

**“Estudos moleculares das fosforribosil pirofosfato
sintetases”**

Elisandra Márcia Rodrigues

OK

USP/IFSC/SBI



8-2-001574

**Tese apresentada ao Instituto de
Física de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências: Física Biomolecular.**

Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

São Carlos – 2004

**IFSC USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E
INFORMAÇÃO**



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE ELISANDRA MÁRCIA RODRIGUES APRESENTADA AO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
EM 10-03-2004.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann (Orientador e Presidente) -IFSC/USP

Profa. Dra. Lucile Maria Floeter Winter – IB/USP

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo – IFSC/USP

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas que sempre estiveram ao meu lado:

Ao meu pai, Emílio S. Rodrigues e à minha mãe, Elizete S. B. Rodrigues, por todo amor, carinho, amizade, confiança incondicionais. À minha irmã Elisangela Renata Rodrigues e ao meu irmão Emilio Rafael Rodrigues pelo amor, união, apoio e compreensão.

Agradecimentos

A Deus pelas experiências e aprendizado vivenciados a cada dia;

Aos meus amigos e professores de graduação da Fundação Hermínio Ometto, pelo início do aprendizado em Ciências Biológicas;

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva da Universidade Federal de São Carlos, por ter me oferecido a primeira chance de contato com o Universo da pesquisa;

Ao meu orientador Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann por me receber no grupo de Cristalografia com muita gentileza e simpatia e mesmo sem me conhecer confiou em meu trabalho, na minha capacidade de aprendizado e principalmente me apoiou nos momentos mais difíceis e além de um excelente orientador acabei ganhando um amigo;

Aos Profs. Dr. Glaucius Oliva e Dr. Richard Charles Garratt por me proporcionarem a oportunidade de ingresso ao grupo de Cristalografia;

Às Prof^{as}. Dra. Leila Maria Beltramini, Dra. Ana Paula Ullian Araújo e Dra. Heloísa Selistre de Araújo pela colaboração neste projeto;

Aos técnicos do grupo de Cristalografia e Biofísica: Bianca, Susana, Dulce, Eli, Maria, Mineiro, Beth, Augusto, Geraldo, Gustavo, Andressa, Bel, Beto por todo o apoio técnico;

Aos secretários do grupo de Cristalografia, Maria Helena, Jaciara, Cláudia e Fernando por todo apoio na área administrativa;

Às secretárias de Pós-Graduação Wladerez e Cristiane, pela simpatia e carinho que tratam todos os alunos;

Ao meu amigo Hamilton pela colaboração neste projeto;

À minha amiga Ane, pela ajuda, amizade e por todas as caronas até Araraquara;

Ao meu amigo Márcio pela ajuda e incentivo neste projeto;

À minha amiga Raquel pelas conversas de incentivo e aprendizado;

Aos meus amigos Alécio, Susana, Antônio, Teresa por termos iniciados juntos o nosso trabalho científico no grupo de Cristalografia;

Aos meus amigos Ney, Alexandre, Ivan, João Renato, Susana e Celina, pela amizade e ajuda nas minhas figuras;

Aos meus amigos Fernando e Mario, pelas horas de estudo em Física, realmente foi uma ajuda muito relevante;

À minha amiga Beth, pela amizade e por todos os almoços engraçados;

Aos meus amigos do grupo de Cristalografia e Biofísica do Instituto de Física de São Carlos, pela convivência agradável;

Às minhas amigas da UFSCAR Andreinha, Daniela e Elizete pela amizade e apoio sinceros;

Às minhas grandes amigas Andreinha e Celina, pelo carinho, amizade, irmandade e principalmente por estarem por perto nos momentos mais difíceis;

Aos meus amigos Roberto e Sandréa, pela convivência, amizade e pela luta para conquista de ideais que sempre acreditávamos que um dia tornar-se-ia realidade;

Aos meus avós (in memoriam), tios, tias, primos, primas e principalmente à Paula, por sempre torcerem por mim;

Ao IFSC-USP, pela utilização das estruturas e serviços prestados;

À CAPES pelo apoio financeiro para realização deste projeto científico;

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xiv
Tabela de Abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xix

Capítulo 1 Introdução

Introdução.....	1
1.1) Vias de obtenção de Purino Nucleotídeos.....	1
1.11) Síntese <i>De Novo</i> de Purino Nucleotídeos.....	2
1.12) Mecanismo da Síntese <i>De Novo</i>	4
1.13) Mecanismo da Via de Síntese <i>De Novo</i>	6
1.14) Via de Recuperação.....	7
1.2) Fosforribosil Pirofosfato (PRPP) Sintetases.....	8
1.3) Defeitos e Patogênias.....	14
1.4) Objetivos.....	18
1.5) Referências Bibliográficas.....	19

Capítulo 2 Técnicas, Materiais e Métodos Utilizados

Parte I – Clonagem dos Genes e Expressão das proteínas.....	23
2.1) Clonagem – Aspectos Gerais.....	23
2.2) Construção de oligonucleotídeos e amplificação dos genes hPRSI, hPRSII, hPAP41-1, hPAP41-2 e hPAP39.....	26
2.3) Clonagem dos genes em vetores de propagação.....	29
2.31) Clonagem do gene hPRSI no vetor de clonagem pGEM-T.....	29
2.32) Clonagem dos genes hPRSII, hPAP41-1 e hPAP 39 no vetor de clonagem pCR4-TOPO.....	30
2.4) Transformação das ligações inserto-plasmídeo.....	32
2.5 Extração e Clivagem dos DNAs plasmidiais e dos Vetores de expressão.....	34
2.6) Subclonagem dos genes hPRSI e hPAP39 nos vetores de expressão pET29a(+) e pMALc-2X respectivamente.....	35
2.7) Expressão das proteínas recombinantes.....	38
2.71) Expressão da enzima hPRSI no vetor pET29a(+).....	38
2.72) Expressão da enzima hPAP39 no vetor pMALc-2X.....	40
Parte II – Purificação das Proteínas.....	41

2.8) Métodos cromatográficos.....	41
2.81) Precipitação com sais.....	42
2.82) Cromatografia de afinidade.....	43
2.83) Cromatografia de troca iônica.....	44
2.84) Cromatografia de exclusão molecular.....	45
2.90) Purificação da enzima hPRSI.....	45
2.91) Purificação da proteína hPAP39.....	48
2.92) Clivagem da fusão hPAP39-MBP com o Fator Xa.....	50
Parte III – Caracterização das Proteínas.....	51
2.10) Focalização Isoelétrica.....	51
2.11) Sequenciamento do N-terminal da proteína.....	53
2.12) Espalhamento de Dinâmico de Luz (DLS).....	54
2.13) Medidas de Dicroísmo Circular (CD).....	54
2.14) Ensaio de Cristalização.....	57
2.15) Immunoblotting.....	59
2.16) Referências Bibliográficas.....	62
Capítulo 3 RESULTADOS DA PROTEÍNA hPRSI SINTETASE	
3.1) Amplificação e clonagem do gene hPRSI em vetor pGEM-T.....	64
3.2) Subclonagem de hPRSI sintetase em vetor de expressão pET29a(+)......	66
3.3) Sequenciamento do gene HPRSI.....	66
3.4) Teste de Expressão da enzima hPRSI em vetor pET29a(+)......	67
3.5) Purificação da enzima hPRSI sintetase.....	69
3.6) Caracterização da proteína hPRSI sintetase.....	71
3.61) Caracterização da proteína hPRSI através do sequenciamento da região N-terminal.....	72
3.62) Determinação do Ponto Isoelétrico.....	73
3.63) Experimento de Dicroísmo Circular (CD).....	73
3.64) Experimento de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	75
3.65) Ensaio de cristalização.....	76
3.66) Referências Bibliográficas.....	78
Capítulo 4 RESULTADOS DA PROTEÍNA hPRSII SINTETASE	
4.1) Amplificação e Clonagem do gene hPRSII no vetor pCR4-TOPO.....	79
4.2) Clivagem da ligação hPRSII/pCR4TOPO para inserção em vetor de expressão.....	81
4.3) Sequenciamento do gene hPRSII.....	82
Capítulo 5 RESULTADOS DAS PROTEÍNAS hPAP41-1 e hPAP41-2	
5.1) Amplificação dos genes hPAP41-1 e hPAP41-2 e clonagem do gene hPAP41-1 em vetor pCR4-TOPO.....	83
5.2) Linearização e clivagem da clonagem do gene hPAP 41-1 em vetor pCR4-TOPO.....	84
5.3) Caracterização do gene hPAP41-1.....	85

Capítulo 6 RESULTADOS DA PROTEÍNA hPAP39

6.1) Amplificação e clonagem do gene hPAP39 em vetor pCR4-TOPO.....	87
6.2) Subclonagem de hPAP39 sintetase em vetor de expressão pMAL-c2X....	89
6.3) Sequenciamento do gene hPAP39.....	90
6.4) Teste de Expressão e Indução da hPAP39 sintetase em vetor pMAL-c2X..	91
6.5) Experimento de Purificação da hPAP39 sintetase.....	92
6.6) Clivagem da proteína de fusão com o Fator Xa e Caracterização por Immunoblotting.....	93
6.7) Purificação da proteína hPAP39 sintetase após clivagem com Fator Xa....	95

Capítulo 7 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	102
---	------------

Capítulo 8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	109
---	------------

Figura 21. Estratégia de alinhamento das extremidades 5' e 3' do gene hPRSI no vetor pET29a(+) produzido pelo programa SeqMan.....	67
Figura 22. Resultado do teste de expressão da enzima hPRSI sintetase.....	68
Figura 23. Resultado do teste de solubilidade da enzima hPRSI sintetase.....	68
Figura 24. Resultado da purificação da hPRSI após fracionamento com sulfato de estreptomicina e amônio.....	69
Figura 25. Perfil cromatográfico da eluição da hPRSI sintetase na coluna POROS 20HQ.....	70
Figura 26. Resultado da cromatografia de troca iônica da hPRSI sintetase.....	70
Figura 27. Resultado do gel SDS-PAGE corado com prata.....	71
Figura 28. Resultado do sequenciamento do N-terminal da proteína hPRSI.....	72
Figura 29. Determinação do ponto isoelétrico da proteína hPRSI sintetase.....	73
Figura 30. Espectro de dicroísmo circular da proteína hPRSI sintetase.....	74
Figura 31. Histograma representativo do RH da proteína hPRSI sintetase.....	76
Figura 32. Experimento de amplificação do gene hPRSII.....	79
Figura 33. Linearização da ligação hPRSII/pCR4- TOPO.....	80
Figura 34. Experimento de amplificação do gene hPRSII sintetase.....	81
Figura 35. Resultado de digestão do DNA plasmidial hPRSII/pCR4TOPO e do Vetor pKK223-3 com as enzimas de restrição Eco RI e Hind III.....	81
Figura 36. Resultado de alinhamento das seqüências 5' e 3' do gene hPRSII no vetor pCR4-TOPO produzido pelo programa SeqMan.....	82
Figura 37. Resultado da amplificação do DNA.....	83
Figura 38. Linearização da ligação hPAP41-1/pCR4-TOPO.....	84
Figura 39. Resultado de clivagem da hPAP41-1 em vetor pCR4-TOPO.....	85

Figura 40. Resultado de alinhamento das seqüências 5' e 3' do gene hPAP41-1 no vetor pCR4-TOPO produzido pelo programa SeqMan.....	86
Figura 41. Resultado da amplificação do DNA.....	87
Figura 42. Linearização da ligação hPAP39/pCR4-TOPO.....	88
Figura 43. Experimento de amplificação do gene hPAP39 sintetase.....	89
Figura 44. Resultado de clivagem da hPAP39 em vetor pCR4TOPO.....	90
Figura 45. Estratégia de alinhamento das extremidades 5'e 3'do gene hPAP39 em vetor pMALc-2X produzido pelo programa SeqMan.....	90
Figura 46. Teste de expressão e solubilidade da enzima hPAP39 sintetase.....	91
Figura 47. Teste de indução e solubilidade da hPAP39 sintetase a 37°C por 4 horas.....	92
Figura 48. Eluição da proteína de fusão em coluna de afinidade.....	93
Figura 49. Experimento de clivagem da proteína de fusão hPAP39-MBP com Fator Xa.....	94
Figura 50. Resultado de Imunoblotting.....	95
Figura 51. Perfil cromatográfico da eluição da hPAP39 sintetase na coluna MONO Q.....	96
Figura 52. Resultado da purificação da hPAP39 sintetase em coluna MONO Q...	96
Figura 53. Perfil cromatográfico da eluição da hPAP39 sintetase em coluna Superose 12.....	97
Figura 54. Resultado da purificação da hPAP39 sintetase em coluna de exclusão molecular Superose 12.....	97
Figura 55. Análise da purificação em resina de amilose da hPAP39 sintetase..	98
Figura 56. Resultado do teste de purificação em coluna Hi Trap SP Sepharose Fast Flow.....	99

Figura 57. Perfil cromatográfico da eluição em coluna de exclusão molecular, após teste de eluição na coluna Hi Trap Fast Flow.....	100
Figura 58. Resultado da purificação em coluna de exclusão molecular Superose 12.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos 5' sintetizados pela empresa GIBCO BRL.....	27
Tabela 2. Oligonucleotídeos 3' (GIBCO BRL) sintetizados com sítios de restrição para endonucleases específicas para a clivagem de cada gene.....	27
Tabela 3. Esquema do ciclo da reação de PCR para amplificação dos genes.....	28
Tabela 4. Padrões de pI constituintes do Kit geral de calibração.....	52
Tabela 5. Resultados de desconvolução do espectro de CD da enzima hPRSI sintetase.....	75
Tabela 6. Ensaios de cristalização com Fatorial I da Hampton Research.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP – Adenosina difosfato
- AMP – Adenosina monofosfato
- APRT – Adenina-fosforribosil-transferase
- ATP – Adenosina trifosfato
- CD – Dicroísmo Circular
- cDNA – DNA complementar
- dATP – adenina desoxirribosídeo trifosfato
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- dNTP – Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
- ddNTP – Desoxirribonucleosídeos trifosfatados que não apresentam a hidroxila no carbono 3
- DLS – “Dynamic Light Scattering”- Espalhamento Dinâmico de Luz
- D.O. – Densidade ótica
- DTT – Dithiotreitol
- E. coli* – *Escherichia coli*
- EDTA – Ácido etileno Diamino Tetra Acético
- Fator-Xa – protease de plasma bovino que cliva após a Arg na seqüência de aminoácidos Ile-Glu-Gly-Arg
- GMP – Guanosina monofosfato
- GTP – Guanosina trifosfato
- HGPRT – hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase
- IEF – “Isoelectric Focusing” - eletroforese de focalização isoeétrica

IMP – inosina monofosfato ou Inosinato

IPTG – Isopropil β - D-tiogalactopiranosídeo

kDa – QuiloDalton

LB – Meio de cultura Luria Bertani

NTB - Nitroblue de tetrazólio

pb – Pares de bases

PCR “Polymerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase

PEG – Polietileno glicol

pI – Ponto isoelétrico

Pi – Fosfato inorgânico

PPi – Pirofosfato

PRPP – 5-fosforribosil-1-pirofosfato

PRS – Fosforribosil sintetases

PRTases – Fosforribosil transferases

PVDF – “Polivinylidene Fluoride”

RMS – “Root Mean Square”- Desvio Médio Quadrático

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

SDS – Detergente dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

SELCON2 – “Self-Consistent method” - Programa de análise de espectros de CD que estima o conteúdo de estrutura secundária da proteína

TAE – Tampão de eletroforese composto por Tris acetato e EDTA

TBS – “Tris buffered saline”

Tris – Hidroximetil-aminometano

Xgal – Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

XPRT – Xantina-guanina-hipoxantina-fosforribosil-transferase

RESUMO

Fosforribosil pirofosfato (PRPP) sintetases são enzimas de central importância em diversas vias metabólicas em todas as células. A enzima PRPP sintetase humana é constituída por um complexo composto de três subunidades catalíticas (PRSI, PRSII e PRSIII) e por proteínas homólogas de 39 e 41 kDa denominadas PRS Associated Proteins (PAPs) cuja função é desconhecida. A importância da PRPP sintetase em humanos, tem sido documentada pela identificação de uma desordem associada ao cromossomo X, resultando em uma atividade aumentada da PRPP sintetase. Em consequência se percebem concentrações elevadas na dosagem de ácido úrico, purino nucleotídeos levando ao desenvolvimento de patologias como a gota e problemas neurológicos. Nesse sentido, realizaram-se estudos moleculares com o complexo enzimático que compõem as PRPP sintetases. Foram obtidos clones do gene *hprsI* em vetor de expressão pET29a(+) e a enzima foi expressa em bactérias *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3). A proteína recombinante hPRSI foi purificada depois de fracionamento com sulfato de estreptomicina, sulfato de amônio e em coluna cromatográfica de troca iônica. O raio hidrodinâmico e o pI da enzima foram determinados usando respectivamente a técnica de espalhamento dinâmico de luz e o sistema Fast de eletroforese. A enzima foi caracterizada quanto ao seu enovelamento através da técnica de Dicroísmo Circular, apresentando um espectro característico de estrutura enovelada, composta predominantemente por α -hélices. Os genes *hprsII* e *hpap41-1* que codificam respectivamente para as proteínas hPRSII e HPAP41-1 foram clonados no vetor de clonagem pCR4-TOPO. A proteína recombinante hPAP39 foi clonada em vetor pMAL-c2X em fusão com a proteína Maltose Binding Protein (MBP) e expressa em *E. coli*. A proteína hPAP39 está em fase de purificação e foi submetida ao experimento de Imunoblotting. Investigações estruturais destas enzimas poderão trazer informações fundamentais para o conhecimento da via biossintética, assim como para o desenvolvimento de inibidores específicos visando o tratamento das desordens a elas associadas.

ABSTRACT

Phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) synthetases are enzymes of central importance in several metabolic pathways in all cells. The enzyme PRPP synthetase complex is composed of three catalytic subunits (PRSI, PRSII and PRSIII) and homologous 39 and 41 kDa proteins termed PRPP synthetase-Associated Proteins (PAPs) whose function is unknown. The importance of PRPP synthetase function in humans has been documented by the identification of an X chromosome-linked disorder associated with super activity of PRPP synthetase. As a consequence uric acid overproduction, purine nucleotides are observed resulting in the development of diseases such as gout and neurodevelopment impairment. In this line, molecular studies were done with the enzyme complex that constitutes the PRPP synthetases. Clones were obtained from the *hprsI* gene in the pET29a(+) expression vector and the enzyme was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) bacterial. The recombinant human PRSI enzyme was purified, after streptomycin and ammonium sulfate fractionation and by anion exchange chromatography. The hPRSI hydrodynamic radius and pI were determined using, respectively, measures of Dynamic Light Scattering (DLS) and isoelectrofocusing electrophoresis. In addition, according to circular dichroism spectroscopy, hPRSI prevalent secondary structure is α -helix. The *hprsI* and *hpap41-1* genes that codify, respectively, to hPRSII and hPAP41-1 proteins were cloned in pCR4-TOPO cloning vector. The recombinant protein hPAP39 was cloned in the pMAL-c2X expression vector in fusion with the Maltose Binding Protein (MBP) and expressed in *E. coli*. A purification protocol is being established for the hPAP39 protein and is submitted by immunoblotting technique. Structural investigation of these enzymes will provide information about the biosynthetic pathway *de novo* of purine nucleotides, as well as to development of specific inhibitors aiming at the treatment of the associated disorders.

Introdução

A possibilidade de corrigir nos genes os erros responsáveis por doenças fascina os cientistas desde que a engenharia genética nasceu, na década de 70. As metodologias de clonagem de DNA, a síntese de oligonucleotídeos, o isolamento de enzimas que clivam e ligam o DNA, a caracterização de plasmídeos bacterianos, além da compreensão da expressão gênica convergiu para um único experimento, no qual uma proteína humana, a somatostatina, era expressa a partir do DNA recombinante pela primeira vez (Itakura *et al.*, 1977).

Além disso, maneiras totalmente novas de projetar fármacos emergem da tecnologia do DNA recombinante, graças à capacidade em modelar proteínas naturais através de vários ajustes e pequenas alterações, melhorando seu desempenho funcional (Shak *et al.*, 1990).

Com esse crescente avanço na biologia molecular está sendo possível o desenvolvimento de quimioterápicos, a partir de informações estruturais de proteínas envolvidas em vias metabólicas relevantes.

1.1) Vias de obtenção de Purino Nucleotídeos

Os purino nucleotídeos que se constituem de bases nitrogenadas são imprescindíveis para a formação do Ácido Desoxirribonucleico (ADN, termo usual DNA) e também do Ácido Ribonucleico (ADR, termo usual RNA). Os nucleotídeos são importantes na biossíntese de precursores como o ATP e GTP, componentes dos cofatores NAD, FAD

e, coenzima A, e também exercem papéis de reguladores metabólicos (Stryer, L., 1992).

Em células de mamíferos os purino e pirimidinonucleotídeos podem ser sintetizados a partir de duas vias. Uma via, envolvendo onze reações enzimáticas seqüenciais leva a síntese “de novo”, a partir de precursores não nucleotídeos tais como aminoácidos, ribose-5-fosfato, amônia e dióxido de carbono. Uma segunda via, constituindo as denominadas “vias de recuperação” (Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2000) utiliza os purino-nucleotídeos pré-formados (adenosina, guanosina e/ou inosina) derivados da degradação hidrolítica dos ácidos nucléicos ou nucleotídeos livres.

1.11) Síntese *De Novo* dos Purino Nucleotídeos

Os primeiros pesquisadores a trabalhar com a via de biossíntese de purinas foram John Buchanan e G. Robert Greenberg (Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2000). Trata-se de uma via central constituída por onze passos enzimáticos, divididos em dois estágios:

I) Composição do 5-aminoimidazol ribonucleotídeo a partir da PRPP.

II) Formação de Inosina 5' monofosfato (IMP) a partir do 5-aminoimidazol ribonucleotídeo (AIR).

O ponto inicial desta via é a síntese do substrato 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) a partir da ribose 5- fosfato (R5P) dos purinos e pirimidinonucleotídeos, fornecido pela PRPP sintetase, pela transferência

direta do pirofosfato a partir do ATP para a ribose 5-fosfato, descrita na figura 1.

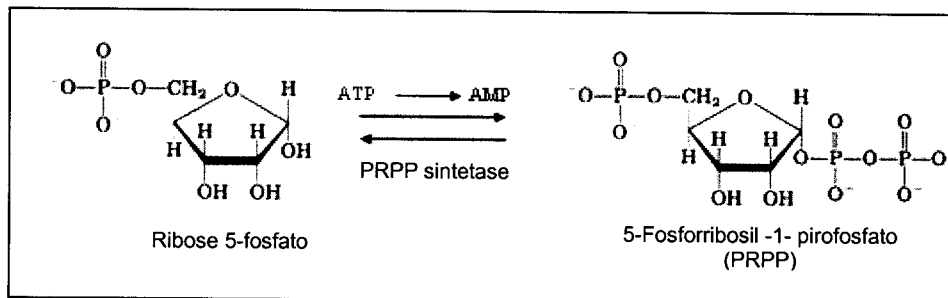


FIG1: Esquema representativo da formação do substrato. Ocorre a formação do substrato PRPP a partir da transferência do pirofosfato do ATP para Ribose 5- fosfato, através da enzima PRPP sintetase (Nelson, D. L.and Cox, M.M., 2000).

Estas reações resultam na síntese do anel purínico (figura 2) e a formação de inosina 5' monofosfato (IMP). O IMP por sua vez é convertido em adenosina monofosfato (AMP) e guanosina monofosfato (GMP).

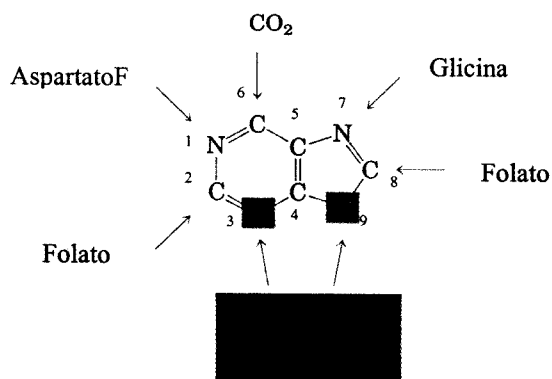


FIG2: Origem dos átomos no anel purínico. Glicina fornece C-4, C-5 e N-7. Aspartato o N-1. A glutamina os átomos de N-3 e N-9 que vem de da cadeia lateral da amida. O C-2 e C-8 vêm dos derivados ativos do tetra-hidrofolato. E o C-6 é doado pelo CO₂ (Nelson, D. L.and Cox, M.M., 2000).

1.12) Mecanismo da Síntese *De novo*

Na figura 3, é possível visualizar as etapas que envolvem o mecanismo da síntese *De Novo* de purino nucleotídeos. O primeiro estágio constitui-se de cinco passos enzimáticos. No primeiro passo, dando início a reação de formação do anel purínico, ocorre substituição do pirofosfato por uma amina, levando à formação da 5-fosfosilamina a partir de PRPP e Glutamina (1). A enzima que catalisa essa reação é a glutamina PRPP amidotransferase, é a etapa limitante, regulada alostericamente pelos produtos finais da via – IMP, GMP e AMP.

Em seguida, ocorre adição de glicina (2) ligando-se a fosforribosilamina produzindo glicinamida ribonucleotídeo, resultando em um intermediário acil-fosfato.

Na próxima etapa (3), tem-se a formilação do amino α terminal da glicina pelo N¹⁰ - formil tetra-hidrofolato formando α -N-Formil glicinamida ribonucleotídeo.

A glutamina contribui com um nitrogênio (4) e, então há a formação do anel de imidazol do núcleo de purinas, com o 5-*aminoimidazol ribonucleotídeo* (5).

O segundo estágio constitui-se dos seis últimos passos enzimáticos para a formação de Inosina 5' monofosfato a partir 5-*aminoimidazol ribonucleotídeo*, no qual um grupo carboxil é adicionado (6 e 7).

O próximo passo é caracterizado pela doação de um grupo amina do aspartato (8), onde uma molécula de ATP é hidrolisada, liberando o esqueleto de carbono do aspartato como fumarato e 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo é produzido (9).

O próximo processo é a formilação pelo N¹⁰ - formil tetra-hidrofolato, tendo como resultado o 5-formamidoimidazol-4-carboxiamida ribonucleotídeo (10). E como último passo na cadeia enzimática de purinonucleotídeos observa-se a ocorrência da desidratação e fechamento do anel (11), formando Inosina 5' monofosfato (IMP), que tem como base purínica a hipoxantina (Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2000).

1.13 - MECANISMO DA VIA DE SÍNTESE *DE NOVO*

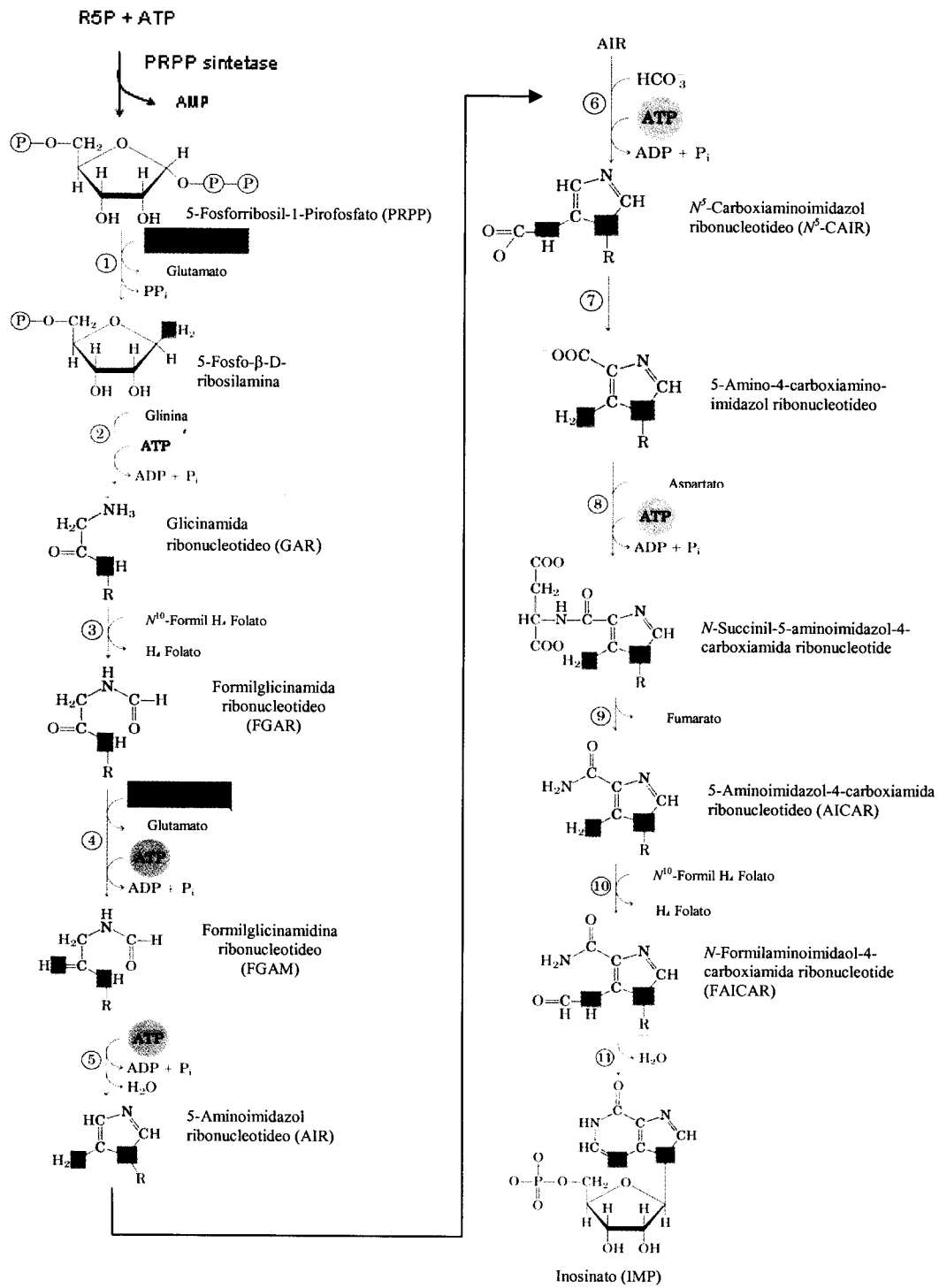


FIG3: Esquema representando o mecanismo da via da síntese *de novo*. Têm-se os onze passos enzimáticos iniciando com a PRPP e culminando para a formação de IMP (Nelson, D. L. and Cox, M.M., 2000).

1.14) Via de Recuperação

Como descrito anteriormente, a via de recuperação utiliza nucleotídeos pré-formados (adenina, guanina, xantina e/ou hipoxantina) derivados da degradação de ácidos nucléicos ou nucleotídeos livres (figura 4). Nesta via, as purinas livres reagem diretamente com o substrato (PRPP) sendo convertidas nos nucleotídeos-5' monofosfatos, AMP e IMP.

Participa dessa via uma classe de enzimas denominadas fosforribosil-transferases (PRTases). Todas as PRTases catalisam reações semelhantes, envolvendo uma purina livre e o 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) (Silva, 2001).

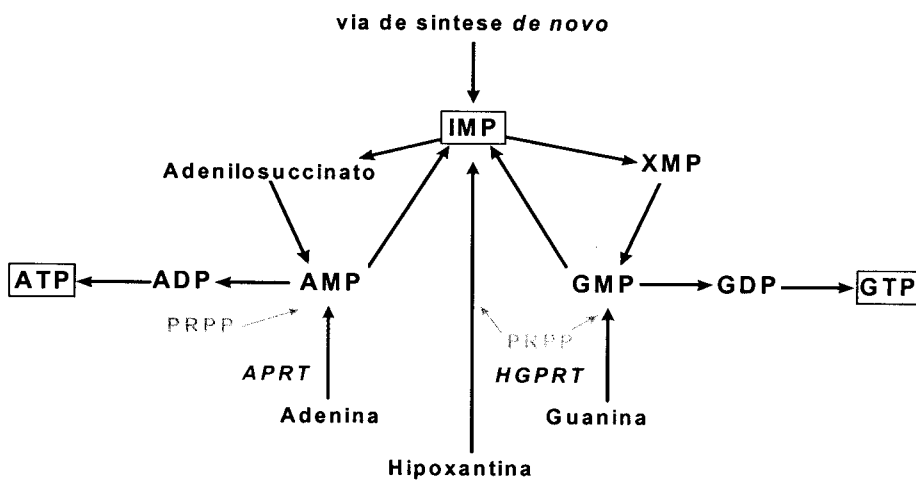


FIG4: Via de recuperação e interconversão, em células de mamíferos. APRT-adenina-fosforribosil-transferase;HGPRT-hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase; PRPP-5'-fosforribosil-1-pirofosfato.

1.2) Fosforribosil Pirofosfato (PRPP) Sintetases

A enzima 5-Fosforribosil pirofosfato (PRPP) sintetase catalisa a formação de PRPP e AMP pela transferência do grupo fosforil do ATP para 1-hidroxil de Ribose 5- fosfato (R5P). PRPP é um substrato importante para quase todos nucleotídeos e um fator de controle crítico na síntese de novo de purinas e pirimidinas.

A PRPP sintetase provavelmente ocorre em todas as células de organismos vivos. Foi descoberta por Kornberg *et al.* (1955), que estudou a sua ocorrência em pombos, ratos e em células de *Escherichia coli*. A enzima tem sido estudada também em muitas espécies de microorganismos e em tecidos humanos. Fox e Kelley (1971) estudaram 14 diferentes extratos de tecidos humanos e encontraram atividade significativa da PRPP sintetase em todos eles. A maior parte da atividade enzimática da PRPP sintetase parece estar localizada no citoplasma celular.

Supõe-se que a PRPP sintetase é essencial a todos os organismos de vida livre e, conseqüentemente estes organismos possuem no mínimo um gene PRS específico que codifica para esta enzima. Apenas dois microorganismos parasitas intracelulares *Chlamydia trachomatis* e *Rickettsia prowazekii* não possuem PRPP sintetase (Anderson *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 1998).

Estudos realizados com organismos eucariontes verificaram a presença de mais de um gene PRS. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui cinco isoformas (Hernando *et al.*, 1998), as quais são homólogas

as PRPP sintetases de mamíferos e bactérias (Carter *et al.*, 1994, 1997). O seqüenciamento completo dos genomas de *Schizosaccharomyces pombe* e do nematódeo *Caenorhabditis elegans* revelaram a existência de duas isoformas. Os mamíferos *Ratus norvegicus* e *Homo sapiens* possuem duas e três isoformas, respectivamente. Existem também trabalhos que visam à caracterização detalhada da PRPP sintetase de bactérias como *E. coli* e *Salmonella typhimurium* (Switzer, 1969; Hove-Jensen *et al.*, 1986).

Um importante avanço no estudo de PRPP sintetases de mamíferos, foi realizado através do estudo de Taira *et al.* (1987), que deduziu através das seqüências de cDNA que codificam para as PRSs de ratos, a ocorrência de duas isoenzimas similares. Roessler *et al.* (1990) demonstrou que em células somáticas de humanos também continham duas isoformas com alta similaridade sequencial que codificavam para PRPP sintetase e as denominou de PRSI e PRSII, as quais são codificadas por genes separados e, mapeados em regiões distintas do cromossomo X humano (Taira *et al.*, 1989b; Becker *et al.*, 1990). Subseqüentemente, uma terceira isoenzima, PRSIII, codificada por um gene localizado no braço pequeno do cromossomo 7 (Taira *et al.*, 1989b) e, aparentemente expressa somente em tecido testicular. Pesquisas realizadas com as isoenzimas PRSI e PRSII indicam que estão presentes em todos tecidos, porém sua expressão é variável (Taira *et al.*, 1989a), podendo ser diferencialmente ativada em resposta à estimulação de células, fatores de crescimento e/ou transformação viral (Becker *et al.*, 1991).

Em ratos, evidências sugerem que a PRPP sintetase é um complexo agregado composto pelas duas subunidades catalíticas (PRSI, PRSII) e, por proteínas homólogas denominadas PRS Associated Proteins (PAPs), no qual estas devem desempenhar papel importante na supressão da atividade catalítica da enzima. A PAP39, a maior componente das PAPs, age na regulação negativa na síntese de PRPP e, conseqüentemente em geral, é um importante fator de controle da síntese de nucleotídeos, apresentando 48 e 49% de identidade com a PRSI e PRSII, respectivamente (Kita *et al.*, 1994; Ishijima *et al.*, 1997). O mRNA da PAP 41 está presente em todos tecidos de ratos examinados, porém ainda não está esclarecida a sua participação nesse complexo enzimático (Tatibana *et al.*, 1995; Sonoda *et al.*, 1997).

Geralmente, as PRSs sintetases usam ATP como doador difosforil tendo como substrato MgATP. As enzimas de *E.coli*, *S. typhimurium* e mamíferos também requerem Mg²⁺ livre. Todas as enzimas PRSs necessitam de fosfato inorgânico (Pi) para sua atividade catalítica e para sua estabilidade (Switzer, 1969; Becker *et al.*, 1979; Hove-Jones *et al.*, 1986). Mas essa dependência ao Pi apresenta um comportamento diferenciado em algumas isoenzimas de plantas, conhecidas como PRS sintases.

A enzima apresenta-se em muitas formas ativas e tem diferentes efetores: Mg²⁺ e fosfato inorgânico (Pi) como ativadores e ADP, 2-3-difosfoglicerato ou GDP como inibidores competitivos ou não competitivos. Sabe-se que em bactérias a enzima é eficientemente inibida

pelo ADP. Em *Bacillus subtilis* e mamíferos essa inibição ocorre pelo GDP e ADP.

Têm-se apenas uma estrutura tridimensional da PRPP sintetase resolvida de *B. subtilis* (Eriksen *et al.*, 2000), que se comporta como um complexo com análogos de ativador fosfato e o inibidor alostérico ADP demonstrando que a forma funcional da enzima é um hexâmero. Cada monômero é caracterizado por dois domínios, ambos com semelhança com fosforribosiltransferases tipo I. O sítio ativo está localizado entre os dois domínios e inclui resíduos das duas subunidades. Fosfato e ADP se ligam ao mesmo centro regulatório consistindo de resíduos de três subunidades do hexâmero.

Cada domínio possui uma estrutura aberta de α/β com cinco folhas β paralelas ao centro e ao redor quatro α -hélices e uma hélice 3_{10} adicional ao domínio N-terminal (figura 6). Ambos os domínios são flanqueados por uma pequena folha β antiparalela que se assemelha com uma haste protuberando do núcleo central (Eriksen *et al.*, 2000). O enovelamento global dos domínios da PRPPs sintetases são similares à fosforribosiltransferases, sugerindo que ambas originaram-se do mesmo gene ancestral, o qual foi duplicado no caso das PRPPs sintetases. A duplicação não foi deduzida da estrutura primária da PRPP sintetase, a qual apresenta menos que 20% de identidade na seqüência entre os resíduos dos dois domínios. No domínio C-terminal foram identificados os resíduos Asp 223-Thr 231 por alinhamento de seqüências com a fosforribosiltransferases tipo I, sugerindo que este “loop” formado por esses resíduos está envolvido no sítio de ligação da R5P. Na estrutura da

PRPP sintetase o “loop” consistindo dos resíduos Tyr 97- Thr 113 exibe uma grande variação na conformação principal, referido como “loop flexível”, onde este se caracteriza por conter em abundância resíduos conservados, sugerindo que uma alteração conformacional nesta região é importante na função catalítica da enzima (figura 5).

Na formação do hexâmero (figura 6), estrutura quaternária da PRPP sintetase, de um lado cada subunidade (A) interage com seu vizinho (D) através do contato entre seus resíduos N-terminais e, a interface entre eles ocorre por interações hidrofóbicas e, pontes de hidrogênio entre dois resíduos altamente conservados Asn 69 e Glu 70 contribuem para a estabilização desta interface (figura 5). Resíduos de ambas subunidades estão envolvidos no sítio de ligação do ATP desta interface, mostrando-se de importância funcional.

De outro lado, cada subunidade (A) e seu vizinho (B) são alinhados de maneira paralela e seus domínios N-terminais e C-terminais estão envolvidos na formação da interface (figura 6). A interação entre os domínios C-terminais é feita por interações hidrofóbicas e pontes salinas. A interface entre os domínios N-terminais é estabilizada por uma ponte de hidrogênio conectada por resíduos conservados de Lys 115 e Asp 144 (figura 5). Resíduos conservados em hélice 3_{10} também estão envolvidos no empacotamento hexâmérico.

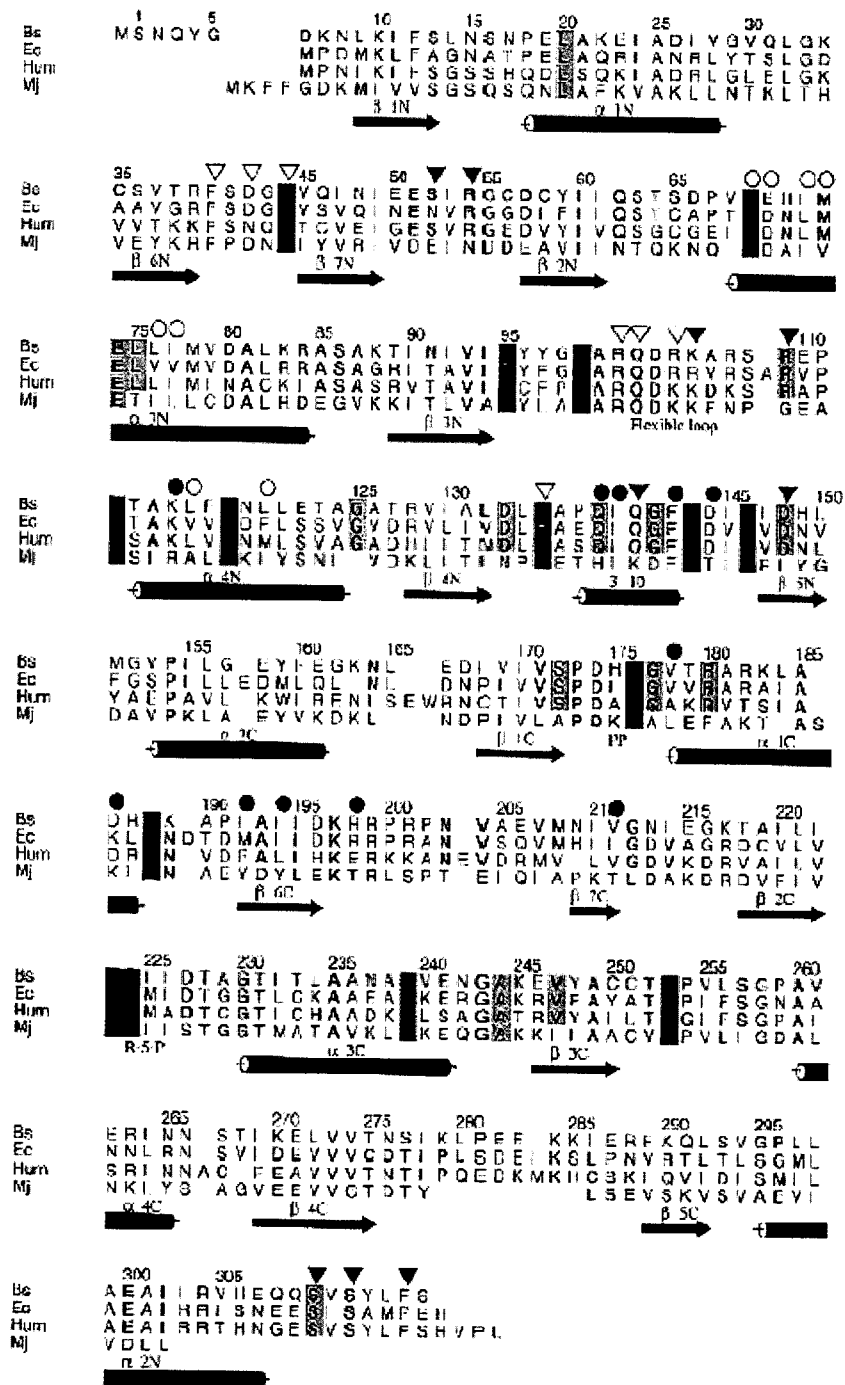


FIG5: Alinhamento das seqüências de PRPP sintetase. Bs, *Bacillus subtilis*; Ec, *Escherichia coli*; Hum, *Homo sapiens* isoenzima I; Mj, *methanococcus jannaschii*. Das 27 seqüências encontradas de PRPP sintetases, nesta figura consta o alinhamento de 4 seqüências. Resíduos em vermelho são conservados nas 27 seqüências de PRPP sintetases; resíduos em laranja e amarelo são conservados em 26 e 22 seqüências, respectivamente. Triângulos coloridos marcam resíduos envolvidos no sítio regulatório e triângulos incolores na ligação de ATP no sítio ativo. Resíduos que participam na interação das subunidades A e D estão marcados por esferas incolores e, os resíduos participantes da interação das subunidades A e B são representados por esferas coloridas. Cilindros representam α -hélices e setas representam folhas β .

A ação alostérica da PRPP sintetase é somente observada na presença de R5P, envolvendo resíduos do loop flexível, como a Lys 105 (substituída por arginina, em algumas seqüências).

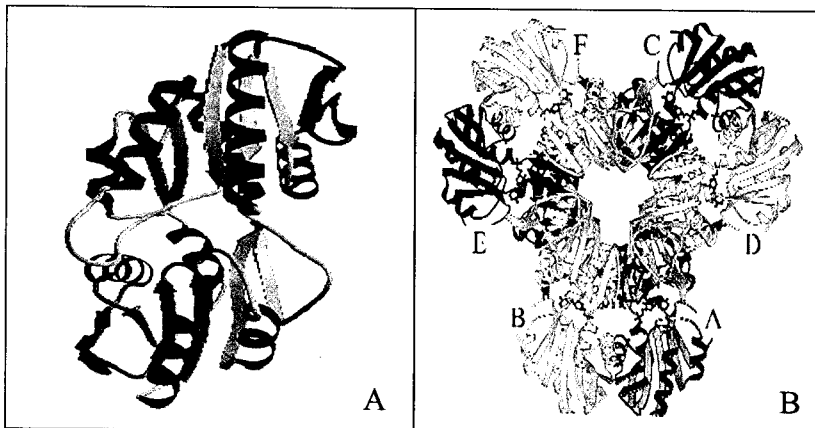


FIG6: Estrutura tridimensional da PRPP sintetase de *Bacillus subtilis*. Na figura A, observa-se o monômero com seus dois domínios e, em B, a estrutura quaternária (hexâmero) da PRPP sintetase de *B.subtilis* (Eriksen *et al.*, 2000).

1.3) Defeitos e Patogênias

O ácido úrico é o maior produto do catabolismo das purinas. Diversos fatores como dieta, predisposição genética, sexo, idade, peso, medicamentos, uso de álcool e associação com algumas patologias como diabetes mellitus e distúrbios lipídicos podem alterar os valores séricos e levar a um desequilíbrio de ácido úrico.

A importância da PRPP sintetase em humanos, tem sido documentada pela identificação de uma desordem associada ao cromossomo X, resultando em uma superatividade da PRPP sintetase, com concentrações elevadas na dosagem de ácido úrico, purino nucleotídeos e, conseqüentemente, levando ao desenvolvimento de

patogênias como a gota e problemas neurológicos (Sperling *et al.*, 1972; Becker *et al.*, 1973b, 1988, 1993).

Estudos revelam que tais patologias estão associadas a alterações fenotípicas refletindo na alteração da regulação alostérica da enzima PRPP sintetase, através de mutações pontuais na região que codifica para o gene PRPSI (Becker *et al.*, 1995).

A atividade aumentada da PRPP sintetase resulta num aumento dos níveis intracelulares de PRPP. Na síntese *de novo* de purino nucleotídeos PRPP age como efetor positivo da glutamina-PRPP amidotransferase, levando ao fluxo aumentado da via *de novo*, já que a atividade da etapa de velocidade limitante é acentuadamente aumentada.

Outras alterações bioquímicas também resultam na síntese aumentada de purino nucleotídeos, como a diminuição parcial da atividade da HGPRTase com diminuição na recuperação de hipoxantina e guanina, PRPP não é consumido pela reação da HGPRTase e PRPP pode ativar a glutamina-PRPP amidotransferase (figura 4). Ainda assim, com a diminuição da recuperação de hipoxantina e guanina, IMP e GMP não são formados por essa via; e com isto, a regulação da etapa PRPP amidotransferase por IMP e GMP como efetores negativos, fica comprometida.

Em pacientes que têm deficiência de glicose 6-fosfatase (doença de armazenamento de glicogênio tipo I) também ocorre, freqüentemente, hiperuricemia e gota. A perda da atividade da glicose 6-fosfatase resulta na produção glicose 6-fosfato sendo desviada de hexose monofosfato e, como consequência, mais ribose 5-fosfato é gerada e o nível intracelular

de PRPP é aumentado. PRPP é um efetor positivo da PRPP amidotransferase (Becker, M. A; Roessler, B.J., 1995).

A gota caracteriza-se clinicamente por hiperuricemia com precipitação de urato monossódico (figura 7), que se depositam por todo o corpo, com exceção do sistema nervoso central, mas com maior ocorrência em articulações, cartilagem periarticular, ossos, bursa e tecidos moles subcutâneos.

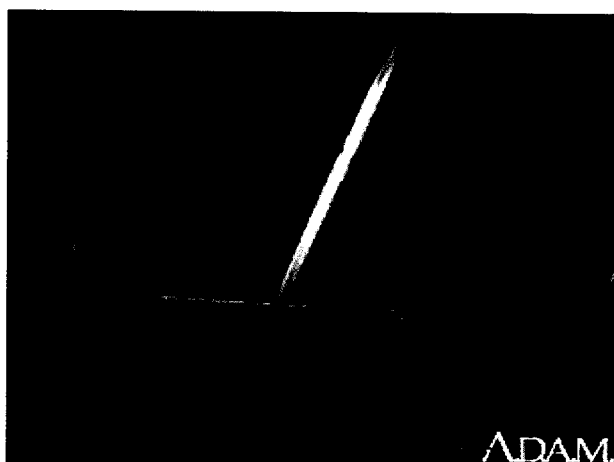


FIG7: Cristais de urato monossódico. Devido a hiperuricemia, ocorre precipitação de urato monossódico em forma de cristais (<http://www.hopkinsmedicine.org>).

Os depósitos de uratos são responsáveis pelos sinais e sintomas de artrite gotosa, pois levam a uma severa reação local (figura 8). Nos rins, são descritos dois tipos de lesões: a nefropatia gotosa com depósito de uratos no parênquima intratubular agudo de cristais de urato e a nefrolitíase. Os homens respondem por cerca de 90% dos casos de gota (http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/acido_urico.shtml).

Existem diferentes abordagens para o tratamento da gota que incluem colchicina, drogas anti-hiperuricêmicas e alopurinol. Alopurinol e seu metabólito, aloxantina, são inibidores eficientes da xantina oxidase,

aumentando as concentrações de hipoxantina e xantina. Essas bases púricas são, então, recuperadas para formar IMP e XMP. Essas reações consomem PRPP e geram inibidores da PRPP amidotransferase. O efeito global é que o tratamento com alopurinol diminui ambos, formação de ácido úrico e síntese de novo de purino nucleotídeos (Devlin, T.M., 1998).

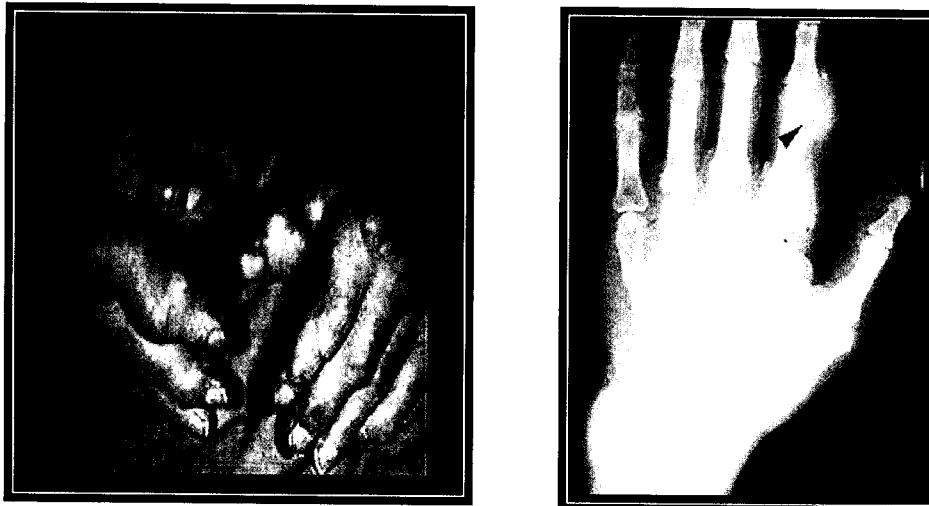


FIG8: Gota. Patogenia caracterizada por hiperuricemia com deposição de cristais de urato monossódico nas articulações das extremidades, causada por anormalidades na biossíntese de purino nucleotídeos na via *de novo* (<http://www.hopkinsmedicine.org>).

O estudo da enzima PRPP sintetase envolvida na via metabólica da síntese *De Novo* de purinonucleotídeos poderá ser uma ferramenta importante no controle de patogenias como a gota. Estudos cristalográficos e de modelagem molecular do complexo PRPP sintetase poderão produzir informações estruturais fundamentais para o conhecimento da biossíntese de purinonucleotídeos, assim como para o desenvolvimento de inibidores específicos.

1.4) Objetivos

Neste trabalho, nos propomos a estudar enzimas do complexo enzimático PRPP sintetase: duas subunidades catalíticas (PRSI e PRSII) e proteínas associadas PAPs 39 e 41, envolvidas na via de purino nucleotídeos em humanos para caracterização físico-química e possível modelo estrutural da Fosforribosil Pirofosfato (PRPP) Sintetase em colaboração com o aluno de Doutorado Hamilton B. Napolitano.

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- Clonagem e Subclonagem dos genes PRS que codificam as proteínas PRPP sintetases, em vetores de propagação e expressão;
- Expressão do gene PRS em *Escherichia coli*;
- Purificação e caracterização das proteínas PRPP sintetases;
- Desenvolvimento de ensaios de cristalização das proteínas PRPP sintetases.

Dentre os objetivos propostos, houve um maior avanço nos estudos das proteínas hPRSI e hPAP39, como descrito nos resultados.

1.5) Referências Bibliográficas

ANDERSON, S.G.E.; ZOMORODIPOUR, A.; ANDERSON, J.O.; SICHERITZ-PONTÉN, T.; ALSMARK, U.C.M.; PODOWSKI, R.M.; NASLUND, A.K.; ERIKSSON, A.S.; WINKLER, H.H.; KURLAND, C.G. The genome sequence of *rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. **Nature**. v. 396, p. 133-140, 1998.

BECKER, M.A., MEYER, L.J., WOOD, A.W., and SEEGMILLER, J. E. **Science**. v. 179, p.1123-1126, 1973b.

BECKER, M.A.; RAIVIO, K.O., and SEEGMILLER. Synthesis of phosphoribosylpyrophosphate in mammalian cells. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** v. 49, p. 281-306, 1979.

BECKER, M.A., PUIG, J.G., MATEOS, F.A., JIMENEZ, M.L., KIM, M., and SIMMONDS, H.A. Inherited superactivity of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase: association of uric acid overproduction and sensorineural deafness. **Am. J. Med.** v. 85, p.383-390, 1988.

BECKER, M.A.; HEIDLER, S.A.; BELL, G.I.; SEINO, S.; LEBEAU, M.M.; WESTBROOK, C.A.; NEUMAN, W.; SHAPIRO, L.J.; MOHANDAS, T. K.; ROESSLER, B.J., and PALELLA, T.D. Cloning of cDNAs for human phosphoribosylpyrophosphate synthetase 1 and 2 and X chromosome localization of PRPS1 and PRPS2 genes. **Genomics**. v. 8, p. 555-561, 1990.

BECKER, M.A.; HEIDLER, S.A.; NOSAL, J.M.; SWITZER, R.L.; LEBEAU, M.M.; SHAPIRO, L.J.; PALELLA, T.D., and ROESSLER, B.J. Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase (PRS)2: An independently active, X chromosome-linked PRS isoform. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 309B, p. 129, 1991.

BECKER, M.A.; NOSAL, J.M.; SWITZER, R.L. Overexpression, Purification, and Characterization of recombinant Human 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate Synthetase Isozymes I and II. **The Journal of Biological Chemistry**. v.268, p.10168-10175, 1993.

BECKER, M.A.; SMITH, P.R.; TAYLOR, W.; MUSTAFI, R., and SWITZER, R.L. The genetic and functional basis of purine nucleotide feedback-resistant phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity. **J. Clin. Invest.** v.96, p.2133-2141, 1995.

BECKER, M.A., and ROESSLER, B.J. Hyperuricemia and gout. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 7^a ed., v.II, p. 1655-1677, 1995.

CARTER, A.T.; NARBAD, A.; PEARSON, B.M.; BECK, K.F.; LOGGHE, M.; CONTRERAS, R.; SCHWEIZER, M. Phosphoribosylpyrophosphate synthetase (PRS): a new gene family in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 10, p. 1031-1044, 1994.

CARTER, A.T.; BEICHE, F.; HOVE-JENSEN, B.; NARBAD, A.; BARKER, P.J.; SCHWEIZER, L.M.; SCHWEIZER, M. PRS1 is a key member of the family encoding phosphoribosylpyrophosphate synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.** v. 254, p. 148-156, 1997.

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 4 edição, Ed. Edgard Blucher Ltda.

ERIKSEN, T.A.; KADZIOLA, A.; BENTSEN, A.K.; HARLOW, K.W.; and LARSEN, .Structural basis for the function of *Bacillus subtilis* phosphoribosyl-pyrophosphate synthetase. **Nature Struct. Biol.** v.7, p. 303-308, 2000.

FOX, I.H., and KELLEY, W.N. Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase: distribution, purification and properties. **J. Biol. Chem.** v. 246, p. 5739-5748, 1971.

HERNANDO, Y.; PARR, A.; SCHWEIZER, M. PRS5, the fifth member of the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase gene family in *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for cell viability in the absence of either PRS1 or PRS3. **J. Bacteriol.** v.180, p. 6404-6407, 1998.

HOVE-JENSEN, B.; HARLOW, K.W.; KING, C.J. & SWITZER, R.L. Phosphoribosylpyrophosphate synthetase of *Escherichia coli*. Properties of the purified enzyme and primary structure of the *prs* gene. **J. Biol. Chem.** v. 261, p. 6765-6771, 1986.

ITAKURA, K.; HIROSE, T.; CREA, R.; RIGGS, A.; HEYNECKER, H.L.; BOLIVAR, F., and BOYER, H. "Expression in *E.coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin." **Science**. v. 198, p. 1056-1063, 1977.

ISHIJIMA, S.; ASAI, T.; KITA, K.; SONODA, T.; TATIBANA, M. Partial reconstitution of mammalian phosphoribosylpyrophosphate synthetase in *Escherichia coli* cells. Coexpression of catalytic subunits with the 39- KDa associated protein leads to formation of soluble multimeric complexes of various compositions. **Biochim. Et Biophys Acta**. v. 1342, p. 28-36, 1997.

KITA, K.; ISHIZUKA, T.; ISHIJIMA, S.; SONODA, T., and TATIBANA, M. A Novel 39-KDa Phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein of Rat Liver. **The Journal of Biol. Chem.** v. 269, p. 8334-8340, 1994.

KORNBERG, A.; LIEBERMAN, I., AND SIMMS, E.S. Enzymatic synthesis and properties of 5-phosphoribosylpyrophosphate. **J. Biol. Chem.**v.215, p. 389-402, 1955.

NELSON, D.L., and COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3. ed. New York 2000.

ROESSLER, B.J.; BELL, G.; HEIDLER, S.; SEINO, S., BECKER, M. & PALELLA, T.D. Cloning of two distinct copies of human phosphoribosylpyrophosphate synthetase cDNA. **Nucleic Acids Res.** v. 18, p. 193, 1990.

SHAK, S.; CAPON, D.J.; HELLMISS, R.; MARSTERS, S.A., and BAKER, C.L. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V. 87, p. 9188-9192, 1990.

SILVA, M. E. Estudos de Biologia molecular e Estrutural da Enzima Adenina Fosforribosil Transferase (APRT) de *Leishmania tarentolae*. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos – USP 2001.

SONODA, T.; ISHIZUKA, T.; KITA, K.; ISHIJIMA, S.; TATIBANA, M. Cloning and sequencing of rat cDNA for the 41-KDa phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein has a high homology to the catalytic subunits and the 39-KDa associated protein. **Biochim. Et Biophysics Acta.** v. 1350, p. 6-10, 1997.

SPERLING, O.; BOER, P.; PERSKY-BROSH, S.; KANAREK, E., and de VRIES, A. Altered Kinetic property of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate synthetase in excessive purine metabolism **Rev. Eur. Etud. Clin. Biol.** v.17, p. 703-706, 1972.

STEPHENS, R.S.; KALMAN, S.; LAMMEL, C.; FAN, J.; MARATHE, R.; ARAVIND, L.; MITCHELL, W.; OLINGER, L.; TATUSOV, R.L.; ZHAO, Q.; KOONIN, E.V.; DAVIS, R.W. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. **Science.** v. 282, p. 754-759, 1998.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3^a ed. Ed. Guanabara Koogan S.A.495. Rio de Janeiro/RJ 1992.

SWITZER, R.L. Regulation and mechanism of phosphoribosylpyrophosphate synthetase I: Purification and properties of the enzyme from *Salmonella typhimurium*. **J. Biol. Chem.** v. 244, p. 2854-2863, 1969.

TAIRA, M.; ILIAZA, T.; YAMADA, H.; SHIMADA, H.; TATIBANA, M. Tissue-differential expression of two distinct genes for

phosphoribosylpyrophosphate synthetase and existence of the testes-specific transcript. **Bochim. Biophys. Acta.** v. 1007, p. 203-208, 1989a

TAIRA, M.; KUDOH, J.; MINOSHIMA, T.; ILIAZA, T.; SHIMADA, H.; SHIMIZU, Y.; TATIBANA, M., and SHIMIZU, N. Localization of human phosphoribosylpyrophosphate synthetase subunit I and II genes (PRPSI and PRPS2) to different regions of the chromosome and assignment of two PRPS-related genes to autosomes. **Somatic Cell. Mol. Genetic.** v. 15, p. 29-37, 1989b.

TAIRA, M.; ILIAZA, T.; SHIMADA, H.; KUDOH, J.; SHIMIZU, N. & TATIBANA, M. A human testis-specific mRNA for phosphoribosylpyrophosphate synthetase that initiates from a non-AUG codon. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 16491-16497, 1990.

TATIBANA, M.; KITA, K.; TAIRA, M.; ISHIJIMA, S.; SONODA, T.; ISHIZUKA, T.; ILIAZA, T., and AHMAD, I. Mammalian phosphoribosyl-pyrophosphate synthetase. **Advan. Enzyme Regul.** v. 35, p. 229-249, 1995.

TÉCNICAS, MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS

Este capítulo encontra-se dividido em três partes: Clonagem dos genes e expressão das proteínas, purificação e caracterização das proteínas hPRSI, hPRSII, hPAP41-1, hPAP41-2 e hPAP39.

PARTE I - CLONAGEM DOS GENES E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS

2.1) Clonagem – Aspectos Gerais

A tecnologia do DNA recombinante veio inovar a ciência por volta dos anos 70 permitindo a obtenção de quantidades significativas de proteínas.

O desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de DNA com a reação de polimerização em cadeia (PCR -Polymerase Chain Reaction) nos possibilitaram a obtenção de clones de quaisquer organismos (Mullis, K.B., 1990).

A clonagem do DNA se baseia em transplantar um gene de um organismo para o outro, formando organismos recombinantes (Cohen *et al.*, 1973). Um importante fato foi a descoberta das enzimas de restrição, que clivam seqüências específicas tanto do DNA alvo (inserto) quanto do DNA vetor (plasmídeo) por hidrólise da ligação fosfodiéster (Meselson, M. and Yuan, R., 1968). Enzimas denominadas “ligases” ligam o inserto no DNA vetor, onde essa nova molécula formada será

introduzida em uma célula bacteriana por uma técnica descrita como transformação, passando a se chamar organismo recombinante, permitindo a obtenção de milhares de cópias de DNA de interesse (Watson et al., 1997).

Os plasmídeos são moléculas circulares de DNA que se replicam autonomamente e possuem genes de resistência a antibióticos, úteis na seleção de células que incorporarão o plasmídeo. Tais plasmídeos podem ser separados em dois grupos distintos: plasmídeos de clonagem, utilizados para propagar o gene clonado, e plasmídeos de expressão que, além de propagar o gene, apresentam região promotora possibilitando a expressão da proteína recombinante.

Assim como a técnica de PCR, o sequenciamento de DNA tem revolucionado a genética molecular, tornando possível uma nova abordagem para o estudo e análise dos genes (Watson *et al.*, 1997). O sequenciamento de DNA também utiliza o mecanismo da síntese de DNA pela DNA polimerase, assim necessita de “primers” (iniciadores), do DNA molde e dos dNTPs e ddNTPs. Os ddNTPs são desoxirribonucleotídeos que não apresentam a hidroxila no carbono 3, dessa forma interrompem o crescimento da cadeia, gerando fragmentos de diferentes tamanhos marcados no último nucleotídeo. Os fragmentos de DNA marcados são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e sua leitura é realizada num seqüenciador automático (Nelson, D.L., and Cox, M.M. 2000).

À medida que mais genes foram sendo clonados e seqüenciados e sua organização estrutural elucidada, maior atenção foi sendo dada às

vias de expressão de tais genes (Watson *et al.*, 1997). O sistema de expressão é regulado em resposta a sinais moleculares, onde a concentração do produto gênico é aumentada ou diminuída por processos conhecidos como indução e repressão, respectivamente. A transcrição é mediada e regulada por interações DNA-proteínas, especialmente as componentes da RNA-polimerase, a qual inicia a transcrição por sítios conhecidos como promotores, encontrados próximos a regiões que iniciam a síntese de RNA a partir do DNA molde.

Os genes de procariontes possuem um mecanismo simples de coordenar a regulação dos seus genes que são agrupados no cromossomo e transcritos juntos com seu promotor denominados de operons. A expressão em procariontes foi primeira definida por estudos do metabolismo de lactose em *E. coli*, a qual usa a lactose como única fonte de carbono (Nelson, D.L., and Cox, M.M. 2000).

Neste trabalho foram utilizadas várias técnicas aplicadas à biologia molecular na clonagem e expressão das enzimas estudadas (Figura 9).

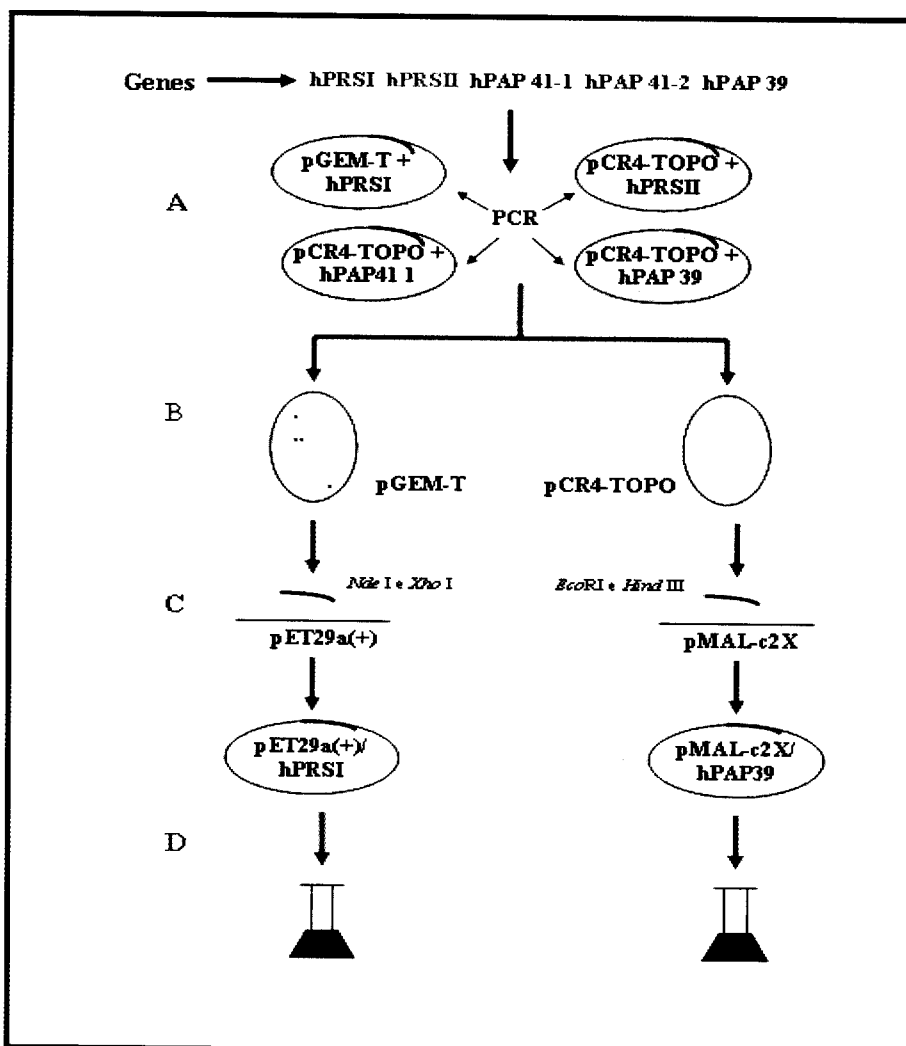


FIG9: Esquema de clonagem e expressão dos genes. A-Amplificação através da técnica de PCR e Clonagem em vetores de propagação dos genes: hPAP39, hPAP 41-1, hPRSI no vetor pC4-TOPO e hPRSI no vetor pGEM-T. B-Transformação em *E.coli* cepa DH5 α dos plasmídeos recombinantes e escolha das colônias transformadas. C-Extração e clivagem com enzimas de restrição específicas do DNA plasmidial e vetores de expressão. D- Ligação dos plasmídeos linearizados: pET29a(+) e pMAL-c2X com os genes hPRSI e hPAP39, respectivamente através da enzima T4 DNA ligase e, transformação em *E.coli* cepas DH5 α e BL21 (DE3), seguido de testes de expressão e solubilidade das proteínas recombinantes.

2.2) Construção de oligonucleotídeos e amplificação das ORFs de hPRSI, hPRSI, hPAP 41-1, hPAP 41-2 e hPAP 39

Atendendo as necessidades de amplificação pelo método da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) tornou-se necessário a síntese de oligonucleotídeos (primers) complementares as regiões terminais dos genes. Nessa etapa também, uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal

humano (Gibco) gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Flávio Henrique Silva do Departamento de Genética e Evolução - UFSCAR - São Carlos, foi submetida a esta amplificação. Os cDNAs que codificam para as proteínas relacionadas nas tabelas 1 e 2 possuem os seguintes números de acessos: hPRSI – X15331 M25042, hPRSII – Y00971, hPAP39 – 002766, hPAP 41 (1 e 2) – 002767 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 1: Oligonucleotídeos 5' sintetizados pela empresa GIBCO BRL com sítios de restrição para endonucleases específicas para a clivagem de cada gene (destacados em azul). As posições marcadas em vermelho são referentes à localização dos oligonucleotídeos nas sequências depositada no banco de dados com seus respectivos números de acesso (www.ncbi.nlm.nih.gov).

OLIGONUCLEOTÍDEOS 5'	
GENES (Nº acesso)	(Seqüência 5'- 3')
hPRSI (X15331M25042)	CTG ACT GAC ATA TGC CGA ATA TCA AAA 67 82
hPRSII (Y00971)	GTG AAT TCA TGC CCA ACA TCG TGC TG 61 78
hPAP 39 (002766)	GTG AAT TCA TGA ACG CCG CTC GCA CCG GCT 50 71
hPAP 41-1 (002767)	TAC CCG GGA TGT TTT GTG TGA CGC CAC CTG 212 233
hPAP 41-2 (002767)	TAC CCG GGA TGA ACA TAA CCA AAG GTG GTC 249 270

Tabela 2: Oligonucleotídeos 3'(GIBCO BRL) sintetizados com sítios de restrição para endonucleases específicas para a clivagem de cada gene (destacados em azul). As posições marcadas em vermelho são referentes à localização dos oligonucleotídeos na sequência depositada no banco de dados com seus respectivos números de acesso (www.ncbi.nlm.nih.gov).

OLIGONUCLEOTÍDEOS 3'	
GENES (Nº acesso)	(Seqüência 5'- 3')
hPRSI (X15331M25042)	CTA GTA GTC GAC TTA TAA AGG GAC ATG GCT 1023 1011
hPRSII (Y00971)	GAC AAG CTT TTA TAG CGG GAC ATG GCT GAA C 1017 1001
hPAP 39 (002766)	GAC AAG CTT CTA GTC ATC CAC AGT GAT GTT TCG 1120 1100
hPAP 41-1 (002767)	GAC AAG CTT TCA GTC ATC TAA GCC TAT GTT TCT 1321 1309
hPAP 41-2 (002767)	GAC AAG CTT TCA GTC ATC TAA GCC TAT GTT TCT 1321 1309

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela GIBCO BRL, e apresentam sítios específicos para a clivagem com enzimas de restrição. Durante a PCR, os dois fragmentos pequenos de DNA complementares às extremidades 3'e 5'do gene de interesse irão hibridizar com esta região e servirão de ponto de ancoragem para a enzima Taq DNA-polimerase, promovendo a amplificação do DNA.

Através da técnica da PCR, obtiveram-se cópias dos genes em estudo já com sítios de digestão para clonagem nos vetores escolhidos, seguindo as condições abaixo:

- 5 µL de tampão de PCR 10X;
- 2,5 µL de MgCl₂ 50mM;
- 1 µL “Primer” (oligo 3’), 100 pmol/ µL;
- 1 µL “Primer” (oligo 5’), 100 pmol/ µL
- 1 µL dNTP 10mM (N= A, G, C, T);
- 5 µL Biblioteca de cDNA humano (10ng);
- 0,5 µL da enzima Taq DNA polimerase 5U/ µL;
- 34 µL de H₂O.

A reação totalizando 50 µL, foi em um termociclador MJ PTC-100TM Programable Thermal Controller e submetida ao seguinte programa:

Tabela 3 – Esquema do ciclo da reação de PCR para amplificação dos genes.

Condições do ciclo da reação						
CICLO	1x	25x			1x	
T °C	95	95	55	72	72	4
TEMPO	3 min	30s	30s	2 min	10 min	infinito

Os produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão TAE 1X (8 mM Tris-acetato, 0,2 mM EDTA pH 8,0). Em seguida, para a purificação do DNA amplificado fez-se um gel preparativo com o Kit InConcert (Invitrogen).

2.3) Clonagem dos genes em vetores de propagação

2.31) Clonagem do gene hPRSI no vetor de clonagem pGEM-T

A clonagem de um gene em vetor pGEM-T acontece devido a presença de resíduos de adenina adicionados pela Taq DNA polimerase às extremidades 3' do gene durante a amplificação por PCR. As adeninas são ligadas a resíduos de timina não pareados existentes no sítio de clonagem do vetor (figura 10). Assim, a clonagem do gene em pGEM-T independe da existência de sítios de restrição no produto de PCR (pGEM-T System Manual. <http://www.promega.com>).

Antecedendo a reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem é necessária a adição de adenina (A) às extremidades do inserto purificado, com a finalidade de aumentar a eficiência de ligação para que o mesmo possa ligar-se ao vetor de clonagem. Para este acréscimo de adenina, seguiu-se o seguinte protocolo (Promega):

- 5 μL do produto de PCR;
- 1 μL tampão PCR Buffer (10X);
- 1 μL MgCl_2 (25 mM);
- 0,4 μL dATP (0,2mM);

- 1 μL de Taq DNA polimerase (5U/ μL);
- 1,6 μL de H_2O .

Esta reação com volume final de 10 μL foi incubada por 15 min a 70°C. Em seguida à adição de adenina, pode ser efetuada a reação de ligação:

- 5 μL (2x Rapid Ligation Buffer-PROMEGA)
- 1 μL vetor pGEM-T (50ng);
- 3 μL do inserto adicionado de (A);
- 1 μL T₄ DNA ligase, (1U/ μL), PROMEGA;

Esta reação ocorreu a 4°C por 12 h.

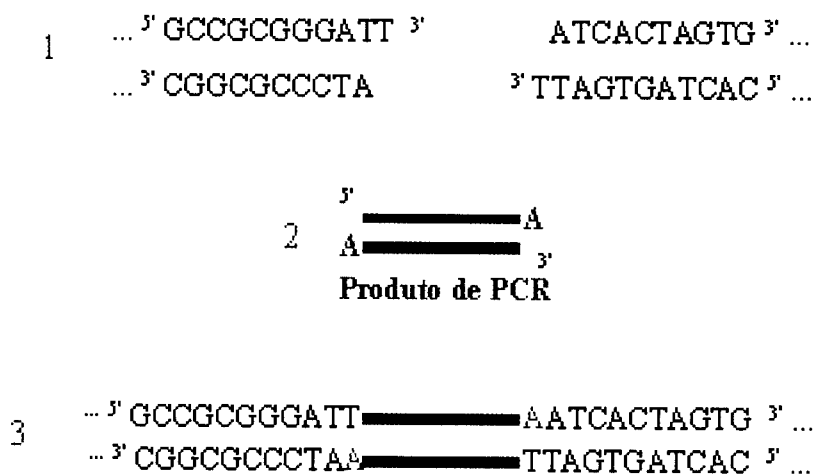


FIG10: Representação esquemática da clonagem do gene hPRSI em vetor pGEM-T. 1. Sequência de bases do vetor com as timinas livres destacadas em vermelho; 2. DNA amplificado do gene hPRSI com Taq DNA polimerase, com adição de adeninas (em verde); 3. DNA recombinante proveniente da junção do vetor com o gene hPRSI, promovida pela ação da enzima T₄ DNA ligase. Os pontinhos representam a continuidade do DNA do vetor.

2.32) Clonagem dos genes hPRSII, hPAP 41-1 e hPAP 39 no vetor de clonagem pCR 4-TOPO.

O vetor pCR4-TOPO (pCR4-TOPO Instruction Manual. www.invitrogen.com) é um vetor linearizado que apresenta uma seqüência de 3 timinas (T) na extremidade 3' e uma topoisomerase covalentemente ligada a uma timina. A topoisomerase I liga-se ao DNA de fita dupla com sítios específicos e cliva o esqueleto fosfodiester depois da seqüência 5' -CCCTT em uma fita. A energia a partir da quebra do esqueleto é conservada pela formação de uma ligação covalente entre o fosfato 3'da fita clivada e um resíduo tirosil (Tyr-274) da topoisomerase. O fosfo-tirosil liga-se entre o DNA e a enzima podendo subseqüentemente ser atacado pelo 5'OH da fita original clivada, invertendo a reação e liberando a topoisomerase. A adição de adenina à extremidade 3'do produto de PCR é realizada com a ajuda da Taq DNA polimerase, permitindo que este produto se ligue com eficiência ao vetor. Portanto, antes da reação de clonagem (Figura 11), torna-se necessário a adição de adeninas (A) às extremidades do inserto para aumentar a eficiência da ligação.

Após adição de adeninas (A), a reação de clonagem procede da seguinte forma:

- 3 μ L do DNA (adicionado de A);
- 1 μ L do vetor pCR4-TOPO (10 ng/ μ L);
- 1 μ L de solução salina.

Esta reação se processa a 22 °C em 30 minutos e não necessita da DNA ligase.

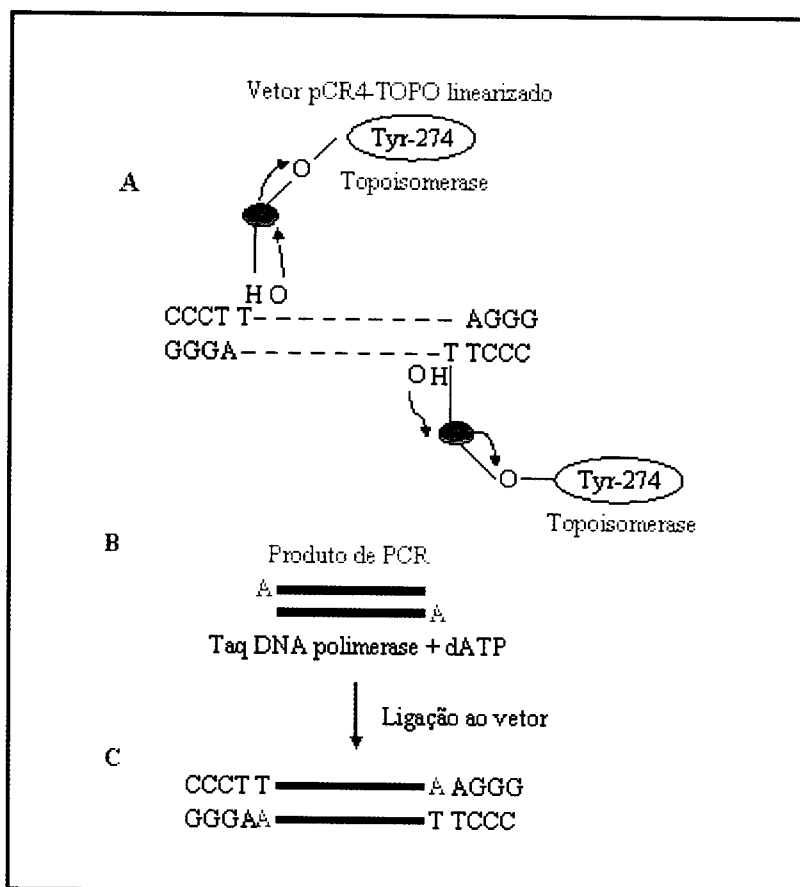


FIG11: Representação esquemática de uma clonagem em vetor pCR4-TOPO. A. Sequência de bases do vetor com uma deoxitimidina (T) na extremidade 3'e uma topoisomerase ligada a ela; B. Fragmento hipotético de DNA amplificado com Taq DNA polimerase e adicionado de desoxiadenosina (A) na extremidade 3'; C. DNA recombinante proveniente da ligação do vetor com o gene de interesse.

2.4) Transformação das ligações inserto – plasmídeo

Seguindo o protocolo descrito em Ausubel *et al.*, 1995, após a ligação dos insertos em seus respectivos vetores foi realizada a transformação de células de *E.coli* com a mistura de ligação.

Em uma primeira abordagem, opta-se pelo uso da célula competente *E.coli* DH5 α , para a propagação e manutenção do plasmídeo. Todo o volume de ligação foi adicionado em 50 μ L de células competentes *E.coli* DH5 α previamente descongeladas e permaneceu em repouso por 30 minutos em gelo. O choque térmico, que

facilita a entrada do DNA exógeno na célula, foi realizado à 42 °C durante 2 minutos. Em seguida, as células competentes ficaram em repouso por 4 minutos em gelo e adicionou-se 270 µL de meio de cultura SOC (2% bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20mM de glicose, pH 6,8) previamente aquecido a 37 °C. A mistura foi incubada a 37 °C por 60 minutos e, posteriormente, plaqueada em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. a mistura de transformação do vetor pGEM-T, ainda foi adicionada à placa 0,5mM de IPTG e 80 µg/mL de Xgal. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

Além da seleção das células transformantes através da resistência ao antibiótico, o vetor de clonagem pGEM-T apresenta diferença na coloração das colônias na placa de cultura. Essa seleção se baseia no fato do vetor pGEM-T possuir um gene que codifica para a proteína β-galactosidase (β-gal). A expressão de β-gal permite à bactéria, através de um sistema denominado α complementação, decompor o bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosídeo (Xgal) colocado no meio de cultura. A decomposição do Xgal torna as colônias azuis. O gene β-gal está posicionado estrategicamente no vetor de modo que quando um inserto é clonado este causa a expressão de uma proteína β-gal inativa. Assim, devido à presença ou ausência de β-gal, podem ser diferenciadas colônias brancas de azuis, respectivamente. As colônias azuis são formadas por bactérias que receberam o plasmídeo selvagem (sem o inserto), enquanto que as brancas apontam a perda da função β-gal indicando que as bactérias podem ter recebido o inserto (Stansfid, 1996).

Após crescimento das colônias recombinantes, escolheram-se 4 colônias brancas. Fez-se inóculos dessas em 5 mL de meio LB, 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C, 250 rpm por 12 horas.

2.5) Extração e Clivagem dos DNAs plasmidiais e dos Vetores de Expressão

Na intenção de expressar o produto gênico, torna-se necessário extrair o DNA recombinante, clivar com enzimas de restrição e introduzir o gene de interesse em vetor de expressão. A princípio, os oligonucleotídeos correspondentes a hPRSII, hPAP39 e hPAP41 (1 e2) foram desenhados com sítios de restrição para endonucleases específicas para clivagem e posterior subclonagem em vetor de expressão pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech), porém este plasmídeo apresentou problemas durante os experimentos, sendo possível apenas a subclonagem de hPAP39 em vetor de expressão pMAL-c2X compatível com a construção dos oligonucleotídeos.

Para o procedimento de extração e purificação dos DNAs plasmidiais, a partir de bactérias *Escherichia coli* DH5α transformadas foi usado o Kit InConcert (Invitrogen).

A eficiência da clonagem e extração do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% marcado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TAE 1X (8 mM Tris-acetato, 0,2 mM EDTA pH 8,0) e, posterior sequenciamento dos plasmídeos. A seguir, o DNA plasmidial hPRSI/pGEM-T e hPAP39/pCR4TOPO foi digerido

com as endonucleases *Nde* I e *Xho* I para a hPRSI e *Eco* RI e *Hind* III para a PAP 39, seguindo o protocolo do Kit da Gibco:

- 10 µL de DNA plasmidial (100ng/ µL);
- 3 µL de tampão React (Gibco);
- 1 µL de cada enzima de restrição (1U/ µL);
- 16 µL de H₂O.

Utilizando o mesmo protocolo, digeriu-se o vetor pET29a(+) (com os mesmos sítios de digestão utilizados na digestão do DNA plasmidial hPRSI/pGEM-T) e o vetor pMAL-c2X (com as endonucleases usadas para a digestão da PAP 39/pCR4TOPO).

As reações de clivagem ocorreram a 37 °C por 15 minutos. Os insertos e vetores digeridos foram purificados em gel de agarose preparativo.

2.6) Subclonagem dos genes hPRSI e hPAP 39 nos vetores de expressão pET29a(+) e pMAL-c2X, respectivamente

Nessa etapa, os genes e seus vetores apresentam extremidades coesivas complementares provenientes do experimento descrito no item 2.5. Dessa forma, os DNAs recombinantes hPRSI/pET29a(+) e hPAP 39/pMAL-c2X foram obtidos a partir da reação de ligação:

- 2 µL 5X T₄ DNA ligase Buffer;
- 1 µL T₄ DNA ligase (1U/ µL);
- 3 µL do vetor de expressão (150ng/µL);
- 4 µL de DNA purificado do gel (100ng/µL).

Essa reação foi processada a 4 °C durante a noite

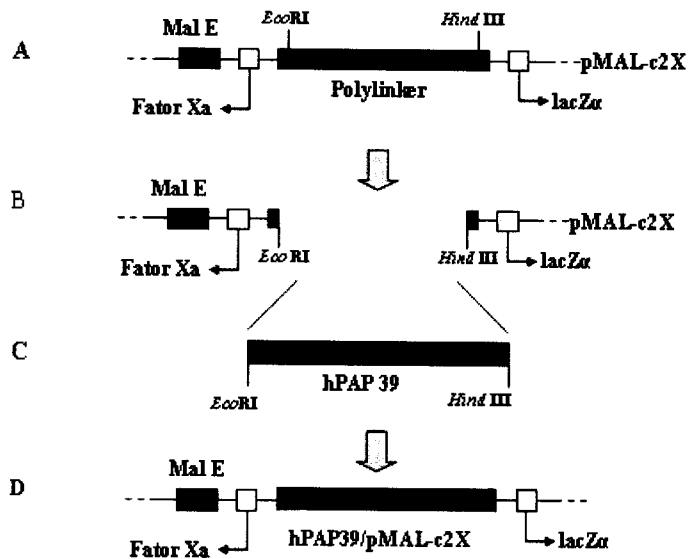


FIG12: Esquema de clonagem do gene hPAP 39 no vetor pMAL-c2X. A- Vetor pMAL-c2X mostrando a região do polylinker com o gene malE, fusionado ao gene lacZ α , que codifica para maltose-binding protein (MBP) e o sítio de clivagem do Fator Xa. B- Vetor linearizado com *Eco* RI e *Hind* III C- Gene hPAP 39 clivado com *Eco* RI e *Hind* III. D- Plasmídeo recombinante pMAL-c2X/hPAP39.

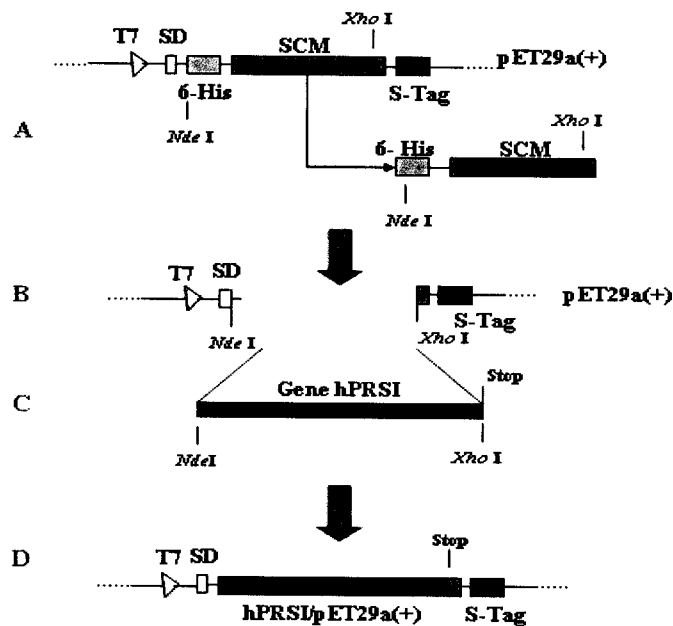


FIG13: Esquema de clonagem do gene hPRSI sintetase no vetor pET29a(+). SD – Sequência Shinedalgarno; T7 – promotor para T7 RNA polimerase; SCM – Sítio de clonagem múltipla; 6-His – Sequência codificante para 6 histidinas; S-Tag – Sequência codificante para um “tag” de aminoácidos no C-terminal de SCM. Stop – códon de terminação de tradução. A – Vetor antes da clivagem. B – Vetor linearizado com *Nde* I e *Xho* I. C - Gene hPRSI clivado com *Nde* I e *Xho* I. D – Plasmídeo recombinante pET29a(+)/hPRSI.

Novamente foi utilizado o protocolo de transformação em células competentes *E.coli* descrito anteriormente (item 2.4), Ausubel et al., 1995). O único diferencial foi o plaqueamento da mistura de transformação, no qual placas que receberam a ligação hPRSI/pET29a(+) continham o antibiótico canamicina (30 µg/mL) e a ligação hPAP 39/ pMAL-c2X, na presença de ampicilina (100 µg/mL), 12h, 37 °C.

O DNA plasmidial foi extraído pelo Kit Concert da Invitrogen e os plasmídeos recombinantes foram submetidos à clivagem com endonucleases de restrição específicas. A análise da clivagem por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TAE 1X (8 mM Tris-acetato, 0,2 mM EDTA pH 8,0) confirmou a presença do inserto nas colônias testadas e o sequenciamento dos genes delimitou a escolha de um clone para testes de expressão das proteínas recombinantes.

Uma nova transformação foi realizada com a cepa de *E. coli* BL21 (DE3). O termo DE3 significa que a linhagem contém o lisógeno λ DE3 que carrega o gene para T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lacUV5*. Mais uma vez, colônias recombinantes foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8%/TAE 1X e confirmaram a presença do inserto para expressão.

Todos os experimentos de seleção de colônias de transformação foram aliquotadas, suplementadas com 20% de glicerol e congeladas a -80 °C para conservação das mesmas.

2.7) Expressão das proteínas recombinantes

Esta parte do capítulo dois aborda a importância do desenvolvimento e utilização dos sistemas de expressão adequados para a produção da proteína de interesse. O ajuste de alguns parâmetros como temperatura, concentração do agente indutor entre outros, é fundamental para o estabelecimento do protocolo que melhor expresse a proteína em sua forma solúvel.

2.71) Expressão da enzima hPRSI no vetor pET29a(+)

Os vetores do sistema pET possuem marcadores seletivos de resistência a antibióticos (canamicina) e uma origem de replicação, um sítio de clonagem múltipla e, diferentes seqüências adjacentes que codificam para uma variedade de peptídeos acessórios que podem ser usados na detecção da proteína alvo.

Os plasmídeos do sistema pET foram desenvolvidos especificamente para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e apresentam alto grau de eficiência. Genes clonados em plasmídeos do sistema pET estão sob o forte controle dos sinais de transcrição do fago T7. Assim, a expressão da proteína de interesse depende da presença da enzima T7 RNA polimerase (pET System Manual 2001. <http://www.novagen.com>)

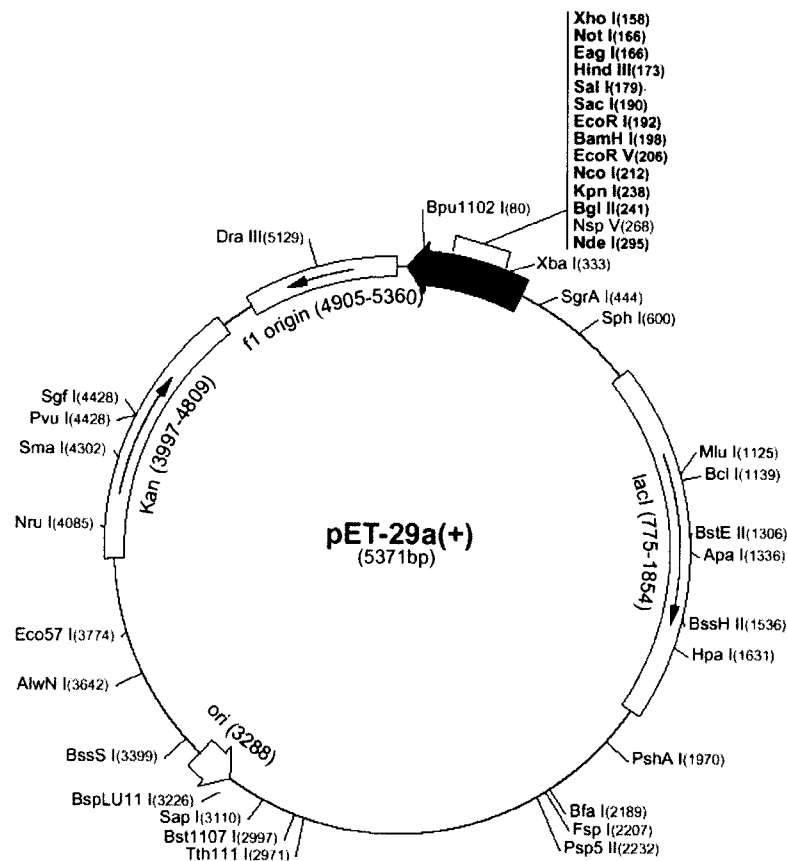


FIG14: Esquema mostrando o vetor pET29a(+) (figura extraída do site www.novagen.com).

Foram realizados experimentos de expressão e solubilidade da hPRSI na cepa de *E.coli* BL21 (DE3), a temperatura de 37 °C, com indução de 7 horas, atingindo uma D.O₆₀₀ próximo a 1.800, utilizando de alíquotas de 1mL de cultura centrifugada por 15 minutos a 13000g e ressuspensa em tampão Tris-EDTA, pH 7.5. Em seguida, foi realizado a lise celular por sonicação (3 ciclos de 10 seg cada) utilizando o aparelho “550 Sonic Dismembrator”(Fisher Scientific) e, após centrifugação, separou-se “pellet” de sobrenadante, analisados em gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE e revelado com 0,010% de Comassie brilliant blue G-250.

2.72) Expressão da enzima hPAP 39 no vetor pMAL-c2X

O vetor pMAL-c2X foi utilizado para melhorar e facilitar os processos de expressão e purificação da proteína de interesse. Ele possui marcador de seleção de resistência a antibiótico (ampicilina), utiliza um forte promotor indutível *tac* e o sinal de iniciação translacional *malE* aumentando o nível de expressão do gene clonado, a expressão da proteína alvo em fusão com a maltose-binding-protein (MBP), facilitando a purificação através de cromatografia de afinidade. O vetor pMAL-c2X também apresenta uma sequência que constitui o sítio de reconhecimento da protease fator Xa, objetivando a separação da proteína de fusão (MBP) da proteína alvo.

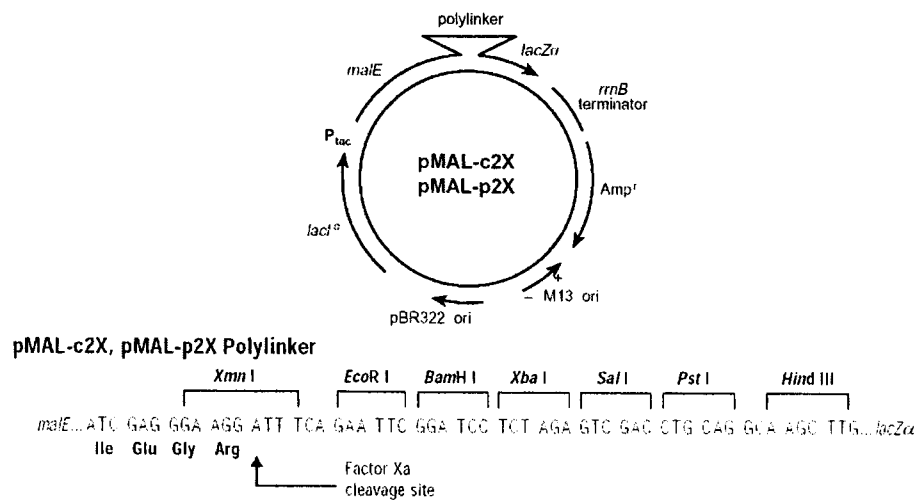


FIG15: Mapa do vetor pMAL-c2X (figura extraída do pMAL Protein Fusion and Purification System).

Experimentos de expressão da hPAP 39 foram feitos em duas cepas de *E.coli* a DH5α e a BL21 (DE3). Fez-se inóculos com 5 mL de

meio LB 100 µg/mL de ampicilina e uma colônia transformante. A cultura foi crescida a 37 °C, 250 rpm e atingida DO₆₀₀ 0,6, foi induzida com IPTG. Fez-se uma bateria de testes variando a concentração de IPTG (sem IPTG, 0,05mM, 0,3mM e 1mM), a temperatura (37 °C e 20 °C) e o tempo (2 e 4 horas). A cultura foi centrifugada a 4000 g por 15 min, a 4 °C e o “pellet” foi ressuspendido em tampão de coluna 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 200mM de NaCl e 1mM de EDTA, segundo Manual – pMA1-c2X. Foram realizados testes de lise celular por congelamento e descongelamento em N₂ líquido e sonicação usando o aparelho “550 Sonic Dismembrator” (Fisher Scientific), em ambas as técnicas foi usado lisozima 1% (massa/volume), 4 °C por 30 minutos. Após a lise celular, foi realizada nova centrifugação a 4000 g por 5 minutos separando a fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (pellet), sendo que o “pellet” foi ressuspendido em tampão de coluna.

A expressão e solubilidade das enzimas foram observadas através de gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10 e 15% pelo método de Laemmli (1970) e revelado com 0,010% de Comassie brilliant blue G-250.

PARTE II – PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

2.8) Métodos cromatográficos

É de fundamental importância para proceder a purificação de proteínas através de sucessivos fracionamentos, propriedades físico-químicas peculiares a cada proteína, tais como: solubilidade, carga

iônica, massa molecular, ponto isoelétrico, de modo que tenhamos um alto rendimento da proteína pura, sem ter que passar por muitos passos de purificação, o que levaria a perdas significativas da amostra (Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2000).

Tipicamente, a estratégia usada para a purificação de proteínas segue três passos: captura, purificação intermediária e polimento. Na fase da captura, como o próprio nome sugere, é importante “capturar” a proteína de interesse e separá-la rapidamente das outras proteínas presentes no extrato lisado, evitando a manifestação de enzimas proteolíticas que degradariam a proteína alvo. Na purificação intermediária, o principal objetivo é separar a proteína de interesse dos contaminantes. E a última fase, denominada polimento, resulta em retirar os últimos traços de contaminantes.

Visando a utilização dessa estratégia, foram desenvolvidas várias técnicas como a precipitação com sulfato de amônio e os métodos cromatográficos: cromatografia de exclusão molecular, troca iônica, fase reversa e afinidade a íons quelantes ou anticorpos.

Neste trabalho, utilizou-se técnica de fracionamento com sulfato de estreptomicina e sulfato de amônio, cromatografia de afinidade a resina de amilose, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular.

2.81) Precipitação com sais

A precipitação com sal, denominada de “salting-out”, refere-se a solubilidade das proteínas que é diminuída em altas concentrações de

sais. A relação de solubilidade com a concentração de sal difere de uma proteína para outra, a adição de sal em altas concentrações pode seletivamente precipitar algumas proteínas enquanto outras permanecem em solução. A precipitação com sal ocorre devido à neutralização das cargas da superfície da amostra pelo sal e pela diminuição da concentração efetiva da água (England, S., and Seifter, S., 1990). O sulfato de amônio é muito usado, pois possui alta solubilidade em água e não interfere no enovelamento da proteína em grande parte das proteínas estudadas.

A enzima hPRSI foi submetida a duas precipitações: uma precipitação com o sobrenadante do extrato bruto a 1% com sulfato de estreptomicina e a outra com sulfato de amônio 20% saturado após diálise do extrato clarificado por centrifugação (Becker *et al.*, 1993).

2.82) Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade baseia-se na característica de que muitas enzimas são capazes de se ligar reversivelmente ao substrato ou produto da reação por ela catalisada. Esse tipo de cromatografia é freqüentemente realizada em coluna composta por um ligante fixado covalentemente a uma matriz, capaz de interagir especificamente com a proteína de interesse. A matriz deve ser quimicamente inerte, com alta porosidade e resistência mecânica.

No experimento de cromatografia por afinidade, ao passar a mistura protéica pelo complexo matriz-ligante ocorre interação entre a proteína alvo e o ligante imobilizado. As demais proteínas são retiradas

da coluna por várias etapas de lavagem. A eluição da proteína de interesse ocorre com a aplicação de um competidor com maior afinidade pelo sítio ativo da proteína ou em maior concentração do que o ligante preso na resina. Alternativamente, pode-se promover alterações nas características da solução presente na coluna e, dessa forma, diminuir a afinidade entre a proteína e o ligante possibilitando a eluição da proteína de interesse (Nelson, D.L., and Cox, M.M. 2000).

Na purificação da enzima hPAP 39, foi utilizada a resina de amilose para a cromatografia de afinidade, pois a proteína foi subclonada em vetor de expressão pMAL-c2X, que expressa a proteína de interesse como uma fusão a MBP.

2.83) Cromatografia de troca iônica

Nesse tipo de cromatografia ocorre a separação de substâncias contendo grupos ionizáveis, como os aminoácidos e tem como base o intercâmbio de íons entre a fase móvel e resinas contendo grupos funcionais do tipo ácido sulfônico (resina aniônica ou trocadora de cátions) ou amônio quaternário (resina catiônica ou trocadora de íons). A afinidade de cada proteína por grupos carregados na coluna é afetada pelo pH, que determina o estado de ionização da molécula e pela concentração de sais ionizáveis livres que competirão com as proteínas pelo solvente (Nelson, D.L., and Cox, M.M. 2000).

A enzima hPRSI foi submetida a cromatografia de troca iônica, usando a coluna POROS 20HQ, resina aniônica. E na purificação da enzima hPAP 39 foram testadas duas colunas de troca iônica, uma

utilizando a coluna MONO Q (resina aniônica), (Amersham Pharmacia Biotech) e a outra usando a coluna SP sepharose (resina catiônica), ambas as colunas da empresa Amersham Pharmacia. As cromatografias de troca iônica foram realizadas num sistema AKTA Explorer10 (Amersham Pharmacia Biotech).

2.84) Cromatografia por exclusão molecular

A cromatografia por exclusão molecular é composta em sua fase estacionária por um polímero com poros de tamanho variado. As moléculas de maior massa molecular não conseguem penetrar nos poros e são arrastadas pela fase móvel, enquanto que moléculas de menor massa molecular, penetram nos poros e são retidas por mais tempo, diminuindo a sua trajetória pela fase estacionária. As diferentes proteínas serão eluídas em diferentes volumes de retenção, de acordo com sua massa molecular.

Ambas as enzimas hPRSI e hPAP 39 foram submetidas a esse tipo de cromatografia, utilizando a coluna SUPEROSE 12 (Amersham Pharmacia Biotech) de 25 mL de volume de coluna , realizada no sistema AKTA Explorer10 (Amersham Pharmacia Biotech).

2.90) Purificação da enzima hPRSI

Estabelecido o protocolo de expressão e lise celular das proteínas, a próxima etapa, foi a purificação das enzimas em estudo.

Para a purificação da hPRSI seguiu-se o seguinte protocolo: Após a expressão da hPRSI incubada a 37 °C, 250 rpm durante 12 horas, as células (precipitados provenientes de 1 litro de cultura) foram separadas do meio através de centrifugação a 8.000g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuscitado em 30mL de tampão A (50mM fosfato de potássio, pH 7,5; 5mM de MgCl₂; 1mM EDTA; 0,3mM de ATP e 1mM de DTT), novamente se procedeu uma nova centrifugação sob as mesmas condições a fim de promover a lavagem das células. O “pellet” foi ressuscitado em 100mL do mesmo tampão A e submetido à lise celular com adição de lisozima 1% (massa/volume) e 1 µL/mL de Benzonase (DNase/RNase – 139U/ µL), através do método de sonicação (6 vezes de 30 segundos com intervalo de 1 minuto). Após a centrifugação, o sobrenadante do lisado foi precipitado com 1% de sulfato de estreptomicina em gelo, sob agitação por 5 minutos. Seguiu-se uma nova centrifugação a 24.000g por 30 minutos a 4 °C , no qual o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuscitado em 10mL no tampão A e submetido à diálise com 3 trocas de tampão de no mínimo 2 horas, para a retirada do excesso de sal. Após a diálise, o sobrenadante foi separado por centrifugação a 24.000g por 20 minutos e precipitado com uma solução de sulfato de amônio 20% em gelo sob agitação por 30 minutos, seguida de uma centrifugação por 30 minutos a 30.000g. Separado o sobrenadante (que foi descartado) e o “pellet”, este foi ressuscitado em 5mL do mesmo tampão usado anteriormente e nova diálise foi realizada com duas trocas de tampão B (5mM fosfato de potássio, pH 7,5; 1mM MgCl₂; 0,1mM

ATP e 1mM DTT) e duas trocas com o tampão C (5mM fosfato de sódio, pH 7,5; 1mM MgCl₂; 0,1mM ATP e 1mM DTT). Depois do procedimento de purificação através da precipitação com sais, a amostra foi concentrada até 1mL em um sistema de ultra-filtração (centriprep 10) e submetida à cromatografia de troca iônica em uma coluna POROS 20HQ (troca aniônica) em tampão C com gradiente de 1M de NaCl. Após a eluição das frações, a amostra novamente passou pelo procedimento de diálise e foi concentrada até 8 mg/mL (Bradford, 1976), a fim de ser caracterizada e submetida a ensaios de cristalização.

Durante todo o processo de purificação foram recolhidas amostras para serem analisadas em gel 15% SDS-PAGE .

Na figura 16 é apresentado um fluxograma com o protocolo de purificação da enzima hPRSI.

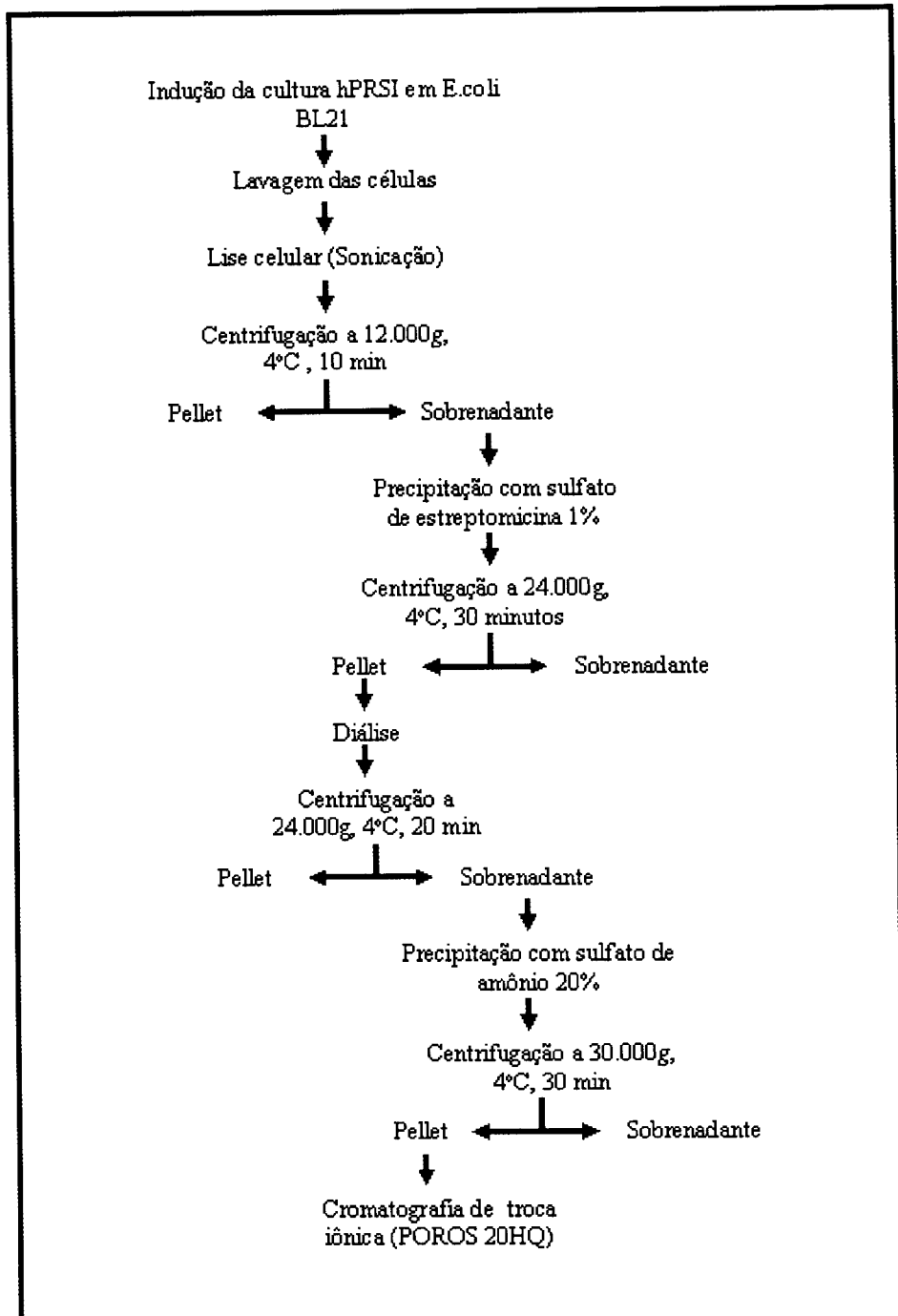


FIG16: Fluxograma de purificação da enzima hPRSI: A enzima hPRSI foi submetida à duas precipitações com sais diferentes, acompanhada de sucessivas centrifugações e duas diálises e para eliminar quaisquer traços de contaminantes foi aplicada a técnica de cromatografia de troca iônica.

2.91) Purificação da proteína hPAP 39

Para a expressão da enzima hPAP 39 foram feitos 300 mL de cultura (meio LB + ampicilina 100 μ g/mL + 0,2% de glicose) que depois

de atingida a DO_{600} de 0,6 foi induzida com IPTG 0,05mM por um período de 4 horas a temperatura de 37 °C, sob agitação de 250 rpm. As células foram centrifugadas por 4000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido em 15 mL em tampão de coluna (20mM Tris-HCl pH 7,4, 200mM de NaCl, 1mM de EDTA) e adição de lisozima 1% (massa/volume) e submetido à lise celular por congelamento e descongelamento em N_2 líquido (procedimento repetido por 5 vezes), seguida de sonicação (2X de 30 segundos). O lisado foi centrifugado a 9000g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi diluído no mesmo tampão de coluna (1:5) e foi aplicado na coluna de amilose, previamente equilibrada com 50 mL de tampão de coluna (o mesmo utilizado para lisar e ressuspender as células). Após a aplicação da amostra, eluiu-se a proteína de fusão PAP39-MBP com 30 mL de tampão de coluna com 0,1mM de maltose e, em seguida ocorreu a clivagem da fusão PAP39-MBP com o Fator-Xa. Foram realizados testes cromatográficos para purificação da clivagem PAP39-MBP, obtendo melhor resultado em cromatografia de troca iônica em coluna SP Sepharose. Em todo o processo de purificação da enzima hPAP 39 foram recolhidas alíquotas de amostra para o monitoramento em SDS-PAGE 10 e 15%.

A figura 17 representa o procedimento para a purificação da enzima hPAP 39.

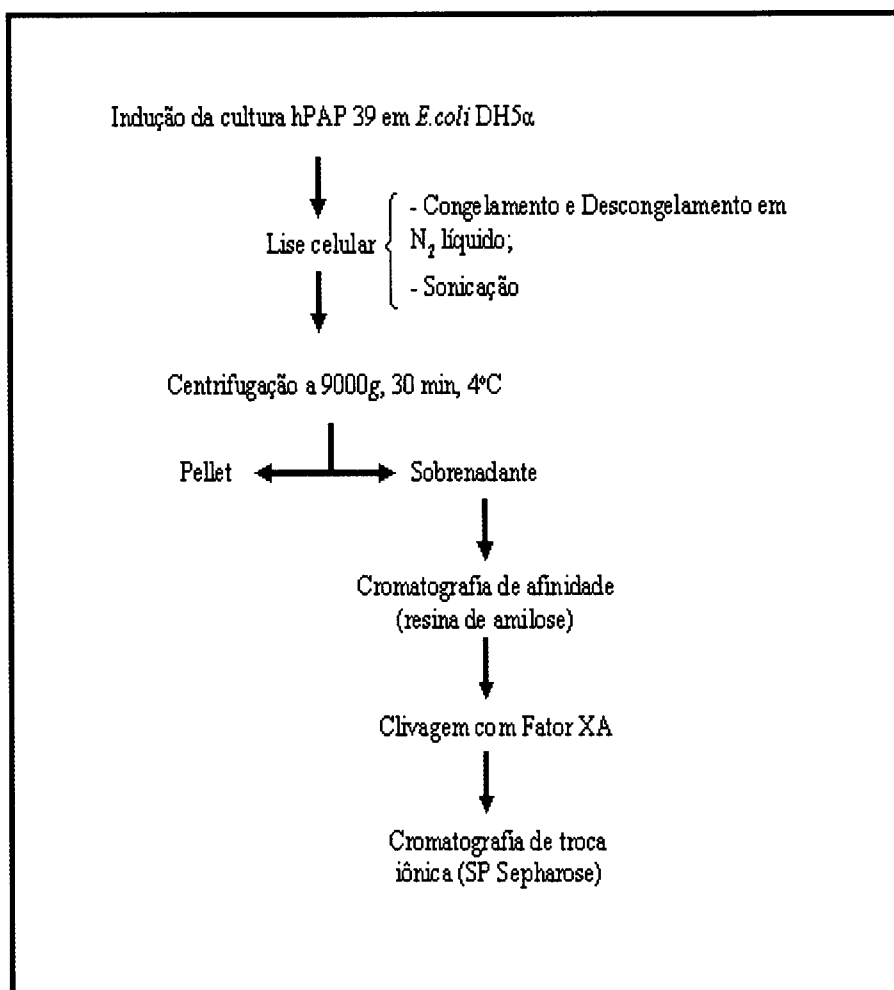


FIG17: Fluxograma representativo da purificação da enzima hPAP 39. Após lise celular, o sobrenadante foi submetido à cromatografia por afinidade em resina de amilose e, ainda após clivagem com fator XA, foi realizado outro procedimento de cromatografia em coluna de troca iônica (SP Sepharose)

2.92) Clivagem da fusão hPAP39-MBP com o Fator Xa

Após purificação em coluna de amilose, a amostra contendo a proteína de fusão PAP39-MBP foi submetida aos experimentos de clivagem com Factor-Xa.

A concentração da amostra foi verificada em 2,5 mg/mL e o experimento foi realizado segundo o manual do vetor pMA1 que sugere que seja usado a relação 1:100 em massa (1 Fator-XA : 100 da proteína de fusão).

A clivagem foi acompanhada em intervalos de tempo através de SDS –PAGE a 15%.

PARTE III – CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Nesse item do capítulo dois são descritas as metodologias utilizadas na caracterização das enzimas hPRSI e hPAP 39.

2.10) Focalização Isoelétrica

A focalização isoeletrica é uma técnica de alta resolução que separa proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos. Proteínas são moléculas anfóteras, apresentam redes de cargas negativas, positivas ou nulas dependendo da sua composição de aminoácidos, do enovelamento e do pH do meio em que estão. A rede de cargas de uma proteína é a soma de todas as cargas positivas e negativas das suas cadeias laterais e dos resíduos amino e carboxi-terminal. O ponto isoeletrico é um pH específico no qual a soma da rede de cargas da proteína é nula. Proteínas são negativamente carregadas em valores de pH acima do seu pI e positivamente carregadas abaixo dele (Protein Electrophoresis Technical Manual, Amersham Pharmacia Biotech).

Nesta técnica, um gradiente de pH é estabelecido ao longo de um gel à base de uma mistura de compostos orgânicos de baixa massa molecular denominados anfólitos, que têm a propriedade de agir como ácidos (doadores de prótons) ou bases (aceptores de prótons). Quando uma mistura de proteínas é aplicada ao gel e sujeita a um campo elétrico, ela pode inicialmente mover-se através do gel em direção ao

eletrodo com carga oposta. A proteína irá migrar até o ponto onde o valor de pH for igual ao seu pI (Protein Electrophoresis Technical Manual).

Para este experimento utilizou-se o sistema “Phast System” (Pharmacia LKB Biotechnology), que utiliza um “Phast Gel IEF 3-9”, o qual permite a determinação do pI situado no intervalo de pH 3 a 9. Para a determinação do pI da proteína hPRSI foi aplicado 5 mg/mL, em 5mM fosfato de sódio, pH 7,5; 1mM MgCl₂; 0,1mM ATP e 1mM DTT. A determinação do pI foi realizada sob condições padrão do equipamento e a coloração foi realizada por “Comassie Blue” G-50 0,1% em solução aquosa de metanol 25% e ácido acético 5%. Os padrões de pI utilizados que constituem o Kit geral de calibração (Amersham Pharmacia Biotech) estão descritos na tabela 4.

Tabela4: Padrões de pI constituintes do Kit geral de calibração

Padrões de pI	pI
Tripsinogênio	9,30
Banda básica de lectina	8,65
Banda média de lectina	8,15
Banda ácida de lectina	8,15
Mioglobina básica	7,35
Mioglobina ácida	6,85
Anidrase carbônica humana	6,55
Anidrase carbônica bovina	5,85
β Lactoglobulina A	5,20
Inibidor de tripsina de soja	4,55

2.11) Sequenciamento do N-terminal da proteína

O método químico empregado no sequenciamento de proteínas é baseado na degradação de Edman. Por este método, a cada ciclo o N-terminal da proteína é modificado com fenilisotiocianato que reage com o radical amino terminal não carregado do peptídeo, formando um derivado feniltiocarbamilado (PTC-N-terminal). O resíduo PTC-N-terminal em condições levemente ácidas é clivado formando um aminoácido anilintiazolino (ATZ) derivado do resíduo N-terminal original e uma proteína cujo penúltimo resíduo agora leva o N-terminal. O aminoácido ATZ por ser instável é convertido no aminoácido feniltiohidantoina (PTH). Este aminoácido amino-terminal (PTH) é separado cromatograficamente e identificado contra padrões. A cadeia polipeptídica menos o aminoácido amino-terminal é isolada e a reação de Edman é repetida para identificar o próximo amino-terminal (Matsudaira, P., 1990).

Neste trabalho foi realizado o sequenciamento da região N-terminal da enzima hPRSI.

A amostra utilizada para o sequenciamento foi obtida através da transferência da banda do gel SDS-PAGE 15% para uma membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride – Bio-Rad) utilizando um tampão de transferência (Tris-base 48 mM, CAPS 39 mM e SDS 0,035% (m/v), 800 mL de H₂O e 200 mL de metanol) por um período de 5 h a 150V. A membrana foi corada com corante Ponceau a 0,5% em ácido acético 0,1% por 5 min e descorada com ácido acético 1%. Após a secagem da membrana, a banda da proteína foi recortada e enviada para análise da

seqüência de aminoácidos NH₂-terminal em colaboração com a Prof^a. Dra. Heloísa S. Selistre de Araújo, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

2.12) Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O fenômeno de espalhamento de luz é interessante no processo de investigação da massa molecular e da homogeneidade das macromoléculas (Santos, C.N and Castanho, A.R.B.M., 1996).

A fim de caracterizar a proteína hPRSI, foi realizado o experimento de espalhamento dinâmico de luz, objetivando estimar a massa molecular da proteína e verificar o comportamento da amostra em solução. Depois de purificada pela cromatografia de troca iônica, a amostra foi concentrada em centriprep (10) até 8 mg/mL. Utilizaram-se 30µL da amostra em tampão 5mM fosfato de sódio, pH 7,5; 1mM MgCl₂, 0,1mM ATP e 1mM DTT, que foi centrifugada por 15 minutos a 10.000g. O equipamento utilizado “Protein Solutions DynaPro” realiza várias medidas e faz uma seleção das melhores medidas, que são representadas em forma de histograma, fornecendo o raio hidrodinâmico (R_H) da partícula estimando-se a massa molecular da proteína e seu grau de homogeneidade. Este experimento foi acompanhado pela Dra. Raquel Kelly Bortoleto Bugs do Instituto de Física da Universidade de São Carlos.

2.13) Medidas de Dicroísmo Circular (CD)

A espectrometria de CD baseia-se no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos assimétricos (quirais). Em proteínas, estes grupos assimétricos envolvem principalmente as ligações peptídicas, as cadeias laterais dos aminoácidos e grupos prostéticos (Nakanish et al., 1994).

Um feixe de luz circularmente polarizado consiste de dois feixes de onda plana, linearmente polarizados, ortogonais entre si e fora de fase por 90°. A onda linearmente polarizada pode ser decomposta em duas componentes individuais circularmente polarizadas: uma à esquerda e a outra à direita. Quando a luz incide em um composto assimétrico, esta é absorvida e cada um dos componentes interage de forma distinta em relação a absorvidade específica dos diferentes compostos. Dessa maneira pode-se então definir o CD como a propriedade que consiste na interação distinta para a luz circularmente polarizada a direita e para a luz circularmente à esquerda emitida com igual intensidade, e o sinal de CD como sendo a diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita (Bugs, R.K.B., 2001).

O espectro de CD é a contribuição linear de todas as frações de estrutura secundária que constituem uma dada proteína. Sendo assim, pela análise e desconvolução de um espectro de CD é possível estimar a composição de estruturas secundárias (Venyaminov *et al.*, 1994).

O espectro de CD é dividido em duas regiões: região de UV próximo e na região de UV distante. Na região de UV próximo que compreende o intervalo para o comprimento de onda entre 250 a 300 nm, verifica-se a contribuição dos aminoácidos aromáticos e também de

pontes dissulfeto. Já na região de UV distante que compreende o intervalo de 190 a 250 nm é dominada pela transição eletrônica da ligação amida das cadeias peptídicas da proteína, permitindo estimar a composição da estrutura secundária e acompanhar as possíveis mudanças na estrutura que possam ocorrer durante o experimento.

No presente trabalho, realizou-se um experimento com a enzima hPRSI sintetase na concentração de 0,2 mg/mL. As medidas de CD foram realizadas no espectropolarímetro Jacso J-720, variando-se o comprimento de onda de 195-250 nm, a temperatura de 22 °C, com uma média de 16 medidas consecutivas usando uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico em tampão 5mM fosfato de sódio, pH 7,5; 1mM MgCl₂, 0,1mM ATP e 1mM DTT.

A análise dos espectros de CD foi realizada através do programa *Self Consistent* “SELCON-2” (Seerama *et al.*, 2000), usando um banco de dados de 33 proteínas diferentes usadas para desconvolução da contribuição espectral de cada estrutura secundária.

Na desconvolução, utiliza-se um método matemático chamado análise de “cluster” (Venyaminov *et al.*, 1994), onde o espectro de CD é incluído em uma matriz com dados espectrais de CD e é selecionada inicialmente uma estrutura de uma proteína referencial ao acaso. A solução inicial é substituída por outra e o processo é repetido até que a autoconsistência seja alcançada (Sreerama *et al.*, 2000).

Este experimento foi realizado no Departamento de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, em colaboração com a Prof^a. Dra. Leila Maria Beltramini.

2.14) Ensaios de Cristalização

A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína por difração de raios X exerce um papel importante no estudo de sistemas biológicos.

A estratégia utilizada para induzir a cristalização de macromoléculas constitui em conduzir lentamente o sistema a um estado de supersaturação. Este é um ambiente favorável que maximiza as interações e diminui a repulsão entre as moléculas em solução. Dessa forma, as moléculas podem se arranjar de maneira ordenada e periódica dando origem a um cristal.

Existem vários métodos utilizados para a obtenção do cristal de proteína, dentre eles o método de Difusão de Vapor, baseado no processo de equilíbrio entre duas soluções, através da passagem das espécies voláteis da solução menos concentrada para a mais concentrada (Blundell, 1976).

Neste método, a técnica mais utilizada é a Gota Suspensa (Branden, 1991), no qual a gota da solução de proteína mais o agente precipitante e aditivos é colocada sobre uma lamínula de vidro siliconizada e, posteriormente fixada em um reservatório hermeticamente fechado, contendo a solução de cristalização em maior volume e mais concentrada. Os cristais tendem a se formar à medida que a concentração da proteína e do agente precipitante aumenta lentamente na gota e os solventes voláteis passam dessa para a solução do poço (figura18).

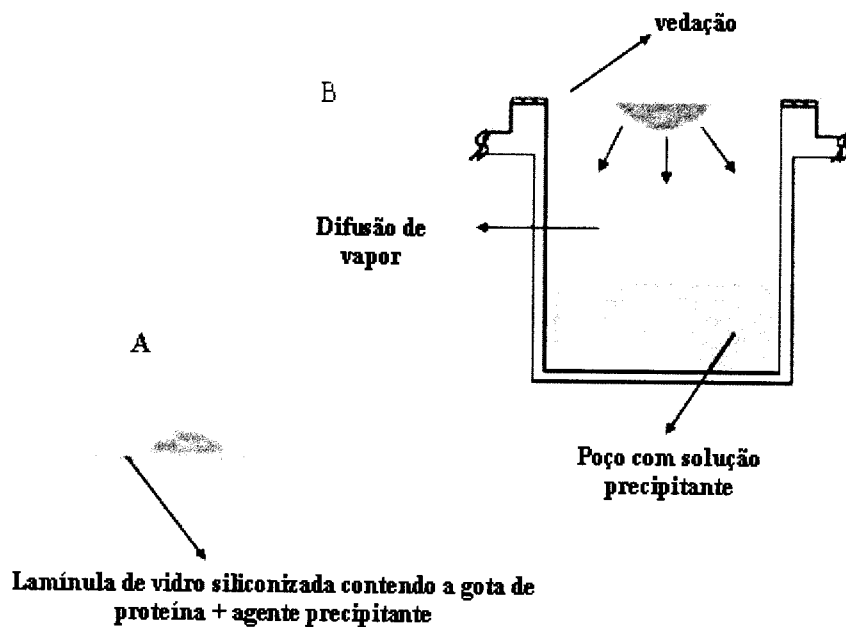


FIG18: Esquema de cristalização usando o método da gota suspensa. A. Lamínula de vidro siliconizada. B. Modelo de um poço de cristalização.

A enzima hPRSI foi submetida aos ensaios de cristalização após a obtenção da proteína purificada e concentrada à 8mg/mL. Foi adicionado 500 μL de cada solução precipitante em cada poço. Em uma lamínula siliconizada fez-se uma gota contendo 3 μL de solução precipitante (solução do poço) mais 3 μL da solução de proteína. Os experimentos de cristalização foram realizados em caixas de cristalização contendo cada uma, 24 câmaras de troca de vapor e realizados em ambientes isolados com temperaturas constantes de 4 °C e 18 °C.

Para a realização deste experimento foram utilizados como agentes precipitantes os fatoriais: Crystal Screen Reagent Formulation I, Crystal Screen MDP, Crystal Screen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ e Crystal Screen PEG 6000 (Hampton Research).

2.15) Immunoblotting

Imunoblotting é a técnica usada para identificar antígenos macromoleculares que reagem com um anticorpo específico. As proteínas são primeiramente separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Os sítios de ligação da membrana que não reagiram são bloqueados para suprimir adsorção não específica de anticorpos. As proteínas imobilizadas reagem com o anticorpo específico. Em seguida, o complexo Ag-Ac (antígeno-anticorpo) reage com um segundo anticorpo (anti-Ig-G de camundongo) que está marcado com fosfatase alcalina que será visualizada após o uso de solução reveladora (Sambrook and Russel, 2001).

A proteína hPAP 39 foi submetida ao experimento de caracterização através de Imunoblotting após clivagem da fusão hPAP39-MBP. A amostra foi aplicada em SDS-PAGE a 15% e, este foi transferido para uma membrana de nitrocelulose corada com Ponceau 0,5% e a banda da proteína correspondente à MBP foi marcada na membrana. A membrana ficou em contato com uma solução de leite em pó desnatado dissolvido em TBS por 12 horas para o bloqueio de sítios inespecíficos e depois foi lavada em TBS para a retirada do leite e incubada com o primeiro anticorpo (anticorpo monoclonal anti-MBP)

por 2 horas. Lavou-se a membrana com TBS e, então ocorreu o contato com o segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo) marcado com fosfatase alcalina por mais 2 horas. Foi realizada nova lavagem com TBS. A seguir, a membrana foi revelada com uma solução contendo NTB (nitroblue de tetrazólio) e BCIP (5-Bromocloroindolil-fosfato) por 10 minutos e lavada com água para interromper a reação.

Os reagentes utilizados nesse experimento foram:

1. Tampão de transferência: Tris-base 48 mM

Glicina 39 mM

SDS 0,035% (m/v)

800 mL de água destilada e 200 mL
de metanol

2. TBS (Tris buffered saline): NaCl 1,5 M

Tris/HCl 0,5 M

1000 mL de água destilada (10
vezes concentrado)

Acertar pH para 8,0.

3. Tampão AP (alkaline phosphate): Tris/HCl 100 mM

NaCl 100 mM

MgCl₂ 5 mM

Água destilada 250 mL

Acertar o pH para 9,5.

4. Solução Reveladora: 1 comprimido do reagente Sigma Fast
BCIP/NBT (Sigma) contendo NBT (nitroblue de tetrazólio) e

BCIP (5-Bromo-4 cloro-3 indolil-fosfato) dissolvido em 10 mL de tampão AP.

5. Solução de Bloqueio: 2,5 g de leite mólico desnatado em 50 mL de TBS [1X].

6. Corante Ponceau: 0,5% de Ponceau em ácido acético 0,1%.

7. Solução descorante: ácido acético a 1%.

2.16) Referências Bibliográficas

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. **Short protocols in molecular biology**. 2.ed. New York, Wiley, 1995.

BECKER, M.A.; NOSAL, J.M.; SWITZER, R.L. Overexpression, Purification, and Characterization of recombinant Human 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate Synthetase Isozymes I and II. **The Journal of Biological Chemistry**. v.268, p.10168-10175, 1993.

BLUNDELL, T.L.; JOHNSON, L.N. **Protein crystallography**. London, Academic Press. 66p, 1976.

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.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. New York, Garland. 565p, 1991.

BUGS, R.K.B. Transformações Estruturais e Função de Fosfolipase. Tese de Doutorado, Departamento de Física, IBRCE, UNESP, Brasil, 2001.

COHEN, S.; CHANG, A.; BOYER, H. and HELLING, R. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 70, p. 3240-3244, 1973.

ENGLAND, S., and SEIFTER, S. Methods in Enzymology, Precipitation Techniques. **Academic Press**. V.182, Inc. 285-296.

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

MATSUDAIRA, P. Limited N-terminal Sequence Analysis. Methods in Enzymology. **Academic Press**. v.182, Inc. 602-626, 1990.

MESELSON, M. and Yuan, R. DNA restriction enzyme from E.coli. **Nature**. v. 217. p. 1110-1114, 1968.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chains reaction. **Sci. Am**. v. 262. p. 56-65, 1990.

NAKANISH, K.; BEROVA, N.; and WOODY, R.W. Circular Dichroism-Principles and Applications. Nova Iorque, V.CH Publishers, INC 1994.

NELSON, D.L. and COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3. edição. New York 2000.

Protein Electrophoresis Technical Manual (Amersham Pharmacia Biotech).

SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3 ed. New York. v.3, 2000.

SANTOS, C.N., and CASTANHO, A.R.B.M. Teaching Light Scattering Spectroscopy: the dimension and shape of Tobacco Mosaic Virus. **Biophysical Journal**. v. 71, p. 1641-1646, 1996.

SREERAMA, N. and WOODY, R.W. Estimation of protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Anal. Biochem**. v. 287, p. 252-260, 2000.

STANFID, W.D. **Molecular and cell biology**. New York, McGraw Hill, 1996.

VENYAMINOV, S.Y. and VASSILENKO, K.S. Determination of tertiary structure class from Circular Dichroism Spectra. **Anal. Biochem**. v.222, p. 176-184, 1994.

WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J. and ZOLLER, M. **O DNA Recombinante**. 2 edição. Ouro Preto (MG) 1997.

ENZIMA hPRSI

Neste capítulo serão descritos os resultados dos experimentos de amplificação, clonagem, expressão, purificação e caracterização da proteína hPRSI sintetase.

3.1) Amplificação e clonagem do gene hPRSI em vetor pGEM-T

Na amplificação do gene hPRSI foi utilizada a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) através de oligonucleotídeos sintetizados contendo sítios para clivagem das enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I, para posterior clonagem em vetor de expressão pET29a(+). A reação de PCR foi realizada variando-se as quantidades de MgCl₂ (μL) e hDNA (μL), possibilitando a escolha da melhor amplificação do fragmento do gene hPRSI (figura 19).

Após ter sido concluída a reação de PCR, 5 μL da reação foram analisados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) em tampão TAE 1X (8 mM Tris-acetato, 0,2 mM EDTA pH 8,0).

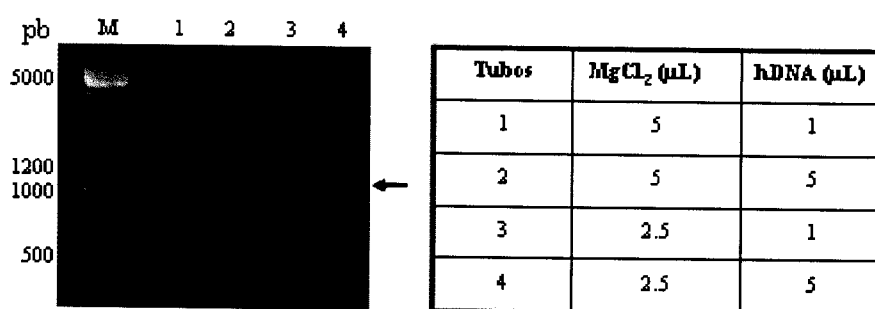


FIG19: Resultado de amplificação do gene hPRSI. Análise realizada em gel de agarose 0,8% TAE (1X). M: marcador de massa molecular 1Kb. As demais amostras (1, 2, 3 e 4) representam as amplificações, variando-se as condições de reação, como demonstrado na tabela ao lado. A seta indica a amplificação do gene hPRSI próximo a 956 pb.

Após a análise do gel foi escolhida a amostra 4 para dar continuidade aos experimentos com o fragmento amplificado do gene hPRSI.

Em seguida, o fragmento do gene hPRSI amplificado foi purificado (Kit Concert – Invitrogen) para clonagem no vetor pGEM-T. Para clonagem em vetor pGEM-T foi necessário o acréscimo de adenina pela Taq DNA polimerase às extremidades do gene durante a amplificação por PCR.

O plasmídeo recombinante pGEM-T/hPRSI foi inserido em bactérias competentes *Escherichia coli* cepa DH5α e plaqueadas em meio LB sólido contendo IPTG (0,5 mM), X-Gal (80 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL). Após crescimento, quatro colônias brancas foram escolhidas e submetidas à lise alcalina e, em seguida, à digestão com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I para confirmação da presença do inserto (figura 20).

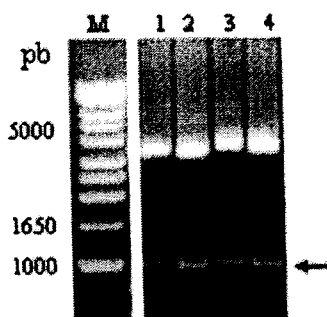


FIG20: Resultado de clivagem da ligação pGEM-T/hPRSI. Análise realizada em gel de agarose 0,8% TAE (1X). M: marcador de massa molecular 1Kb. As colunas 1, 2, 3 e 4 representam as 4 colônias recombinantes digeridas com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I. A seta indica o fragmento da hPRSI.

Aleatoriamente foi escolhido o fragmento recombinante da colônia 2 para subclonagem em vetor de expressão pET29a(+).

3.2) Subclonagem de hPRSI sintetase em vetor de expressão pET29a(+)

O fragmento da colônia recombinante 2 foi purificado para subclonagem em vetor de expressão pET 29a(+). A próxima etapa foi linearizar o vetor com as mesmas enzimas de restrição.

Dessa forma, o DNA recombinante hPRSI/pET29a(+) pode ser obtido a partir da reação de ligação cuja condições experimentais foram 23°C por 12 horas. Em seguida, a mistura de ligação contendo o DNA recombinante hPRSI/pET29a(+) foi utilizada para a transformação em bactérias competentes *E.coli* BL21(DE3).

As bactérias transformadas foram selecionadas após plaqueamento em meio de cultura LB contendo o antibiótico canamicina a 30 µg/mL por 12 horas a 37°C. O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina das células e submetido ao sequenciamento para confirmar a presença do inserto.

3.3) Sequenciamento do gene hPRSI

O sequenciamento do gene hPRSI em vetor pET29a(+) foi realizado pelo método de Sanger no equipamento ABI-Prism 377 (Perkin Elmer) pela especialista do laboratório Susana A. Sculaccio. Foram utilizados para o sequenciamento os “primers” 5’ (T7) promotor e o 3’ (T7 Terminator) e, após obtenção das seqüências, o alinhamento foi feito

no programa Seqman (DNASar) (Lasergene Sequence Analysis Software – DNASar, 2001).

Uma seqüência consenso foi obtida a partir das seqüências alinhadas (figura 21). Esta estratégia permitiu a leitura de cada posição por pelo menos duas reações de sequenciamento independentes, aumentando a confiabilidade da seqüência consenso obtida.

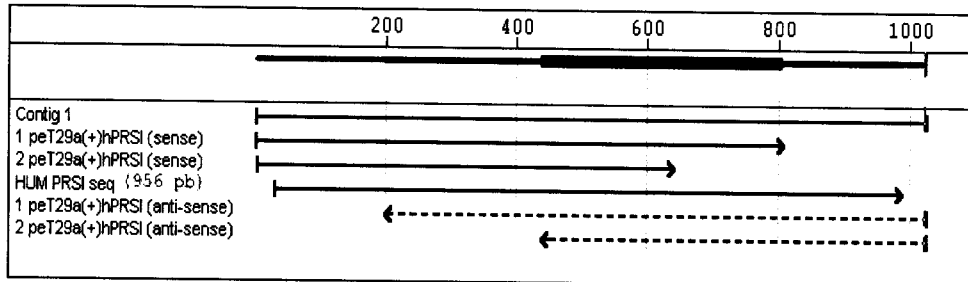


FIG21: Estratégia de alinhamento das extremidades 5'e 3' do gene hPRSI no vetor pET 29 a(+) produzido pelo programa SeqMan. Os alinhamentos indicados pelas setas (sentido esquerda para direita) representa o alinhamento da extremidade 5'e os alinhamentos indicados pelas setas (sentido direita para esquerda) representa o alinhamento da extremidade 3'.

3.4) Teste de Expressão da enzima hPRSI em vetor pET29a(+)

Após transformação da cepa *E. coli* BL21 (DE3) contendo o DNA plasmidial (hPSRI/pET29a(+)) foi realizado um teste de expressão tendo como variante a concentração de IPTG (0 e 5mM) a temperatura de 37 °C, com tempo de indução de 7 horas, atingindo a D.O.₆₀₀ próximo a 1.8.

Uma alíquota de 1 mL de cultura foi centrifugada por 15 minutos a 13000g e ressuspendida em tampão TE (Tris-EDTA, pH 7.5). Após 3 ciclos de sonicação por 10 segundos cada, o extrato bruto pode ser avaliado através de SDS-PAGE 15%, no qual observou-se que não havia variação na expressão da enzima hPRSI na presença (5mM) ou ausência de IPTG (figura 22).

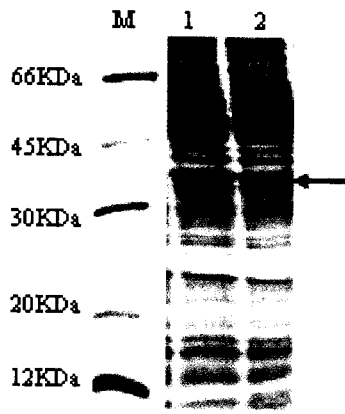


FIG22: Resultado do teste de expressão da enzima hPRSI sintetase. M: padrão de massa molecular em kDa. Coluna 1: representa a expressão da enzima hPRSI sem o indutor IPTG. Coluna 2: representa a expressão da enzima hPRSI com 5 mM de IPTG.

Foram realizados novos testes com a enzima hPRSI sintetase expressa sem o indutor IPTG para analisar a solubilidade da proteína. Após obtenção do extrato bruto lisado por 3 ciclos de sonicação (10 seg cada), a cultura foi centrifugada a 13000g por 30 minutos para separação do “pellet” e sobrenadante, analisados em SDS-PAGE 15% (figura23). Pode ser observado que a maior porção da proteína hPRSI é solúvel, apesar de ocorrer perda para o “pellet”. O próximo passo foi expressar a proteína em larga escala para sua purificação.

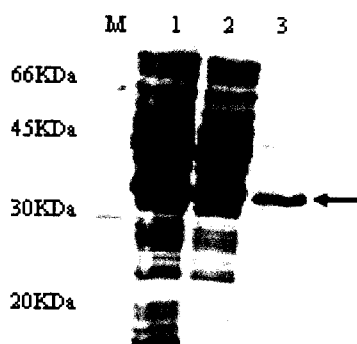


FIG23: Resultado do teste de solubilidade da enzima hPRSI sintetase. M: representa o padrão de massa molecular em kDa. Coluna 1: extrato bruto lisado. Coluna 2: sobrenadante do lisado. Coluna 3: pellet do lisado. A seta representa a migração da proteína hPRSI sintetase.

3.5) Purificação da enzima hPRSI sintetase

A purificação da proteína em larga escala foi feita a partir de 1L de meio de cultura que foi expressa a 37°C, 250 rpm por 12 horas. Após crescimento, a cultura foi centrifugada e o “pellet” ressuscitado em 100 mL de tampão A (50mM fosfato de potássio, pH 7,5; 5mM de MgCl₂; 1mM EDTA; 0,3mM de ATP e 1mM de DTT). A lise celular foi feita por sonicação e o lisado foi centrifugado a 12000g, 4 °C por 10 minutos (figura 24).

O sobrenadante foi precipitado com sulfato de estreptomicina 1%, centrifugado e o “pellet” ressuscitado em 10 mL do mesmo tampão A e levado à diálise. Após a diálise, o sobrenadante foi separado por centrifugação e precipitado com sulfato de amônio 20%. O “pellet” obtido por centrifugação foi ressuscitado em 5 ml de tampão A e dialisado com duas trocas de tampão B (5mM fosfato de potássio, pH 7,5; 1mM MgCl₂; 0,1mM ATP e 1mM DTT) e duas trocas com o tampão C (5mM fosfato de sódio, pH 7,5; 1mM MgCl₂; 0,1mM ATP e 1mM DTT).

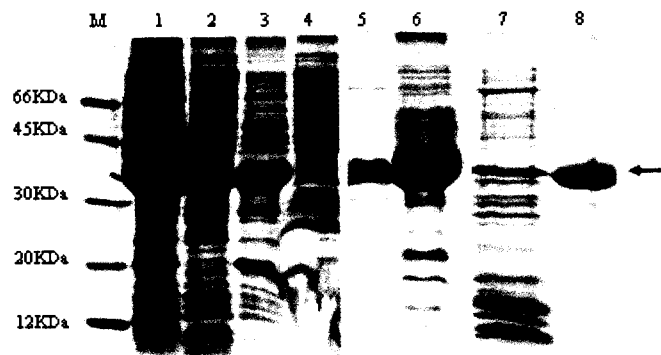


FIG24: Resultado da purificação da hPRSI, após fracionamento com sulfatos de estreptomicina e amônio. M: representa o padrão de massa molecular em kDa. Coluna 1: extrato bruto (lisado). Coluna 2: sobrenadante do lisado. Coluna 3: “pellet” do lisado (descartado). Coluna 4: sobrenadante após precipitação com estreptomicina

(descartado). Coluna 5: sobrenadante após centrifugação da diálise de estreptomicina. Coluna 6: "pellet" após centrifugação da diálise de estreptomicina (descartado). Coluna 7: sobrenadante após precipitação com sulfato de amônio (descartado). Coluna 8: "pellet" após precipitação com sulfato de amônio.

A amostra foi concentrada até 1 mL em um centriprep (10) e então aplicada e uma coluna de troca iônica – POROS 20HQ (Amersham Pharmacia) em tampão C com fluxo de 1mL/min com gradiente de 1M de NaCl. (figura 25).

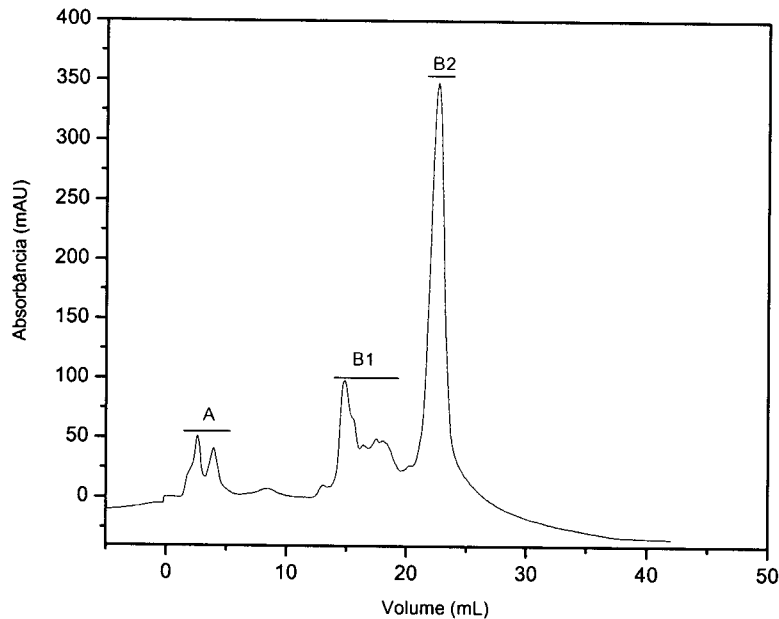


FIG25: Perfil cromatográfico da eluição da hPRSI sintetase na coluna POROS 20HQ. Os picos A, B1 e B2 representam a eluição da hPRSI sintetase.

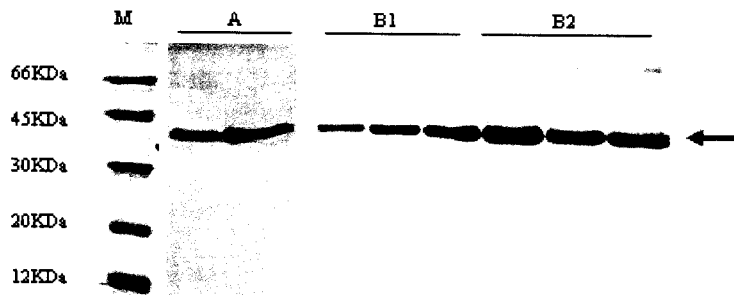


FIG26: Resultado da cromatografia de troca iônica da hPRSI sintetase. M: representa o padrão de massa molecular em kDa. As colunas A, B1 e B2: representam as frações de eluição da hPRSI sintetase em coluna POROS 20 HQ. A seta indica a migração da hPRSI sintetase.

A proteína foi eluída em três picos diferentes, supostamente apresentando diferentes populações de estrutura quaternária e no pico A provavelmente a proteína está enovelada incorretamente, então optou-se por trabalhar com as eluições em B1 e B2.

Para se certificar que não havia nenhum contaminante após a cromatografia de troca iônica, foi realizado uma coloração com prata do gel SDS-PAGE 15% com as frações correspondentes a eluição da hPRSI em B1 e B2 (figura 27).

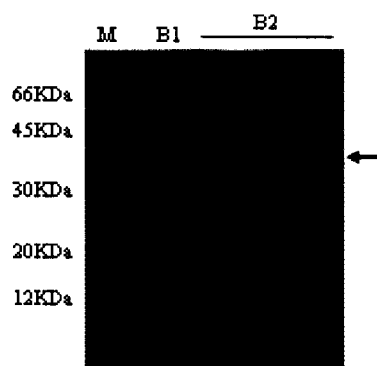


FIG27: Resultado do gel SDS-PAGE corado com prata. M: representa o padrão de massa molecular em kDa. Coluna B1: representa uma das frações eluídas na cromatografia de troca iônica da hPRSI sintetase referente ao pico B1. Coluna B2: representa três frações da eluição da hPRSI sintetase na cromatografia de troca iônica (pico B2). A seta representa a migração da proteína hPRSI sintetase.

Através do SDS-PAGE 15% corado com prata pode ser avaliado que não havia a presença de contaminantes na amostra eluída da coluna POROS 20 HQ em B1 e B2, portanto prosseguiram os experimentos para caracterização da proteína hPRSI sintetase com as frações eluídas em B2.

3.6) CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA hPRSI SINTETASE

3.61) Caracterização da proteína hPRSI através do sequenciamento da região N-terminal

Para a realização do sequenciamento do N-terminal, a hPRSI obtida a partir de culturas bacterianas induzidas, foi purificada, concentrada a 8 mg/mL e transferida para uma membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride – Bio-Rad). A membrana contendo hPRSI, foi enviada ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos. Aos cuidados da pesquisadora Prof^a. Dra. Heloísa S. Selistre de Araújo, a amostra foi submetida ao sequenciamento do N-terminal.

O resultado do sequenciamento indicou a seqüência de 15 aminoácidos (P N I K I F S G S S H Q D L S) correspondentes ao N-terminal da enzima hPRSI. A metionina inicial não foi detectada, porém este resultado pode ser esperado uma vez que a *E. coli* apresenta enzimas específicas que clivam a metionina inicial das proteínas expressas quando o segundo resíduo não é muito grande (Lohmann *et al.*, 2001).

A figura 28 mostra a correlação observada entre a seqüência de aminoácidos da hPRSI, obtida a partir do banco de dados de proteínas, e a seqüência obtida experimentalmente.

Padrão	—	M	P	N	I	K	I	F	S	G	S	S	H	Q	D	L	S
Experimento	—		P	N	I	K	I	F	S	G	S	S	H	Q	D	L	S

FIG28: Resultado do sequenciamento do N-terminal da proteína hPRSI. Padrão: Seqüência dos primeiros 16 aminoácidos da hPRSI depositada no banco de dados. **Experimento:** Seqüência de 15 aminoácidos obtida a partir da hPRSI recombinante expressa pelo vetor pET29a(+). M: metionina sujeita a clivagem.

3.62) Determinação do Ponto Isoelétrico (pI)

Para o experimento de focalização isoeletrica foi utilizado 2 μL de uma alíquota contendo a proteína hPRSI numa concentração de 5mg/mL. Foi usado neste experimento o Phast Gel com intervalos de 3 a 9.

O ponto isoeletrico determinado experimentalmente (figura 29) a partir da proteína hPRSI purificada foi de 7.35.

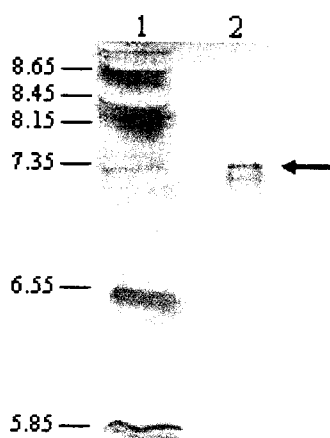


FIG29: Determinação do ponto isoeletrico da proteína hPRSI sintetase. Coluna 1: indica o padrão de pI. Coluna 2: representa a migração da proteína hPRSI até o ponto onde a somatória de suas cargas é zero ou nula.

3.63) Experimento de Dicroísmo Circular (CD)

A técnica de dicroísmo circular (Circular Dichroism – CD) foi utilizada nos estudos de enovelamento da proteína hPRSI sintetase devido a sua sensibilidade em distinguir a presença e a porção de elementos de estrutura secundária de proteínas.

Para este experimento foi utilizada uma alíquota de 500 μL a 0,2 mg/mL da proteína hPRSI após sua purificação em coluna de exclusão molecular Superose12 em tampão 5mM fosfato de sódio, pH 7,5; 1mM

MgCl₂; 0,1mM ATP e 1mM DTT. Um total de 16 varreduras, na faixa de comprimento de onda 195 a 250 nm, a uma temperatura de 22°C, foram tomadas para a construção de uma curva média. Este experimento foi realizado no Departamento de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, com a colaboração da Prof^a. Dra. Leila Maria Beltramini.

A figura 30 mostra o espectro de CD da hPRSI sintetase, onde este apresenta um máximo positivo próximo a 194 nm e dois mínimos negativos, um em 210 e o outro em 222 nm.

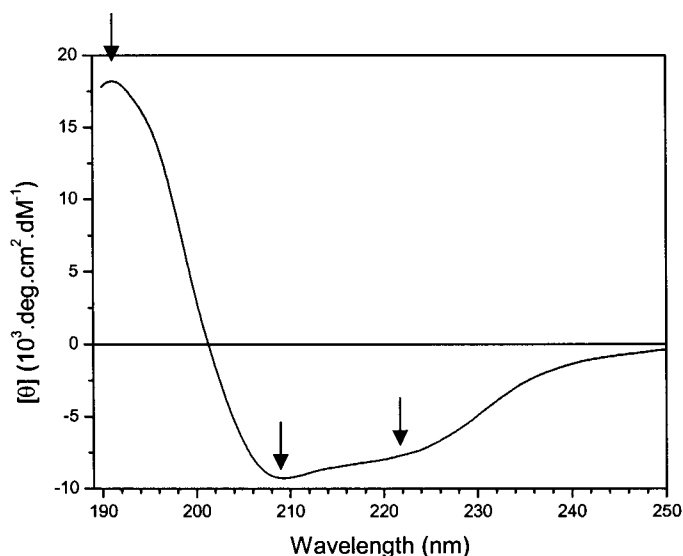


FIG30: Espectro de dicroísmo circular da proteína hPRSI sintetase. Espectro de CD da hPRSI em pH 7.5 realizado a partir de 195 a 250 nm em cubeta com caminho óptico de 1mm com uma média de 16 medidas a 22°C.

Esse resultado foi então utilizado para o cálculo de desconvolução da curva média, para curvas equivalentes às proporções relativas a cada um dos elementos de estrutura secundária presentes. Na tabela 5 é

possível a visualização da desconvolução e para este cálculo foi utilizado o programa Self Consistent (SELCON-2).

Tabela 5: Resultados de desconvolução do espectro de CD da enzima hPRSI sintetase.

Porções de estrutura secundária	Frações (%)
Hélice α	24
Folhas β	28
Turns	19
Elementos de estrutura desordenada	29

3.64) Experimento de Espalhamento Dinâmico de Luz

Foi possível estimar o resultado de massa molecular da enzima hPRSI sintetase através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz.

A partir do histograma (figura31) obteve-se o raio hidrodinâmico da amostra de 6,00 nm, podendo-se estimar a partir deste que a massa molecular da proteína é de 223 kDa. Pelo perfil do histograma pode-se dizer que a proteína também se apresenta homogênea.

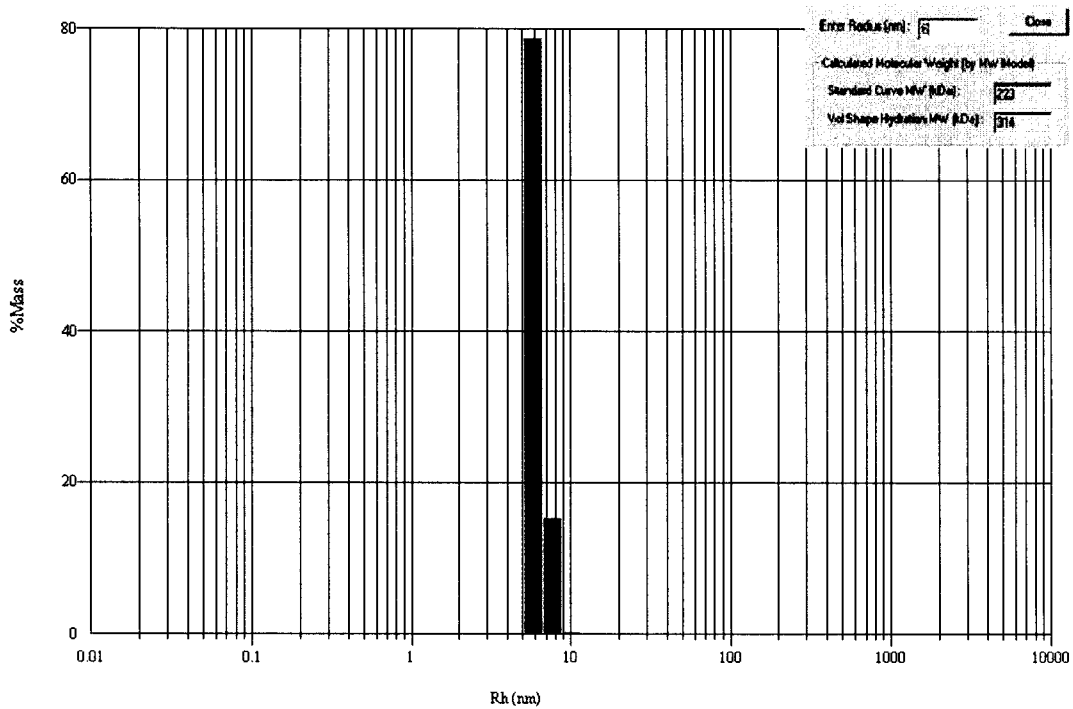
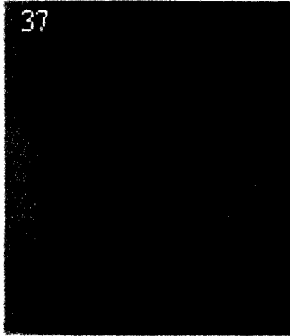
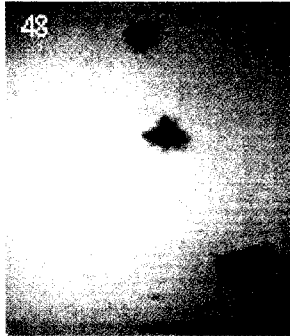


FIG31: Histograma representativo do R_H da proteína hPRSI sintetase. O valor do R_H apresentado é de 6,00 o que fornece uma massa molecular de 223 kDa.

3.65) Ensaios de Cristalização

Com a proteína hPRSI sintetase purificada e concentrada (8 mg/mL) foram realizados testes de cristalização utilizando o Fatorial I (50 condições) e Fatoriais MPD, $(NH_4)_2SO_3$ e PEG 6000 (24 condições) (Hampton Research) a temperatura de 4°C e 18°C. Na maioria das gotas observou-se a presença de precipitado amorfo e de cristais de sal, porém duas condições do fatorial I a 18 °C se mostraram mais favoráveis e, então foi iniciado um procedimento de refinamento em torno dessas condições (tabela 6).

Tabela 6: Ensaios de cristalização com Fatorial I da Hampton Research

FATORIAL I			
			
CONDIÇÃO	SAL	TAMPÃO	PRECIPITANTE
37	-	0,1 M Acetato de sódio pH 4.6	8% PEG 4000
48	-	0,1 M Tris-HCl pH 8.5	2,0 M Fosfato Dihidrogenio de amônio

3.66) Referências Bibliográficas

Lasergene Sequence Analysis Software for Windows and Macintosh – DNASTar – version 5, 2001.

LOHMANN, K.; WESTERDORF, B.; MAYTUM, R.; GEEVE, M.A. and KORNELIA J. Overexpression of Human Cardiac Troponin in Escherichia coli: Its purification and characterization. **Protein Expression Purif.** V.21, p.49-59, 2001.

ENZIMA hPRSII

Neste capítulo serão apresentados os resultados dos experimentos de amplificação, clonagem em vetor de propagação e caracterização do gene hPRSII.

4.1) Amplificação e clonagem do gene hPRSII no vetor pCR4-TOPO

Para a amplificar o DNA foi seguida a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), através dos “primers” desenhados para o gene hPRSII e utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase. Esta enzima adiciona adeninas nas extremidades 3’, o que permite que este DNA seja ligado ao vetor pCR4 TOPO (Invitrogen), que apresenta 3 timinas na extremidade 3’, facilitando a confirmação dos sítios de restrição do inserto (figura 32).

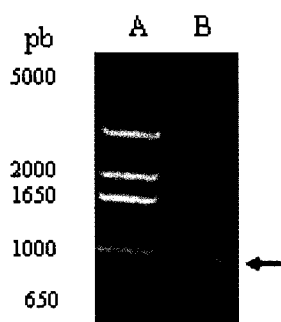


FIG32: Experimento de amplificação do gene hPRSII. Coluna A representa o marcador de massa molecular 1Kb plus. Coluna B: fragmento do gene hPRSII amplificado em 957 pb

O fragmento de DNA amplificado foi analisado em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TAE 1X apresentando migração aproximada a 957 pb como esperado (figura 32). Esse fragmento de DNA foi purificado (Kit Concert – Invitrogen) e, posteriormente submetido à adição de adeninas para clonagem em vetor pCR4 – TOPO.

A ligação hPRSII/pCR4-TOPO foi usada transformar células de *E.coli* DH5α, o que possibilitou a escolha de 3 clones, os quais foram submetidos a experimentos de extração de DNA plasmidial, vindo a confirmar que o experimento de clonagem foi bem sucedido (figura 33).

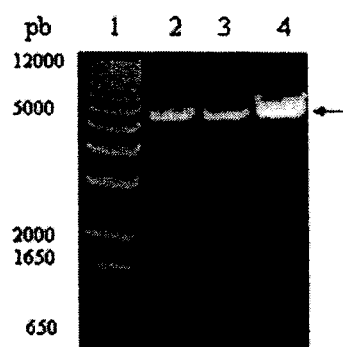


FIG33: Linearização da ligação hPRSII/pCR4TOPO. Coluna 1) marcador de massa molecular 1Kb plus. Colunas 2, 3 e 4 representam os clones 1, 2 e 3 da hPRSII sintetase obtidos da clonagem em vetor pCR4TOPO, respectivamente, linearizados com a enzima de restrição Hind III. Toda a análise foi realizada em gel de agarose 0,8% TAE (1X).

Estes clones também foram amplificados novamente para se certificar que o inserto se encontra na orientação correta com relação ao promotor T7 no vetor pCR4-TOPO e, para isto foi utilizada uma combinação de oligonucleotídeos T7 e oligo 3' da hPRSII. De acordo com a figura 34 foram positivos os clones 1 e 3 amplificados próximo a 957 pb.

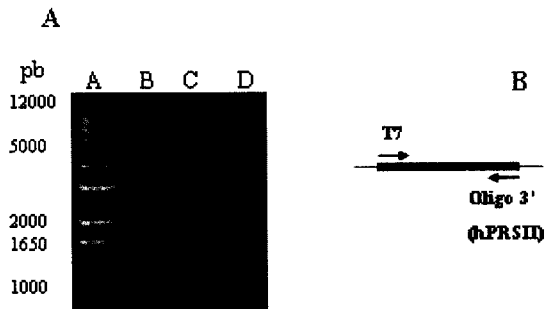


FIG34: Experimento de amplificação do gene hPRSII sintetase. Representação da checagem da orientação da construção recombinante a partir da amplificação por PCR com combinação de oligonucleotídeos T7 e Oligo 3'da hPRSII. Figura A representa os clones 1, 2 e 3 da hPRSII, respectivamente. Na coluna 1 da figura A tem-se o marcador de massa molecular de 1 Kb plus. Figura B representa o esquema da combinação dos oligonucleotídeos T7 e Oligo 3'da hPAP 39.

Através do sequenciamento de DNA optou-se pela escolha do clone 1 da para dar continuidade aos experimentos com a enzima hPRSII.

4.2) Clivagem da ligação hPRSII/pCR4-TOPO para inserção em vetor de expressão

A ligação pCR4-TOPO/hPRSII foi digerida com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Hind III*, conforme figura35 para subclonagem em vetor de expressão pKK223-3, que também foi digerido com as mesmas enzimas.

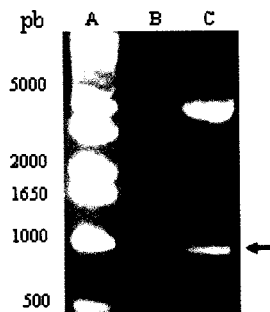


FIG35: Resultado de digestão do DNA plasmidial hPRSII/pCR4-TOPO e do vetor pKK223-3 com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Hind III*. A análise foi realizada em gel de agarose 0,8% TAE (1X). Coluna A: marcador de massa molecular de 1 Kb plus. Coluna B: vetor pKK223-3 após clivagem com as enzimas de restrição. Coluna C: clone 1 (hPRSII/pCR4-TOPO) digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *Hind III*. A seta indica o fragmento de DNA da hPRSII após digestão.

Após clivagem com enzimas de restrição, os fragmentos de DNA do vetor pKK223-3 e de hPRSII foram purificados (Kit Concert – Invitrogen) e submetidos a reação de clonagem e transformação em células competentes *E.coli* DH5 α , porém não foram obtidos clones positivos.

Outra tentativa de subclonagem do gene hPRSII foi realizada em vetor pMA1-c2X, porém sem êxito.

4.3) Sequenciamento do gene hPRSII

O inserto hPRSII clonado (957 pb) no vetor pCR4-TOPO foi sequenciado pelo método de Sanger e utilizando os “primers” 5’ (M13 Forward) e 3’ (M13 reverse). Foram obtidas seqüências que quando alinhadas pelo programa SeqMan (DNASar), possibilitaram a obtenção da seqüência consenso (figura 36).

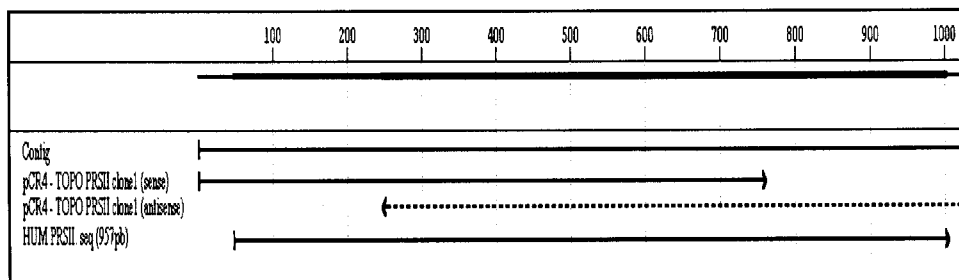


FIG36: Resultado de alinhamento das seqüências 5'e 3' do gene hPRSII no vetor pCR4-TOPO produzido pelo programa SeqMan. A seta (sentido esquerda para direita) representa o alinhamento da extremidade 5'e a seta (sentido direita para esquerda) representa o alinhamento da extremidade 3'.

PROTEÍNAS hPAP41-1 e hPAP41-2**5.1) Amplificação dos genes hPAP41-1 e PAP41-2 e clonagem do gene hPAP41-1 em vetor pCR4-TOPO**

Para o gene hPAP41 foram realizadas duas construções diferentes, portanto foram desenhados oligonucleotídeos específicos para os genes hPAP41-1 e 2 diferindo em 37pb a mais no gene hPAP41-1. Os genes hPAP41 (1 e 2) também foram amplificados segundo a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o emprego da enzima Taq DNA polimerase (figura 37).

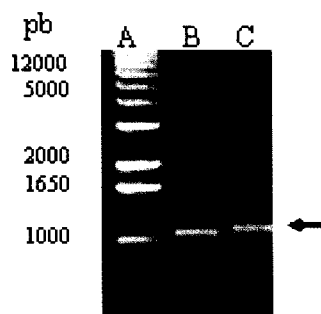


FIG37: Resultado da amplificação do DNA. Foi analisada em gel de agarose 0,8% TAE 1X. A primeira coluna (A) representa o marcador de massa molecular de 1Kb plus. Coluna B tem-se o fragmento da PAP41-1 amplificado. Coluna C representa o fragmento amplificado da PAP41-2. A seta indica os fragmentos de DNA amplificados.

Através de análise em gel de agarose 0,8% TAE (1X), observaram-se fragmentos amplificados de 1110 pb e 1073 pb para hPAP41-1 e hPAP41-2, respectivamente. Estes fragmentos foram posteriormente purificados (Kit concert-Invitrogen) e submetidos a

adição de adeninas para o prosseguimento dos experimentos de clonagem em vetor pCR4-TOPO (Invitrogen) e pGEM-T (Promega).

Após clonagem em vetor pCR4-TOPO, a reação foi usada para transformar em células competentes *E. coli* DH5 α e alguns clones foram selecionados para análise em gel de agarose 0,8% TAE (1X). A clonagem da hPAP41-2 em vetor pCR4-TOPO foi negativa, não apresentando colônias recombinantes, também houve tentativa de clonagem em vetor pGEM-T, porém sem sucesso.

5.2) Linearização e clivagem da clonagem do gene hPAP41-1 em vetor pCR4-TOPO

Alguns clones da proteína hPAP41-1 foram selecionados e submetidos à linearização com a enzima de restrição *Hind* III e analisados em gel de agarose 0,8% TAE (1X) para confirmar clonagem no vetor pCR4-TOPO (figura 38).

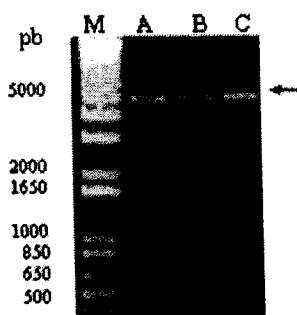


FIG38: Linearização da ligação hPAP41-1/pCR4-TOPO com enzima de restrição *Hind* III. M: marcador de massa molecular 1Kb plus. Colunas A, B e C: representam os clones 2, 3 e 4 da clonagem do gene hPAP41-1 em vetor pCR4-TOPO, respectivamente. A seta indica a ligação hPAP41-1/pCR4-TOPO.

Através do sequenciamento de DNA, foi escolhido o clone 4 de hPAP41-1 para prosseguir os experimentos

A digestão da ligação hPAP41-1/pCR4-TOPO (clone 4) foi realizada através das enzimas de restrição *Xma* I e *Hind* III usando o tampão 1X One-Phor-All- Buffer Plus para clivagem (figura 39).

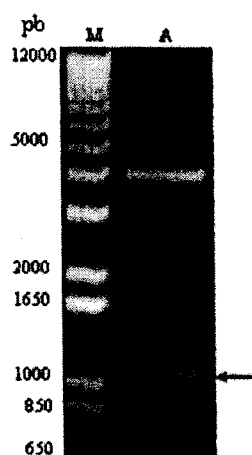


FIG39: Resultado de clivagem da hPAP41-1 em vetor pCR4-TOPO. A análise foi realizada em gel de agarose 0,8% TAE (1X). M: padrão de massa molecular 1Kb plus. A: digestão da ligação hPAP41-1/pCR4-TOPO com as enzimas *Xma* I e *Hind* III. A seta indica o fragmento de DNA de hPAP41-1.

Porém, não foi possível a clonagem em vetor pKK223-3 programada através do desenho de oligonucleotídeos do gene hPAP41-1, pois o vetor não foi linearizado por digestão com as enzimas de restrição *Xma* I e *Hind* III e, após sequenciado o vetor pKK223-3 apresentou problemas em sua seqüência.

5.3) Caracterização do gene hPAP41-1

O gene hPAP41-1 (1110 pb) clonado no vetor pCR4-TOPO foi submetido ao sequenciamento pelo método de Sanger, utilizando os

primers M13 forward e M13 reverse. As seqüências foram alinhadas através do programa Seqman (DNASStar), onde uma seqüência consenso foi obtida. A estratégia utilizada para o alinhamento é mostrada na figura 40.

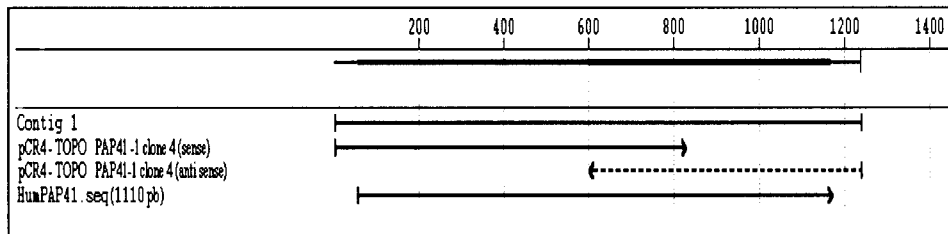


FIG40: Estratégia de alinhamento das extremidades 5'e 3' do gene hPAP41-1 no vetor pCR4-TOPO produzido pelo programa SeqMan. Os alinhamentos indicados pela seta (sentido esquerda para direita) representa o alinhamento da extremidade 5'e os alinhamentos indicados pela seta (sentido direita para esquerda) representa o alinhamento da extremidade 3'.

PROTEÍNA hPAP 39

Neste capítulo serão descritos os resultados dos experimentos de amplificação, clonagem, expressão, purificação e caracterização realizados com a proteína hPAP39.

6.1) Amplificação e clonagem do gene hPAP 39 no vetor pCR4-TOPO

A amplificação do gene hPAP 39 foi realizada através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) partindo dos “primers” e utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase (figura 41). Após ter sido concluída a reação de PCR, 5 μ L do produto final (50 μ L) foram analisados em gel de agarose 0,8% marcado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) em tampão TAE 1X (8 mM Tris-acetato, 0,2 mM EDTA pH 8,0), o que permitiu comprovar o sucesso da amplificação e, posterior purificação do gene (Kit Concert- Invitrogen).

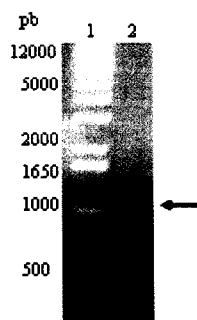


FIG41: Resultado da amplificação do DNA. Foi analisada em gel de agarose 0,8% TAE (1X). 1) representa o marcador de massa molecular de 1Kb plus. 2) Gene hPAP 39 amplificado. A seta em vermelho indica a banda do gel retirada para posterior purificação do DNA amplificado (dados não mostrados).

Pelo gel de agarose observa-se que o produto de PCR tem o tamanho próximo a 1071 pares de bases como esperado. Posteriormente,

o fragmento de DNA amplificado foi purificado (Kit InConcert – Invitrogen) e submetido à adição de adeninas para ligação no vetor pCR4 TOPO (Invitrogen).

Após transformação em células competentes *E.coli* DH5 α da ligação hPAP39/pCR4 TOPO, três clones foram selecionados para experimentos de extração de DNA plasmidial e linearização do vetor com a enzima *Hind* III, confirmando a clonagem em vetor de propagação do gene hPAP 39. Pode ser observado na figura 42, que os clones selecionados estão próximos a 5000 pb de bases.

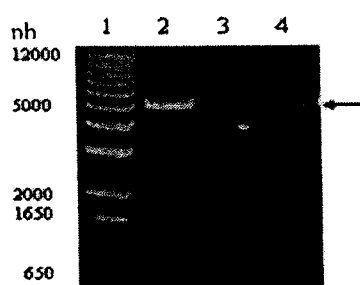


FIG42: Linearização da ligação hPAP39/pCR4TOPO. Coluna 1) Marcador de massa molecular 1Kb plus. Colunas 2, 3 e 4) Clones (1, 2, 3) de hPAP 39 sintetase obtidos da clonagem em vetor pCR4TOPO, respectivamente, linearizados com a enzima de restrição *Hind* III. Toda a análise foi realizada em gel de agarose 0,8% TAE (1X).

Além disso, estes clones foram submetidos a uma nova amplificação para verificar se o inserto se encontra na orientação correta com relação ao promotor T7 no vetor pCR4TOPO, utilizando uma combinação de oligonucleotídeos T7 e Oligo 3'da hPAP 39. Segundo a figura 43, verifica-se que os clones 2 e 3 apresentaram regiões amplificadas, enquanto o clone 1 não foi amplificado, demonstrando que foi ligado incorretamente.

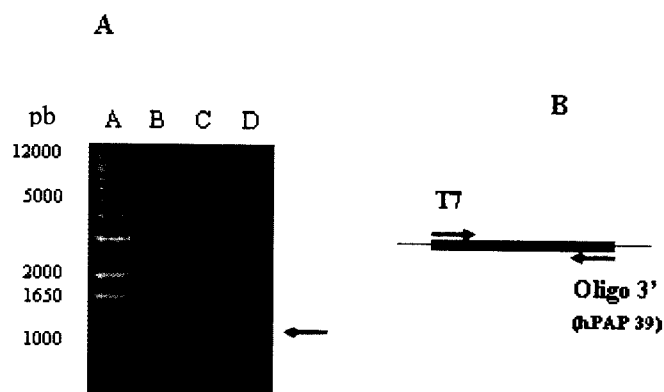


FIG43: Experimento de amplificação do gene hPAP 39 sintetase. Representação da checagem da orientação da construção recombinante a partir da amplificação por PCR com combinação de oligonucleotídeos T7 e Oligo 3' da hPAP 39. Figura A representa os clones 1, 2 e 3 da hPAP 39, respectivamente. Na coluna 1 da figura A tem-se o marcador de massa molecular de 1 Kb plus. Figura B representa o esquema da combinação dos oligonucleotídeos T7 e Oligo 3' da hPAP 39.

Além disso, através de análise do sequenciamento destes clones de hPAP 39 inseridos no vetor pCR4TOPO, tornou-se possível a escolha do clone 2 para a ligação em vetor de expressão pMAL-c2X.

6.2) Subclonagem de hPAP 39 sintetase em vetor de expressão pMAL-c2X

Para subclonagem em vetor de expressão, foi necessário a digestão do DNA plasmidial hPAP39/pCR4TOPO com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III, o próximo passo foi linearizar o vetor pMAL-c2X com as mesmas enzimas de restrição (figura 44). Em seguida, foi realizada a purificação do vetor pMAL-c2X e do gene hPAP 39 (Kit Concert – Invitrogen).

A próxima etapa, foi então clonar o gene hPAP 39 no vetor de expressão pMAL-c2X e transformar a reação de ligação em células competentes *E.coli* DH5 α . Dos clones selecionados, foi possível a

escolha do clone 3 através de sequenciamento de DNA como ideal para testes de expressão.

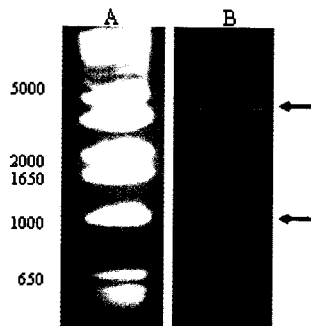


FIG44: Resultado de clivagem da hPAP39 em vetor pCR4TOPO. A análise foi realizada em gel de agarose 0,8% TAE (1X). A: padrão de massa molecular 1Kb plus (pares de bases-pb). B: digestão da ligação hPAP39/pCR4TOPO com as enzimas EcoRI e HindIII. A setas azul e vermelha indicam o plsmideo pCR4TOPO e o fragmento de hPAP39, respectivamente.

6.3) Sequenciamento do gene hPAP 39

O sequenciamento do gene hPAP39 em vetor pMALc-2X foi realizado pelo método de Sanger. Foram utilizados para o sequenciamento os “primers” 5’ (MALE-F) e o 3’ (MALE- R) e, após obtenção das seqüências, o alinhamento foi efetivado pelo programa Seqman (DNASar) (Lasergene Sequence Analysis Software – DNASar, 2001), demonstrado na figura 45.

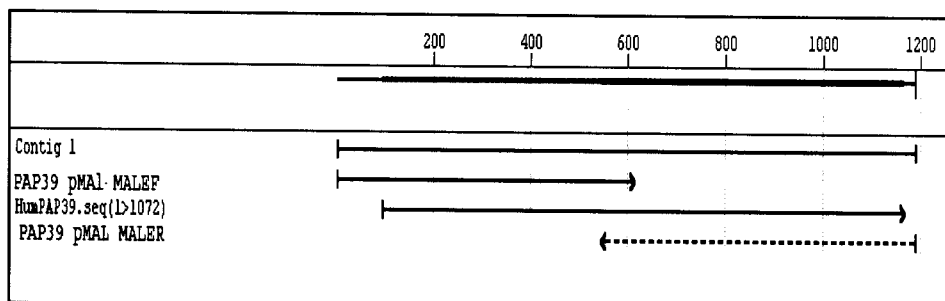


FIG45: Estratégia de alinhamento das extremidades 5'e 3' do gene hPAP39 no vetor pMALc-2X produzido pelo programa SeqMan. Os alinhamentos indicados pelas setas (sentido esquerda para direita) representam o alinhamento da extremidade 5'e os alinhamentos indicados pelas setas (sentido direita para esquerda) representa o alinhamento da extremidade 3'.

6.4) Testes de Expressão e Indução da hPAP 39 em vetor pMAI-c2X

Foi realizado um primeiro teste de expressão variando-se a concentração de IPTG (0 - 1mM), temperatura (20 e 37 °C), com tempo de indução de 4 horas onde constatou-se que a temperatura ideal seria de 37°C (figura 46), porém a lise celular não foi eficiente e, então, novo teste foi realizado usando além do congelamento e descongelamento, 3 ciclos de sonicação e adicionando lisozima.

Pode se observar a expressão da proteína de fusão hPAP 39 – MBP, com massa molecular estimada em 81 kDa.

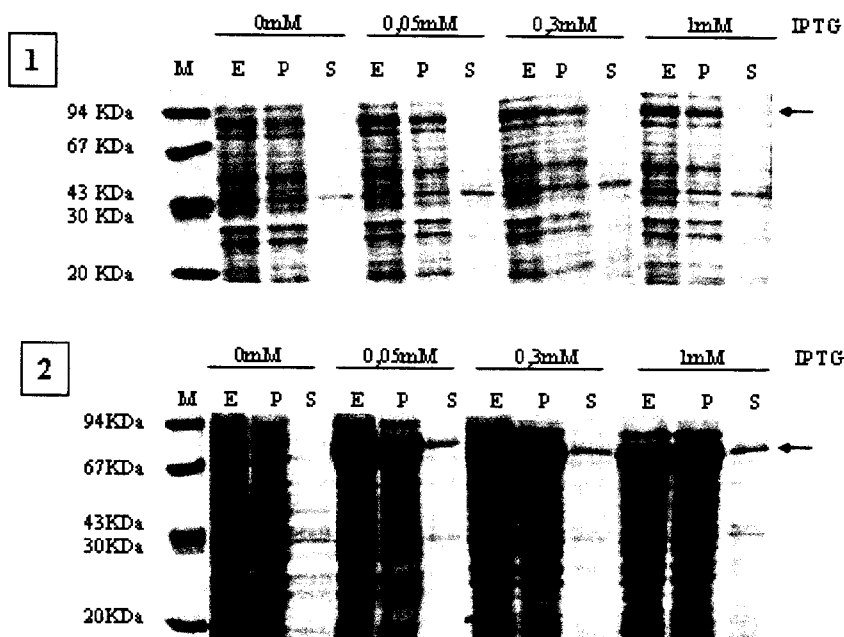


FIG46: Teste de expressão e solubilidade da proteína hPAP 39 sintetase. Analisada em 15% SDS-PAGE. Na coluna M aplicou-se o padrão de massa molecular em kDa. A seta indica a migração da proteína recombinante expressa. 1) Representa o teste realizado a temperatura de 20 °C. 2) Representa o teste realizado a temperatura de 37 °C. E, P e S representam extrato bruto não lisado, “pellet” e sobrenadante, respectivamente.

Pode-se avaliar que a temperatura de 37°C, a 0,05mM de IPTG com 4 horas resulta na melhor condição de indução e solubilidade da hPAP 39 e, assim, prosseguiram os experimentos em larga escala para purificação da proteína (Fig. 47).

Também tentou-se transformar células de *E.coli* BL21 (DE3) com DNA plasmidial para verificar aumento de expressão, porém isso não ocorreu.

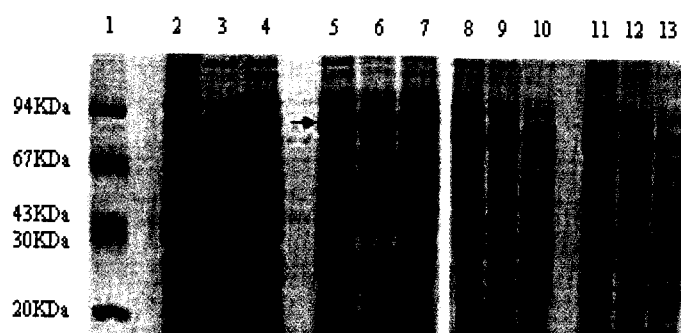


FIG47: Teste de Indução e Solubilidade da hPAP 39 sintetase a 37 °C por 4 horas. A análise foi realizada em gel SDS-PAGE a 10%. Coluna 1: padrão de massa molecular (kDa). Colunas 2E, 3P e 4S: Sem o indutor IPTG. Colunas 5E, 6P e 7S: Após indução com 0,05mM de IPTG. Colunas 8E, 9P e 10S: Após indução com 0,3mM de IPTG. Colunas 11E, 12P e 13S: Após indução com 1mM de IPTG. A seta indica a melhor indução e solubilidade da proteína hPAP 39 sintetase. (E = Extrato bruto, P = pellet e S = Sobrenadante).

6.5) Experimento de Purificação da hPAP 39 sintetase

Testes de purificação com o sobrenadante foram iniciados (figura 48), com a enzima expressa utilizando 0,05mM de IPTG na indução por 4 horas a 37°C. Após a indução a cultura foi centrifugada e o “pellet” ressuspenso em 5mL de tampão de coluna para realização da lise celular. Após centrifugação, o sobrenadante do lisado foi diluído cinco vezes com o tampão de coluna e aplicado em coluna de amilose. Através de experimento com variação na concentração de maltose (0,1 – 2mM),

pode-se confirmar a eluição da proteína de fusão a 0,1mM de maltose em 10 ml de eluição, após a lavagem da coluna (figura 48).

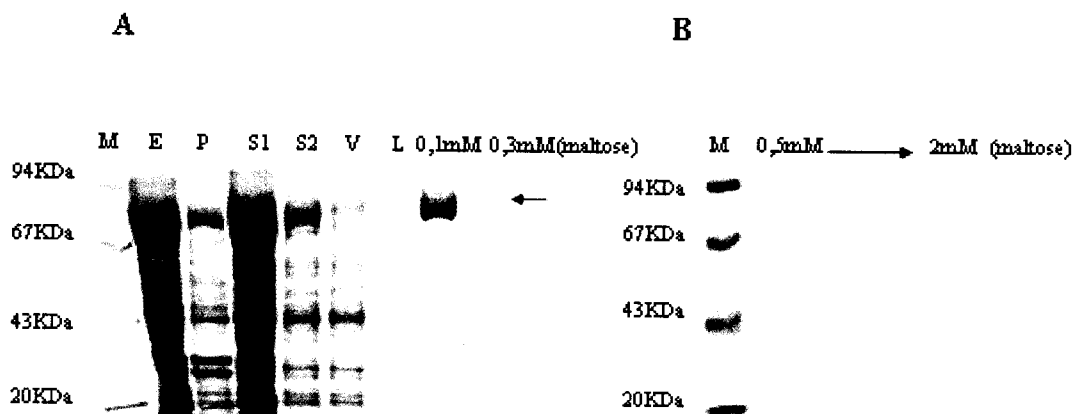


FIG48: Eluição da proteína de fusão em coluna de afinidade. Análise realizada em gel 10% SDS-PAGE. Em A, encontra-se representado a eluição da proteína de fusão hPAP 39-MBP a 0,1mM de maltose. E em B, representa a continuação do gradiente de eluição em maltose. M = padrão de massa molecular em KDa; E = extrato bruto; P = pellet; S1 = sobrenadante sem diluir; S2 = sobrenadante diluído 5X; V = Void; L = lavagem da coluna.

A proteína de fusão hPAP 39 – MBP eluída à 0,1 mM de maltose foi quantificada pelo método de Bradford a 0,4mg/mL.

6.6) Clivagem da proteína de fusão com o Fator Xa e experimento de Imunoblotting

Após purificação em coluna de amilose a amostra contendo a proteína de fusão hPAP 39 – MBP foi submetida aos experimentos de clivagem com o Fator Xa (New England Biolabs). Adicionou-se 0,2 μ L de Fator Xa em 200 μ L da amostra de modo que ficasse na concentração 1 Fator Xa : 100 hPAP 39 – MBP. O experimento foi realizado na temperatura de 22 °C e foram recolhidas alíquotas após 3, 6, 9, 12 e 24

horas de clivagem com Fator Xa e analisada em 15% SDS-PAGE (figura 49).

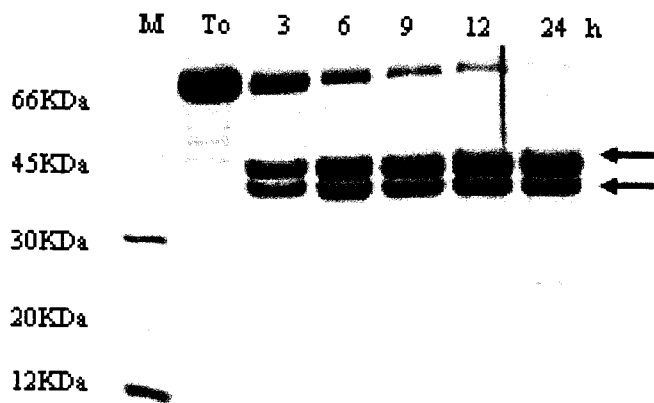


FIG49: Experimento de clivagem da proteína de fusão hPAP 39- MBP com Fator Xa. M representa o padrão de massa molecular em KDa. To: representa a proteína de fusão hPAP39/MBP. As demais colunas representam o tempo de incubação em horas. A seta vermelha indica a clivagem da MBP em 42 KDa e a seta azul representa a hPAP 39 com 39 KDa.

Através do experimento de clivagem, optou-se pela clivagem por 9 horas, pois após este período havia degradação da proteína de interesse.

Foi realizado um experimento de Imunoblotting da proteína hPAP 39 – MBP. A fração eluída da coluna de amilose a 0,1 mM e a clivagem da proteína de fusão foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e posteriormente visualizadas com Ponceau. A membrana foi então incubada com o anticorpo anti-MBP durante 2 horas. A membrana foi lavada com TBS e incubada por mais duas horas com o anticorpo anti-IgG de camundongo. Após essa incubação a membrana foi revelada com solução de NBT/BCIP (conforme item 2.15).

A figura 50 mostra a reação do antígeno (hPAP39-MBP) com o anticorpo (anti-MBP).

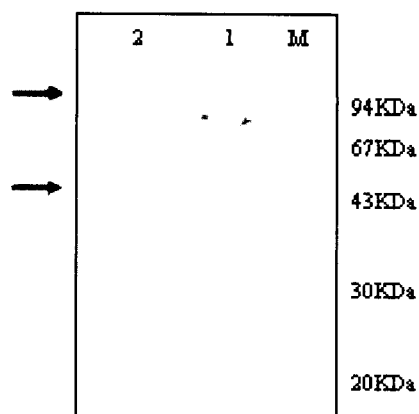


FIG50: Resultado de Imunoblotting. M: padrão de massa molecular. Coluna 1: reação do antígeno PAP39-MBP com o anticorpo anti-MBP (seta verde). Coluna 2: reação MBP- Anti-MBP (seta vermelha).

Após o experimento de Imunoblotting, partiu-se para os experimentos de purificação da proteína de interesse.

6.7) Purificação da proteína hPAP39 sintetase após clivagem com Fator Xa

Como primeiro teste de purificação da proteína clivada, esta foi aplicada em uma coluna cromatográfica de troca aniônica (MONO-Q) e para isto, a amostra foi dialisada contra tampão Tris/HCl 20mM pH 8.0 contendo 1mM de EDTA e concentrada em centriprep-10 até 1 mL (figura 51). A análise em SDS-PAGE a 15% mostrou que não havia separação da proteína de fusão hAP39/MBP e nem da proteína clivada, todas eluíram numa mesma fração (figura 52).

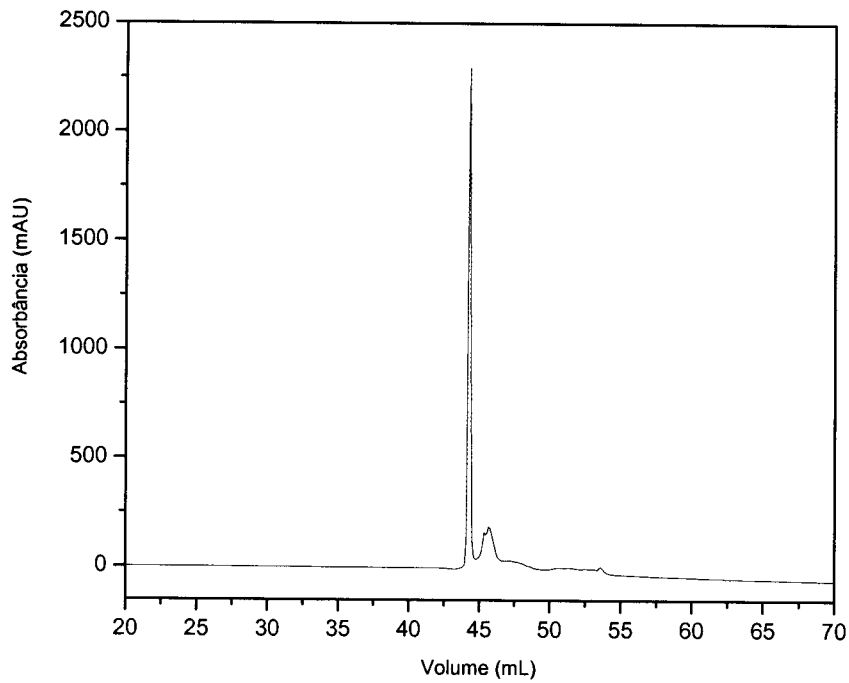


FIG51: Perfil cromatográfico da eluição da hPAP 39 sintetase na coluna MONO-Q. O pico representa a eluição da proteína de fusão hPAP 39 / MBP e hPAP 39 / MBP clivada com Fator Xa.

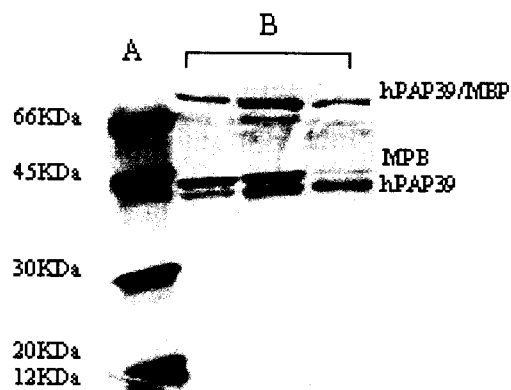


FIG52: Resultado da purificação da hPAP 39 sintetase em coluna MONO-Q. A representa o padrão de massa molecular em kDa. B representa as frações eluídas da proteína.

Uma nova estratégia de purificação da hPAP39 sintetase foi testada utilizando a coluna de exclusão molecular Superose 12. Após clivagem com Fator Xa, foi aplicado 200 μ L da amostra com um fluxo de 0,3 mL/min (figura 53).

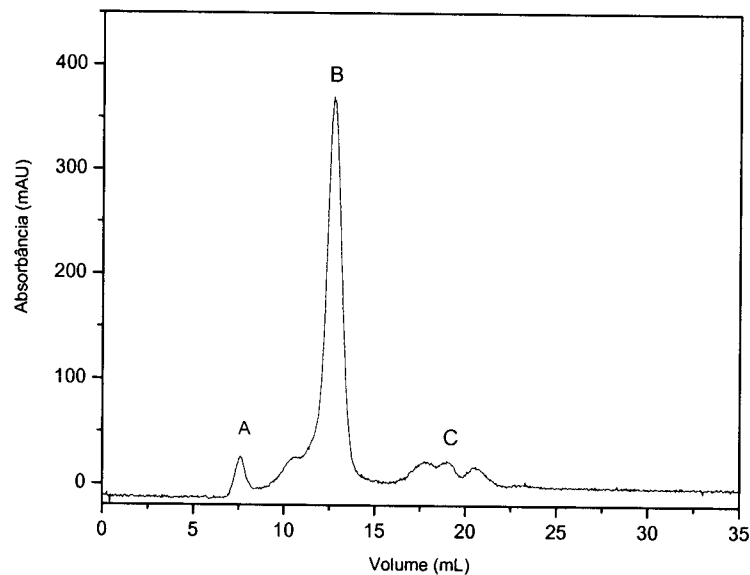


FIG53: Perfil cromatográfico da eluição da hPAP 39 sintetase em coluna Superose 12. Os picos A e C representam contaminantes. O pico B representa a eluição em 12 mL da proteína de fusão hPAP39/MBP e da proteína clivada com Fator Xa

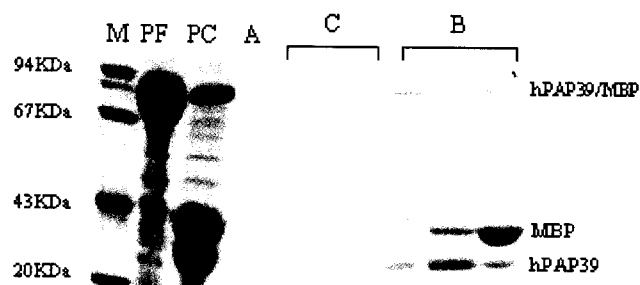


FIG54: Resultado da purificação da hPAP 39 sintetase em coluna de exclusão molecular Superose 12. M representa o padrão de massa molecular em kDa. PF representa a proteína de fusão hPAP 39/MBP. PC representa a proteína de fusão parcialmente clivada com Fator Xa. A e C representam contaminantes que não foram identificados em gel. B representa as frações de eluição da proteína de fusão hPAP39/MBP e da proteína clivada com Fator Xa.

Novamente observou-se através de análise em SDS-PAGE que não houve separação da proteína de fusão hPAP39/MBP parcialmente clivada com Fator Xa (figura 54).

Um outro procedimento foi adotado para purificação da proteína hPAP39 sintetase através de experimento de clivagem com Fator Xa na própria resina de amilose. Após aplicar a amostra do sobrenadante obtido após lise celular na coluna de amilose, o “void” (volume de exclusão) foi recolhido e a coluna lavada com tampão de coluna (20mM Tris-HCl pH 7,4, 200mM de NaCl, 1mM de EDTA). Em seguida, a resina foi ressuspendida com tampão de coluna e recolhida num béquer, levada a 18 °C sob agitação, adicionou-se o Fator Xa e a reação foi realizada por 9 horas. A coluna foi reempacotada e, após sedimentação eluiu-se o volume contido na coluna. Após lavagem da coluna, foi realizado eluição da amostra com 0,1 e 1 mM de maltose. O resultado analisado em gel SDS-PAGE 15% foi negativo, revelando eluição da proteína hPAP39/MBP parcialmente clivada após reempacotamento da coluna e novamente não ocorreu separação da proteína hPAP39/MBP clivada com Fator Xa (Figura 55).

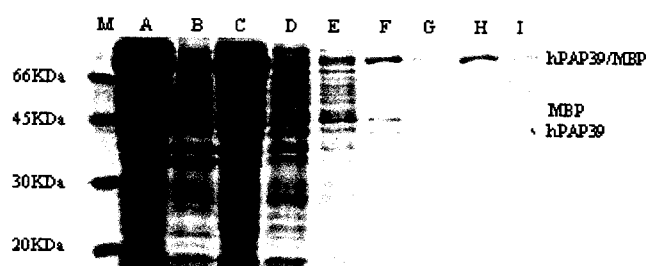


FIG55: Análise da purificação em resina de amilose da hPAP39 sintetase. M: padrão de massa molecular em kDa. A: extrato bruto. B: pellet. C: Sobrenadante. D: Void. E: lavagem após eluição do Void. F: eluição da coluna após reempacotamento. G: Lavagem após eluição do volume da coluna. H: eluição com 0,1 mM de maltose. I: eluição com 1 mM de maltose.

Uma nova tentativa para purificação da hPAP 39 clivada com factor Xa foi utilizar a coluna Hi Trap SP Sepharose Fast Flow, 1 mL, forte trocadora de cátions (Hi Trap IEX Selection Kit).

Fez-se preparação da cultura lisada de células a partir de 300 mL de meio LB, ressuspendida em 15 mL de tampão e concentrada até 3 mL para diálise contra um tampão Tris/HCl pH 5.8 contendo 1mM de EDTA e, posteriormente clivada com Fator Xa.

Primeiramente lavou-se a coluna com 3 mL H₂O e equilibrou com 3 mL de tampão (Tris/HCl pH 5.8, 1mM EDTA). Foram aplicados 1,5 mL da proteína clivada com Fator Xa. Lavou-se com 3 mL do mesmo tampão. Para eluir foi usado 3 mL de tampão com 1M de NaCl. E após a eluição a coluna foi lavada com H₂O.

Foram retiradas alíquotas da aplicação, lavagem com o tampão e da eluição com 1M de sal e aplicou-se em SDS-PAGE 15% evidenciando que com 1M de NaCl a proteína eluiu sem a MBP, porém ainda apresentava a proteína não clivada (figura 56).

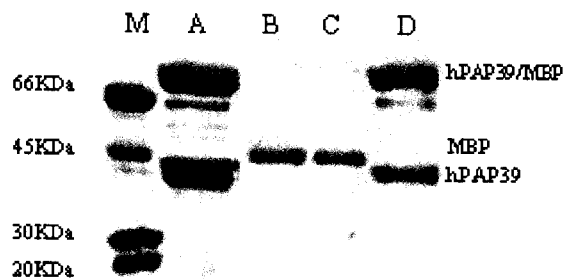


FIG56: Resultado do teste de purificação em coluna Hi Trap SP Sepharose Fast Flow. M: padrão de massa molecular em kDa. A: proteína HPAP 39 parcialmente clivada com Fator Xa. B: Void. C: lavagem da coluna. D: eluição a 1M NaCl da amostra.

Como tentativa de separar a fração não clivada da proteína de fusão da hPAP 39 eluída a 1M de sal da coluna Hi Trap SP Sepharose Fast Flow foi usada a cromatografia por exclusão molecular (coluna Superose 12), conforme figura 57.

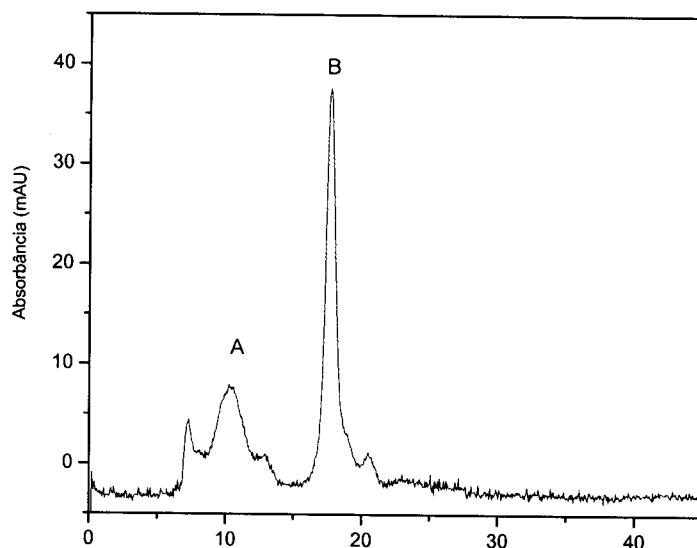


FIG57: Perfil cromatográfico da eluição em coluna de exclusão molecular Superose 12 após teste de eluição na coluna Hi Trap SP Sepharose Fast Flow. A representa a eluição das frações 8-15 mL. B representa a eluição das frações de 18-23 mL.

Pela quantidade de amostra eluída em cada fração ser insuficiente foi necessário agrupar as frações eluídas no pico A (frações de 8-15 mL) em uma única amostra e as frações eluídas em B (frações de 18-23 mL) em outra amostra. As amostras A e B foram concentradas para análise em gel SDS-PAGE 15%. Através do gel pode-se analisar que a proteína de fusão hPAP39/MBP e a proteína clivada hPAP 39 eluíram juntas no pico A que representa as frações de 8-15 mL. (figura 58).

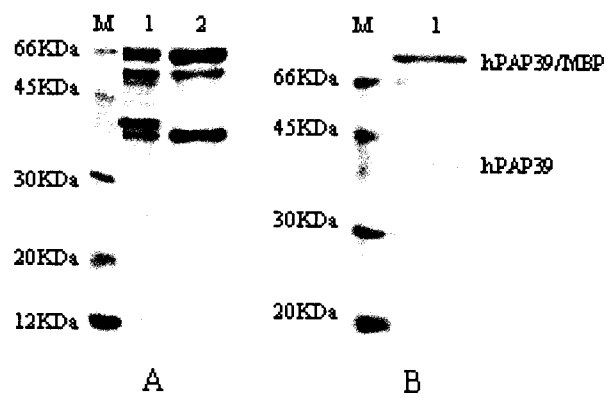


FIG58: Resultado da purificação em coluna de exclusão molecular Superose 12. M representa o marcador de massa molecular em KDa. Em A, na coluna 1: clivagem da proteína de fusão hPAP39/MBP e na coluna 2: proteína eluída na coluna Hi Trap SP Sepharose fast Flow. Em B na coluna 1 eluição da proteína hPAP39, em fusão e clivada, em coluna de exclusão molecular Superose 12.

Discussão e Conclusões

A enzima 5-Fosforribosil pirofosfato sintetase (PRPP sintetase) é um complexo agregado composto pelas três subunidades catalíticas (PRSI, PRSII, PRSIII) e, por proteínas homólogas denominadas PRS Associated Proteins (PAPs). Esta enzima está envolvida no metabolismo de purinonucleotídeos (Via da síntese *de novo*) que é de central importância em células de mamíferos e tem sido investigada como um possível alvo para o planejamento de drogas quimioterápicas. É conhecida apenas uma estrutura tridimensional da enzima PRPP sintetase em *Bacillus subtilis*, por isso o interesse em caracterizar a proteína homóloga em humanos, devido a diferenças apresentadas entre patógeno e hospedeiro.

Na ausência da enzima 5-Fosforribosil pirofosfato sintetase (PRPP sintetase), que é iniciadora da cascata enzimática da síntese *de novo* de purinas (figura 3, pg 06), há o impedimento da manutenção de toda a via metabólica. A PRPP sintetase é importante em outras vias metabólicas como a via fosfato pentose, via de recuperação de purina e pirimidina nucleotídeos, na biossíntese de coenzimas e na síntese dos aminoácidos histidina e triptofano.

O grande papel desta enzima foi o principal motivo de seleção dos clones humanos que compõem o composto agregado (PRSI, PRSII) e proteínas associadas a PRPP (PAPs 39 e 41) sintetases, além do fato de ter apresentado resultados positivos, do alinhamento a expressão das proteína hPRSI e hPAP 39 sintetases em células de *E. coli*.

Um fragmento de 956 pb foi amplificado do gene *hPRSI* da PRPP sintetase a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano, segundo a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando primers que foram hibridizados às seqüências complementares na molécula de DNA. O fragmento amplificado foi clonado em vetor pGEM-T, cujo DNA plasmidial (hPRSI-pGEM-T) foi transformado em células de *E.coli* DH5 α .

Após clivagem do DNA plasmidial (hPRSI-pGEM-T), aleatoriamente foi escolhido o clone 2 para posterior subclonagem em vetor pET 29a(+) para expressão em larga escala. A construção do plasmídeo resultante foi seqüenciada para confirmar a fidelidade da seqüência e verificar a orientação correta com relação à região promotora. O DNA plasmidial (hPRSI-pET29a(+)) foi usado na transformação de células competentes *E.coli* BL21(DE3). As células de *E.coli* transformadas, foram submetidas a teste de expressão como descrito na figura 22, pg 68, produzindo um alto nível da enzima hPRSI sintetase, apresentando-se também satisfatoriamente na fração solúvel. A expressão em larga escala da proteína hPRSI sintetase foi realizada e inicialmente purificada através de dois fracionamentos consecutivos, um com sulfato de estreptomicina a 1% e, o seguinte com sulfato de amônio (20% de saturação), segundo a figura 24, pg 69, sendo posteriormente submetida a cromatografia de troca iônica (POROS 20HQ). A purificação da hPRSI sintetase foi visualizada em SDS-PAGE corado com "Coomassie blue" (figura 26, pg 70) e confirmada a ausência de contaminantes através da coloração com prata (figura 27, pg 71). Como

mostrado a enzima hPRSI sintetase expressa e purificada migra como uma proteína de 36 kDa em SDS-PAGE como esperado. Através de estudos da enzima PRS de *Bacillus subtilis* com massa molecular de 280 KDa e subunidade de 34 KDa, determinaram pela primeira vez a estrutura tridimensional de uma PRS como sendo um hexâmero determinando também domínios ligantes.

Foram realizados estudos moleculares para caracterização da enzima hPRSI sintetase. A análise da estrutura quaternária da proteína foi confirmada pelo experimento de espalhamento dinâmico de luz que forneceu o raio hidrodinâmico de 6,00 nm, com massa molecular estimada a partir deste raio de 223 kDa consistente com a forma de um hexâmero (figura 31, pg 76). Através do experimento de focalização isoelétrica, determinou-se o ponto isoelétrico experimentalmente da proteína hPRSI sintetase igual a 7,35.

Através do experimento de sequenciamento da região N-terminal da proteína hPRSI, determinou-se a seqüência dos 15 primeiros aminoácidos (P N I K I F S G S S H Q D L S) correspondente ao N-terminal da proteína.

A técnica de Dicroísmo Circular (CD) foi usada para a análise da distribuição dos componentes de estrutura secundária da proteína hPRSI. A hPRSI sintetase recombinante teve verificado a sua composição de estrutura secundária em pH 7,5 apresentando um espectro caracterizado por dois mínimos, um em 210 nm e o outro a 222 nm e um máximo próximo a 194 nm que pode ser visualizado na figura 30 da página 74.

A desconvolução do perfil em pH 7,5 mostrou 24% de hélice α , 28% de componentes β (folhas paralela e antiparalela) e 48% de outras contribuições (não ordenadas e "turns"), com um desvio médio quadrático (R.M.S.D) de 1%, onde elementos de estrutura são conservados, possivelmente com enovelamento correto e compatível com a composição de estrutura secundária de PRS de *Bacillus subtilis* com 23,66% folhas β e 28,39% de α hélices (Eriksen *et al.*, 2000).

Através do alinhamento das sequências de aminoácidos de cada proteína com a sequência de *Bacillus subtilis* pelo programa CLUSTAL W (Higgins D. *et al.*, 1994) foi possível a obtenção das identidades sequenciais de cada proteína hPRSI- 44,79%, hPRSII-43,85%, hPRSIII- 43,84%, hPAP39-34,38% e hPAP41-36,59%, evidenciando que a modelagem molecular vai ser fiel a estrutura real, haja visto que o parâmetro usado para o desenvolvimento de modelagem é que a identidade sequencial obrigatoriamente deva ser maior ou igual a 30%.

Pelas propriedades apresentadas da hPRSI sintetase incluindo sua expressão solúvel, fácil purificação e rendimento médio de 1 mg por litro de meio de cultura, sugere que esta seria uma boa candidata à cristalização e determinação da estrutura por análises de difração de raios X.

Partindo-se deste princípio a proteína hPRSI sintetase foi utilizada para ensaios de cristalização testando-a nos fatoriais I (50 condições) e MPD, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ e PEG 6000 (24 condições) (Hampton Research) a temperatura de 4°C e 18°C. Obteve-se a formação de precipitados amorfos em algumas condições e em outras se verificou a formação de

cristais como mostrado na tabela 6 (pg 77). O cristal obtido na condição 37 do Fatorial I a 18°C foi detectado como cristal de proteína por testes de difração de raios X, porém este cristal difratou acima de 4 Å sendo de má qualidade para coleta de dados. As condições 37 e 48 do Fatorial I em que houve o crescimento de cristais foram submetidas ao processo de refinamento variando-se as concentrações de precipitante e valores de pH. A obtenção destes cristais representa a cristalização da primeira PRS de mamífero e permitirá explorar vários aspectos de estrutura e função.

Também foi amplificado o fragmento do gene *hPRSII* contendo 957 pb, através de um biblioteca de cDNA humana pela técnica de PCR (figura 32, pg 79). A este fragmento foram adicionadas adeninas para facilitar a clonagem em vetor pCR4 TOPO (Invitrogen). O DNA plasmidial (*hPRSII*-pCR4 TOPO) foi transformado em células de *E.coli* DH5α. Foram selecionados alguns clones referentes a essa transformação para experimento que caracterizasse a fase de leitura e, posteriormente foram seqüenciados demonstrando precisão na clonagem.

O DNA plasmidial *hPRSII* - pCR4 TOPO foi digerido com endonucleases de restrição para subclonagem em vetor de expressão pKK223-3, porém o vetor apresentou problemas e não foi possível a clonagem no mesmo. Houve tentativas de clonagem em outros vetores de expressão, porém sem êxito.

Fragmentos dos genes que codificam para as proteínas hPAP 41-1 (1110 pb) e hPAP 41-2 (1073 pb) foram amplificados seguindo a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Em seguida, foram submetidos ao experimento de clonagem em vetor pCR4 TOPO e transformados em

células competentes de *E.coli* DH5 α . Não houve resultado positivo quanto ao gene que codifica para hPAP41-2. Após sequenciamento do DNA plasmidial hPAP41-1 – pCR4 TOPO, optou-se pela escolha do clone 4 para prosseguimento aos experimentos de subclonagem em vetor de expressão pKK223-3, porém os resultados obtidos foram negativos.

O fragmento que codifica para proteína hPAP39 também foi amplificado, apresentando 1071 pb através da análise em gel 1% de agarose. Após clonagem em vetor pCR4 TOPO, o DNA plasmidial foi submetido à clivagem com enzimas de restrição. O fragmento obtido foi subclonado em vetor pMALc-2X. O DNA plasmidial hPAP39/pMALc-2X também foi submetido ao processo de sequenciamento, comprovando a eficiência da clonagem. Testes de expressão e indução demonstraram que a enzima hPAP39 sintetase a 37 °C com 0,05 mM de IPTG apresentava-se na fração solúvel (figura 46, pg 91).

Foram iniciados experimentos de purificação da proteína de fusão hPAP39-MBP em coluna de afinidade (resina de amilose) a 0,1 mM de maltose e, posterior clivagem com Fator Xa por 9 horas. Através da técnica de Imunoblotting pode ser verificada a eficiência da clivagem. Após este procedimento, foram realizados testes de separação da proteína de fusão hPAP39 – MBP por cromatografia em troca iônica: aniônica (MONO Q) e catiônica (Hi Trap SP Sepharose Fast Flow), clivagem da proteína na resina de amilose e cromatografia por exclusão de tamanho (SUPEROSE 12), porém sem resultados positivos de separação.

A obtenção de cristais da hPRSI sintetase e possível resolução da estrutura tridimensional, assim como a expressão e purificação das

proteínas hPRSII e hPAP41-1 acrescidas da purificação e ensaios de cristalização da proteína hPAP39 serão de fundamental importância para o conhecimento e aperfeiçoamento de como este agregado enzimático das Fosforribosil pirofosfato sintetases atuam sobre o mecanismo da via metabólica da síntese de novo de purinonucleotídeos e se tornam alvos relevantes na projeção de drogas quimioterápicas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Caracterização dos parâmetros cinéticos das proteínas recombinantes hPRSI – II e PAPs 39 - 41 sintetases.
- Refinar as condições de cristalização da proteína recombinante hPRSI e realizar experimentos de cristalização com a proteína nativa.
- Determinar a estrutura tridimensional da proteína hPRSI sintetase e refiná-la.
- Concluir os experimentos de expressão e purificação das proteínas hPRSII, PAPs 39 e 41.
- Realizar estudos de modelagem molecular da proteína hPRSI.
- Realizar experimentos de ensaios de cristalização com a proteína hPAP39.
- Tendo as PRSs & PAPs purificadas realizar experimento de reconstrução do complexo *in vitro*.