UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Interferência de peptídeos contendo histidinas na estrutura de proteínas recombinantes: um estudo aplicado à adenina fosforibosil transferase (APRT) de *Leishmania tarentolae.*

Cecília Sulzbacher Caruso

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências: Área de Física Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Beltramini

USP/IFSC/SBI

8-2-001484

São Carlos
2002

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Caruso, Cecília Sulzbacher
C329i Interferência de peptídeos contendo histidinas na estrutura de proteínas recombinantes: um estudo aplicado à adenina fosforibosil transferase (APRT) de *Leishmania tarentolae*. / Cecília Sulzbacher Caruso. – São Carlos, IFSC, 2002.
82 p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2002.

Orientadora: Prof. Dra. Leila Maria Beltramini

1. *Leishmania tarentolae*. 2. APRT. 3. His-tag. I. Título

UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador São-carlense, 400
Caixa Postal 369
13560-970 - São Carlos - SP - Brasil

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE CECILIA SULZBACHER CARUSO, APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 23-9-2002.

COMISSÃO JULGADORA:

Profa. Dra. Leila Maria Beltramini (Orientadora e Presidente) – IFSC-USP

Profa. Dra. Maria Lucia Bianconi – UFRJ

Prof. Dr. Hidetake Imasato – IQSC-USP

Prof. Dr. Amando S Ito – FFCLRP-USP

Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento – IFSC-USP

Dedico essa tese, de todo coração,
à minha família e amigos sinceros,
por todo carinho e apoio. Em
especial, à minha irmã Célia e
ao meu querido André.

À Deus e aos espíritos amigos agradeço pelo carinho, oportunidades e presença constante.

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Leila M. Beltramini pela orientação da tese;
- Ao Prof. Dr. Otávio Thiemann e à Profa. Dra. Paula Ullian de Araújo pelo trabalho e auxílio no desenvolvimento da tese;
- Ao Prof. Dr. Hidetake Imasato pela valiosa contribuição e disposição de sempre;
- Ao Prof. Dr. Otaciro Rangel do Nascimento por sua vontade em transmitir conhecimento;
- Aos demais professores da Cristalografia pela presença e apoio;
- Ao Beto, Bel, Sueli, Estér, Claudia, Maria Helena, Bianca, Wanda, Susana e todos os técnicos dos laboratórios de Cristalografia e Biofísica que muito auxiliaram no desenvolvimento do trabalho. Em especial, a minha amiga Andressa pela disposição e ajuda em todas as horas;
- Às bibliotecárias do IFSC/São Carlos, em especial à Mara, Neusa e Camila pelo excelente atendimento, apoio e amizade.
- À minha professora e amiga Adriana pelas aulas de português, paciência e amizade;
- Aos meus irmãos de coração Sandra, Jabah, Cris, Bia, Stéfano e Zac por eles existirem e serem um exemplo pra mim. Em especial, ao PH pela valiosa ajuda durante todo doutorado;
- À minha querida amiga Regiane Burger e toda sua família pela inestimável ajuda e amizade sincera;
- À Patrícia e à Rose pelo convívio, ajuda, risadas, conversas paralelas, música, samba e tudo mais;
- À Eurofarma e em especial à equipe de desenvolvimento pela oportunidade de trabalho. Às minhas mais recentes amigas Daniela e Claudia pela amizade e incentivo do último ano;
- À minha tia Tereza pelo apoio de sempre;
- Ao Dr. Oswaldo Abramovitz pelos conselhos e valiosa ajuda profissional;
- À todas as pessoas que passaram por mim durante esses anos e que deixaram gravados momentos bons e "menos bons" em minha memória.

SUMÁRIO

Lista de Figuras i

Lista de Tabelas ii

Lista de Abreviaturas iii

Resumo vi

Abstract vii

Capítulo 1 1
1.1 INTRODUÇÃO 1
1.1.1. De sistemas de expressão à produção de proteínas heterólogas 1
1.1.2 Produção de proteínas heterólogas em bactérias 4
1.1.3 Vantagens e desvantagens de proteínas de fusão 5
1.1.4 A enzima APRT (adenina fosforibosil transferase) 10
1.2 OBJETIVOS 15
Capítulo 2 16
2.1 MATERIAIS 16
2.1.1 Soluções 16
2.1.1.1 Ensaio de atividade - método espectrofotométrico 16
2.1.1.2 Ensaio atividade - método radioquímico 16
2.1.2 Reagentes 17
2.2 EQUIPAMENTOS 18
2.2.1 Espectroscópicos 18
2.2.2 Outros 18
Capítulo 3 19
3.1 METODOLOGIA 19
3.1.1 Expressão da APRT-His e da APRT 19
3.1.2 Purificação da APRT-His e da APRT 20
3.1.2.1 Purificação da APRT-His 21
3.1.2.2 Purificação da APRT 21
3.1.3 Caracterização Físico-Química 23
3.1.3.1 Eletroforese 23
3.1.3.2 Determinação da concentração e ensaios enzimáticos 23
3.1.3.2.1 Ensaio enzimático - método espectrofotométrico 25
3.1.3.2.2 Ensaio enzimático - método radioquímico 25
3.1.3.3 Determinação do ponto isoelétrico 26
3.1.3.4 Estudo de solubilidade da APRT-His 27
3.1.4 Caracterização espectroscópica 29
3.1.4.1 Espectroscopia de absorção eletrônica 29
3.1.4.2 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) 30
3.1.4.2.1 Estimativa da estrutura secundária 31
3.1.4.3 Espectroscopia de emissão de fluorescência 32

Capítulo 4 34
4.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES 34
4.1.1 Expressão e purificação enzimática 34
4.1.1.1 APRT-His 34
4.1.1.2 APRT 37
4.1.2 Determinação do ponto isoelétrico 40
4.1.3 Estudo de solubilidade da APRT-His 41
4.1.4 Ensaio de atividade enzimática 51
4.1.5 Análises espectroscópicas das enzimas APRT-His e APRT 57
4.1.5.1 Espectroscopia de dicroísmo circular 57
4.1.5.2 Espectroscopia de emissão de fluorescência 60
4.1.5.2.1 Comparação entre os espectros da APRT-His e da APRT 60
4.1.5.2.2 Intervalo de linearidade 62
4.1.5.2.3 Emissão de fluorescência da APRT-His e da APRT na presença de ligantes 66
Capítulo 5 73
5.1 CONCLUSÕES 73
Capítulo 6 76
6.1 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS 76
Capítulo 7 77
7.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Reação enzimática catalisada pela enzima APRT. 11
Figura 1.2 - Seqüência primária da APRT de *L. tarentolae e L. donovani*..... 12
Figura 1.3 - Estrutura tridimensional da APRT de *L. tarentolae*..... 13
Figura 1.4 - Monômero da APRT de *L. tarentolae*..... 14
Figura 4.1 - Gel de SDS-PAGE a 15% da APRT-His antes e após cromatografia de afinidade..... 36
Figura 4.2 - Cromatograma da APRT-His em Superdex-75..... 38
Figura 4.3 - Eletroforese da APRT antes e após cromatografia de afinidade e após filtração molecular. 39
Figura 4.4 - Cromatograma da APRT em Superdex-75. O pico observado entre 8 e 9 mL corresponde à APRT eluída em TrisMg-7,5 os demais picos são de contaminantes..... 40
Figura 4.5 - Concentração da APRT-His em diferentes valores de pH. 44
Figura 4.6 - Espectros de CD da APRT-His em Tris pH 8,5 contendo 150 e 500 mmol.L^{-1} de KCl.... 46
Figura 4.7 - Influência de agentes solubilizantes na concentração da APRT-His.. 49
Figura 4.8 - Estrutura dimérica da APRT de *L. tarentolae*..... 50
Figura 4.9 - Efeito da concentração de histidina na solubilidade da APRT-His. 51
Figura 4.10 - Gráfico obtido no ensaio de atividade enzimática da APRT (método espectrofotométrico)..... 53
Figura 4.11 - Curva de atividade enzimática da APRT pelo método radioquímico. 56
Figura 4.12 - Espectro de CD da APRT e da APRT-His. 58
Figura 4.13 - Espectros de emissão de fluorescência da APRT-His e da APRT com excitação em 295 nm..... 62
Figura 4.14 - Monômero da APRT de *L.tarentolae*.. 63
Figura 4.15 - Espectros de emissão de fluorescência da APRT em função da sua concentração. 64
Figura 4.16 - Intensidade de fluorescência a 332 nm em função da concentração de APRT..... 65
Figura 4.17 - Espectros de absorção eletrônica da APRT na presença de seus ligantes..... 66
Figura 4.18 - Espectro de fluorescência do Trp da APRT com seus ligantes após excitação em 295 nm. 68
Figura 4.19 - Estrutura tridimensional da APRT de *L. tarentolae*..... 70
Figura 4.20 - Espectro de emissão de fluorescência de Trp livre na presen;a de PRPP. 71
Figura 4.21 - Espectro de fluorescência do Trp da APRT-His com seus ligantes após excitação em 295 nm..... 72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Comparação entre os sistemas de expressão 3
Tabela 4.1 - Valores teórico e experimental de PI da APRT-His e da APRT. 41
Tabela 4.2 - Atividade enzimática da APRT e da APRT-His em diferentes tampões (método espectrofotométrico) 54
Tabela 4.3 - Atividade enzimática da APRT e da APRT-His em diferentes tampões (método radioquímico) 57
Tabela 4.4 - Frações de estrutura secundária da APRT-His e APRT 60

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A

ACB	Anidrase carbônica bovina
AMP	*Adenosine mono phosphate*
APRT	*Adenine phosphoribosyltransferase*
APRT-His	*Adenine phosphoribosyltransferase- his tag*

B

BFR	Bacterioferritina
BSA	*Bovin soro albumin*

C

CCA	*Convex Constraint Analysis*
CD	*Circular dichroism*
Cit C	Citocromo c
COM	*Counts per minutes*

D

DsbA	*Protein disulfide Isomerase A*
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotrietol

F

Fen	Fenilalanina

G

GrpE	*Glucose-regulated Protein E*
GST	Glutationa S-transferase

H

HGPRT	*Hipoxantine guanine phosphoribosyltransferase*
hGST P1-1	Glutationa S-transferase P1-1 humana
hIL-3	Interleucina humana do tipo 3

I

IEF	*Isoeletric eletrophoresis*
IPTG	Isopropil-1-β-D- tiogalactopiranosideo
ITS	Inibidor de tripsina de soja

K

KCl	Cloreto de potássio

M

MBP	*Maltose binding protein*
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio

N

NaCl	Cloreto de sódio
Ni-NTA	*Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid*

O

OPRT	*Orotate phosphoribosyltranferase*
OVA	Ovoalbumina

P

PI	Ponto isoeletrico
PM	Peso molecular

PMSF	*Phenylmethanesulfonyl fluoride*
Ppi	*Pirophosphate*
PRRP	*5-phosphoribosyl-1-pirophosphate*
PRT	*Phosphoribosyltransferase*

R

RIB	*Riboflavin*
RMN	*Ressonance Magnetic Nuclear*

S

SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*
SELCON	*Self-consistent method*
SPB	*Streptavidin*
SVD	*Singular value decomposition algoritm*

T

Tir	Tirosina
TRX	Tioredoxina
Trp	Triptofano
TT	Tampão Tris

X

XPRT	*Xantine phosphoribosyltransferase*

λ_{max}	Máximo de emissão

RESUMO

Enquanto as células humanas sintetizam purinas pela via de novo e pela via de recuperação, protozoários parasitas as sintetizam somente pela via de recuperação. Por essa razão, as enzimas que compõem essa via são importantes alvos para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias. A enzima APRT converte adenina e α-D-5-fosforibosil 1-pirofosfato (PRPP) a AMP na via de recuperação de purinas. Nesse trabalho, a APRT e a APRT-His recombinantes foram caracterizadas por métodos bioquímicos e espectroscópicos. As expressões do gene *aprt* contidos nos vetores pET29+ (Novagen) e pQE30 (Qiagen) renderam 5 e 10 $mg.mL^{-1}$ de APRT e APRT-His, respectivamente, na forma solúvel. A APRT permaneceu estável e homogênea *in vitro* em Tris pH 7,5 contendo 5 mM de $MgSO_4$ e 150 mM de KCl, mas a APRT-His mostrou-se instável e insolúvel nesse pH e acima de 0,5 $mg.mL^{-1}$. O estudo de solubilidade revelou que a APRT-His é parcialmente estabilizada em Tris pH 8,5 contendo 150 mM de KCl, devendo ser purificada e mantida nesse tampão durante os ensaios espectroscópicos e a adição de 50 mM de histidina mostrou-se eficiente para a concentração da enzima até $8mg.mL^{-1}$. A caracterização bioquímica da APRT e da APRT-His revelou que elas são diméricas nos seus tampões e têm PI igual a 6,45±0,20 e 7,7±0,16, respectivamente. Os ensaios de atividade enzimática indicaram que a APRT é duas vezes mais ativa do que a APRT-His. Os espectros de CD da APRT-His foram mais intensos do que os espectros da APRT e mostraram perfil de hélice α. Os resultados da desconvolução revelaram que a APRT-His tem cerca de 10% mais hélice α do que a APRT. O valor de teor de estrutura secundária da APRT equivale aos valores extraídos dos dados cristalográficos da APRT de *L. donovani* e de *L. tarentolae*. Os espectros de emissão de fluorescência mostraram que a APRT-His e a APRT possuem máximos de emissão em 342 e 332 nm, respectivamente. Além disso, eles indicaram que o PRRP e o AMP suprimem a fluorescência do Trp presente na APRT. A supressão foi relacionada à posição dos ligantes localizados no sítio ativo da enzima e a ausência de supressão nas amostras de APRT-His foi relacionada à presença de Mg^{2+}. Os resultados indicam que a presença dos resíduos de histidina na região N-terminal da APRT-His induziu a modificação estrutural da enzima levando a precipitação contínua. Nesse sentido, a ausência dos resíduos de histidina incorporados à enzima favoreceu a estabilidade da proteína *in vitro*.

ABSTRACT

Human cells synthesize purine nucleotide by *de novo* and salvage pathways, while parasitic protozoa use only salvage pathways. For this reason, the enzymes that compound the salvage pathway are important targets to development of new antiparasitic drugs. The enzyme adenine phosphoribosyltransferase (APRT) converts adenine and α-D-5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate (PRPP) to adenosine monophosphate (AMP) at salvage pathway. In this work, the APRT and APRT-His recombinants had been characterized by biochemical and spectroscopic methods. The expression of the *aprt* genes from *L. tarentolae* inserted into pET29a+ (Novagen) and pQ30 (Qiagen) vectors yielded 5 and 10 $mg.mL^{-1}$ of the APRT and APRT-His, on soluble form, respectively. The APRT remained stable and homogeneous *in vitro* at Tris pH 7.5 containing 5 mM $MgSO_4$ and 150 mM KCl, but APRT-His was instable and insoluble above 0.5 $mg.mL^{-1}$at the same pH. The solubility study showed that histidine increased the APRT-His solubility and it is partially stabilized at Tris pH 8.5 containing 150 mM KCl. The addition of the histidine 50 mM was efficient for concentrations up to 8 $mg.mL^{-1}$. Then, the APRT-His was purified and storage in that buffer for spectroscopic assays. The biochemical characterization of the APRT and APRT-His indicated that a both are dimercs in its buffers, and they have isoelectric points at pH 6.45 ± 0.20 and 7.7 ± 0.16, respectively. By enzymatic activity assays, the APRT is twice activer than APRT-His. The CD spectra of the APRT-His were more intense than the APRT spectra. and showed helix alpha profile. The fluorescence spectra marked a maximum emission fluorescence at 342 nm for the APRT-His and 332 nm for the APRT. In addition, the spectra revealed that PRPP and AMP quenched the fluorescence of the tryptophan (Trp) into APRT. The quench was related to position of the ligands inside active site of the enzyme and the absent of fluorescence of the Trp, inside APRT-His, was related to absent of the Mg^{2+}. The results has demonstrated that the presence of the histidine residues at N-terminal region of the APRT-His induced to conformational changes of the enzyme following to continuos precipitation. In the same sense, the absent of histidine residues associated to enzyme favored to stability of the protein *in vitro*.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1. De sistemas de expressão à produção de proteínas heterólogas

A utilização de sistemas de expressão heterólogos vem viabilizando a produção de proteínas, ainda não caracterizadas, advindas de seqüências resultantes dos diversos genomas recém-decifrados. Esses sistemas de expressão fazem uso de organismos procariotos e eucariotos geneticamente modificados, portando vetores de clonagem ou expressão que carregam o gene de interesse, o promotor apropriado e outras seqüências reguladoras. As células hospedeiras, responsáveis pela síntese das proteínas de interesse, podem ser procarionte, como a da bactéria *Escherichia coli (E.coli)*, ou eucarionte, tais como leveduras, células de insetos, plantas ou até mesmo de mamíferos. A escolha de um sistema adequado dependerá dos objetivos do projeto e das características do produto de expressão.

Algumas proteínas, especialmente aquelas originárias de células de organismos superiores, não podem ser corretamente produzidas em células procariotas. Na maioria das vezes, essas proteínas passam por etapas de modificações pós-traducionais que determinam o seu estado correto de enovelamento. Por essa razão, a produção desse tipo de proteína deverá ser realizada em sistemas de expressão que empregam células hospedeiras eucariotas, que são aptas a promover tais

modificações. O emprego de células de eucariotos superiores, principalmente células de mamíferos, é difícil porque requer altos níveis de controle de esterilidade, condições de crescimento celular, meios nutritivos especiais onde são freqüentemente empregados hormônios, fatores de crescimento e métodos complexos de transformação. Além disso, a quantidade de proteínas produzidas é pequena e de alto custo quando comparada aos sistemas de expressão bacterianos. Outra consideração a ser feita durante a escolha de um sistema de expressão é o efeito do produto recombinante no hospedeiro. Se ele for tóxico ou inibir o crescimento celular, podem ser empregados vetores com promotores indutíveis fortemente regulados, que somente serão ativados após o crescimento da cultura de células [Fernandez, 1999].

Em resumo, para a seleção de um sistema adequado de expressão, é importante que se tenha em mente quais serão as vantagens e desvantagens de se utilizar cada um deles e qual sistema se adapta mais adequadamente às necessidades do experimento. Uma visão geral sobre alguns sistemas de expressão comumente utilizados é dada pela tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Comparação entre os sistemas de expressão

Características desejadas	Sistemas de expressão			
	Bactéria	**Levedura**	**Inseto**	**Cultura de células mamíferas**
Crescimento celular	Rápido	Rápido	Lento	Lento
Complexidade do meio de crescimento	Mínima	Mínima	Complexa	Complexa
Custo do meio de crescimento	Baixo	Baixo	Alto	Alto
Nível de expressão	Alto	Baixo para alto	Baixo para alto	Baixo para moderado
Expressão extra-celular	Secreção para o periplasma	Secreção para o meio	Secreção para o meio	Secreção para o meio
Modificação Pós-traducional				
Enovelamento da proteína	Usualmente é necessário renovelar a proteína	O renovelamento deve ser necessário	Enovelamento próprio	Enovelamento próprio
Glicosilação N-Ligada	Nenhuma	Alta	Simples, sem ácido siálico	Complexo
Glicosilação O-ligada	Não	Sim	Sim	Sim
Fosforilação	Não	Sim	Sim	Sim
Acetilação	Não	Sim	Sim	Sim
Acilação	Não	Sim	Sim	Sim
γ-Carboxilação	Não	Não	Não	Sim

A tabela foi extraída e traduzida do livro: Fernandez, J. M. & Hoeffler, J. P. *Gene expression system: using nature for the art of expression.* Academic Press, 1999, p. 4.

1.1.2 Produção de proteínas heterólogas em bactérias

Dentre as células que podem ser utilizadas na produção de proteínas heterólogas, a bactéria *E. coli* se destaca. Esse organismo, além de ter suas características genéticas e bioquímicas bem caracterizadas, também pode ser manipulado de forma segura e com um risco biológico mínimo[1], mesmo quando se deseja obter proteínas provenientes de organismos eucariotos patogênicos [Baneyx, 1999].

A síntese de proteínas heterólogas em *E. coli* é feita a partir de vetores de expressão por um processo de transcrição seguido de tradução. Apesar de esses dois processos ocorrerem quase simultaneamente, a transcrição é a etapa que define o nível de expressão do gene [Voet, 2000].

Em geral, quando se deseja produzir grandes quantidades de proteína heteróloga recombinante em *E. coli*, utilizam-se cepas transformadas com vetores de clonagem contendo um promotor forte [Gross, 1995]. Os vetores da família pET carregam o promotor forte do bacteriófago[2] T7, que somente será reconhecido pela enzima T7 RNA polimerase [Novagen, 1994]. Por se tratar de uma enzima proveniente do bacteriófago T7, a transcrição gênica regulada pelo operador *lac* somente ocorrerá em linhagens de *E. coli* capazes de produzir a enzima T7 RNA polimerase, como a BL21(DE3). Essas linhagens possuem a seqüência de DNA codificante

---

[1] De acordo com a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), a *E. coli* pertence ao grupo I na classificação dos organismos geneticamente modificados. Maiores detalhes sobre as características dos organismos que compõem esse grupo podem ser consultadas na *Internet* no *site* http://www.mct.gov.br/ctnbio/in/in7.htm.

[2] A denominação bacteriófago é dada para vírus de bactéria.

para essa enzima integrada ao seu genoma (lisógeno λDE3) e regulada por um operador *lac*, induzível por IPTG. Quando essa molécula "desrepressora" se associa ao repressor *lac*, ela libera o operador, permitindo que a transcrição do gene de interesse seja iniciada. Além desses elementos, os vetores pET possuem genes que conferem resistência a antibióticos e um sítio múltiplo de clonagem. Esses vetores também permitem a produção da proteína de interesse fusionada a seqüências para facilitar sua purificação (*tags*) ou mesmo seqüências para reconhecimento por anticorpos.

O vetor pQE30, também utilizado neste trabalho, carrega o promotor forte T5 e atua em conjunto com o vetor auxiliar pREP4 [*The QIAexpressionist*, 2001]. O plasmídeo pREP4 é o responsável pela síntese do repressor *lac*, que atua no operador do vetor pQE30. Esse vetor permite a produção da proteína-alvo como uma fusão com hexapeptídeo de histidinas na porção N-terminal.

1.1.3 Vantagens e desvantagens de proteínas de fusão

Embora seja comum obter um alto rendimento de proteínas heterólogas em *E. coli*, ainda é um desafio obtê-las na sua forma solúvel e biologicamente ativa [Baneyx, 1999]. Por vezes, essas proteínas tornam-se instáveis, insolúveis e se agregam em corpos de inclusão. Para evitar isso, é comum recorrer ao controle da expressão, variando as condições de crescimento bacteriano como temperatura, aeração

ou modificando-se as propriedades químicas do meio de cultura, como pH e concentração de nutrientes.

Um exemplo em que a diminuição da temperatura do meio de cultura induziu o aumento da solubilidade dos produtos de expressão foi dado por Schein e Noteborn (1988). Os autores observaram que as proteínas interferon-2α e interferon-γ de origem humana, assim como a proteína Mx induzida pelo interferon-γ, apresentam-se insolúveis e agregadas em corpos de inclusão quando produzidas por cepas de *E. coli* cultivadas a 37°C. Quando, porém, as bactérias são cultivadas em temperaturas entre 23 e 30°C, pode-se encontrar um percentual variável entre 30 a 90% de proteínas solúveis. Esse comportamento foi observado em várias linhagens de *E. coli* transformadas com diferentes tipos de vetores de clonagem [Schein, 1988].

Apesar disso, modificar as condições físicas de crescimento da bactéria pode não ser suficiente para se alcançar resultados satisfatórios. Em alguns casos, a fusão entre o gene de interesse e uma proteína, ou peptídeo altamente solúvel, pode promover um aumento dos níveis de expressão e solubilidade. Desse modo, é possível evitar a formação de corpos de inclusão e, simultaneamente, facilitar a purificação do produto de expressão [Sheibani, 1999].

Chang e colaboradores (1999) expressaram e purificaram glutationa *S*-transferase P1-1 (hGST P1-1) ligada a seis resíduos de histidina. A fusão possibilitou a purificação da proteína de interesse em uma única etapa usando o método de separação cromatográfica por afinidade, em resina de glutationa imobilizada e,

comparativamente, em resina de afinidade de metal (Co^{2+}). Os autores relatam que o sistema de expressão usado permitiu a obtenção de 30 mg de proteína pura e ativa por litro de cultura sem a necessidade de remoção dos resíduos de histidina [Chang, M., 1999].

Keefe e co-autores (2001) também propuseram o uso do peptídeo de fusão à streptavidina (SPB) para facilitar a purificação de proteínas heterólogas recombinantes. Os autores usaram na purificação uma resina de afinidade contendo streptavidina imobilizada, com capacidade superior àquelas encontradas em matrizes com anticorpos imobilizados, mas inferior às matrizes usadas na purificação de proteínas ligantes de maltose (MBP), glutationa *S*-transferase (GST) ou seqüências de poliistidina. Segundo os autores, essa resina poderia ser empregada de maneira rápida e eficiente para a purificação de 10 a 500 μg de proteínas recombinantes em *E. coli* e possivelmente em outros sistemas de expressão [Keefe, 2001].

Davis e colaboradores (1999) verificaram a influência de algumas proteínas de fusão na solubilidade da interleucina humana do tipo 3 (hIL-3), uma proteína tipicamente insolúvel. Nesse caso, os autores descrevem que, quando hIL-3 é fundida com NusA, GrpE, bacterioferritina (BFR) ou tioredoxina (TRX), a expressão em *E. coli* a 37°C produz NusA/hIL-3 em um estado quase completamente solúvel, GrpE/hIL-3 e BFR/hIL-3 parcialmente solúveis e tioredoxina/hIL-3 na forma insolúvel. Os autores confirmaram os resultados obtidos com NusA, fundindo-a com hormônios de crescimento bovino e também com interferon, obtendo-se proteínas quiméricas solúveis [Davis, 1999].

Além dos exemplos citados acima, outras proteínas de fusão também têm sido usadas como agentes solubilizantes de proteínas e peptídeos [Kapust, 1999]. Entre elas estão incluídas GST [Nygren, 1994], MBP [Pryor, 1997], ubiquitina [Power, 1990] e DsbA [Zhang, 1998].

É importante mencionar que as fusões nas posições N ou C terminal da proteína de interesse podem modificar suas características físico-químicas, independentemente do meio em que se encontrem (*in vivo* ou *in vitro*).

Sachdev e Chirgwin (1998) observaram que a fusão de MBP à região N-terminal das enzimas pepsinogênio e procatepsina D resultam em produtos mais solúveis, mas inativos em *E. coli*. Em contrapartida, quando MBP é adicionado ao C-terminal dessas proteínas, observa-se a formação de corpos de inclusão. Os autores concluem que a formação de corpos de inclusão é desencadeada por um enovelamento incorreto dessas proteínas [Sachdev, 1998].

Até então, os exemplos citados anteriormente demonstraram que a adição de fusões às proteínas insolúveis auxilia na sua solubilização e purificação. Por outro lado, também há casos em que essa adição resultou na redução de atividade biológica de enzimas. Araújo e co-autores (2000) demonstraram que a remoção dos resíduos de histidina do N terminal da enzima clorocatecol 1,2-dioxigenase recombinante, de *Pseudomonas putida,* aumenta em seis vezes a atividade da enzima *in vitro* [Araújo, 2000]. A recuperação da atividade pode, muitas vezes, ser feita através de tratamento proteolítico, com o intuito de romper a ligação entre as proteínas fundidas [Stevens, 2000].

Embora existam inúmeras proteínas que tenham sido expressas, purificadas e até mesmo cristalizadas com peptídeos de fusão [Oza, 2002; Michel, 2000], existem outras, em especial as que contêm resíduos de histidinas (também chamadas de cauda de histidinas), que se tornam excepcionalmente instáveis, *in vivo* e *in vitro*, após a fusão.

A grande maioria dos relatos sobre essa instabilidade é informalmente divulgada pela rede mundial de computadores e em congressos científicos. Apesar de não oficiais, eles demonstram as dificuldades em manter a estabilidade de algumas proteínas recombinantes associadas à cauda de histidinas.

O objetivo inicial do presente trabalho visou obter a enzima adenina fosforibosiltransferase (APRT) pura e em grande quantidade (alguns mg por mL) utilizando um peptídeo contendo resíduos de histinas fundido na porção N-terminal da enzima. Embora essa proteína fosse obtida em grande quantidade e de forma solúvel durante a expressão do gene, ela mostrou-se instável e insolúvel durante seu armazenamento. Diante dessa dificuldade, foram feitos alguns ensaios de solubilidade com a APRT-His e, como alternativa mais drástica, foi realizada a subclonagem do gene *aprt* em um novo vetor para a expressão da proteína sem cauda de histidinas (APRT). Com isso, a APRT passou a apresentar-se solúvel e estável durante sua estocagem e manuseio. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi redirecionado para a verificação de possíveis alterações, físico-químicas e estruturais, induzidas pela presença do peptídeo de fusão, contendo seis resíduos de histidinas, locali-

zado no N-terminal da proteína recombinante adenina fosforibosiltransferase (A-PRT) de *Leishmania tarentolae (L. tarentolae).*

1.1.4 A enzima APRT (adenina fosforibosil transferase)

Nos organismos vivos, existem duas vias para a síntese de nucleotídeos: a via biossintética *de novo* e a via de recuperação [Stryer, 1996]. As células humanas utilizam preferencialmente a via biossintética *de novo*, ao passo que os parasitas protozoários, incluindo as espécies dos gêneros *Plasmodium lophurae* [Walsh, 1968], *Leishmania brasiliensis* [Marr, 1978], *Entamoeba histolytica* [Boonlayangoor, 1980], *Trypanossoma cruzi* [Berens, 1982; Fish, 1982; Blattner, 1992], *Eumeria tenella* [Wang, 1981], *Toxoplasma gondii* [Scwartzman, 1982], *Giárdia lamblia* [Wang, 1983], *Trichomonas vaginalis* [Miller, 1983] *e Tritrichomonas foetus* [Wang, 1983] utilizam somente a via de recuperação, em função de sua incapacidade para sintetizar nucleotídeos pela via *de novo.*

Diferentemente de alguns parasitas, as espécies de *Leishmania* contam com a atividade de três enzimas do tipo fosforibosil transferases (PRT) para a recuperação de purinas: as enzimas adenina fosforibosil transferase (APRT), hipoxantina-guanina fosforibosil transferase e xantina fosforibosil transferase [Ullman, 1995].

Enquanto as enzimas HGPRT e XPRT catalisam, respectivamente, a adição de hipoxantina-guanina e xantina ao 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRRP), a APRT catalisa a reação de adição da adenina ao PRPP.

Na reação catalisada pela APRT, inicialmente o substrato 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) liga-se à enzima, liberando uma molécula de pirofosfato (PPi). Em seguida o segundo substrato, adenina, liga-se ao complexo PRPP-APRT para formação de adenosina monofosfato (AMP) e liberação da enzima (Figura 1.1).

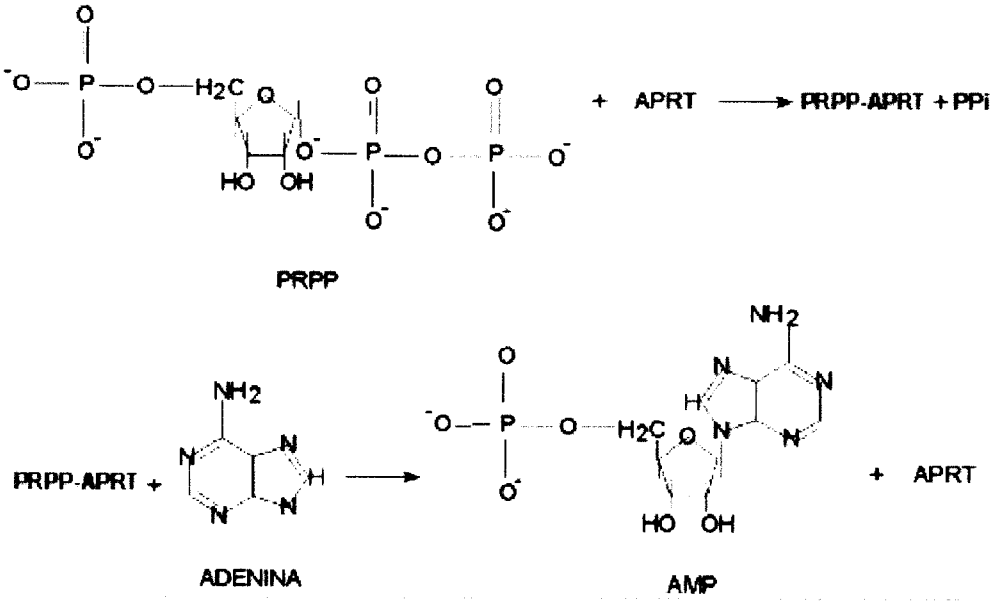

Figura 1.1- Reação enzimática catalisada pela enzima APRT.A reação enzimática ocorre em duas etapas: inicialmente o substrato 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) liga-se à adenina fosforibosiltransferase (APRT), liberando uma molécula de pirofosfato (PPi). Em seguida o segundo substrato, adenina, liga-se ao complexo PRPP-APRT para formação de adenosina monofosfato (AMP) e liberação da enzima. A catálise é dependente do cofator Mg^{2+} ou Mn^{2+} que tem a função de estabilizar o PRPP no sítio ativo da enzima.

Considerando que a APRT é uma importante enzima da via de recuperação de nucleotídeos, alguns pesquisadores acreditam que essa enzima representa um interessante alvo para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias. A sua inibição, no entanto, não é suficiente para causar a morte do parasita, pois os produtos de síntese catalisados por HGPRT e XPRT podem ser convertidos para AMP. Por

essa razão, um medicamento efetivo contra a leishmaniose deveria ser capaz de inibir todas as enzimas fosforibosil transferases simultaneamente.

Mesmo que o protozoário *L. tarentolae* não seja um organismo patogênico, a enzima APRT apresenta alta identidade seqüencial com a enzima homóloga de *L. donovani*, causadora da úlcera visceral [Ullman, 1995]. Espera-se então que a caracterização físico-química da enzima APRT de *L. tarentolae* possa ser útil na caracterização da enzima homóloga de *L. donovani.*

A APRT de *Leishmania donovani* e *tarentolae* pertencem à família das fosforibosiltransferases do tipo I e requerem para sua atividade um metal divalente, tipicamente Mg^{2+} ou Mn^{2+}, coordenado a resíduos ácidos conservados da região de ligação do PRPP. A seguir estão descritas as seqüências primárias das duas APRT's:

L. tarentolae	MSLKEIGPNS	LLLEDSHSLS	QLLKKNYRWY	SPIFSPRNVP	RFADVSSITE
L. donovani	MPFKEVSPNS	FLLDDSHALS	QLLKKSYRWY	SPVFSPRNVP	RFADVSSITE
L. tarentolae	SPETLKAIRD	FLVERYRTMS	PAPTHILGFD	ARGFLFGPMI	AVELGIPFVL
L. donovani	SPETLKAIRD	FLVQRYRAMS	PAPTHILGFD	ARGFLFGPMI	AVELEIPFVL
L. tarentolae	MRKADKNAG	LLIRSEPYEK	EYKEAAPEV	MTIRHGSIGK	NSRVVLIDDV
L. donovani	MRKADKNAG	LLIRSEPYEK	EYKEAAPEV	MTIRYGSIGK	GSRVVLIDDV
L. tarentolae	LATGGTALSG	LQLVEASGAE	VVEMVSILTIP	FLKAAEKIHST	AGGRYKNVR
L. donovani	LATGGTALSG	LQLVEASDAV	VVEMVSILSIP	FLKAAEKIHST	ANSRYKDIK
L. tarentolae	FIGLLSEDVLT	EANCGDLND	YTGPRVLSCG	LLVNQ	
L. donovani	FISLLSDDALT	EENCGDSKN	YTGPRVLSCG	VLAEHPH	

Figura 1.2 - Seqüência primária da APRT de *L. tarentolae e L. donovani.* Na figura estão destacados, em vermelho, os resíduos que compõe a região N-terminal das enzimas. Para a A-PRT-His de *L. tarentolae* deve-se considerar a inserção do peptídeo MRGSHHHHHHGS antes da primeira metionina (M).

As estruturas tridimensionais da APRT de *L. donovani* e *L. tarentolae* foram recentemente elucidadas, apresentando-se diméricas (Figura 1.3).

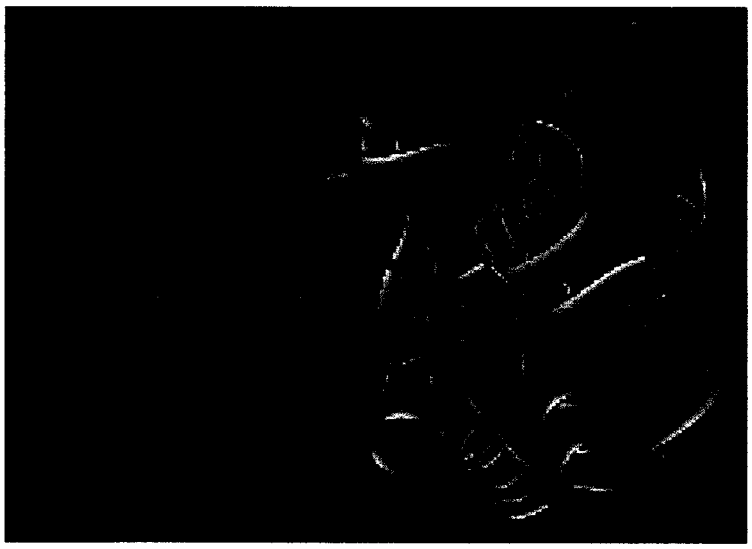

Figura 1.3 - Estrutura tridimensional da APRT de *L. tarentolae*. Na figura, as unidades monoméricas que compõe a APRT de *L. tarentolae*, estão destacadas de cores diferentes.

No monômero da APRT de *L. tarentolae* são destacadas 5 regiões (Figuras 1.4 e 1.4):

A região central , também chamada *core*, é uma região conservada nas PRT's do tipo I e compostas por folhas β empacotadas contra duas hélices de um lado e duas hélices do outro lado. O *core* inclui uma região de ligação de nucleotídeo próximo ao C-terminal das folhas β.

O *loop* flexível, no qual origina-se no meio da região central, é estruturalmente posicionado no final de uma folha β. Segundo Phillips e co-autores (1999), essa região pode adotar uma conformação aberta, permitindo que o substrato se ligue e uma conformação fechada durante a catálise.

O sítio ativo da APRT está localizado entre a região central e uma estrutura estruturalmente variável, chamada de touca. A touca proporciona a maior parte dos contatos para o nucleotídeo e é responsável pela especificidade das várias PRT's. Para a APRT essa região é exclusiva, visto que ela não se assemelha a qualquer outra região de outras PRT's.

O braço C-terminal também é uma sub-estrutura única e distinta das outras PRT's. Phillips e colaboradores acreditam que o braço auxilia na catalise, a medida em que envolve o outro monômero da APRT para formação do dímero ativo.

A região do N-terminal é também importante visto que nela ocorreu a inserção do peptídeo **MRGSHHHHHHGS**.

1.4a **1.4b**

Figura 1.4 - Monômero da APRT de *L. tarentolae*. As figuras 1.4 e 1.4 ilustram o monômero e o dímero da APRT de *L. tarentolae*, respectivamente. No monômero estão estacadas as regiões: central (verde e amarelo), *loop* flexível (azul), touca (branco), C-terminal (amarelo), N-terminal (vermelho).

1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi investigar possíveis modificações, físico-químicas e estruturais, causadas pela adição de um peptídeo contendo seis resíduos de histidina na porção N-terminal da enzima adenina fosforibosiltransferase (A-PRT).

Os objetivos específicos foram: caracterização da APRT-His e da APRT por métodos cromatográficos e espectroscópicos, incluindo cromatografia de exclusão molecular, absorção eletrônica, dicroísmo circular e fluorescência.

CAPÍTULO 2

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Soluções

TF Tampão fosfato.

TFK Tampão fosfato 20 $mmol.L^{-1}$ contendo 1 $mmol.L^{-1}$ de PMSF e 50 $mmol.L^{-1}$ de KCl.

TK Tampão Tris 20 $mmol.L^{-1}$ contendo 1 $mmol.L^{-1}$ de PMSF e 150 $mmol.L^{-1}$ de KCl.

TrisMg Tampão Tris 20 $mmol.L^{-1}$ contendo 1 $mmol.L^{-1}$ PMSF, 1 $mmol.L^{-1}$ de DTT, 150 $mmol.L^{-1}$ de KCl e 5 $mmol.L^{-1}$ de $MgSO_4$.

2.1.1.1 Ensaio de atividade - método espectrofotométrico

- TRE: Tampão Tris-HCl 100 $mmol.L^{-1}$ pH 7,4 contendo 5 $mmol.L^{-1}$ de $MgSO_4$ e 1 $mmol.L^{-1}$ de PRPP.

2.1.1.2 Ensaio atividade - método radioquímico

Tampão de diluição

- Tampão Tris-HCl 50 $mmol.L^{-1}$ pH 7,4 contendo 5 $mmol.L^{-1}$ de $MgCl_2$ e 0,5 $mg.mL^{-1}$ de BSA.

Solução de reação

- Adenina marcada/fria (0,3 mL da adenina fria 2,5 $mmol.L^{-1}$, 0,3 mL da adenina marcada 1 $mCi.mL^{-1}$ e 2,4 mL de água).

- Tampão Tris-HCl (250 $mmol.L^{-1}$ pH 7,4).

- BSA (2,5 $mg.mL^{-1}$).

- PRPP (5 $mmol.L^{-1}$).

- $MgCl_2$ (25 $mmol.L^{-1}$).

Solução tampão de parada

- Acetato de sódio 50 $mmol.L^{-1}$ e Na_2HPO_4 2 $mmol.L^{-1}$ pH 5,0.

2.1.2 Reagentes

- Acrilamida, N,N'-metileno bis-acrilamida, albumina sérica bovina, anidrase carbônica, citocromo c, Coomassie Brilliant Blue R-250, marcadores de peso molecular (BSA, OVA, anidrase carbônica, ITS e citocromo c).

- Resinas de Ni-NTA (Superflow), resina de AMP-agarose (Sigma), resina de filtração (Superdex-75).

- Os reagentes citados foram adquiridos da Sigma Aldrich e os demais foram de grau analítico.

2.2 EQUIPAMENTOS

2.2.1 Espectroscópicos

- Espectropolarímetro Jasco, mod. J 700.
- Espectrofluorímetro ISS, mod. K2 (modulação de fase).
- Espectrofluorímetro Jasco, mod. FP-777.
- Espectrofluorímetro Hitachi - U-2001.

2.2.2 Outros

Sistemas cromatográficos (BIO RAD, ÄKTA-Pharmacia); Sistema eletroforético-Pharmacia; Multi-purpose Scintillation Counter LS 6500 (Beckman Coulter); Phast-System (Pharmacia); Shaker New Brunswick Scientific; Ultracentrifugas refrigerada Sorvall modelo 5B e RC5C Plus e outros.

CAPÍTULO 3

3.1 METODOLOGIA

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais utilizados nas etapas de expressão, purificação, caracterização bioquímica e espectroscópica da APRT-His e da APRT.

3.1.1 Expressão da APRT-His e da APRT

A expressão da APRT-His e da APRT foi realizada após a subclonagem do gene *aprt* em dois diferentes vetores. Para a expressão em grande quantidade da APRT-His, o gene foi subclonado no plasmídeo pQE30 e inserido na cepa de *E. coli* SG13009 contendo o vetor auxiliar pREP4 [Thiemann, O. H., 1998]. Para a expressão da APRT, o gene foi subclonado no plasmídeo pET29A+ e inserido em cepas de *E. coli* BL21(DE)[3]. Nos dois casos, as bactérias transformadas foram armazenadas em solução tampão a 30% de glicerol.

Colônias das respectivas bactérias foram retiradas do freezer a –80°C e pré-inoculadas em 10 mL de meio LB contendo antibióticos e incubadas sob agitação de 250 rpm por cerca de 12 horas a 37°C. Para a expressão da APRT-His foram

usados 250 $\mu g.mL^{-1}$ de canamicina e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de ampicilina e para expressão da APRT foi empregado 100 $\mu g.mL^{-1}$ de canamicina. Cada pré-inóculo foi posteriormente usado para inocular 1 L do meio 2XYT suplementado com os respectivos antibióticos. Após a cultura atingir DO_{600nm} de 0,6 nas condições de crescimento, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 1 $mmol.L^{-1}$ de IPTG. Passadas 3 horas de indução, a suspensão de bactérias foi centrifugada a 4.000 x *g* durante 30 minutos a 4°C e o precipitado estocado a –20°C até a ressuspensão e purificação.

3.1.2 Purificação da APRT-His e da APRT

As etapas de purificação da APRT-His e da APRT foram preferencialmente conduzidas a 4°C, com exceção da cromatografia de filtração molecular, que foi feita em temperatura ambiente. A APRT-His foi purificada utilizando-se uma resina Ni-NTA, ao passo que a purificação da APRT foi feita com auxílio de uma coluna de afinidade AMP-agarose e outra de filtração molecular (Superdex-75).

Durante cada etapa de purificação, as frações foram coletadas e separadas para posterior determinação do grau de homogeneidade, concentração e atividade enzimática.

---

[3] Silva, M. – comunicação pessoal, 2001.

3.1.2.1 Purificação da APRT-His

O precipitado de bactérias contendo APRT-His foi inicialmente descongelado e ressuspenso em dois tampões distintos: tampão fosfato 20 $mmol.L^{-1}$ pH 7,5 e tampão Tris 20 $mmol.L^{-1}$ pH 8,5, ambos contendo 1 $mmol.L^{-1}$ de PMSF e 50 e 150 $mmol.L^{-1}$ de KCl, respectivamente (TFK-7,5 e TK-8,5). As células foram, então, lisadas com o auxílio de um sonicador, operando com pulsos de 50 mA por 10 vezes durante 30 segundos com intervalos regulares de 30 segundos de repouso no gelo, e os extratos resultantes foram centrifugados a 20.000 × *g* por 30 minutos a 4^0C. Em seguida, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Ni-NTA de fluxo rápido previamente equilibrada com tampão TFK-7,5 ou TK-8,5. Após 30 minutos de repouso na coluna, os contaminantes e a amostra foram eluídos da coluna com 60 e 350 $mmol.L^{-1}$ de imidazol, respectivamente. Ao final, as frações foram reunidas, concentradas e dialisadas para retirada do imidazol.

3.1.2.2 Purificação da APRT

As células contendo APRT foram ressuspensas em 20 $mmol.L^{-1}$ de tampão Tris pH 7,5 contendo 1 $mmol.L^{-1}$ de PMSF, 1 $mmol.L^{-1}$ de DTT, 150 $mmol.L^{-1}$ de KCl e 5 $mmol.L^{-1}$ de $MgSO_4$ (TrisMg-7,5) e, em seguida, rompidas usando um sonicador operando com pulsos de 50 mA, por 30 segundos, em intervalos regulares de 30 segundos de repouso no gelo. Os resíduos celulares e o material insolúvel foram

removidos por centrifugação a 20.000 × *g* por 30 minutos a 4°C e a APRT purificada em duas etapas cromatográficas. Na primeira etapa, o sobrenadante foi adicionado a uma coluna de AMP-agarose, previamente equilibrada com tampão TrisMg-7,5, permanecendo em seu interior por 15 minutos. Passado esse período, o sobrenadante foi retirado pela lavagem da coluna com o mesmo tampão. Os contaminantes e a APRT foram posteriormente eluídos com tampão contendo 1 e 2 $mmol.L^{-1}$ de AMP, respectivamente. Após a coleta das frações, a coluna foi reequilibrada com tampão e adicionada nova alíquota de sobrenadante. A monitoração dos efluentes da coluna foi feita pela medida de absorbância a 220 nm e o fluxo mantido a 1 $mL.min^{-1}$. Após essa etapa de purificação, frações de APRT foram reunidas e concentradas em AMICON® e submetidas à coluna de filtração molecular (Superdex-75).

Após equilíbrio da Superdex 75, feito com tampão TrisMg-7,5, amostras da APRT foram submetidas à coluna e tiveram suas frações eluídas no pico principal com mesmo tampão de equilíbrio. O fluxo foi mantido a 30 $mL.h^{-1}$ e frações de 1 mL foram coletadas e imediatamente armazenadas a 4°C para caracterização físico-química e espectroscópica. Previamente à coleta, a coluna foi padronizada com padrões de massa molecular.

3.1.3 Caracterização Físico-Química

3.1.3.1 Eletroforese

A eletroforese em gel de SDS-PAGE é um método usado para determinar o grau de homogeneidade de amostras biológicas, para identificar e monitorar proteínas durante a purificação. Ele demanda pouca quantidade de amostra e os experimentos são reprodutíveis e realizados sob condições desnaturantes. [Garfin, D. E., 1990]

A eletroforese das amostras foi feita segundo o método LAEMMLI [Laemmili, 1970] em géis de SDS-PAGE a 15%. Os tampões de amostra continham β-mercaptoetanol e os géis foram corados com azul de comassie. Para identificar as massas moleculares das proteínas (MM), foram usados padrões contendo BSA, OVA, ACB, ITS e Cit c.

3.1.3.2 Determinação da concentração e ensaios enzimáticos

Dentre os métodos espectrofotométricos voltados para a determinação da concentração protéica foram selecionados um direto e outro indireto para determinar o teor de APRT-His e de APRT nas amostras [Stoscheck, 1990]. O método de absorção a 280 nm (direto) baseia-se na medida de absorção dos cromóforos tirosina, triptofano, fenilalanina e cisteína presentes nas proteínas, ao passo que o méto-

do de Bradford (indireto) está baseado na absorção colorimétrica do produto formado na reação entre o azul de comassie e grupos específicos da proteína tais como arginina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina.

No cálculo de concentração de proteína determinada pelo método direto, foram usados coeficiente de extinção calculado igual a 14.890 $mol^{-1}L.cm^{-1}$ [4] e massas moleculares de 26,7 kDa e 25,8 kDa para APRT-His e APRT, respectivamente. A concentração de proteína determinada pelo método de Bradford foi extraída da curva padrão de BSA a 1 $mg.mL^{-1}$.

A atividade enzimática foi determinada pelo método espectrofotométrico [Tuttle, 1980] e pelo radioquímico [Hochstadt, 1978]. Ambos os métodos são baseados na medida quantitativa do AMP formado na reação enzimática, porém, o primeiro é mais rápido e simples, embora seja menos sensível e demande uma grande quantidade de amostra (mg de proteína). O método radioquímico, por sua vez, necessita de um tempo maior para preparação do experimento, além de equipamento e materiais de alto custo tais como cintilador, líquido de cintilação e filtros especiais. Mas, apesar dessas desvantagens, o método radioquímico é mais sensível e detecta pequenas quantidades de amostra (μg de proteína).

[4] O cálculo do coeficiente de extinção foi feito por um programa extraído do artigo intitulado "Calculation of protein extintion coefficients from amino acid sequence data", descrito por Gill & von Hippel em *Analytical Biochemistry*, **182**, 319-326, 1989.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

3.1.3.2.1 Ensaio enzimático - método espectrofotométrico

Foram avaliadas as atividades enzimáticas de três amostras de APRT-His e uma de APRT. As amostras de APRT-His encontravam-se a 0,200 $mg.mL^{-1}$ e nos tampões TK-8,5, TrisHis-8,5 e TrisMg-7,5.

Alíquotas de 30 μL de cada amostra foi adicionada separadamente a uma mistura constituída de TRE[5] e 100 $\mu mol.L^{-1}$ de adenina e acompanhada a variação na absorbância da adenina a 256 nm ($\Delta\varepsilon$= 2,1 $mmol^{-1}$ L cm^{-1}) por 300 segundos.

3.1.3.2.2 Ensaio enzimático - método radioquímico

O método radioquímico baseia-se na medida do produto [8-^{3}H]AMP formado na reação catalisada pela APRT entre a [8-^{3}H]adenina e o PRPP em presença do Mg^{2+}. Sabendo-se que a alta concentração de produto pode levar à inibição enzimática, obteve-se inicialmente a curva de atividade enzimática analítica da APRT e em seqüência foram analisadas as amostras.

Amostras de APRT foram diluídas em *tampão de diluição* até as concentrações de 2,8; 3,5; 5,7; 7,0; 9,0; 18 e 28 $mg.mL^{-1}$. Alíquotas de 25 μL de cada amostra foram adicionadas a 25 μL de *solução de reação* e incubadas a 37°C por 10 minutos.

[5] A composição dessa solução está descrita no capítulo 2, item 2.1.1.

Em seguida, 1 mL de solução *tampão de parada* e 200 μL de solução 500 mmol.L^{-1} de cloreto de lantânio foram adicionados à mistura para cessar a reação e permitir a precipitação do [8-^{3}H]AMP. Após breve agitação e repouso no gelo por 15 minutos, as amostras foram filtradas em filtro GF/C para obtenção do precipitado. Após secagem dos filtros durante 12 horas a 22°C, foi feita a contagem do AMP marcado, retido no filtro no *Multi-purpose Scintillation Counter LS 6500*, usando líquido de cintilação *Ultima Gold*^{tm}.

Amostras de APRT a 10 μg.mL^{-1} em TrisMg-7,5 e de APRT-His a 10 μg.mL^{-1} em tampão TK-8,5 na ausência e na presença de 150 mmol.L^{-1} de histidina (TrisHis-8,5) foram diluídas em tampão de diluição para 2,0 μg.mL^{-1} e medidas suas atividades enzimáticas seguindo o mesmo procedimento usado para obtenção da curva de atividade enzimática analítica.

3.1.3.3 Determinação do ponto isoelétrico

A focalização isoelétrica (IEF) é uma técnica eletroforética usada para separar proteínas em uma mistura. Ela é feita em condição não desnaturante e tem como princípio a movimentação de uma partícula carregada em um gradiente de pH quando um campo elétrico é aplicado. Nesse gradiente, a partícula se movimenta até a posição em que sua carga total seja zero (ponto isoelétrico) [Garfin, 1990].

O ponto isoelétrico da APRT-His (μg) e da APRT (μg) em TK-8,5 e TrisMg-7,5, respectivamente, foram determinados experimentalmente com auxílio de equipamento *Phast-System* utilizando um gel com um gradiente de pH variando entre 5 e 8. Simultaneamente, os valores de PI teórico das proteínas também foram obtidos usando-se o programa EXPASY e os valores comparados aos experimentais.

3.1.3.4 Estudo de solubilidade da APRT-His

A solubilidade e a estabilidade de uma proteína *in vitro* dependem da escolha do solvente que pode, por sua vez, modificar as características da proteína em função da alteração da força iônica, pH, concentração de cofatores e aditivos [Pohl, 1990].

A avaliação da solubilidade da APRT-His foi feita em função do pH, da concentração salina e da presença de agentes solubilizantes. Com exceção das amostras contendo AMP, a concentração das demais foi obtida pela medida de absorbância a 280 nm do sobrenadante após centrifugação das amostras a 13.000 rpm a 4°C por 30 minutos, utilizando o coeficiente de extinção calculado de 14.890 $mol^{-1}.L.cm^{-1}$ e massa molecular de 26,7 kDa. As concentrações das amostras contendo AMP foram determinadas pelo método de Bradford.

Inicialmente, amostras de APRT-His purificadas foram dialisadas contra 20 $mmol.L^{-1}$ de tampão fosfato pH 7,0 e 7,5 (TF-7,0 e TF-7,5) e contra 20 $mmol.L^{-1}$ de tampão Tris pH 8,0 8,5 e 9,0 (Tris-8,0, Tris-8,5, Tris-9,0), todos os tampões continham 1 $mmol.L^{-1}$ de PMSF. Após diálise, as amostras a 3 $mg.mL^{-1}$, em triplicata, foram armazenadas por no mínimo 5 dias a 4°C, tendo suas concentrações acompanhadas diariamente conforme descrito. Após avaliação do limite de solubilidade da enzima em cada pH estudado, as amostras da APRT-His a 0,5 $mg.mL^{-1}$, em triplicata, foram dialisadas contra os mesmos tampões na ausência e na presença de 50 $mmol.L^{-1}$ de KCl e tiveram suas concentrações determinadas durante o período de armazenagem de cinco dias a 4°C.

O efeito da concentração salina na solubilidade da APRT-His foi verificado após diálise das amostras a 0,5 $mg.mL^{-1}$, em triplicata, contra tampão Tris-8,5 contendo 50, 150, 500 e 1000 $mmol.L^{-1}$ de KCl. A escolha pelo íon potássio foi feita com o intuito de manter o mesmo cátion dos tampões fosfato utilizados.

A influência do íon níquel, do AMP, do imidazol e do aminoácido histidina na solubilidade da APRT-His foi observada separadamente após diálise das amostras a 1,8 $mg.mL^{-1}$ contra tampão Tris-8,5 contendo 50 $mmol.L^{-1}$ de cloreto de níquel, 1 $mmol.L^{-1}$ de AMP, 150 $mmol.L^{-1}$ de Imidazol, 50, 100 e 150 $mmol.L^{-1}$ de histidina livre, na ausência e presença de 150 $mmol.L^{-1}$ de KCl.

3.1.4 Caracterização espectroscópica

3.1.4.1 Espectroscopia de absorção eletrônica

A espectroscopia de absorção eletrônica voltada à caracterização de proteínas *in vitro* pode fornecer informações sobre o ambiente molecular da proteína, uma vez que suas características espectrais podem variar de acordo com o ambiente químico em que se encontra. A mudança de solventes ou a presença de ligante, por exemplo, podem alterar a freqüência e a intensidade de absorção ou levar a uma modificação na forma da banda espectral [Cantor, 1980].

Ao longo dos experimentos, a absorção eletrônica foi amplamente usada para caracterização e monitoramento dos procedimentos de purificação e também para caracterizar a interação da enzima APRT-His e APRT com seus ligantes. Além disso, essa técnica foi fundamental no acompanhamento da solubilidade da APRT-His em função do tempo.

Espectros de absorção eletrônica das amostras de APRT-His e APRT foram coletados entre 220 e 300 nm a 25°C com auxílio de uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico, no espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001. Como referência, foram utilizadas soluções dos correspondentes tampões descritos na seção anterior.

Espectros da APRT-His e da APRT na presença e na ausência de ligantes foram registrados em um intervalo de 240 a 300 nm. As amostras a 200 $\mu g.mL^{-1}$ en-

contravam-se em TK-7,5 e 8,5 e TrisMg-7,5 contendo 100 $\mu mol.L^{-1}$ de adenina, 1 $mmol.L^{-1}$ de PRPP e 1 $mmol.L^{-1}$ de AMP.

3.1.4.2 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

O dicroísmo circular é a propriedade que uma molécula quiral tem de absorver diferentemente a luz circularmente polarizada à direita e à esquerda.

Como as proteínas estão repletas de centros quirais (carbonos α) distribuídos e arranjados ao longo da cadeia principal em hélices alfa, folhas beta, estrutura desordenada e outras, é possível caracterizar a estrutura secundária dessas macromoléculas e quantificá-las por espectroscopia de CD [Cantor, 1980].

Por CD é possível observar mudanças conformacionais induzidas por interações da proteína com ligantes específicos e solventes, assim como verificar alterações ocorridas em função do pH, da temperatura, da força iônica, e monitorar fenômenos de desenovelamento/renovelamento [Cantor, 1980].

Espectros de CD foram registrados no intervalo de 195/200 a 250 nm, como uma média de dezesseis varreduras em cubetas cilíndricas de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Em todos os casos, eles foram obtidos em elipticidade (θ) e, em alguns casos, convenientemente transformados em elipticidade molar ($[\theta]$), utilizando a relação:

$$[\theta] = \frac{100.\ 10^{-6}\ N}{C.l} . \theta$$

em que N é 115 (massa molar média de um resíduo), C é a concentração da proteína em mg/ml e l é o caminho ótico em cm. Por razões históricas, a concentração era medida em g/100 cm^3, por esta razão aparece o fator 100 na equação acima. A elipticidade molar, [θ], é expressa em grau.cm^2.$dmol^{-1}$. 10^3.

Espectros de CD das amostras de APRT-His e de APRT em TK-7,5 e 8,5 com concentrações variando de 0,04 a 0,40 $mg.mL^{-1}$ foram coletados, sendo verificado o efeito dos ligantes e do aminoácido histidina (nas amostras de APRT-His) nesses espectros.

3.1.4.2.1 Estimativa da estrutura secundária

O espectro de CD é a contribuição linear de todas as frações de estrutura secundária que constituem uma dada proteína. Sendo assim, por uma simples análise de um espectro de CD é impossível obter o teor de cada uma dessas estruturas em separado [Greenfield, 1996]. Para estimar o conteúdo de frações de estruturas secundárias são usados programas como o *Convex Constraint Analysis* (CCA) [Perczel, A., 1992], o *Self Consistent Method* (SELCON) [Seerama *et al*, 1993] e outros. Os programas CCA e SELCON são métodos de desconvolução, isto é, extraem diretamente as componentes comuns dos espectros experimentais de CD, permitindo a obtenção de suas curvas puras (α-hélice, folha β antiparalela, volta β e/ou

folha β paralela e estrutura desordenada, contribuições de resíduos aromáticos e/ou pontes de dissulfetos) e as porcentagens que as mesmas representam no espectro.

A estimativa do teor de estrutura secundária foi feita pelo programa *Self Consistent* (SELCON-2), usando um grupo de proteínas de referência constituído de 33 espectros de CD e suas respectivas frações determinadas por cristalografia de raios X. Por esse método, o espectro da proteína a ser analisado é incluído em uma matriz com dados espectrais de CD e é selecionada inicialmente a estrutura de uma proteína ao acaso. A equação da matriz relacionando o espectro de CD e a estrutura secundária é resolvida pelo algoritmo de decomposição de valor singular (SVD)[6] e as soluções válidas satisfazem as condições da soma de frações entre 0,95 e 1,05, na qual a fração é maior do que –0,025 e o desvio r.m.s. entre a forma calculada e a experimental é menor do que $\Delta\varepsilon$. A solução, a qual é a média de todas as soluções válidas, substitui a seleção inicial e o processo é repetido até que a autoconsistência seja alcançada.

3.1.4.3 Espectroscopia de emissão de fluorescência

É possível caracterizar macromoléculas biológicas por emissão de fluorescência e verificar mudanças conformacionais discretas. Em proteínas, no microambiente dos fluoróforos naturais como triptofano, tirosina e fenilalanina, podem ocorrer

[6] Hennessey, J.P., and Johnson, W.C. Jr. Information content in the circular dichroism of protein. Biochemistry 20, 1085-1094, 1981.

alterações no espectro de emissão, no rendimento quântico ou na posição do máximo de emissão. As alterações também podem ser induzidas por ligantes, supressores, solventes, íons ou agentes solubilizantes [Lakowicz, 1983; Eftink, 1991].

Para verificar o intervalo de linearidade das medidas, amostras de APRT com concentração variando entre 0,035 e 0,142 $mg.mL^{-1}$ tiveram seus espectros coletados após excitação a 280 nm.

Espectros de emissão de fluorescência estática da APRT-His e da APRT em tampões com diferentes valores de pH também foram coletados na presença e na ausência de ligantes. As amostras, a 0,110 $mg.mL^{-1}$, foram excitadas em 295 nm e seus espectros de emissão coletados de 305 a 450 nm. Os tampões e os ligantes estudados foram, respectivamente, TK-8,5 e TrisMg-7,5, adenina (100 $\mu mol.L^{-1}$), PRPP (1 $mmol.L^{-1}$), AMP (1 $mmol.L^{-1}$) e Mg^{2+} (na forma de cloreto e sulfato - 5 $mmol.L^{-1}$). Todas as medidas foram conduzidas em um espectrofluorímetro Hitachi modelo FP-777 a 20°C com auxílio de cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Após a coleta, foi feita a subtração dos espectros dos tampões a fim de excluir a interferência do espalhamento Raman. Em todas as medidas, foram usados filtros ópticos de 295 nm no compartimento de emissão do equipamento.

O efeito da adição do PRPP á solução de Trp livre com também foi acompanhada por fluorescência seguindo as condições citadas anteriormente. À solução de Trp livre com DO de 0,03 foram adicionadas alíquotas de uma solução de PRPP a 10 $mmol.L^{-1}$ até as respectivas concentrações 1, 2, 3, 4, 5 $mmol.L^{-1}$.

CAPÍTULO 4

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1.1 Expressão e purificação enzimática

4.1.1.1 APRT-His

Cepas de *E. coli* SG13009 contendo o gene *aprt*, inserido no plasmídeo pQE30, e o plasmídeo de expressão pREP4 expressaram cerca de 10 $mg.mL^{-1}$ de APRT-His por litro de cultura.

Na purificação, em coluna de Ni-NTA, foram utilizados dois tampões: o TFK-7,5 e o TK-8,5. O primeiro tampão, usado na fase inicial do trabalho, foi substituído pelo segundo após conclusão do ensaio de solubilidade e da caracterização espectroscópica preliminar da enzima. Tal modificação, embora fundamental para a solubilização da proteína, não alterou a homogeneidade das amostras durante as etapas de expressão e purificação. A figura 4.1 mostra um gel de SDS-PAGE a 15% obtido após submeter as amostras a condições desnaturantes.

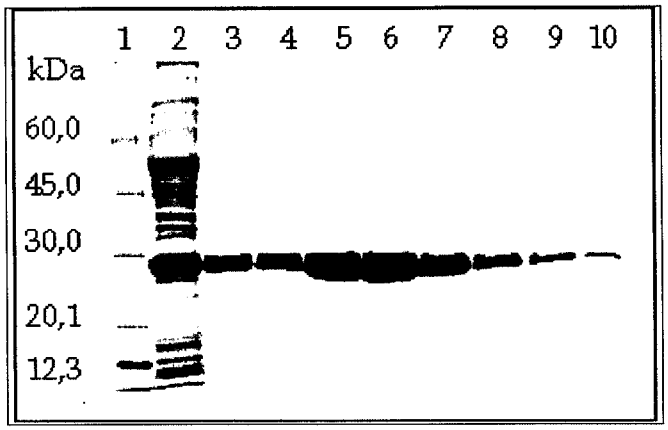

Figura 4.1 - Gel de SDS-PAGE a 15% da APRT-His antes e após cromatografia de afinidade. Raia 1) Padrão de massa molecular; 2) Extrato bruto após centrifugação; 3 a 10) Frações de APRT-His eluídas com 350 mmol.L^{-1} de imidazol da coluna de Ni-NTA.

A presença de uma banda única nas frações de 3 a 10, correspondente a A-PRT-His, revela a eficiência da purificação conduzida em coluna de Ni-NTA. Nessa coluna, o Ni^{2+}, cujo número de coordenação é 6, possui 4 sítios ocupados pelo ácido nitrilo triacético (NTA), ligado à matriz de fluxo rápido, e 2 sítios coordenados com moléculas de água e, portanto, livres para ocupação de histidinas. À medida que a proteína, com seis resíduos de histidina adicionais, percola pela coluna, ela coordena-se à resina pelos dois sítios livres, permanecendo ligada até que seja eluída com uma solução ácida ou com imidazol, que, por sua semelhança estrutural com a histidina, é capaz de ligar-se à resina deslocando a proteína presa a ela[7]. Além de histidinas, o Ni^{2+} também pode formar complexos com resíduos de cisteínas ou triptofano presentes nas proteínas. Por isso, proteínas contaminantes são freqüen-

[7] Maiores informações sobre essa resina podem ser encontradas no *site* http://www.qiagen.com.

temente eluídas com baixas concentrações de imidazol[8] (10 a 20 $mmol.L^{-1}$) antes da eluição da proteína de interesse. Nesse caso, a extração dos contaminantes foi feita com 60 $mmol.L^{-1}$ de imidazol, já que em concentrações menores foi observada a presença de contaminantes nas frações de interesse.

Após purificação, o grau de oligomerização APRT-His foi investigado submetendo a amostra à coluna de exclusão molecular (Superdex-75). Por se tratar de uma coluna capaz de separar proteínas globulares com massa molecular entre 3 e 70 kDa, essa coluna permite a diferenciação de formas monoméricas, diméricas e por vezes tetraméricas. O grau de oligomerização da proteína é definido, num primeiro momento, pela análise do cromatograma gerado na corrida, podendo ser confimado por um gráfico de *log* de massa molecular (MM) dos padrões *versus* seus correspondentes volumes de eluição. A figura 4.2 mostra o cromatograma da A-PRT-His e dos padrões eluídos em TK-8,5, onde se verifica que a MM aparente da APRT-His, eluída entre 9 e 10 mL, é cerca de 49 kDa, ou seja, quase o dobro da MM do seu monômero (26,7 kDa), indicando que a enzima em TK-8,5 oligomeriza-se em dímero.

[8] Processo também chamado de lavagem da coluna.

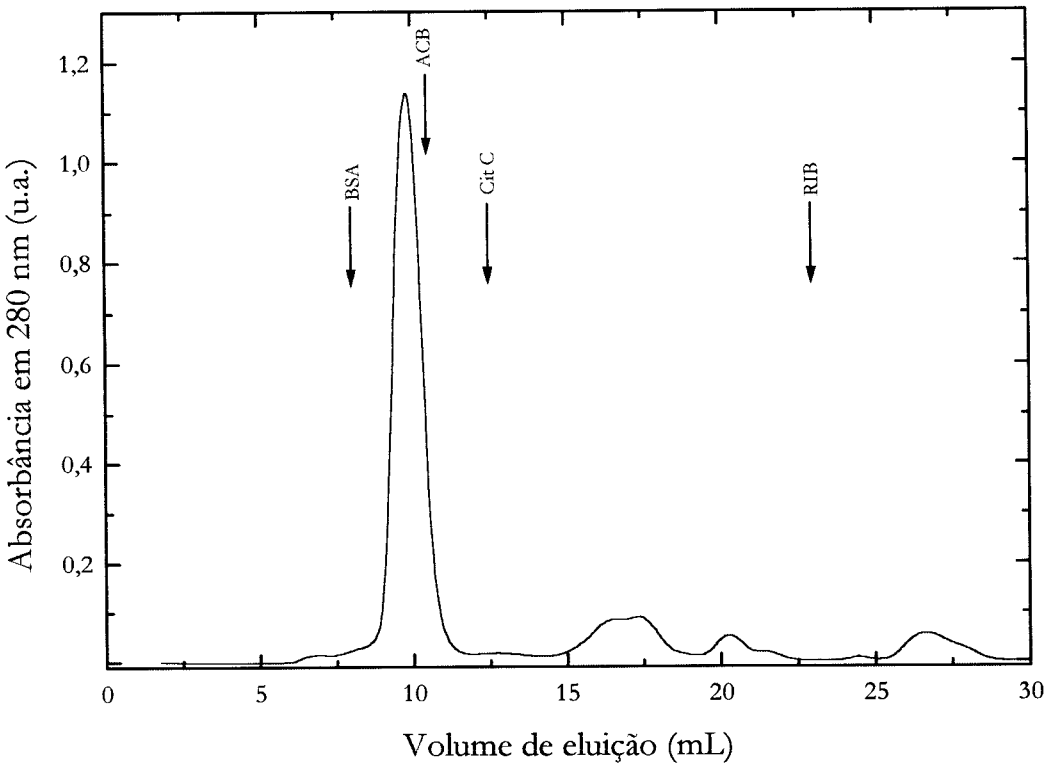

Figura 4.2 - Cromatograma da APRT-His em Superdex-75. Na figura, o pico mais intenso corresponde à eluição da APRT-His em TK-8,5 na presença de 150 mmol.L^{-1} de KCl após padronização da coluna. As posições de eluição dos padrões de massa molecular: BSA (albumina de soro bovino; 66,0 KDa), ACB (anidrase carbônica; 30,0 KDa), Cit C (citocromo c; 12,4 KDa) e RIB (riboflavina, 0,375 KDa) estão indicadas por setas.

4.1.1.2 APRT

Cerca de 5 mg.mL^{-1} de APRT por litro de cultura foi obtido na expressão da enzima em cepas de *E. coli* BL21(DE) contendo o gene *aprt* subclonado no plasmídeo pET29A+. Esse rendimento é correspondente à metade do obtido com a purificação da APRT-His e deve-se provavelmente à ausência da cauda de histidinas da proteína. A purificação, realizada em duas etapas, além de exigir um tempo maior (cerca de 5 dias ou mais), também implica em menor recuperação a cada etapa.

A APRT foi purificada usando-se uma coluna cromatográfica de afinidade (AMP-agarose) e outra de exclusão molecular (Superdex-75). Como um dos produtos da reação catalisada pela APRT é o AMP, foi utilizada uma resina contendo esse composto.

A homogeneidade das amostras purificadas e o rendimento obtido na expressão bacteriana foram verificados através de ensaios eletroforéticos sob condições desnaturantes (Figura 4.3).

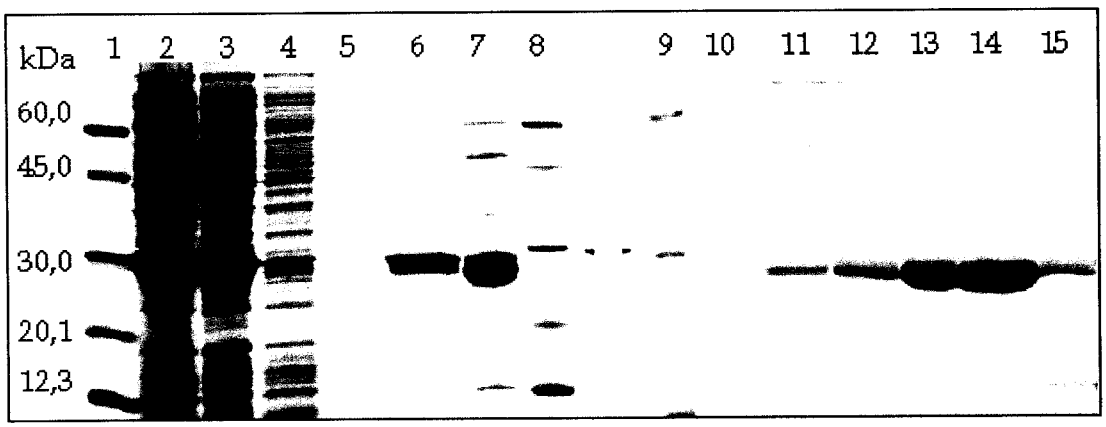

Figura 4.3 - Eletroforese da APRT antes e após cromatografia de afinidade e após filtração molecular. Raias 1, 8 e 9) Padrão de massa molecular; 2) Extrato bruto após lise celular; 3) Extrato bruto após centrifugação; 4 e 5) Frações eluídas com 1 mmol.L^{-1} de AMP da coluna de AMP-agarose; 6) APRT eluída com 2 mmol.L^{-1} de AMP da coluna de AMP-agarose; 7) APRT concentrada até 8 mg.mL^{-1} após purificação em coluna de AMP-agarose; 10 a 15) Frações de APRT eluídas com TrisMg-7,5 da coluna Superdex-75.

As raias 6 e 7 mostram a enzima eluída da coluna de afinidade, diluída e concentrada, enquanto as raias de 11 a 15 mostram as frações 5, 6, 7, 8 e 9 eluídas da Superdex-75. A figura 4.4 ilustra a eluição da APRT sobre a coluna Superdex.

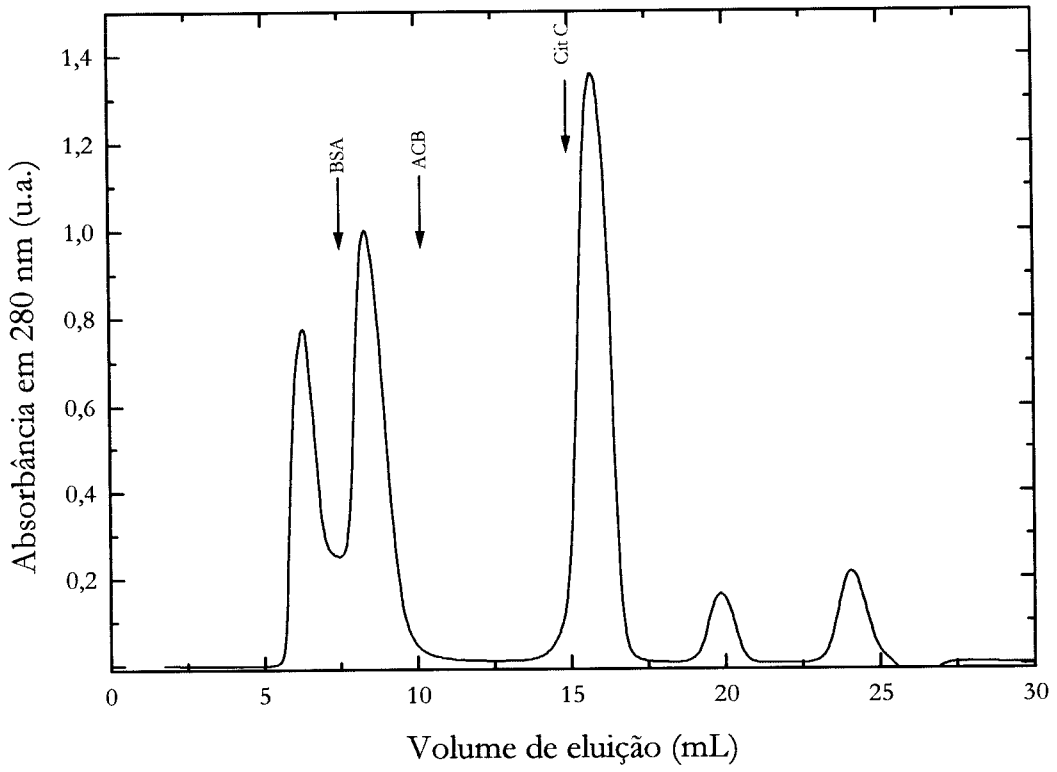

Figura 4.4 - Cromatograma da APRT em Superdex-75. O pico observado entre 8 e 9 mL corresponde à APRT eluída em TrisMg-7,5 os demais picos são de contaminantes. As posições de eluição dos padrões de peso molecular: BSA (albumina de soro bovino, 66,0 KDa), ACB (anidrase carbônica; 30 KDa), Cit C (citocromo c, 12,4 KDa) estão indicadas por setas.

A APRT em TrisMg-7,5 foi eluída em 9 mL, ou seja, na posição que corresponde a uma massa molecular aparente de 60,2 kDa. Considerando que o monômero possui uma massa molecular de 25,8 kDa, pode-se dizer que essa proteína encontra-se em uma forma dimérica nessa condição. A fração 8 (correspondente à raia 14 da figura 4.3) foi a mais homogênea obtida, assim, os experimentos foram realizados com essa fração.

4.1.2 Determinação do ponto isoelétrico

Sabe-se que uma proteína, acondicionada em um pH próximo ao seu valor de PI, agrega-se levando à precipitação [Voet & Voet, 1995]. Assim, com o objetivo de se utilizar um tampão com pH distante do PI, foram determinados os valores experimentais e teóricos dos pontos isoelétricos da APRT-His e da APRT. Pela tabela 4.1 é possível comparar os resultados obtidos com as duas enzimas e verificar que a APRT-His apresenta um PI experimental distante daquele obtido pelo programa Expasy. O mesmo, contudo, não ocorre com a APRT, que mostra proximidade entre os valores de PI teórico e experimental.

Tabela 4.1 - Valores teóricos e experimentais de PI da APRT-His e da APRT.

Proteína	PI	
	Teórico	Experimental
APRT em TrisMg-7,5	6,12	6,40±0,20
APRT-His em TK-8,5	6,80	7,70±0,16

A diferença entre os valores de PI teórico e experimental da APRT-His e a diferença entre seus valores e os obtidos com a APRT parece estar relacionada, sobretudo, à presença da cauda de histidinas e à sua conformação na região N-terminal da APRT-His.

Considerando que o pKa das histidinas em proteína está em torno de pH 7,5, pode-se afirmar que em pH 8,5, esses resíduos encontram-se totalmente ionizados, adquirindo uma densidade de carga negativa proveniente dos pares de elétrons isolados do nitrogênio. A presença dessas cargas adicionais na estrutura da APRT faz com que seu valor de PI desloque para um valor mais alto de pH.

4.1.3 Estudo de solubilidade da APRT-His

Inúmeras vezes, proteínas recombinantes solúveis *in vivo* tornam-se insolúveis *in vitro* em virtude da alteração no seu ambiente biológico [Pohl, 1990]. A precipitação da APRT-His em TF-7,5 foi observada, inicialmente, durante a diálise para retirada do imidazol e acentuou-se à medida que ela era concentrada e armazenada no mesmo tampão. A caracterização por CD após centrifugação das amostras a 10.000 rpm por 10 minutos, por sua vez, indicou que a proteína, embora mostrasse uma solubilidade "aparente", não fornecia espectros reprodutíveis, indicando que possivelmente estaria ocorrendo a formação de complexos macromoleculares solúveis, no sobrenadante. Esses resultados mostraram que, apesar de solúveis, esses complexos estariam promovendo o espalhamento da luz incidente sobre as amostras de CD. Tais observações conduziram os experimentos a um estudo para investigação da solubilidade da proteína em função de parâmetros diversos (concentração, pH e força iônica).

A definição do intervalo de concentração estudado foi baseada na constatação de que APRT-His a 3,0 $mg.mL^{-1}$ precipitava durante a diálise contra tampão fosfato pH 7,5 contendo 300 $mmol.L^{-1}$ de KCl. Assim, para definir seu o limite de solubilidade, a APRT-His armazenada no mesmo tampão, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 $mg.mL^{-1}$ foi acompanhada por 5 dias. Durante esse período, notou-se que as amostras a 0,1 $mg.mL^{-1}$ eram "aparentemente" solúveis, embora ainda apresentassem falta de reprodutibilidade nos espectros de CD. Nas demais concentrações (acima de 0,5 $mg.mL^{-1}$), ocorreu precipitação diária.

A baixa solubilidade observada para a APRT-His (0,1 $mg.mL^{-1}$) poderia estar relacionada ao pH do tampão utilizado (TF-7,5). Por isso, a solubilidade da APRT-His na concentração de 0,5 $mg.mL^{-1}$ foi estudada em tampões com pH variando de 7,2 a 9,0, por um período de 5 dias. Os experimentos foram conduzidos em tampão fosfato (pH 7,2 e 7,7) e em tampão Tris (pH 8,0, 8,5 e 9,0). Ambos tiveram sua força iônica constante, uma vez que foram preparados a partir dos seus respectivos sais. Além disso, esses experimentos também foram realizados na presença de 50 $mmol.L^{-1}$ de KCl

A figura 4.5 mostra os gráficos de concentração de APRT-His em função do tempo. Conforme citado na seção 3.1.3.4, a concentração das amostras foi obtida diariamente pela medida de absorbância, a 280 nm, do sobrenadante após centrifugação das amostras a 13.000 rpm a 4°C por 30 minutos. Após 5 dias, cerca de 92% da proteína permaneceu solúvel em Tris-8,0, 8,5 e 9,0. Enquanto isso, em tampão

fosfato pH 7,2 e 7,7, a solubilidade foi de 76%, independentemente da presença de KCl.

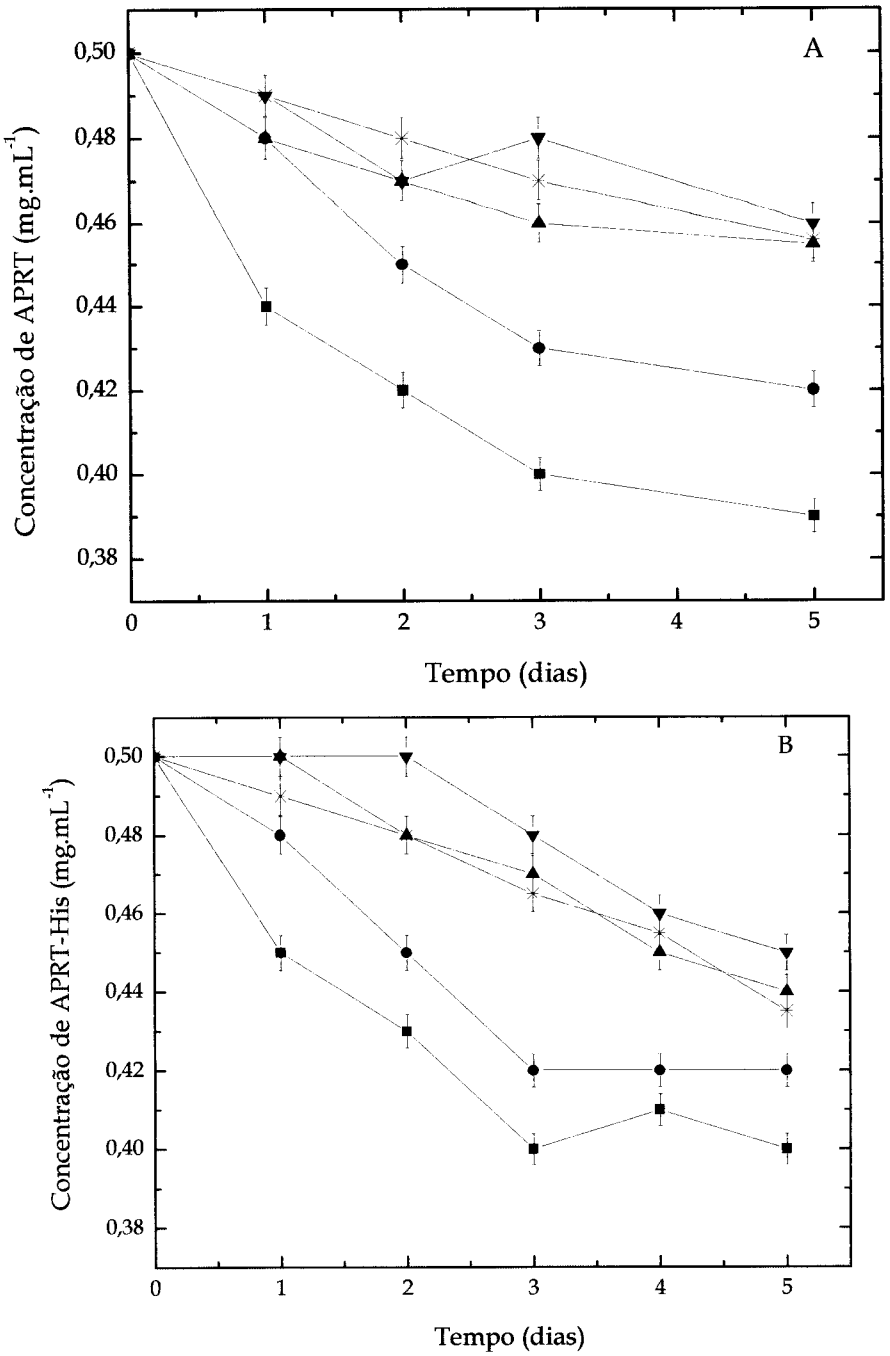

Figura 4.5 - Concentração da APRT-His em diferentes valores de pH. Concentração da APRT-His, em diferentes valores de pH, em função do tempo na ausência (A) e na presença de 50 mmol.L^{-1} de KCl (B). APRT-His em tampão fosfato pH 7,2 (■), tampão fosfato pH 7,5 (●), Tris-8,0 (*), Tris-8,5 (▼) e Tris-9,0 (▲).

Como descrito no item 4.2, o PI para a APRT-His calculado a partir de sua seqüência foi de 6,8, enquanto o experimental foi de 7,7. Analisando os resultados de solubilidade obtidos pela variação do pH e os resultados provenientes da análise de PI, optou-se pelo uso do tampão TK-8,5 para a manipulação da APRT-His desde sua expressão, procedimentos de purificação e armazenamento.

Como a solubilidade de muitas biomoléculas depende da força iônica dos solventes [Harris, 1999], insistimos na investigação desse aspecto, incubando a APRT-His em TK-8,5 (0,5 $mg.mL^{-1}$) em 50, 150, 500 $mmol.L^{-1}$ e 1 $mol.L^{-1}$ de KCl por um período de 15 dias. Os resultados mostraram que a solubilidade da enzima manteve-se maior nas concentrações de 150 e 500 $mmol.L^{-1}$ de KCl (80% do valor inicial), enquanto em 50 $mmol.L^{-1}$ sua solubilidade caiu para 58%. Por outro lado, na presença de 1 $mol.L^{-1}$ a solubilidade foi menor que 20% e pode ser explicada devido ao efeito de *salting-out*[9].

As amostras da enzima armazenada em Tris-8,5 contendo 150 e 500 $mmol.L^{-1}$ de KCl também foram avaliadas por CD. A figura 4.6 contém os resultados dessa análise.

[9] O efeito *de salting-out* é a precipitação da proteína induzida pelo excesso de sal..

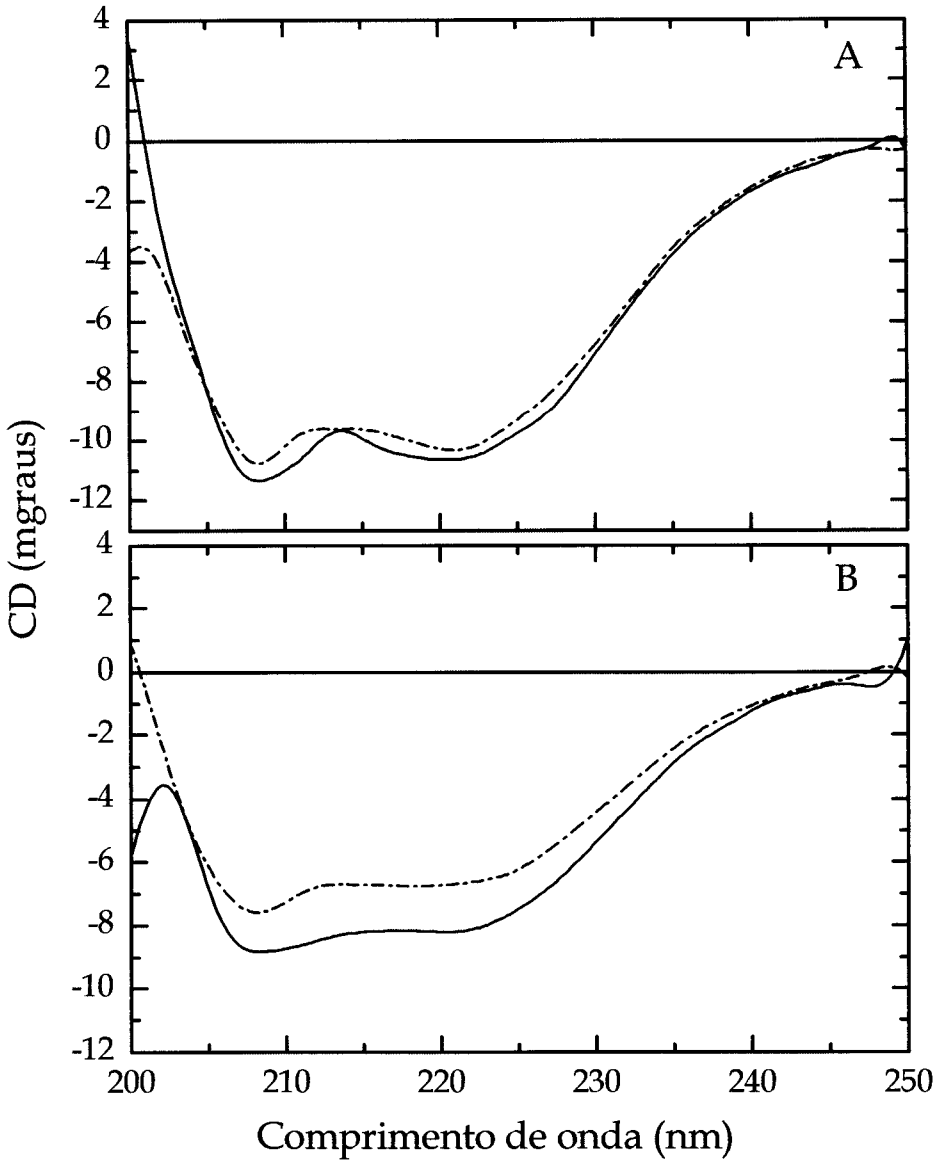

Figura 4.6 - Espectros de CD da APRT-His em Tris pH 8,5 contendo 150 e 500 mmol.L-1 de KCl. Nesta figura são mostrados os espectros das amostras, a 0,4 mg/mL, em duplicata (-.-) e (--). A figura (A) refere-se a APRT-His armazenada com 150 mmol.L^{-1} de KCl e a figura (B) referem-se à mesma proteína em 500 mmol.L^{-1} de KCl. Todos os espectros foram coletados em 16 ciclos consecutivos, com o intervalo de 200 a 250 nm usando uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Como é possível observar na figura 4.6, os espectros das amostras contendo 300 mmol.L^{-1} de KCl não mostram reprodutibilidade entre os espectros. É possível

que, nessa concentração, a APRT-His estivesse próxima à condição de saturação salina ou de *salting-out* e que, mesmo não sendo significativamente perceptível por medidas de concentração, estivesse ocorrendo também a formação de complexos macromoleculares no decorrer da manipulação da amostra. Os resultados de solubilidade da APRT-His mostraram, então, que a melhor condição para mantê-la solúvel em concentração abaixo de 0,5 $mg.mL^{-1}$ seria purificando-a e armazenando-a em tampão Tris-8,5 na presença de 150 $mmol.L^{-1}$ de KCl (TK-8,5).

Soluções protéicas em concentrações abaixo de 0,5 $mg.mL^{-1}$ são freqüentemente utilizadas para estudos espectroscópicos. Contudo, para ensaios de cristalização ou mesmo RMN, é necessário que a proteína esteja em concentrações cerca de 5 a 10 vezes maior. Por isso, os estudos sobre solubilidade da APRT-His foram estendidos, investigando-se o efeito de alguns agentes de solubilidade nesse fenômeno.

Embora não seja possível descrever um sistema de solventes de aplicação universal, a adição de certos componentes à solução de armazenagem pode ser feita no sentido de auxiliar a estabilização de determinadas proteínas. A presença de aditivos ou ligantes em uma solução protéica pode afetar a solubilidade de macromoléculas diretamente pela estabilização da estrutura terciária ou indiretamente por modificação da estrutura e propriedades físico-químicas dos solventes [Ries-Kautt & Ducroix, 1992]. Nesse sentido, os aditivos cloreto de níquel, AMP, imidazol e histidina livre foram adicionados, separadamente, à APRT-His armazenada a 1,8 $mg.mL^{-1}$ em Tris-8,5. Como citado na seção 3.1.3.4, esses aditivos foram adicionados por meio

de diálise, levando a solubilização diferenciada da proteína no saco de diálise. Devido a esse fato, o inicio do experimento deu-se após a diálise pelo acompanhamento da concentração protéica do sobrenadante por 7 dias consecutivos. A figura 4.7 ilustra a influência de cada aditivo (ou agente de solubilização) na solubilidade da enzima durante o período de armazenagem da proteína.

A ausência da curva relativa à APRT-His na presença do Ni^{2+} deve-se ao fato de as amostras terem precipitado durante o processo de diálise. Diante da precipitação, deduz-se que esse íon ao ser coordenado pelas histidinas de várias moléculas adjacentes estaria contribuindo para aumentar a interação intermolecular proteína-proteína.

Ao contrário do que ocorreu com o níquel, a presença dos demais aditivos elevou a solubilidade da APRT-His. Após 7 dias de armazenamento, a presença de histidina livre promoveu a solubilidade de cerca de 75% da proteína, ao passo que o imidazol e o AMP promoveram, respectivamente, a solubilização de 70% e 60% da APRT-His. Um fato a ser destacado é que a adição de 150 $mmol.L^{-1}$ de KCl mostrou-se inócua em aumentar a solubilidade da enzima quando na presença desses aditivos. Vale ressaltar que os experimentos também foram conduzidos com NaCl, substituindo o KCl, e não foram observadas diferenças significativas nesses resultados.

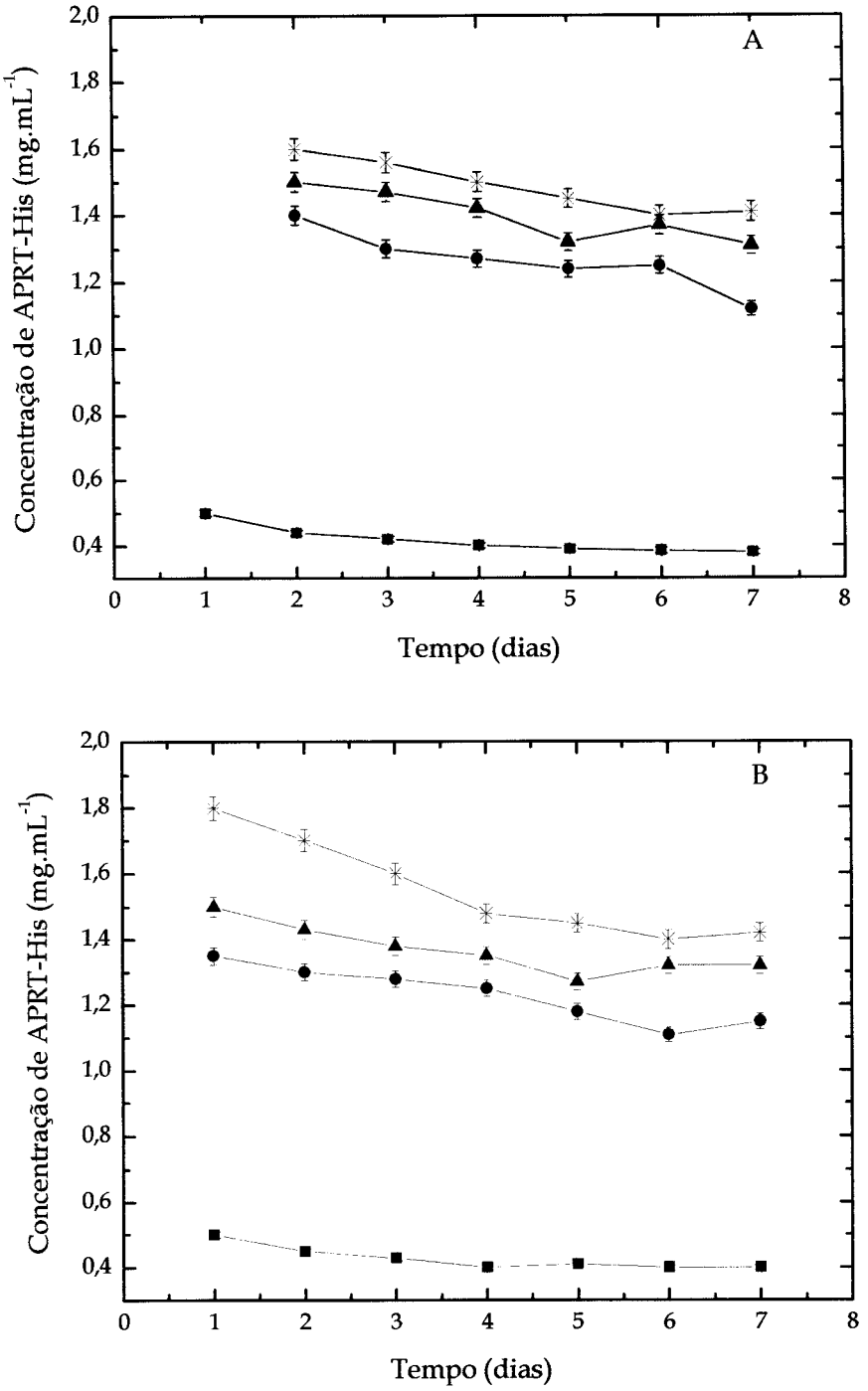

Figura 4.7 - Influência de agentes solubilizantes na concentração da APRT-His. Amostras de APRT-His, com concentração inicial de 1,8 $mg.mL^{-1}$ em Tris-8,5 na ausência (A) e na presença de 150 $mmol.L^{-1}$ de KCl (B) e de (■) nenhum ligante, (•) 1 $mmol.L^{-1}$ de AMP, (▲) 150 $mmol.L^{-1}$ de imidazol e (*) 150 $mmol.L^{-1}$ de histidina. As concentrações foram monitoradas pela medida de absorbância, a 280 nm, do sobrenadante retirado após centrifugação das amostras a 13000 rpm por 30 minutos e a 4°C. Na figura a precipitação ocorrida durante a diálise das amostras é representada pela ausência da linha ligando a concentração inicial ao primeiro ponto de cada curva.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Com base nessas observações, supõe-se que o aumento de solubilidade promovido pela histidina livre e pelo imidazol tenha ocorrido devido à minimização da interação das seis histidinas do peptídeo de fusão com regiões de potencial eletrostático positivo de moléculas adjacentes ou das interações intermoleculares do tipo dipolo-dipolo que poderia levar à formação de grandes agregados. É importante lembrar que a proteína armazenada em Tris-8,5 possui todas as histidina da porção N-terminal ionizadas e com densidade eletrônica negativa. Na Figura 4.8 são ressaltadas as regiões com potencial positivo e negativo, presentes na superfície da APRT.

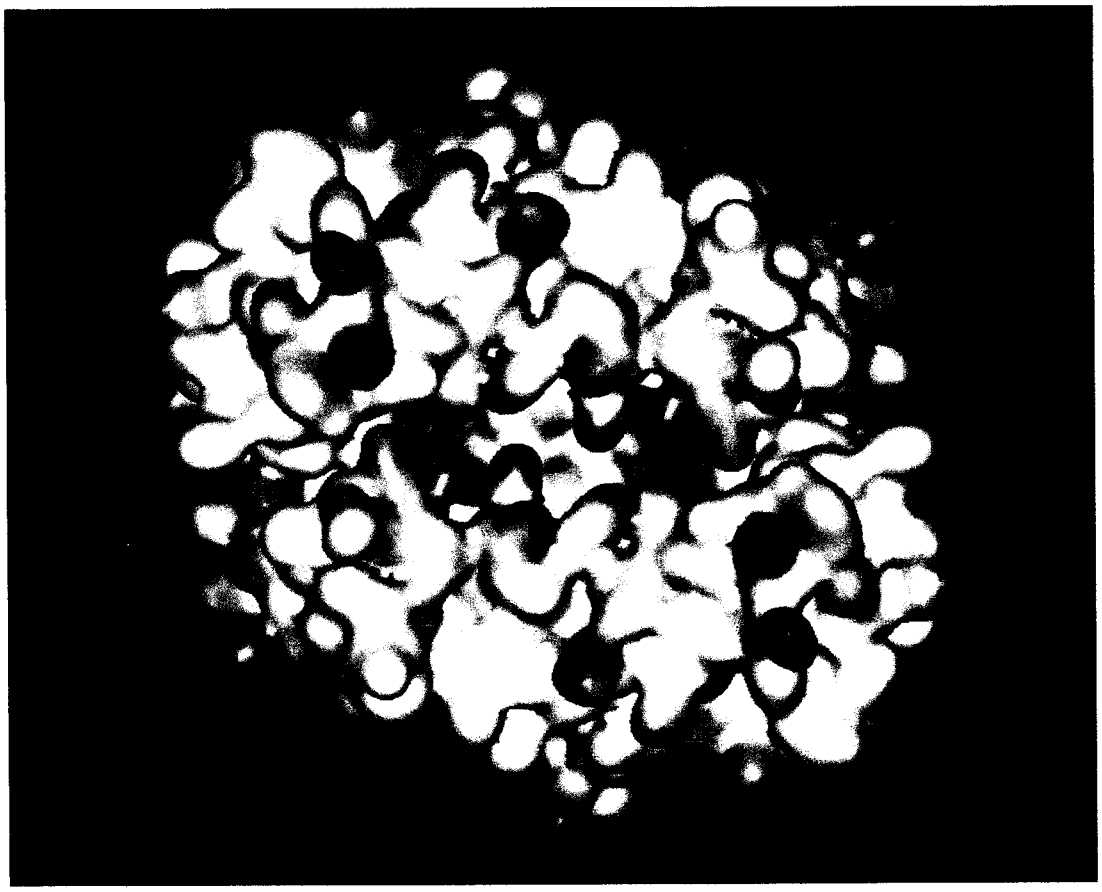

Figura 4.8 - Estrutura dimérica da APRT de *L. tarentolae*. Na figura, as regiões em azul ressaltam os resíduos com carga positiva enquanto as regiões em vermelho ressaltam os resíduos com carga negativa.

Como o melhor resultado obtido foi na presença de histidinas livres, um experimento aumentando-se a concentração desse aminoácido livre de 50 para 100 e 150 mmol.L^{-1} foi realizado. Esses resultados estão ilustrados na Figura 4.9 e demonstram que a solubilidade não foi significativamente alterada com o aumento da concentração de histidina.

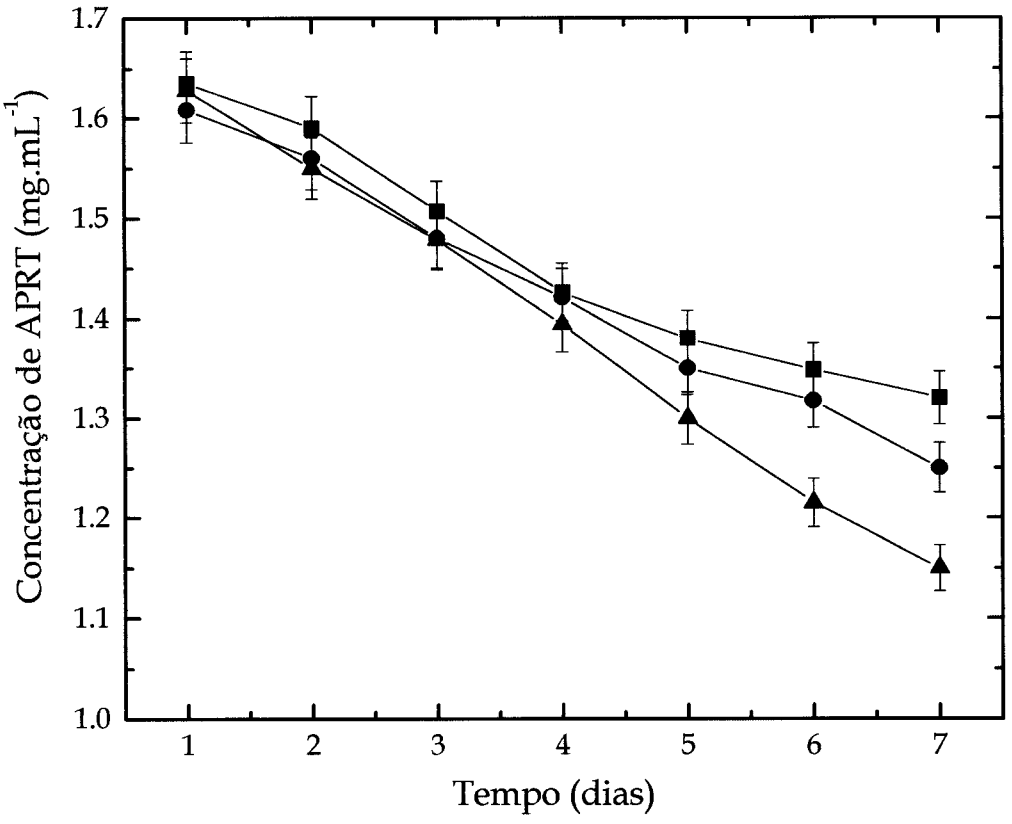

Figura 4.9 - Efeito da concentração de histidina na solubilidade da A-PRT-His. Nesta figura evidencia-se a variação da concentração da APRT-His (C_i= 01,8 mg.mL^{-1}) que ocorre quando 50 mmol.L^{-1} de histidina (▲), 100 mmol.L^{-1} de histidina(●) e 150 mmol.L^{-1} de histidina (■) são adicionados no tampão de armazenagem da APRT-His.

A APRT-His, em tampão Tris pH 8,5, contendo 50 $mmol.L^{-1}$ de histidina, na presença de 1 $mmol.L^{-1}$ de PMSF, foi concentrada até 8 $mg.mL^{-1}$, permanecendo estável por 7 dias, a 4°C.

A análise conjunta dos resultados de determinação do PI experimental e dos estudos de solubilidade permitiu-nos concluir que a purificação e o armazenamento da APRT-His, inicialmente conduzidos em pH 7,5, levaram a intensa precipitação da enzima pelo fato de estar armazenada em pH próximo ao valor de PI experimentalmente obtido.

Após a definição das condições de solubilidade da APRT-His, foram conduzidos alguns estudos comparativos de atividade enzimática com a APRT.

4.1.4 Ensaio de atividade enzimática

As atividades enzimáticas da APRT-His e da APRT foram determinadas pelo método espectrofotométrico [Tuttle & Krenitsky, 1980] e pelo radioquímico [Hochstadt, 1978].

O método espectrofotométrico baseou-se na variação de absorbância (ΔA) que ocorre à medida que o produto AMP é formado. A concentração do produto é calculada pela equação da Lei de Beer $\Delta A = \varepsilon.b.c$.

Como a ΔA ocorre em função da adição da adenina ao nucleosídeo, torna-se necessário utilizar uma variação de coeficiente de absortividade molar ($\Delta\varepsilon$), ao invés

de ε, para o cálculo da concentração do AMP formado (n). O Δε corresponde, então, à diferença entre o coeficiente de absortividade molar da adenina ligada e no estado livre e igual a 2,1 $mmol^{-1}.L.cm^{-1}$, como indicado por Tutle e Krenitsky (1980).

A partir disso, a concentração do produto formado relaciona-se com a atividade enzimática pela equação:

$$\text{Atividade enzimática específica} = c.\ \Delta A.1000\ /\ \Delta t.c_p \qquad \textbf{(1)}$$

em que Δt é a variação de tempo em minutos e c_p a concentração enzimática em $g.L^{-1}$. A figura 4.10 exemplifica o resultado de um ensaio enzimático da APRT.

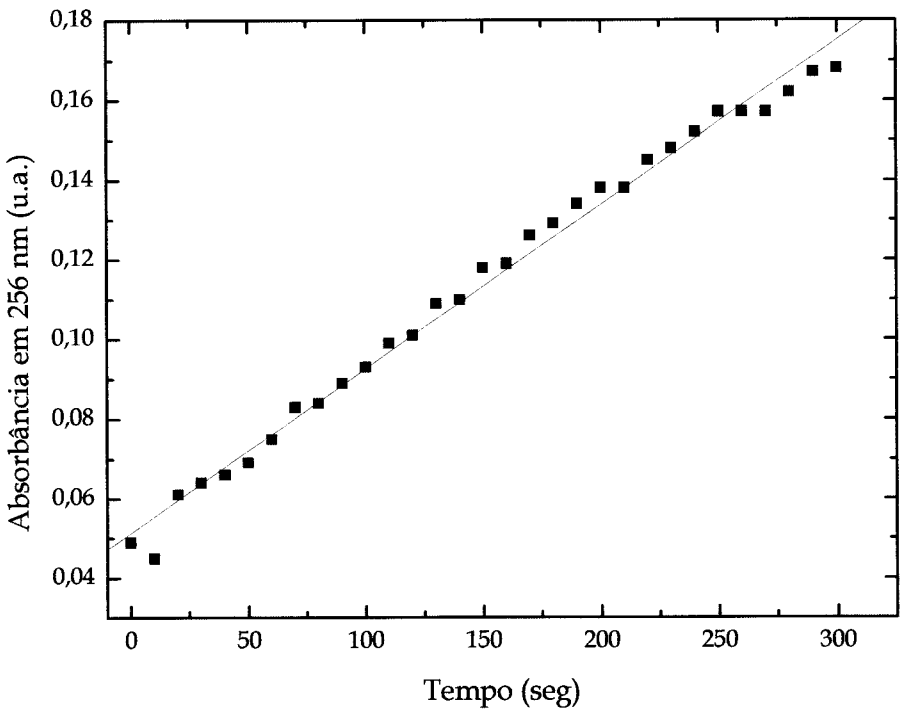

Figura 4.10 - Gráfico obtido no ensaio de atividade enzimática da APRT (método espectrofotométrico). 30 μg de APRT a 0,2 $mg.mL^{-1}$ foram adicionados á solução de TER contendo 100 $\mu mol.L^{-1}$ de adenina. A reação foi acompanhada a 256 nm por 300 segundos.

Na tabela 4.2 encontram-se os valores de atividade enzimática obtidos pelo método espectrofotométrico para a APRT e APRT-His.

Tabela 4.2 - Atividade enzimática da APRT e da APRT-His em diferentes tampões (método espectrofotométrico).

Amostra	Tampão	Atividade específica (U**/mg de proteína)
APRT(*L. donovani*)	-	3,60***
APRT (*L. tarentolae*)*	TrisMg-7,5	3,60
APRT-His (*L. tarentolae*)*	TK-8,5	3,77
APRT-His (*L. tarentolae*)*	TrisHis-8,5	4,00

*Todas as amostras encontravam-se a 0,2 mg mL^{-1}.
**Por definição, 1 unidade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima necessária para catalisar 1 μmol de substrato por minutoa 25°C sob condições ótimas de reação.
***Valor extraído de Tuttle, V.J.; Krenitsky, T. A. A Purine Phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani.The Journal of Biological Chemistry*, **255** (3), 909, 1980.

Esses valores são muito próximos aos descritos na literatura para a APRT de *L. donovani* [Tuttle & Krenitsky, 1980], e aparentemente a atividade da APRT-His e da APRT mostram os mesmos valores. Mas, por se tratar de um método menos sensível do que o radioquímico, as medidas de atividade enzimática foram repetidas utilizando-se este último método.

A atividade enzimática determinada pelo método radioquímico é baseada na radioatividade do trítio incorporado ao AMP produzido na reação catalisada pela APRT. Antes das medidas propriamente ditas, é conveniente obter-se uma curva analítica da APRT, pois altas concentrações do produto formado podem levar à

inibição da enzima [Nelson & Cox, 2000]. A figura 4.11 mostra essa curva e destaca duas regiões distintas: uma região linear, entre 0 e 10 $\mu g.mL^{-1}$, em que a concentração da APRT é proporcional à concentração de AMP formado e outra região, acima de 20 $\mu g.mL^{-1}$, em que a concentração do produto tende a se tornar constante. Considerando que até 10 $\mu g.mL^{-1}$ a concentração de produto formado não inibe a catálise enzimática, foi usada essa concentração de APRT e de APRT-His na reação.

É conveniente relacionar os valores de atividade enzimática convertendo-os de contagem por minuto (CPM) para porcentagem de eficiência, pois os valores em CPM comumente estão vinculados ao tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da substância radioativa, à sua taxa de decaimento e à sua concentração na amostra e os valores de eficiência estão relacionados às características da amostra, como tampão, pH, força iônica, etc. Para o cálculo de eficiência também foram considerados o $t_{1/2}$ do trítio e o tempo de armazenamento da adenina marcada desde a sua fabricação.

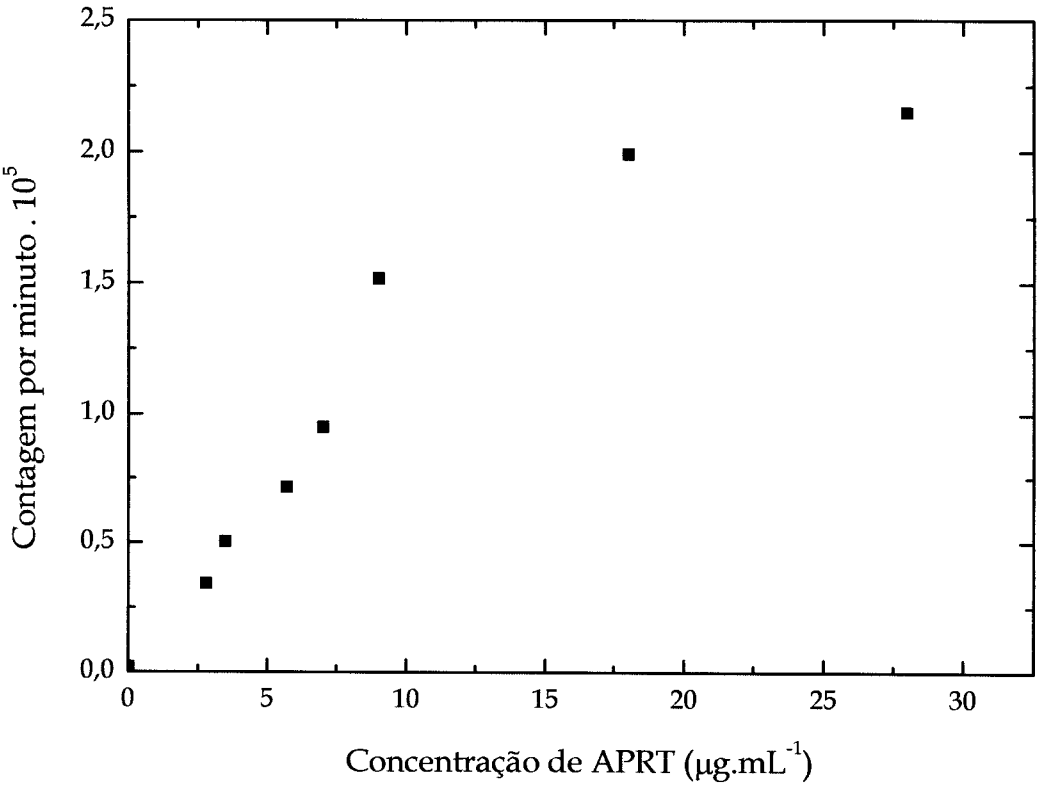

Figura 4.11 - Curva de atividade enzimática da APRT pelo método radioquímico. Na figura está indicado o intervalo de duas regiões distintas: uma em que a concentração do produto é proporcional à concentração enzimática e outra em que a relação entre o produto formado e a concentração da APRT tende a se tornar constante. (mudar o CPM para velocidade – contagens por minuto)

A Tabela 4.3 mostra os resultados dos ensaios radioquímicos das duas enzimas. A APRT apresentou praticamente o dobro da atividade da APRT-His, em todos os tampões estudados, contrastando com aqueles obtidos no ensaio espectrofotométrico.

Tabela 4.3 - Atividade enzimática da APRT e da APRT-His em diferentes tampões (método radioquímico).

*Amostra	Tampão	% de eficiência (^3H)
APRT	TrisMg-7, 5	9,44
APRT-His	TK-7,5	3,85
APRT-His	TK-8,5	4,42
APRT-His	TKHis-8,5	4,28

* Todas as amostras encontravam-se a 10 $\mu g.mL^{-1}$.

Como constatado, o método radioquímico permitiu detectar pequenas variações na quantidade de produto que não foram possíveis de serem observadas pelo primeiro método.

Considerando que a APRT é mais ativa e estável no tampão de purificação (TrisMg-7,5) do que a APRT-His nessa condição, e que a sua cristalização[10] ocorreu em tampão contendo TrisMg-7,4, optou-se por manter a enzima nessa condição.

Em paralelo à investigação descrita acima, foram analisadas possíveis modificações estruturais por dicroísmo circular e fluorescência. Os resultados demonstrando as modificações estruturais na APRT-His, induzidas pela presença da cauda de histidinas, serão mostrados a seguir.

[10] A cristalização e a resolução da estrutura da APRT de *L. tarentolae* foram feitas por Silva, M. e encontram-se descritas em sua dissertação de mestrado, atualmente depositada no IQSC/USP.

4.1.5 Análises espectroscópicas das enzimas APRT-His e APRT

4.1.5.1 Espectroscopia de dicroísmo circular

O efeito da cauda de histidinas na estrutura secundária da APRT-His foi investigado por CD comparando-se o seu espectro com o da APRT.

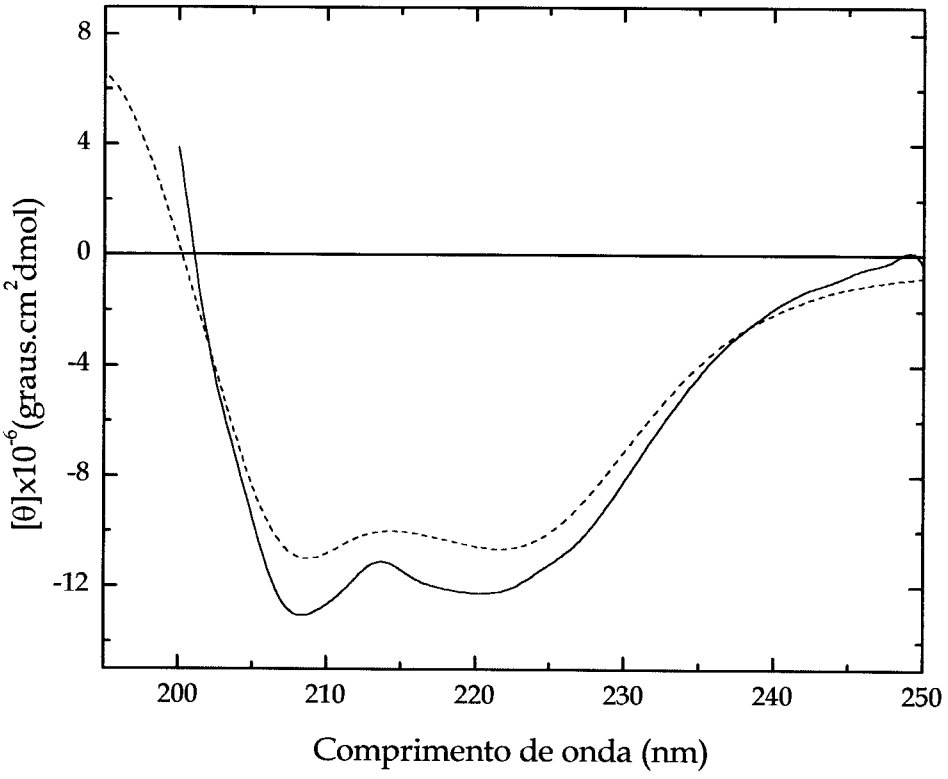

Figura 4.12 - Espectro de CD da APRT e da APRT-His. Os espectros da APRT-His (–) e da APRT (- -), ambas em Tris-8,5, foram coletados em 16 ciclos consecutivos no intervalo de 195 a 250 nm, usando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Os espectros de CD da APRT e da APRT-His, mostrados na figura 4.12, apresentam dois mínimos locais em 209 e 222 nm e uma intersecção com o zero em 200 e 201 nm, respectivamente. No entanto, somente no espectro da APRT é pos-

sível observar que na região em torno de 195 nm a curva tende para um máximo local. Esse máximo local, entretanto, é melhor observado quando espectros da APRT-His e da APRT, em baixas concentrações salinas, são coletados na região entre 190 e 250 nm. De acordo com Cantor e Schimmel (1980), bandas com máximos locais em 195, 209 e 222 nm referem-se às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (C–N) e $n \rightarrow \pi^*$ (C=O) que ocorrem em ligações peptídicas de estruturas do tipo hélice α [Cantor & Schimmel, 1980] [11].

No entanto, devido ao fato de o espectro de CD ser resultante da contribuição de todos os elementos de estrutura secundária, podemos apenas afirmar, à primeira vista, que as duas proteínas contêm hélice α em sua estrutura e que, em decorrência da diferença de intensidade dos seus espectros, elas têm diferentes teores de estrutura secundária. Para estimar a contribuição de todos esses elementos foi usado o programa SELCON-2, utilizando-se um banco com 33 proteínas de referência [Sreerama, 1993]. Os resultados dessa desconvolução são mostrados na tabela 4.4. Na mesma tabela encontram-se os teores de estrutura secundária das APRT de *L. donovani* e *L. tarentolae*, cujas estruturas cristalográficas estão resolvidas.

[11] Nessa referência é mostrada, por cálculos teóricos, a origem das transições observadas em todos os elementos de estruturas secundárias.

Tabela 4.4 - Frações de estrutura secundária da APRT-His e APRT.

Amostras	Hélice α	Folha β	Dobra β	Outras	RMS
			%		
APRT de *L. donovani* [Phillips, 1999]	30	21	–	–	–
APRT de *L. tarentolae***	26	25	–	–	–
* APRT	28	20	20	32	1
* APRT-His	37	18	19	26	1

*Amostras armazenadas em TK-8,5.
** Silva, M., - comunicação pessoal, 2001

Como indicado na tabela, verifica-se que quantitativamente há cerca de 10% mais em hélices na APRT-His comparados com as outras estruturas da APRT. No entanto é preciso considerar que o programa SELCON traduz a reorientação de vetores como uma variação estrutural, o que parece ser o mais provável visto que dificilmente um peptídeo levaria a uma modificação estrutural tão significativa. E mais provável pensar que o peptídeo levaria a uma modificação conformacional da enzima que se traduziria como uma modificação na orientação dos vetores associados às estruturas secundárias. Esses resultados podem explicar àqueles obtidos nos ensaios de atividade enzimática.

A interação da APRT-His e da APRT com os ligantes adenina, PRPP e AMP, também foi avaliada por CD e não foi observada nenhuma alteração nos espectros obtidos quando comparados aos das enzimas isoladas.

4.1.5.2 Espectroscopia de emissão de fluorescência

Para evidenciar as alterações induzidas pelas histidinas na molécula de APRT, as duas enzimas foram analisadas por espectroscopia de fluorescência, uma vez que próximo aos sítios catalíticos da APRT ocorre a presença do único resíduo de triptofano presente em cada monômero dessas enzimas. Esses estudos também estenderam-se às possíveis alterações que poderiam ser induzidas nas enzimas quando da interação com seus ligantes.

4.1.5.2.1 Comparação entre os espectros da APRT-His e da APRT

A figura 4.13 mostra os espectros de emissão da fluorescência da APRT-His em TK-7,5 e 8,5 e da APRT em TrisMg-7,5 após excitação das amostras em 295 nm. O espectro da APRT mostrou um máximo de emissão em torno de 332 nm enquanto a APRT-His, independentemente do pH do tampão, apresentou um máximo em torno de 442 nm. A diferença entre os dois espectros indica uma modificação conformacional observada por CD, nesse sentido pode-se afirmar que o triptofano estaria num microambiente mais exposto na APRT-His do que na APRT [Lakowicz, 1983].

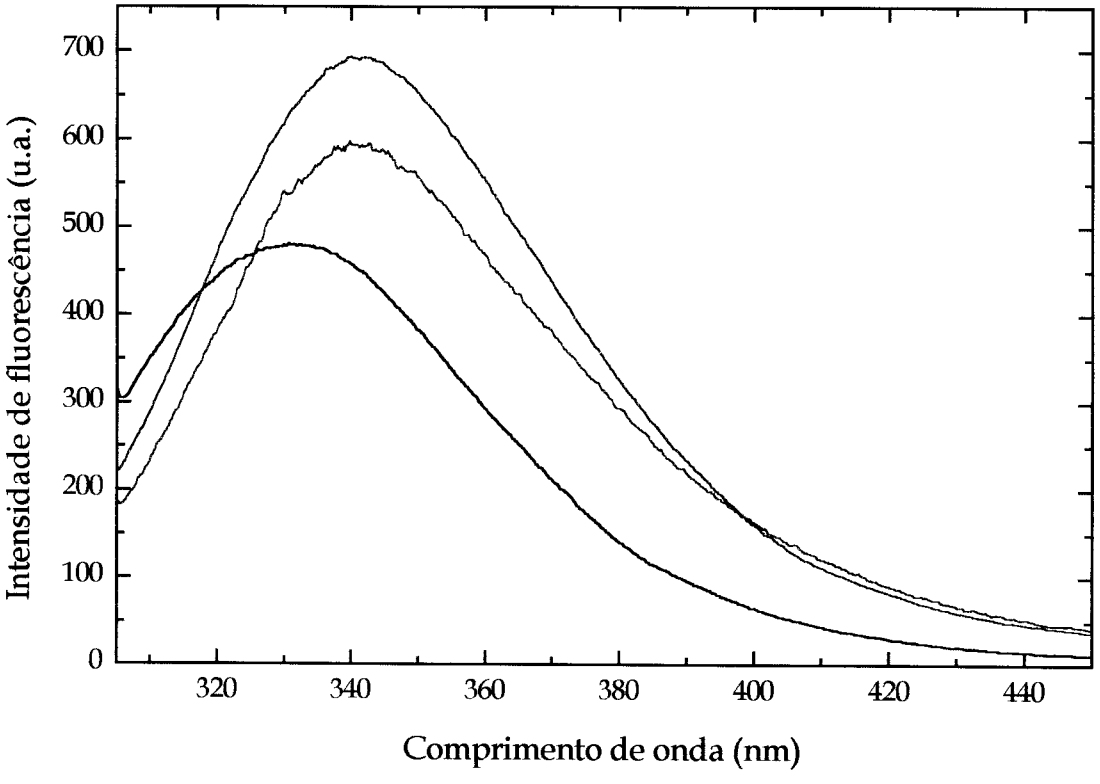

Figura 4.13 - Espectros de emissão de fluorescência da APRT-His e da APRT com excitação em 295 nm. As amostras a 110 μg.mL^{-1} encontravam-se em TK e TrisMg, respectivamente com diferentes valores de pH: (—) APRT-His pH 8,5, (–) APRT-His pH 7,5 e (—) APRT pH 7,5. Nas medidas foi utilizada uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

A diferença na intensidade dos espectros da APRT-His em pH 7,5 e 8,5 pode estar relacionada à supressão induzida pelo pH ou à supressão interna promovida pela variação do pH [Lakowicz, 1983]. Uma análise mais apurada do microambiente do triptofano indicou que os resíduos que o compõe são aminoácidos carregados (Figura 4.14). Com base nessa observação, espera-se que o Trp seja sensível ao pH, uma vez que sua vizinhança é composta de resíduos tipicamente carregados como tirosina, arginina e serina e ácido aspártico.

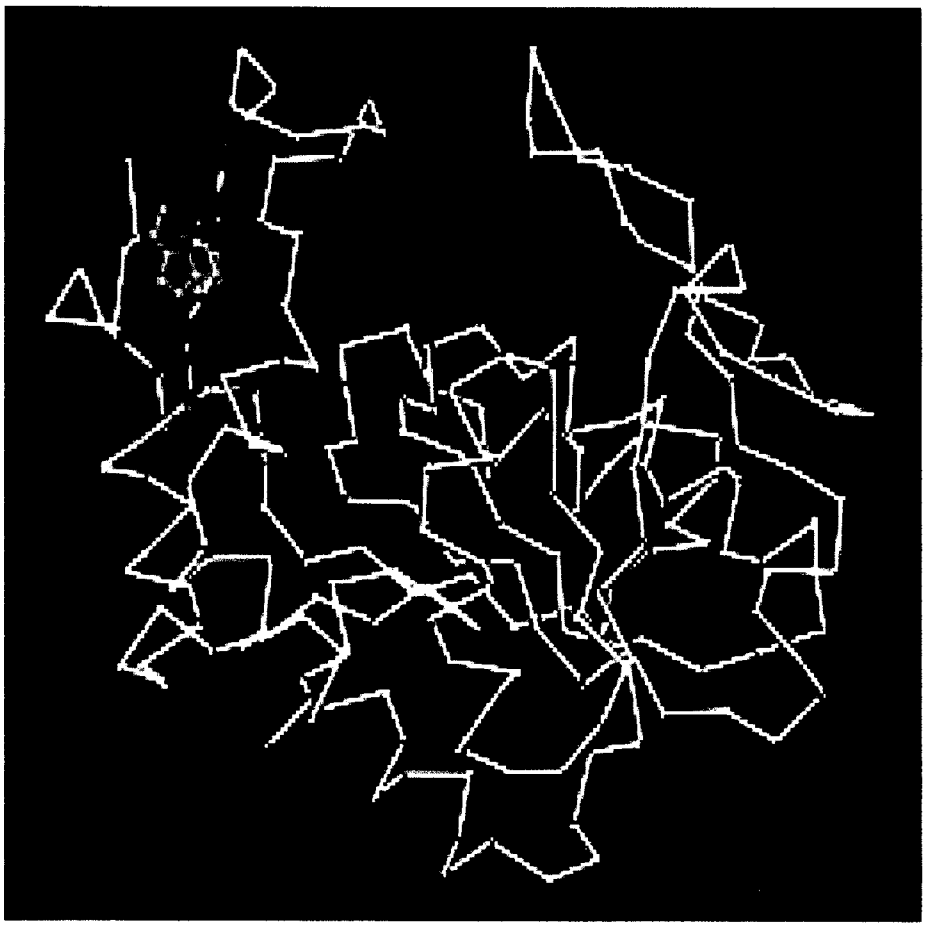

Figura 4.14 - Monômero da APRT de *L.tarentolae*. Na figura estão destacados alguns resíduos que compõe o microambiente do triptofano; de cima para baixo são identificados os aminoácidos: lisina (verde), arginina (vermelho), triptofano (amarelo), ácido aspártico (verde), arginina (vermelho).

4.1.5.2.2 Intervalo de linearidade

A intensidade de fluorescência emitida por um fluoróforo é proporcional à sua concentração sobre uma limitada faixa de densidade óptica, visto que existe um limite de concentração de fluoróforo em que o efeito de filtro interno é minimizado [Lakowicz, 1983]. Para determinar o intervalo de proporcionalidade entre o sinal de

emissão e a concentração da amostra a ser utilizada nos experimentos, espectros de APRT em concentrações entre 0,035 e 0,142 mg.mL^{-1} foram coletados após excitação a 280 nm (Figura 4.15). A seleção desse comprimento de onda de excitação se deu em virtude da presença de seis resíduos de tirosina por monômero na superfície da proteína, que poderia refletir com mais exatidão a concentração protéica do que o único triptofano encontrado em cada unidade monomérica.

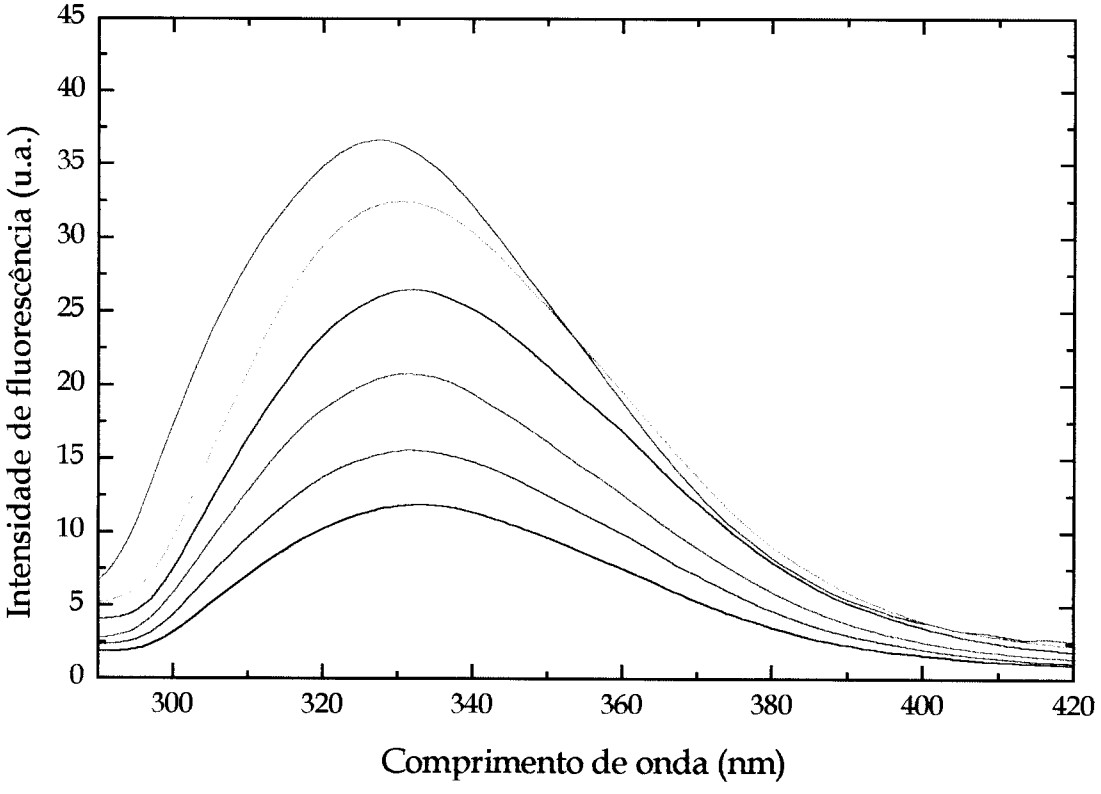

Figura 4.15 - Espectros de emissão de fluorescência da APRT em função da sua concentração. Espectros de emissão de fluorescência da APRT em Tris-7,5 contendo 150 mmol.L^{-1} de NaCl a (–) 0,035; (–) 0,056; (–) 0,070; (–) 0,107; ( ) 0,125 e (–) 0,142 mg.mL^{-1}. As amostras de APRT foram excitadas em 280 nm.

Pelas figuras 4.15 e 4.16, nota-se que a intensidade do sinal de fluorescência aumenta proporcionalmente com a concentração da amostra. Até a concentração de 0,125 mg.mL^{-1} (DO=0,07), figura. 4.15, não há deslocamento do máximo de

emissão (λ_{max}), enquanto em 0,142 mg.mL^{-1} (DO=0,08) ocorreu um deslocamento para a região mais baixa do ultravioleta mostrando que, provavelmente, está ocorrendo a formação de complexos macromoleculares.

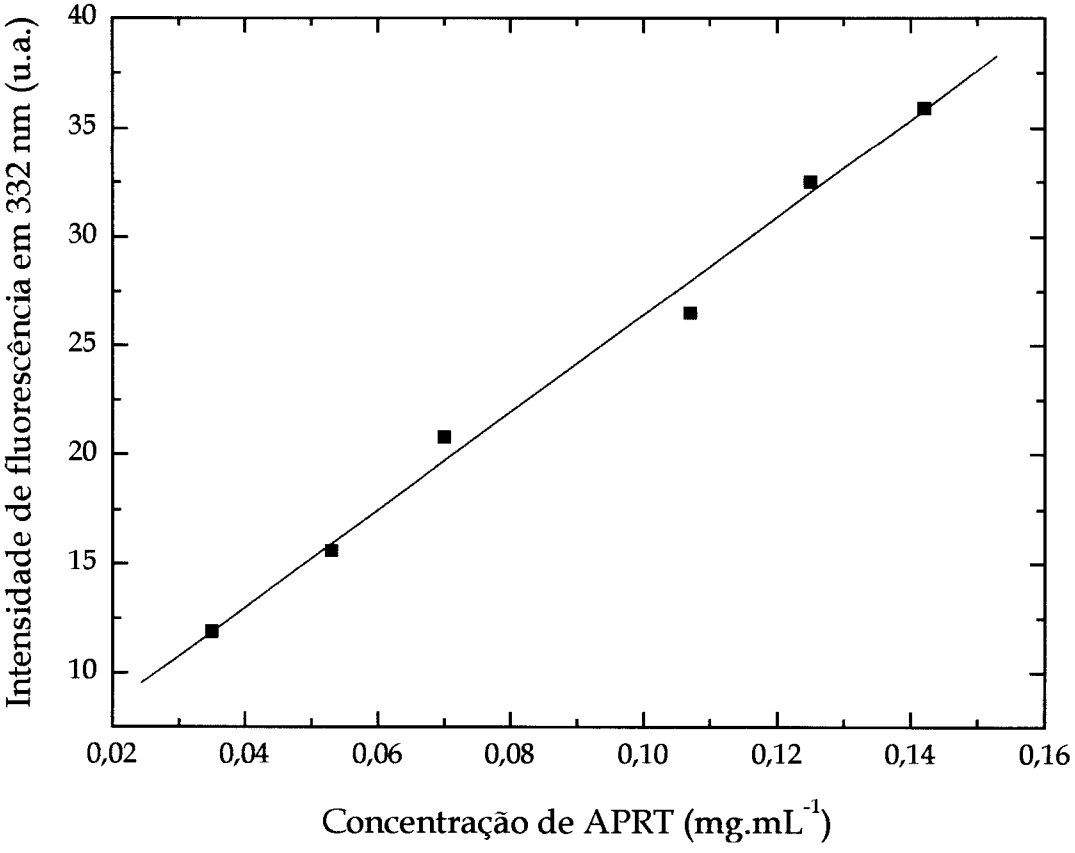

Figura 4.16 - Intensidade de fluorescência a 332 nm em função da concentração de APRT. Os valores de intensidade foram extraídos dos espectros da A-PRT (Figura 4.13) e o cálculo de regressão linear a partir deles mostrou um valor de R=0,9983.

Para acompanhar a interação da APRT-His e APRT com seus ligantes, por fluorescência, foi necessário estabelecer o comprimento de onda de excitação adequado, uma vez que alguns ligantes da APRT, em função de suas estruturas, poderiam absorver luz no mesmo comprimento de onda dos fluorófuros presentes nas

proteínas (Trp, Tir, Fen). Nesse sentido foram medidos os espectros de absorção eletrônica das enzimas na presença da adenina, PRPP, PRPP+adenina.

Na figura 4.17 estão os espectros da APRT (200 $\mu g.mL^{-1}$) na ausência e na presença de 100 $\mu mol.L^{-1}$ de adenina, 1 $mmol.L^{-1}$ de PRPP e de 100 $\mu mol.L^{-1}$ de AMP (formado pela adição de 100 $mmol.L^{-1}$ de adenina à solução protéica contendo 1 $mmol.L^{-1}$ de PRPP).

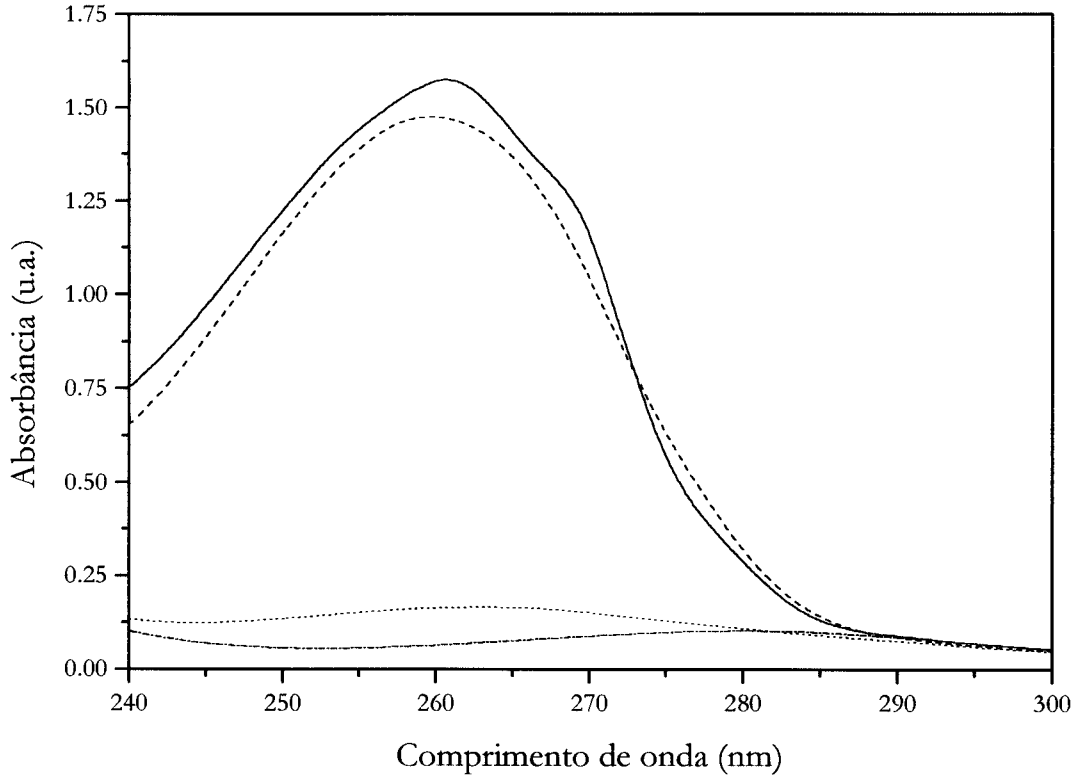

Figura 4.17 - Espectros de absorção eletrônica da APRT na presença de seus ligantes. Espectros de absorção eletrônica da APRT a 200 $\mu g.mL^{-1}$ na presença de (—) 100 μM adenina, (— —) 1 $mmol.L^{-1}$ PRPP e 100 μM de adenina (AMP), (.....)1 $mmol.L^{-1}$ de PRPP e (—.—) Mg^{2+}.

Como se observa na figura 4.17, a banda de absorção da adenina estende-se até próximo a 286 nm, sobrepondo-se à banda de absorção das tirosinas e triptofanos. Como a eficiência da emissão de fluorescência resulta da absorção máxima do

fluoróforo em um determinado comprimento de onda, a excitação das amostras foi realizada em 295 nm, um comprimento de onda em que essa purina não absorve [Lakowicz, 1983].

4.1.5.2.3 Emissão de fluorescência da APRT-His e da APRT na presença de ligantes

Os espectros de emissão de fluorescência da APRT na presença dos ligantes estão mostrados na figura 4.18. Não se observa qualquer alteração no espectro da APRT na presença de adenina e uma supressão de fluorescência maior quando a APRT foi incubada com PRPP do que quando armazenada com AMP.

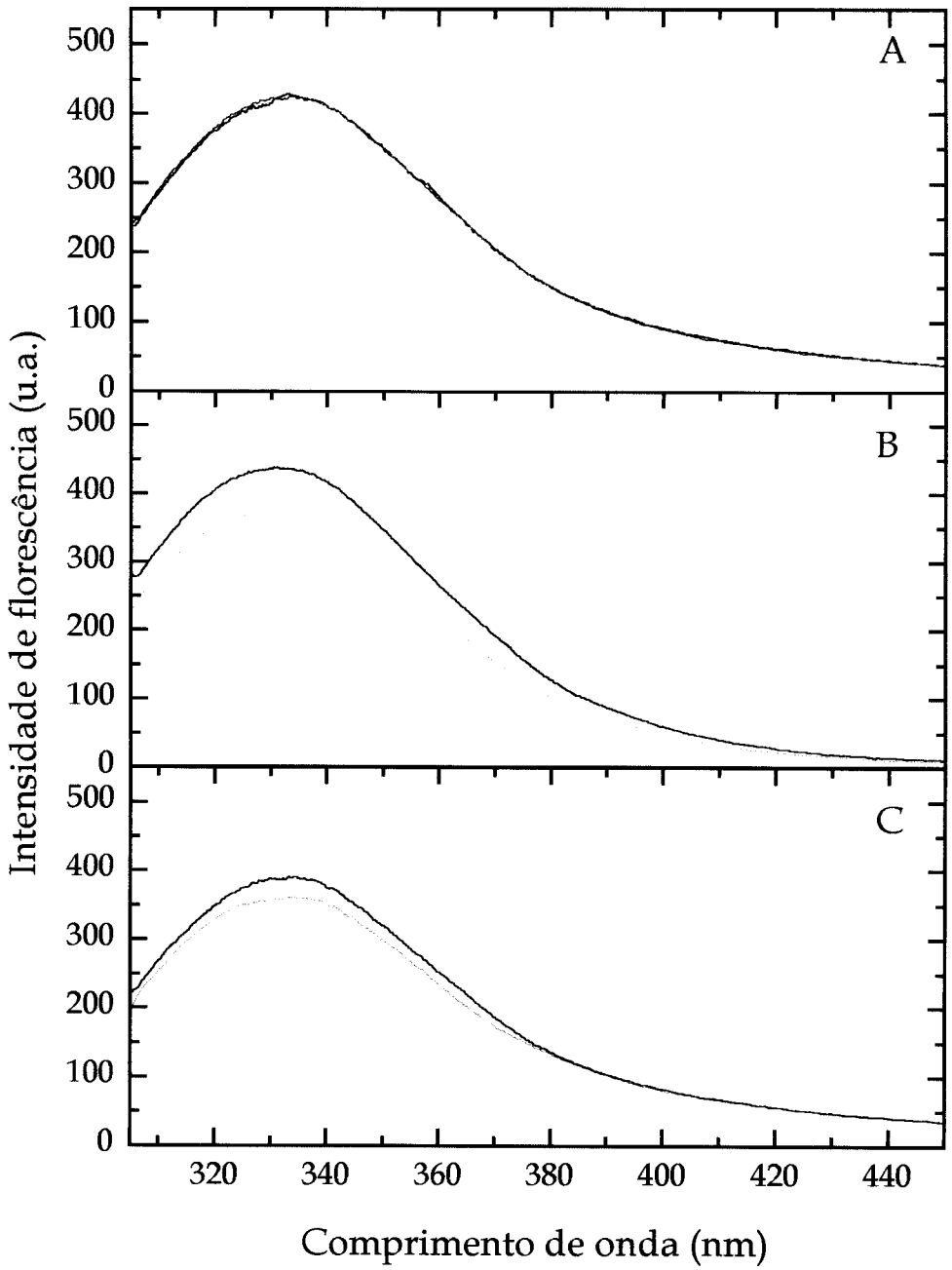

Figura 4.18 - Espectro de fluorescência do Trp da APRT com seus ligantes após excitação em 295 nm. Amostra de (—) APRT (110 μg.mL^{-1}) em TrisMg-7,5, (—) APRT e 100 μM de adenina, (—) APRT e 1 mmol.L^{-1} de PRPP e (—) APRT, 1 mmol.L^{-1} PRPP e 100 μmol.L^{-1} de adenina (APRT e AMP). As figuras A, B e C ilustram os espectros da APRT associada à APRT+adenina, APRT+ PRPP e APRT + PRPP + adenina (APRT + AMP), respectivamente.

A supressão de fluorescência observada nos espectros da APRT contendo PRPP e AMP pode ser explicada pela localização do Trp na sua estrutura. O Trp encontra-se próximo ao sítio ativo da APRT, na região da touca, que é altamente conservada, flexível e responsável por estabilizar o substrato adenina durante a reação enzimática.

A supressão diferenciada do AMP e do PRPP pode estar relacionada à mudança de orientação do Trp quando os ligantes estão presentes no sítio ativo da molécula. A figura 4.20 mostra o Trp, o PRPP e o AMP na estrutura da APRT de *L. tarentolae*. A posição e a orientação do Trp e do AMP foram extraídas dos dados cristalográficos da APRT de *L. tarentolae* ao passo que os do PRPP foram retirados da estrutura cristalográfica da OPRT, uma PRTase cujo sítio ativo é homólogo ao da APRT. Nessa figura, o Trp parece ser sensível à flexibilidade da região do braço, que abre após a catálise. A abertura do braço impediria que a fluorescência do Trp fosse intensamente suprimida pelo AMP, ao passo que uma posição mais fechada, por ocasião da catálise, a proximidade desse braço causaria uma supressão mais efetiva de fluorescência do Trp pelo PRPP. Essas considerações, juntamente com resultados obtidos, indicam que possivelmente o PRPP muda sua posição no sítio ativo à medida que o produto é formado.

Figura 4.19 - Estrutura tridimensional da APRT de *L. tarentolae*. Na figura são ressaltados o Trp, o PRPP e o AMP. O Trp encontra-se na touca e o *loop* flexível está em uma conformação aberta.

A possibilidade de os oxigênios dos grupos fosfatos, presentes no PRPP, serem os responsáveis pela supressão do Trp, ao invés de uma modificação estrutural imposta pelo PRPP, também foi considerada. Entretanto, tal hipótese foi descartada após se verificar que, quando o triptofano livre é titulado com PRPP, não se observa supressão de fluorescência do triptofano, figura 4.21.

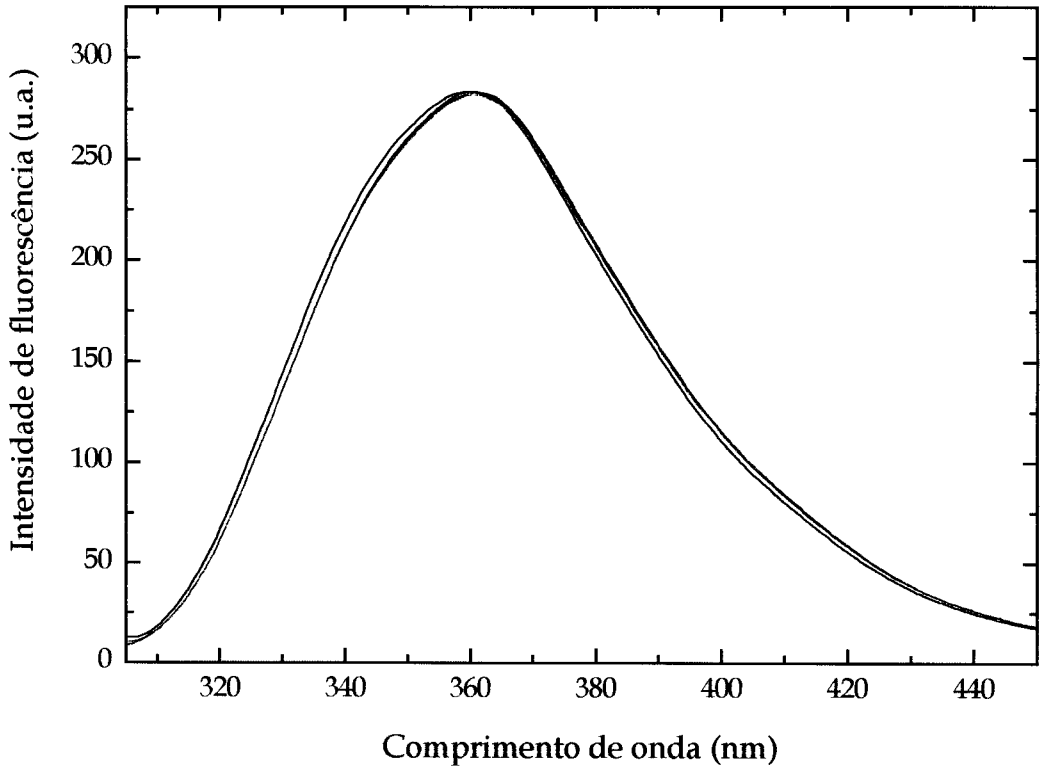

Figura 4.20 - Espectro de emissão de fluorescência de Trp livre na presen;a de PRPP. Espectros de emissão de (–) Trp livre (DO=0,03), (–) Trp e 1 mmol.L^{-1} de PRPP; ( ) Trp e 2 mmol.L^{-1} de PRPP; (–) Trp e 3 mmol.L^{-1} de PRPP; (–) Trp e 4 mmol.L^{-1} de PRPP; (–) Trp e 5 mmol.L^{-1} de PRPP.

A interação da APRT-His com seus ligantes também foi verificada por fluorescência (Figura 4.22).

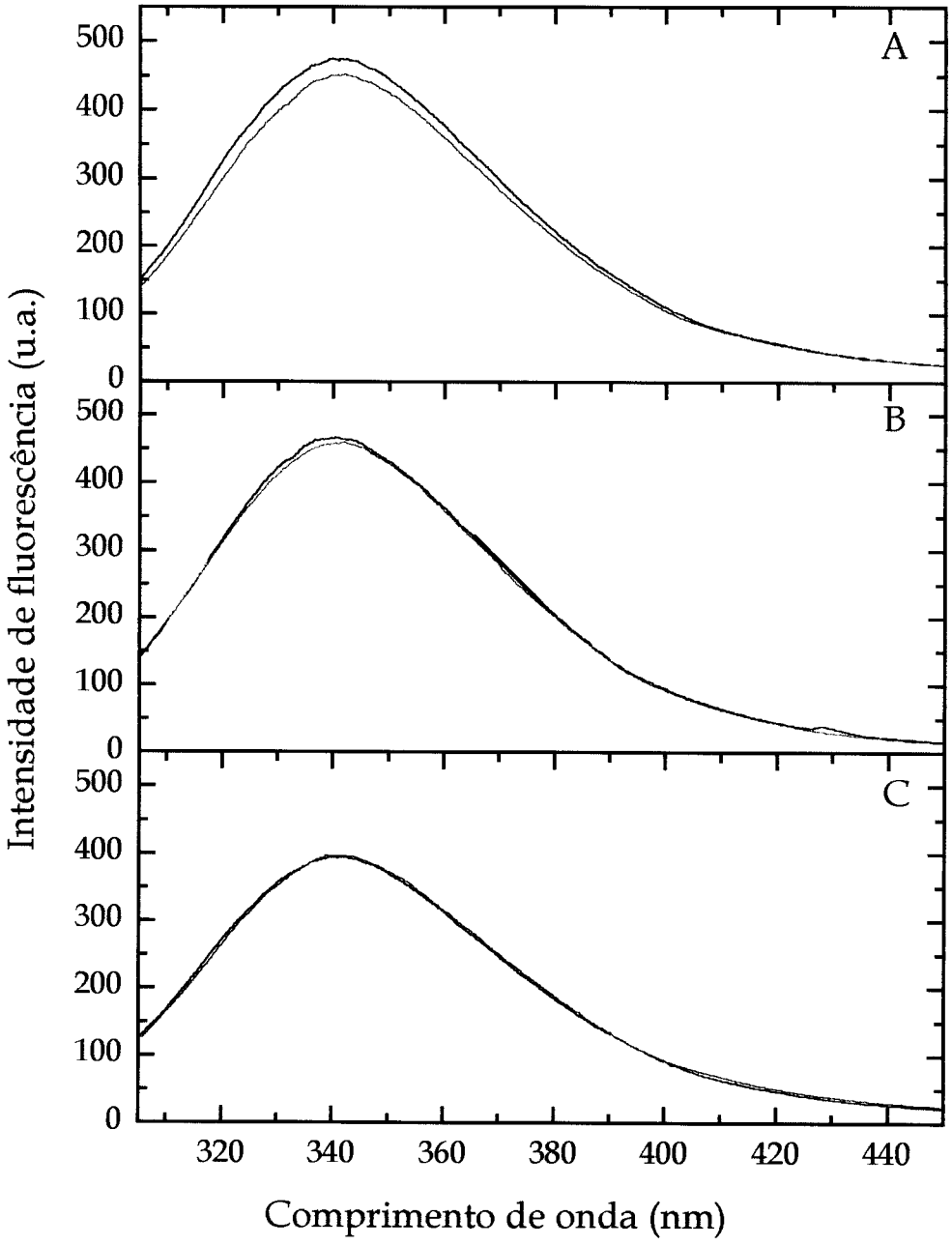

Figura 4.21 - Espectro de fluorescência do Trp da APRT-His com seus ligantes após excitação em 295 nm. Amostra de (—) APRT-His (110 μg/mL) em TK-8,5, (—) APRT-His e 100 μM de adenina, (—) APRT-His e 1 mmol.L^{-1} de PRPP e (—) APRT-His e 1 mmol.L^{-1} PRPP e 100 μM de adenina (APRT-His e AMP).

Os espectros de emissão de fluorescência da APRT-His não mostram qualquer efeito na fluorescência do Trp induzida pelo PRPP e pelo PRPP + adenina.

Tal fato pode ter ocorrido em decorrência da ausência do cofator Mg^{2+} no tampão de purificação dessa enzima. Dados publicados por Phillips e colaboradores sugerem que o Mg^{2+} é fundamental para a catálise da APRT. Esse íon favoreceria o ataque nucleofílico da purina à ribose C_1 do PRPP para formação do AMP [Phillips, 1996]. Essa hipótese é corroborada pela ausência de atividade enzimática observada na ausência desse cofator.

CAPÍTULO 5

5.1 CONCLUSÕES

Na caracterização bioquímica da APRT-His e da APRT foi verificada a eficiência das etapas de expressão e purificação das enzimas, o grau de oligomerização de ambas nos seus respectivos tampões como dímero e determinados os valores de pI como 7,7±0,16 e 6,45± 0,20, respectivamente. A diferença entre os valores de PI da APRT e da APRT-His está relacionada à estabilidade das enzimas nos tampões.

Em virtude da grande precipitação da APRT-His e de seu pH de purificação estarem muito próximos do seu pI, foram realizados estudos de solubilidade com essa proteína. Com esses estudos concluiu-se que a APRT-His deve ser mantida em 20 $mmol.L^{-1}$ de tampão Tris pH 8,5 (Tris-8,5), contendo 150 $mmol.L^{-1}$ de histidina. Já a APRT permanece estável até 8,0 $mg.mL^{-1}$ em TrisMg-7,5.

Os ensaios de atividade, feitos pelo método espectrofométrico e radioquímico, mostraram que tanto a APRT-His quanto a APRT são ativas nos seus respectivos tampões. De acordo com o ensaio radioquímico, a APRT apresentou atividade duas vezes maior do que a APRT-His.

Os espectros de CD da APRT-His e da APRT mostraram perfil de hélice α e os resultados da desconvolução revelou que a APRT-His possui 10% mais hélice do que a APRT.

Medidas de absorção eletrônica indicaram que os ligantes adenina e AMP absorvem energia em 280 nm, ou seja mesma região de absorção das tirosinas e do triptofano. Dessa forma, ambas as proteínas foram excitadas em 295 nm.

Análises dos espectros de emissão de fluorescência revelaram que os triptofanos da APRT-His estão mais expostos ($\lambda_{máx}$=342 nm) em relação aos da APRT ($\lambda_{máx}$=332 nm). Foi observada discreta supressão de fluorescência da APRT, excitadas em 295 nm, na presença de PRPP. É provável que a supressão seja devida à mudança conformacional no microambiente dos triptofanos (1 por monômero) próximos aos sítios catalíticos da enzima.

Os espectros de emissão de fluorescência da APRT-His não mostram qualquer efeito na fluorescência do Trp induzida pelos ligantes. Tal fato pode ter ocorrido pela ausência do cofator Mg^{2+} no tampão de purificação dessa enzima. Dados publicados por Phillips e colaboradores sugerem que o Mg^{2+} é fundamental para a catálise da APRT. Esse íon favoreceria o ataque nucleofílico da purina à ribose C_1 do PRPP para formação do AMP [Phillips, 1996].

Apesar de a estabilização de proteínas recombinantes *in vitro* ocorrer após a adição e a subtração dos agentes estabilizantes, é preciso se conhecer todas as características dos sistemas *in vivo* e *in vitro* para correta manipulação dos meios. Somente

assim será possível caracterizar proteínas heterólogas recombinantes e encontrar sua possível função no organismo de origem.

Tão importante quanto produzir proteínas heterólogas recombinantes ativas e estáveis *in vivo* é mantê-las com suas características preservadas *in vitro* para que possam ser utilizadas para caracterização bioquímica e estrutural. Dessa forma, no estudo de caracterização físico-química e estrutural de proteínas, o ideal parece ser utilizar essas macromoléculas na sua forma intacta, ou seja, sem estarem ligadas a um peptídeo de fusão. Dessa forma, previne-se qualquer alteração na estrutura e função protéica induzida pela adição de um segmento de fusão.

CAPÍTULO 6

6.1 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

➢ Os resultados dos testes físico-químicos e espectroscópicos indicaram que o peptídeo de fusão inserido no N-terminal da APRT pode ter induzido a modificação conformacional da enzima. Mesmo para modificações discretas, a anisotropia estática e resolvida no tempo é aplicável , a medida que fornece informações sobre o volume total da proteína e sobre a variação desse parâmetro em função do tempo.

➢ A insolubilidade de proteínas é, freqüentemente, acompanhada pela exposição de alguns resíduos hidrofóbicos ao solvente, que ocorre em função do pH, força iônica, adição de aditivos, temperatura, etc. Nesse sentido, estudos de desnaturação térmica da APRT-His e da APRT auxiliarão na controle da estabilidade das enzimas, sendo convenientemente acompanhada por espectroscopia espalhamento de luz (light scattering), DSC, CD e fluorescência.

➢ O entendimento do mecanismo de reação enzimática da APRT e da cinética de formação dos produtos de reação são fundamentais para o desenho de novas drogas. O estudo sistemático para definição de parâmetros como K_m e $V_{máx}$ podem ser determinados, por exemplo, por espectroscopia de emissão de fluorescência (*Stopped flow*, fluorescência resolvida no tempo).

CAPÍTULO 7

7.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.P.U.; *et al.* Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, v. **272**, p. 480-484, 2000.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli. Curr. Opin. Biotech.*, v. **10**, p. 411-421, 1999.

BERENS, R.L.; MARR, J.J.; LAFON, S.W.; NELSON, D.J. Purine Metabolism in *Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol.*, v. **3**, p. 187-96, 1981.

BLATTNER, J.; *et al.* Glycosome Assembly in *Trypanosomes*: Variations in the Acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. *J. Cell Biol.*, v. **119**, p. 1129-36, 1992.

BOONLAYANGOOR, P., ALBACH, R. A.; BOODEN, T. Purine Nucleotide Syntesis in *Entamoeba histolytica*: A Preleminary Study. *Arch. Invest. Med. (Mex)*, v. **11**, p. 83-8, 1980.

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

CANTOR, C.R.; SCHIMMEL, P.R. Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function: spectroscopic analysis of biopolymers. New York, W. H. Freeman and Company, 1980. Cap. 7-8, p. 349-451.

CHANG, M.; BOLTON, J.L.; BLOND, S.Y. Expression and purification of hexahistidine-tagged human glutathione *S*-transferase P1-1 in *Escherichia coli. Protein Exp.Purif.*, v. **17**, p. 443-448, 1999.

DAVIS, G.D.; *et al.* New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli. Biotech. Bioeng.*, v. **65**, n.**4**, p. 383-388, 1999.

FERNANDEZ, J.M.; HOEFFLER, J.P. Introduction: So many possibilities: How to choose a system to achieve your specific goal. In: Gene expression systems: using nature for the art of expression. New York, Academic Press, 1999. v. **1**, p. 1-5.

FISH, W.R.; MARR, J.J.; BERENS, R.L. Purine Metabolism in *Trypanosoma brucei gambiense. Biochim. Biophys. Acta*, v. **714**, p. 422-8, 1982.

GARFIN, D.E. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology: guide to protein purification,* v. **182**, p. 425-441, 1990.

GREENFIELD, J. N. Review: methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.*, v. **235**, p. 1-10, 1996.

GROSS, G.; HAUSER, H. Heterologous expression as a tool for gene identification and analysis. *J. Biotech.*, v. **41**, p. 91-110, 1995.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S.C. Strategies for otimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli. Tibtech*, v. **16**, p. 54-60, 1998.

HARRIS, E.L.V.; ANGAL, S. *Protein Purification Applications: a practical approach.* Oxford. Oxford University Press, 1990. 179p.

HOCHSTADT, J. Adenine Phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli. Methods in Enzymology: Purine and Pyrimidine Nucleotide Metabolism*, v. **51**, p. 561-563, 1978.

KAPUST, R.; WAUGH, D.S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.*, v. **8**, p. 1668-1674, 1999.

KEEFE, A.D., WILSON, D.S., SEELIG, B., SZOSTAK, J.W. One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide the SBP-Tag. *Protein Exp. Purif.*, v. **23**, p. 440-446, 2001.

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York. Plenum Press. 1983. 496 p.

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

MARR, J. J.; BERENS, R. L.; NELSON, D. J. Purine metabolism in *Leishmania brasiliensis, Biochem. Bioph. Acta*, v. **544**, p. 360-71, 1978.

MICHEL, G.; *et al.* Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the *l*-carrageenase from *Alteromonas fortis. Acta Cryst.*, v. **D56**, p. 766-768, 2000.

MILLER, R. L.; LINSTEAD, D. Purine and pyrimidine metabolising activities in *Trichomonas vaginalis* extracts, *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. **7**, p. 41-51, 1983.

NYGREN, P.A.; STAHL, S.; UHLEN, M. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol.*, v. **12**, n. **5**, p. 184-188, 1994.

OZA, S.L.; ARIYANAYAGAM, M.R.; FAIRLAMB, A.H. Characterization of recombinant glutathionylpermidine synthetase/amidase from *Crithidia fasciculata. Biochem. J.*, v. **364**, p. 679-686, 2002.

PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, G.D. Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a pratical guide. *Anal. Biochem.*, v. **203**, p. 83-93, 1992.

POHL, T. Concentration of proteins and removal of solutes. *Methods in enzymology: guide to protein purification,* v. **182**, p. 68-83, 1990.

PRYOR, K.D.; LEITING B. High level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. *Protein Exp. Purif.*, v. **10**, p. 309-319, 1997.

POWER, R.F.; *et al.* High level expression of a truncated chicken progesterone receptor in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, v. **265**, p. 1419-1424, 1990.

RIES-KAUTT, M.; DUCROIX, A. Phase diagram. In: DUCROIX, A.; GEIGE, R. Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach. Oxford. Oxford University Press. 1992, cap. 9, p. 195-200.

SACHDEV, D.; CHIRGWIN, J.M. Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. **244**, p. 933-937, 1998.

SCHEIN, C.H.; NOTEBORN, M.H.M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Biotech.*, v. **6**, p. 291-294, 1988.

SCWARTZMAN J. D.; PFEFFERKORN, E.R. *Toxoplasma gondii:* Purine Síntesis and Salvage in Mutant Hosí Cell and Parasites. *Exp. Parasitol.*, v. **53**, p. 77-86, 1982.

SHEIBANI, N. Prokariotic gene fusion expression systems and their use in structural and functional studies of proteins. *Prep. Biochem. Biotech.*, v. **29**, n. **1** p. 77-99, 1999.

SREERAMA, N.; WOODY, R.W. A self consistent method for analysis of protein secondary structure from CD. *Anal. Biochem.*, v. **209**, n. **1**, p. 32-44, 1993.

STEVENS, R.C Design of high-throughput methods of protein production for structural biology, *Structure*, v. **8**, p. R-177-R185, 2000.

STOSCHECK, C. M. Quantification of protein. *Methods in enzymology: guide to protein purification*, v. **182**, p. 50-68, 1990.

STRYER, L. Biossíntese de nucleotídeos. In: Bioquímica. Trad. Antonio José Magalhães da Silva Moreira, João Paulo de Campos, Luiz Francisco Macedo, Paulo Armando Motta, Paulo Roberto P. Elias. 4. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A, 1996. cap. 29. p. 706.

The QIAexpressionist: a handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. QIAGEN. 3.ed. 1997. p. 14-18.

THIEMANN, O.H.; ALFONZO, D.J., SIMPSON, L. Cloning and Characterization of *Leishmania tarentolae* adenine phosphoribosyltransferase. *Mol. Biochem. Paras.*, v. **95**, p. 141-146, 1998.

TUTTLE, V.J.; KRENITSKY, T. A. Purine Phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani. J. Biol. Chem.*, v. **255**, n. **3**, p. 909, 1980.

ULLMAN, B.; CARTER, D. Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase as a Therapeutical Target in Protozoal Infections. *Infect. Ag. Dis.*, v. **4**, p. 29-40, 1995.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Regulação da expressão gênica. In: ?TÊM AUTOR diferente?NÃO Fundamentos de bioquímica. Trad.de Arthur Germano Fett Neto. Porto Alegre, Artes Médicas Sul, 2000. cap. 27, p. 894-910.

VOET, D.; VOET, J.G. Solubility of protein. In: Biochemistry. 2.ed. United States of America. John Wiley & Sons Inc., 1995. cap. 5. p. 77.

WANG, C.C.; ALDRITT, S. Purine Salvage Networks in *Giardia lamblia, J. Exp. Med.*, v. **158**, p. 1703-12, 1983.

WALSH, C.J. ; SHERMAN, I. W. Purine and Pyrimidine Synthesis by the Avian Malaria Parasite, *Plasmodium lophurae, J. Protoz.*, v. **15**, p. 763-70, 1968.

WANG, C.C.; SIMASHYKEVICH, P. M. Purine Metabolism in the Protozoan Parasite *Eumeria tenella. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. **78**, p. 6618-22, 1981.

WANG, E. C.; *et al.* Purine salvage by *Tritrichomonas foetus. Mol. Biochem. Parasitol.* v. **8**, p. 325-37, 1983.

ZHANG, Y., *et al.* Expression of eukariotic proteins in soluble form in *Escherichia coli. Protein Exp. Pur.*, v. **12**, p. 159-165, 1998.