✂

**Isolamento e caracterização do cDNA,
produção heteróloga e análise estrutural de
BbKI: um inibidor de proteinase de
*Bauhinia bauhinoides***

Débora Fernanda Vieira

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ulian de Araújo

USP/IFSC/SBI

8-2-001593

São Carlos
2004

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO

IFSC - SBI
CLASS.....
CUTTER.....
TOMBO 121593

Vieira, Débora Fernanda

“Isolamento e caracterização do cDNA, produção heteróloga e análise estrutural de BbKI: um inibidor de proteinase de *Bauhinia bauhinoides*”
Débora Fernanda Vieira – São Carlos, 2004

Dissertação (Mestrado) – Área de Física da Universidade de São Paulo,
2004 - Páginas: 103

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ulian de Araújo

1. Produção Heteróloga. 2. Análise Estrutural.

I. Título

IFSC**UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO****Instituto de Física de São Carlos**

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

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE DÉBORA FERNANDA VIEIRA APRESENTADA AO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,
EM 22-04-2004.

COMISSÃO JULGADORA:

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo (Orientadora e Presidente) - IFSC/USP

Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman – FFCLRP/USP

Prof. Dr. Máximo Siu Li – IFSC/USP

“Dos anos que passaram, certamente ficaram 3 coisas: a certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar, e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Por isso, é importante: fazer da interpretação um caminho novo; fazer da queda, um passo de dança; do sonho, uma ponte e da promessa, um encontro.”

Fernando Sabino

Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria Eurides e Paulo (in memoriam)
pelo amor, oportunidade e confiança, aos
meus irmãos queridos, Saulo e Fabinho, e
ao meu namorado, Fábio, pela paciência e
compreensão.

Agradecimentos

- ☞ A Deus, por tudo;
- ☞ Aos meus familiares pela confiança, pelo incentivo ao estudo e pelo carinho;
- ☞ Aos meus professores de graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), pelo aprendizado em Biologia e pela orientação para o desenvolvimento da pesquisa científica;
- ☞ Aos professores da pós-graduação do Instituto de Física de São Carlos -USP, por proporcionar-me conhecimentos na área de Biofísica;
- ☞ À Prof^a.Dr^a. Ana Paula Ulian de Araújo, pela orientação e condução deste trabalho, pelos ensinamentos, pela amizade e confiança depositada em mim;
- ☞ À Prof^a.Dr^a Maria Luiza V. de Oliva, pela colaboração neste projeto;
- ☞ À Dr^a. Raquel K. Bortoleto, pelo auxílio e ensinamentos de experimentos durante o decorrer de minha iniciação científica e no mestrado, além da amizade e consideração;
- ☞ À Prof^a.Dr^a. Maria Helena Goldman, por dispor seu laboratório à nossa pesquisa e ao Ms. Luis Lamberti, pelo auxílio na parte experimental;
- ☞ À Prof^a.Dr^a. Leila M. Beltramini, pelas informações a respeito dos estudos de CD e de fluorescência;
- ☞ À Prof^a.Dr^a. Heloísa S. Selistre de Araújo, pelo apoio e pela disposição em contribuir no início de meu mestrado;
- ☞ À Dr^a. Dulce Helena F. de Souza pelo auxílio nos primeiros testes de cristalização de BbKI;
- ☞ Ao aluno de Doutorado Marcos Vicente A. S. Navarro, por seu trabalho de fundamental importância para a conclusão deste trabalho, pelo auxílio e pela amizade (ah! pelas caronas também!);

- ☞ Ao aluno de Doutorado André Luis Coelho, por ser a primeira pessoa a me ensinar no laboratório as técnicas de Biologia Molecular, por me ajudar na confecção da minha dissertação e pela amizade;
- ☞ A todos os professores da Biofísica, pela agradável convivência no ambiente de trabalho e social;
- ☞ À secretária do grupo de Biofísica Éster, pelo apoio na área administrativa e pela agradável convivência;
- ☞ À secretária de Pós-Graduação Wladerez A. Gounella Caiado, pela disposição de prestar informações e o respeito que trata os alunos;
- ☞ Aos técnicos do grupo de Biofísica: Andressa, Bel, Beto, Kelven, por sempre me ajudarem no laboratório quando foi preciso e pela amizade;
- ☞ A todo o pessoal do Grupo de Cristalografia;
- ☞ Aos meus companheiros do grupo de Biofísica: Alessandra, André, Andressa, Cris Nordi, Sheila, Ronny, Leandro, Ceará, Queite, Melissa, Marli, Patrícia, Marcel, Fernando, Julio, Luciano, Neusa, Raphael, Alain, Tales, Elisangela, Assuero, Bia, Zé Luiz, Gustavo, Marlon, Priscila, Ana Paula, Tais, Beto, Bel, Wânius, Marcão, Cláudia Munte.
- ☞ Às minhas colegas de república, Celina e Susana, pelo carinho e agradável convivência;
- ☞ Em especial, aos meus amigos (de longe e de perto): Larry, Drika, Jane, Veronica (apesar de ter sumido!!), Marcel, Julio, Lúcia, Fábio (meu namorado), Fábio (Preto), Caio, Marcelo, Hamilton Cabral, Fábio Lombardi, Assuero, Sirlei.
- ☞ Ao IFSC-USP e todos os seus funcionários, por toda a infra-estrutura e serviços prestados;
- ☞ Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii

Capítulo 1 - Introdução 1

1.1. Proteinases	2
1.1.1. Serina proteinases	4
1.1.2. As serina proteinases no processo de coagulação sanguínea	5
1.2. Inibidores de proteinases	9
1.2.1. Inibidores de serina proteinases	13
1.2.1.1. Inibidores tipo Kunitz	13
1.3. Inibidores de proteinases da família Leguminosae	15
1.3.1. O gênero <i>Bauhinia</i>	16
1.4. Objetivos	18
1.5. Referências bibliográficas	18

Capítulo 2 – Isolamento e Caracterização de BbKI 21

2.1. RT-PCR	21
2.2. RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	26
2.2.1. Análise e discussão dos resultados do RACE	30
2.2.1.1. Breve comentário sobre proteínas vacuolares	31
2.3. Conclusões	38
2.4. Referências bibliográficas	38

Capítulo 3 – Expressão, Purificação e Atividade de rBbKI 40

3.1. Subclonagem em vetor de expressão pET	40
3.2. Subclonagem da cadeia madura+C-terminal	45
3.3. Expressão heteróloga de BbKI em células de <i>E.coli</i>	48
3.3.1. Testes de indução	48
3.4. Purificação	51
3.4.1. Análise de solubilidade e preparo das células para a purificação	51
3.4.2. Purificação em resina de afinidade	53
3.4.3. Retirada da cauda de histidinas	55
3.4.4. Cromatografia de Exclusão Molecular (<i>SEC</i>)	56
3.5. Ensaio de Atividade	58
3.6. Conclusões	61
3.7. Referências bibliográficas	61

Capítulo 4 – Estudos Espectroscópicos.....	63
4.1. Quantificação das amostras de proteínas	63
4.2. Dicroísmo Circular (CD – <i>Circular Dichroism</i>)	64
4.3. Espectroscopia de Fluorescência.....	68
4.4. Conclusões	71
4.5. Referências bibliográficas.....	72
 Capítulo 5 – Cristalização e Análise da Estrutura Cristalográfica de rBbKI.....	73
5.1. Cristalização.....	73
5.2. Determinação da Estrutura Cristalográfica de rBbKI.....	75
5.3. Análise da estrutura	76
5.3.1. Enovelamento protéico	76
5.3.2. Principais características da estrutura do inibidor	79
5.4. Conclusões	83
5.5. Referências bibliográficas.....	84
 Capítulo 6 – Considerações Finais e Perspectivas	86
 Anexos.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1.1. Representação esquemática da interação entre uma proteinase tipo-tripsina (vermelho) e seu inibidor protéico (azul)	5
Figura 1.1.2.1. Cascata de coagulação sangüínea simplificada.....	8
Figura 2.1.1. Seqüência primária de BbKI (<i>Bauhinia bauhinioides</i> kallikrein inhibitor).....	21
Figura 2.1.2. Amplificação parcial do gene <i>bbki</i> através de RT-PCR.....	23
Figura 2.1.3. Seqüência nucleotídica de BbKI.....	25
Figura 2.2.1. Esquema ilustrativo do método RACE (adaptado de Bertoli, 1997).	27
Figura 2.2.2. Análise dos produtos amplificados a partir dos RACEs 3' e 5'.....	29
Figura 2.2.1.1. Um modelo da rota de proteínas solúveis para diferentes vacúolos.....	32
Figura 2.2.1.2. Seqüência nucleotídica do mRNA e seqüência de aminoácidos deduzida de BbKI.....	37
Figura 3.1.1. Amplificação parcial do gene <i>bbki</i> a partir de RT-PCR correspondente à região codificante da cadeia madura (<i>primers</i> BbKI-Sense/ <i>Nde</i> I e BbKI-Reverse/ <i>Eco</i> RI).	42
Figura 3.2.1. Análise da amplificação de BbKI-C-terminal.	46
Figura 3.3.1.1. Teste de indução de rBbKI expressa em <i>E.coli</i> BL21(DE3) e ER2566 (pBbKI-28a).....	49
Figura 3.3.1.2. Teste de indução de rBbKI-Cterm expressa em <i>E. coli</i> BL21(DE3).	50
Figura 3.4.2.1. Ensaio de solubilidade e purificação por cromatografia de afinidade de rBbKI.....	54
Figura 3.4.2.2. Ensaio de solubilidade e purificação por cromatografia de afinidade de rBbKI-His-C-terminal.	54
Figura 3.4.3.1. Clivagem de rBbKI-His.....	55
Figura 3.4.4.1. Purificação de rBbKI por SEC.....	57
Figura 3.5.1. Ensaio de atividade inibitória de rBbKI.....	59
Figura 4.2.1. Espectro de CD no UV distante de vários tipos de estruturas secundárias	65
Figura 4.2.2. Espectro de CD de rBbKI e de rBbKI-Cterminal	67
Figura 4.3.1. Espectro de fluorescência de rBbKI na presença de diferentes pHs, a 25°C... ..	70
Figura 5.1.1. Morfologia dos diversos cristais de rBbKI.....	75
Figura 5.3.1.1. Estrutura tridimensional de BbKI e características estruturais do enovelamento β - <i>trefoil</i>	78
Figura 5.3.2.1. Representação gráfica do ambiente do Trp 88.....	80
Figura 5.3.2.2. Representação ilustrativa do ambiente da Cys (155).	82
Figura 5.3.2.3. Mapa da densidade eletrônica da região composta pelo <i>loop</i> inibitório de BbKI.....	82
Figura 5.3.2.4. Sobreposição dos <i>loops</i> inibitórios de BbKI (representado em cinza), de BbCI (em azul) e de ETI (em rosa).	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.2.1. Família de PIs de plantas depositadas no banco InterPro.	11
Tabela 2.1.1. Sequências dos <i>primers</i> usados neste trabalho	22
Tabela 2.2.1.1. Pró-peptídeos envolvidos no encaminhamento de proteínas vacuolares solúveis (tabela extraída de Vitale e Raikhel, 1999).	35
Tabela 3.1.1. Reação de digestão do produto amplificado.....	43
Tabela 3.1.2. Mistura de ligação entre o fragmento codificador da cadeia madura de BbKI e os vetores de expressão pET28a e pET29a.....	43
Tabela 3.2.1. Reação de digestão do produto amplificado (rBbKI-C-terminal).....	47
Tabela 4.1.1. Proteínas recombinantes e seus coeficientes de extinção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) teóricos a 280 nm com a absorbância correspondente, equivalente a uma solução 1mg/mL.	64
Tabela 4.2.1. Frações de estruturas secundárias de rBbKI e rBbKI-Cterminal, estimadas pelo programa de desconvolução SELCON 2.....	66
Tabela 4.3.1. Relação dos tampões utilizados nos experimentos espectroscópicos de fluorescência.	70
Tabela 5.1.1. Soluções de crescimento de cristais de rBbKI.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
BbKI	<i>Bauhinia bauhinioides</i> kallikrein inhibitor
BL21(DE3)	Linhagem de expressão de <i>Escherichia coli</i>
BLAST	Algoritmo de procura de identidades seqüenciais depositadas no banco de dados do NCBI
cDNA	DNA complementar
D.O.	Densidade óptica
DH5α	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamono tetracético
ER2566	Linhagem de expressão de <i>Escherichia coli</i>
GenBank	Banco de dados de seqüências genéticas
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ni-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriacetic Acid</i>
nm	Nanômetros
kDa	Quilo Daltons
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> , tampão fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
pmol	Picomol
rBbKI	Proteína BbKI recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SELCON	Programa de análise de espectros de CD que estima o conteúdo de estrutura secundária da proteína
SDS-PAGE	<i>Sodium DodecylSulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> , eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
TAE	Tampão de eletroforese Tris, ácido acético, EDTA
Tris-HCl	Tris-hidroximetil aminometano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactosídeo

Resumo

Inibidores tipo Kunitz são proteínas de aproximadamente 20 kDa, que geralmente possuem de dois a quatro resíduos de cisteína, formando uma ou duas pontes dissulfeto, sendo responsáveis por inibir uma ou diversas serina proteinases com grande especificidade. Eles são importantes tanto por atuarem em situações de defesa na planta como por estarem envolvidos na inibição de diversas proteinases, como aquelas presentes na cascata de coagulação sanguínea, no processo inflamatório ou e até mesmo atuarem na supressão de tumores. Este trabalho teve como alvo o estudo de um inibidor tipo Kunitz encontrado em sementes de *Bauhinia bauhinioides* (Martius) Macbr., denominado BbKI (*Bauhinia bauhinioides* Kallikrein Inibitor). Um fragmento gênico codificando a sequência primária madura de BbKI foi amplificado por RT-PCR e clonado no vetor pGEM-T. Através da técnica de RACE (3' e 5') foi possível constatar que a proteína é sintetizada inicialmente como um prepropeptídeo com a seguinte estrutura: peptídeo sinal (19 resíduos de aminoácidos), proteína madura (164 resíduos), e peptídeo C-terminal (10 resíduos). A presença do peptídeo sinal demonstra que a proteína segue uma rota de síntese via retículo endoplasmático e sugere que este inibidor possa seguir para outro compartimento celular, sinalizado pelo peptídeo C-terminal. Para avaliar se este peptídeo não seria um mero inibidor da atividade biológica, foram feitas duas subclonagens em vetores do sistema pET: uma com o fragmento gênico codificador para BbKI madura, e outra adicionando a sequência codificante para a porção C-terminal na proteína madura. As proteínas recombinantes foram expressas em células de *E. coli* BL21(DE3), as quais foram purificadas através de cromatografia de afinidade (Ni-NTA) e filtração em gel, apresentando a massa molecular esperada de 20 kDa. Testes de atividade com tripsina mostraram que ambas as proteínas são biologicamente ativas, embora com diferentes constantes de inibição. Estudos de Dicroísmo Circular revelaram estruturas secundárias similares para ambas as proteínas. Quando analisado por espectroscopia de fluorescência, o inibidor maduro mostrou-se estável numa ampla faixa de pH. A proteína madura recombinante foi ainda cristalizada e o cristal foi difratado por raios X até a resolução máxima de 1,9Å, permitindo a resolução e o refinamento de sua estrutura. A análise da estrutura revelou que o inibidor apresenta um enovelamento β -trefoil que é típico nos inibidores tipo Kunitz previamente estudados. Sua estrutura terciária mostrou que no centro ativo o *loop* inibitório está exposto ao solvente e que os únicos W e C ficam escondidos no interior da proteína, rodeados por resíduos hidrofóbicos.

Abstract

Kunitz-type inhibitors are proteins of about 20 kDa that usually contain from 2 to 4 cystein residues used to form one or two disulfide bridges. They are responsible for inhibiting one or several serine proteinases with large specificity. Kunitz inhibitors are important both for playing defense roles in plants and also for being involved in the inhibition of many proteinases, like those present in the blood coagulation cascade, in inflammatory processes, or even for suppressing tumors. The aim of this work was to study a Kunitz-type inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* (Martius) Macbr. seeds, denominated BbKI (*Bauhinia bauhinioides* Kallikrein Inhibitor). A gene fragment codifying the mature primary sequence of BbKI was amplified by RT-PCR and was cloned in the pGEM-T vector. Using the RACE (3' and 5') technique we could verify that this protein is synthesized as a prepropeptide with the following structure: signal peptide (19 amino acid residues), mature protein (164 residues) and C-terminal peptide (10 residues). The presence of the peptide signal shows this protein follows a synthesis pathway via endoplasmatic reticulum and suggests the inhibitor can move to another cell compartment guided by the C-terminal peptide. To evaluate if this peptide was just an inhibitor of the biological activity, we performed two subclonings in the system pET vectors: one using the gene fragment codifying to mature BbKI, and another adding the codifying sequence for the C-terminal peptide to the mature protein. The recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells which were purified by affinity chromatography (Ni-NTA) and gel filtration thus presenting the expected molecular mass of 20kDa. Activity assays with trypsin showed that both of proteins are biologically active, although they presented different inhibition constants. Circular Dichroism studies revealed that both proteins have similar secondary structures. When analyzed by fluorescence spectroscopy the mature inhibitor was stable in a wide pH range. The mature recombinant protein was latter crystallized and the crystal was diffracted by X-ray at 1.9Å resolution, allowing the resolution and refinement of its structure. The analysis of this structure revealed the inhibitor presents a β -trefoil fold, which is typical in the Kunitz-type inhibitors previously studied. Its tertiary structure showed that in the active site the inhibitory loop is exposed to solvent, and that the W and the C are buried into the protein surrounded by hydrophobic residues.

Capítulo 1

Introdução

O estudo de inibidores de proteinases tem, recentemente, chamado a atenção de pesquisadores em diversas áreas. Dentre exemplos de suas potencialidades, pode-se citar a interação inibidor-proteinase como um modelo de estudo no entendimento do mecanismo de digestão proteolítica. Já no campo farmacêutico, investiga-se o potencial uso de inibidores como agentes terapêuticos no tratamento de uma variedade de doenças, como aquelas que envolvem as enzimas da cascata coagulativa do sangue e do sistema calicreína-quinina ou mesmo inibidores de eventos específicos que podem ajudar a elucidar os processos bioquímicos envolvidos na inflamação, na formação e supressão de tumores.

A área agrícola, por sua vez, estuda um método de tornar as plantas mais resistentes a uma variedade de herbívoros e agentes fitopatogênicos, produzindo-se plantas transgênicas capazes de produzir um inibidor para uma determinada proteinase. Estas, por apresentarem altas concentrações de inibidores de proteinases digestivas, quando ingeridas pelos insetos podem interferir no processo de digestão de proteínas no intestino médio, levando à deficiência de aminoácidos. Esta atividade antinutricional prejudica a síntese de proteínas necessárias ao seu crescimento, desenvolvimento e reprodução.

Ainda, mas não menos importante, são as pesquisas que visam determinar qual é o papel biológico dessas proteínas nos tecidos vegetais e animais em diversas condições.

Neste trabalho, o foco situa-se em um inibidor de proteinase, encontrado em tecido vegetal (sementes), importante por possuir a função de inibição de, pelo menos, duas proteinases envolvidas na cascata coagulativa e na inflamação.

1.1. Proteinases

Enzimas proteolíticas ou proteinases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas em outras proteínas. Algumas proteinases estão envolvidas na digestão protéica intra e extracelular. Porém, a maioria delas atua em processos biológicos muito mais especializados, tais como ativação de zimogênios (cascata), liberação de hormônios precursores, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos, translocação através de membranas, preparação na montagem de proteínas ou na ativação de receptores (Bode & Huber, 2000).

A maioria dessas proteinases é potencialmente prejudicial ao seu ambiente natural (Bode & Huber, 2000) e para limitar esses danos devem ser estritamente controladas. Normalmente, este controle é realizado: (1) pela regulação da expressão/secreção e/ou pela ativação de pró-proteinases ou zimogênios, os quais são seus precursores inativos; (2) pela degradação específica de enzimas maduras; e (3) pelo bloqueio de sua atividade proteolítica através de inibidores, que formam complexos completamente inativos ou menos ativos com suas enzimas específicas (Bode & Huber, 2000; Laskowski Jr & Qasim, 2000).

As enzimas proteolíticas encontradas na natureza podem ser subdivididas em quatro grupos principais que são caracterizados pela natureza de seus sítios ativos e o mecanismo de reação envolvido. Estes grupos são representados pelas serina proteinases (ex.: tripsina, quimiotripsina, trombina, subtilisina, plasmina e elastase), as cisteína proteinases (ex.: papaína e bromelina), as metaloproteinases (ex.: carboxipeptidases A e B e as aminopeptidases) e as proteinases aspárticas ou ácidas (ex.: pepsina e renina). Todos esses tipos de enzimas mostraram ser inibidos por proteínas ou peptídeos isolados de plantas ou de microrganismos (Richardson, 1977).

As proteinases vegetais têm um papel de grande importância durante a germinação de sementes, pois atuam na degradação de proteínas de reserva para a assimilação de nitrogênio dentro da via biossintética. Estas enzimas também estão envolvidas em processos de desenvolvimento como na morte programada de células durante a formação dos elementos de vasos, e são componentes importantes na interação entre plantas e outros organismos (Koiwa *et al.*, 1997).

Por sua vez, os inibidores de proteinases produzidos pelas plantas, aparentemente modulam o crescimento e o desenvolvimento de pragas pela atenuação da degradação de proteínas. Os inibidores vegetais de serina proteinases são a classe mais extensivamente caracterizada, e têm assumido a função de defesa contra herbívoros (Koiwa *et al.*, 1997). As proteinases dos patógenos agem na infecção e são essenciais para a digestão das proteínas vegetais pelos herbívoros (Koiwa *et al.*, 1997). Insetos, por exemplo, usam principalmente uma ou a combinação de serina, cisteína e aspártica proteinases como as principais enzimas proteolíticas digestivas.

1.1.1.1. Serina proteinases

As enzimas proteolíticas conhecidas como serina proteinases são assim denominadas por utilizarem um resíduo de Ser no seu centro ativo para cataliticamente hidrolisar ligações peptídicas. Na verdade o sítio ativo conta com uma tríade de Ser, His e Asp. As serina proteinases incluem enzimas digestivas de procariontes e eucariontes, e proteínas mais especializadas que participam no desenvolvimento, na coagulação sanguínea, nas inflamações e em vários outros processos (Voet & Voet, 2000). Algumas já bem estudadas, responsáveis pela digestão inicial de proteínas no intestino da maioria dos animais como, por exemplo, a quimiotripsina, a tripsina e a elastase, mostram ter evoluído a partir de um ancestral comum por divergência. Essas três proteinases se assemelham na estrutura e nos mecanismos de ação, mas catalisam a hidrólise das ligações peptídicas com diferentes especificidades pelas cadeias laterais que flanqueiam a ligação peptídica a ser clivada. A quimiotripsina requer um resíduo hidrofóbico no lado carboxílico da ligação a ser clivada; já a tripsina, requer um resíduo carregado positivamente (Lis ou Arg); e a elastase, um resíduo neutro e pequeno. Estas especificidades são devido a pequenas diferenças estruturais no centro de ligação (Stryer, 1992; Voet & Voet, 2000). Um exemplo de um tipo dessas enzimas está mostrado na **figura 1.1.1.1**, que representa o centro de ligação e a especificidade de serina proteinases do tipo-tripsina, as quais possuem no seu centro ativo, um bolsão apolar constituído pelo resíduo de Asp.

Figura 1.1.1.1. Representação esquemática da interação entre uma proteinase tipo-tripsina (vermelho) e seu inibidor protéico (azul). O *loop* formado pelo centro reativo do inibidor interage com o sítio ativo da proteinase através de várias pontes de hidrogênio intercadeias, inclusive entre a Ser 195 (O_γ representando o O_γ da cadeia lateral desse aminoácido). Uma forte interação eletrostática ocorre entre um resíduo de Asp, que faz parte do bolsão de especificidade (S1) da proteinase, e um resíduo de Lys, a qual se encontra na posição P1 do inibidor, se projetando dentro do bolsão S1. (Ilustração modificada a partir de Bode & Huber, 2000).

1.1.2. As serina proteinases no processo de coagulação sanguínea

A cascata da coagulação (Figura 1.1.2.1) é um processo em cadeia no qual uma série de enzimas são ativadas sequencialmente pela proteólise de suas formas de zimogênios até a formação dos coágulos sanguíneos, resultantes da agregação de plaquetas e formação de uma rede insolúvel de fibrina.

As principais enzimas envolvidas na cascata da coagulação sangüínea, além dos cofatores protéicos não-enzimáticos, são serina proteinases que, como a maioria das enzimas proteolíticas, são sintetizadas como precursores inativos até serem ativados por uma lesão aos vasos sangüíneos.

Assim que uma superfície é lesada tem início a via intrínseca da cascata de coagulação. Um coágulo de fibrina é formado pela ação conjugada das vias intrínseca e extrínseca até a ativação da protrombina em trombina pelo fator Va (**Figura 1.1.2.1**). Pelo menos duas proteínas são essenciais no início da cascata: calicreína e cininogênio. Elas fazem parte da via intrínseca e são responsáveis pela ativação do Fator XII ou fator Hageman.

A calicreína é uma serina proteinase que age sobre um precursor, o cininogênio, liberando um peptídeo bioativo, a cinina (Bhoola *et al. apud* Yousef e Diamandis, 2003¹). Em humanos, há duas classes de calicreínas: as calicreínas plasmáticas e as calicreínas tissulares (Movat, H.Z. *apud* Yousef e Diamandis, 2003²). Essas duas categorias diferem significativamente em peso molecular, especificidade de substrato, características imunológicas, estrutura gênica e tipo de cinina liberada (Yousef e Diamandis, 2003).

No caso de lesões severas como infecções bacterianas e múltiplas lesões, grandes quantidades de calicreínas e cininas são liberadas causando dores severas, extravasamento de fluidos e formação de edemas associado com perda de fluido no sistema vascular. Em vários casos, isso pode levar a falência de órgãos vitais. Em pancreatite aguda, calicreína tissular e plasmina estão envolvidas na adição de

¹ Bhoola *et al.* Bioregulation of kinins: kalikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol.Rev.* **44**, 1-80, 1992 *apud* Yousef, G.M. e Diamandis, E.P. *Clinical Biochemistry*, **36**, 443-452, 2003.

² Movat, H.Z. The plasma kallikrein-kinin system and its interrelationship with other components of blood. In: Erdos E G, editor. Bradykinin, kallidin and kallikrein. Berlin:Springer-Verlag, 1979.p.1-89 *apud* Yousef, G.M. e Diamandis, E.P.. *Clinical Biochemistry*, **36**, 443-452, 2003.

enzimas digestivas (tripsina e quimiotripsina). Neste caso, é possível fazer uma terapia com o inibidor de caliceína aprotinina (Oliva *et al.*, 2001b).

Tem-se especulado a possibilidade de algumas caliceínas tornarem-se valiosos alvos terapêuticos em diversas vias biológicas. Por exemplo, sua atividade de serina proteinase pode iniciar eventos, como a invasão por tumores, ativação de hormônios, de fatores de crescimento, de outras enzimas, de receptores ou de citocinas, formação de amilóide, ou terminar eventos, como a inibição da angiogênese, inativação de fatores de crescimento, hormônios, enzimas, citocinas ou receptores. Uma vez conhecidos, esses eventos poderiam ser manipulados por inibidores ou ativadores de enzimas (Yousef e Diamandis, 2003).

Um desses inibidores de caliceína, objeto deste estudo, já foi previamente isolado e caracterizado na sua forma nativa por Oliva *et al.* (1999, 2001a) reforçando a idéia de estudar a interação e especificidade entre uma enzima e um inibidor e, portanto, contribuindo nos estudos de inibidores como possíveis alvos terapêuticos.

Figura 1.1.2.1. Cascata de coagulação sangüínea simplificada. As formas inativas (pró-proteínas) dos fatores de coagulação estão em rosa, e suas correspondentes formas ativadas em verde (o sufixo a denota um fator ativo). Os cofatores não enzimáticos estão mostrados em azul. O coágulo só é formado pela ação conjunta das duas vias. (Figura adaptada de Stryer, 1992).

1.2. Inibidores de proteinases

Os inibidores de proteinases englobam um variado número de proteínas encontradas em plantas, microrganismos e animais, as quais têm como propriedade peculiar a formação de complexos estequiométricos de proteína-proteína reversíveis com várias enzimas proteolíticas (Richardson, 1977).

Adicionalmente a sua função na regulação das atividades proteolíticas, eles são importantes na proteção de fluidos e tecidos contra sua degradação por proteólise. Altas concentrações de inibidores de proteinases são freqüentemente encontradas em fluidos e tecidos que são particularmente vulneráveis a proteases estranhas, tais como soro sanguíneo, células pancreáticas e tecidos de reserva de plantas (Ryan, 1990).

Tem-se conhecimento da ocorrência dos inibidores de proteinases desde 1938. Eles são largamente distribuídos dentro do reino vegetal e são extensivamente estudados em Leguminosae, Gramineae e Solanaceae, provavelmente pelo grande número de espécies destas famílias serem importantes fontes alimentares (Richardson, 1977).

O possível papel dos inibidores de proteinases na proteção da planta só foi investigado no início de 1947, quando foi observado que larvas de certos insetos não se desenvolviam em produtos de sementes de soja, e mais tarde, que inibidores de tripsina de soja mostraram ser tóxicos a outros insetos (Lawrence & Koundal, 2002). Eles também exibem um amplo espectro de atividades, incluindo supressão de nematóides patógenos (Williamson e Hussey *apud* Lawrence & Koundal, 2002³), inibição da germinação de esporos e crescimento de micélio de *Alternaria alternata*

³ Williamson e Hussey. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*, 8, 1735-1745, 1996 *apud* Lawrence, P.K. & Koundal, K.R. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5 (1), 93-109, 2002.

(Dunaevskii *et al. apud* Lawrence & Koundal, 2002⁴) e inibição do crescimento de muitos fungos patogênicos (Joshi *et al. apud* Lawrence & Koundal, 2002⁵).

Inibidores de proteinases vegetais são proteínas pequenas, geralmente presentes em alta concentração em tecidos de reserva de plantas (acima de 10% do conteúdo protéico), mas também detectáveis em folhas na resposta ao ataque por insetos e microrganismos patogênicos (Ryan, 1990).

A contribuição de inibidores de proteinases (denominados de PIs), nos mecanismos de defesa da planta, conta com a inibição de proteinases presentes no sistema digestório de insetos ou produzidas por microrganismos, impedindo assim, a digestão das proteínas, causando uma redução na disponibilidade de aminoácidos necessários para seu crescimento e desenvolvimento. Como resultado disso, os insetos tornam-se fracos e morrem (De Leo *et al.*, 2002; Lawrence & Koundal, 2002).

A presença de famílias multigênicas tem sido relatada para diversos PIs de plantas (Ryan, 1990). Basicamente, inibidores de proteinases são categorizados de acordo com as proteinases que eles inibem: serina, cisteína, aspártica ou metalo proteinases. Em plantas, PIs ativos contra serina, cisteína e metalocarboxi-proteinases são encontrados em todos os órgãos, enquanto que inibidores ativos contra proteinases aspárticas não têm sido encontrados em sementes (De Leo *et al.*, 2002).

Foi criado atualmente um banco de dados, disponível no InterPro (*Integrated Resource of Protein Domains and Functional Sites* em

⁴ Dunaevskii *et al.* The anionic protease inhibitor BBWI-1 from buckwheat seeds. Kinetic properties and possible biological role. *Physiologia Plantarum*. **100**, 483-488, 1997 apud Lawrence, P.K. & Koundal, K.R. *Electronic Journal of Biotechnology*, **5** (1), 93-109, 2002.

⁵ Joshi *et al.* Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochemical and Biophysical Communications*. **246**, 382-387, 1998 apud Lawrence, P.K. & Koundal, K.R. *Electronic Journal of Biotechnology*, **5** (1), 93-109, 2002.

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) que reúne os PIs de acordo com a bem conhecida classificação de famílias de PIs (**Tabela 1.2.1**) (De Leo *et al.*, 2002). Essa classificação é baseada na estrutura primária da proteína.

Tabela 1.2.1. Família de PIs de plantas depositadas no banco InterPro.

Família de inibidores de proteinases de plantas	Código PLANT-PIs
Inibidores de serina proteinases Bowman-Birk	BBI
Inibidores de tripsina/ α -amilase de cereais	BRI
Inibidores de cisteína proteinases	CYS
Inibidores de metalocarboxipeptidases	MCI
Inibidores de tripsina de mostarda	MSI
Inibidores de proteinases batata tipo I	PI1
Inibidores de proteinases batata tipo II	PI2
Serpinas	SPI
Inibidores (Kunitz) de tripsina de soja	KNI
Inibidores de proteinases tipo abóbora	SQI

A faixa da especificidade de inibição exibida por essas proteínas é altamente variada. Alguns inibidores de proteinases são capazes de inibir somente uma ou duas proteinases relacionadas, enquanto outros são ativos contra uma grande faixa de diferentes enzimas dentro da mesma classe (Richardson, 1991).

O mecanismo de ligação entre os inibidores e as proteinases de insetos parece ser similar em todas as quatro classes de inibidores. Ele se liga no sítio ativo da enzima para formar um complexo com uma constante de dissociação muito baixa (10^7 a 10^{14} M em pH neutro), desta forma efetivando o bloqueio do sítio ativo. Um *loop* no inibidor, geralmente com uma conformação fechada por uma ponte dissulfeto, se projeta para a superfície da molécula e contém uma ligação peptídica (sítio ativo) clivável pela enzima (Terra *et al.*; Walker *et al.* *apud* Lawrence &

Koundal, 2002⁶). Essa ligação peptídica pode ser clivada no complexo enzima-inibidor, mas a clivagem não afeta a interação, deste modo uma molécula de inibidor hidrolisado é ligada similarmente a uma não hidrolisada. O inibidor então diretamente imita um substrato normal da enzima, mas não permite o mecanismo normal de dissociação do produto (Walker *et al. apud* Lawrence & Koundal, 2002⁷).

Estudos cristalográficos e de ressonância magnética nuclear (NMR) indicam que inibidores de serina proteinase agem como substratos altamente específicos da enzima; eles inibem uma única ligação peptídica chamada de ligação peptídica do sítio ativo. Diferentemente dos complexos normais enzima-substrato e enzima-produto, que se dissociam muito facilmente, os complexos enzima-inibidor são muito estáveis ($K_a=10^8 - 10^{13} \text{ M}^{-1}$). Os resultados de estudos de cristalografia de raios X e de NMR indicaram que tão pouco quanto 10-15 resíduos do inibidor estão em contato com a enzima formando quase uma interação do tipo chave-fechadura (Richardson, 1991).

⁶ Terra *et al.* Digestive enzymes. In: Lehane, M.J., ed. Billin London, Chapman and Hall, p. 153-194, 1996 apud Lawrence, P.K. & Koundal, K.R. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5 (1), 93-109, 2002. Walker *et al.* Characterisation of the midgut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28, 173-180, 1998 apud Lawrence, P.K. & Koundal, K.R. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5 (1), 93-109, 2002.

⁷ Walker *et al.* Characterisation of the midgut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28, 173-180, 1998 apud Lawrence, P.K. & Koundal, K.R. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5 (1), 93-109, 2002.

1.2.1. Inibidores de serina proteinases

Os inibidores vegetais de serina proteinases são principalmente proteínas de reserva, de defesa e regulatórias (Birk, Y. *apud* Oliva *et al.*, 2001a⁸), e compõem a classe de inibidores vegetais mais extensivamente caracterizada. Eles se acumulam durante a maturação de sementes ou de bulbos, sugerindo facilitar o acúmulo de proteínas de reserva pela atenuação da atividade de proteases (Koiwa *et al.*, 1997). Têm-se discutido que o acúmulo de PIs de serina proteinase durante a maturação de sementes e bulbos é um indicador de suas funções de defesa, porque a manutenção da integridade desses órgãos é essencial para a sobrevivência das espécies (Koiwa *et al.*, 1997).

Inibidores de serina proteinases podem ser classificados em diferentes famílias de acordo com suas características de inibição. As famílias melhor caracterizadas são as: Bowman-Birk, Kunitz, batata I, batata II e abóbora (Oliva *et al.*, 2001a). Uma característica interessante dessa classificação é que pode ser visto que certas sementes contêm diversas misturas de inibidores de proteínas pertencentes a diferentes famílias (Richardson, 1991). Todas as famílias de inibidores de serina proteinases de plantas são inibidores competitivos e reagem com enzimas-alvo de acordo com o mecanismo padrão enzima-substrato (Ryan, 1990).

1.2.1.1. Inibidores tipo Kunitz

Os inibidores de proteinase da família Kunitz contém de 170 a 200 resíduos de aminoácidos (massa molecular de aproximadamente 21 a 22 kDa), possuindo uma

⁸ Birk, Y. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion.* **44**, 1994 *apud* Oliva, M.L., Mendes, C.R., Santomauro-Vaz, E.M., Juliano, M.A., Mentel, R., Auerswald, E.A., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M. *Curr. Med. Chem.* **8** (8), 977-984, 2001.

ou duas cadeias polipeptídicas e uma ou duas ligações dissulfeto intracadeias. A região mais conservada é encontrada em sua seção N-terminal (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Inibidores de serina proteinases tipo Kunitz são encontrados em todos os tipos de tecidos vegetais, mas a maioria em sementes de três subfamílias de Leguminosae: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionoideae (Richardson, 1991).

A estrutura primária do primeiro inibidor de proteinase tipo Kunitz foi elucidada em 1973 e foi encontrado em sementes de soja. . O inibidor Kunitz de soja (STI) apresenta uma especificidade por tripsina e fracamente por quimiotripsina (Bosterling e Quast *apud* Richardson, 1991⁹). As seqüências completas de aminoácidos de outros inibidores de legumes que são claramente homólogos com o inibidor Kunitz de soja têm sido determinadas em *Psophocarpus tetragonolobus*, *Erythrina latissima* e na árvore brasileira carolina (*Adenanthera pavonina*) (Richardson, 1991).

Um estudo recente sobre inibidor de tripsina Kunitz de *Prosopis juliflora* mostrou que esse inibidor apresenta atividade inibitória contra papaína e cisteína proteinases digestórias de diversas pragas fitófagas e que os sítios de reação se sobrepõem (Franco *et al.*, 2002). Essa combinação de atividades contra ambas proteinases (serina e cisteína) faz do inibidor Kunitz papaína-tripsina de *Prosopis* (PTPKI) um poderoso candidato para o desenvolvimento de um inibidor a ser expresso por plantas transgênicas.

A localização da ligação peptídica do sítio ativo tem sido determinada em um número de inibidores Kunitz provenientes de sementes e está sempre em posições

⁹ Bosterling e Quast. *Biochim.Biophys.Acta.* **657**, 58-72, 1981 *apud* Richardson, M. *Methods in Plant Biochemistry*.**5**, 259-305, 1991.

homólogas à ligação Arg (63) - Ile (64) nas formas de inibidores encontrados em soja (Richardson, 1991).

A família Kunitz não está confinada as Leguminosae. Certos inibidores bifuncionais α -amilase / proteinase de cereais (Gramineae) e o inibidor de catepsina D de batata exibem grau de identidade entre suas estruturas primárias, de 20-30% com os inibidores Kunitz de legumes. Diferente dos inibidores Kunitz de legumes, que não parecem afetar enzimas endógenas, os inibidores tipo Kunitz de cereais parecem ser importantes na regulação da atividade da alfa-amilase específica da germinação, a qual mobiliza as reservas da semente (Richardson, 1991).

Há também um padrão estrutural e seqüencial entre inibidores Kunitz, interleucinas 1 α e 1 β , e fatores de crescimento de fibroblastos. A função dessas proteínas é comum e envolve reconhecimento: os inibidores Kunitz por ligação com alta afinidade de seus sítios ativos; as interleucinas mediam a resposta imune; e os fatores de crescimento de fibroblastos induzem atividades mitogênica, quimotática e angiogênica pela ligação de receptores da superfície numa variedade de células (Murzin *et al.*, 1992). Estas proteínas têm um padrão conformacional característico de β -trefoil e possivelmente evoluíram independentemente (Murzin *et al.*, 1992).

1.3. Inibidores de proteinases da família Leguminosae

As sementes de leguminosas são reconhecidas como excelentes fontes de proteína, e os inibidores que elas possuem são os mais estudados nesta classe de compostos (Richardson, 1991).

A literatura cita diversos estudos de inibidores extraídos das sementes de leguminosas, principalmente aqueles que desempenham funções nas reações de

coagulação sangüínea. Sampaio *et al* (1996) descreveram inibidores Bowman-Birk e tipo Kunitz de diversas leguminosas e os caracterizaram por sua afinidade para tripsina, quimiotripsina, calicreína plasmática e fator XII, comparando as estruturas primárias na região do sítio ativo.

Até 1999, os inibidores de calicreína tissular eram conhecidos somente por serem sintéticos ou endógenos, nenhum originado de plantas, até a descrição de um potente inibidor isolado de sementes de *Bauhinia bauhinoides* por Oliva *et al.* (1999) o qual também inibe tripsina (K_i 0,6 nM) tão fortemente quanto os inibidores isolados de outras espécies do gênero *Bauhinia* como a BuXI (K_i 20,7 nM) e BvTI (K_i 2,1 nM) (Oliva *et al.*, 1996).

1.3.1. O gênero *Bauhinia*

Em relação ao gênero *Bauhinia* são quatro as espécies das quais já foram isolados inibidores Kunitz de cadeia única: *B. variegata*, BvTI (Diciero *et al.* apud Oliva *et al.*, 2001b¹⁰), *B. unguolata*, BuXI (Oliva *et al.*, 1996), *B. bauhinoides*, BbKI e BbCI (Oliva *et al.*, 2001a; de Oliveira *et al.*, 2001), e *B. rufa*, BrPI (Neuhof *et al.*, 2003) e gBrEI (Oliva, M.L.V., 2004¹¹). As sementes de *Bauhinia* contêm grandes quantidades de inibidores de serina proteinases, de 2 a 4 mg/g de semente (Oliva *et al.*, 2001b).

BbKI (*Bauhinia bauhinoides* Kallikrein Inhibitor) é um inibidor de serina proteinases e apresenta homologia com outros inibidores do tipo Kunitz, especialmente por ter o resíduo de arginina (63) na posição P1 do sítio reativo, porém

¹⁰ Diciero *et al.* The complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from *Bauhinia variegata* var. *candida* seeds. *J. Prot. Chem.* 17, 827-834, 1998 apud Oliva, M.L., Santomauro-Vaz, E.M., Andrade, S.A., Juliano, M.A., Pott, V.J., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M. *Biol. Chem.* 382, 109-113, 2001.

¹¹ Oliva, M.L.V. – Comunicação pessoal (2004).

não apresenta pontes dissulfeto, tendo somente um resíduo de cisteína na posição C-terminal (resíduo 154). BbKI já teve sua estrutura primária definida (Oliva *et al.*, 2001a) sendo a proteína composta de 164 resíduos de aminoácidos e apresenta uma massa molecular de 18.034 (composição elementar C₈₁₃ H₁₂₇₃ N₂₁₈ O₂₄₀ S₁). Suas características estruturais particulares favorecem a inibição de tripsina (K_i 0,6 nM) (Oliva *et al.*, 2001a), de calicreína plasmática (K_i 0,35 nM) (Oliva *et al.*, 2001a) e tissular (Oliva, M.L.V., 2002¹²). A atividade inibitória também foi determinada para quimiotripsina (K_i 2,7 nM) e plasmina (K_i 33,1 nM), porém não houve inibição de trombina, fator Xa e calicreína de porco.

Dentre os inibidores BvTI, BuXI e BbKI, o último é o mais efetivo contra a calicreína plasmática, seguido de BuXI e BvTI. A homologia de BbKI com metade da bradicinina do cininogênio pode explicar a forte ligação com a calicreína quando comparada aos outros dois inibidores. Resultados preliminares indicam que o resíduo do sítio ativo envolvido inicialmente na inibição da calicreína plasmática seja a arginina da posição P7 e não da P1 envolvida na inibição de tripsina (Oliva *et al.*, 2001b).

¹² Oliva, M.L.V. – Comunicação pessoal (2002).

1.4. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral a disponibilização de BbKI de forma heteróloga para estudos e análises estruturais. Para tanto, os seguintes objetivos específicos e/ou complementares foram propostos:

- ✓ Isolar o cDNA de BbKI e caracterizá-lo;
- ✓ Montar um sistema de expressão bacteriano para a produção de BbKI ativo;
- ✓ Purificar o BbKI recombinante (rBbKI);
- ✓ Cristalizar e analisar a estrutura cristalográfica de rBbKI;
- ✓ Avaliar se há interferência na estrutura secundária e na atividade biológica da proteína madura em função da presença do peptídeo C-terminal.

1.5. Referências bibliográficas

- Bode, W. & Huber, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1477**, 241-252, 2000.
- De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., Ceci, L.R. PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*. **30** (1), 2002.
- de Oliveira, C., Santana, L.A., Carmona, A.K., Cezari, M.H., Sampaio, M.U., Samapaio, C.A., Oliva, M.L. Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds. *Biol. Chem.* **382** (5), 847-852, 2001.
- Franco, O.L., Grossi de Sá, M.F., Sales, M.P., Mello, L.V., Oliveira, A.S., Rigden, D.J. Overlapping Binding Sites for Trypsin and Papain on a Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from *Prosopis juliflora*. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*. **49**, 335-341, 2002.
- Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in plant science*. **2** (10), 379-384, 1997.

- Laskowski Jr, M. & Qasim, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochimica et Biophysica Acta*. **1477**, 324-337, 2000.
- Lawrence, P. K. & Koundal, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. **5** (1), 93-109, 2002.
- Murzin, A.G., Lesk, A.M., Chothia, C. Patterns of Structure and Sequence in the Kunitz Inhibitors Interleukins-1 β and 1 α and Fibroblast Growth Factors. *J.Mol.Biol.* **223**, 531-543, 1992.
- Neuhof, C., Oliva, M.L., Maybauer, D., Maybauer, M., de Oliveira, C., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A., Neuhof, H. Effect of plant Kunitz inhibitors from *Bauhinia bauhinoides* and *Bauhinia rufa* on pulmonary edema caused by activated neutrophils. *Biol. Chem.* **384**, 6, 939-944, 2003. /Resumo/.
- Oliva, M.L, Sallai, R.C., Sampaio, C.A., Fritz, H., Auerswald, E.A., Tanaka, A.S., Torquato, R.J., Sampaio, M.U. *Bauhinia* serine proteinase inhibitors: effect on factor X, factor XII and plasma kallikrein. *Immunopharmacology*. **32**, 85-87, 1996.
- Oliva, M.L., Mendes,C.R., Juliano, M.A., Chagas, J.R., Rosa, J.C., Greene, L.J.,Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M. Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinoides* seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates.*Immunopharmacology* **45**, 163-169, 1999.
- Oliva, M.L., Mendes,C.R., Santomauro-Vaz, E.M., Juliano, M.A., Mentele,R., Auerswald, E.A., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M. *Bauhinia bauhinoides* plasma kallikrein inhibitor: interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence.*Curr. Med. Chem.* **8** (8), 977-984, 2001a.
- Oliva, M.L., Santomauro-Vaz, E.M., Andrade, S.A., Juliano, M.A., Pott, V.J., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M. Synthetic Peptides and Fluorogenic Substrates Related to the Reactive Site Sequence of Kunitz-Type Inhibitors Isolated from *Bauhinia*: Interaction with Human Plasma Kallikrein. *Biol. Chem.* **382**, 109-113, 2001b.
- Richardson, M. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. *Phytochemistry*. **16**, 159-169, 1977.
- Richardson, M. Seed Storage Proteins: The Enzyme Inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*. **5**, 259-305, 1991.
- Ryan, C.A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annu.Rev.Phytopathol.* **28**, 425-449, 1990.
- Sampaio, C.A.M., Oliva, M.L.V., Sampaio, M.U., Batista, I.F.C., Bueno, N.R., Tanaka, A.S., Auerswald, E.A., Fritz, H. Plant serine proteinase inhibitors. Structure

and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. *Immunopharmacology* **32**, 62-66, 1996.

Ok Stryer, L. Bioquímica. 3ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 180-190, 200-209, 1992.

Ok Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. Fundamentos de Bioquímica. 1ªed. Artmed Editora, Porto Alegre, pp 307-319, 2000.

Yousef, G.M., Diamandis, E.P. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: Emerging candidate tumour markers. *Clinical Biochemistry*. **36**, 443-452, 2003.

Internet:

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>

Capítulo 2

Isolamento e Caracterização do cDNA de BbKI

2.1. RT-PCR

O fragmento gênico codificador da proteína madura foi amplificado por RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*). Baseando-se na estrutura primária protéica de BbKI (Oliva *et al.*, 2001), foram sintetizados *primers* degenerados (**Tabela 2.1.1**) correspondentes às porções amino e carboxi-terminal da sequência de aminoácidos descrita (**figura 2.1.1**). A degeneração dos *primers* foi minimizada, com base na tabela de códons preferenciais para espécies de *Bauhinia* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), principalmente na porção 3'dos mesmos.

SVVVDTNQGQPVSN GADAYYLVPVSHGHAGLALAKIGNEAEPRVVLDPHHRPGL PVRFESPLRINI IKESYFLNIKFGPSSSDSGVWDV IQQDPIGLAVKVTDTKSLL GPFKVEKEGEGYKIVYYPERGQTGLDIGLVHRNDKYYLAVKDGEPCVFKIRKAT DE

Figura 2.1.1. Sequência primária de BbKI (*Bauhinia bauhinoides* kallikrein inhibitor). Em destaque, as regiões escolhidas para a síntese dos *primers* degenerados utilizados no RT-PCR.

Para o RT-PCR, o RNA total de sementes de *B. bauhinoides* imaturas (cedidas gentilmente pela Profª. Drª. Maria Luiza V. Oliva, do Departamento de Bioquímica da UNIFESP, e armazenadas a -80°C) foi extraído, sendo utilizado para

isso o kit *RNAeasy Plant Mini* (Qiagen). O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (HITACHI U-2001), medindo-se a absorbância em 260 nm ($D.O_{260nm} = 40\mu g/\mu L$).

Tabela 2.1.1. Sequências dos *primers* usados neste trabalho (sintetizados pela Gibco-BRL).

Primers usados na clonagem	BbKI-D Sense 5' GTNGTNGAYACHAAYGGHCAACC 3'
	BbKI-D Reverse 5' TTCRTCDTGDGCYTDDCKDAT 3'
Primers usados nos RACEs	RACE5BB-1 5' GCAAGTGGGGTTTCAAATC3'
	RACE5BB-2 5' CAACTGCTTTTGGCTCTGC3'
	C-EcoRI 5' AAGGAATTCCCCCCCCCCCCCCC 3'
	RACE3'BbKIP 5' GATTGTGTACTACCCTGAGC 3'
Primers usados na subclonagem	BbKI-Sense/NdeI 5' GAGATTCCATATGTCGGTCGTTGTCGACACCAATGG 3'
	BbKI-Reverse/EcoRI 5' CGAATTCTTACTCATCAGTTGCCTTCCTTATCTTG 3'
Primer usado na subclonagem da rBbKI-Cterminal	C-termbbkiEcoRI 5' <u>GGAATTCTTAAACGATAGACATGATACCAGCGAAAGATTCC</u> TC ATCAGTTGCCTTCCTTATC3'

* sítios de restrição estão sublinhados.

O RT-PCR foi realizado seguindo o protocolo do kit *Access RT-PCR System* (Promega). A mistura da reação foi a seguinte:

Mistura de reação do RT-PCR	Quantidade final
RNA total da semente de <i>B. bauhinioides</i>	0,65µg
Primer BbKI-D Sense	50 pmol
Primer BbKI-D Reverse	50 pmol
dNTPs	2 mM
MgSO ₄	1 mM
AMV/Tf/5x Reaction Buffer	[1 X]
AMV Reverse Transcriptase	5 U
Tf/DNA Polymerase	5 U
Água livre de RNase	29 µL
Volume final da reação	50 µL

A reação de polimerização foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) sob as seguintes condições:

Síntese da primeira fita de cDNA

1 ciclo de 48°C por 45 min.

Síntese da segunda fita e amplificação

Desnaturação a 94°C por 2 min.

40 X { 94 °C por 30 s. (desnaturação)
55°C por 1 min. (anelamento)
68 °C por 2 min. (extensão)

Extensão final a 68 °C por 7 min.

A análise de 5 µL do produto da reação (**figura 2.1.2**) foi realizada por eletroforese horizontal em um gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão TAE [1X], visualizado sob luz ultravioleta. O padrão utilizado foi *1 Kb DNA Ladder* (GibcoBRL). Na figura 2.1.2, uma banda correspondente a aproximadamente 500 pb pode ser visualizada representando o tamanho esperado do fragmento do gene *bbki*, deduzido a partir da sequência de aminoácidos da proteína madura (Oliva *et al.*, 2001).

Figura 2.1.2. Amplificação parcial do gene *bbki* através de RT-PCR. Foram utilizados *primers* degenerados (*primers* BbKI-D *sense* e BbKI-D *reverse*). Produto da amplificação observado em gel de agarose 0,8%, TAE [1X], corado com brometo de etídeo e transiluminado por luz ultravioleta. (1) Padrão de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (GibcoBRL); (2) Controle positivo do kit (~300pb); (3) Banda correspondente a amplificação parcial do gene *bbki* (~500pb).

Este fragmento amplificado por PCR foi submetido a um gel preparativo, retirado deste e purificado pelo kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), segundo o protocolo do fabricante. Então, este fragmento foi ligado no vetor de clonagem pGEM-T, de acordo com o protocolo *pGEM-T Vector System I* (Promega). A reação da mistura de ligação entre vetor e fragmento foi a seguinte:

Reagentes da mistura de ligação*	Quantidade final
Produto de PCR	~150 ng
Vetor pGEM-T (50 ng/ µL)	1 µL
Rapid Ligation buffer, T ₄ DNA Ligase (2X)	5 µL
T ₄ DNA Ligase (3 U/ µL)	1 µL
Volume final	10 µL

* reação incubada a 4°C, *overnight*.

Dois µL da mistura de ligação foram utilizados numa transformação de células *Escherichia coli* linhagem DH5α eletrocompetentes (Sambrook *et al.*, 1989). As células foram plaqueadas em meio Lúria-Bertani (LB) contendo X-gal (0,1 mg/mL) (Gibco BRL), IPTG (0,45 mM) (Sigma) e ampicilina (50 µg/mL) (Sigma), a fim de selecionar as colônias positivas (brancas) das negativas (azuis). As colônias positivas foram coletadas e tiveram suas células ressuspensas assepticamente em 10 µL de água MilliQ estéril. As suspensões bacterianas foram aquecidas a 100°C, por 5 min., e 5 µL foram utilizados num PCR de colônia, descrito a seguir.

Mistura da reação de PCR de colônia	Quantidade final
DNA (colônia positiva)	5 µL
Primer BbKI-D Sense	50 pmol
Primer BbKI-D Reverse	50 pmol
dNTPs	2 mM
MgCl ₂	1,25 mM
Tampão da Taq DNA Polimerase [10X]	[1X]
Taq DNA Polimerase	0,2 U
Água MilliQ	14,55 µL
Volume final	25 µL

Ciclo:

Desnaturação a 94°C por 2 min.

30 X { 94 °C por 30 seg. (desnaturação)
55°C por 1 min. (anelamento)
72 °C por 2 min. (extensão)

Extensão final a 72 °C por 7 min.

Após a análise dos produtos do PCR de colônia (não mostrado aqui), os clones que continham o DNA de interesse foram confirmados por seqüenciamento automático (Sanger *et al.*, 1977), realizado num seqüenciador ABI Prism 377 (Perkin Elmer), segundo o protocolo do fabricante. Uma seqüência nucleotídica de 492 pb, codificadora da proteína com 164 resíduos de aminoácidos foi obtida. Esta seqüência foi submetida a uma pesquisa no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) através do programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997), o qual não retornou seqüências com qualquer similaridade. Como esperado, entretanto, o resultado da busca foi positivo quando a seqüência submetida foi a seqüência de aminoácidos deduzida. A seqüência nucleotídica de BbKI (**figura 2.1.3**) foi depositada no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e recebeu o código de acesso AY341934.

>bbki madura-pGEM
5' TCGGTCGTTGTCGACACCAATGGCCAGCCGGTGAGCAATGGCGCCGACGCATACTATCTC
GTACCACTCTCTCATGGTCATGCTGGGTAGCACTCGCCAAGATTGGAAACGAAGCAGAGCC
AAGAGCAGTTGTTTTGGATCCTCACCACCGTCCCGGTTTACCGGTTAGATTTGAATCCCCAC
TTCGAATTAATATCATCAAAGAGTCTTATTTCTCTCAATATCAAATTTGGACCCTCTTCATCT
GATTCGGGAGTCTGGGACGTTATCCAACAAGACCCAATCGGCTTGCGGGTGAAAGTCACAGA
CACTAAATCTTTACTGGGTCCATTTAAAGTTGAGAAAGAAGGTGAAGGGTACAAGATTGTGT
ACTACCTGAGCGGGGCCAGACCGGGCTCGATATCGGGCTTGTTACAGAAATGATAAATAT
TATTTGGCTGTGAAAGATGGGGAGCCATGCGTATTCAAGATAAGGAAGGCAACTGATGAG3'

Figura 2.1.3. Seqüência nucleotídica de BbKI.

2.2. RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

A fim de se obter informações a respeito das regiões 3' e 5' do cDNA da BbKI, foi realizada a técnica de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), segundo descrito em Bertoli (1997).

RACE é uma técnica que permite a amplificação de qualquer extremidade 5' ou 3' de um cDNA específico (RACE-5' e RACE-3' respectivamente) partindo-se de uma população de mRNA, que pode estar contida no RNA total. O método permite a amplificação de regiões com seqüências desconhecidas e requer somente o conhecimento de uma única seqüência curta dentro do mRNA de interesse (Bertoli, 1997). Esta técnica pode trazer interessantes informações, inclusive averiguar se a proteína contém algum sinal de endereçamento para um sítio específico da célula na biossíntese.

Nesta técnica, para a produção do cDNA, é utilizado um *primer* específico, que se anela numa seqüência conhecida dentro do mRNA, ou um oligo-dT, que se anela a cauda poli-A do mRNA. Este cDNA, posteriormente servirá como molde para um PCR, onde *primers* específicos e adaptadores serão utilizados para amplificar a região 3' (no caso do RACE 3') ou a região 5' (RACE 5'). A **figura 2.2.1** contém um modelo representativo do método descrito por Bertoli (1997), adaptado ao experimento realizado.

Figura 2.2.1. Esquema ilustrativo do método RACE (adaptado de Bertoli, 1997).

No procedimento experimental para o RACE 5' foram utilizados 0,6 µg de RNA total da semente de *B. bahinioides* e 15 pmol do *primer* específico RACE5BB-1 (tabela 2.1.1), além da *AMV Reverse Transcriptase* (Promega), na síntese do cDNA. Uma transferase terminal (Life Technologies) foi usada para adicionar uma cauda poli-G na primeira fita (extremidade 3' do cDNA) do RACE 5'. Uma alíquota de 3 µL desse cDNA juntamente com 50 pmol dos *primers*

RACE5BB-2 e C-*EcoRI* (tabela 2.1.1) foram usados em um PCR, cujo os outros componentes da reação foram aqueles fornecidos pelo kit *Access RT-PCR System*.

O RACE 3' foi realizado utilizando-se o kit *Access RT-PCR System* segundo as instruções do fabricante. A mesma quantidade de RNA total usada no RACE 5' foi usada nesta etapa. Foram adicionados à reação de extensão do cDNA, 50 pmol do *primer* específico RACE3'BbKIP e 50 pmol de um oligonucleotídeo poli-T, que serviu como *primer* e para a extensão do cDNA (tabela 2.1.1). A reação de polimerização foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) nas seguintes condições:

Síntese da primeira fita de cDNA

1 ciclo de 48°C por 45 min.

Síntese da segunda fita e amplificação

Desnaturação a 94°C por 2 min.

40 X $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C por 30 s. (desnaturação)} \\ 55^{\circ}\text{C por 1 min. (anelamento)} \\ 68^{\circ}\text{C por 2 min. (extensão)} \end{array} \right.$

Extensão final a 68 °C por 7 min.

A análise de 5 µL dos produtos das reações foi realizada por eletroforese em um gel de agarose 0,8% TAE [1X] (figura 2.2.2). Os produtos amplificados nos RACEs 3' e 5' apresentaram os tamanhos de aproximadamente 300 pb e 200 pb, respectivamente. Os tamanhos dos produtos foram compatíveis com o esperado.

Figura 2.2.2. Análise dos produtos amplificados a partir dos RACEs 3' e 5'. Eletroforese em gel de agarose, TAE [1X]. Painei (A) RACE 3': (1) Padrão de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (GibcoBRL); (2) Controle positivo do kit (~300pb); (3) Banda correspondente ao fragmento amplificado RACE 3' (~300pb). Painei (B) RACE 5': (1) Padrão de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (GibcoBRL); (2) Controle positivo do kit (~200pb); (3) Banda correspondente ao fragmento amplificado RACE 5' (~200pb).

Os produtos totais dos PCRs (tanto do RACE 3' quanto do 5') foram purificados pelo kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, segundo o protocolo do fabricante. Ambos fragmentos amplificados e purificados foram inseridos em vetores pGEM-T. A reação da mistura de ligação entre vetor e fragmento foi a seguinte:

Reagentes da mistura de ligação*	Quantidade final
Produto de PCR	~100 ng
Vetor pGEM-T (50 ng/ µL)	1,5 µL
Rapid Ligation buffer T ₄ DNA Ligase (2X)	5 µL
T ₄ DNA Ligase (3 U/ µL)	1 µL
Água estéril	0,5 µL
Volume final	10 µL

* reação foi incubada à 4°C, *overnight*.

50 µL de células de *E. coli* linhagem DH5α competentes por cloreto de cálcio (Ausubel *et al.*, 1995), foram transformadas com 8 µL da mistura de ligação, por choque térmico e plaqueadas em meio LB ágar contendo X-gal (0,1 mg/mL), IPTG (0,45 mM) e ampicilina (50 µg/mL). Os clones positivos foram submetidos ao seqüenciamento automático de DNA, como já descrito anteriormente.

2.2.1. Análise e discussão dos resultados do RACE

A partir das seqüências obtidas pelo RACE 3' e 5', foi possível alinhá-las para montar a seqüência do cDNA e desta deduzir a seqüência completa de BbKI imatura. Analisando o transcrito completo foi possível caracterizá-lo, consistindo de 823 nucleotídeos e uma cauda poli-A, contendo uma fase aberta de leitura – ORF (*open reading frame*) correspondente a uma proteína com 193 resíduos de aminoácidos (**figura 2.2.1.2**). Quando confrontadas a seqüência protéica deduzida do cDNA àquela seqüência primária já publicada, foi possível observar que BbKI sofre um processamento traducional que consiste da proteólise em dois sítios específicos. Este inibidor apresentou uma extensão amino-terminal característica (peptídeo sinal) e um peptídeo extra carboxi-terminal, sugerindo que a BbKI deva ser inicialmente sintetizada como um prepropeptídeo com a seguinte estrutura: peptídeo N-terminal (19 resíduos), proteína madura (164 resíduos) e peptídeo C-terminal (10 resíduos).

Pré-peptídeos ou peptídeos sinais são muitas vezes envolvidos no endereçamento, enquanto pró-peptídeos ou pró-regiões podem regular muitos processos (Martoglio & Dobberstein, 1998). Dependendo se sua função eles podem ser classificados em dois grupos: a classe I de pró-peptídeos, necessários para o correto enovelamento das proteínas as quais estão ligados, e a classe de pró-peptídeos II, que influenciam outros processos celulares, tais como secreção, atividade ou montagem molecular (Bronsons *et al.*, 2003).

2.2.1.1. Breve comentário sobre proteínas vacuolares

Para continuar a análise das informações obtidas a partir do RACE, será feito agora um breve comentário a respeito das proteínas de estocagem características de sementes e sua possível localização na célula.

Sementes têm a característica de apresentarem células com numerosos vacúolos. Vacúolos são únicos, dentre os compartimentos intracelulares dos eucariotos, em termos de versatilidade, e podem conter proteínas tão diversas quanto hidrolases, lectinas, inibidores de enzimas, proteínas inativadoras de ribossomos altamente tóxicas e proteínas de estocagem. Há, no mínimo, dois tipos de vacúolos: vacúolos líticos (LV) e vacúolos de estocagem de proteínas (PSV). Em muitas células maduras, os dois tipos de vacúolos provavelmente fundem-se, entretanto, a coexistência de LVs e PSVs distintos em células maduras implica na presença de mais de um mecanismo para seleção de proteína vacuolar. Proteínas vacuolares pertencem a um grupo muito maior de proteínas que são coletivamente chamadas de proteínas secretórias porque elas são transportadas para seus diferentes destinos pela via secretória através do sistema de endomembranas. A maior rota biossintética de proteínas secretoras começa no retículo endoplasmático, passa pelo complexo de Golgi e finalmente encontra os vacúolos ou a superfície celular (**Figura 2.2.1.1**) (Vitale e Raikhel, 1999).

Figura 2.2.1.1. Um modelo da rota de proteínas solúveis para diferentes vacúolos. Os círculos em rosa indicam uma proteína direcionada a vacúolos líticos (LVs). Os círculos em azul e em verde indicam duas proteínas direcionadas para vacúolo de estocagem de proteínas. Essas proteínas seguem a rota Golgi-independente (proteínas verdes) ou a mediada pelo Golgi (proteínas azuis), dependendo se a agregação ocorre no retículo endoplasmático ou mais tarde, respectivamente. Corpos multivesiculares, não representados aqui, devem ser o último estado intermediário antes dos vacúolos de estocagem de proteínas (PSVs). A fusão dos vacúolos representa a situação de muitas células maduras, onde os LVs e PSVs fundem-se em um único compartimento capaz de receber ambas as proteínas líticas e de estocagem. O tracejado vermelho representa o revestimento por clatrina (clathrin coat). Abreviações: PAC: vesículas acumuladoras de precursores; DV: vesículas densas; CCV: vesículas revestidas por clatrina (clathrin-coated vesicles). (Ilustração modificada a partir de Vitale e Raikhel, 1999).

A presença de proteínas de estocagem define os PSVs de sementes. Sementes maduras contêm depósitos de proteínas de estocagem densamente empacotados que preenchem inteiramente o PSV. Esses depósitos podem ser diferenciados em diversos subdomínios que contêm diferentes proteínas. Esses subdomínios consistem em matriz protéica, um cristalóide proteináceo, inclusões de fitina e vesículas

intravacuolares derivadas por autofagia, além de proteínas de estocagem auxiliares. Dentre essas últimas, estão as lectinas de sementes, inibidores de α -amilase, que são defensores contra a predação das sementes maduras por insetos (Chrispeels e Raikhel *apud* Herman e Larkins, 1999¹), e inibidores de tripsina tipo Kunitz (Horisberger e Volanthen *apud* Herman e Larkins, 1999²), que também atuam como proteínas de defesa (Herman e Larkins, 1999).

A acumulação de proteínas de estocagem dentro de vacúolos é acompanhada por um processamento adicional que pode servir para modificar e preparar as proteínas para o empacotamento denso. Esse processamento inclui modificações das cadeias polipeptídicas, embora nem todas as proteínas de PSV sejam modificadas depois da deposição (Herman e Larkins, 1999).

Proteínas vacuolares começam sua vida no retículo endoplasmático onde elas entram na via secretória. Assim que a cadeia polipeptídica nascente está sendo traduzida, sua porção N-terminal é removida e, então o processo de tradução continua dentro do lúmen do retículo endoplasmático (Vitale *et al.* *apud* Vitale e Denecke, 1999³). A informação necessária para a distribuição correta de proteínas solúveis para vacúolos tem sido encontrada em pró-peptídeos que podem estar localizados no N- ou C- terminal da proteína ou ser um peptídeo interno. Sem esses pró-peptídeos, proteínas vacuolares são secretadas (Vitale e Raikhel, 1999). Proteínas destinadas para os vacúolos de estocagem podem ou não se mover até o complexo de Golgi e ser empacotadas dentro de grandes e densas vesículas antes de

¹ Chrispeels e Raikhel. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell*. **3**, 1-9, 1991 *apud* Herman, E.M. e Larkins, B.A. *The Plant Cell*. **11**, 601-613, 1999.

² Horisberger e Volanthen. Ultrastructural localization of Kunitz trypsin inhibitor on thin sections of *Glycine max* (soybean) cv Maple Arrow by the gold method. *Histochemistry*. **77**, 313-321, 1983 *apud* Herman, E.M. e Larkins, B.A. *The Plant Cell*. **11**, 601-613, 1999.

³ Vitale *et al.* The role of the endoplasmatic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport. *J.Exp.Bot.* **44**, 1417-1444, 1993 *apud* Vitale, A., Denecke, J. *The Plant Cell*. **11**, 615-628, 1999.

seguirem para os vacúolos de estocagem. A seleção de proteínas de estocagem ocorre no complexo de Golgi ou no próprio retículo endoplasmático (Vitale e Raikhel, 1999).

Seqüências que são necessárias para selecionar algumas proteínas vacuolares têm sido identificadas (**tabela 2.2.1.1**). Todas as seqüências identificadas pertencem à pró-peptídeos, isto é, peptídeos que são removidos pós-traducionalmente no vacúolo ou em um compartimento pré-vacuolar. Mais recentemente esses sinais de encaminhamento para vacúolo foram divididos em 3 categorias: sinais de seleção para vacúolo seqüência-específica (ssVSS), sinais C-terminais (ctVSS) e sinais físico-estruturais (psVSS) (Frigerio *et al.*, 2001). As seqüências ssVSS estão predominantemente localizadas do N-terminal e apresentam o consenso NPIR, o qual não permite alterações nesta seqüência. ctVSS são extremamente variados no tamanho e na composição de aminoácidos e, embora não haja uma seqüência consenso para as seqüências C-terminais, elas são freqüentemente enriquecidas por aminoácidos hidrofóbicos, mas a importância do caráter hidrofóbico não é absoluto. A terceira classe de sinais ainda não foi totalmente definida (Vitale e Raikhel, 1999; Frigerio *et al.*, 2001). Evidentemente, não é fácil identificar seqüências consensos gerais para seleção vacuolar, entretanto, sugere-se que sinais com um consenso como NPIR direcionem proteínas para o LV, enquanto que os sinais menos bem definidos, que são encontrados no C-terminal, direcionem proteínas para o PSV (Neuhaus e Rogers *apud* Vitale e Raikhel, 1999⁴).

⁴ Neuhaus, J.M. e Rogers, J.C. Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant. Mol. Biol.* **38**, 127-144, 1998 *apud* Vitale, A., Raikhel, N.V. *Trends in plant science.* **4** (4), 149-155, 1999.

Tabela 2.2.1.1. Pró-peptídeos envolvidos no encaminhamento de proteínas vacuolares solúveis (tabela extraída de Vitale e Raikhel, 1999).

Sequência	Posição na proteína	Localização da proteína em seu tecido natural
HSRFNPIRLPTTHEPA (esporamina de batata doce)	N	Vacúolos
SSSSFADSNPIR (aleuraina de cevada)	N	LV
VFAEAIAANSTLVAE (lectina de cevada)	C	PSV
GLLVDTM (quitinase de tabaco)	C	Vacúolos
IAGF (2S albumina de castanha-do-Pará)	C	PSV
AFVY (faseolina de feijão comum)	C	PSV
SLLIRPVVPNFN (ricina de mamona)	interno	PSV

Sabendo-se que inibidores tipo Kunitz são amplamente encontrados em sementes e que, por sua vez, estas contêm um alto conteúdo de proteínas de estocagem em vacúolos PSVs, que necessitam de peptídeos sinais para um correto encaminhamento, foram feitas algumas inferências sobre o caminho da BbKI imatura na célula vegetal.

Analisando a seqüência traduzida de BbKI através de uma ferramenta da bioinformática, a seqüência encontrada na porção N-terminal da proteína madura foi identificada como um peptídeo sinal, estando de acordo com sua ausência no inibidor nativo maduro previamente isolado (Oliva *et al.*, 2001). Comparando a seqüência sinal (N-terminal) encontrada em BbKI com algumas seqüências já descritas na literatura (tabela 2.2.1.1) não encontramos similaridades entre elas. Porém, uma predição de localização subcelular a partir da seqüência de aminoácidos, usando os programas SignalP V2.0 e TargetP V1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/>) (Nielsen *et al.*, 1997), mostrou que esse peptídeo N-terminal preenche todas as características de um

peptídeo sinal [19 resíduos formando uma porção altamente hidrofóbica, destacada em azul, precedida de um resíduo básico (em vermelho) na **figura 2.2.1.2**].

Por outro lado, hipóteses para a provável “função” do peptídeo C-terminal foram propostas: (a) ele seria um potencial sinal de encaminhamento para vacúolo ou (b) seria um peptídeo envolvido na inibição da atividade biológica [BbKI poderia ser sintetizada na forma inativa, quando imatura, e quando essa porção C-terminal fosse processada a proteína se tornaria ativa (Denecke, J., 2003⁵)] ou ainda, (c) poderia estar envolvido no correto enovelamento da proteína.

Quando a sequência BbKI-C-terminal foi submetida a programas de predição (TargetP V1.0) não foi encontrada nenhuma identidade sequencial com qualquer outro peptídeo que seja sinalizador para alguma organela. Porém, analisando a sequência primária desse peptídeo (ESFAGIMSIV), observamos que a maioria dos resíduos de aminoácidos são hidrofóbicos, concordando então com o que já foi discutido a respeito das sequências de ctVSS. Outra comparação foi feita entre a BbKI e pró-peptídeos já descritos na literatura (**tabela 2.2.1.1**): os aminoácidos da sequência IAGF, encontrada em 2S albumina de castanha-do-Pará, também aparecem em BbKI, mas com a sequência FAGI. Porém, não foram encontradas relações com outras sequências, exceto a presença predominante de resíduos de caráter hidrofóbico.

Para validar as hipóteses (b) e (c) foram feitas a clonagem, a expressão e a purificação da BbKI madura acrescida da porção C-terminal (10 resíduos), sendo testada a atividade inibitória dessa proteína. Esses resultados serão apresentados e discutidos no próximo capítulo.

⁵ Denecke, J. - Comunicação pessoal (2003).

	<u>M K T T F L A L C</u>	9
TCGCTCCTACCAAAACCCAAACACCAACACA ATGA GACCACTTTCCTTGCACTGTGCT		60
<u>F F L F A Y K A T S S V V V D T N G Q P</u>		29
TCTTTCTTTTTGCCTACAAAGCCACATCTTCGGTCGTTGTCGACACCAATGGCCAGCCGG		120
V S N G A D A Y Y L V P V S H G H A G L		49
TGAGCAATGGCGCCGACGCATACTATCTCGTACCAGTCTCTCATGGTCATGCTGGGTTAG		180
A L A K I G N E A E P R A V V L D P H H		69
CACTCGCCAAGATTGGAAACGAAGCAGAGCCAAGAGCAGTTGTTTTGGATCCTCACCACC		240
R P G L P V R F E S P L R I N I I K E S		89
GTCCCGGTTTACCGGTTAGATTTGAATCCCCACTTCGAATTAATATCATCAAAGAGTCTT		300
Y F L N I K F G P S S S D S G V W D V I		109
ATTTCTCAATATCAAATTTGGACCCTCTTCATCTGATTCTGGGAGTCTGGGACGTTATCC		360
Q Q D P I G L A V K V T D T K S L L G P		129
AACAAGACCCAATCGGCTTGGCGGTGAAAGTCACAGACACTAAATCTTTACTGGGTCCAT		420
F K V E K E G E G Y K I V Y Y P E R G Q		149
TTAAAGTTGAGAAAGAAGGTGAAGGGTACAAGATTGTGTACTACCCTGAGCGGGGCCAGA		480
T G L D I G L V H R N D K Y Y L A V K D		169
CCGGGCTCGATATCGGGCTTGTTACAGAAATGATAAATATTATTTGGCTGTGAAAGATG		540
G E P C V F K I R K A T D E E S F A G I		189
GGGAGCCATGCGTATTCAAGATAAGGAAGGCAACTGATGAGGAAAGCTTTGCTGGAATAA		600
<u>M S I V &</u>		193
TGAGCATCGTTT TGA AGATGCGACGTCGTTTCTCCTCTTACTTTGTAGTTGACTGTGTAAT		660
AATGTAAGATGAACCCTCACTTGTGAGGATCTATCTACTTTGAATAATATCCCTACTTGT		720
TACCTTTCTTGAATGTCTTAATTATAAGTTTTGTGTCGTATCTTCTTCCTTTTTTGTATGC		780
ACCTGCATTTCTGTTATTGTTAATATGGCTAATTGTTTCGTCTAAAAAAGAAAAAAAAA		840

Figura 2.2.1.2. Sequência nucleotídica do mRNA e sequência de aminoácidos deduzida de BbKI. Os números acima representam as posições dos aminoácidos e, os abaixo, as posições dos nucleotídeos na sequência. O peptídeo sinal (amino-terminal) e o carboxi-terminal estão sublinhados. O códon iniciador (ATG) e o de parada (TGA) estão em negrito.

2.3. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser delineadas:

- ✧ O fragmento gênico de BbKI foi clonado com sucesso, sendo a sequência nucleotídica, obtida através da técnica de RT-PCR, composta de 492 pb.
- ✧ As regiões 3' e 5' do cDNA foram caracterizadas pelos resultados obtidos no RACE, mostrando que a proteína é recém-sintetizada com um peptídeo sinal, composto de 19 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal, e um peptídeo C-terminal, com 10 resíduos de aminoácidos, o qual especula-se que seja um sinal de encaminhamento para o vacúolo de estocagem protéica.

2.4. Referências bibliográficas

- Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402, 1997.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struthl, K. *Short protocols in Molecular Biology*. 3ª ed. USA, Ed. John Wiley & Sons, Inc., 1995.
- Bertioli, D. Rapid Amplification of cDNA Ends. In White, B.A. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 67: *PCR Cloning Protocols: From Molecular Cloning to Genetic Engineering*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Cap. 24. p. 233-238, 1997.
- Bronsoms, S., Villanueva, J., Canals, F., Querol, E., Aviles, F.X. Analysis of the effect of the potato carboxypeptidase inhibitor pro-sequence on the folding of the mature protein. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3641-3650, 2003.
- Frigerio, L, Jolliffe, N.A., Di Cola, A., Felipe, D.H., Paris, N., Neuhaus, J., Lord, J.M., Ceriotti, A., Roberts, L.M. The Internal Propeptide of the Ricin Precursor Carries a Sequence-Specific Determinant for Vacuolar Sorting. *Plant Physiology*. **126**, 167-175, 2001.

Herman, E.M. e Larkins, B.A. Protein Storage Bodies and Vacuoles. *The Plant Cell*. **11**, 601-613, 1999.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*. **10**, 1-6, 1997.

Martoglio, B. & Dobberstein B. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* **8**, 410-415, 1998.

Oliva, M.L., Mendes, C.R., Santomauro-Vaz, E.M., Juliano, M.A., Mentele, R., Auerswald, E.A., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A. *Bauhinia bauhinioides* plasma kallikrein inhibitor: interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence. *Curr. Med. Chem.* **8** (8), 977-984, 2001.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^aed., Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467, 1977.

Vitale, A., Denecke, J. The Endoplasmic Reticulum – Gateway of the Secretory Pathway. *The Plant Cell*. **11**, 615-628, 1999.

Vitale, A., Raikhel, N.V. What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends in plant science*. **4** (4), 149-155, 1999.

<http://www.kazusa.or.jp/codon/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
<http://www.cbs.dtu.dk/>

Capítulo 3

Expressão, Purificação e Atividade de rBbKI

3.1. Subclonagem em vetor de expressão pET

A partir dos resultados da clonagem do cDNA de BbKI e uma vez sua sequência nucleotídica determinada, novos *primers* foram construídos para amplificar o fragmento referente à cadeia da proteína madura a fim de expressar o produto correspondente. Um sítio de restrição *NdeI* foi incluído no *primer sense* e um sítio *EcoRI*, no *primer reverse* (tabela 2.1.1). Tais sítios foram escolhidos com base nos vetores de expressão que iriam ser utilizados, o pET28a e o pET29a (Novagen, Milwaukee, WI), os quais possuem em seu múltiplo sítio de clonagem os já referidos sítios de restrição. Tal escolha em pET28a resultaria na expressão da proteína de interesse fusionada na porção N-terminal a um polipeptídeo de 6 histidinas mais um sítio de clivagem, reconhecido pela trombina. Na escolha de subclonar o fragmento de interesse nos sítios *NdeI* e *EcoRI* do vetor pET29a, a proteína recombinante seria expressa integralmente, sem nenhum polipeptídeo ou proteína de fusão.

Numa primeira tentativa para se amplificar o fragmento desejado foi utilizado, como DNA molde, um dos clones positivos obtidos na clonagem feita anteriormente. Porém, as sequências nucleotídicas das porções 5' e 3' obtidas

(regiões de anelamento dos *primers*) não correspondiam exatamente àquelas encontradas no RACE 5'e 3'. Isso se deveu ao fato do uso de *primers* degenerados na amplificação por RT-PCR.

Assim, o resultado obtido nesta tentativa inicial foi negativo, optando-se então por realizar um novo RT-PCR, usando o kit *Acess RT-PCR System* e os *primers* não degenerados. A partir de 0,16 µg de RNA total de semente de *B. bauhinioides* e 50 pmol de cada *primer* (BBKI-Sense/*Nde*I e BBKI-Reverse/*Eco*RI) foi realizada a seguinte reação de RT-PCR:

Mistura de reação do RT-PCR	Quantidade final
RNA total da semente de <i>B. bauhinioides</i>	0,16 µg
<i>Primer sense</i> BbKI-Sense/ <i>Nde</i> I	50 pmol
<i>Primer reverse</i> BbKI-Reverse/ <i>Eco</i> RI	50 pmol
dNTPs	2 mM
MgSO ₄	1 mM
AMV/ <i>Tf</i> /5x Reaction Buffer	[1 X]
AMV Reverse Transcriptase	5 U
<i>Tf</i> /DNA Polymerase	5 U
Água livre de RNase	23 µL
Volume final da reação	50 µL

A reação de síntese/polimerização foi realizada nas seguintes condições:

Síntese da primeira fita de cDNA

1 ciclo de 48°C por 45 min.

Síntese da segunda fita e amplificação

Desnaturação a 94°C por 2 min.

2 X { 94 °C por 30 s. (desnaturação)
55°C por 1 min. (anelamento)
68 °C por 2 min. (extensão)

38 X { 94 °C por 30 s. (desnaturação)
50°C por 1 min. (anelamento)
68 °C por 2 min. (extensão)

Extensão final a 68 °C por 7 min.

A análise de 5 µL do produto da reação foi realizada por eletroforese em um gel de agarose 0,8% TAE [1X] (**figura 3.1.1**). O resultado foi a amplificação de um produto de aproximadamente 500 pb, referente à cadeia madura de BbKI.

Figura 3.1.1. Amplificação parcial do gene *bbki* a partir de RT-PCR correspondente à região codificante da cadeia madura (*primers* BbKI-Sense/*Nde*I e BbKI-Reverse/*Eco*RI). (1) Padrão de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (GibcoBRL); (2) Banda de ~500pb correspondente à amplificação parcial de *bbki* e banda menor que 200pb difusa mostrando excesso de *primers*.

O produto total do PCR foi purificado por kit *Qiaquick PCR Purification* (Qiagen) segundo o protocolo do fabricante, e inserido em vetor pGEM-T. A propagação do vetor foi feita em *E. coli* DH5-α em células competentes por CaCl₂ transformadas por tratamento de choque térmico. O DNA dos clones positivos foi seqüenciado, como já descrito.

Após o sequenciamento, o DNA plasmidial de um clone com a sequência correta, denominado pGEM-BbKI, foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI* (Promega) por 20h a 37°C (tabela 3.1.1). Tal digestão resultou em extremidades coesivas necessárias para direcionar corretamente a ligação do fragmento com os vetores, os quais foram previamente linearizados com as mesmas enzimas.

Tabela 3.1.1. Reação de digestão do produto amplificado.

DNA plasmidial (75ng/ µL)	<i>EcoRI</i> (5U/ µL)	<i>NdeI</i> (5U/ µL)	Tampão React 3 [10X] (Gibco-BRL)	Água estéril	Volume da reação
30 µL	1 µL	1 µL	4 µL	4 µL	40 µL

O produto da digestão foi purificado com o kit *Perfect Gel Clean Up* (Eppendorf) e quantificado por gel de agarose 0,8% TAE [1X]. A seguir, esse fragmento foi inserido nos dois vetores de expressão: pET28a e pET29a, previamente digeridos, purificados e quantificados. As reações de mistura de ligação (tabela 3.1.2) foram incubadas à 4°C, *overnight*.

Tabela 3.1.2. Mistura de ligação entre o fragmento codificador da cadeia madura de BbKI e os vetores de expressão pET28a e pET29a.

Vetor (50 ng/ µL): pET28a ou pET29a	Fragmento digerido e purificado (50ng/µL)	<i>Rapid ligation buffer, T₄ DNA Ligase (5X)</i> (Promega)	T ₄ DNA Ligase (3U/µL) (Promega)	Água estéril	Volume da reação
2 µL	1 µL	2 µL	1 µL	4 µL	10 µL

Células de *E.coli* DH5α competentes por cloreto de cálcio foram transformadas com os plasmídeos recombinantes (denominados como pBbKI-28a e pBbKI-29a) por tratamento de choque térmico. Os transformantes foram selecionados por resistência a canamicina e os clones positivos foram submetidos a

um PCR de colônia, cujo produto foi analisado em gel de agarose 0,8% TAE [1X]. Todas as colônias escolhidas continham o inserto de tamanho desejado (~500pb) para ambos os vetores.

Mistura da reação para o PCR de colônia	Quantidade final
DNA da colônia	5 µL
Primer BbKI-Sense/NdeI	50 pmol
Primer BbKI-Reverse/EcoRI	50 pmol
dNTPs	0,2 mM
MgCl ₂	2,5 mM
Tampão da Taq DNA Polimerase [10 X]	[1X]
Taq DNA Polimerase	0,2 U
Água MilliQ	14,55 µL
Volume final	25 µL

Ciclo:

Desnaturação a 94°C por 2 min.

30 X {

94 °C por 30 s. (desnaturação)

50 °C por 30 s. (anelamento)

72 °C por 30 s. (extensão)

Extensão final a 72 °C por 7 min.

As colônias contendo os clones positivos foram então inoculadas, separadamente em 5 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina (Sigma) e incubadas a 37°C, sob agitação (250 rpm), por até 16h. Posteriormente, foi realizada uma extração de DNA plasmidial de ambas as construções utilizando para isso o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). Os DNAs plasmidiais foram então usados na transformação de células *E. coli* BL21(DE3) e ER2566 competentes por cloreto de cálcio. Os transformantes foram selecionados por resistência à canamicina e utilizados em testes de expressão.

3.2. Subclonagem da cadeia madura+C-terminal

A partir dos resultados obtidos pelos RACEs, os quais mostraram que a BbKI recém-sintetizada possui tanto um peptídeo sinal (N-terminal) com 19 resíduos de aminoácidos, quanto 10 resíduos adicionais no C-terminal, decidiu-se clonar e expressar o fragmento gênico referente a cadeia madura mais os resíduos do C-terminal, a fim de se determinar se esse peptídeo interfere na atividade da proteína madura e/ou contribui para seu enovelamento.

A sequência codificante para os resíduos adicionais na porção C-terminal foi inserida na porção 3' da sequência referente à cadeia madura, através de um PCR. Um novo *primer reverse* (C-term**bbki***EcoRI*) foi sintetizado (**tabela 2.1.1**), no qual o códon de parada foi excluído e a sequência desejada inserida usando códons preferenciais para *E.coli*. Para amplificar essa sequência, uma reação de PCR foi montada, utilizando como DNA molde o plasmídeo pGEM-BbKI:

Mistura da reação de PCR	Quantidade final
DNA (plasmídeo pGEM-BbKI)	~ 80 ng
Primer sense: BbKI-Sense/ <i>NdeI</i>	50 pmol
Primer reverse: C-term bbki <i>EcoRI</i>	50 pmol
dNTPs	2 mM
*Tampão [10X] <i>High Fidelity buffer with 25 mM Mg⁺²</i>	[1 X]
* <i>Taq High Fidelity</i>	0,5 U
Água estéril	19,5 µL
Volume final	25 µL

* tampão e enzima da Eppendorf

Ciclo:

Desnaturação a 94°C por 1 min.

10 X { 94 °C por 30 s. (desnaturação)
50 °C por 30 s. (anelamento)
68 °C por 1 min. (extensão)

20 X { 94 °C por 30 s. (desnaturação)
55 °C por 30 s. (anelamento)
68 °C por 1 min. (extensão)

Extensão final a 68 °C por 7 min.

5 µL do produto da reação foram submetidos à eletroforese em um gel de agarose 0,8% TAE [1X]. Um produto amplificado ligeiramente maior que 500pb foi obtido, como demonstrado na **figura 3.2.1**. Esse tamanho era o esperado, pois tendo a proteína madura 164 resíduos de aminoácidos, adicionados os 10 resíduos no C-terminal (174 resíduos de aminoácidos) resultam em uma sequência nucleotídica de 522b.

Figura 3.2.1. Análise da amplificação de BbKI-C-terminal. (1) Padrão de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (GibcoBRL); (2) Produto da amplificação. A seta indica a banda de amplificação de rBbKI-C-terminal em torno de 500pb. A banda menor que 250pb corresponde ao excesso de *primers*.

O produto total do PCR foi purificado em *MicroSpin S-400 HR Columns* (Pharmacia Biotech) segundo instruções do fabricante, e em seguida foi feita uma digestão (**tabela 3.2.1**) com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI*, a 37°C por 20h.

Tabela 3.2.1. Reação de digestão do produto amplificado (rBbKI-C-terminal).

Produto de PCR purificado	<i>EcoRI</i> (5U/ µL)	<i>NdeI</i> (5U/ µL)	Tampão React 3 [10X] (Gibco-BRL)	Volume da reação
25 µL	1 µL	1 µL	3 µL	30 µL

O produto da digestão foi purificado com o kit *Perfect Gel Clean Up* (Eppendorf) e quantificado por gel de agarose 0,8% TAE [1X]. Então, esse fragmento foi inserido em vetor pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas. A mistura de ligação, incubada à 4°C, *overnight*, vem descrita a seguir:

Reagentes da mistura de ligação	Quantidade final
Vetor pET 28a linearizado	~ 100 ng
Produto de PCR purificado e digerido	~ 180 ng
* <i>Rapid ligation buffer</i> [2X]	[1X]
*T ₄ DNA Ligase	6 U
Volume final	20µL

* tampão e enzima da Promega.

Células de *E. coli* DH5α competentes por cloreto de cálcio foram transformadas com o plasmídeo recombinante denominado pBbKIC-term. Os transformantes foram selecionados em meio LB suplementado por canamicina. As colônias resistentes foram crescidas em 5 mL de LB líquido + 30 µg/mL de canamicina para a extração do DNA plasmidial por lise alcalina (Ausubel *et al.*, 1995). Os transformantes foram submetidos a uma análise de restrição com endonucleases *NcoI* e *EcoRI*, observada em eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE [1X]. A inserção da sequência correta foi então confirmada por sequenciamento.

O DNA de um clone foi usado na transformação de células *E. coli* BL21(DE3) competentes por cloreto de cálcio. Os transformantes foram selecionados por resistência a canamicina e utilizados em testes de expressão.

3.3. Expressão heteróloga de BbKI em células de *E. coli*

3.3.1. Testes de indução

Tanto a construção em pET28a quanto a em pET29a (pBbKI-28a e pBbKI-29a) em ambas as células, *E. coli* BL21(DE3) e ER2566, foram usadas em um teste de expressão. A construção pBbKIC-term em *E. coli* BL21(DE3) também foi submetida ao teste de expressão.

Os transformantes contendo a sequência nucleotídica foram puncionados e utilizados em um pré-inóculo de 5 mL, o qual foi incubado a 37°C, *overnight*, sob agitação (250 rpm). Este pré-inóculo então foi diluído em 500 mL de meio LB, suplementado com canamicina (50 µg/mL). As células foram crescidas a 37°C até uma D.O._{600 nm} ≈ 0,4 - 0,6. Uma vez atingida tal densidade, correspondente ao início da fase exponencial de crescimento, a expressão da proteína recombinante foi induzida inicialmente com 0,2 mM IPTG (concentração final), a 37°C por 4h sob agitação (250 rpm). Alíquotas de 200 µL da cultura foram coletas antes e após a indução, de hora em hora. Estas amostras foram centrifugadas por 1 min. em microcentrífuga, em velocidade máxima, descartando os sobrenadantes e ressuspensando os precipitados com 30 µL de água MilliQ. Foram adicionados 15 µL de tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol e tais amostras foram fervidas por 5 min. Estas alíquotas foram posteriormente submetidas a eletroforese em gel de

poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). Os marcadores de massa molecular (Sigma) utilizados foram: albumina sérica bovina, BSA (66 kDa), ovalbumina, OVA (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, GAPDH (36 kDa), anidrase carbônica bovina, ACB (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina de soja, ITS (20,1 kDa), α -lactoalbumina bovina, α -LAC (14,2), citocromo C, CITc (12,4 kDa) e aprotinina bovina (6,5 kDa). Os géis foram corados com azul de Comassie.

Tanto na linhagem BL21(DE3), quanto na ER2566, contendo os plasmídeos pBbKI-28a e pBbKI-29a, houve expressão de rBbKI. Na construção com o pBbKI-28a, inicialmente houve uma expressão basal (pré-indução), e após um total de 3h de indução, o máximo de expressão, como visto no gel de eletroforese demonstrado na **figura 3.3.1.1**. Na construção com o pBbKI-29a, a maior taxa de expressão de rBbKI também se deu após 3h de indução (resultados não mostrados).

Figura 3.3.1.1. Teste de indução de rBbKI expressa em *E.coli* BL21(DE3) e ER2566 (pBbKI-28a). SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. M, marcador de massa molecular. Proteínas totais de BL21(DE3) pBbKI-28a (1) não induzidas; (2), (3), (4) e (5) após 1, 2, 3 e 4 h de indução com 0,2 mM IPTG a 37°C, respectivamente; proteínas totais de ER2566 pBbKI-28a (6) não induzidas; (7), (8) e (9) após 1, 2, e 3 h de indução, respectivamente. A seta indica a banda referente a BbKI (~20 kDa).

O resultado da indução da expressão de rBbKI-C-terminal também foi positivo. Após uma hora da indução, uma banda adicional de cerca de 20 kDa pode ser facilmente detectada em SDS-PAGE 15% (**figura 3.3.1.2**), frente à cultura não induzida.

Diversos inibidores tipo Kunitz encontrados em sementes de plantas têm sido clonados e expressos heterologicamente. O mais recente caso foi de um inibidor de α -amilase e subtilisina encontrado em sementes maduras de cevada, o qual foi clonado e expresso em células de *E. coli* (Bonsager *et al.*, 2003). Este inibidor, BASI (*barley α -amylase/subtilisin inhibitor*), que apresenta 30% de identidade sequencial com inibidores de tripsina tipo Kunitz de outras plantas, foi subclonado em dois tipos de vetores de expressão: pTYB1 e pET11a. As proteínas recombinantes, BASI com e sem cauda de histidinas (clonagem em vetor pET) e BASI ligada à proteína de fusão inteína (clonagem em vetor pTYB1), foram expressas com sucesso em linhagens *E. coli* BL21(DE3).

Figura 3.3.1.2. Teste de indução de rBbKI-Cterm expressa em *E. coli* BL21(DE3). SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. M, marcador de massa molecular. Proteína total das células BL21(DE3) com o vetor recombinante (1) não induzidas; (2), (3) e (4) após 1h, 2h e 3h de indução com 0,2 mM IPTG a 37°C, respectivamente. A seta indica a banda referente a rBbKI-HIS-Cterminal (~20 kDa).

Em 1997, Kouzuma *et al.* publicaram dois artigos sobre a clonagem e expressão de inibidores de tripsina (tipo Kunitz) isolados de *Erythrina variegata*. O método de clonagem e expressão também foi parecido com o método utilizado em nosso trabalho, no qual o autor fez uso do vetor de expressão pET22b e conseguiu expressar os inibidores ETIa e ETIb em células *E. coli* BL21(DE3). Dessa mesma espécie vegetal, foi clonado e expresso um inibidor de quimiotripsina (tipo Kunitz), o ECI, com o mesmo vetor e mesma linhagem de células descritos anteriormente (Kuramitsu *et al.*, 1996). WbCI (*winged bean chymotrypsin inhibitor*), outro inibidor de quimiotripsina tipo Kunitz de *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. foi clonado e expresso em *E. coli*, porém com um sistema diferente do usado neste presente trabalho (Ghosh e Singh, 1997). Todos os inibidores recombinantes já citados também apresentavam sua atividade de inibição contra suas específicas serina proteinases.

3.4. Purificação

3.4.1. Análise de solubilidade e preparo das células para a purificação

As células induzidas, provenientes de 500 mL de cultura foram centrifugadas em SORVALL® RC 5C *Plus* a 10410 x g, por 6 minutos, a 4° C. O precipitado de células foi separado da porção sobrenadante e ressuspenso em 10 mL de tampão 50mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM de NaCl. Adicionaram-se 5 mg de lisozima e incubou-se em gelo por 30 minutos, a fim de auxiliar a lise celular. Após essa incubação, as células foram lisadas por sonicação (pulsos de 30 segundos de

ultra-som, com intervalos de 30 segundos entre um pulso e outro, repetidos de 6-8 vezes) e o lisado foi clarificado por centrifugação a 30600 x g durante 15 min., a 4°C. Alíquotas do sobrenadante e do precipitado foram submetidas a análise por SDS-PAGE 15% para checar a solubilidade das proteínas recombinantes.

A rBbKI foi expressa de forma solúvel em todas as construções, conforme análises dos géis mostrados nas **figuras 3.4.2.1 e 3.4.2.2**. Na figura 3.4.2.1, nota-se que na fração precipitada, após sonicação e centrifugação das células, não há presença de rBbKI-His, estando esta na fração solúvel (sobrenadante). Já na figura 3.4.2.2, nota-se a presença de rBbKI-His-C-terminal no precipitado, porém a maior parte desta proteína encontra-se na fração solúvel. Sua presença no precipitado pode estar relacionada à possibilidade dos resíduos adicionais no C-terminal terem alterado sua solubilidade.

Assim, a fração utilizada na etapa de purificação foi sempre o sobrenadante, obtido após a centrifugação das células lisadas, o qual será referido como extrato celular.

O primeiro teste de purificação foi realizado com a proteína expressa em células BL21(DE3) pBbKI-28a, no qual rBbKI é expressa em fusão com seis resíduos de histidinas consecutivos em sua porção N-terminal e uma região de clivagem reconhecida pela enzima trombina. Dada a conhecida facilidade de purificação associada à afinidade das histidinas por uma matriz contendo Ni^{2+} , escolhemos este vetor para prosseguir com os estudos, não testando a etapa de purificação com a outra construção (pBbKI-29a).

Com relação à purificação de rBbKI-C-terminal, a metodologia aplicada foi a mesma utilizada para purificar rBbKI expressa em *E. coli* BL21(DE3) contendo o

plasmídeo pBbKI-28a, pois ambas as proteínas recombinantes recém-expressas possuem uma cauda de histidinas.

3.4.2. Purificação em resina de afinidade

A construção realizada no vetor pET28a permitiu a utilização de cromatografia de afinidade em resina de níquel *Ni-NTA Superflow* (Qiagen) no processo de purificação de rBbKI, pois as histidinas têm afinidade por níquel.

Uma coluna cromatográfica (Bio-Rad) foi empacotada com tal resina, por decantação. Na preparação para a purificação, a resina foi inicialmente lavada com 10 volumes de água e depois, equilibrada com cinco volumes do tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM de NaCl (tampão A). A partir daí, o extrato celular, previamente filtrado em papel de filtro, foi aplicado na coluna e o material eluído foi todo coletado. Prosseguiu-se com a lavagem da resina com três volumes do tampão A e então, os extratos coletados foram reaplicados, coletados e a etapa de lavagem foi repetida. Esse processo foi repetido por três vezes para garantir saturação (todas as moléculas de proteína recombinante interagindo com os íons de níquel da resina). Após a terceira aplicação do extrato, foi feita uma lavagem final com 10 volumes do mesmo tampão. Finalmente, a eluição de rBbKI-His foi realizada em três etapas, uma utilizando sempre dois volumes do tampão A contendo 100mM de imidazol, 250mM de imidazol, e uma última etapa com 500mM de imidazol, respectivamente.

As frações coletadas durante a purificação foram submetidas a SDS-PAGE 15%. Nas **figuras 3.4.2.1 e 3.4.2.2** temos os resultados das purificações de rBbKI-His e de rBbKI-His-C-terminal. Ambas proteínas recombinantes foram eluídas com

100mM e 250mM de imidazol, adicionado ao tampão A. Estas proteínas apresentaram-se de forma pura, sem a presença de contaminantes, e com um peso molecular aproximado de 20 kDa.

Figura 3.4.2.1. Ensaio de solubilidade e purificação por cromatografia de afinidade de rBbKI. SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie mostrando: M, marcador de massa molecular. Proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3) pBbKI-28a purificada em resina de Ni-NTA. Colunas: (1) precipitado e (2) sobrenadante das células lisadas e posteriormente centrifugadas; (3) primeira, (4) segunda e (5) terceira lavagens da resina; (6), (7) e (8): eluições de rBbKI-His com 100mM, 250mM e 500mM de imidazol, respectivamente. A seta indica a altura da banda correspondente ao peso molecular de rBbKI-His (~20 kDa).

Figura 3.4.2.2. Ensaio de solubilidade e purificação por cromatografia de afinidade de rBbKI-His-C-terminal. SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. M, marcador de massa molecular. Proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3) pBbKI-His-C-terminal após lise celular. Colunas: (1) e (2): precipitado e sobrenadante pós-centrifugação; (3) primeira, (4) segunda e (5) terceira lavagens da resina Ni-NTA, respectivamente; (6) eluato da última passagem do sobrenadante pela resina; (7) e (8) eluições de rBbKI-His com 100mM e 250mM de imidazol, respectivamente. A seta indica a altura da banda correspondente ao peso molecular (~20kDa) de rBbKI-His-C-terminal.

3.4.3. Retirada da cauda de histidinas

Após a purificação das proteínas por cromatografia de afinidade, estas foram submetidas à clivagem, através da digestão por trombina (Amersham Biosciences) para a retirada da cauda de HIS.

As frações eluídas da coluna de Ni-NTA contendo a rBbKI-His foram reunidas e dialisadas contra tampão PBS (*phosphate buffer saline*) 0,15M NaCl pH 7,4, em concentrador Centriprep 3 (Amicon Corporation, USA) à 3000 x g a 4°C em SORVALL. Após a mudança de tampão, a amostra foi submetida a digestão com 0,01U de trombina (0,01U trombina/ 10 µg proteína) por 4 horas, à temperatura ambiente. Amostras foram coletadas antes e após a digestão de hora em hora e misturadas ao tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol. Em seguida, foram aplicadas em um SDS-PAGE 17%. O resultado da digestão está representado na **figura 3.4.3.1** Após 2 horas pode-se observar a digestão parcial e após 3 horas, a digestão era completa. O mesmo procedimento foi feito com a amostra rBbKI-His-C-terminal, obtendo-se o mesmo resultado.

Figura 3.4.3.1. Clivagem de rBbKI-His. SDS-PAGE 17% corado com azul de Coomassie. M, marcador de massa molecular. (1) amostra antes da clivagem; após (2) uma hora, (3) duas horas, (4) três horas, e (5) quatro horas de incubação de rBbKI-HIS, respectivamente, sempre com 0,01U de trombina.

Após a retirada dos resíduos de histidina ainda restaram quatro resíduos adicionais na porção N-terminal de rBbKI: Gly-Ser-His-Met, devido a construção do plasmídeo pBbKI-28a. Observando a região de expressão do pET 28a, no qual o fragmento codificante para BbKI foi inserido nos sítios *NdeI* e *EcoRI*, nota-se um sítio de reconhecimento da trombina que possui a sequência: Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, seguido pelo resíduo His, antecedendo a metionina iniciadora. Porém, a ligação catalisada pela trombina ocorre entre os resíduos Arg e Gly, sobrando assim os quatro últimos resíduos desta região que ficarão ligados na proteína recombinante. Apesar disso, esses resíduos não interferiram na estabilidade/atividade de BbKI, provavelmente por não estarem enterrados no interior da estrutura, como foi visto pela análise da estrutura tridimensional, que será discutida em capítulo posterior.

3.4.4. Cromatografia de Exclusão Molecular (*Size Exclusion Chromatography - SEC*)

Após a etapa de clivagem, uma cromatografia adicional foi inserida no intuito de separar a rBbKI da cauda de histidinas liberada, bem como da trombina. Assim, os produtos da clivagem (tanto a rBbKI quanto a rBbKI-C-terminal) foram filtrados por cromatografia de exclusão molecular (SEC), em uma coluna Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando o sistema *Äkta Explorer-10* (Amersham Pharmacia Biotech). A coluna foi pré-equilibrada e as proteínas eluídas em tampão PBS 0,15M NaCl pH 7,4, com fluxo de 0,5 mL/min., monitorada por absorbância em 280nm, sendo o eluato coletado em frações de 1 mL. Para a calibração, foram utilizadas as proteínas padrão: ovalbumina (OVA), anidrase carbônica bovina (ACB), e citocromo C (CITc); cromatografadas sob as mesmas

condições descritas para a amostra.

A fração da rBbKI clivada foi eluída no intervalo entre 29 kDa e 12,4 kDa (ACB e CITc), mostrando-se assim sob a forma monomérica, com aproximadamente 20 kDa de massa molecular. Além disso, está pura, pois somente um pico de eluição foi visto no cromatograma (**Figura 3.4.4.1**), o que também foi comprovado pela análise da amostra em um gel SDS-PAGE (não mostrado aqui). A SEC, portanto, foi capaz de eliminar os produtos indesejáveis da clivagem.

Figura 3.4.4.1. Purificação de rBbKI por SEC. Amostras resultantes da clivagem com trombina foram aplicadas na coluna Superdex 75 e eluídas com o tampão PBS 0,15M pH 7,4. Fluxo: 0,5 ml/min; volume das frações coletadas: 1 mL. A eluição foi monitorada por absorbância em 280 nm. As posições dos picos de eluição dos padrões de massa molecular estão representadas por setas assinaladas por: OVA, ovalbumina (45 kDa); ACB, anidrase carbônica bovina (29 kDa); CITc, citocromo C (12,4 kDa).

As frações de interesse foram então reunidas, dialisadas contra o tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM de NaCl, e concentradas em concentrador Centriprep 3 (Amicon Corporation, USA) a 3000 x g, a 4°C, até um volume de 1 mL. Essas amostras foram utilizadas em experimentos seguintes de atividade biológica e de caracterização estrutural.

Com esse resultado podemos inferir que rBbKI mesmo com uma cisteína em sua sequência, contém o grupo tiol (SH) não reativo, isto é, não está livre para fazer uma ponte dissulfeto com a cisteína de uma outra molécula de rBbKI e, sendo assim, a proteína está sob a forma monomérica. Além disso, em capítulo posterior será mostrado que tal Cys (154) não é essencial para manter a estabilidade desta proteína, como tem sido visto em outros inibidores do tipo kunitz, e que também não tem influência direta na função inibitória.

3.5. Ensaio de Atividade

A determinação da atividade inibitória das proteínas recombinantes (rBbKI e rBbKI-Cterm) foi feita contra tripsina bovina, utilizando-se como substrato o composto Bz-Arg-pNa. O teste foi realizado pela Prof^a. Dr^a. Maria Luiza V. Oliva, no Departamento de Bioquímica da UNIFESP.

As atividades enzimáticas foram ensaiadas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,02% CaCl₂ (v/v) e NaCl 0,15M. 20 µL de uma solução de tripsina (0,02 mg/mL) foram pré-incubados a 37°C com diferentes concentrações do inibidor. Ao final de 10 minutos foram adicionados 25 µL do substrato Bz-Arg-pNa (10 mM), num volume final de 250 µL, prosseguindo-se a incubação por 20 minutos a 37°C. A hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada pela leitura fotométrica (em 405

nm) da p-nitroanilina liberada do substrato, em espectrofotômetro Packard (modelo SpectraCount). As reações foram interrompidas com 40 µL de ácido acético 40% (v/v) e as dosagens feitas em placas de Elisa. A atividade inibitória foi calculada pela atividade residual de tripsina no ensaio.

A **figura 3.5.1** representa as curvas de inibição (utilizando concentrações crescentes de inibidor, em condições de estabelecimento do equilíbrio da reação de inibição) construídas a partir do experimento descrito acima. De acordo com este teste tanto a rBbKI (curva A) quanto a rBbKI-Cterminal (curva B) apresentaram alta afinidade por tripsina bovina sendo suas constantes de inibição respectivamente $K_i=12$ nM e $K_i=20$ nM. Comparando com a constante de inibição de BbKI nativa, $K_i=0,60$ nM (Oliva *et al.*, 2001), podemos dizer que ambas as proteínas recombinantes não perderam suas atividades inibitórias e, ainda, que a proteína madura (rBbKI) é cerca de duas vezes mais ativa que o inibidor contendo os 10 aminoácidos a mais no C-terminal (rBbKI-Cterminal).

Figura 3.5.1. Ensaio de atividade inibitória de rBbKI. (A) Curva de inibição de rBbKI. (B) Curva de inibição de rBbKI-Cterminal. Foram usados 20 µL de Tripsina bovina (0.02 mg/mL) em concentrações crescentes de rBbKI após pré-incubação durante 10 minutos a 37°C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 0,02% CaCl₂ (v/v) e NaCl 0,15M, num volume final de 250 µL. A atividade enzimática foi determinada pela hidrólise de 25 µL de Bz-Arg-pNa (10mM) como substrato.

Sabendo-se que rBbKI-Cterminal ainda continua ativa, podemos dizer que estes resíduos de aminoácidos, não devam ter papel inibitório sobre a atividade biológica de BbKI nativa. Ainda, o fato de rBbKI mostrar-se enovelada e ativa quando produzida em *E. coli*, independente da presença da extensão C-terminal, descarta um possível papel deste peptídeo no enovelamento. Assim, uma função relacionada ao endereçamento desta proteína para o compartimento PSV parece mais provável. Entretanto, experimentos de localização subcelular utilizando essa porção C-terminal precisam ser realizados posteriormente para confirmação.

Já foi descrita na literatura, tanto a presença de peptídeos sinais quanto resíduos adicionais na região C-terminal em alguns inibidores tipo Kunitz que tiveram suas seqüências nucleotídicas clonadas e analisadas. Dentre eles, os quais já foram citados anteriormente, estão os inibidores de tripsina: ETIa e ETIb, ambos apresentando um peptídeo sinal de aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos e, dois resíduos de aminoácidos adicionais na porção C-terminal (Kouzuma *et al*, 1997a e 1997b). Tanto o inibidor ECI quanto o WbCI também apresentaram um peptídeo sinal (N-terminal) de 24 aminoácidos (Kuramitsu *et al.*, 1996; Ghosh e Singh, 1997); porém as funções de tais peptídeos ainda não foram descobertas.

3.6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste capítulo, as seguintes conclusões podem ser sumarizadas:

- ✧ O fragmento gênico codificador da cadeia madura de BbKI foi subclonado em vetores de expressão pET 28a e 29a com sucesso;
- ✧ A adição dos 10 resíduos de aminoácidos na porção C-terminal também foi realizada e subclonada em vetor pET 28a;
- ✧ As proteínas recombinantes, fusionadas a caudas de His, foram expressas de forma solúvel em células *E. coli* linhagens BL21(DE3);
- ✧ Ambas as proteínas foram purificadas em coluna de níquel, mostrando bom rendimento e alto grau de pureza;
- ✧ A clivagem do hexapeptídeo de His de ambas as proteínas foi total, sendo realizada com trombina, com 3h de incubação, à temperatura ambiente;
- ✧ As proteínas, durante a cromatografia de exclusão molecular, apresentaram-se de forma monomérica, demonstrando que o único resíduo de Cys tem seu grupo SH não reativo, não estando livre para realizar uma ponte dissulfeto com uma Cys de outra molécula de BbKI;
- ✧ Tanto rBbKI ($K_i=12\text{nM}$) quanto rBbKI-Cterminal ($K_i=20\text{nM}$) submetidas a testes de atividade mostraram inibir tripsina, porém com um K_i menor do que a BbKI nativa ($K_i= 0,6 \text{ nM}$).

3.7. Referências bibliográficas

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struthl, K. *Short protocols in Molecular Biology*. 3ª ed. USA, Ed. John Wiley & Sons, Inc., 1995.

Bonsager, B., Praetorius-Ibba, M. Nielsen, P.K., Svensson, B. Purification and characterization of the β -trefoil fold protein barley α -amylase/subtilisin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. **30**, 185-193, 2003.

Ghosh, S., Singh, M. cDNA cloning, expression, and rapid purification of a Kunitz-type winged bean chymotrypsin inhibitor. *Protein Expression and Purification*. **10**, 100-106, 1997.

Kouzuma, Y., Yamasaki, N., Kimura, M. The tissue-type plasminogen activator inhibitor ETIa from *Erythrina variegata*: structural basis for the inhibitory activity by cloning, expression, and mutagenesis of the cDNA encoding ETIa. *J.Biochem.* **121** (3),456-463,1997a.

Kouzuma, Y., Yamasaki, N., Kimura, M. Cloning, expression, and mutagenesis of trypsin inhibitor ETIb from *Erythrina variegata* seeds. *Biosci Biotechnol Biochem.***61** (6),1041-1043,1997b.

Kuramitsu, J., Iwanaga, S., Yamasaki, N., Kimura, M. Molecular cloning of cDNA that encodes chymotrypsin inhibitor ECI from *Erythrina variegata* seeds and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **60** (9), 1469-1473, 1996.

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

Oliva, M.L., Mendes, C.R., Santomauro-Vaz, E.M., Juliano, M.A., Mentele, R., Auerswald, E.A., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A. *Bauhinia bauhinioides* plasma kallikrein inhibitor: interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence. *Curr. Med. Chem.* **8** (8), 977-984, 2001.

Capítulo 4

Estudos Espectroscópicos

Todas as quantificações, de DNA, de RNA e de proteínas, foram realizadas em espectrofotômetro (U-2001 *Spectrophotometer* HITACHI), medindo-se a absorbância em 260 nm ou 280 nm, respectivamente.

A seguir estão descritas as condições experimentais e os métodos espectroscópicos utilizados para monitorar a estrutura secundária de rBbKI.

4.1. Quantificação das amostras de proteínas

Para a determinação das concentrações estimadas das amostras protéicas foi utilizado o coeficiente de extinção molar teórico (Gill e von Hippel, 1989) de cada uma das delas, obtido a partir da análise da seqüência primária da proteína através do servidor *ExPASy* (Expert Protein Analysis System). A seqüência primária de cada proteína foi indexada ao programa “ProtParam tool” (<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>), o qual retornou alguns parâmetros da proteína, tais como: pI teórico, peso molecular, coeficiente de extinção molar, porcentagem de cada aminoácido na proteína, entre outros. Os coeficientes de extinção molar das proteínas deste trabalho estão expostos na **tabela 4.1.1**.

Tabela 4.1.1. Proteínas recombinantes e seus coeficientes de extinção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) teóricos a 280 nm com a absorbância correspondente, equivalente a uma solução 1mg/mL.

Proteína	BbKI-HIS	BbKI pós clivagem	BbKI-HIS-Cterm.	BbKI-Cterm.
Coeficiente de extinção	15930	15930	15930	15930
Abs _{280 nm} 0.1% (=1 g/l)	0,786	0,886	0,748	0,838

4.2. Dicroísmo Circular (CD - *Circular Dichroism*)

A espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é uma ferramenta muito utilizada para estudos estruturais de proteínas ou de polipeptídeos em solução devido à sua capacidade de discriminar a proporção de estruturas secundárias como α -hélice, folha β , volta β e desordenada. O CD também é um método muito útil na monitoração de alterações conformacionais das proteínas em função de solventes, pH, temperatura, força iônica e ligações específicas e não específicas.

O CD é observado quando uma molécula opticamente ativa, chamada de cromóforo, apresenta diferenças na absorção de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. Para tanto, este cromóforo deve ser assimétrico. No caso de proteínas, estes cromóforos são principalmente as ligações peptídicas, as cadeias laterais dos aminoácidos e grupos prostéticos, todos com absorção na região ultravioleta. Assim, o espectro de CD entre 180 e 260 nm (região do ultravioleta distante) pode identificar diferentes tipos de estrutura secundária (**figura 4.2.1**), como hélices-alfa, folhas beta, voltas beta e estruturas aleatórias (Woody, 1994, 1996).

Para estimar o conteúdo de frações de estruturas secundárias são usados programas que utilizam métodos de desconvolução que extraem as componentes

comuns dos espectros experimentais de CD, permitindo a obtenção de suas curvas puras (α -hélice, folha β antiparalela, volta β e/ou folha β paralela e estrutura desordenada, contribuições de resíduos aromáticos e/ou pontes de dissulfetos) e as porcentagens que as mesmas representam no espectro.

Figura 4.2.1. Espectro de CD no UV distante de vários tipos de estruturas secundárias: (—) α -hélice; (- - -) folha- β antiparalela; (· · · ·) β -turn; (- · - ·) estrutura irregular (Modificado a partir de Kelly & Price, 1997).

Neste trabalho, esta técnica foi empregada a fim de comparar as duas formas das proteínas recombinantes (rBbKI e rBbKI-Cterminal), sob o ponto de vista estrutural; se o peptídeo C-terminal afetaria a organização da estrutura da proteína.

As medidas de CD foram realizadas num espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corporation, Japão) em cubeta circular de quartzo de 1 mm de caminho

óptico. Os espectros foram registrados num intervalo de comprimento de onda de 195 a 250 nm, a 20°C, com em média de 16 varreduras.

As amostras de proteínas usadas neste experimento (rBbKI e rBbKI-Cterminal) estavam concentradas em 0,2 mg/mL em tampão 50mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM de NaCl.

A **figura 4.2.2** representa os espectros de CD de rBbKI e de rBbKI-Cterminal, no seu pH ótimo de atividade. As curvas apresentam um máximo em aproximadamente 230nm e um mínimo em torno de 200nm. Abaixo de 200nm há uma diferença pronunciada entre os dois espectros. Para analisar essa diferença, o programa SELCON 2 (Sreerama e Woody, 1993) com uma base de dados de 33 proteínas foi utilizado para a desconvolução de ambos espectros. O conteúdo e as porcentagens de frações de estruturas secundárias estimadas pela desconvolução podem ser visualizadas na **tabela 4.2.1**. A diferença notável entre as duas estruturas é que a proteína adicionada a cauda C-terminal apresentou 6% de α -hélice, que pode ser creditada aos resíduos adicionados na proteína madura. Também podemos dizer através da análise dos espectros que a estrutura secundária da proteína não sofreu desordenação, quando presente os 10 resíduos de aminoácidos na porção C-terminal. Ainda, o teste de atividade mostrando que esta proteína é ativa também é um indicativo que mudanças conformacionais bruscas em sua estrutura terciária não ocorreram.

Tabela 4.2.1. Frações de estruturas secundárias de rBbKI e rBbKI-Cterminal, estimadas pelo programa de desconvolução SELCON 2.

	α -hélice	folha- β	turn	não ordenada	Total
rBbKI	-	32%	27%	41%	100%
rBbKI-Cterminal	6%	27%	27%	40%	100%

Figura 4.2.2. Espectro de CD de rBbKI e de rBbKI-Cterminal. Em azul, perfil de rBbKI, e em verde, de rBbKI-Cterminal. As medidas foram realizadas com uma solução protéica de aproximadamente 0,2 mg/mL, em tampão 50mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM de NaCl, a 20°C, variando o comprimento de onda de 190 a 250 nm e registradas como uma média de 16 varreduras.

Continuando a análise dos espectros, de acordo com Woody (1994), para várias proteínas as bandas positivas no CD têm sido relatadas na região de 225-235 nm. Essa característica pode ser atribuída às cadeias laterais de tirosina e/ou triptofano (tanto BbKI como BbKI-Cterminal possuem 8 resíduos de Tyr e 1 de Trp). A conformação desordenada (ou mais comumente os componentes semelhantes a poli (Pro) II) deva aumentar a banda positiva nessa região em geral, mas essa banda é fraca e usualmente aparece nos comprimentos de onda menores que 225 nm (Woody, 1994). Também pode se especular que essa banda positiva apareça devido à contribuição de resíduos de cisteína na molécula de proteína (a BbKI apresenta apenas um resíduo de Cys). Porém, ao comparar o espectro de CD de BbKI com o de

um outro inibidor com 82% de identidade sequencial também estudado em nosso laboratório (BbCI- *Bauhinia bauhinioides* Cruzipain Inhibitor), o qual não apresenta resíduos de Cys em sua molécula, nota-se que no espectro desse último também ocorre a presença da banda positiva na região de 230 nm.

Um estudo feito com outro inibidor tipo Kunitz, encontrado em sementes maduras de cevada, BASI (*Barley α -amylase/subtilisin inhibitor*), que apresenta 30% de identidade com inibidores de tripsina tipo Kunitz de outras plantas, mostra um espectro semelhante ao de rBbKI. Esse inibidor, cuja estrutura é de β -trefoil, foi expresso heterologicamente em células de *E. coli*, purificado e caracterizado físico-quimicamente por Bonsager *et al.* (2003). Espectros de CD de BASI nativa e recombinante apresentaram-se idênticos, com um mínimo em 201 nm e um máximo em 225 nm. Comparando esse espectro com o de rBbKI, pode-se notar grande similaridade entre eles. O autor sugere que embora um espectro de CD típico de folhas- β tenha um máximo em 192 nm e um mínimo em 205 nm, o espectro incomum de BASI se deva a uma sequência de Pro, já que o espectro característico de poli-L-prolina mostre um sinal positivo em 230nm e um forte mínimo em torno de 200nm (Bonsager *et al.*, 2003). No caso de BbKI, tem-se que levar em consideração a presença de 12 Pro em sua sequência de aminoácidos, o que pode ser uma grande contribuição para um máximo de 230 nm em seu espectro de CD .

4.3. Espectroscopia de Fluorescência

Esta técnica se baseia na propriedade que algumas moléculas possuem de ao serem excitadas emitirem luz em comprimentos de ondas mais longos. Um desses fenômenos é a chamada emissão de fluorescência. No caso de proteínas, três resíduos

de aminoácidos possuem esta propriedade: a tirosina, o triptofano e a fenilalanina. Esses resíduos são chamados fluoróforos naturais e sua fluorescência é altamente específica e sensível ao ambiente em que se encontram. Desta maneira, a fluorescência da proteína quando enovelada é resultante da fluorescência de seus resíduos individuais dependendo da vizinhança de cada um deles e, se este ambiente ao redor do fluoróforo muda, a fluorescência também muda. Essas características fazem com que esta técnica seja uma ferramenta altamente sensível para estudar mudanças estruturais e até conformacionais, sendo capaz de monitorar modificações na estrutura terciária da proteína (Lakowicz,1983).

Neste trabalho foi utilizada a espectroscopia de fluorescência para monitorar o microambiente do triptofano (W), analisando possíveis mudanças conformacionais da proteína recombinante (rBbKI) em função de diferentes pHs.

As medidas de fluorescência foram feitas em um fluorímetro K2 (ISS, Fluorescence, Analytical and Biomedical Instrumentation – Illinois/USA) a 25°C, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm e a emissão monitorada de 305 a 450 nm.

As amostras de proteínas usadas neste experimento estavam concentradas ao redor 0,1 mg/mL, correspondentes a Abs_{280nm} de 0,1. Foram utilizadas amostras incubadas em vários tampões com diferentes pHs, expostos na **tabela 4.3.1**. Para minimizar o efeito do espalhamento de luz pelo tampão, de cada amostra foi subtraído o espectro do tampão correspondente. Os resultados estão ilustrados na **figura 4.3.1**.

Tabela 4.3.1. Relação dos tampões utilizados nos experimentos espectroscópicos de fluorescência.

Tampão: 100mM + 50mM NaCl	pH
glicina-HCl	2,2
acetato de sódio	3,7 e 5,1
tris-HCl	7,0, 8,0 e 9,0
glicina-NaOH	10,5

* rBbKI em tampão com pH 6,0 precipita, pois seu pI (teórico) é aproximadamente 6.

Figura 4.3.1. Espectro de fluorescência de rBbKI na presença de diferentes pHs, a 25°C.

O resultado da fluorescência sugere que a estrutura da proteína é estável quando exposta à pHs diferentes daquele de atividade. Isso porque o máximo de emissão de fluorescência não variou; em todos os ambientes (pH 2,2 a 10,5) foi observado um máximo de intensidade de fluorescência em 322,5 nm, o que corresponde a não exposição do triptofano. Apenas no ambiente mais básico (pH 10,5) houve uma ligeira variação no máximo de emissão para 324,3 nm, e

decréscimo de intensidade de fluorescência pode ser explicado pela supressão interna devido a resíduos carregados nesta faixa de pH.

Poderia-se supor que nos extremos ácidos e básicos as moléculas de BbKI encontrem-se estruturalmente diferentes da nativa, embora arrançadas de forma que o triptofano não esteja exposto ao ambiente do solvente.

O mesmo ocorre com uma lectina, a frutalina, que quando exposta a pH de 2 a 9 não expõe seus triptofanos. Resultados recentes de cromatografia de exclusão molecular mostraram que frutalina em pH ácido é eluída na posição da proteína tetramérica, sugerindo que nos pHs extremamente ácidos a frutalina se encontre em forma de agregados moleculares solúveis (Campana, 2002).

A ausência de variação da exposição do triptofano mesmo em pHs extremos pode ser explicada através da análise da estrutura tridimensional de rBbKI, a qual será descrita e discutida em capítulo posterior. Pela estrutura terciária nota-se que tal aminoácido está enterrado num bolsão hidrofóbico, dificultando assim o acesso ao solvente.

4.4. Conclusões

Pelos resultados espectroscópicos, podemos concluir que:

- ✧ A adição dos resíduos no C-terminal parece não interferir na estrutura secundária do inibidor, pois comparando os espectros de CD de rBbKI e rBbKI-Cterminal não há mudanças drásticas;
- ✧ A exposição de rBbKI à diferentes pHs (2,2 – 10,5) não causou exposição do W, sugerindo que a rBbKI tenha uma estrutura terciária estável, e que este aminoácido esteja “enterrado” dentro de um bolsão hidrofóbico.

4.5. Referências bibliográficas

Bonsager, B.C., Praetorius-Ibba, M., Nielsen, P.K., Svensson, B. Purification and characterization of the β -trefoil fold protein barley α -amylase/subtilisin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. **30**, 185-193, 2003.

Campana, P.T. *Desnaturação e Renovelamento de Lectinas Oligoméricas Ligantes de D-Galactose: Estudos no Equilíbrio Termodinâmico*. São Carlos, 2002. 105p. Tese (Doutorado) – IFSC - Universidade de São Paulo (USP).

Gill S.C., von Hippel P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326, 1989.

Kelly, S.M. & Price, N.C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1338**, 161-185, 1997.

Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy, 1st edn. Plenum Press, NY, 1983.

Sreerama, N., Woody, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209**, 32–44, 1993.

Woody, R.W. Circular Dichroism of Peptides and Proteins. In: Koji Nakanishi, Nina Berova, Robert W. Woody, Ed. *Circular Dichroism: Principles and Applications*. Cap.17. p. 473-521, 1994.

Woody, R.W. Theory of Circular Dichroism of Proteins. In: Fasman, G.D., ed. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, p.25-68. Plenum Press, N.Y., 1996.

<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>

Capítulo 5

Cristalização e Análise da Estrutura Cristalográfica de rBbKI

5.1. Cristalização

Os passos envolvidos na resolução da estrutura tridimensional de uma macromolécula biológica são: (1) purificação da macromolécula; (2) cristalização; (3) coleta dos dados: caracterização do grupo espacial, medidas de intensidades da difração por difractometria ou métodos fotográficos ou usando um detector de área eletrônica ou uma placa de imagens; (4) determinação das fases, usando métodos baseados na substituição isomórfica (preparação de derivados de átomo pesado), espalhamento anômalo, substituição molecular e simetria não-cristalográfica, ou cálculos diretos; (5) obtenção do mapa de densidade eletrônica e sua interpretação por construção de mini-mapas ou construção de modelo por métodos de gráficos computacionais; e (6) refinamento do modelo (Ducruix e Giegé, 1999). Neste trabalho, todos estes passos foram alcançados. Uma vez obtida a proteína de forma pura e em quantidade adequada (solução de alguns miligramas), foram iniciados os ensaios de cristalização.

Os ensaios de cristalização com rBbKI foram realizados utilizando a metodologia de difusão de vapor em gota suspensa (McPherson, 1982). Uma gota

contendo a proteína em solução e um volume igual da solução precipitante foram depositados sobre uma lamínula siliconizada, a qual foi invertida e selada com graxa de vácuo sobre a solução do reservatório (poço). O sistema fechado atingiu o equilíbrio pela difusão da água da gota para o reservatório. O estado de supersaturação é assim atingido, podendo levar à cristalização da macromolécula. A observação dos cristais foi monitorada através de microscópio de polarização (lupa).

Para os ensaios preliminares de cristalização foram utilizadas soluções do tipo Fatorial, obtidas comercialmente da *Hampton Research: Fatorial Crystal Screen I* (Jankarik & Kim, 1991). Foram utilizados 3 µL de uma solução de proteína (rBbKI) a 6,5 mg/mL em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM NaCl. Esse volume de proteína foi misturado a uma gota de 3 µL da solução de cristalização (cada uma do Fatorial I), sob uma lamínula. Em cada reservatório foram colocados 500 µL da solução de cristalização correspondente. Os experimentos foram realizados à 4°C e 18°C.

Após aproximadamente três dias, ocorreu o crescimento de cristais com diferentes morfologias em sete soluções diferentes (**tabela 5.1.1**).

Tabela 5.1.1. Soluções de crescimento de cristais de rBbKI.

Solução fatorial	Sal	Tampão	Precipitante
9	0,2 M acetato de amônio	0,1 M citrato de sódio pH 5,6	30% PEG 4000
10	0,2 M acetato de amônio	0,1 M acetato de sódio pH 4,6	30% PEG 4000
15	0,2 M sulfato de amônio	0,1 M cacodilato de sódio pH 6,5	30% PEG 8000
20	0,2 M sulfato de amônio	0,1 M acetato de sódio pH 4,6	25% PEG 4000
37	—	0,1 M acetato de sódio pH 4,6	8% PEG 4000
49	1 M sulfato de lítio monohidratado	—	2% PEG 8000
50	1 M sulfato de lítio monohidratado	—	15% PEG 8000

Nas soluções 9, 10, 15, 20, 37 e 49, cresceram cristais em forma de agulhas, enquanto na solução 50, apresentaram-se em forma de placas. Na **figura 5.1.1** são mostrados alguns destes cristais. Aqueles obtidos na solução 37 foram os mais adequados para a difração de raios X, sendo assim utilizados.

Figura 5.1.1. Morfologia dos diversos cristais de rBbKI. Os números acima das figuras representam a condição da solução do Fatorial I. Concentração da solução de rBbKI utilizada na confecção da gota foi de 6,5 mg/mL.

5.2. Determinação da Estrutura Cristalográfica de rBbKI

Uma vez obtidos cristais adequados à difração de raios X, todo o procedimento para a determinação da estrutura de rBbKI (coleta e processamento dos dados, resolução e refinamento da estrutura) foi realizado pelo aluno de doutorado Marcos V. A. Navarro, que faz parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Cristalografia de Proteínas, do Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural (CBME) – IFSC/USP.

5.3. Análise da estrutura

5.3.1. Enovelamento protéico

Pela análise tridimensional, as estruturas secundárias predominantes do inibidor BbKI são folhas- β , sendo estas conectadas por alguns *loops* (estruturas desordenadas). Estas estruturas arranjadas deram à molécula um enovelamento característico de β -*trefoil* (**figura 5.3.1.1a**). Este enovelamento é composto por 12 fitas beta, formado seis grampos dupla-fita, sendo que três desses formam uma estrutura de barril e os outros três estão em um arranjo triangular (tripleto) que cobre o barril. As conexões entre as fitas são tais que a conformação pode ser descrita em termos de três unidades muito similares (**figura 5.3.1.1b**) tendo uma forma de Y ou de trevo (*trefoil*). Dois segmentos do trevo são formados pelos grampos das folhas beta, e o terceiro por uma longa conexão entre as fitas. O arranjo das três unidades dá à molécula um pseudo-eixo de ordem 3 (**figura 5.3.1.1c**).

Outros inibidores Kunitz, como o inibidor de tripsina de soja (STI) (Song e Suh, 1998), o inibidor de tripsina de *Erythrina caffra* (ETI) (Ornesti *et al.*, 1991) e o inibidor bifuncional de alfa-amilase/proteinase K de trigo (PK13) (Zemke *et al.*, 1991), além das interleucina-1 β e 1 α (Priestle *et al.*, 1988; Graves *et al.*, 1990) e os fatores de crescimento de fibroblastos (Zhu *et al.*, 1991), tiveram suas estruturas cristalográficas resolvidas, mostrando o mesmo enovelamento β -*trefoil*. Embora as diferentes proteínas tenham estruturas muito similares, muitas de suas seqüências não têm similaridades significantes (Murzin *et al.*, 1992). Na verdade, durante o decorrer da evolução, a estrutura tridimensional das proteínas é muito mais conservada que a seqüência. Observações feitas em proteínas com estrutura β -*trefoil* mostram que essa

conformação é muito bem conservada; são mudanças na região do sítio ativo que conferem a imensa variedade de funções para cada uma dessas proteínas: inibidores tipo Kunitz inibem serina proteinases, as interleucinas mediam a resposta imune, toxinas de plantas atuam na defesa contra invasores, porém todas essas funções estão envolvidas no reconhecimento (Mukhopadhyay, 2000). Estudos sugerem a existência de uma proteína ancestral com tamanho e forma da unidade β -trefoil (Mukhopadhyay, 2000), que sofreu duas sucessivas duplicações no seu gene para dar origem ao enovelamento β -trefoil. Os eventos evolucionários e as pressões seletivas levaram a inúmeras divergências nas cópias, gerando uma hipervariabilidade seqüencial nas regiões funcionais. Assim, moléculas com domínios comuns mostraram uma ampla faixa de inovações funcionais (Mukhopadhyay, 2000).

Figura 5.3.1.1. Estrutura tridimensional de BbKI e características estruturais do enovelamento β -trefoil. (A) o barril de 6 fitas (vermelho) e o "cap" formado pelo tripleto de "grampos" (azul); (B) a unidade β -trefoil (as cores vermelha, azul e amarela representam as 3 repetições das unidades); (C) o pseudo-eixo de ordem 3 correlacionando as três unidades do enovelamento. Obs.: as folhas- β estão representadas por setas coloridas e os loops estão em cinza. Notar as posições das regiões N- e C-terminal.

5.3.2. Principais características da estrutura do inibidor

Triptofano

Uma das características da estrutura de rBbKI, que também é conservada nas outras estruturas citadas acima, é a presença de volumosos resíduos hidrofóbicos no interior de certos sítios da proteína, o que também garante a estabilidade do diâmetro do barril.

Na BbKI, em um desses sítios está localizado um resíduo de triptofano, o único desta proteína. Ele está inserido em um “bolsão hidrofóbico” constituído pelos resíduos: Leu (21), Leu (31), Val (45), Val (57), Ile (76), Phe (78), Val (100), Val (102), Phe (112), Leu (147) (**figura 5.3.2.1**).

Essa informação juntamente com os resultados obtidos através do experimento de fluorescência (rBbKI em ambientes de diferentes pHs), mostra a alta estabilidade estrutural que a proteína apresenta, pois mesmo em pHs extremos o triptofano não se expõe. Isso ocorre devido sua localização e proximidade com outros resíduos hidrofóbicos.

Sítio Ativo e a Cisteína

Outra região importante na estrutura é o sítio ativo inibitório da proteína, que no caso é formado pelo resíduo arginina 64 (posição P1). Os inibidores de tripsina de soja tipo Kunitz (STI-Kunitz) são caracterizados por possuírem quatro resíduos de Cys, formando duas pontes dissulfeto, as quais são essenciais não somente para a

estabilidade protéica quanto para a função inibitória; em estado reduzido eles perdem totalmente sua atividade (Lehle *et al.*, 1994). Um exemplo de um desses inibidores é o ETI (*Erythrina caffra* inibitor), o qual possui alta afinidade por tripsina e quimiotripsina, e apresenta em seu estado nativo duas pontes dissulfeto. Porém, diferentemente dos STIs, o ETI necessita da formação das pontes dissulfeto somente para estabilizar a proteína, mas não é essencial na funcionalidade do inibidor (não altera sua afinidade pela protease) (Lehle *et al.*, 1994).

Figura 5.3.2.1. Representação gráfica do ambiente do Trp 88. O bolsão hidrofóbico se encontra no interior do barril (alguns resíduos vizinhos estão indicados na figura).

A BbKI, como os inibidores tipo Kunitz, também apresentou seu sítio reativo localizado em um *loop* e este não é estabilizado por ponte dissulfeto (como visto na estrutura cristalográfica resolvida), pois seu único resíduo de cisteína não é reativo, e

mais ainda, a proteína se apresenta na forma monomérica (análise por dados cromatográficos). Podemos então inferir que tanto a estabilidade quanto a funcionalidade de BbKI não sejam mantidas por pontes dissulfeto, que afinal não existem na estrutura deste neste inibidor.

Na verdade, o único resíduo de Cys fica localizado em um ambiente altamente hidrofóbico composto por: His (26), Leu (47), Leu (138), Leu (147) e Phe (157) (**figura 5.3.2.2**). Fazendo uma sobreposição das estruturas tridimensionais dos inibidores ETI e BbKI, notamos que a posição onde se encontra a Cys deste último é substituída por um resíduo de Leu em ETI. Logo, podemos concluir que se trata apenas de uma substituição conservativa de um resíduo hidrofóbico por outro.

O *loop* inibitório de rBbKI é ilustrado na **figura 5.3.2.3**, no qual visualizamos os resíduos que fazem parte da posição P1 (Arg), P'1 (Ile) e P'2 (Asn); enquanto que a **figura 5.3.2.4** representa uma sobreposição dos *loops* inibitórios de BbKI, do inibidor de elastase de *B. baubinioides* (BbCI), e do inibidor de tripsina de *E. caffra* (ETI), os quais apresentam respectivamente 82% e 32% de identidade sequencial com BbKI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). É possível notar que os *loops* ficam expostos ao solvente. Enquanto que a posição P1 de BbKI e de ETI é composta por um resíduo de Arg, esta posição em BbCI é tomada por um resíduo Ala. Isso acontece devido à especificidade de tais inibidores por diferentes serina proteinases. O *loop* do sítio ativo de ETI é estabilizado por pontes de hidrogênio, sem requerer elementos estruturais secundários ou pontes dissulfeto, as quais estão localizadas longe do sítio ativo (Arg 63–Ser 64) (Ornesti *et al.*, 1991); o mesmo ocorre com BbKI.

Figura 5.3.2.2. Representação ilustrativa do ambiente da Cys (155). Os resíduos vizinhos a cisteína estão indicados (nota-se a alta hidrofobicidade desse meio).

Figura 5.3.2.3. Mapa da densidade eletrônica da região composta pelo *loop* inibitório de BbKI. A posição P1 é composta pelo resíduo Arg 64. Uma Ile 65 ocupa a posição P'1, e uma Asn 66 ocupa a posição P'2.

Figura 5.3.2.4. Sobreposição dos *loops* inibitórios de BbKI (representado em cinza), de BbCI (em azul) e de ETI (em rosa). Os resíduos da posição P1 de cada proteína estão indicados na figura.

5.4. Conclusões

- ✧ A cristalização da proteína rBbKI foi obtida com sucesso; os cristais pertencem ao sistema cristalino ortorrômbico com grupo espacial $P2_12_12_1$ e foram difratados por raios X à 1,9 Å de resolução;
- ✧ rBbKI apresentou um enovelamento do tipo β -trefoil, conforme outros inibidores tipo Kunitz os quais já tiveram suas estruturas cristalográficas resolvidas;
- ✧ A análise da estrutura tridimensional mostra que: o resíduo de W fica realmente rodeado por resíduos hidrofóbicos, garantindo estabilidade à proteína; o resíduo de C não faz parte do *loop* inibitório, estando localizado em um ambiente hidrofóbico; o resíduo da posição P1, a Arg 64, fica exposto ao solvente;

- ✧ Os 4 resíduos que sobram da clivagem de rBbKI-His não interferiram na estabilidade estrutural nem na função de inibição.

5.5. Referências bibliográficas

Ducruix, A. & Giegé, R. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach*. 2ª ed. Oxford:IRL Press, 1999.

Graves, B.J., Hatada, M.H., Hendrickson, W.A., Miller, J.K., Madison, V.S., Satow, Y. Structure of interleukin 1 α at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* **29** (11), 2679–2689, 1990.

Jancarik, J. & Kim, S. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411, 1991.

Lehle, K., Wrba, A., Jaenicke, R. *Erythrina caffra* trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide bonds. *J. Mol. Biol.* **239**, 276-284, 1994.

McPherson, A. *The Preparation and Analysis of Protein Crystals*. 1ª ed. Wiley & Sons, New York. p. 96-97, 1982.

Mukhopadhyay, D. The Molecular Evolutionary History of a Winged Bean α -Chymotrypsin Inhibitor and Modeling of Its Mutations Through Structural Analyses. *J. Mol. Evol.* **50**, 214-223, 2000.

Murzin, A.G., Lesk, A.M., Chothia, C. Patterns of Structure and Sequence in the Kunitz Inhibitors, Interleukins-1 beta and 1 alpha and Fibroblast Growth Factors. *J. Mol. Biol.*, **223**, 531- 543, 1992.

Ornesti, S., Brick, P., Blow, D.M. Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. *J. Mol. Biol.* **217**, 153- 176, 1991.

Priestle, J.P., Schär, H.P., Grütter, M. Crystal structure of the cytokine interleukin-1 β . *EMBO J.* **7** (2), 339–343, 1988.

Song, H. K., Suh, S. W. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* **275**, 347, 1998.

Zemke, K.J., Müller-Fahrnow, A., Jany, K.D., Pal, G.P., Saenger, W. The three-dimensional structure of the bifunctional proteinase K/ α -amylase inhibitor from wheat (PK13) at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.* **279**, 240–242, 1991.

Zhu, X., Komiya, H., Chirino, A., Faham, S., Fox, G.M., Arakawa, T., Hsu, B.T., Rees, D.C. Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* **251** (4989), 90–93, 1991.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Capítulo 6

Considerações Finais e Perspectivas

O objetivo geral deste trabalho foi atingido, sendo o inibidor BbKI produzido de forma heteróloga, estudado e analisado estruturalmente com sucesso. Ainda durante o percurso do trabalho, informações adicionais não previstas inicialmente foram obtidas sobre a síntese e processamento deste inibidor, ampliando o conhecimento sobre sua biologia.

Esse estudo oferece subsídios que poderão ser utilizados em projetos de desenvolvimento de plantas mais resistentes a pragas, já que esses inibidores provavelmente assumem um papel de defesa na planta. A aplicabilidade de BbKI na inibição de processos inflamatórios e na cascata coagulativa, através de sua complexação com proteinases específicas, também abre perspectivas para seu uso como fármaco.

As futuras perspectivas a respeito desse trabalho são:

- Tentativa de isolar o complexo inibidor-tripsina visando a determinação das regiões/resíduos atuantes na inibição;
- Desenvolvimento de experimentos de localização subcelular em células vegetais a fim de verificar a potencial sinalização do peptídeo C-terminal;
- Produção de mutantes sítio-dirigidos na região do sítio ativo do inibidor, na tentativa de avaliar quais os resíduos essenciais para sua especificidade.

Anexos

Meio LB
5,0 g/L de extrato de levedura
10,0 g/L de bacto-triptona
10,0 g/L de cloreto de sódio
Ajustar pH para 7,0
Para meio ágar LB, adicionar 15g/L.
Autoclavar por 20 min.

Tampão PBS
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na ₂ HPO ₄
1,4 mM KH ₂ PO ₄
Ajustar pH para 7,4

Tampão TAE [50X]
242 g de Tris base
51,1 mL de ácido acético glacial
37,2 g de Na ₂ EDTA
Completar para volume final de 1 L com água destilada
Ajustar pH para 8,5

Tampão de amostra
0,188M tampão Tris-HCl 2M pH 6,8
6% SDS
35,9% glicerol
15% β-mercaptoetanol
0,01% azul de bromofenol

Solução Corante de Gel	Solução Descorante de Gel
0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 (2g)	Solução de ácido acético 7%
50% metanol (500mL)	
10% ácido acético (100mL)	
40% água (400mL)	
Cora-se o gel por 10 a 15 min.	

APÊNDICES

I. Lista de Abreviaturas dos Aminoácidos

Ala – A – Alanina
Asn – N - Asparagina
Asp – D – Aspartato
Arg – R - Arginina
Cys – C – Cisteína
Gln – Q – Glutamina
Glu – E - Glutamato
Gly – G – Glicina
His - H - Histidina
Ile – I – Isoleucina
Leu – L - Leucina
Lys – K – Lisina
Met – M - Metionina
Phe – F - Fenilalanina
Pro – P – Prolina
Ser – S - Serina
Thr – T - Treonina
Trp – W – Triptofano
Tyr – Y – Tirosina
Val – V – Valina

II. Mapa de restrição do vetor de clonagem comercial pGEM-T.

II. Mapa de restrição dos vetores de expressão comerciais pET28a e pET29a.