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA não resultou na clivagem do pró-peptídeo com a formação da enzima madura como observado

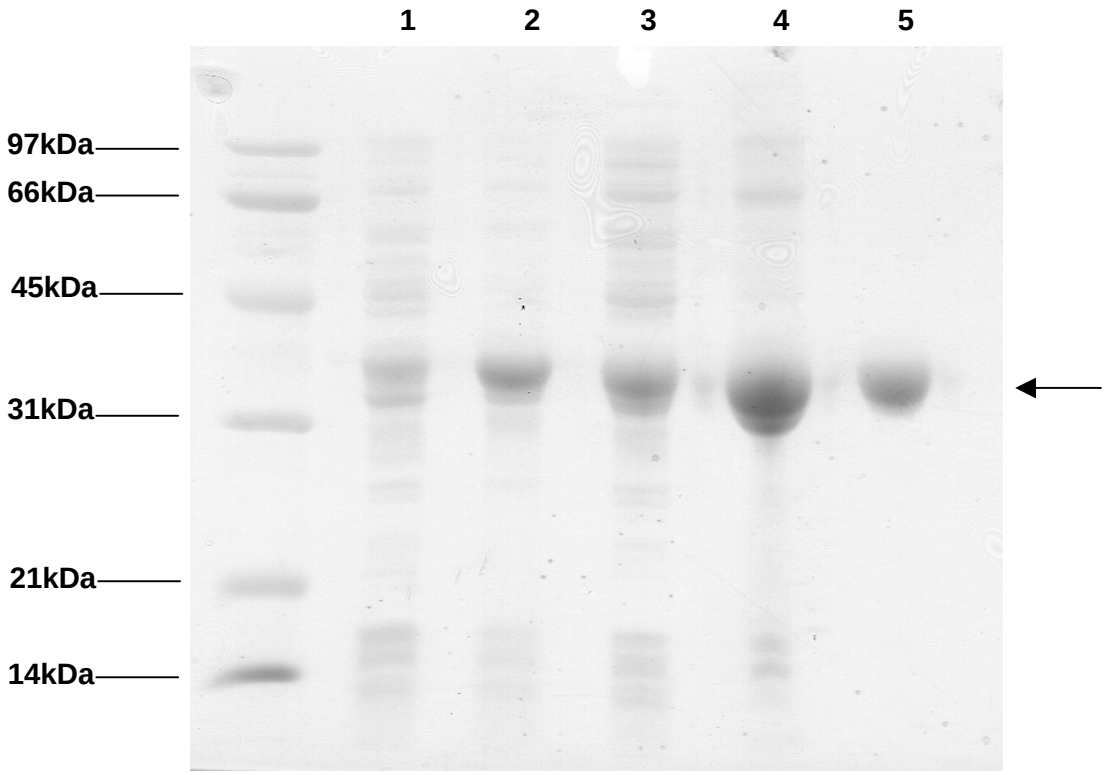


Figura 31. Expressão, Solubilidade e Purificação de pCAL2 mutante. Para expressão, a cultura de bactérias OrigamiB(DE3), transformada com a construção pAE-pCAL2Cys25Ser, crescida a 37℃, por uma noite, foi diluída para DO_{600nm}=0,1 a 20℃. Após DO_{600nm} atingir 0,6, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 20 horas a 20℃. Na avaliação da solubilidade as bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado. pCAL2 mutante foi purificado por cromatografia de afinidade em Ni^{+2}-NTA agarose a partir de culturas induzidas com IPTG a 20℃ por 20 horas. A canaleta 1 se refere ao extrato bacteriano proteíco de cultura controle não induzida, a canaleta 2 a de cultura induzida com IPTG, a canaleta 3 a fração solúvel, a canaleta 4 ao precipitado e a canaleta 5 a eluição utilizando 300mM de imidazol. As amostras foram separadas em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com *Coomassie Blue.* A seta indica pCAL2 mutante.

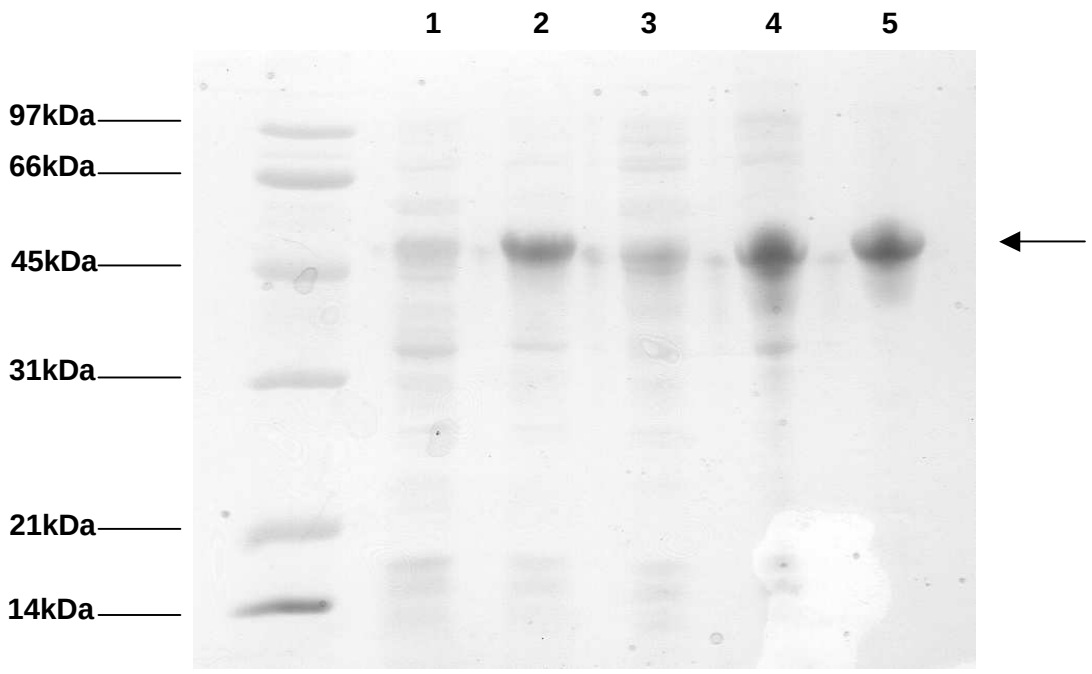


Figura 32. Expressão, Solubilidade e Purificação de pCAL3 mutante. Para expressão, a cultura de bactérias OrigamiB(DE3), transformada com a construção pAE-pCAL3Cys26Ser, crescida a 37℃, por uma noite, foi diluída para DO_{600nm}=0,1 a 20℃. Após DO_{600nm} atingir 0,6, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 20 horas a 20℃. Na avaliação da solubilidade as bactérias foram lisadas e o extrato bruto foi centrifugado. pCAL3 mutante foi purificado por cromatografia de afinidade em Ni^{+2}-NTA agarose a partir de culturas induzidas com IPTG a 20℃ por 20 horas. A canaleta 1 se refere ao extrato bacteriano proteíco de cultura controle não induzida, a canaleta 2 a de cultura induzida com IPTG, a canaleta 3 a fração solúvel, a canaleta 4 ao precipitado e a canaleta 5 a eluição utilizando 150mM de imidazol. As amostras foram separadas em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com *Coomassie Blue*. A seta indica pCAL3 mutante

para pCAL3 selvagem (item 4.9). pCAL3 mutante não apresentou atividade sobre o substrato Z-FR-MCA.

4.16. Processamento de pCAL3Cys26Ser por adição de CAL3 madura ativa

Foi demonstrado que o precursor da papaína mutante Cys25Ser sofreu processamento intermolecular através da adição da papaína selvagem (Vernet *et al*., 1991). Recentemente foi verificado processamento intermolecular da pró-catepsina L 1 mutante Cys26Gly de *Fasciola hepatica* através da adição da catepsina L 1 madura nativa exógena de *F. hepatica* (Collins *et al*., 2004). Como no artigo citado acima incubamos 5μg de pCAL3Cys26Ser recombinante purificada na presença de 0,5μg de CAL3 madura nativa. A adição de CAL3 madura nativa, que foi ativada como descrito no item 4.9, resultou na formação de um polipeptídeo menor com ~38kDa (figura 33A) que corresponde a massa molecular de CAL3 madura, como mostrado na figura 24. Este polipeptídeo foi submetido a seqüenciamento N-terminal e o resultado foi o mesmo do obtido para CAL3 produzida a partir de pCAL3 (item 4.9). A sequência de aminoácidos obtida foi: SKKPLAASVD.

É importante ressaltar que a incubação de pCAL3Cys26Ser recombinante purificada a 37℃ em tampão citrato de sódio 100mM contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA na presença de CAL3 madura nativa não resultou num aumento da atividade enzimática sobre o substrato Z-FR-MCA, como observado para pCAL3 recombinante purificada nativa.

A figura 33B mostra que a incubação de pCAL3Cys26Ser recombinante purificada a 37℃ em tampão citrato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA não resultou na formação de um polipeptídeo de massa molecular menor, como verificado na figura 33A.

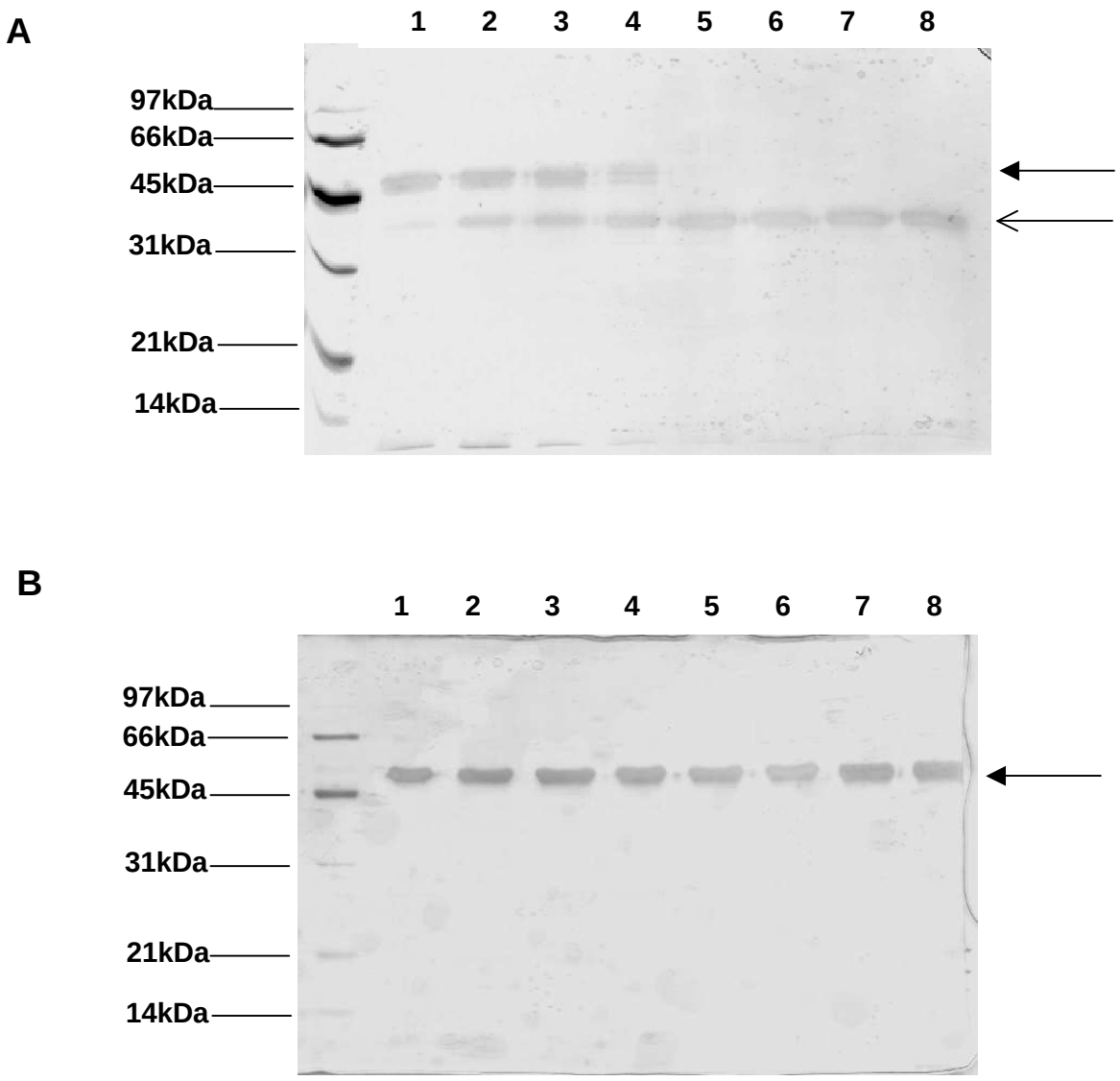


Figura 33. Processamento intermolecular de pCAL3Cys26Ser recombinante de *T. molitor* pela adição de CAL3 madura nativa. pCAL3Cys26Ser recombinante purificada (5µg) foi incubada na presença de CAL3 madura nativa (0,5µg) a 37℃ nos tempos 10, 20, 30, 60, 120, 240, 300 e 360 minutos (canaletas 1-8) em tampão citrato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA. A atividade foi monitorada através de ensaios utilizando o substrato Z-FR-MCA (A). O painel B mostra pCAL3Cys25Ser nos tempos 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos de incubação a 37℃ em tampão citrato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA (canaletas 1-8). As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com prata. As setas cheias e vazias indicam respectivamente pCAL3 e CAL3.

4.17. Cristalização de pCAL3Cys26Ser e pCALCys25Ser

Quando mudamos a purificação para uma escala maior para os testes de cristalização apareceram algumas bandas de contaminação (dados não mostrados). Assim, para a purificação em grande escala o protocolo adotado inicialmente foi modificado. Para eliminar a contaminação aumentamos a concentração de imidazol no tampão de lavagem de 10mM para 20mM. Além disso, aumentamos o número de lavagens. Pureza e quantidade de macromoléculas na amostra são fatores importantes para o sucesso do processo de cristalização (Rhodes, 2006). Como controle do grau de pureza de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser sempre foi feito antes dos testes de cristalização um gel de poliacrilamida 12% contendo de 5 a 10μg de proteína purificada. A figura 34 mostra um gel de poliacrilamida 12% com amostras de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser corado com prata. Concluímos que as purificações de pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser por cromatografia de afinidade apresentaram um grau de pureza satisfatório para os testes de cristalização.

Para o crescimento de cristais, a proteína purificada é dissolvida num tampão aquoso contendo um agente precipitante como sulfato de amônio ou polietileno glicol. A evaporação controlada de água pode gerar concentrações de proteína e agente precipitante apropriadas para precipitação. A precipitação lenta é mais conveniente para a obtenção de cristais grandes, enquanto a precipitação rápida pode produzir cristais pequenos ou piores ou sólidos amorfos (Rhodes, 2006).

Para os ensaios de cristalização pCAL3Cys26Ser recombinante purificada foi submetida à diálise em tampão Tris-HCl 10mM pH 8,3 como na cristalização da pró-catepsina L de humano (Coulombe *et al*., 1996a). Em seguida, a amostra foi concentrada em filtro Amicon YM10 para concentração final de 9,7mg/mL.

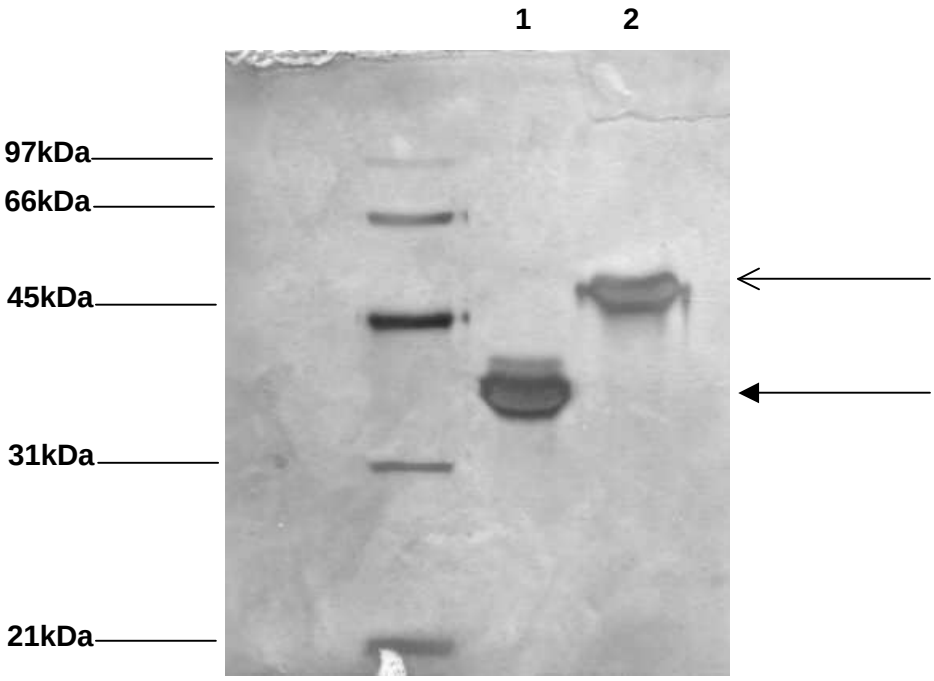


Figura 34. pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser recombinantes purificadas para os testes de cristalização. A canaleta 1 refere-se a pCAL2Cys25Ser e a canaleta 2 a pCAL3Cys26Ser. As amostras correspondem as eluições com 300 e 150mM de imidazol ,respectivamente. As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com prata. As setas cheia e vazia, indicam respectivamente pCAL2Cys25Ser e pCAL3Cys26Ser.

Os experimentos de cristalização foram realizados através do método difusão de vapor (gota sentada) com os seguintes *Kits*: Crystal Screen, Crystal Screen II, Index I e Index II. Nas condições 3 (Dihidrogênio fosfato de amônio 0,4M) e 11 (Citrato de sódio 0,1M pH 5,6 e dihidrogênio fosfato de amônio 1,0M) do *Kit* Crystal Screen foram obtidas estruturas cristalinas. O período de crescimento dos cristais foi de aproximadamente 2 semanas.

Os cristais das condições 3 e 11 foram submetidos ao raio X de uma fonte síncroton e as resoluções máximas processadas foram respectivamente 2,7Å e 9,0Å (dados não mostrados). Além disso, o cristal 2,7Å apresentou muita mosaicidade o que nos impossibilitou de trabalhar com os seus dados.

Com o objetivo de melhorar a resolução, realizamos o refinamento das condições 3 e 11. O refinamento da condição 3 consistiu na variação da concentração do agente precipitante (0,1M a 1,6M de dihidrogênio fosfato de amônio). O refinamento da condição 11 consistiu na variação do pH do tampão (citrato de sódio pH 5,0 a pH 6,0) e do agente precipitante (0,1M a 1,6M de dihidrogênio fosfato de amônio).

Para demonstrar que as estruturas cristalinas eram cristais de proteína, os cristais da condição 1M de dihidrogênio fosfato de amônio foram corados com Izit Crystal Dye da Hampton Research. Os cristais de macromoléculas biológicas possuem grandes canais de solvente permitindo que o Izit penetre nesses canais e o cristal se torne azul. Como moléculas pequenas e cristais inorgânicos não possuem esses canais, não absorvem o Izit ficando sem a coloração azul. A figura 35A mostra que o cristal da condição 1,0M de dihidrogênio fosfato de amônio corado com Izit apresentou coloração azul.

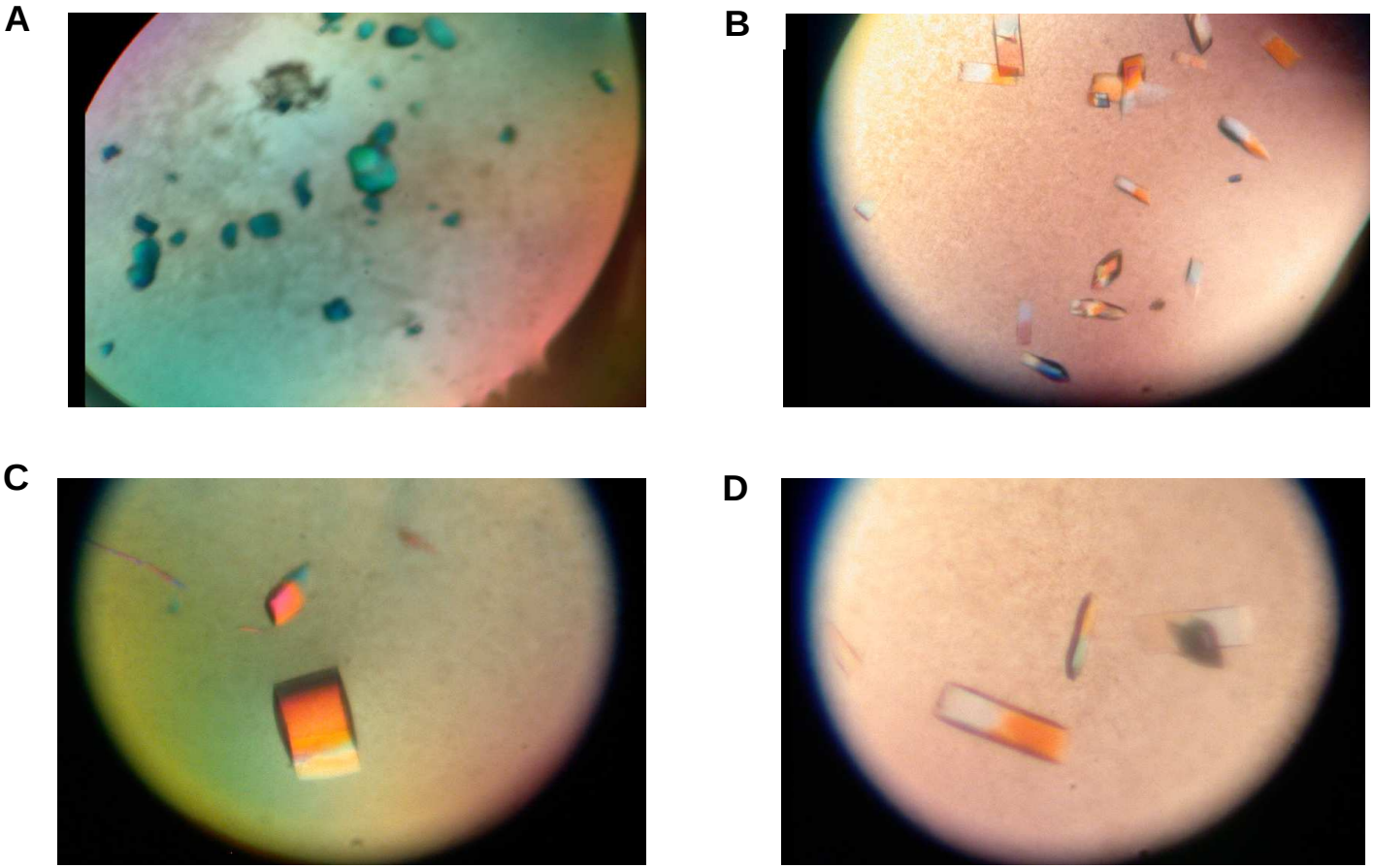


Figura 35. Cristais de pCAL3Cys26Ser. Condições de cristalização: (A)) $NH_4H_2PO_4$ 1,0M corado com Izit. (B) $NH_4H_2PO_4$ 0,2M. (C) $NH_4H_2PO_4$ 0,6M. (D) $NH_4H_2PO_4$ 0,3M.

As figuras 35B, 35C e 35D mostram algumas condições do refinamento que apresentaram estruturas cristalinas. Um cristal da condição citrato de sódio 0,1M pH 5,6 e 0,2M de dihidrogênio fosfato de amônio foi submetido ao raio X de uma fonte síncroton e a resolução máxima processada foi 2,1Å (tabela 2). Os cristais apresentaram parâmetros de célula unitária a=57,634Å, b=89,322, c=70,076Å, $\alpha=\gamma=90$Å, $\beta=92{,}502°$ e grupo espacial C2.

Tabela 2. Coleta de dados da difração de raios-X e processamento dos dados de um cristal de pCAL3Cys26Ser de *T. molitor.*

Grupo espacial	C 2
a (Å)	57,634
b (Å)	89,322
c (Å)	70,076
β	92,502
Estatísticas de coletas de dados	
Resolução (Å)[1]	35,00 – 2,11 (2,19 -2,11)
N° de reflexões observadas [1]	122348
N° de reflexões únicas [1]	20295
<(I/error).[1]	25,22 (6,94)
Multiplicidade[1]	6,0 (5,4)
Completeza (%)[1]	99,3 (94,7)
R (%)[1]	7,0 (21,5)
Nº de imagens	291
λ (Å)	1,42

[1] Valores em parênteses correspondem aos dados de maior resolução.

$R = (\Sigma \mid I-\langle I\rangle \mid) / \Sigma(I)$

Para os ensaios de cristalização pCAL2Cys25Ser recombinante purificada foi submetida à diálise em tampão Tris-HCl 10mM pH 8,3. Em seguida, a amostra foi concentrada em filtro Amicon YM10 para concentração final de 10mg/mL. Os experimentos de cristalização foram realizados através do método difusão de vapor (gota sentada) com os seguintes *Kits*: Crystal Screen, Crystal Screen II, Index I e Index II. Nas condições 28 (acetato de sódio 0,2M, PEG 8000 30% e cacodilato de

sódio 0,1M pH 6,5) do *Kit* Crystal Screen, 4 (sulfato de amônio 2M e Bis-Tris 0,1M pH 6,5) 43 (PEG 3350 25% e Bis-Tris 0,1M pH 6,5) e 46 (PEG 5000 20% e Bis-Tris 0,1M pH 6,5) do *Kit* Index foram obtidas estruturas cristalinas com forma de agulhas. O período de crescimento dos cristais foi de aproximadamente 2 semanas. Como não é possível coletar dados de difração de raios-X destes cristais agulhas foi feito o refinamento destas condições.

O refinamento da condição 28 consistiu na variação do pH do tampão (cacodilato de sódio 0,1M pH 6,4 a pH 6,7) e do agente precipitante (0% a 50% de PEG 8000). O refinamento da condição 4 consistiu na variação do pH do tampão (Bis-Tris 0,1M pH6,4 a pH 6,7) e do agente precipitante (0M a 2M de sulfato de amônio). O refinamento da condição 43 consistiu na variação do pH do tampão (Bis-Tris 0,1M pH6,3 a pH 6,9) e do agente precipitante (0% a 40% de PEG 3350). O refinamento da condição 46 consistiu na variação de pH do tampão (Bis-Tris 0,1M pH6,3 a pH 6,9) e do agente precipitante (0% a 40% de PEG 5000). Na placa de refinamento da condição 28 apareceram cristais agulha.

A figura 36 mostra um diagrama de fases para cristalização mediada por precipitante. A nucleação é a etapa inicial da formação de cristal e requer altas concentrações de proteína e agente precipitante. Em seguida, a partir dos núcleos de proteína formados na nucleação ocorre o crescimento do cristal (Rhodes, 2006). Um dos problemas da cristalização é que as condições ótimas para nucleação podem não ser ideais para o crescimento. Isto ocorre porque a nucleação espontânea é gerada quando as concentrações de proteína e precipitante são altas (figura 36, C), enquanto que o crescimento ordenado é favorecido por concentrações menores (figura 36, B). Assim, no experimento ideal a nucleação e o crescimento ocorrem separados (Bergfors, 2003). A semeadura de cristais consegue separar

nucleação de crescimento. Nesta técnica são fornecidos núcleos provenientes de cristais que sofreram nucleação para semear novas gotas com níveis menores de supersaturação.

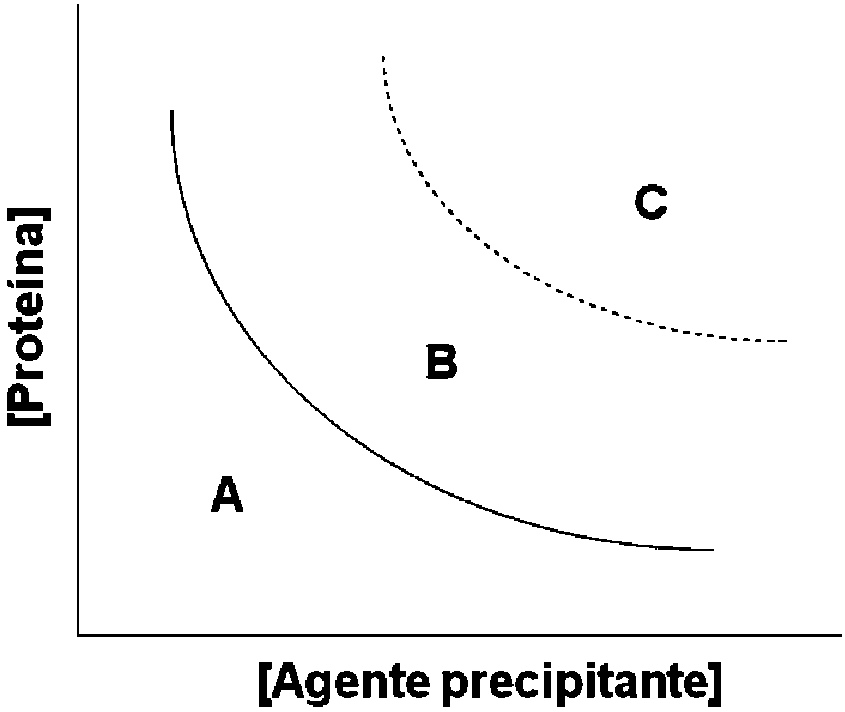


Figura 36. Diagrama de fases para cristalização (Adaptado de Bergfors, 2003 e Rhodes, 2006). (A) Região não saturada. Nucleação e crescimento não ocorrem nesta região. Aqui a gota é clara. (B) Região de crescimento. Nesta região as condições são favoráveis ao crescimento do cristal, mas não são favoráveis a nucleação. Esta é a melhor região para semeadura. (C) Região de nucleação e crescimento. Nesta região ocorre nucleação espontânea e crescimento do cristal

A semeadura é dividida em dois tipos: micro semeadura (transferência de micro sementes sub microscópicas) e macro semeadura (transferência de cristais únicos). A introdução das micro sementes na nova gota pode ser feita de diferentes maneiras, sendo o *strek seeding* a mais fácil e rápida. Neste método é utilizado um bigode de animal (usualmente gato ou coelho) como instrumento na semeadura. Nos testes de cristalização citados acima provavelmente nucleação e crescimento

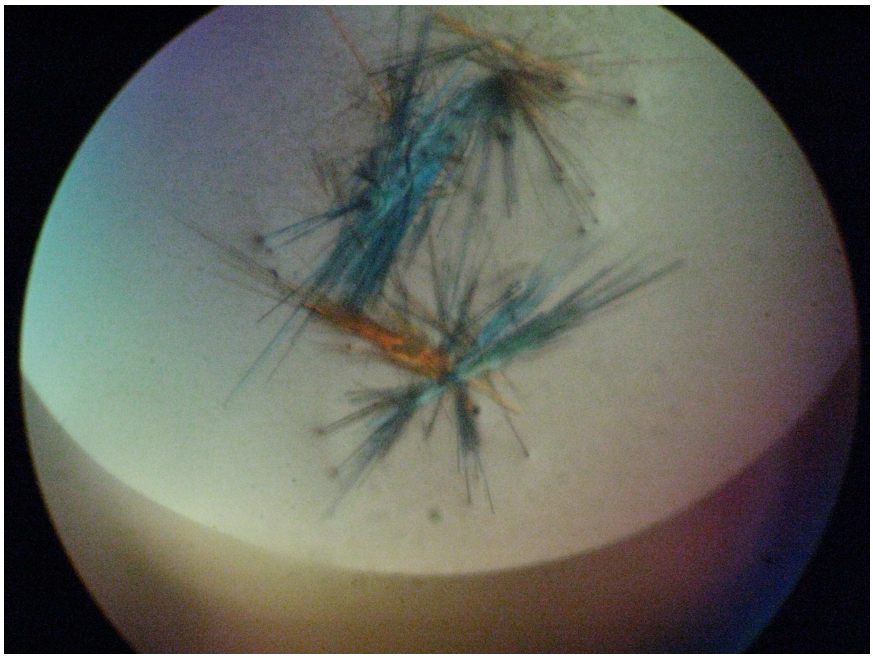
ocorreram na mesma região do diagrama de fases gerando cristais ruins. Também deve ter ocorrido à formação de muitos núcleos, pois foi observada a formação de muitos cristais agulhas numa única gota (dados não mostrados).

Com o objetivo de obter cristais isolados foi feita a semeadura (*streak seeding*) a partir de cristais agulha da placa de refinamento da condição 28. Com o auxílio de uma alça do tipo “bigode de gato” os cristais agulhas foram quebrados e semeados numa placa contendo 1,5µL de pCAL2Cys25Ser e 1,5µL da solução do reservatório. Assim, foram feitas placas de micro semeadura variando o pH do tampão (cacodilato de sódio 0,1M pH 6,4 a pH 6,7) e do agente precipitante (0% a 50% de PEG 8000). Como observados na figura 37A, nas condições cacodilato de sódio 0,1M pH 6,7 e 20% de PEG 8000 e cacodilato de sódio 0,1M pH 6,6 e 20% de PEG 8000 foram obtidos os maiores cristais agulhas.

A semeadura pode ser utilizada em conjunto com outras medidas de otimização como variação da concentração de proteína e precipitante, variação do pH e adição de aditivos (Bergfors, 2003). Geralmente, a primeira medida é a diminuição da concentração de proteína. Assim, novas placas de micro semeadura foram feitas a partir dos cristais agulhas obtidos acima. Foram utilizadas as soluções citadas acima variando apenas a concentração de proteína (6,5mg/mL a 10mg/mL de pCAL2Cys25Ser). O objetivo de diminuir a concentração de proteína é fazer com que o cristal demore mais para crescer, formando cristais maiores e isolados.

A figura 37B mostra que em concentrações de proteína inferiores a 9mg/mL foram obtidos cristais maiores e isolados. Assim, o cristal da condição cacodilato de sódio 0,1M pH 6,7, 20% de PEG 8000 e 9,0mg/mL de proteína foi submetido ao raio-X de uma fonte síncroton e os dados de difração foram processados com uma

A



B

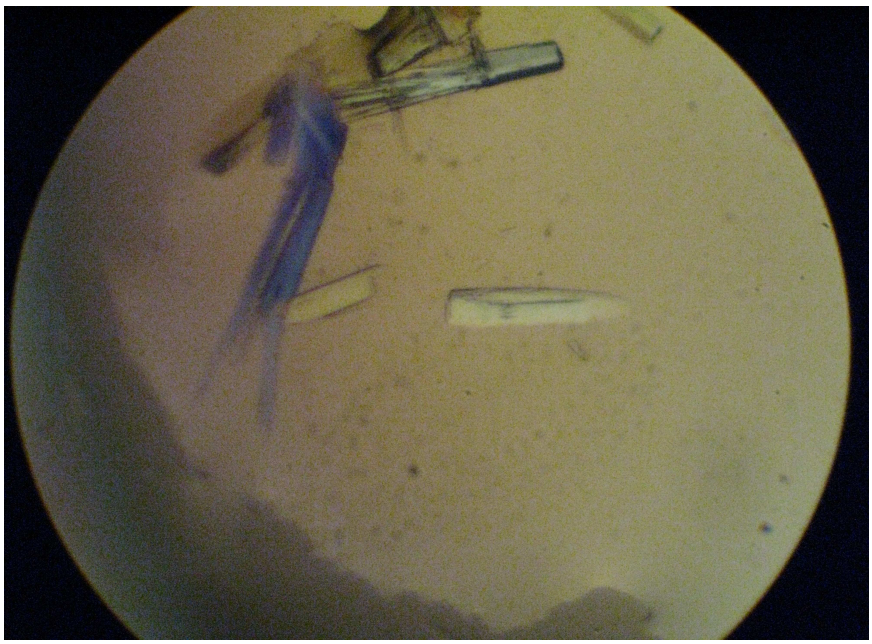


Figura 37. Cristais de pCAL2Cys25Ser. Condições de cristalização: (A) cacodilato de sódio 0,1M pH 6,6 e 20% de PEG 8000 e 10mg/mL de pCAL3Cys25Ser. (B) cacodilato de sódio 0,1M pH 6,6 e 20% de PEG 8000 e 8mg/mL de pCAL2Cys25Ser.

resolução máxima de 1,85Å (tabela 3). Os cristais apresentaram parâmetros de célula unitária de a=51,669Å, b=52,37Å, c=59,716Å, α=91,278°, β=91,547° e γ=109,586 Å e grupo espacial P1.

Tabela 3. Coleta de dados da difração de raios-X e processamento dos dados de um cristal de pCAL2Cys25Ser de *T. molitor.*

Grupo espacial	P1
a (Å)	51,669
b (Å)	52,37
c (Å)	59,716
α	91,278°
β	91,547°
γ	109,586°
Estatísticas de coletas de dados	
Faixa de resolução (Å)[1]	42,00 – 1,85 (1,92 -1,85)
Número de reflexões observadas[1]	165543
Número de reflexões únicas[1]	44108
<(I/error).[1]	18,2 (2,5)
Multiplicidade[1]	3,8 (2,5)
Completeza (%)[1]	87,7 (49,4)
R (%)[1]	0,054 (0,318)
Nº de imagens	360

[1] Valores em parênteses correspondem aos dados de maior resolução.
$R = (\Sigma \mid I-\langle I\rangle \mid) / \Sigma(I)$

4.18. Determinação da estrutura cristalográfica de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser

Para a determinação da estrutura tridimensional de pCAL3Cys26Ser foi utilizado o método de substituição molecular utilizando a estrutura da pró-catepsina L 1 de *Fasciola hepatica* como modelo (Stack *et al*., 2008). A comparação da sequência primária da pCAL3Cys26Ser com a pró-catepsina L 1 de *Fasciola hepatica* mostra que as sequências apresentam 42% de identidade (dados não mostrados).

O programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004) foi utilizado na interpretação do mapa de densidade eletrônica, ou seja, neste programa foram feitas as modificações

manuais no modelo atômico. A figura 38 mostra uma pequena seção da interpretação da imagem molecular no programa COOT.

A estrutura da pCAL3Cys26Ser foi determinada a 2,1Å (figura 39) com fator R final de 16,19% e R_{free} de 20,5%. O modelo apresenta um monômero na unidade assimétrica com 329 aminoácidos, incluindo a metionina iniciadora, os seis resíduos de histidina (utilizado na purificação por cromatografia de afinidade) e um espaçador de 10 aminoácidos na extremidade amino-terminal. O mapa de densidade eletrônica é muito claro e ligado possibilitando a construção do modelo molecular. Os resíduos Gln80, Lys81, Pro82, Lys83, His84, Pro85 e Glu86 do pró-peptídeo não apresentaram densidade eletrônica. Os 6 resíduos de histidina, o espaçador de 10 aminoácidos e os 5 primeiros resíduos do pró-peptídeo também não apresentaram densidade eletrônica. Estes resíduos foram omitidos no modelo estrutural (figura 39). Estes dados sugerem que estas regiões são desordenadas e sujeitas a movimento dentro do cristal. A falta de densidade eletrônica na extremidade C-terminal do pró-peptídeo já foi descrito para outras pró-catepsinas da família da papaína (Sivaraman *et al*., 1999; Kaulmann *et al*., 2006). Mais recentemente, na estrutura terciária da pró-catepsina L 1 de *fasciola hepatica* os quatro resíduos finais do pró-peptídeo não aparecem no mapa de densidade eletrônica, sugerindo região desordenada e sujeita a movimento dentro do cristal (Stack *et al*., 2008). Na estrutura tridimensional da pró-catepsina L de humano os quatro primeiros resíduos do pró-peptídeo não apresentaram densidade eletrônica (Coulombe *et al*., 1996b).

No modelo incluímos 231 moléculas de água e 3 íons fosfato. O fosfato faz parte da solução utilizada na cristalização. Um dos fosfatos está próximo do sítio ativo.

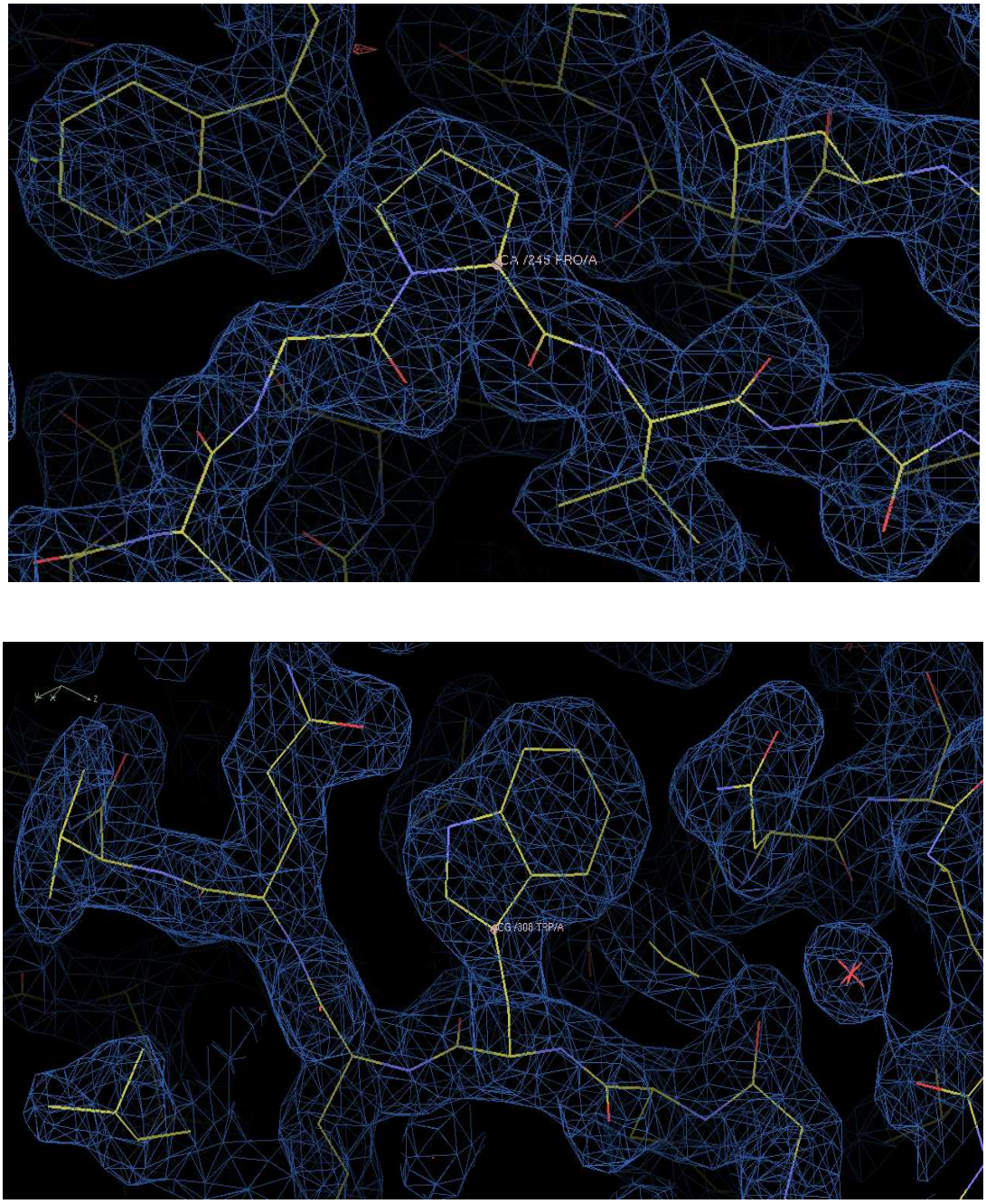


Figura 38. Seção do mapa de densidade eletrônica $2F_o$-F_c do cristal de pCAL3Cys26Ser com contornos 1,0σ.

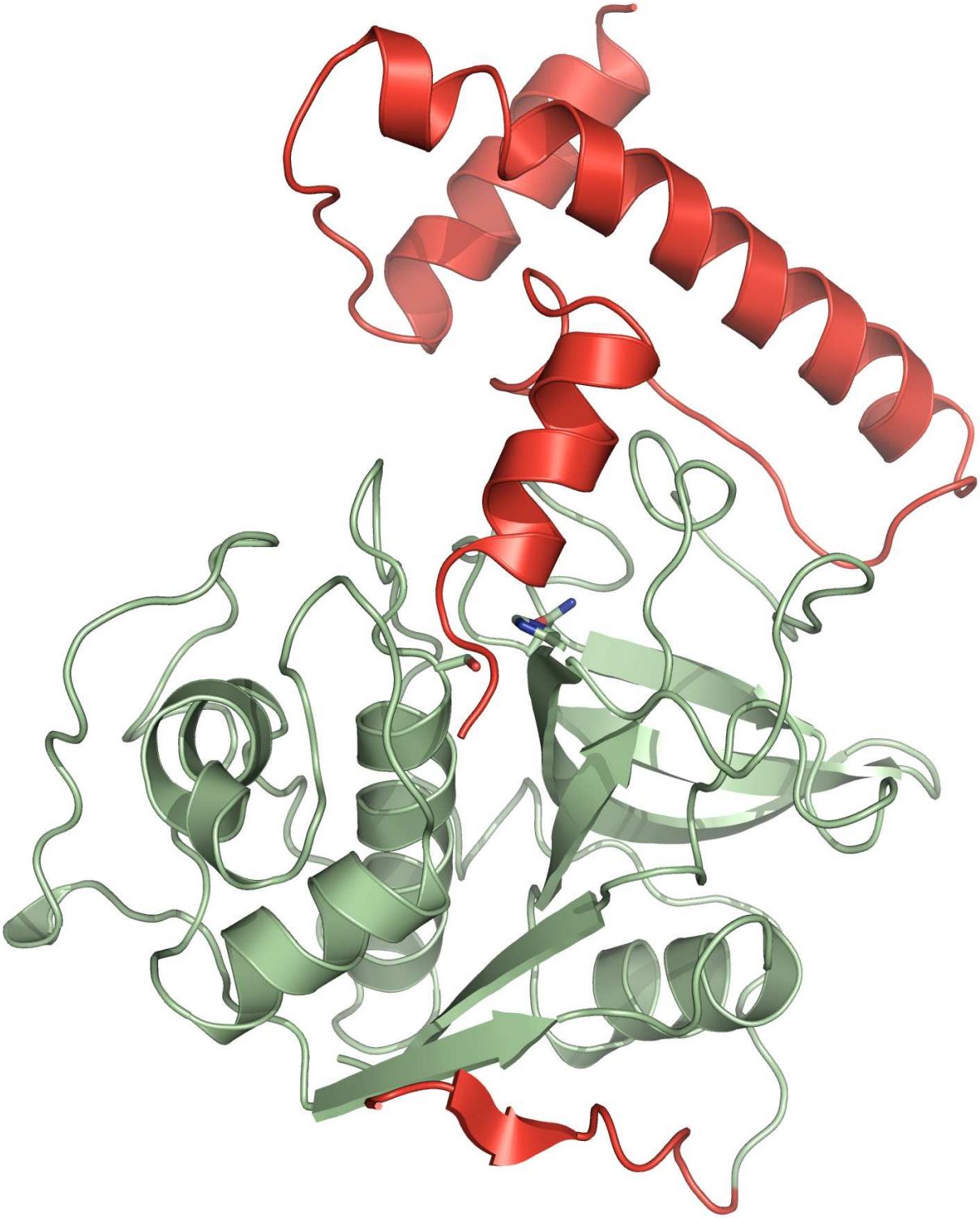


Figura 39. Modelo estrutural de pCAL3Cys26Ser de *Tenebrio molitor*. A estrutura foi determinada por substituição molecular usando a pró-catepsina L 1 de *Fasciola hepatica* como modelo. Em verde está representado a parte da enzima madura e em vermelho o pró-peptídeo. As cadeias laterais do resíduo catalítico His163, Asn183 e do resíduo do sítio ativo mutado Cys26→Ser estão representados na forma de bastão, coloridos de acordo com o tipo de átomo (C em verde, N em azul e O em vermelho). Esta figura foi construída utilizando o programa PyMol (DeLano, 2002).

A pCAL3Cys26Ser apresenta estrutura terciária similar a outras cisteína proteinases da família da papaína. O domínio N-terminal (domínio L) é composto principalmente por α-hélices e o domínio C-terminal (domínio R) por fitas β. O sítio ativo está localizado na interface entre estes dois domínios. O sítio catalítico está localizado dentro de uma região de ligação ao substrato que possui subsítios de ligação na direção C-terminal e N-terminal da ligação que vai ser hidrolisada. A figura 40 mostra que a Ser26 mutada no lugar da Cys26 está no domínio composto por α-hélices e a His159 no domínio composto por fitas β. A presença da cisteína e da histidina em domínios diferentes já foi descrita para outras cisteína proteinases como pró-catepsina L de humano (Coulombe *et al*., 1996b), pró-catepsina B de humano (Podobnik *et al*., 1997), pró-catepsina K de humano (Sivaraman *et al*., 1999), pró-catepsina X de humano (Sivaraman *et al*., 2000), a pró-catepsina S de humano (Kaulmann *et al*., 2006) e a pró-catepsina L 1 de *Fasciola hepatica* (Stack *et al*., 2008).

A pCAL3Cys26Ser, como outros membros da família da papaína, apresenta pontes dissulfeto na enzima madura: Cys119-Cys162, Cys153-Cys194 e Cys252-Cys301.

Para o depósito da proteína no PDB é necessário validar o modelo no PROCHECK (Laskowski *et al*., 1993) com ferramentas disponíveis no programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004).

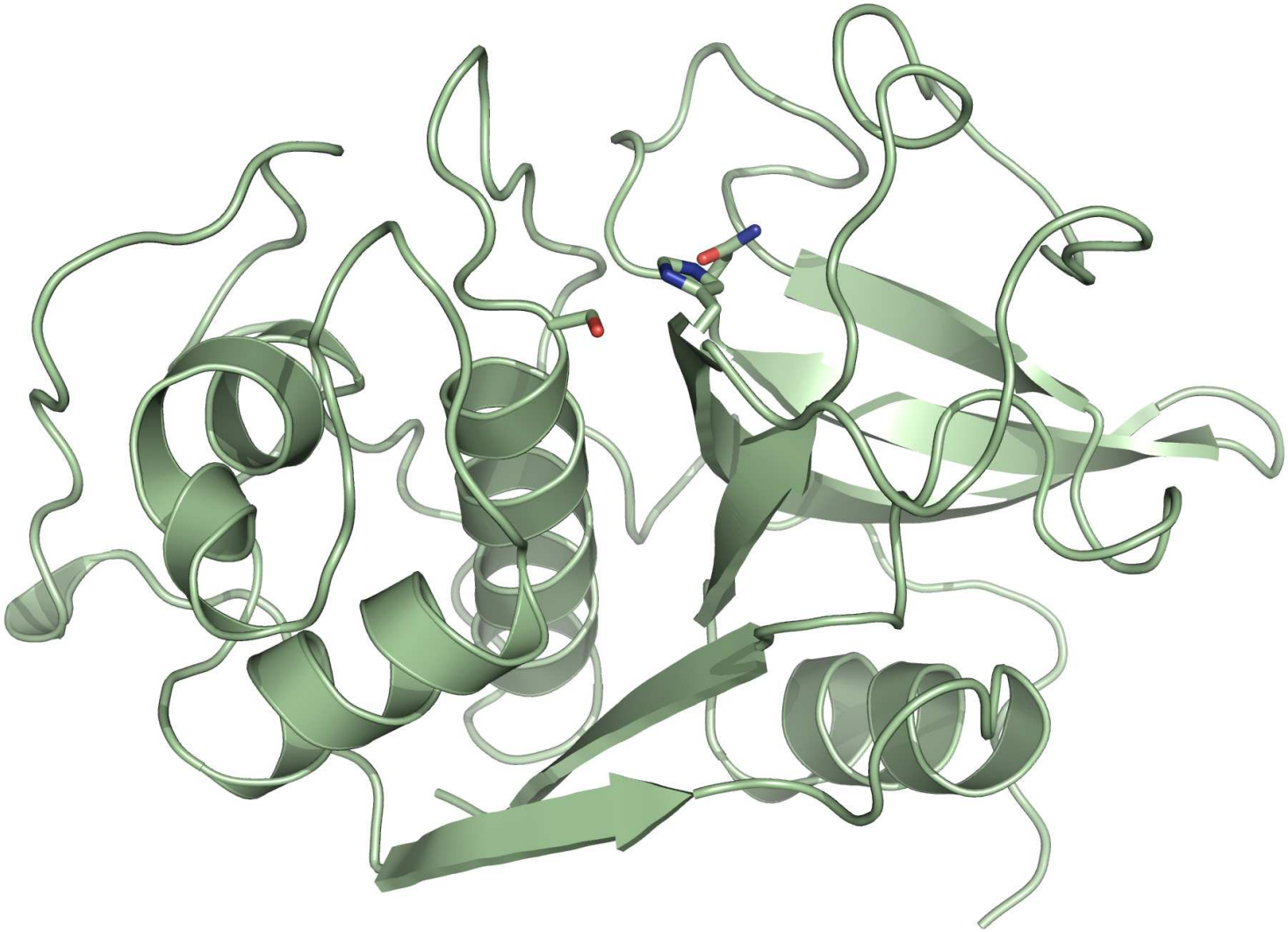


Figura 40. Enzima madura (CAL3). Esta figura foi construída no programa PyMol (DeLano, 2002) omitindo o pró-peptídeo. O domínio N-terminal é composto pricipalmente por α-hélices e o domínio C-terminal por fitas β. As cadeias laterais do resíduo His163, Asn183 e do resíduo do sítio ativo mutado Cys26→Ser estão representados na forma de bastão, coloridos de acordo com o tipo de átomo (C em verde, N em azul e O em vermelho).

A análise da geometria da cadeia principal com o diagrama de Ramachandran usando o programa PROCHECK (Laskowski *et al*., 1993) mostra que 87,9% dos resíduos estão em regiões favoráveis e 12,1% em regiões permitidas (figura 41).

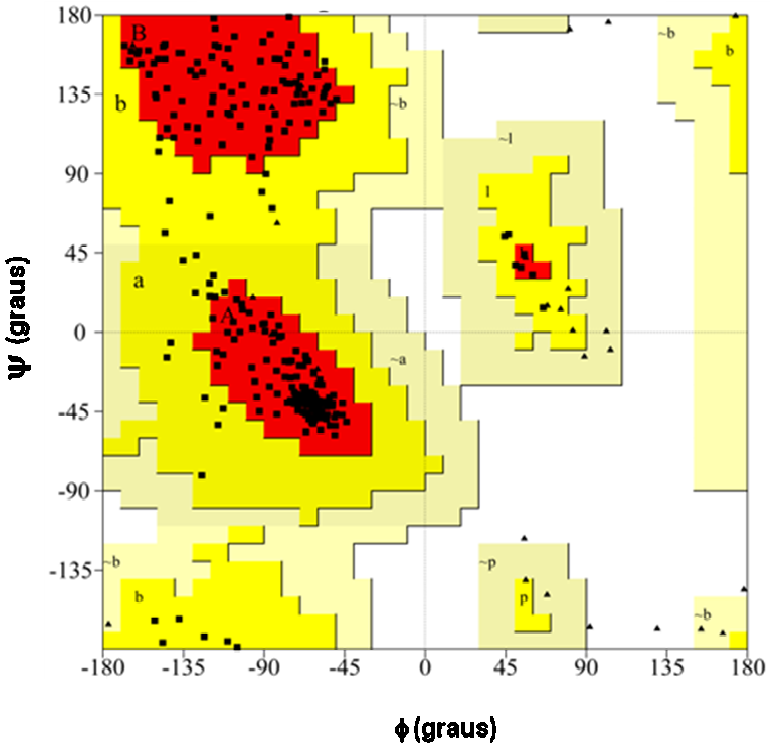


Figura 41. Diagrama de Ramachandran de pCAL3Cys26Ser de *T. molitor* usando o programa PROCHECK (Laskowski et al., 1993). O gráfico mostra que 87,9% dos resíduos encontra-se em regiões preferidas (regiões em vermelho) e 12,1% em regiões permitidas (regiões em amarelo). Os resíduos de glicina são mostrados como triângulos.

Para a determinação da estrutura tridimensional de pCAL2Cys25Ser foi utilizado o método de substituição molecular utilizando a estrutura da pró-catepsina L 3 de *Tenebrio molitor* como modelo. A comparação da sequência primária da pCAL2Cys25Ser com a pCAL3Cys26Ser mostra que as sequências apresentam 43% de identidade (dados não mostrados).

O programa COOT (Emsley & Cowtan, 2004) foi utilizado na interpretação do mapa de densidade eletrônica. Como a unidade assimétrica apresenta 2 monômeros,

foi feito o refinamento dos dois monômeros. Cada monômero contém 331 aminoácidos, incluindo a metionina iniciadora, os seis resíduos de histidina (utilizado na purificação por cromatografia de afinidade) e um espaçador de 4 aminoácidos na extremidade amino terminal. A figura 42 mostra uma pequena seção da interpretação da imagem molecular no programa COOT.

A estrutura da pCAL2Cys25Ser foi determinada a 2,0Å (figura 43) com fator R final de 17,61% e R_{free} de 22,48%. O mapa de densidade eletrônica é muito claro e ligado possibilitando a construção do modelo molecular. Os 6 resíduos de histidina, o espaçador de 4 aminoácidos e os 4 primeiros resíduos do pró-peptídeo não apresentaram densidade eletrônica, sugerindo região desordenada. No modelo foram incluídas 314 moléculas de água.

A pCAL2Cys25Ser também apresentou estrutura terciária similar a outras cisteína proteinases da família da papaína com domínio N-terminal composto principalmente por α-hélices e domínio C-terminal por fitas β. O sítio ativo está localizado na interface entre estes dois domínios.

A figura 44 mostra que a Ser25 mutada no lugar da Cys25 está no domínio composto por α-hélices e a His159 no domínio composto por fitas β. Como descrito anteriormente, a presença da cisteína e da histidina em domínios diferentes já foi descrita para outras cisteína proteinases. A pCAL2Cys25Ser, como outros membros da família da papaína, apresenta pontes dissulfeto na enzima madura: Cys126-Cys169, Cys162-Cys202 e Cys260-Cys309.

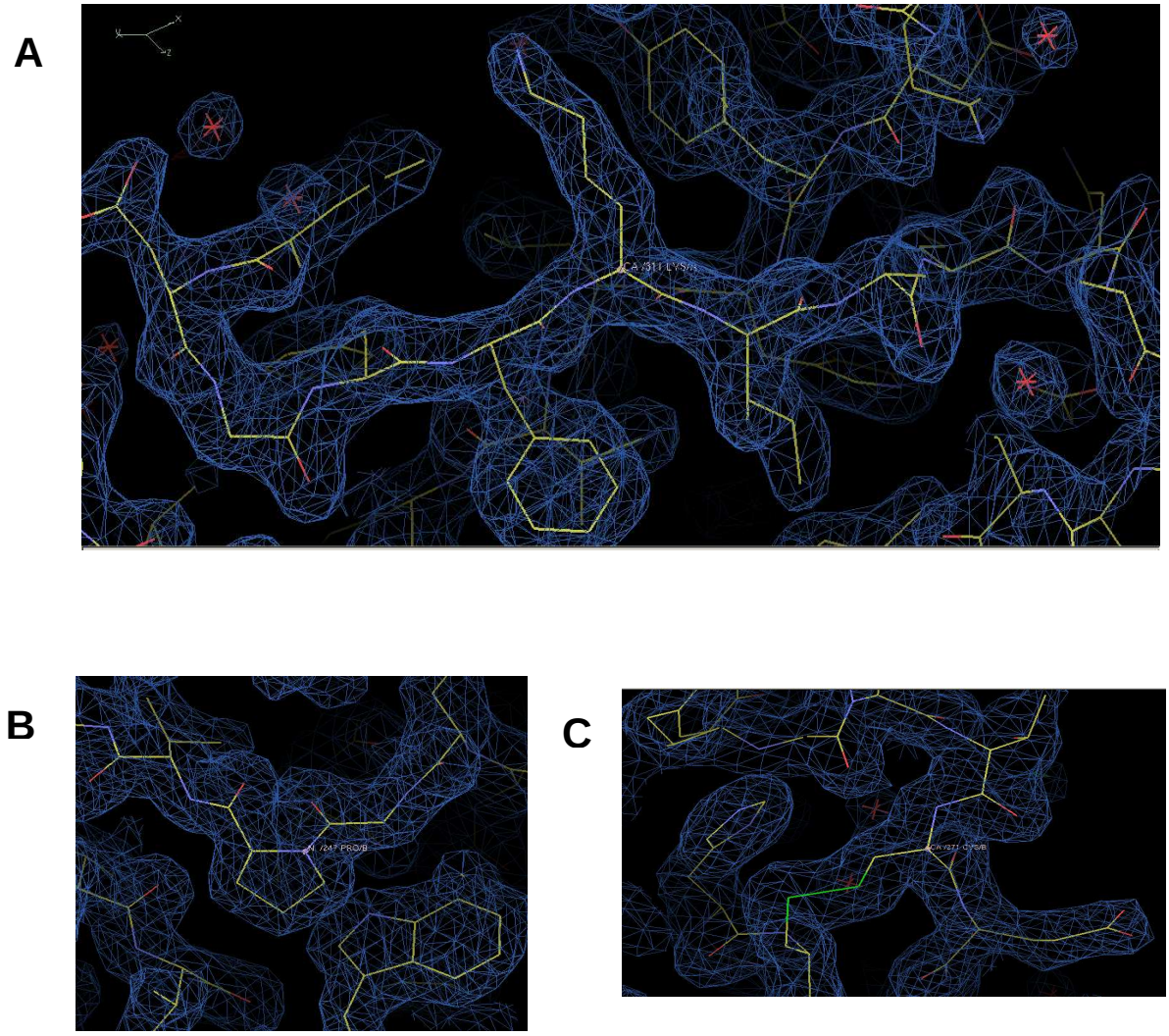


Figura 42. Seção do mapa de densidade eletrônica $2F_o$-F_c do cristal de pCAL2Cys25Ser com contornos 1,0σ. (A) Mapa de densidade eletrônica do monômero A. (B) e (C) Mapa de densidade eletrônica do monômero B.

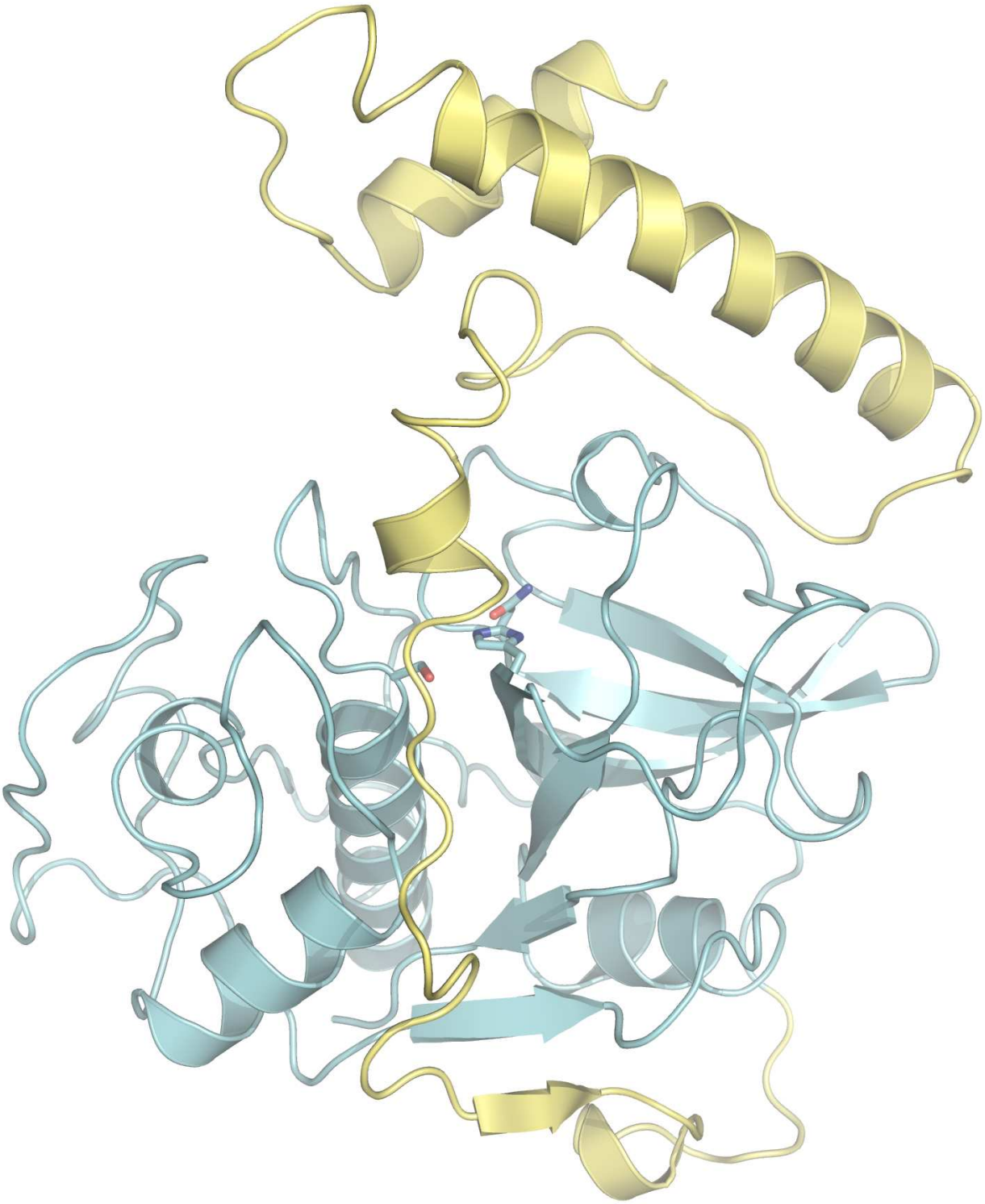


Figura 43. Estrutura por raios X da pCAL2Cys25Ser de *Tenebrio molitor*. A estrutura foi determinada por substituição molecular usando a pró-catepsina L 3 de *T. molitor* como modelo. Em ciano está representado a parte da enzima madura e em amarelo o pró-peptídeo. As cadeias laterais do resíduo catalítico His163, Asn183 e o resíduo do sítio ativo mutado Cys25→Ser estão representados na forma de bastão, coloridos de acordo com o tipo de átomo (C em ciano, N em azul e O em vermelho). Esta figura foi construída utilizando o programa PyMol (DeLano, 2002).

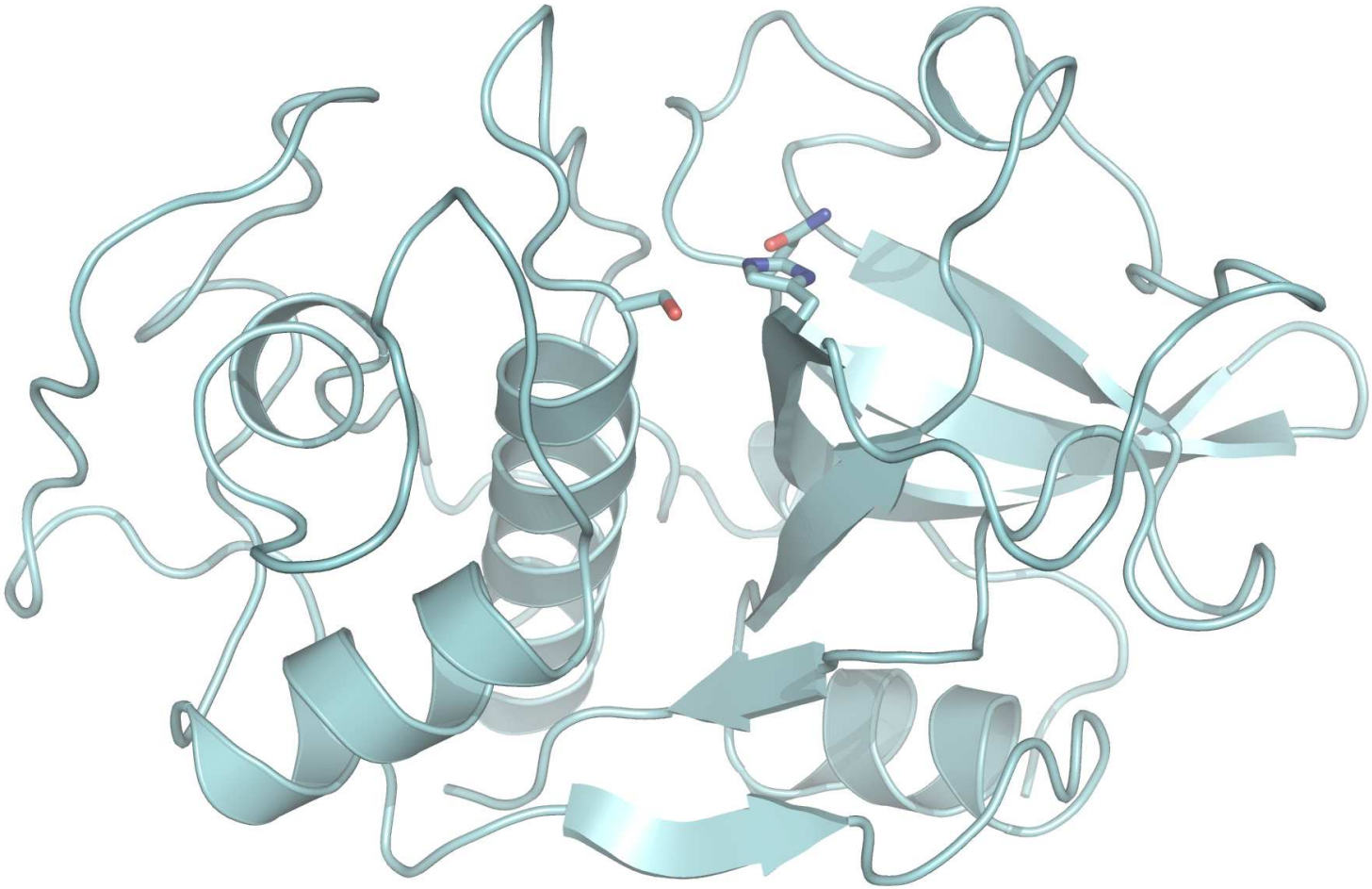


Figura 44. Enzima madura (CAL2). Esta figura foi construída no programa PyMol (DeLano, 2002) omitindo o pró-peptídeo. O domínio N-terminal é composto pricipalmente por α-hélices e o domínio C-terminal por fitas β. As cadeias laterais do resíduo catalítico His163, Asn183 e do resíduo do sítio ativo mutado Cys25→Ser estão representados na forma de bastão, coloridos de acordo com o tipo de átomo (C em ciano, N em azul e O em vermelho).

A análise da geometria da cadeia principal com o diagrama de Ramachandran usando o programa PROCHECK mostra que 88,4% dos resíduos estão em regiões favoráveis e 11,6% em regiões permitidas (figura 45).

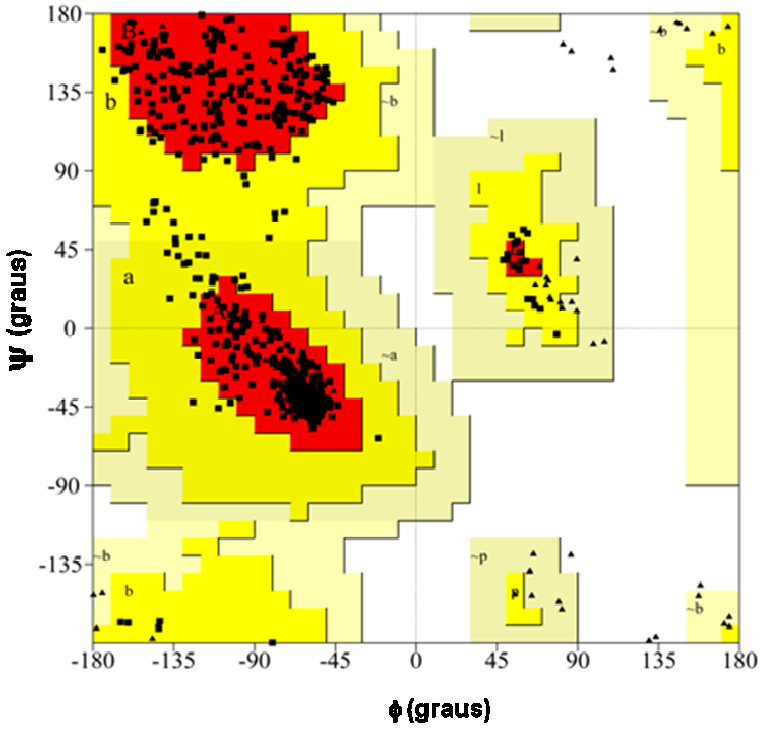


Figura 45. Diagrama de Ramachandran de pCAL2Cys25Ser de *T. molitor* usando o programa PROCHECK (Laskowski et al., 1993). O gráfico mostra que 88,4% dos resíduos encontra-se em regiões preferidas (regiões em vermelho) e 11,6% em regiões permitidas (regiões em amarelo). Os resíduos de glicina são mostrados como triângulos.

A comparação das estruturas de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser mostra que elas são similares e que as cadeias laterais dos resíduos catalíticos se sobrepõem (figura 46).

A figura 47 apresenta a comparação entre as estruturas secundárias das pró-catepsinas L digestivas (pCAL2 e pCAL3) de *T. molitor* com as pró-catepsinas L de humano, K de humano e L 1 de *F. hepatica*.

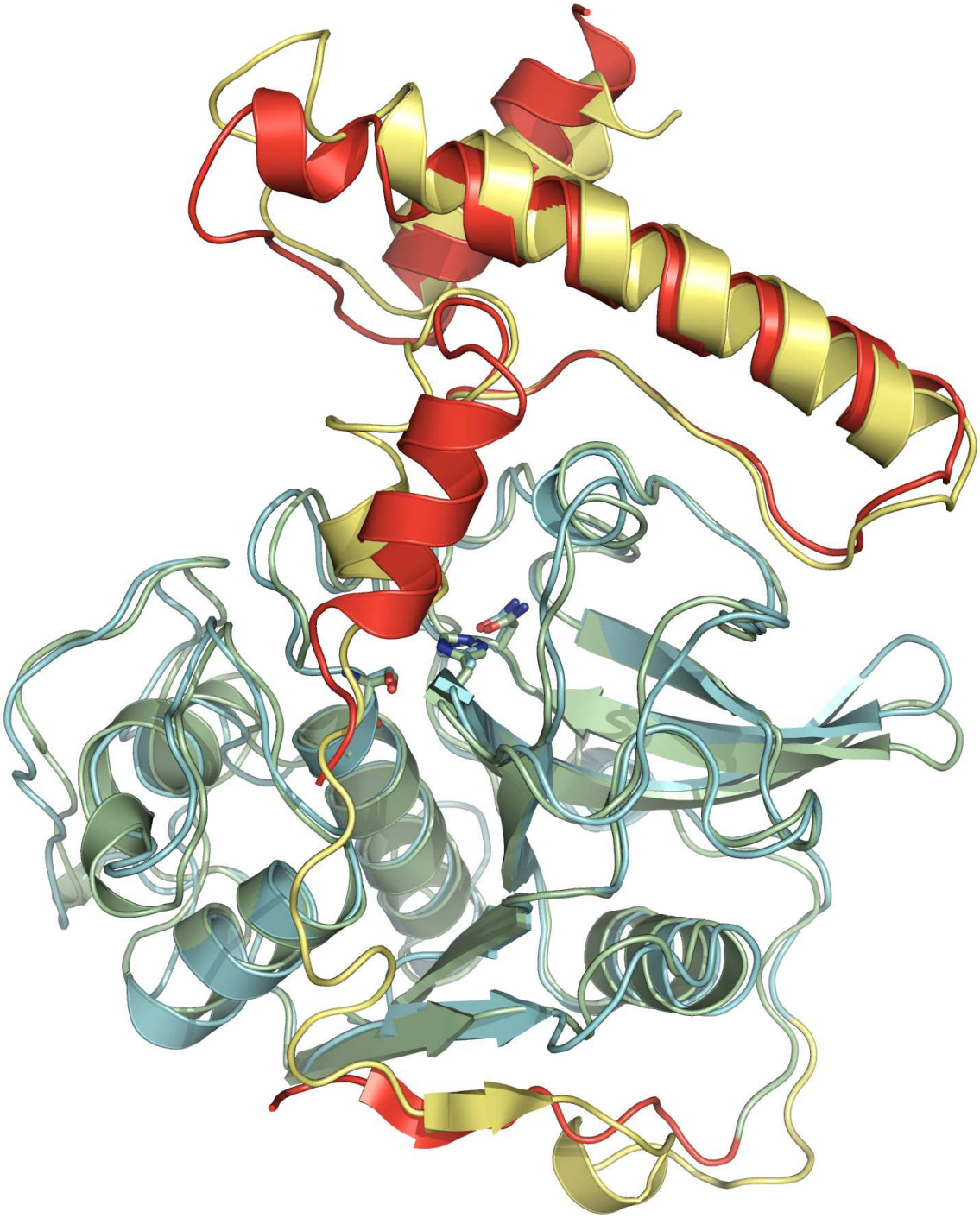


Figura 46. Comparação das estruturas de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser de *T. molitor.* Em verde está representado a parte da enzima madura (CAL3) e em vermelho o pró-peptídeo da pCAL3Cys26Ser. Em ciano está representado a parte da enzima madura (CAL2) e em amarelo o pró-peptídeo da pCAL2Cys25Ser. As cadeias laterais dos resíduos catalíticos estão representados na forma de bastão. Esta figura foi construída utilizando o programa PyMol (DeLano, 2002).

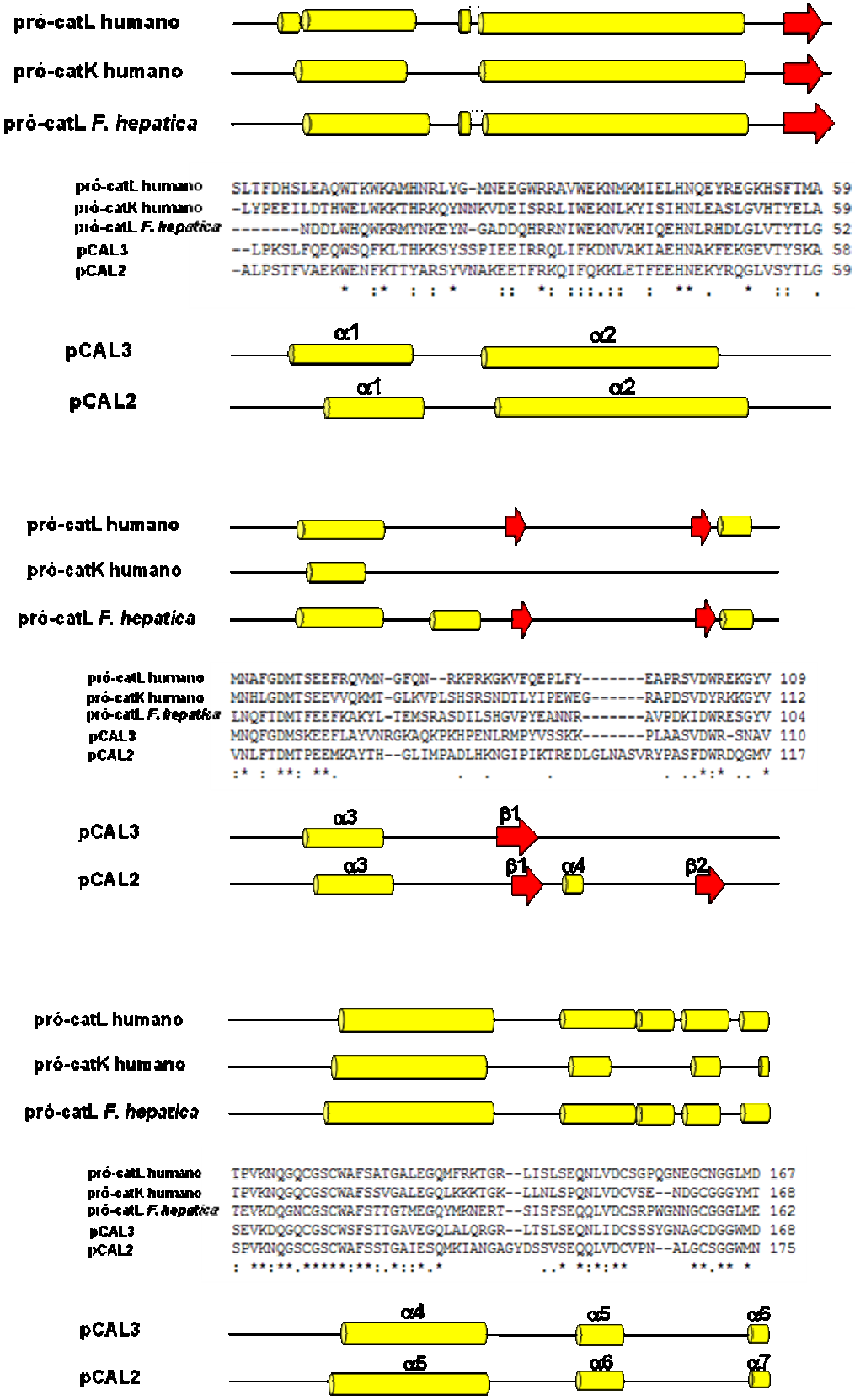

pró-catL humano
pró-catK humano
pró-catL F. hepatica
pró-catL humano SLIFDHSLEAQWTKWKAMHNRLYG-MNEEGWRRAVWEKNMKMIELHNQEYREGKHSFTMA 59
pró-catK humano -LYPEEILDTHWELWKKTHRKQYNNKVDEISRRLIWEKNLKYISIHNLEASLGVHTYELA 59
pró-catL F. hepatica -------NDDLWHQWKRMYNKEYN-GADDQHRRNIWEKNVKHIQEHNLRHDLGLVTYTLG 52
pCAL3 --LPKSLFQEQWSQFKLTHKKSYSSPIEEIRRQLIFKDNVAKIAEHNAKFEKGEVTYSKA 58
pCAL2 -ALPSTFVAEKWENFKTTYARSYVNAKEETFRKQIFQKKLETFEEHNEKYRQGLVSYTLG 59
pCAL3
α1
α2
pCAL2
α1
α2
pró-catL humano
pró-catK humano
pró-catL F. hepatica
pró-catL humano MNAFGDMTSEEFRQVMN-GFQN--RKPRKGKVFQEPLFY-------EAPRSVDWREKGYV 109
pró-catK humano MNHLGDMTSEEVVQKMT-GLKVPLSHSRSNDTLYIPEWEG------RAPDSVDYRKKGYV 112
pró-catL F. hepatica LNQFTDMTFEEFKAKYL-TEMSRASDILSHGVPYEANNR-------AVPDKIDWRESGYV 104
pCAL3 MNQFGDMSKEEFLAYVNRGKAQKPKHPENLRMPYVSSKK-------PLAASVDWR-SNAV 110
pCAL2 VNLFTDMTPEEMKAYTH--GLIMPADLHKNGIPIKTREDLGLNASVRYPASFDWRDQGMV 117
pCAL3
α3
β1
pCAL2
α3
β1
α4
β2
pró-catL humano
pró-catK humano
pró-catL F. hepatica
pró-catL humano TPVKNQGQCGSCWAFSATGALEGQMFRKTGR--LISLSEQNLVDCSGPQGNEGCNGGLMD 167
pró-catK humano TPVKNQGQCGSCWAFSSVGALEGQLKKKTGK--LLNLSPQNLVDCVSE--NDGCGGGYMT 168
pró-catL F. hepatica TEVKDQGNCGSCWAFSTTGTMEGQYMKNERT--SISFSEQQLVDCSRPWGNNGCGGGLME 162
pCAL3 SEVKDQGQCGSCWSFSTTGAVEGQLALQRGR--LTSLSEQNLIDCSSSYGNAGCDGGWMD 168
pCAL2 SPVKNQGSCGSCWAFSSTGAIESQMKIANGAGYDSSVSEQQLVDCVPN--ALGCSGGWMN 175
pCAL3
α4
α5
α6
pCAL2
α5
α6
α7

Figura 47...

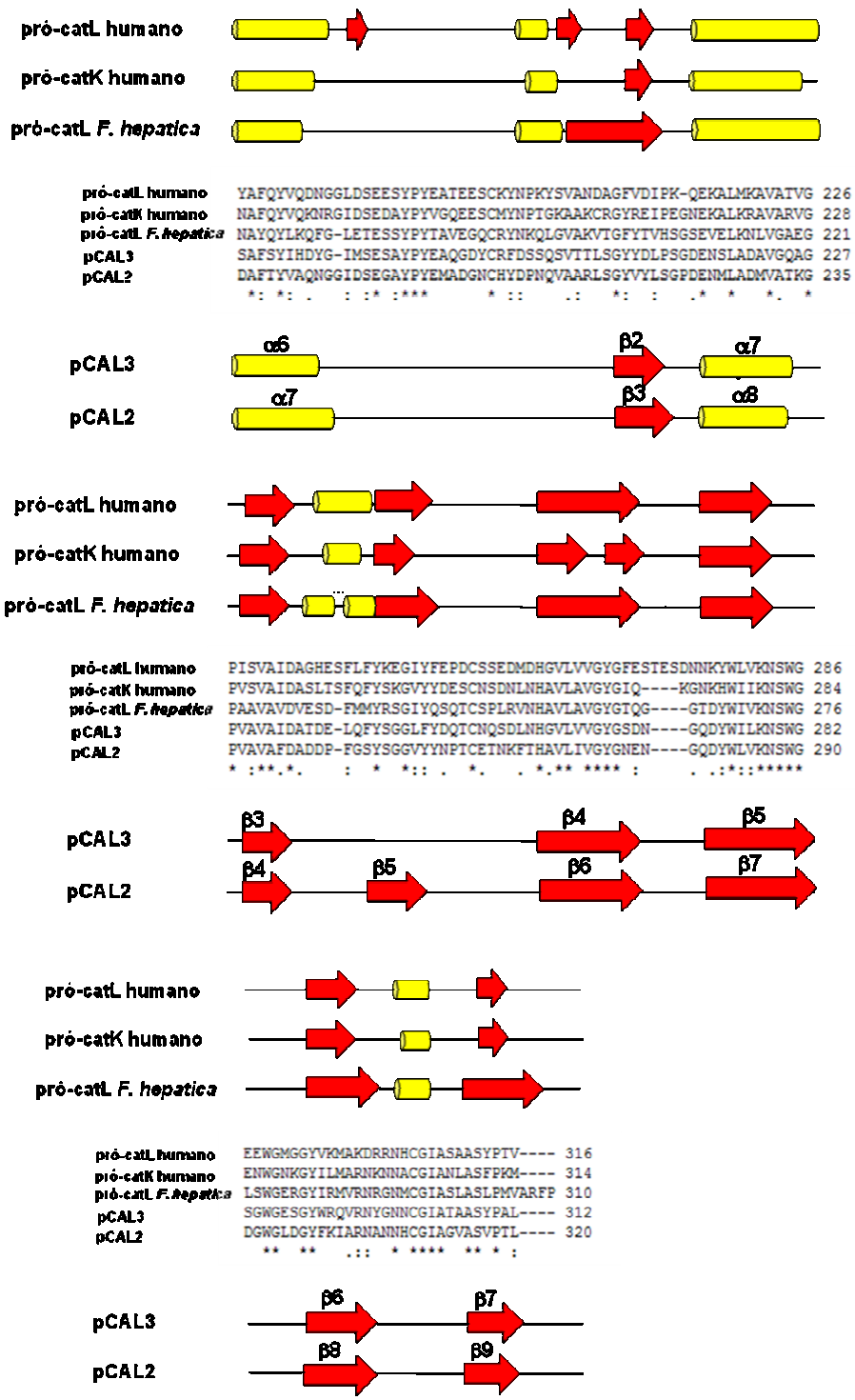


Figura 47. Comparação entre as pró-catepsinas L digestivas (pCAL2 e pCAL3), L de humano (pró-catL humano), K de humano (pró-catK humano) e L de *Fasciola hepática* (pró-catL *F. hepática*). No alinhamento das sequências de aminoácidos o asterisco indica resíduos idênticos, dois pontos indica substituição conservativa e um ponto indica substituição semi-conservativa. As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW. A linha contínua mostra a comparação das estruturas secundárias: pró-catepsina L de humano (1CS8), pró-catepsina K de humano (1BY8), pró-catepsina L 1 de *Fasciola hepática* (2OX6), pró-catepsina L 3 de *T. molitor*, pró-catepsina L 2 de *T. molitor*, com seus respectivos códigos do PDB. Os cilindros em amarelo representam as estruturas helicoidais e as setas em vermelho as estruturas Beta.

O subsítio S2 é provavelmente o melhor definido sítio de ligação ao substrato. Resíduos do domínio L e do domínio R fazem parte do subsítio S2. Em geral, o caráter do subsítio S2 é hidrofóbico com resíduos alifáticos e resíduos de metionina (Turk *et al*., 1998). A capacidade de aceitar ou excluir porções do substrato depende do tamanho, forma e volume do subsítio, além da ausência ou presença de interações hidrofóbicas, ligações iônicas e pontes de hidrogênio (Stack *et al*., 2008). A catepsina B e a cruzaína apresentam um resíduo de ácido glutâmico na posição 205 que corresponde ao fundo do subsítio. Assim, esta substituição permite a clivagem de substratos com arginina em P2 de maneira mais eficiente (Turk *et al*., 1998).

A figura 48 mostra que o subsítio S2 da pCAL3Cys26Ser é formado pelos seguintes resíduos: Trp67, Met68, Ala133, Leu157, Asn158, Gly160 e Ala205. Trp67 e Leu157 estão localizados na entrada do subsítio e Ala205 no fundo do subsítio. O subsítio S2 da pCAL2Cys25Ser (figura 49) é composto pelos resíduos: Trp67, Met68, Ala133, Phe157, Thr158, Ala160 e Val205. Trp67 e Phe157 estão localizados na entrada do subsítio e Val205 no fundo do subsítio. Como já mencionado, CAL3 foi capaz de hidrolisar Z-FR-MCA e Z-RR-MCA e CAL2 hidrolisou apenas Z-FR-MCA. O substrato Z-FR-MCA apresenta fenilalanina em P2, enquanto o substrato Z-RR-MCA apresenta arginina em P2. Uma possível explicação para CAL2 não hidrolisar Z-RR-MCA é a presença de dois resíduos hidrofóbicos volumosos na entrada do seu subsítio S2.

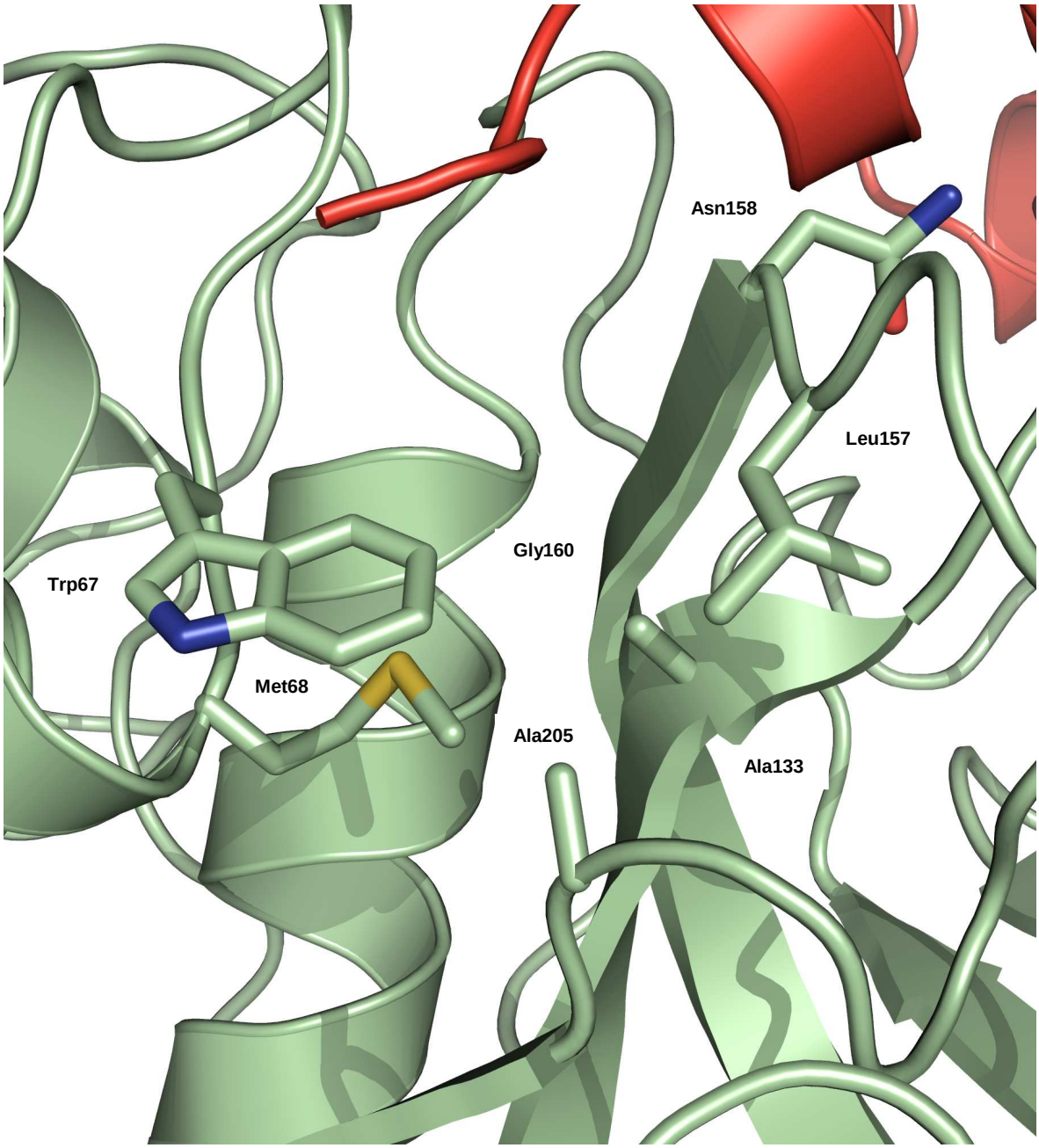


Figura 48. Subsítio S2 da pCAL3Cys26Ser. Os resíduos presentes no subsítio S2 são: Trp67, Met68, Ala133, Leu157, Asn158, Gly160 e Ala205 (numeração baseada na sequência da papaína). Trp67 e Leu157 estão localizados na entrada do subsítio. Esta figura foi construída no PyMol.

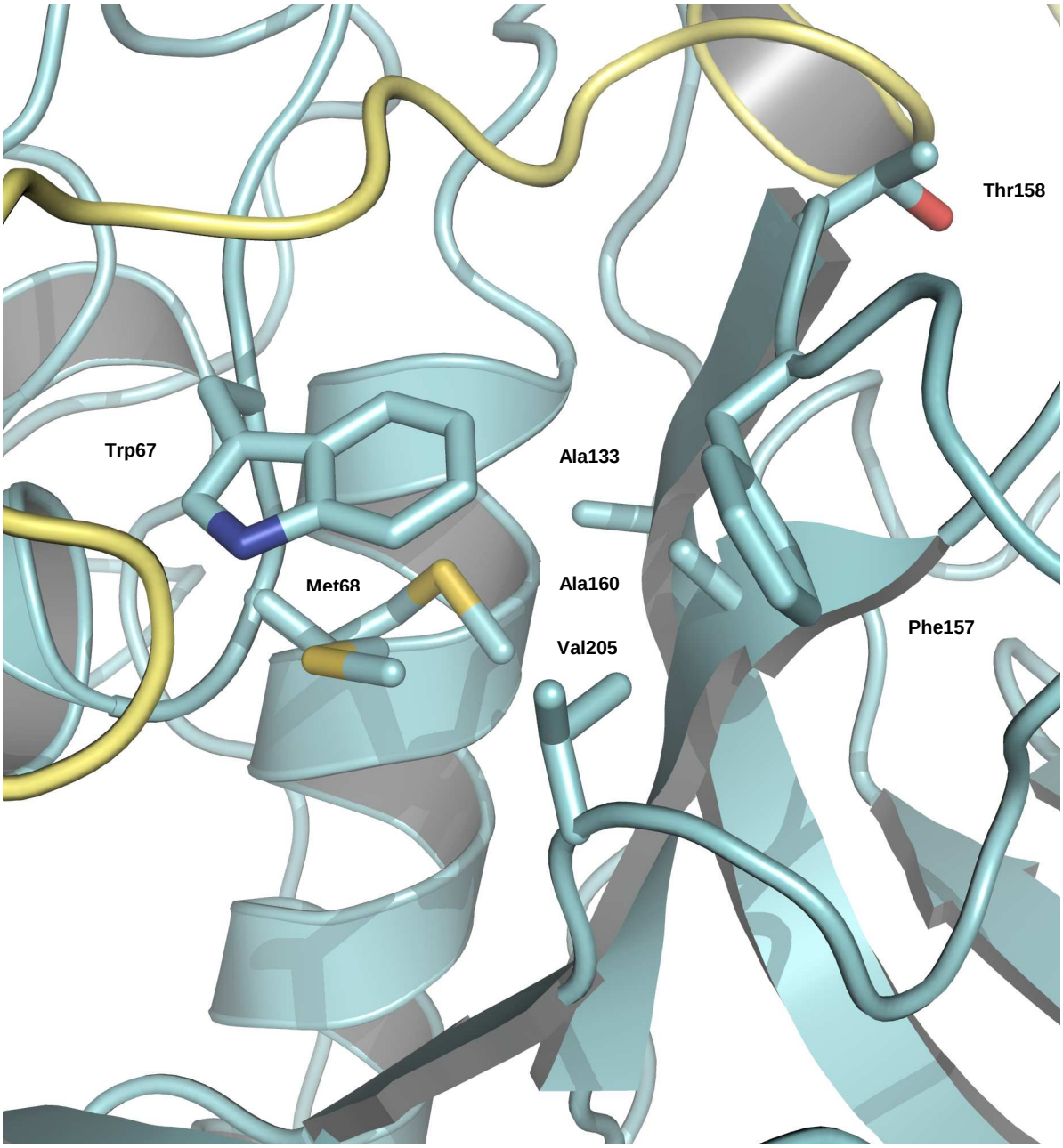


Figura 49. Subsítio S2 da pCAL2Cys25Ser. Os resíduos presentes no subsítio S2 são: Trp67, Met68, Ala133, Phe157, Thr158, Ala160 e Val205 (numeração baseada na sequência da papaína). Trp67 e Phe157 estão localizados na entrada do subsítio. Esta figura foi construída no PyMol.

Os subsítios S2 das pró-catepsinas L de humano (Leu67, Met68, Ala133, Met157, Asp158, Gly160 e Ala205), K de humano (Tyr67, Met68, Ala133, Leu157, Asn158, Ala160 e Leu205) e L 1 de *F. hepatica* (Leu67, Met68, Ala133, Val157, Asn158, Ala160 e Leu205) não apresentaram resíduos volumosos como a fenilalanina e o triptofano. A catepsina L de humano e a catepsina K de humano são capazes de hidrolisar Z-FR-MCA e Z-RR-MCA (Lecaille *et al*., 2002b). A catepsina L 1 de *F. hepática* hidrolisa Z-FR-MCA (Stack *et al*., 2008). Na literatura não existem dados sobre a atividade da catepsina L 1 de *F. hepatica* sobre o substrato Z-RR-MCA. É importante ressaltar que as catepsinas L 3 de *T.molitor*, L de humano e K de humano clivam Z-FR-MCA com maior eficiência quando comparado com Z-RR-MCA.

A comparação dos subsítios de pCAL3Cys26Ser e pCAL2Cys25Ser mostra que eles são similares e que as cadeias laterais dos resíduos se sobrepõem (figura 50).

4.19. Expressão e purificação de pCAL1 e pCAL1 mutante de *T. molitor*

Com o objetivo de produzir uma maior quantidade de CAL1 recombinante para os experimentos de cristalografia, pCAL1 foi clonada no vetor de expressão pAE. A cepa utilizada na obtenção da proteína recombinante foi a OrigamiB(DE3). No vetor pAE a proteína recombinante é expressa em fusão com uma cauda de histidina no N-terminal facilitando a sua identificação e purificação. A cepa OrigamiB(DE3) resultou na obtenção de uma fração de pCAL1 solúvel a 25℃ (figura 51). A redução da temperatura de indução para 20℃ não resultou num aumento da fração da enzima recombinante solúvel. pCAL1 foi purificada por cromatografia de afinidade e apresentou um grau de pureza satisfatório (figura 51). A incubação em

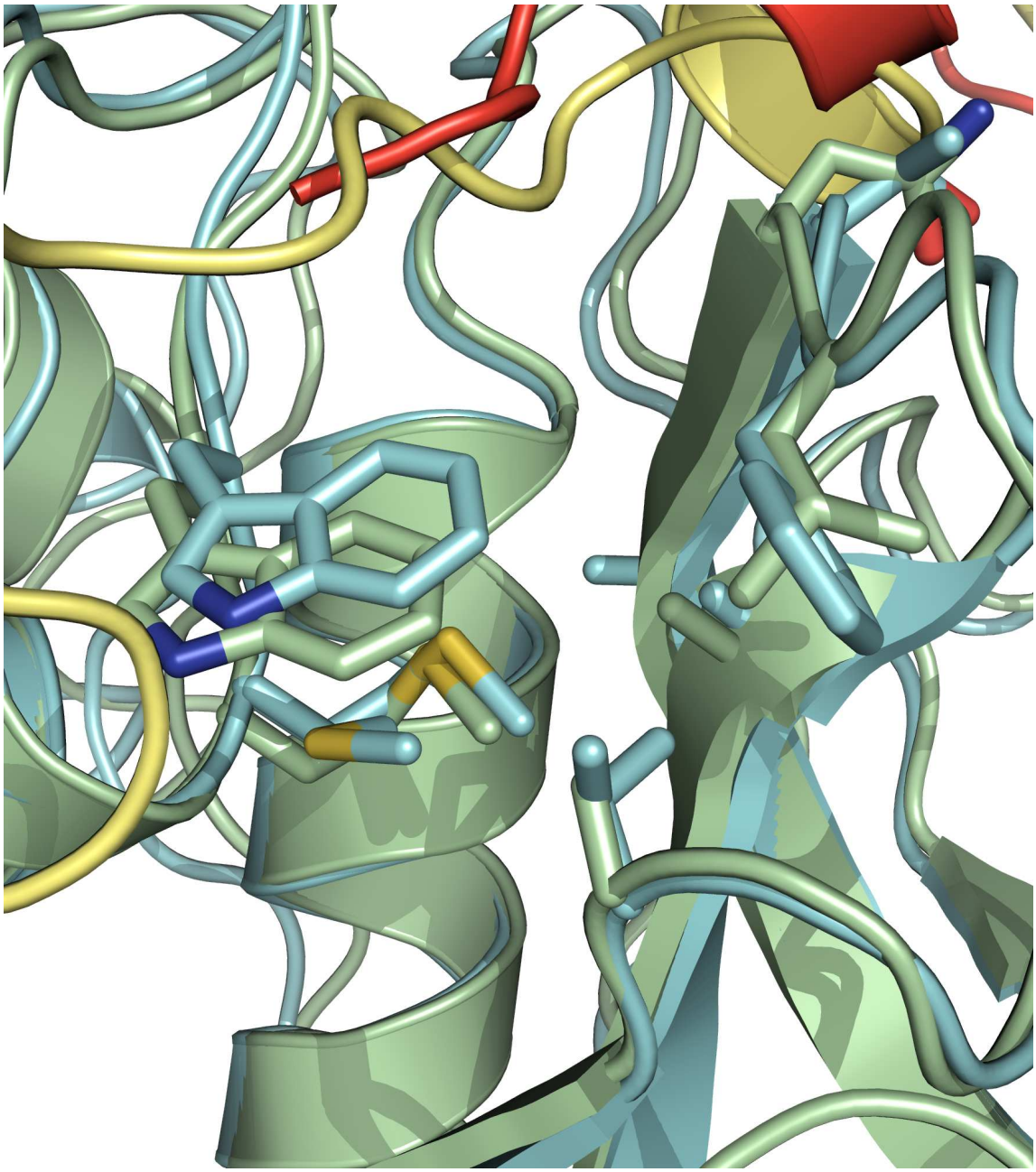


Figura 50. Comparação do subsítio S2 nas pró-catepsinas L 2 e 3 de *T. molitor*. Os resíduos de aminoácidos (Trp67, Met68, Ala133, Leu157, Asn158, Gly160 e Ala205) do subsítio S2 da pCAL3Cys26Ser estão representados em verde e os resíduos de aminoácidos (Trp67, Met68, Ala133, Phe157, Thr158, Ala160 e Val205) do subsítio S2 da pCAL2Cys25Ser estão representados em ciano. A numeração usada é baseada na sequência da papaína. A figura foi construída no PyMol.

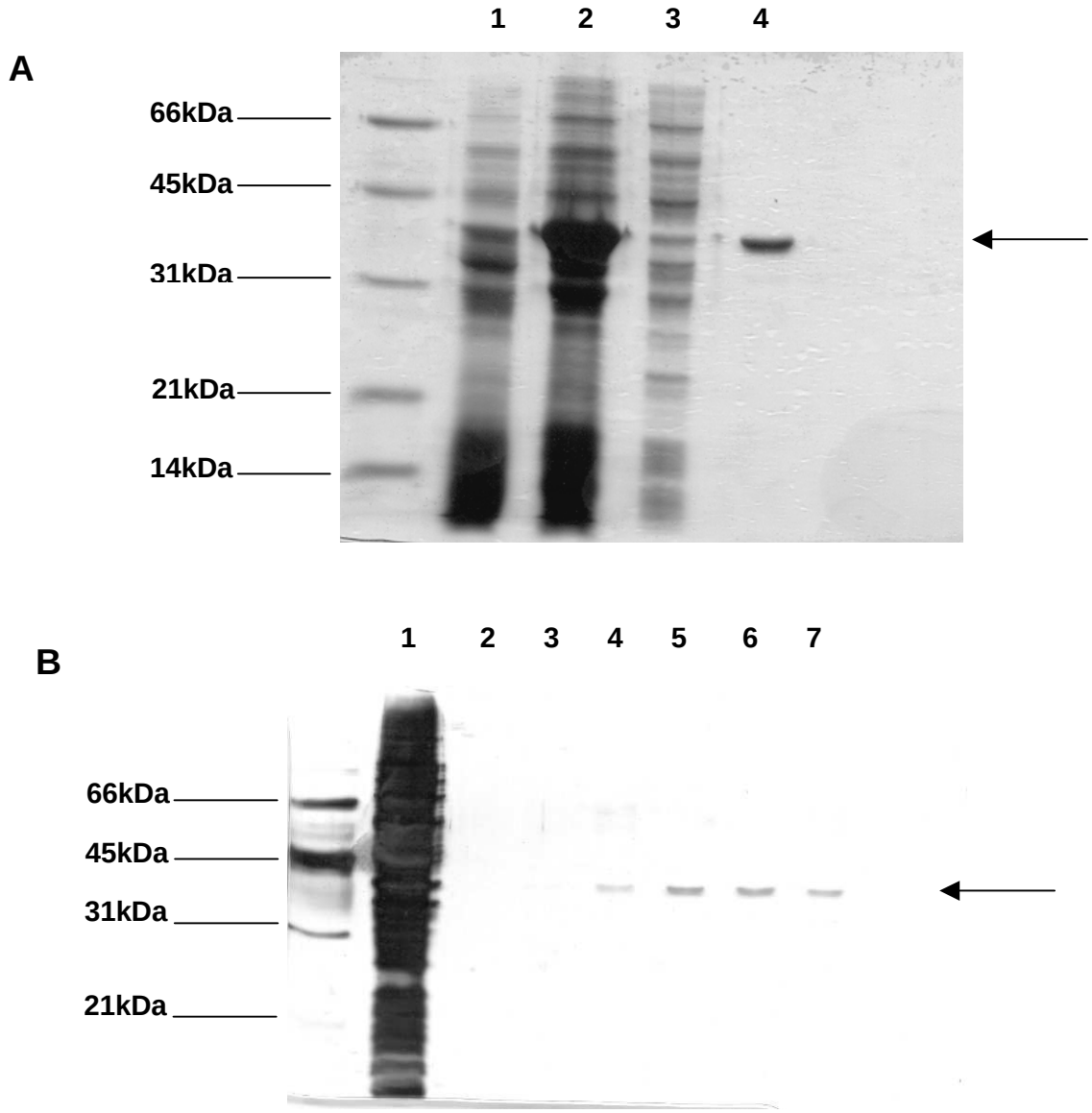
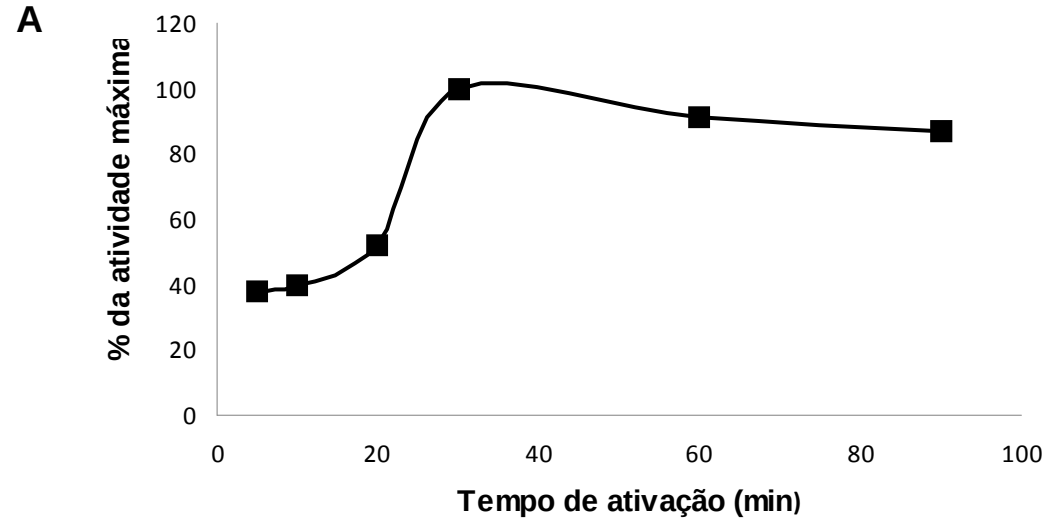


Figura 51. Expressão e purificação de pCAL1 recombinante. (A) A cultura de bactérias OrigamiB(DE3) transformadas com a construção pAE-pCAL1 crescida a 37℃ por uma noite foi diluída pra OD_{600nm} 0,1 e incubada a 25℃. Após OD_{600nm} atingir 0,7, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 15 horas. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle não induzidas (canaleta 1), de culturas induzidas com IPTG (canaleta 2), a fração solúvel do lisado bacteriano (canaleta 3) e amostra de proteína purificada eluída utilizando-se 300mM de imidazol foram separados em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com Coomassie Blue. (B) A fração solúvel do lisado bacteriano (canaleta 1) foi incubada com a resina Ni^{+2}-NTA agarose por 1 hora a 4℃. As eluições do material adsorvido foram feitas com 25, 50, 75, 100, 150 e 300mM de imidazol (canaletas 2 a 7). A seta indica pCAL1 recombinante. As amostras foram separadas em SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com prata.

pH ácido resultou na formação da enzima madura com atividade sobre o substrato Z-FR-MCA (figura 52).

A substituição do resíduo de cisteína pelo resíduo de serina no sítio ativo na pró-catepsina L 1 foi necessária para evitar a autoativação nos ensaios de cristalização do zimogênio. Autores propõem que a substituição acima não desestabiliza a estrutura da pró-enzima. O nível de indução e o perfil de purificação dos mutantes foram semelhantes ao do selvagem (figura 53). A proteína mutante não apresentou atividade sobre o substrato Z-FR-MCA e não ocorreu processamento em pH ácido.

Para os ensaios de cristalização, pCAL1Cys26Ser recombinante purificada foi submetida à diálise em tampão Tris-HCl 10mM pH 8,3. Em seguida, a amostra foi concentrada em filtro Amicon YM10 para concentração final de 4,0mg/mL. Concentrações maiores que 4,0mg/mL de proteína não foram utilizadas, pois nestas condições mais de 50% da placa apresentou precipitado amorfo. Mesmo na concentração 4,0mg/mL foram observadas muitas gotas com precipitados amorfos. Experimentos com concentrações menores de pCAL1Cys26Ser são necessários para a padronização da concentração de proteína recombinante nos testes de cristalização.



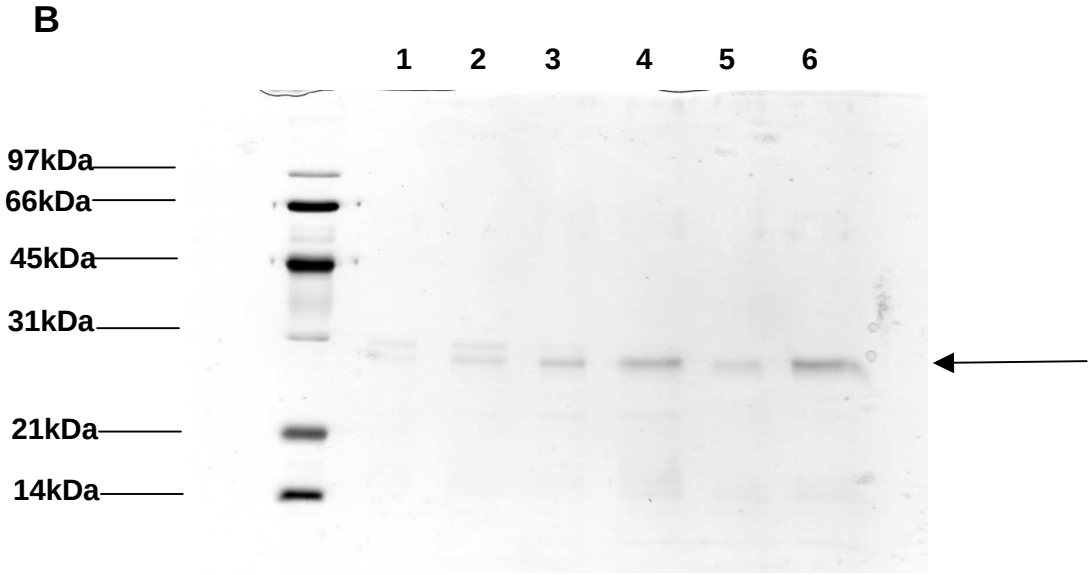


Figura 52. Processamento autocatalítico de pCAL1 a pH 4,0. pCAL1 recombinante purificada foi incubada a 37℃ em diferentes tempos em tampão acetato de sódio 100mM pH 4,0. A atividade foi monitorada através de ensaios utilizando o substrato Z-FR-MCA. Os resultados estão expressos em função da maior atividade (A). O painel B mostra as amostras nos tempos 5, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação a 37℃ em pH 4,0 (canaletas 1-6). A seta indica CAL1 madura. As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com prata.

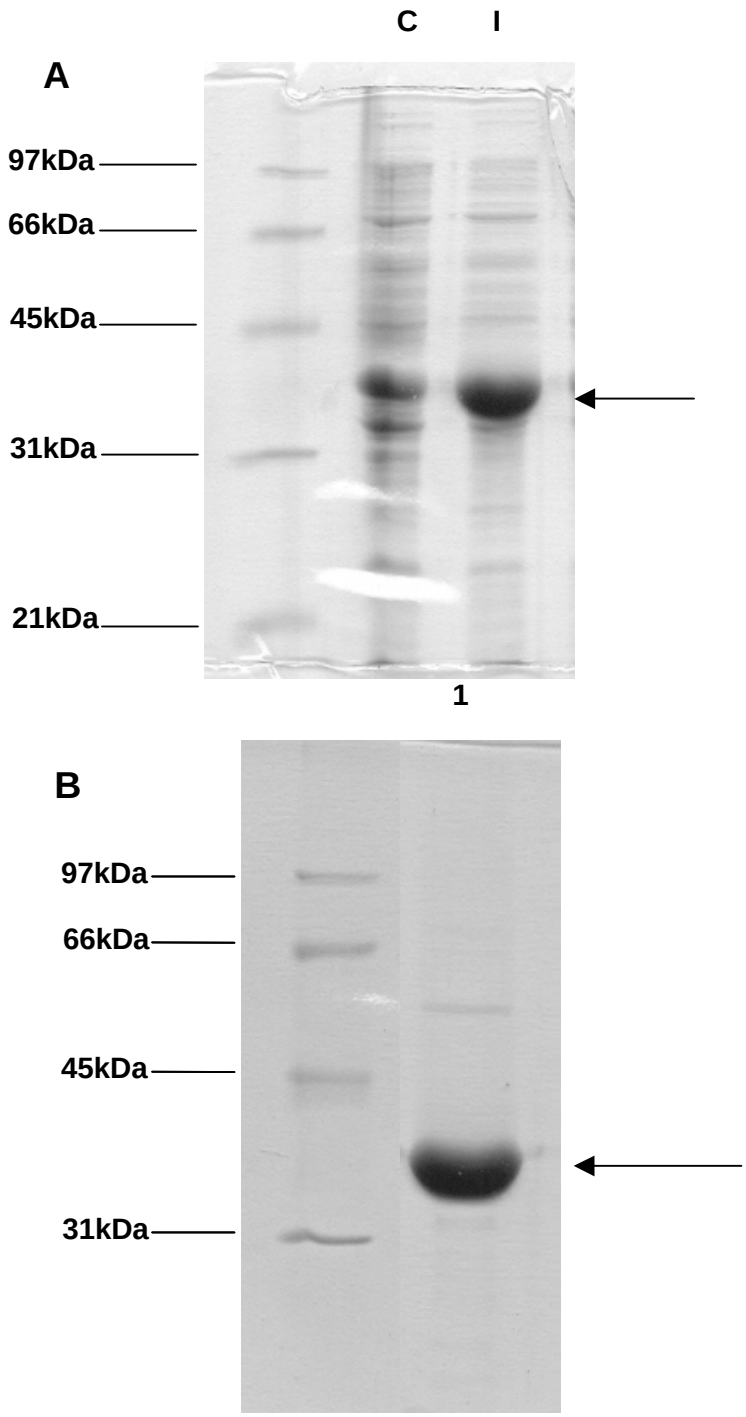


Figura 53. (A) Expressão de pCAL1 mutante. Para expressão, a cultura de bactérias OrigamiB(DE3), transformada com a construção pAE-pCAL1Cys26Ser, crescida a 37℃, por uma noite, foi diluída para DO_{600nm}=0,1 em meio fresco a 25℃. Após DO_{600nm} atingir 0,7, foi adicionado IPTG para concentração final de 1mM, seguindo-se incubação por 15 horas a 25℃. pCAL1 mutante foi purificado por cromatografia de afinidade em Ni^{+2}-NTA agarose a partir de culturas induzidas com IPTG a 25℃ por 15 horas. Os extratos bacterianos protéicos de culturas controle-não induzidas (C) e de culturas induzidas com IPTG (I) foram separadas em SDS-PAGE 12% e o gel foi corado com *Coomassie Blue*. A seta indica pCAL1 mutante. **(B) Purificação de pCAL1 mutante.** A purificação foi realizada a partir de culturas induzidas com IPTG a 25℃ por 15 horas A eluição foi feita com 300mM de imidazol (canaleta 1). O gel foi corado com Coomassie Blue.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, realizamos a expressão das pró-catepsinas L digestivas (pCAL2 e pCAL3) de *T. molitor* em bactérias. A incubação em pH ácido levou a ativação de pCAL2 recombinante purificada, resultando na enzima madura CAL2 com atividade sobre o substrato Z-FR-MCA. A ativação de pCAL3 recombinante purificada, em tampão citrato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA a 37℃, resultou na formação de CAL3 sem au tólise. O seqüenciamento N-terminal de CAL3 mostrou que a clivagem ocorreu 2 aminoácidos antes do N-terminal da CAL3 madura. A enzima CAL3 madura foi capaz de hidrolisar o substrato Z-FR-MCA.

O anticorpo policlonal anti-pCAL2 foi produzido em coelho utilizando pCAL2 recombinante purificada. Este anticorpo foi capaz de reconhecer uma banda de ~31kDa correspondente a CAL2 madura em amostras de homogeneizado de ventrículo anterior mais ventrículo médio de intestino médio de larvas de *T. molitor*. O anticorpo policlonal anti-pCAL3 foi produzido em coelho utilizando pCAL3 recombinante purificada. O anticorpo anti-pCAL3 possibilitou a análise da expressão de pCAL3 e CAL3 em diferentes tecidos de *T. molitor*. Esta análise mostrou que a tradução ocorreu apenas no intestino médio. A imunocitolocalização de pCAL3 foi feita com o anticorpo anti-pCAL3 e mostrou a presença de pCAL3 em pequenas vesículas em células do epitélio do intestino médio anterior e em células do epitélio do intestino médio, sugerindo que esta enzima é secretada nos dois terços anteriores do intestino médio. Estes dados reforçam o papel de CAL3 como enzima digestiva. A região anterior do intestino médio é mais ácida (pH luminal 5,6), enquanto a posterior é mais alcalina (pH luminal 7,9) (Terra *et al*., 1985). O valor de

pH do intestino médio anterior favorece a atividade de CAL2 (pH ótimo 6,0) e de CAL3 (pH ótimo 7,0).

Para os experimentos de cristalografia, as pró-enzimas pCAL2 e pCAL3 foram expressas como formas inativas. A mutação Cys25→Ser foi realizada para evitar autoativação das pró-enzimas. pCAL2 e pCAL3 mutantes foram expressas e purificadas seguindo os mesmos procedimentos estabelecidos para pCAL2 e pCAL3. A incubação de pCAL3Cys26Ser recombinante purificada na presença de 0,5μg de CAL3 madura nativa a 37℃ em tampão citrato de sódio 100mM pH 5,0 contendo 2mM de DTT e 2mM de EDTA resultou na formação de um polipeptídeo menor com ~38kDa que corresponde a massa molecular de CAL3 madura.

Na determinação da estrutura de pCAL3Cys26Ser por substituição molecular, utilizamos a estrutura da pró-catepsina L 1 de *Fasciola hepatica* (Stack *et al*., 2008) como modelo. A estrutura foi determinada a 2,1Å com R final de 16,19% e R_{free} de 20,5%. Para a determinação da estrutura de pCAL2Cys25Ser, utilizamos o método de substituição molecular usando a estrutura da pró-catepsina L 3 de *T. molitor* como modelo. A estrutura foi determinada a 2,0 Å com fator R final de 17,61% e R_{free} de 22,48%. Ambas as enzimas apresentaram estruturas terciárias similares a outras cisteína proteinases da família da papaína com domínio N-terminal composto principalmente por α-hélices e domínio C-terminal por fitas β. Estes domínios são separados por uma fenda contendo o sítio ativo com os resíduos Cys25 e His159 (numeração da papaína) em cada domínio. Como observado para outras pró-catepsinas, o pró-peptídeo apresenta um domínio globular na sua porção N-terminal e uma região pouca estruturada na porção C-terminal. Apesar de termo determinado a estrutura das pró-catepsinas L digestivas, não deve existir mudanças conformacionais significativas entre a porção madura da pró-catepsina L e da

catepsina L. Estudos mostraram que a estrutura cristalográfica da catepsina L de humano complexada com o inibidor E-64 (Fujishima *et al.*, 1997) não apresentou diferenças significativas em relação à porção madura da pró-catepsina L de humano (Coulombe *et al*., 1996b).

O subsítio S2 das cisteína proteinases é muito importante na especificidade de substrato. Um dado interessante mostrado no trabalho foi à presença dos resíduos hifdrofóbicos volumosos Trp67 e Phe157 na entrada do subsítio S2 da pCAL2Cys25Ser. Esta observação pode ser uma possível explicação para CAL2 não hidrolisar Z-RR-MCA com Arg em P2 e hidrolisar Z-FR-MCA com Phe em P2. pCAL3Cys26Ser contém Trp67 e Leu157 na entrada do subsítio S2 e foi capaz de hidrolisar Z-FR-MCA e Z-RR-MCA. Vale ressaltar que Ala205 está localizada no fundo do subsítio S2 da pCAL3Cys26Ser, enquanto Val205 está no fundo do subsítio S2 da pCAL2Cys25Ser. Estudos de mutagênese sítio dirigida com a catepsina K mostraram que a substituição da leucina na posição 205 por alanina resulta num aumento do valor do K_{cat}/K_m sobre os substratos Z-FR-MCA e Z-RR-MCA (Lecaille *et al*., 2002b). A disponibilidade das estruturas tridimensionais aliadas a estudos de mutagênese sítio dirigida e ensaios usando substratos de fluorescência apagada variando a posição P2 podem mostrar melhor a especificidade do subsítio S2 das catepsinas L digestivas. Será interessante estudar em detalhe as especificidades de CAL2 e CAL3 usando substratos de fluorescência apagada, variando também as posições P3 e P1'.

Para a produção de uma maior quantidade de pCAL1 para os experimentos de cristalografia, a sequência codificadora de pCAL1 foi clonada no vetor de expressão pAE. A incubação de pCAL1 recombinante purificada em pH ácido resultou na enzima madura com atividade sobre o substrato Z-FR-MCA. pCAL1 foi

expressa como uma forma inativa (Cys26→Ser) para experimentos de cristalização do zimogênio. Testes iniciais de cristalização foram feitos com pCALCys26Ser. Contudo, será necessário testar outras concentrações de pCAL1 mutante.

6. Referências Bibliográficas

Alves, L.C., Almeida, P.C., Franzoni, L., Juliano, L. & Juliano, M.A. (1996) Synthesis of N-alpha-protected aminoacyl 7-amino-4-methyl-coumarin amide by phosphorus oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. *Pept Res*, **9**, 92-96.

Baker, E.N. (1980) Structure of actinidin, after refinement at 1.7 A resolution. *J Mol Biol*, **141**, 441-524.

Barrett, A.J., Rawlings, N.D. & Wasner, J.F. (1998) Handbook of proteolytic enzymes. Academic press, London.

Bergfors, T. (2003) Seeds to crystals. *J Struct Biol,* **142**, 66-76.

Bown, D.P., Wilkinson, H.S., Jongsma, M.A. & Gatehouse, J.A. (2004) Characterization of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochem Mol Biol*, **34**, 305-320.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem,* **72**, 248-254.

Brömme D., Nallaseth F.S. & Turk, B. (2004) Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods,* **32**, 199-206.

Blum H., Beier H. & Gross H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis,* **8**, 93-99.

Cereghino J.L. & Cregg J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev,* **24**, 45-66.

Cho, W.L., Tsao, S.M., Hays, A.R., Walter, R., Chen, J.S., Snigirevskaya, E.S. & Raikhel, A.S. (1999) Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J Biol Chem,* **273**, 13311-13321.

Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* **50**, 760-763.

Collins, P.R., Stack, C.M., O′Neill, S.M., Doyle, S., Ryan, T., Brennan, G.P., Mousley, A., Stewart, M., Maule, A.G., Dalton, J.P. & Donnelly, S. (2004) Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propetide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *J Biol Chem,* **279**, 17038-17046.

Coulombe, R., Li, Y., Takebe, S., Ménard, R., Mason, P., Mort, J.S. & Cygler, M. (1996a) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human procathepsin L. *Proteins,* **25**, 398-400.

Coulombe, R., Grochulski, P., Sivaraman, J., Ménard, R., Mort, J.S. & Cycler, M. (1996b) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegement. *EMBO J,* **15**, 5492-5503.

Cristofoletti, P.T., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbé, Y. & Terra, W.R. (2003) Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol,* **49**, 11-24.

Cristofoletti P.T., Ribeiro A.F. & Terra W.R. (2005) The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: Sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochem Mol Biol,* **35**, 883-901.

Cygler, M., Sivaraman, J., Grochulski, P., Coulombe, R., Storer, A.C. & Mort, J.S. (1996) Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure,* **4**, 405-416.

Cygler, M. & Mort, J.S. (1997) Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie,* **79**, 645-652.

Delano, W.L. (2002) The PyMOL molecular graphics system DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

Delaria, K., Fiorentino, L., Wallace, L., Tamburini, P., Brownell, E. & Muller, D. (1994) Inhibition of cathepsin L-like cysteine protease by cytotoxic T-lymphocyte antigen-2β. *J Biol Chem*, **269**, 25172-25177.

Denizot, F., Brunet, J.F., Roustan, P., Harper, K., Suzan, M., Luciani, M.F., Mattei, M.G. & Golstein, P. (1989) Novel structures CTLA-2α and CTLA-2β expressed in mouse activated T cells and mast cells and homologous to cysteine proteinase proregions. *Eur J Immunol*, **19**, 631-635.

Dolenc, I., Turk, B., Pungercic, G., Ritonja, A. & Turk, V. (1995) Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. *J Biol Chem,* **270**, 21626-21631.

Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M. & Wolthers, B.G. (1968) Structure of papain. *Nature,* **218**, 929-932.

Eakin, A.E., Mills, A.A., Harth, G., McKerrow, J.H & Craik, C.S. (1992) The sequence, organization, and expression of the cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi. J Biol Chem*, **267**, 7411-7420.

Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* **60**, 2126-2132.

Fujishima, A., Imai, Y., Nomura, T., Fujisawa, Y., Yamamoto, Y. & Sugawara, T. (1997) The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. *FEBS Lett*, **407**, 47-50.

Gauthier, J.P., Legeai, F., Zasadzinski, A., Rispe, C. & Tagu, D. (2007) AphidBase: a database for aphid genomic resources. *Bioinformatics*, **23**, 783-784.

Gavira J.A., González-Ramírez L.A., Oliver-Salvador M.C., Soriano-Garcia M. & García-Ruiz J.M. (2007) Structure of the mexicain-E-64 complex and comparison with other cysteine protease of the papain family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* **D63**, 555-563.

Groves, M.R., Taylor, M.A., Scott, M., Cummings, N.J., Pickersgill, R.W. & Jenkins, J.A. (1996) The prosequence of procaricain forms an alpha-helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure,* **4**, 1193-1203.

Gruden, K., Popovic, T., Cimerman, N., Krizaj, I. & Strukelj, B. (2003) Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, “intestains”, enable Colorado potato beetle larva to counteract the potato defense mechanism. *Biol Chem*, **384**, 305-310.

Guay, J., Falgueyret, J.P., Ducret, A., Percival, M.D. & Mancini, J.A. (2000) Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propetides. *Eur J Biochem*, **267**, 6311-6318.

Guncar, G., Podobnik, M., Pungercar, J., Strukelj, B., Turk, V. & Turk, D. (1998) Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 A resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function. *Structure,* **6**, 51-61.

Guncar, G., Pungercic, G., Klemencic, I., Turk, V. & Turk, D. (1999) Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J,* **18**, 793-803.

Guncar, G., Klemencic, I., Turk, B., Turk, V., Karaoglanovic Carmona A., Juliano L. & Turk D. (2000) Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure,* **8**, 305-313.

Harlow, E. & Lane, D. *Antibodies, A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory. 1988.

Heinemann, U., Pal, G.P., Hilgenfeld, R. & Saenger, W. (1982) Crystal and molecular structure of the sulfhydryl protease calotropin DI at 3.2 A resolution. *J Mol Biol,* **161**, 591-606.

Higuchi, R., Krummel, B. & Saiki, R.K. (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, **16**, 7351-7367.

Ho, S.N, Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene,* **77**, 51-59.

Hogg, T., Nagarajan, K., Herzberg, S., Chen, L., Shen, X., Jiang, H., Wecke, M., Blohmeke, C., Hilgenfeld, R. & Schimidt, C.L. (2006) Srtuctural and functional characterization of falcipain-2, a hemoglobinase from the malarial parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem*, **281**, 25425-25437.

Houseman, J.G., Morrison, P.E. & Downe, A.E.R. (1985) Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of the *Phymata wolfii* (Hemiptera: Phymatidae*). Can J Zool,* **63**, 1288-1291.

Jaubert-Possamai, S., Le Trionnaire, G., Bonhomme, J., Christophides, G.K., Rispe, C. & Tagu, D. (2007) Gene knockdown by RNAi in the pea aphid Acyrthosiphon pisum. *BMC Biotechnol*, **7**, 63.

Johnson, K.S. & Rabosky, D. (2000) Phylogenetic distribution of cysteine proteinase in beetles: evidence for an evolutionary shift to an alkaline digestive strategy in Cerambycidae. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol,* **126**, 609-619.

Jordão B.P., Terra W.R., Ribeiro A.F., Lehane M.J. & Ferreira C. (1996) Trypsin secretion in Musca domestica larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. *Insect Biochemistry and Molecular Biology,* **26**, 337-346.

Jovanin, L., Bonade Bottino, M., Girard, C., Morrot, G. & Giband, M. (1998) Transgenic plants for insect resistence. *Plant Science,* **131**, 1-11.

Karrer, M., Peiffer, S.L. & DiTomas, M.E. (1993) Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA,* **90**, 3063-3067.

Kaulmann, G., Gottfried, J.P., Schilling, K., Hilgenfeld, R. & Wiederanders, B. (2006) The crystal structure of Cys25→Ala mutant of human procathepsin S elucidates enzyme-prosequence interactions*. Protein Science,* **15**, 2619-2629.

Kirschke, H., Schimidt, I. & Wiederanders, B. (1986) Cathepsin S. The cysteine proteinase from bovine lymphoid tissue is distinct from cathepsin L (EC 3.4.22.15). *Biochem J,* **240**, 455-459.

Kirschke, H., Wiederanders, B., Brömme, D. & Rinne, A. (1989) Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J,* **264**, 467-473.

Koiwa, H., Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., D'Urzo, M.P., Murdock, L.L., Bressan, R.A. & Hasegawa, P.M. (2000) A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinase (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*). *FEBS Lett*, **471**, 67-70.

Kramer, G., Paul, A., Kreusch, A., Schüler, S., Wiederanders, B. & Schilling, K. (2007) Optimized folding and activation of recombinant procathepsin L and S produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, **54**, 147-156.

Kurata, M., Yamamoto, Y., Watabe, S., Makino, Y., Ogawa, K. & Takahashi, S.Y. (2001) *Bombyx* cysteine proteinase inhibitor (BCPI) homologous to propeptide regions of cysteine proteinases is a strong, selective inhibitor of cathepsin L-like cysteine proteinases. *J Biochem*, **130**, 857-863.

LaLonde, J.M., Zhao, B., Janson, C.A., D′Alessio, K.J., McQueney, M.S., Orsini, M.J., Debouck, C.M. & Smith, W.W. (1999) The crystal structure of procathepsin K. *Biochemistry,* **38**, 862-869.

Larson, E.T., Parussini, F., Huynh, M.H., Giebel, J.D., Kelley, A.M., Zhang, L., Bogyo, M., Merritt, E.A. & Carruthers, V.B. (2009) Toxoplasma gondii cathepsin L is the primary target of the invasion inhibitory compound Morpholinurea-leucyl-homophenyl-vinyl sulfone phenyl. *J Biol Chem,* **284**, 26839-26850.

Laskowski, R.A., Macarthur M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of proteins structures. *J Appl Cryst*, **26,** 283-291.

Lecaille, F., Kaleta, J. & Brömme, D. (2002a) Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent development in inhibitor design. *Chem Rev*, **102**, 4459-4488.

Lecaille, F., Choe, Y., Brandt, W., Li, Z., Craik, C.S. & Brömme, D. (2002b) Selective inhibition of the collagenolytic activity of human cathepsin K by altering its S2 subsite specificity. *Biochemistry*, **41**, 8447-8454.

Liu, J., Shi, G.P., Zhang, W.Q., Zhang, G.R. & Xu, W.H. (2006) Cathepsin L function in insect moulting: molecular and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol Biol,* **15**, 823-834.

Lopes, A.R., Juliano, M.A., Juliano, L. & Terra, W.R. (2004) Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *Arch Insect Biochem Physiol*, **55**, 140-152.

Marana, S.R., Andrade, E.H., Ferreira, C. & Terra, W.R. (2004) Investigation of the substrate specificity of a substrate specificity of a β-glycosidase from *Spodoptera fuigiperda* using site-directed mutagenesis and bioenergetics analysis. *Eur J Biochem,* **271**, 4169-4177.

Marana, S.R., Lopes, E.R., Juliano, L., Juliano, M.A., Ferreira, C. & Terra, W.R. (2002) Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding*. Biochem Biophys Res Commun*, **290**, 494-497.

Matusuidara, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins eletroblotted on to polyvinylidenedifluoride membranes. *J Biol Chem,* **262**, 10035-10038.

McGrath, M.E., Eakin, A.E., Engel, J.C., McKerrow, J.H., Craik, C.S. & Fletterick, R.J. (1995) The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J Mol Biol*, **247**, 251-259.

McCrath, M.E., Klaus, J.L., Barnes, M.G. & Bromme, D. (1997) Crystal structure of human cathepsin K complexed with a potent inhibitor. *Nat Struct Biol,* **4**, 105-109.

Ménard R., Carmona E., Sachiko T., Dufour É., Plouffe C., Mason P. & Mort J.S. (1998) Autocatalytic Processing of Recombinant Human Procathepsin L. *J Biol Chem,* **273**, 4478-4484.

McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P. & Sajid, M. (2006) Proteases in Parasitic Diseases. *Annu Rev Pathol,* **1**, 497-536.

Morton R.E. & Evans T.A. (1992) Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Anal Biochem,* **204**, 332-334.

Murshudov, G.N., Vagin A.A. & Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **53**, 240-255

Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R.A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T. & Katunuma, N. (1991) The refined 2.15 A X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specifity*. EMBO J*, **10**, 2321-2330.

Nagler, D.K., Zhang, R., Tam, W., Sulea, T., Purisima, E.O. & Menard, R. (1999) Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry,* **38**, 12648-54.

Novillo, C., Castanera, P. & Ortego, F. (1997) Inhibition of digestive trypsin-like porteases from larvae of several lepidopteran species by the diagnostic cysteine portease inhibitor E-64. *Insect Biochem. Mol Biol*, **27**, 247-254.

O'Hara, B.P., Hemmings, A.M., Buttle, D.J. & Pearl, L.H. (1995) Crystal structure of glycyl endopeptidase from *Carica papaya*: a cysteine endopeptidase of unusual substrate specificity. *Biochemistry,* **34**, 13190-13195.

Olsen, J.G., Kadziola, A, Lauritzen, C., Pedersen, J., Larsen, S. & Dahl, S.W. (2001) Tetrameric dipeptidyl peptidase I directs substrate specificity by use of the residual pro-part domain. *FEBS Lett*, **506**, 201-206.

Otwinowski, Z. & Minor W. (1997) Macromolecular Crystallography, Part A, in C.W. Carter Jr, R.M. Sweet (Eds). New York: Academic Press, *Methods Enzymol*, **276**, 307-326.

Pickersgill, R.W., Rizkallah, P., Harris, G.W. & Goodenough, P.W. (1991) Determination of the structure of papaya protease omega. *Acta Crystallogr*, **B47**, 766-771.

Podobnik, M., Kuhelj, R., Turk, V. & Turk, D. (1997) Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2,5 A resolution reveals the native active site of papain-like cysteine protease zymogen. *J Mol Biol*, **271**, 774-788.

Prabhakar, S., Chent, M.S., Elpidina, K.S., Vinokurov, C.M., Marshall, J. & Oppert, B. (2007) Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from yellow mealworm, *Tenebrio molitor L*. *Insect Mol Biol,* **16**, 455-468.

Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997) The role of thi and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem*, **272**, 15661-15667.

Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M. & Lopez-Otin, C. (2003) Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Rev Genet*, **4**, 544-558.

Rahbé, Y., Deraison, C., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Nardon, C. & Jouanin, L. (2003) Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape*. Plant Science*, **164**, 441-450.

Ramos, C.R., Abreu, P.A., Nascimento, A.L. & Ho, P.L. (2004) A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian J Med Biol Res,* **37**, 1103-1109.

Rathanayaka, M.C., Desahapriya, A.T., Shirao, K., Isa, K., Watabe, S., Murakami, R., Tsujimura, H. & Yamamoto, Y. (2007) *Drosophila* CTLA-2-like protein (D/CTLA-2) inhibits cysteine proteinase 1 (CP1), a cathepsin L-like enzyme. *Zoolog Sci,* **24**, 21-30.

Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J,* **290**, 205-218.

Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1994) Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol,* **244**, 461-486.

Read, R.J. (2001) Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,* **D57**, 1373-1382.

Reis, F.C., Costa, T.F., Sulea, T., Mezzetti, A., Scharfstein, J., Brömme, D., Ménard, R. & Lima, A.P. (2007) The propeptide of cruzipain-a potent selective inhibitor of the

trypanosomal enzynes cruzipain and brucipain, and of the human enzyme cathepsin F. *FEBS J,* **274**, 1224-1234.

Renard, G., Garcia, J.F., Cardoso, F.C., Richter, M.F., Sakanari, J.A., Ozaki, L.S., Termignoni, C. & Masuda, A. (2000) Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzme. *Insect Biochem Mol Biol*, **30**, 1017-1026.

Rhodes, G. *Crystallography Made Crystal Clear.* 3nd ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press. 2006.

Roche, L., Tort, J. & Dalton, J.P. (1999) The propeptide of *Fasciola hepatica* cathepsin L is a potent and selective inhibitor of the mature enzyme. *Mol Biochem Parasitol,* **98**, 271-277.

Rossi, A., Deveraux, O., Turk, B. & Sali, A. (2004) Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biol Chem,* **385**, 363-72.

Sabater-Munoz, B., Legeai, F., Rispe, C., Bonhomme, J., Dearden, P., Dossat, C., Duclert, ª, Gauthier, J.P., Hunter, W., Dang, P., Kambhampati, S., Martinez-Torres, D., Cortes, T., Moya, A., Nakabachi, A., Philippe, C., Prunier-Leterme, N., Rahbé, Y., Simon, J.C., Stern, D.L., Wincker, P. & Tagu, D. (2006) Large-scale gene discovery in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Hemiptera). *Genome Biol*, **7**, R21.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Schilling, K., Körner, A., Sehmisch, S., Kreusch, A., Kleint, R., Benedix, Y., Schlabrakowski, A. & Wiederanders, B. (2009) Selectivity of propetide-enzyme interaction in cathepsin L-like cysteine proteases. *Biol Chem*, **390**, 167-174.

Silva, C.P., Ribeiro, A.F., Gulbenkian, S. & Terra, W.R. (1995) Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *J Insect Physiol,* **41**, 1093-1103.

Sivaraman, J., Lalumière, M., Ménard, R. & Cygler, M. (1999) Crystal structure of wild-type human procathepsin K. *Protein Sci*, **8**, 283-290.

Sivaraman, J., Nagler, D.K., Zhang, R., Ménard, R. & Cygler, M. (2000) Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol*, **295**, 939-951.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem,* **150**, 76-85.

Smith, S.M. & Gottesman, M.M. (1989) Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 34, 20487-20495.

Somoza, J.R., Zhan, H., Bowman K.K., Yu, L., Mortara, K.D., Palmer, J.T., Clark, J.M. & McGrath, M.E. (2000) Crystal structure of human cathepsin V. *Biochemistry,* **39**, 12543-12551.

Somoza, J.R., Palmer, J.T., Ho, J.D. (2002) The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators. *J Mol Biol,* **322**, 559-568.

Stack C.M., Caffrey C.R., Donnelly S.M., Seshaadri A., Lowther J., Tort J.F., Collins P.R., Robinson M.W., Xu W., McKerrow J.H., Craik C.S., Geiger S.R., Marion R., Brinen L.S. & Dalton J.P. (2008) Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin L proteases of the parasitic liver fluke, *Fasciola hepatica. J Biol Chem,* **283**, 9896-9908.

Storer, A.C. & Ménard, R. (1994) Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol*, **244**, 486-500.

Storoni, L.C., McCoy, A.J. & Read, R.J. (2004) Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **D60**, 432-438.

Takahashi, N., Kurata, S. & Natori, S. (1993) Molecular cloning of cDNA for the 29kDa proteinase participating in decomposition of the larval fat body, during metamorphosis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *FEBS Lett,* **334**, 153-157.

Terra, W.R. & Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol*, **109B,** 1-62.

Terra, W.R., Ferreira, C. & Bastos, F. (1985) Phylogenetic considerations of insect digestion. Disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem*, **15**, 443-449.

Terra, W.R. & Ferreira, C. (2005) Biochemistry of digestion. Gilbert, L.I., Iatrov, K., Gill, S. (Eds), Comprehensive Molecular Insect Science, **4**, 171-224.

Turk, V. & Bode, W. (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett*, **285**, 213-219.

Turk, D., Podobnick, M., Popovic, T., Katunuma, N., Bode, W. & Turk, V. (1995) Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0 A resolution: A basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors. *Biochemistry,* **34**, 4791-4797.

Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M. & Turk, V. (1996) Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett*, **384**, 211-214.

Turk, B., Turk, V. & Turk, D. (1997) Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem,* **378**, 141-150.

Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M. & Turk, B. (1998) Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem,* **379**, 137-147.

Turk, B., Dolenc, I., Lenarcic, B., Krizaj, I., Turk, V., Bieth, J.G. & Björk, I. (1999) Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *Eur J Biochem*, **259**, 926-932.

Turk, B., Turk, D. & Turk, V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: more then scavengers. *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 98-111.

Turk, D., Janjic, V., Stern, I., Podobnik, M., Lamba, D., Dahi, S.W., Lauritzen, C., Pedersen, J., Turk, V. & Turk, B. (2001) Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *EMBO J*, **20**: 6570-6582.

Turk, V., Turk, B. & Turk, D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J*, **20**, 4629-4633.

Turk, D. & Guncar, G. (2003) Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crstallogr D Biol Crystallogr*, **D59**, 203-213.

Turkenburg, J.P., Lamers, M.B., Brzozowski, A.M., Wright, L.M., Hubbard, R.E., Sturt, S.L. & Williams, D.H. (2002) Structure of a Cys25--.Ser mutant of human cathepsin S. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 451-455.

Vernet, T., Khouri, H.E., Laflamme, P., Tessier, D.C., Musil, R., Gour-Salin, B.J., Storer & A.C., Thomas, D.Y. (1991) Processing of the papain precursor. *J Biol Chem,* **266**, 21451-21457.

Vinokurov, K.S., Elpidina, E.N., Oppert, B., Prabhakar, S., Zhuzhikov, D.P., Dunaevsky, Y.E. & Belozersky, M.A. (2006) Fractionation of digestive proteinases from Tenebrio molitor (Coleoptera: tenebrionidae) larvae and role in protein digestion. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol,* **145**, 138-146.

Wang, S.X., Pandey, K.C., Somoza, J.R., Sijwali, P.S., Kortemme, T., Brinen, L.S., Fletterick, R.J., Rosenthal, P.J. & McKerrow, J.H. (2006) Structural basis for unique mechanisms of folding and hemoglobin binding by a malarial protease. *Proc Natl Acad Sci USA,* **103**, 11503-11508.

Wex, T., Levy, B., Wex ,H. & Brömme, D. (1999). Human cathepsins F and W: new subgroup of cathepsins. *Biochem Biophys Res Commun*, **259**, 401-407.

Wiederanders, B. (2003) Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Bichim Pol*, **50**, 691-713.

Yamamoto, Y., Watabe, S., Kageyama, T. & Takahashi, S.Y. (1999) Proregion of *Bombyx mori* cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme. *Arch Insect Biochem Physiol*, **42**, 167-178.

Yan J.X., Wait R., Berkelman T., Harry R.A., Westbrook J.A., Wheeler C.H. & Dunn M.J. (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis,* **21**, 3666-72

Zhang M., Wei Z., Chang S., Teng M. & Gong W. (2006) Crystal structure of a papain-fold protein without the catalytic residue: A novel member in the cysteine proteinase family. *J Mol Biol,* **358**, 97-105.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Daniela Beton

Local e data de nascimento: São Paulo, 28/06/75

EDUCAÇÃO

1997-2001: Bacharel em Química com atribuições tecnológicas (industriais). Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP.

2002-2004: Mestrado em Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP.

2004-2009: Doutorado em Bioquímica. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Iniciação Científica, CNPq-PIBIC (2000-2001). Projeto: Obtenção e purificação da trealase neutra de *N.crassa* recombinante. Orientadora: Profa. Dra. Aline M. da Silva

Bolsista de Mestrado, FAPESP (2002-2004). Projeto: Caracterização molecular do inibidor da proteína serina/treonina fosfatase 1 (PP1) de *Neurospora crassa*. Orientadora: Profa. Dra. Aline M. da Silva

Bolsista de Doutorado, FAPESP (2005-2009). Projeto: Estrutura e função das cisteína proteinases intestinais do besouro *Tenebrio molitor*.

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS

Almeida, F.M., Bonini, B.M., Beton, D., Jorge J.A., Terenzi, H.F. & da Silva, A.M (2009) Heterologous expression in *Escherichia coli* of *Neurospora crassa* neutral threalase as an active enzyme. *Protein Expression and Purification* 65 (2), 185-189.

Sousa–Canavez, J.M., Beton, D., Gonzalez–Kristeller D.C., & da Silva, A.M. (2007) Identification and domain mapping of *Dictyostelium discoideum* type–1 protein phosphatase inhibitor–2. *Bichimie*, 89 (5), 692-701.