

---

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

**ANA ISABEL DE CAMARGO**

**Estudos estruturais e termodinâmicos das centrinas BeCen1 e BeCen3 do**  
**fungo *Blastocladiella emersonii***

**São Carlos**

**2011**

---



---

ANA ISABEL DE CAMARGO

**Estudos estruturais e termodinâmicos das centrinas BeCen1 e BeCen3 do  
fungo *Blastocladiella emersonii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Física do Instituto de Física de São Carlos, da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do título  
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Profa. Dra. Leila Maria Beltramini

**Versão Original**

**São Carlos**

**2011**

---

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Camargo, Ana Isabel de.

Estudos estruturais e termodinâmicos de centrinas BeCen1 e Be Cen3 do fungo *Blastocladiella emersonii* / Ana Isabel de Camargo; orientador Leila Maria Beltramini.-- São Carlos, 2011.

119 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração: Física Aplicada – Opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Centrinas. 2. Proteínas ligantes de cálcio. 3. Formação de filamentos. 4. Domínio "EF-Hand". 5. *Blastocladiella emersonii*. I. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Isabel de Camargo

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

Aprovado(a) em: 27.05.2011

Comissão Julgadora

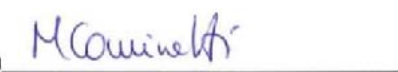
Prof(a). Dr(a). Vanessa Santos Sotomaior

Instituição: PUC/PR

Assinatura 

Prof(a). Dr(a). Márcia Regina Cominetti

Instituição: UFSCar

Assinatura 


Prof(a). Dr(a). Richard John Ward

Instituição: FFCLRP/USP

Assinatura 

Prof(a). Dr(a). Rosângela Itri

Instituição: IF/USP

Assinatura 

Prof(a). Dr(a). Leila Maria Beltramini

Instituição: IFSC/USP

Assinatura 



---

*A meus pais Marli e Paulo, por todo  
suporte emocional, financeiro, confiança e  
amor.*

*Dedico*

---





## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a minha querida família, que foi quem me forneceu todo o suporte necessário para chegar até aqui. Mãe, Pai, Angela e Marcia muito obrigado por sempre estarem presentes na minha vida, eu os amo infinitamente.

Ao meu amado "namorado" Júlio que fez parte desses ótimos 4 anos de doutorado e contribuiu imensamente para meu crescimento. Ensinou-me muita coisa, promoveu momentos inesquecíveis, permitiu realização de sonhos e continua me fazendo feliz a cada dia! Amo você!

Aos meus queridos cunhados, Evandro e Dó, obrigado por fazerem parte da família e aos meus amados e insubstituíveis sobrinhos: Kauet, Isabela, Inaiá e Henry obrigado por me ensinarem coisas novas sempre.

Aos meus companheiros Sussu e Joci que foram meus grandes amigos de todas as horas, principalmente quando o assunto era "smirnoff" ou mesmo só um cafezinho... Vocês dois foram essenciais para minha vida estes anos de doutorado, não posso descrever a alegria de ter convívio com vocês.

Aos "antigos" (porém não velhos) amigos da biofísica, Zé, Luís, Débora, Andressa, Fernandos, Thatty, Suzana, Priscila, Sheila, Júlio, Militar, Leandro, Sirley, Ana Paula, Bel, Célia, Bira e Fernanda.

Aos "novos" amigos da Biofísica, Lílian, Valéria, Patty, Fábio, Ana Elisa, Nádia, Marília, Crusca, Iêda, Edson, Natália, Patrícia e Débora.

As minhas novas amigadas da Enfermagem que tornam minhas noites mais prazerosas, proveitosas e por fazerem parte da realização de um sonho antigo.

As minhas amadas amigas, que mesmo estando longe, fazem parte da minha vida: Flávia, Helô, Ana Paula, Patty, Fer, Sheila, Camille.

À Prof. Dra. Leila Maria Beltramini, pela oportunidade e orientação.

À Prof. Dra. Ana Paula Ulían de Araújo, pela oportunidade e orientação.

A Prof. Dra. Elaine Benelli e ao Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo da UFPR pela iniciação na vida acadêmica e amizade.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto e Prof. Dra. Heloísa Sobreiro Selístre de Araújo pelo apoio que me deram nesta época de transição na minha vida Profissional.

Aos "super técnicos" e amigos do Grupo de Biofísica do IFSC: Bel, Andressa, Fernando e João, vocês são fundamentais para nosso aprendizado e na organização e funcionamento do grupo.

A Ester secretária do grupo e a todos os funcionários da secretaria de pós-graduação e da biblioteca do IFSC que estão sempre nos auxiliando.

A todos os docentes do grupo de Biofísica e Cristalografia, pela participação na minha formação profissional;

Não posso nunca deixar de agradecer aos meus "companheiros peludos ou com penas" que sempre me demonstraram amor incondicional e o companherismo que nem um ser humano pode proporcionar. Desde minha infância me ensinaram muita coisa e me deram o prazer de suas amizades. Infelizmente, hoje nem todos estão presentes, mas com toda certeza são lembrados como parte da minha família. A cada dia aprendo coisas novas com estes seres. "A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados." Mahatma Gandhi.

A todas as pessoas, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização do meu trabalho;

Ao programa de Pós-Graduação em Física Aplicada do Instituto de Física de São Carlos e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade;

A CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro necessário para realização deste trabalho.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

Chico Xavier

"A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência."

Charles Darwin



## RESUMO

CAMARGO, A.I. **Estudos Estruturais e Termodinâmicos das Centrininas BeCen1 e BeCen3 do Fungo *Blastocladiella emersonii***. 2011. 119p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Centrininas são proteínas componentes essenciais nos centros organizadores de microtubulos em diversos organismos. Pertencem à família das proteínas “EF-Hand” ligantes de cálcio e podem ser divididas em duas subfamílias: uma definida pela centrina da alga *Chlamydomonas reinhardtii* CrCenp, associada a funções contráteis, e a outra pela centrina da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ScCdc31p, relacionada a duplicação de centros mitóticos. Curiosamente o fungo *Blastocladiella emersonii* possui duas formas de centrininas em seu genoma : BeCen1 mais parecida com a CrCenp, e BeCen3 com a ScCdc31p, enquanto todos os outros fungos já descritos possuem apenas uma forma, pertencente ao grupo ScCdc31p. Diante desse fato curioso, descrito em 2005, estudos estruturais e termodinâmicos comparativos entre as proteínas recombinantes BeCen1 e BeCen3, foram desenvolvidos para identificar e caracterizar diferenças relevantes, que pudessem justificar a presença dessas duas proteínas no fungo *Blastocladiella emersonii*. Ambas as centrininas foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia, resultando em um rendimento de aproximadamente 5mg/l. Análises estruturais foram realizadas utilizando técnicas de dicroísmo circular (CD) , fluorescência, espalhamento de luz (DLS e RALS), microscopias de força atômica (AFM) e eletrônica de transmissão (MET). Por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) parâmetros termodinâmicos foram obtidos para BeCen1 e BeCen3 em relação a ligação de cálcio. Ambas apresentaram conteúdo predominante de hélices alfa e diferenças físico-químicas e estruturais marcantes. BeCen1, após desnaturação a 90°C e deixada a temperatura de 4°C por 24 horas, mostrou um espectro de CD compatível com um processo de reenovelamento; a TM foi de 42°C e aumentou cerca de 4°C na forma holo; os espectros de CD são modificados na presença de cálcio, mostrando uma forma característica de movimentação de hélices das proteínas ligantes de cálcio; pelos dados obtidos por ITC liga cálcio em três sítios “EF-Hand” por uma reação endotérmica; na presença de magnésio apresentou mudanças conformacionais, compatíveis com a ligação deste nos sítios de cálcio; a partir de 40°C é observado um processo de agregação chegando a formação de filamentos, que foram visualizados por AFM e MET. BeCen3 após ser desnaturada e colocada nas mesmas condições de BeCen1, permanece desnaturada; A TM é de 49°C e aumentou em aproximadamente 5°C na forma holo; os espectros de CD, na presença de cálcio, apresentam aspectos característicos de movimentação de  $\alpha$ -hélices das proteínas ligantes de cálcio; liga cálcio em apenas dois sítios “EF-Hand” por uma reação exotérmica, sofre mudanças conformacionais na presença de magnésio e a partir de 30°C já sofre um processo de agregação, formando filamentos. Neste trabalho foi estabelecido o primeiro protocolo para a expressão e purificação das centrininas de *B. emersonii*, além dos estudos de caracterização estrutural e termodinâmica destas proteínas. O estudo também foi pioneiro quanto a obtenção de imagens no processo de formação de filamentos destas centrininas na ausência de cálcio. As centrininas de *B. emersonii* apresentam diferenças importantes nas respostas em função da presença de cálcio e também do magnésio. Os dados obtidos são fortes indicativos que estas centrininas têm mecanismos de ação diferentes dentro do fungo *B. emersonii*.

Palavras-chave: Centrininas, Proteínas ligantes de cálcio, Formação de filamentos, Domínio “EF-Hand”, *Blastocladiella emersonii*.



## **ABSTRACT**

CAMARGO, A. I. **Structural and Thermodynamics Studies of *Blastocladiella Emersonii* Centrins**. 2011. 119p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Centrin proteins are essential component of the microtubule organizing centers in a large range of organisms. They belong to the EF-Hand calcium binding proteins family e can be divided in two subfamilies: one defined by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* CrCenp, related to contractile functions and the other centrin of the yeast *Saccharomices cerevisiae* ScCdc31p, related to duplication of centrosome mitotic centers. Interestingly, *Blastocladiella emersonii* fungus posses two centrin forms in it genome: BeCen1 closely related to CrCenp and BeCen3 closely related to ScCdc31p. All other known fungus have only one form of centrin: ScCdc31p. With this curious finding, described in 2005, compared structural and thermodynamics studies between recombinant proteins BeCen1 and BeCen3 were performed, in attempt to identify relevant differences that could explain the presence of two forms of centrins in this fungus. Both centrins were expressed in *E. coli* and purified by chromatography resulting in 5mg/l protein yield. Structural analyses were performed with circular dichroism (CD), fluorescence, light scattering (DLS AND RALS), atomic force microscopy (AFM) and transmission electronic microscopy (TEM). Using isothermal titration calorimetry (ITC) thermodynamics parameters about the calcium binding were defined. Both showed alpha helix predominant content and structural physical-chemistry differences. After denaturation at 90°C and cooled overnight at 4°C, BeCen1 showed a CD spectrum consistent to a renaturation process; the calculated TM was 42°C and raised 4°C in the holo state; CD spectra were modified under calcium presence showing characteristics changes of calcium binding proteins; ITC data exhibited three calcium binding motifs through an endothermic reaction and the presence of magnesium also showed conformational changes; From 40°C a aggregation process leading to filament formation was observed and visualized with AFM and TEM. After denaturation at 90°C and cooled overnight at 4°C, BeCen3 remained denaturated; Calculated TM was 49°C and raised 5°C in the holo state; CD spectra were modified under calcium presence showing characteristics changes of calcium binding proteins; ITC data exhibited only two calcium binding motifs through an exothermic reaction and the presence of magnesium also showed conformational changes; From 30°C BeCen3 already suffered a aggregation process forming filaments. In this study it was established the first expression and purification protocol for *B. emersonii* centrins, besides the structural and thermodynamic characterization of these proteins. This is the first study containing filaments images of the centrins of *B. emersonii*. These centrins showed important response differences in calcium and magnesium binding. All the obtained data are strong indications that the two centrins have distinct functions in the fungus.

Keywords: Centrins, Calcium binding proteins, Protein filaments, EF-Hand domain, *Blastocladiella emersonii*.





## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Par de motivos “EF-Hand”s e coordenação do $\text{Ca}^{2+}$ pelo domínio N-terminal da Calmodulina	31
FIGURA 2 -	Representação das $\alpha$ -hélices E e F pertencentes ao motivo “EF-Hand” e sua mudança angular na presença de cálcio	32
FIGURA 3 -	Mudanças conformacionais na Proteína Calmodulina	33
FIGURA 4 -	Estrutura da Ligação de Cálcio. Bipirâmide Pentagonal e resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação de cálcio	34
FIGURA 5 -	Ciclo de vida do fungo <i>Blastocladiella emersonii</i>	37
FIGURA 6 -	Micrografia do zoósporo de <i>Blastocladiella emersonii</i>	38
FIGURA 7 -	Representação dos espectros de CD característicos de cada estrutura secundária	53
FIGURA 8 -	Representação esquemática do espalhamento de luz a ângulo reto	56
FIGURA 9 -	Excitação e emissão de fluorescência	57
FIGURA 10 -	Emissão dos resíduos de aminoácidos aromáticos nas proteínas em seus respectivos comprimentos de onda	59
FIGURA 11 -	Estrutura química da molécula de ANS	60
FIGURA 12 -	Esquema de um equipamento de calorimetria	61
FIGURA 13 -	Princípio de funcionamento AFM	63
FIGURA 14 -	Amplificação do cDNA da BeCen1 e BeCen3	67
FIGURA 15 -	Análise de restrição dos vetores de expressão (pET28a)	68
FIGURA 16 -	Alinhamento de várias sequências de centrinas	69
FIGURA 17 -	Expressão recombinante de BeCen1 em E.coli BL21(DE3)pET28a e ensaio de solubilidade	71
FIGURA 18 -	Expressão recombinante de BeCen3 em E.coli BL21(DE3)pET28a e ensaio de solubilidade	71
FIGURA 19 -	Ensaio de purificação BeCen1	72
FIGURA 20 -	Ensaio de purificação BeCen3	72

FIGURA 21 -	Pureza das proteínas BeCen1 e BeCen3 analisados por eletroforese	73
FIGURA 22 -	Cromatografia de Exclusão de Peso Molecular de BeCen1 e BeCen3	74
FIGURA 23 -	Espectros de CD das proteínas BeCen1 e BeCen3 em diferentes valores de pH	77
FIGURA 24 -	Desnaturação Térmica de BeCen1 e BeCen3 monitorada por UV-CD	78
FIGURA 25 -	Curvas de Transição de Temperatura Média (TM) das centrinas monitoradas a 222 nm	79
FIGURA 26 -	Espectros de CD antes e depois das centrinas atingirem 90°C e serem resfriadas	80
FIGURA 27 -	Espectros de CD das proteínas nas formas apo e holo	81
FIGURA 28	Dicroísmo Circular das centrinas com diferentes íons	83
FIGURA 29 -	Espectros de emissão das proteínas BeCen1 e BeCen3	84
FIGURA 30 -	Emissão de Fluorescência da sonda ANS com e sem cálcio	85
FIGURA 31 -	Espectros de emissão da sonda ANS com diferentes íons	86
FIGURA 32 -	Mudanças no domínio “EF-Hand” presente na porção N-terminal da proteína Calmodulina	87
FIGURA 33 -	Oligomerização das centrinas em função da temperatura monitorada por espalhamento de luz a 340 nm	88
FIGURA 34 -	Imagens de AFM da proteína BeCen1-apo	91
FIGURA 35 -	Imagens de AFM da proteína BeCen3-apo	92
FIGURA 36 -	Imagens de AFM da proteína BeCen1-holo	93
FIGURA 37 -	Imagens de AFM da proteína BeCen3 –holo	93
FIGURA 38 -	Imagens de MET da proteína BeCen1-apo.	94
FIGURA 39 -	Imagens de MET da proteína BeCen3-apo	95
FIGURA 40 -	Termograma da Titulação Isotérmica de cálcio na proteína BeCen1.	98
FIGURA 41 -	Termograma da Titulação Isotérmica de cálcio na proteína BeCen3.	99

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela I	Oligonucleotídeos utilizados na clonagem de BeCen1 e BeCen3	43
Tabela II	Medidas de Diâmetro Efetivo das proteínas BeCen1 e BeCen3 em suas formas apo ou holo	76
Tabela III	Deconvolução dos espectros de CD da BeCen1 e BeCen3	82
Tabela IV	Dados Termodinâmicos obtidos para a ligação de cálcio às proteínas BeCen1 e BeCen3	100



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta G$	Variação da Energia Livre de Gibbs
$\Delta H$	Variação da Entalpia
$\Delta S$	Variação da Entropia
$\Delta T$	Variação da Temperatura
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> – Microscopia de força atômica
ANS	1-Anilino-8-Naphthalene sulfonate
<i>B. emersonii</i>	<i>Blastocladiella emersonii</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Ca <sup>++</sup>	Cálcio
CaBP's	<i>Calcium Binding Proteins</i> – Proteínas ligantes de Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CD	<i>Circular Dichroism</i> – Dicroísmo Circular
cDNA	Ácido desorribonucleico complementar
D.O.	Densidade optica
DLS	<i>Dinamic Light Scattering</i> - Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	Ácido bis (2-aminoetil) etilenoglicol- N,N,N',N'-tetracético
F <sub>d</sub>	Fração desnaturada
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i> - Calorimetria de Titulação Isotérmica
K <sub>a</sub>	Constante de ligação
KCl	Cloreto de Potássio
LB	Meio de cultura Luria Bertani
MET	Microscopia Eletronica de Transmissão
Mg <sup>++</sup>	Magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio

MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
R	Constante Universal de gases
RALS	<i>Right Angle Light Scattering</i> – Espalhamento de luz em Ângulo Reto
RMS	<i>Root Mean Square</i> – Desvio médio quadrático
RNA	Ácido ribonucleico
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> – Espalhamento de raios-X a Baixo Ângulo.
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
TM	Temperatura média de Transição
TRIS	Tris (hidroximetil aminometano
U	Unidades
u.a.	Unidades Arbitrárias
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

## LISTA DE AMINOÁCIDOS

<b>NOME</b>	<b>SÍMBOLO</b>	<b>ABREVIACÃO</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>
Glicina	Gly, Gli	G	Polar não Carregado
Alanina	Ala	A	Apolar
Leucina	Leu	L	Apolar
Valina	Val	V	Apolar
Isoleucina	Ile	I	Apolar
Prolina	Pro	P	Apolar
Fenilalanina	Phe, Fen	F	Apolar
Serina	Ser	S	Polar não Carregado
Treonina	Thr, The	T	Polar não Carregado
Cisteina	Cys, Cis	C	Polar não Carregado
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Polar não Carregado
Asparagina	Asn	N	Polar não Carregado
Glutamina	Gln	Q	Polar não Carregado
Ácido Aspártico	Asp	D	Negativo
Ácido Glutâmico	Glu	E	Negativo
Arginina	Arg	R	Positivo
Lisina	Lys, Lis	K	Positiva
Histidina	His	H	Positiva
Triptofano	Trp, Tri	W	Apolar
Metionina	Met	M	Apolar





## SUMÁRIO

<b><u>1. INTRODUÇÃO</u></b> .....	29
1.1 Proteínas Ligantes de Cálcio.....	29
1.2 A Família das Proteínas “EF-Hand”.....	29
1.3 Centrinas.....	35
1.4 Centrinas do Fungo <i>Blastocladiella emersonii</i> .....	37
1.5 Objetivos.....	40
<b><u>2. MATERIAIS E MÉTODOS</u></b> .....	43
2.1 Amplificação do cDNA de <i>Blastocladiella emersonii</i> .....	43
2.2 Clonagem em vetor de propagação.....	44
2.2.1. Purificação e adição de adeninas.....	44
2.2.2 Reação de ligação e transformação em <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ .....	45
2.3 Sequenciamento.....	46
2.4 Clonagem em vetor de expressão.....	46
2.4.1 Reação de ligação.....	47
2.4.2 Transformação e confirmação dos clones positivos.....	47
2.5 Expressão e purificação.....	48
2.5.1 Teste de solubilidade.....	49
2.5.2 Purificação dos produtos recombinantes solúveis.....	49
2.6 Alinhamento de Varias Sequências de Centrinas.....	50
2.7 Cromatografia de Exclusão de Peso Molecular para Caracterização Estrutural.....	51
2.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular - CD.....	51
2.9 <i>Dinamic Light Scattering</i> - DLS.....	55
2.10 <i>Right Angle Light Scattering</i> - RALS.....	55
2.11 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência.....	57
2.12 Calorimetria de Titulação Isotérmica - ITC.....	60
2.13 Microscopia de Força Atômica - AFM.....	63
2.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET.....	64

<b><u>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES</u></b> .....	67
3.1 Amplificação e clonagem do cDNA de BeCen 1 e BeCen3.....	67
3.1.1 Subclonagem no vetor de expressão.....	68
3.2. Análise de sequências.....	68
3.3 Expressão recombinante, análise da solubilidade e purificação.....	70
3.4 Cromatografia de Exclusão de Peso Molecular: purificação e estado conformacional.....	73
3.5 <i>Dinamic Light Scattering</i> .....	75
3.6 Aspectos Estruturais da BeCen1 e BeCen3 investigados neste trabalho.....	76
3.6.1 Estudos estruturais utilizando a técnica de Dicroísmo Circular.....	76
3.6.2 Estudos Estruturais Utilizando Emissão de Fluorescência.....	83
3.7 Investigação da Formação de Filamentos.....	87
3.7.1 Espalhamento de Luz em função da Temperatura – <i>Right Angle Light Scattering</i> .....	88
3.7.2 Microscopia Força Atômica.....	89
3.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	94
3.8 Calorimetria .....	95
<b><u>4. CONCLUSÕES</u></b> .....	103
<b><u>5. PERSPECTIVAS</u></b> .....	109
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b> .....	113

# INTRODUÇÃO

---



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Proteínas Ligantes de Cálcio – “Calcium Binding Proteins” (CaBP’s)**

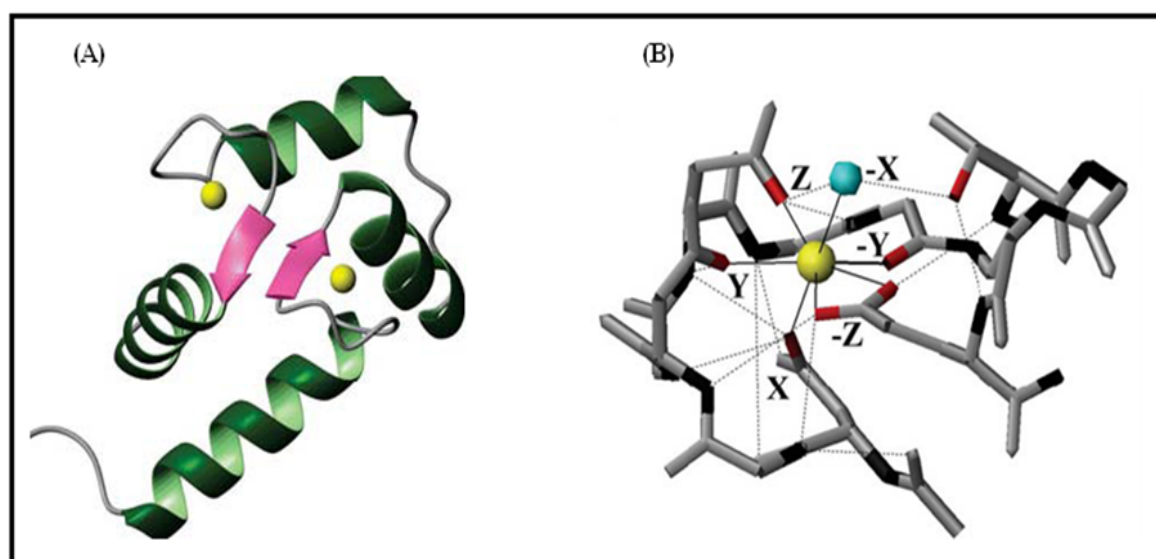
O cálcio é o quinto elemento mais abundante nos organismos e está envolvido na transmissão de impulsos nervosos, contração muscular e flagellar, coagulação sanguínea, funções cardíacas, sinalização intracelular, divisão celular entre outros mecanismos biológicos ainda não esclarecidos. É encontrado livre nos fluídos extracelulares e no interior celular, em concentrações que podem variar de aproximadamente 10 nM a 100 nM (2). Nos vertebrados mais de 99% do cálcio está armazenado nos ossos, enquanto que o 1% remanescente está dissolvido nos fluidos corpóreos e ligados a proteínas específicas: as proteínas ligantes de cálcio ou “CaBP’s”, como são classificadas (2). A presença de cálcio media uma variedade de processos fisiológicos na célula, como por exemplo, a ligação de várias proteínas à membranas, além de atuar como mensageiro intracelular quando ligado às CaBP’s (3).

### **1.2 A Família das Proteínas “EF-Hand”**

A maioria das CaBP’s pertencem a família das “EF-Hand” ligantes de cálcio, compreendendo mais de 40 subfamílias de proteínas, entre estas: a Calmodulina, Troponina, Caltractina, S100,  $\alpha$ -Actina, e a Parvalbumina, que foi a primeira proteína descrita com o domínio “EF-Hand”, este justamente formado entre as hélices E e F de sua estrutura cristalográfica (4).

As proteínas “EF-Hand” ainda podem ser divididas em duas classes: as moduladoras de cálcio - “calcium sensors” ou as tamponantes de cálcio - “calcium buffers” (5). As proteínas moduladoras de cálcio traduzem o sinal químico, das diferentes concentrações de cálcio, em respostas bioquímicas. Mudanças conformacionais induzidas pelo íon também podem ser observadas para esta classe de proteínas, acarretando em ativações enzimáticas, ligações com outras proteínas, e demais respostas. Já a classe das proteínas tamponantes de cálcio, ligam o cálcio livre para transmitir o sinal pela célula ou para remover o íon potencialmente prejudicial do citoplasma. Uma pequena porção das “EF-Hand”s ajudam na regulação do sinal de cálcio tanto espacial quanto temporalmente, e não sofrem mudanças conformacionais em sua estrutura tridimensional na presença do íon (6).

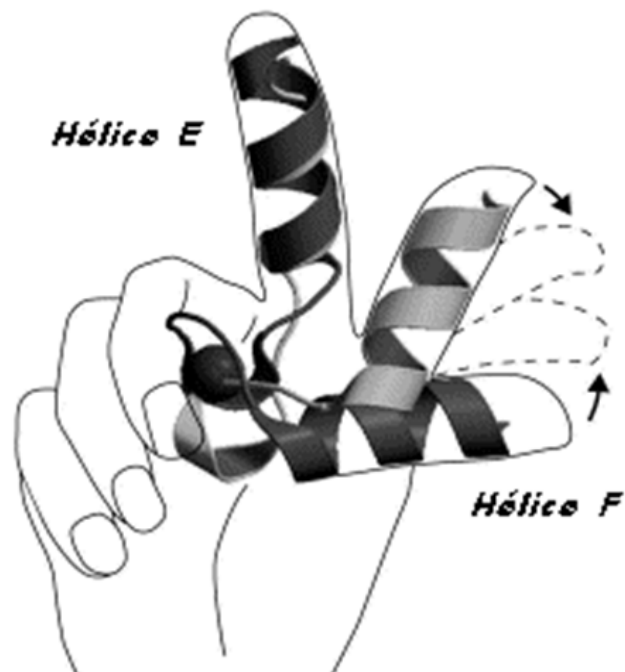
Os domínios ligantes de cálcio presentes nestas proteínas são compostos por dois motivos “EF-Hand” e seguem uma estrutura típica de hélice-volta-hélice, a qual é composta de duas  $\alpha$ -hélices conectadas por um volta ligante de cálcio (Figura 1A) (7). Esta região da volta é composta por 12 resíduos e é rica em aminoácidos carregados negativamente, como ácido glutâmico (E) e ácido aspártico (D), contendo também diferentes aminoácidos que possuem importante papel na estabilização da estrutura. A glicina (G), por exemplo, presente na sexta posição com papel fundamental na flexibilidade da volta. Dois motivos “EF-Hand”s são estabilizados por uma pequena folha- $\beta$  formada entre as voltas (7). A estrutura geométrica típica do motivo “EF-Hand” é determinada por sete ligantes formando uma bipirâmide pentagonal (Figura 1B). Na maioria das vezes domínios “EF-Hand” ocorrem em pares criando uma distância de 11Å entre os dois íons de cálcio ligados, neste caso os domínios são chamados de par ou ímpar, dependendo se os dois domínios são ativos (par) ou não (ímpar) (6).



**Figura 1-Motivos “EF-Hand”s do domínio N-terminal da calmodulina.** (A) Um elemento estrutural adicional é observado no par como uma pequena folha -  $\beta$  antiparalela formada. (B) Coordenação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo domínio “EF-Hand” da Calmodulina ilustrando a estrutura geométrica de bipirâmide pentagonal nas linhas contínuas e ligações de hidrogênio na volta marcado pelas linhas pontilhadas, grupos NH em preto, átomos de oxigênio em vermelho,  $\text{Ca}^{2+}$  em amarelo e molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  em azul (6).

No caso das parvalbuminas existem três motivos “EF-Hand” ativos e, o motivo que permanece inativo serve como estabilizador na ligação de cálcio ao domínio ativo. Existem também famílias que possuem cinco motivos “EF-Hand’s”, no entanto, a função deste quinto motivo é a promoção da auto-associação a outra molécula igual, formando uma estrutura com dez “EF-Hand”s, por exemplo, a proteína Calpaína (8).

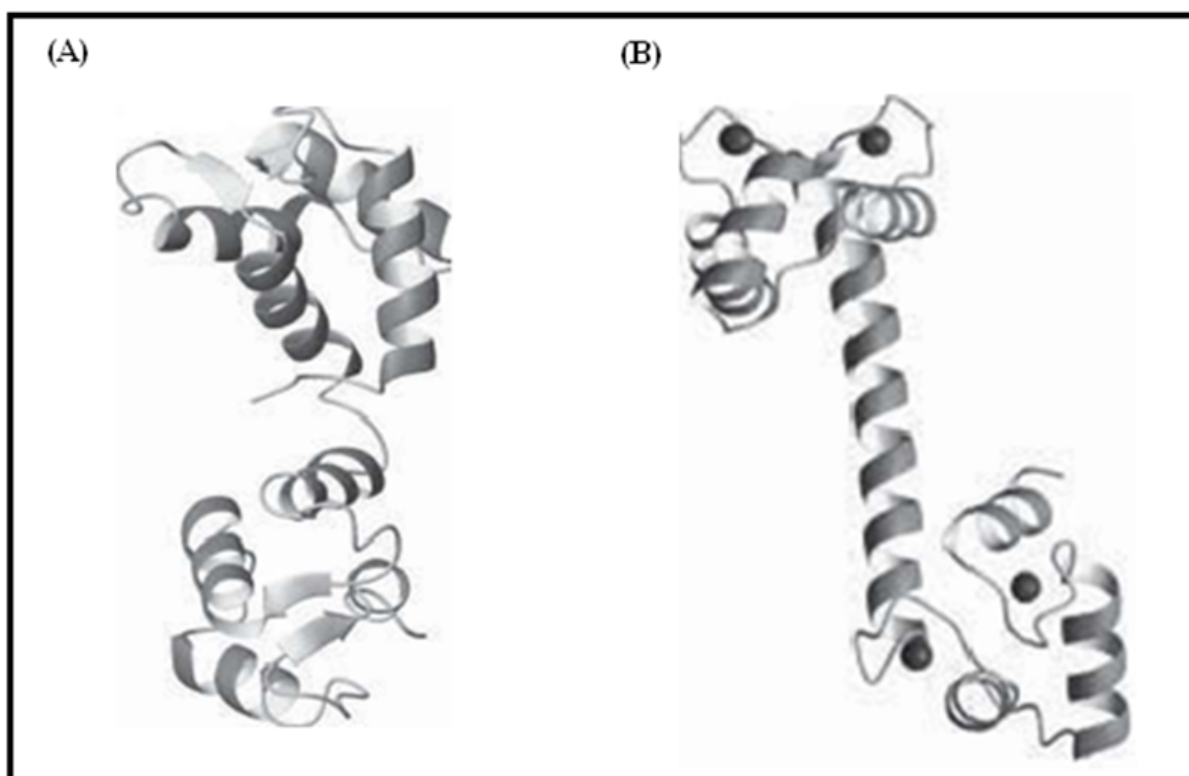
O cálcio pode causar mudanças conformacionais nas proteínas “EF-Hand”, estas mudanças são referentes a uma conformação aberta ou fechada do domínio ligante de cálcio e/ou com relação a hélice que liga os domínios. O que ocorre, é uma mudança no ângulo entre as hélices que pareiam a volta, onde o íon é ligado. Algumas Calmodulinas, por exemplo, possuem um ângulo de  $130\text{-}140^\circ$  entre suas hélices, quando na forma apo (sem cálcio), e um ângulo de  $90^\circ$  quando na forma holo (com cálcio) (Figura 2), esta mudança acarreta em uma exposição de cadeias laterais hidrofóbicas que anteriormente estavam no interior da estrutura (9).



**Figura 2 - Representação das  $\alpha$ -hélices E e F pertencentes ao motivo “EF-Hand” e sua mudança angular na presença de cálcio (10).**

As Calmodulinas ilustram bem as mudanças conformacionais em relação à presença de cálcio e de outros ligantes específicos. Como podemos observar na figura 3 a proteína Calmodulina, sem os íons de cálcio ligados, apresenta-se mais compacta e não tão alongada quanto a proteína ligada ao cálcio, apresentando uma longa hélice que liga os dois conjuntos de domínios “EF-Hand”, ilustrando a flexibilidade desta hélice conectora (3).

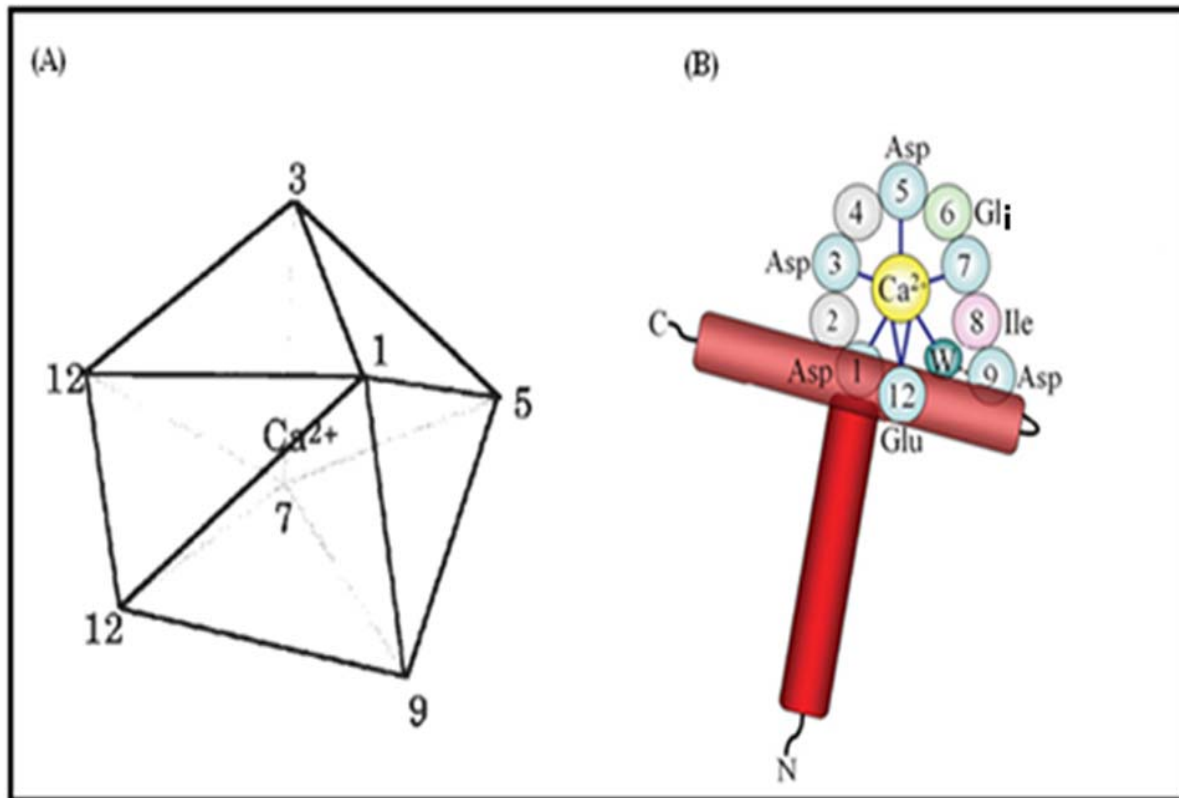




**Figura 3 - Mudanças conformacionais na Proteína Calmodulina.** (A) Calmodulina sem cálcio ligado. (B) Calmodulina com íons de cálcio ligados aos domínios “EF-Hand” (11).

Existem seis resíduos envolvidos na ligação de cálcio, estes estão localizados nas posições 1, 3, 5, 7, 9, e 12 da volta e formam uma bipirâmide pentagonal (Figura 4A). Os resíduos de aminoácidos presentes em algumas posições da volta são essenciais para o funcionamento e estrutura do domínio. Na primeira posição da volta, por exemplo, é sempre encontrado um resíduo de ácido aspártico (D), na posição 3 quase sempre encontramos um resíduo de ácido aspártico (D) ou asparagina (N). O resíduo da posição 12 também não varia e é sempre um ácido glutâmico (E) ou um ácido aspártico (D), sendo estes responsáveis pela ligação bidentada, formada pela ligação do cálcio a ambos os oxigênios das carboxilas do resíduo, doando o sétimo oxigênio da estrutura. A participação de um resíduo de glicina (G) na sexta posição da volta, também é conservada, e sua presença é responsável pela flexibilidade, pois não possui cadeia lateral. Na posição 8, frequentemente, encontra-se um resíduo de isoleucina (I), ou então outro resíduo hidrofóbico como valina (V) ou leucina (L),

contribuindo para a formação da pequena folha- $\beta$  antiparalela, existente entre as voltas de ligação de cálcio no domínio (Figura 4B) (6).



**Figura 4 - Estrutura da Ligação de Cálcio.** (A) Bipirâmide Pentagonal formada pela ligação de cálcio na volta das proteínas “EF-Hand”. (B) Resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação de cálcio na volta das proteínas “EF-Hand” (6).

Além do cálcio, o magnésio também pode se ligar aos motivos “EF-Hand”, no entanto, em sítios específicos de cálcio, o magnésio parece só se ligar a seis resíduos da volta, não utilizando o 12º resíduo, neste caso formando um octaedro. A seletividade do magnésio a determinados sítios, se dá devido dois aspectos destes íons: primeiro, citado acima, sobre os seis ligantes necessários para a ligação e segundo, o menor raio iônico do magnésio resultando um custo energético mais elevado de desidratação. Nas Calmodulinas, esta ligação não promove mudanças conformacionais na proteína, somente certa rigidez na volta. Já as proteínas que possuem sítios “EF-Hand” não específicos de cálcio, ligam magnésio com certa afinidade e esta ligação utiliza-se inclusive do 12º resíduo da volta (12).

A ligação do magnésio às proteínas “EF-Hand”, pode ser importante em três aspectos: primeiro para a estabilidade estrutural da proteína, segundo para modular a afinidade da proteína ao cálcio, e terceiro para a modulação de funções contráteis em condições de estresse (6).

### 1.3 Centrinas

Analises comparativas de seqüência de varias centrinas, mostram que estas fazem parte da superfamília das proteínas “EF-Hand”, descritas anteriormente. As centrinas foram primeiramente identificadas na alga verde *Tetraselmis striata*, como componente das suas raízes flageladas (13). Após a descrição de centrinas em algas, estas também foram identificadas em camundongos, plantas e humanos. (14-16).

Em geral centrinas são proteínas ácidas com tamanho de aproximadamente 20kDa. Enquanto algas e fungos possuem, geralmente, somente uma centrina, vertebrados possuem quatro isoformas distintas, com seqüências variadas e distribuição celular diferentes (17). Em células animais, estão presentes no centrossomo como componente essencial, sendo mediadora da segregação cromossômica durante a mitose. Nas algas verdes, como, *Chlamydomonas reinhardtii*, localizam-se no centro organizador de microtúbulos e participam da contração de fibras conectoras do núcleo ao corpo basal, sendo este mecanismo dependente de cálcio (18). Também existem relatos da participação de centrinas na excisão do flagelo em *C. reinhardtii* (19). Em diversas algas verdes o produto do gene correspondente a centrina é encontrado em seis locais diferentes; no citoesqueleto, no corpo conector do corpo basal, fibra conectora distal, lúmen, axonema e nos corpos pró-basais. Nas leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, mostram um papel essencial na duplicação e separação do corpo polar do fuso, que corresponde ao centro organizador de microtúbulos em algas. (20). É importante ressaltar que independente do tipo e complexidade do centrossomo presente nas células dos diferentes organismos vivos, seu principal componente é sempre  $\gamma$  - tubulina e centrina, sendo esta última essencial no processo de organização,

duplicação e outros processos nos centrossomos (21). Algumas centrinas acumulam-se na parte interna dos centríolos, já nos primeiros estágios de sua formação, sendo facilmente detectada intracelularmente. A centrina humana HsCen1, ligada a sondas fluorescentes, tem sido muito utilizada na detecção e localização exata dos centríolos em formação em cultura de diversas células animais, durante vários estágios do ciclo celular (22).

Recentemente, mais funções das centrinas foram reveladas: reparo de DNA recombinante pela regulação da via de reparo da excisão de nucleotídeos em humanos e plantas (20), maquinaria de exportação de RNAm nuclear em leveduras (23), regulação de atividades cálcio-dependentes em ciliados, transdução de sinal em fotorreceptores de vertebrados (24) e também na formação de fibras contrácteis ligando o núcleo ao corpo basal (25).

Hoje, as estruturas cristalográficas disponíveis de centrinas completas são: HsCen2 complexada com um peptídeo de 17 resíduos pertencente ao complemento C do gene responsável por causar xeroderma pigmentoso em humanos (P17-XPC) (26); e a proteína de *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc31p complexada a sequências repetidas da proteína Sfi1 (27), conhecida por interagir com centrinas. Provavelmente, as poucas estruturas tridimensionais de centrinas resolvidas por cristalografia, se devem a dificuldade na obtenção de cristais em função da grande flexibilidade destas proteínas, dificultando o processo de cristalização.

Em 1997, Middendorp e colaboradores (28) sugeriram a existência de duas subfamílias divergentes dentro das centrinas: a primeira sendo definida pela centrina da alga verde *C. reinhardtii* (CrCenp), relacionada a três centrinas presentes em mamíferos (HsCen1, HsCen2 e MmCen1), sendo responsável por funções contrácteis e a segunda, caracterizada pela centrina ScCdc31p de *Saccharomyces cerevisiae*, relacionada a proteínas HsCen3 e MmCen3 em mamíferos e com funções na duplicação do centro organizador de microtúbulos. Alguns eucariotos possuem as duas formas de centrinas e com base nestes dados, surge a questão se todos os eucariotos possuem esses dois tipos de centrinas.

Até o ano de 2005, somente o tipo ScCdc31p havia sido descrito para fungos. Porém, neste mesmo ano foram isolados genes correspondentes a duas isoformas de centrinas em *B. emersonii* (29): BeCen3, pertencente à subfamília ScCdc31p de *Saccharomyces cerevisiae*, e BeCen1, pertencente a subfamília CrCenp de *C. reinhardtii*, nunca descrita antes em fungos.

#### 1.4 Centrinas do Fungo *Blastocladiella emersonii*

O fungo aquático *Blastocladiella emersonii* da classe dos quitridiomycetos, faz parte de um grupo de fungos que possuem uma fase flagelada durante seu ciclo de vida, o zoósporo. O ciclo se inicia com a germinação do zoósporo em uma célula vegetativa, a qual é capaz de proliferar cenociticamente dando origem a uma célula multinucleada. A célula vegetativa pode ser induzida à esporulação, em qualquer momento, com a reposição do meio carente em nutrientes, um processo no qual coincide com a produção de novos zoósporos (Figura 5). A esporulação e a germinação são caracterizadas por mudanças bioquímicas e morfológicas importantes, envolvendo controles transcricionais e pós-transcricionais (30).

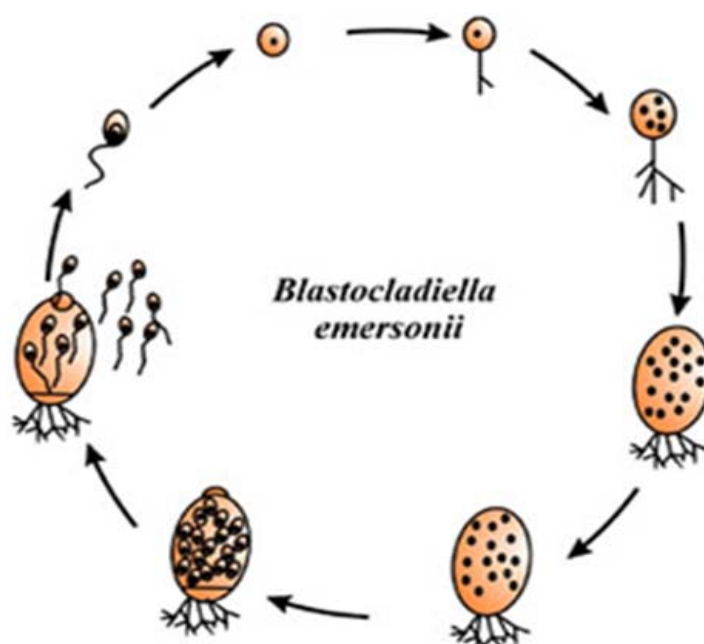
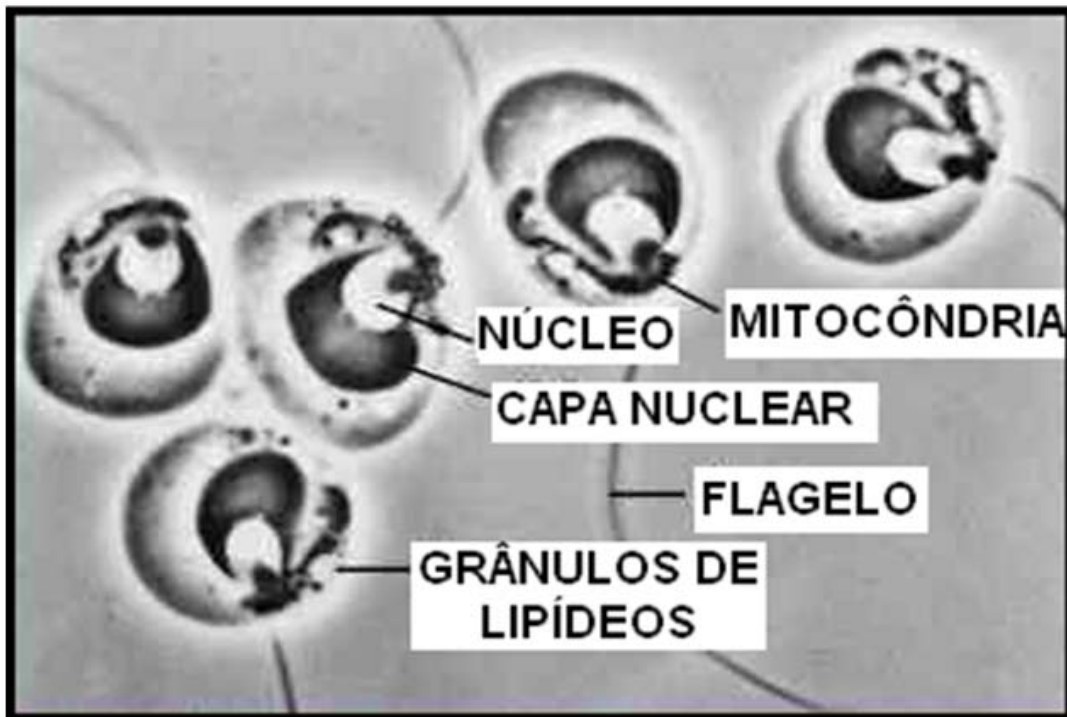


Figura 5 - Ciclo de vida do fungo *Blastocladiella emersonii*. Disponível em <http://blasto.iq.usp.br/>

O ciclo de vida do fungo pode ser dividido em cinco estágios. No primeiro estágio correspondente ao zoósporo, a célula tem alta mobilidade e tem como característica

principal, a dispersão e propagação do organismo (Figura 6). Pode permanecer móvel durante horas ou pode sofrer um encistamento e dar origem a germinação, dependendo do meio em que se encontra. Estudos mostram que o zoósporo na presença de baixas concentrações de cálcio tem sua estabilidade aumentada (31).



**Figura 6 - Micrografia do zoósporo de *Blastocladia emersonii*.** O zoósporo possui aproximadamente 2,5 $\mu$ m de diâmetro, longo flagelo e um núcleo bem proeminente. Também é caracterizado por apresentar uma grande mitocôndria, uma capa nuclear onde os ribossomos são agregados, e grânulos de lipídeos. Disponível em: <http://www.bsu.edu/classes/ruch/msa/porter>.

O segundo estágio corresponde a germinação do zoósporo, onde a presença de KCl (cloreto de potássio) do meio irá induzir o encistamento, ocorrendo então a retração do flagelo, perda dos microtúbulos citoplasmáticos, arredondamento da célula, rompimento da capa nuclear e diminuição do volume celular. A germinação, propriamente dita, começa com o crescimento do rizóide primário, aumento do núcleo, aparecimento de vesículas apicais e mitocôndria alongada. Nesta fase o cálcio e a Calmodulina são essenciais para a germinação, ocorrendo a inibição completa desta fase se não presentes (30).

No terceiro estágio ocorre o crescimento exponencial, marcada por aumento da célula (cisto) e proliferação celular (mitose), também pode ser notado a ramificação e alongamento dos rizóides. O quarto estágio é caracterizado pela formação do zoosporângio e crescimento de uma parede separando o pré-zoosporângio multinucleado da região do rizóide. Pode ser notada também a formação de uma papila hialina por onde vão ser liberados os zoósporos no próximo estágio. O quinto e último estágio é a diferenciação do zoósporo, onde ocorre a formação do flagelo, formação da capa nuclear e liberação dos zoósporos quando maduros. Lembrando que a liberação das células esta intimamente ligada a presença de cálcio no meio (30). O fungo *B.emersonii* é um ótimo modelo de estudo, pois além de possuir um rápido crescimento de células multinucleadas, é de fácil manipulação em todas as diferentes fases de seu ciclo.

Estudos recentes, mostram que a proteína BeCen1 de *B.emersonii* apresenta níveis máximos de expressão no período entre 120-150 minutos da esporulação, que é quando os centríolos maiores alongam-se para formar o corpo basal (29), sugerindo uma função associada ao centríolo. Ao mesmo tempo ocorre a transição da cariocinese para a citocinese em *B. emersonii*. Sabe-se que as proteínas CrCenp estão envolvidas na orientação das fibras do corpo basal e também em eventos de segregação durante a mitose (32). Então, este aumento nos níveis de expressão de BeCen1 durante a esporulação, pode estar diretamente relacionado à formação do corpo basal e também a transição desta fase de desenvolvimento em *B. emersonii*. Com técnicas de imunolocalização foi detectada a presença da proteína BeCen1 na região citoplasmática do fungo, ao redor do núcleo, reforçando a idéia de que as centrinas apresentam funções ainda desconhecidas no citoplasma e também no núcleo (29).

Este trabalho foi proposto levando-se em consideração a importância fisiológica das “*EF-Hand*” como ligantes de cálcio em fungos, animais e diversos outros organismos; a diversidade de funções descritas para as centrinas nos diferentes reinos; e a falta de informações das centrinas descritas em *B. emersonii* (BeCen1 e BeCen3). O escopo geral foi criar um protocolo para a expressão de BeCen1 e BeCen3 de forma heteróloga, estudar aspectos estruturais e explorar propriedades físico-químicas destas proteínas sempre comparando-as entre si.

## 1.5 Objetivos

Com o objetivo geral de contribuir com informações bioquímicas e biofísicas das centrinas de *Blastocladiella emersonii*, este trabalho objetivou caracterizar as duas proteínas de forma comparativa em relação a ligação de cálcio e sua capacidade de formar filamentos.

De acordo com o objetivo geral do trabalho os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos:

- ✓ Estabelecer um sistema de expressão para as centrinas BeCen1 e BeCen3;
- ✓ Obte-las em forma solúvel e em estado de homogeneidade adequados para os estudos estruturais;
- ✓ Estudar aspectos de suas estruturas, na ausência e presença de cálcio, utilizando diferentes métodos espectroscópicos como: dicroísmo circular, emissão de fluorescência e espalhamento de luz;
- ✓ Caracterizar a ligação de cálcio nas proteínas BeCen1 e BeCen3 utilizando a calorimetria de titulação isotérmica ;
- ✓ Explorar a formação de filamentos, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica;



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---



## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amplificação do cDNA de *Blastocladiella emersonii***

Os cDNA codificantes de BeCen1 e BeCen3 foram clonados no vetor pSPORT1 e gentilmente cedido pela Dra. Karina F. Ribichich IQ-USP (29).

Para a amplificação do cDNA que codifica a BeCen1 e 3, utilizou-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR, em um termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf), tendo como molde o cDNA no vetor pSPORT1. Para subclonagem foram sintetizados os seguintes primers, que flanqueavam as regiões codificantes:

Tabela I - **Oligonucleotídeos para a clonagem de BeCen1 e BeCen3.** Em cinza está o sítio de restrição para enzima *Nde* I e em preto está o sítio de restrição para a enzima *Bam*HI.

<b>Oligonucleotídeos</b>	<b>Seqüência de nucleotídeos</b>
BeCen1-Senso-NdeI	5'CCC ATA TGG TGT CCT CCA ACA CCA CGT TC 3'
BeCen1- Reverso-BAMHI	5'CGG ATC CTC AGT ACA GGT TGG TCT TCT TC 3'
BeCen3-Senso-NdeI	5'GCC ATA TGT CAC TCG CGT TCC CCG TCT CGA C 3'
BeCen3-Reverso-BAMHI	5'CGG ATC CTC AGT AGT CGT CCG TCA TGA TGC TC 3'

As sequências codificadoras utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos estão depositadas no banco de dados público, GenBank, sob os números de acesso DQ112161.1 (BeCen1) e DQ112162.1(BeCen3).

Para a amplificação da região que codifica a BeCen1 e 3, foram feitas reações de PCR contendo: 500 ng de DNA, 100 pmol de primers, 0,2 mM de dNTP's, 1 unidade de enzima *Taq* Platinum High Fidelity (Promega), tampão da enzima 1X, 2,5 mM de MgSO<sub>4</sub> e quantidade suficiente de água MilliQ para 50 uL de volume final. No caso da BeCen3, foi utilizado também DMSO 5%.

Para tais reações, o ciclo de amplificação foi realizado sob as seguintes condições:

94°C por 2,5 min. – desnaturação inicial

30X { 94°C por 0,3 min. - desnaturação  
72°C por 0,5 min. – hibridização\*  
68°C por 1 min. - extensão

68°C por 5 min. – extensão final

\*No caso da BeCen3, a temperatura de hibridização foi de 64°C.

## 2.2 Clonagem em vetor de propagação

### 2.2.1. Purificação e adição de adeninas

Os produtos resultantes das amplificações foram purificados com o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida foram adicionadas adeninas nas extremidades dos produtos amplificados, já que o

vetor escolhido (pGEMT-Easy) possui a base nitrogenada timina em suas extremidades. A reação foi catalisada por 5U *Taq* DNA Polimerase (Promega), na presença de 0,2 mM de dATP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, sob incubação a 70°C por 30 minutos.

### 2.2.2 Reação de ligação e transformação em *E. coli* DH5- $\alpha$

Em seguida foi feita outra reação para promover a ligação do vetor pGEMT-Easy às seqüências gênicas de interesse. Nesta reação foi utilizado 100 ng de DNA acrescido de adeninas, 50 ng do vetor, tampão da enzima 1X, T<sub>4</sub> DNA ligase (Promega) 3U e água Milli-Q suficiente para 20  $\mu$ l. A mistura foi incubada a 4°C *overnight*.

Após o tempo de incubação, todo o volume da reação anterior foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , competente por tratamento com Cloreto de Cálcio (33).

Colônias transformantes foram selecionadas em meio de cultura LB (Luria Bertani) ágar contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, 0,2 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) e 0,04 mg/mL de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo). Colônias brancas foram escolhidas aleatoriamente e inoculadas em 5 mL de LB líquido com 50  $\mu$ g/mL de ampicilina seguida de incubação a 37 °C, 200 rpm por 16 horas, para posterior extração de DNA plasmidial.

## 2.3 Sequenciamento

Dentre os clones positivos três deles, de cada construção, foram escolhidos aleatoriamente para terem suas seqüências determinadas. Para o sequenciamento foi utilizada a técnica de didesoxinucleotídeo marcado (33) em um seqüenciador automático ABI-Prism 377 (Perkin Elmer). Os oligonucleotídeos, SP6 e T7, próprios para o vetor pGEMT-Easy foram utilizados. A seqüência protéica deduzida a partir da seqüência de DNA foi submetida à análise da seqüência primária pelo *software Prot Parameters* (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>).

## 2.4 Clonagem em vetor de expressão

Inicialmente os plasmídios de propagação foram clivados com as enzimas *NdeI* e *BamHI* (Fermentas), para isolar os fragmentos gênicos. Esse procedimento foi feito utilizando 2,4 µg de plasmídios, 10U de cada enzima de restrição, tampão da enzima 1X e quantidade suficiente de água MilliQ para completar o volume final de 40 µl.

Ambas enzimas possuíam atividade no mesmo tampão e a mesma temperatura. Assim a reação foi incubada a 37°C por 3 horas. Após a incubação todo o volume da reação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE [1X], seguido de excisão e purificação da banda de interesse do gel.

O vetor escolhido para a construção dos plasmídios de expressão foi o pET28a, que possibilita a produção da proteína fusionada com cauda de histidina no N-terminal, seguida por um sítio de reconhecimento da protease trombina. O plasmídio escolhido carrega a região promotora do bacteriófago T7, designada para a expressão de altos níveis de proteína.

### 2.4.1 Reação de ligação

Após confirmação da clonagem, pela análise de restrição, os fragmentos foram isolados do plasmídeo *pGEMT-Easy*, sendo então purificados pelo método de lise alcalina (33).

Em seguida foi feita a ligação dos fragmentos no vetor previamente linearizado com as mesmas enzimas (*NdeI* e *BamHI*), nesta reação foi utilizado 50 ng do vetor pET28a, 150 ng do inserto clivado e purificado, 3U da enzima T4 DNA ligase (Fermentas), tampão da enzima 1X e quantidade suficiente de água MilliQ para completar o volume final de 10 µl. As reações foram incubadas a 4°C, *overnight*.

### 2.4.2 Transformação e confirmação dos clones positivos

Após o tempo de incubação, células da linhagem *E. coli* DH5α, competentes por tratamento com Cloreto de Cálcio, foram transformadas, com todo o volume das misturas de ligação. A suspensão foi mantida no gelo por 20 minutos e em seguida conduziu-se o choque térmico por 2 minutos a 42 °C. Após adição de 500 µL de meio LB, as células foram incubadas por 1 hora, a 37 °C e agitação de 200 rpm. As células foram concentradas por centrifugação a 6000 x g por 1 minuto, ressuspensas em 100 µL de meio LB e espalhadas em placas de petri contendo LB ágar mais agentes seletivos.

As colônias positivas foram selecionadas pela resistência ao antibiótico específico no vetor: Canamicina 30 µg/mL.

Para a confirmação de quais colônias continham o plasmídeo de interesse, foi feito um PCR de colônia. Cada uma das colônias foi puncionada e ressuspensa em 10 µl de água estéril. Essas amostras foram fervidas por 5 minutos. A seguir, 3 µl de cada amostra foram

misturados com 7  $\mu$ l da mistura de reação, contendo 500 pmol de primers, 0,3 mM dNTP's, 1U de enzima *Taq Platinum High Fidelity* (Promega), tampão da enzima 1X, 2,5 mM de  $MgSO_4$  e quantidade suficiente de água MilliQ para 100  $\mu$ L de volume final.

Os clones positivos tiveram seu DNA plasmidial extraídos pelo método da lise alcalina seguida de precipitação com álcool (34). Colônias isoladas de bactérias foram inoculadas em 5 mL de meio LB com 30  $\mu$ g/ml de canamicina e incubadas a 37 °C por 16 horas a 250 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto e ressuspensas em 300  $\mu$ L de solução I (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, pH 8,0) por agitação vigorosa. Em seguida adicionou-se 300  $\mu$ L de solução II (0,2 N de NaOH, 1% de SDS), agitou-se a mistura por inversão e mantendo-a por 5 minutos a temperatura ambiente. Trezentos  $\mu$ L de solução III (60 mL de acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial, 28,5 mL de água) foram adicionados, seguido por homogeneização da mistura por inversão e centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtudo e 0,7 volume de isopropanol foi adicionado seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. A precipitação do DNA procedeu-se por centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos. O excesso de sal foi retirado pela lavagem do DNA precipitado com 500  $\mu$ L de etanol 70%, seguido de centrifugação nas mesmas condições anteriores. Os DNAs precipitados foram secos a temperatura ambiente e a seguir ressuspensos em 50  $\mu$ L de água e quantificados por eletroforese em gel de ágarose 1% ou em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Confirmada a clonagem nos vetores de expressão, células da linhagem *E. coli* BL21(DE3), competentes por tratamento com Cloreto de cálcio, foram transformadas com um plasmídeo positivo, para a expressão.

Todo o procedimento de clonagem foi conduzido de acordo com as técnicas padrão de clonagem molecular descritas por Sambrook (34).

## 2.5 Expressão e purificação



### 2.5.1 Teste de solubilidade

Foi feito um pré-inóculo em LB, contendo o antibiótico canamicina 30 µg/mL para cada construção. Esse pré-inóculo foi incubado a 37°C, overnight, sob agitação de 250 rpm e a seguir diluído (1:50), em meio LB. As células foram crescidas, em constante agitação a 37°C, até atingir uma D.O.<sub>600 nm</sub> entre 0,4 e 0,6. A seguir, a cultura foi induzida com 0,4 mM de IPTG. Após a indução as culturas foram incubadas a 37°C, durante 4 horas, sob agitação de 250 rpm (33).

Após a incubação, cada cultura foi centrifugada por 15 minutos a 7.000g e o sobrenadante foi descartado. As células foram então ressuspensas em 10 ml de Tris 20 mM, NaCl 200mM, pH 7 acrescido de 0,1 mg/ml de lisozima. A suspensão foi incubada por 30 minutos em gelo e depois as células foram lisadas por sonicação com 10 ciclos (20 segundos de pulso ultra-som intercalados com 20 segundos de descanso). Os lisados foram centrifugados por 30 minutos a 15.000g, separando assim a fração sobrenadante (solúvel) e a precipitada (insolúvel), sendo esta última ressuspensa em 5 ml do mesmo tampão. Aliquotas foram retiradas e então submetidas a um gel SDS-PAGE 15%, segundo Laemmli (35).

### 2.5.2 Purificação dos produtos recombinantes solúveis

Inicialmente foi feita uma purificação por cromatografia de afinidade, usando 2mL de coluna de resina Ni-NTA super flow (Qiagen), já que as proteínas recombinantes foram produzidas como proteínas de fusão a um hexapeptídeo de histidina na porção N-terminal. A coluna foi equilibrada com 10 volumes do tampão Tris 20 mM, NaCl 200 mM, pH 7 e, em seguida, as frações solúveis dos extratos celulares contendo as proteínas BeCen1 e BeCen3 foram aplicadas, separadamente nas colunas. Estas foram então lavadas com 10 volumes do tampão contendo quantidades crescentes imidazol de 5 a 100 mM para retirar contaminantes

ligados com baixa afinidade. Finalmente, as proteínas de interesse foram eluídas em 5 volumes do tampão Tris 20 mM, NaCl 200mM, pH 7 contendo 250 mM de imidazol.

O eluato proveniente da cromatografia de afinidade foi concentrado e aplicado numa coluna cromatográfica de exclusão molecular, utilizada para separar os agregados protéicos e contaminantes das proteínas de interesse. Volumes de 1 mL das proteínas concentradas foram aplicadas na coluna Superdex75 3.2/30 (Pharmacia Biotech Smart System) acoplada a um sistema Äkta purifier (GE Healthcare), previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado no passo anterior. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min, monitorado pela absorbância em 280 nm e 220 nm e o material eluído foi coletado em frações de 1 mL. Alíquotas do eluato foram retiradas e então submetidas a um gel de SDS-PAGE 15% (35).

## 2.6 Alinhamento de Várias Sequências de Centrininas

Para verificar a identidade de BeCen1 e BeCen3 com outras centrininas foi realizado um alinhamento entre centrininas humanas HsCen1, HsCen2 e HsCen3, BeCen1 e BeCen3 de *Blastocladiella emersonii*, CrCenp de *Chlamydomonas reinhardtii* e CdC31p de *Sacharomyces cerevisiae*. Para este procedimento foi utilizado o programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Já o programa PROSITE database (<http://ca.expasy.org/prosite/>) foi utilizado para identificar os sítios ligantes de cálcio de cada seqüência de centrina analisada (1).

## 2.7 Cromatografia de Exclusão de Peso Molecular para Caracterização Estrutural

A cromatografia de exclusão de peso molecular permite que as moléculas em solução sejam separadas de acordo com seu tamanho. Este método possui vantagens, como uma boa separação de moléculas grandes das pequenas moléculas, com um volume mínimo de eluato, preservando a atividade biológica das partículas a serem separadas.

Com a intenção de investigar se o cálcio induz mudanças conformacionais que possam ser detectadas por esta técnica, as centrinas BeCen1 e BeCen3, ambas as formas apo e holo foram aplicadas em uma coluna Superdex75 3.2/30 (Pharmacia Biotech Smart System). A coluna foi equilibrada com tampão contendo 20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl e 1 mM EGTA pH7,0 para o estado apo e, tampão contendo 2 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.0 para o estado holo. Todas as amostras de proteínas (25 µM) foram pré-incubadas com CaCl<sub>2</sub> (2 mM) ou EGTA (1 mM) durante duas horas a 20°C antes de serem aplicadas na coluna. Os cromatogramas foram monitorados em dois comprimentos de ondas (220 nm e 280 nm), isto foi útil uma vez que BeCen1 não tem triptofanos (W) em sua seqüência. O volume relativo de eluição foi comparado aos padrões de massa molecular e calculado como:  $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_g - V_o)$ , onde  $V_e$  é o volume de eluição,  $V_o$  o volume do void e  $V_g$  o volume geométrico da coluna. Uma curva padrão  $K_{av}$  X Massa Molecular (Kda) foi calculada e a partir desta a massa molecular, da forma apo de BeCen1 e BeCen3, e também da forma holo, de ambas foram estimadas.

## 2.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular-CD

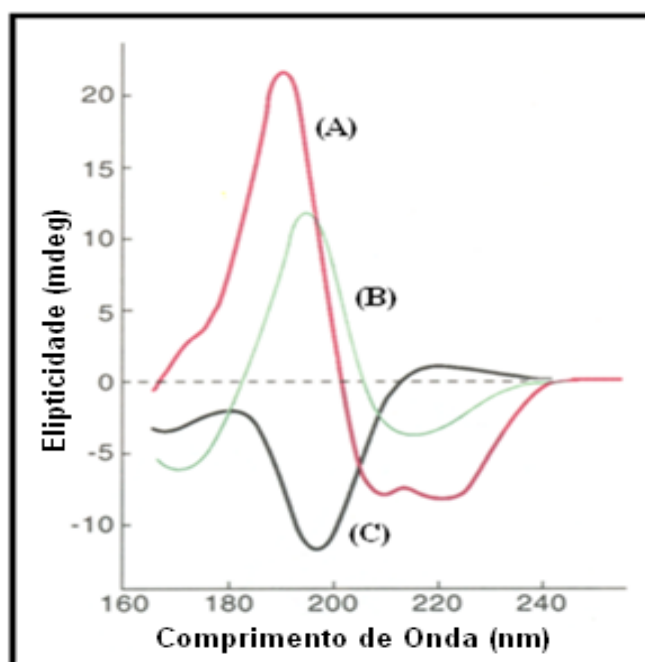
A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica sensível para estimar a porcentagem dos elementos de estrutura secundária de proteínas, podendo também ser

utilizado no monitoramento de mudanças conformacionais em função da interação com ligantes, cinética de “unfolding/refolding” de proteínas, entre outros (36).

O princípio da técnica baseia-se na diferença de absorção dos componentes da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda. Este efeito ocorre quando temos uma molécula quiral, ou seja, com centros assimétricos para que ocorra a absorção desigual entre a direita e esquerda. O equipamento irá produzir as luzes polarizadas a esquerda e a direita e o sinal detectado vai ser a diferença de absorção entre estas, depois de atravessarem as moléculas em solução.

Os resíduos de aminoácidos presentes nas proteínas são assimétricos (com exceção da Glicina) e a formação das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, fazem com que as proteínas gerem um espectro característico de CD, o que permite monitorar alguns tipos de alterações estruturais em estudos de suas propriedades e interações com ligantes. Devido a estas características a espectroscopia de CD é muito utilizada no estudo de proteínas (37).

O estudo de proteínas por CD pode ser realizado na região do ultravioleta distante (180 nm – 250 nm) onde as ligações peptídicas absorvem. Nesta região podemos analisar os componentes de estrutura secundária de cada proteína. Estruturas como  $\alpha$ -hélices, folhas-  $\beta$ , voltas e estruturas desordenadas possuem espectros bem característicos nesta região (Figura 7).



**Figura 7- Representação dos espectros de CD característicos de cada estrutura secundária.** (A)  $\alpha$ -hélice, (B) folha-  $\beta$  e (C) estrutura desordenada. Modificado a partir de (37).

Medidas de CD na região mais próxima do ultravioleta (250 nm – 290 nm) também podem ser realizadas, no entanto, são os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) que absorvem nesta região, podendo fornecer informações sobre alterações estruturais envolvendo o ambiente onde estão localizados (37).

As análises de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco modelo J-815 *CD Spectrometer* (Toquio, Japão) com uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros foram coletados em uma faixa de comprimento de onda de 197-250 nm, e uma média foi obtida a partir de 16 varreduras, para cada espectro.

Realizou-se desnaturação térmica (8 a 90°C, com  $\Delta T=2^\circ\text{C}$ ) das proteínas BeCen1 e BeCen3 recombinantes (0.1 mg/ml), para a determinação da estabilidade e cálculo da  $T_m$  (temperatura média de transição). Neste experimento as proteínas, previamente purificadas, foram monitoradas em 222 nm. Os experimentos foram realizados na ausência e presença de  $\text{CaCl}_2$ , com concentração final de 2 mM. As curvas de desnaturação térmica foram ajustadas de acordo com uma curva sigmoideal de Boltzmann, utilizando para isso o programa Origin 7.0. A curva foi expressa em termos de porcentagem (%) da fração desnaturada ( $f_d$ ).

Estudos de estabilidade química foram realizados no mesmo equipamento em diferentes soluções de pH, variando de 4 a 10 para verificar sua estabilidade em relação a este parâmetro. Mudanças conformacionais também foram investigadas por CD, onde ambas as proteínas foram medidas na presença de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$  ou então nas suas formas apo. Os ions cálcio e magnésio encontravam-se a 2 mM na solução de proteína a 0.1 mg/ml. Os espectros foram analisados quanto à contribuição da estrutura secundária com o pacote de programas de desconvolução CDPRO (Selcon3, Contill, CDSSTR) utilizando-se o maior banco de dados distribuído com o pacote, composto de 56 proteínas (38-41). O método de desconvolução utilizado extrai as componentes comuns dos espectros experimentais de CD e assim, permite a obtenção de curvas e porcentagens que representam no espectro. Para a desconvolução, os espectros de CD foram transformados em elipticidade molar ( $[\theta]$ ) através da seguinte relação:

$$\theta = \frac{\theta_{\text{obs}} \cdot M_R \cdot 100}{l \cdot c} \times 10^{-3}$$

onde:  $\theta_{\text{obs}}$  é a elipticidade observada (graus),

$M_R$  é a massa molecular média por resíduo ( $115 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),

$l$  é o caminho ótico (cm) e

$c$  é a concentração ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

A contribuição das soluções tampões nos espectros foi subtraída em todas as análises.

## 2.9 Dinamic Light Scattering (DLS)

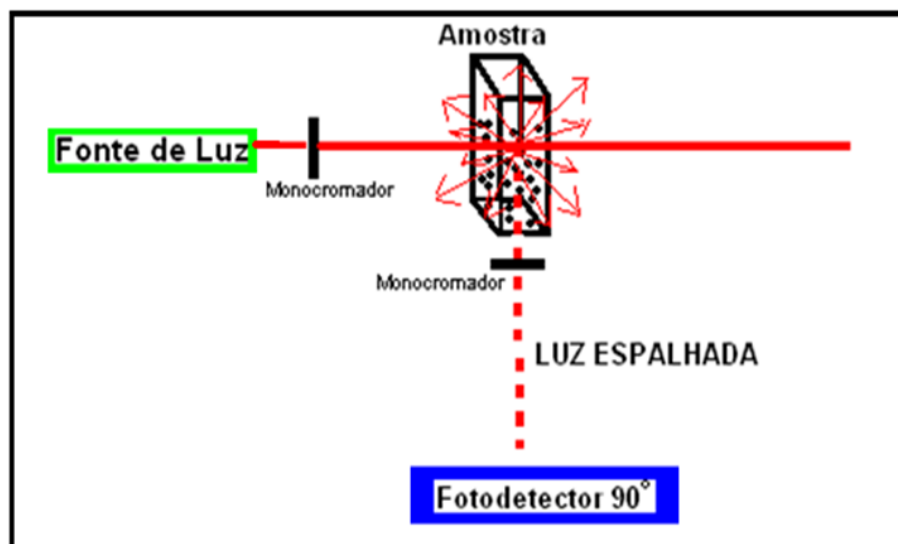
Partículas suspensas em um líquido estão sujeitas ao movimento browniano, as partículas menores movem-se mais rapidamente e as maiores mais lentamente. Com base neste conceito, o equipamento de DLS permite o cálculo do raio de giro das partículas em solução, podendo ser correlacionado com o tamanho das partículas em solução. A variação de tempo da intensidade espalhada é analisada examinando sua auto-correlação e a partir disto um coeficiente de difusão pode ser deduzido. Deste coeficiente de difusão medido, o tamanho das partículas é calculado. Um feixe de laser (633 nm) é direcionado na amostra e as partículas na solução espalham a luz em todas as direções, sendo que os fótons espalhados são coletados por um fotomultiplicador a um ângulo fixo de 90°. Um correlacionador digital é usado para calcular a função de auto-correlação. Esta função vai ser um decaimento exponencial e cada população monodispersa de partículas irá produzir uma função única de auto-correlação (42).

As medidas de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas com a intenção de verificar o estado de oligomerização das proteínas BeCen1 e BeCen3 nas formas apo (1 mM EGTA) e holo (2 mM CaCl<sub>2</sub>), para isto as proteínas foram medidas em uma concentração fixa de 25 µM a uma temperatura de 16°C. Os experimentos foram realizados no laboratório de cristalografia do Instituto de Física de São Paulo (IFUSP) com auxílio dos Professores Dr. Leandro R. S. Barbosa e Dra. Rosangela Itri.

## 2.10 Right Angle Light Scattering - RALS

Para investigar a polimerização das proteínas BeCen1 e BeCen3 utilizou-se a técnica de espalhamento de luz em ângulo reto (Figura 8). Esta técnica baseia-se no espalhamento de luz do tipo *Rayleigh*, que faz com que a luz se espalhe ao passar através de partículas com diâmetros próximos a um décimo do comprimento de onda da luz incidida na amostra (43). Para que a luz seja dispersa, o tamanho das partículas deve ser similar ou menor que o

comprimento de onda, por isso determinou o uso de 340 nm para analisar a polimerização das proteínas estudadas.



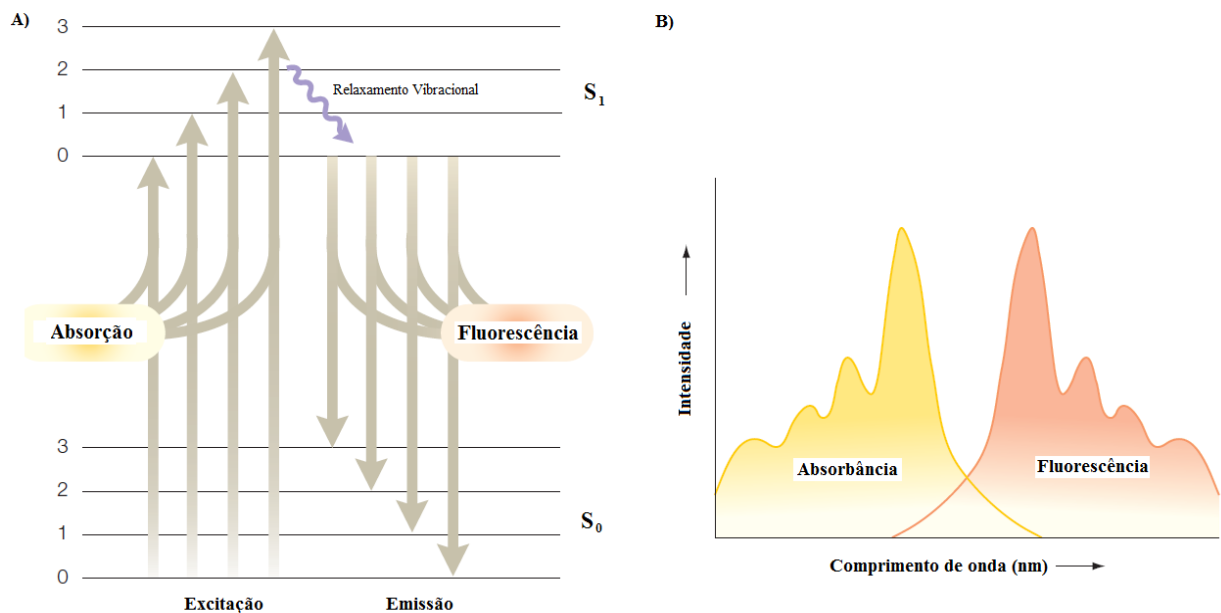
**Figura 8** - Representação esquemática do espalhamento de luz a ângulo reto.

Os experimentos com as amostras de BeCen1 (25  $\mu$ M) e BeCen3 (25  $\mu$ M) com e sem cálcio (2 mM) em tampão 20 mM Tris-HCl, contendo 10 mM NaCl pH 7.0 foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 0.5 cm em espectrofluorímetro K2 ISS (Neslab RTE-210), equipado com sistema de refrigeração. Todas as amostras foram centrifugadas (16.000g durante 10 min a 4°C) antes de cada medida feita. As amostras foram então iluminadas em 340 nm, e a luz espalhada foi coletada no mesmo comprimento de onda a um ângulo de 90°. Os experimentos foram feitos em 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C. Todas as medidas de intensidade foram dadas em unidades arbitrárias após a subtração da luz espalhada pelo tampão utilizado. Os dados foram analisados com o software Origin 7.



## 2.11 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

Basicamente, o fenômeno da fluorescência consiste na absorção de energia por um elétron, passando do estado fundamental ( $S_0$ ) para o estado excitado ( $S_1$ ); este elétron ao retornar ao estado fundamental é acompanhado pela liberação de energia em excesso através da emissão de radiação (Figura 9A). No processo de absorção de energia parte desta é transferida para o sistema através de várias conversões internas, e após um curto intervalo de tempo a outra parte da luz é emitida com uma energia relativamente menor e conseqüentemente, em comprimentos de onda maiores (Figura 9B) (44, 45).



**Figura 9 - Excitação e emissão de fluorescência.** (a) Representação gráfica dos níveis de energia sendo  $S_0$  o estado fundamental e  $S_1$  o estado excitado. (B) Diagrama que representa os níveis de energia, em amarelo os espectros de absorção e em vermelho os espectros de emissão. Modificado de (46).

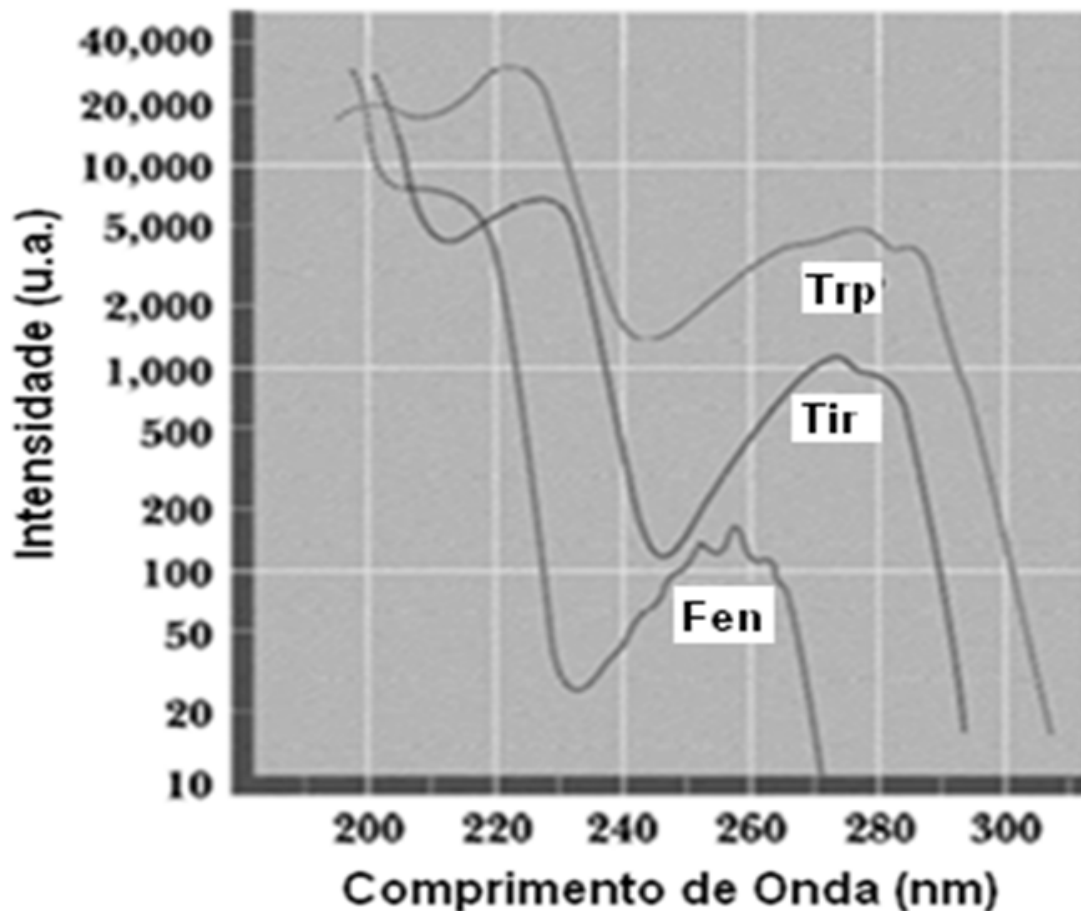
Nas proteínas, somente três aminoácidos absorvem luz de forma significativa na região do UV próximo, que fica entre 340nm a 255nm, são as cadeias laterais do Triptofano (W), Tirosina (Y) e Fenilalanina (F) (Figura 10).

O triptofano é o aminoácido que possui maior influência no rendimento quântico da fluorescência quando comparado aos outros aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas.

A intensidade, o rendimento quântico, e comprimento de onda do máximo de emissão de do triptofano é muito dependente do solvente. Mudanças no espectro de fluorescência do triptofano para comprimentos de onda menores e o aumento na intensidade, ocorrem de acordo com a diminuição da polaridade do solvente em torno dos resíduos triptofano. Resíduos de triptofano, que estão enterrados nos núcleos hidrofóbicos de proteínas, podem ter espectros deslocados de 10-20 nm em relação aos triptofanos localizados na superfície da proteína. A fluorescência de triptofano pode sofrer uma supressão por estar ao redor de vizinhos com grupos ácidos protonados, como ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E) (45).

A tirosina possui bandas de absorção em 280 nm, como o triptofano, porém é um emissor mais fraco do que o triptofano. Sua fluorescência pode ser suprimida por resíduos de triptofano na vizinhança devido a efeitos de transferência de energia.

A fenilalanina é fracamente fluorescente possuindo apenas um anel benzeno e um grupo metileno. A fluorescência deste resíduo é apenas observada na ausência de ambos: tirosina e triptofano.

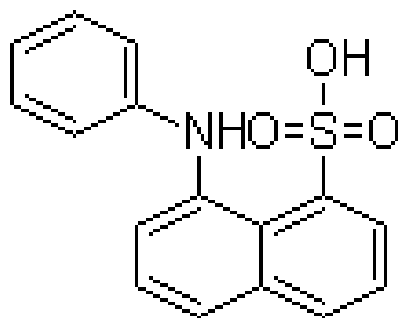


**Figura 10** - Emissão dos resíduos de aminoácidos aromáticos nas proteínas em seus respectivos comprimentos de onda. Emissão do resíduo de triptofano (W), emissão do resíduo de tirosina (Y) e emissão do resíduo de fenilalanina (F). Modificado de: <http://bifi.es/jsancho/estructuramacromoleculas/2aminoacidos/2aminoacidos.html>

As proteínas podem ser covalentemente marcadas com fluoróforos externos, produzindo conjugados fluorescentes na proteína. A emissão destas sondas conjugadas é conhecida como fluorescência extrínseca.

Experimentos com a sonda *1-anilino-8-naphthalenesulfonic acid* (ANS) foram feitos a fim de mostrar possíveis alterações estruturais nas regiões hidrofóbicas das proteínas em diferentes condições. A sonda ANS (Figura 11) é conhecida por auxiliar em experimentos envolvendo sítios hidrofóbicos de proteínas. Sua excitação no comprimento de onda de 360 nm resulta em uma emissão com o máximo em torno de 545 nm. Um notável aumento na emissão da sonda e um deslocamento para esquerda (blue shift) na presença da proteína, geralmente é atribuído a hidrofobicidade de um sítio protéico resultando grau de liberdade menor para o ANS. A interação do ANS com as proteínas ocorre principalmente pelo

pareamento iônico entre os grupos sulfonatos da sonda com os aminoácidos carregados positivamente, exemplo: histidina (H), lisina (K) ou arginina (R) (47). A emissão desta sonda vai depender muito da interação com a proteína em questão, pois o ANS sozinho em solução aquosa possui um máximo de emissão muito baixo.



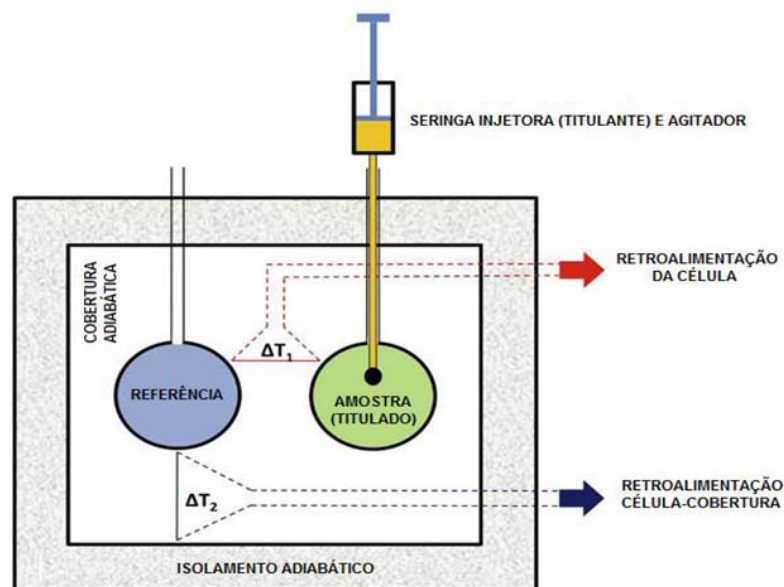
**Figura 11 - Estrutura química da molécula de ANS.** Disponível em: <http://www.chemblink.com/products/82-76-8.htm>

As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro K2 ISS (Neslab RTE-210) equipado com sistema de refrigeração. Os monocromadores de excitação e emissão foram ajustados com fendas de 2 mm e 1 mm de largura, respectivamente. Uma concentração fixa de ANS (250  $\mu\text{M}$ ) foi misturada na solução de proteínas (10  $\mu\text{M}$ ) em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7.0 contendo 10 mM NaCl. Ambas as proteínas foram medidas na presença de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$  ou então nas suas formas apo. Os ions cálcio e magnésio encontravam-se a 2 mM na solução de proteína. O comprimento de onda de excitação foi 360 nm e o de emissão foi monitorado na faixa entre 400 nm a 650 nm.

## 2.12 Calorimetria de Titulação Isotérmica - ITC

A calorimetria de titulação isotérmica mede o calor absorvido ou liberado quando duas moléculas interagem no interior da célula calorimétrica do equipamento, ou seja, detecta qualquer alteração de calor que ocorra ao longo do tempo. O equipamento possui duas células

calorimétricas, uma de referência e a segunda onde se encontra a amostra, a diferença de temperatura entre estas células é que determina o calor da reação (Figura 12). Normalmente a técnica é realizada com a titulação do ligante, através de varias injeções de volumes pequenos na proteína (ou outra molécula) localizada no interior da célula com a amostra, estas injeções são graduais e constantes e sempre em temperatura fixa. A cada injeção é medida a variação de calor, resultando em gráficos obtidos da velocidade de fluxo de calor em função do tempo ( $\mu\text{cal/sec}$ ). O gráfico é dado em picos correspondendo a liberação ou absorção de calor, que o equipamento precisa promover para reestabelecer o equilíbrio da temperatura na célula. Neste processo a temperatura de cada célula é monitorada e mantida constante através de um ciclo eletrônico de retroalimentação que controla aquecedores adjacentes a cada célula. Um sistema de retroalimentação reduz desvios em relação a uma referência. Durante o experimento, a diferença de temperatura entre a célula que contém o titulado e a cela de referência aumenta se o resultado da adição do titulante ao titulado for um processo exotérmico. O sistema responde reduzindo a energia dos aquecedores ao redor da célula da amostra para reduzir a zero o valor de  $\Delta T_1$  produzindo um pico negativo neste caso (48). Se a reação for endotérmica, ocorre a produção de um pico positivo indicando um aumento da energia dos aquecedores. Ao atingir o equilíbrio ocorre o registro de um valor constante de energia.



**Figura 12 - Esquema de um equipamento de calorimetria.** Em azul da célula de referência e em verde a célula da amostra com a seringa acoplada. Modificado de (48).

A energia medida é global, inclui a energia da interação entre as espécies químicas colocadas em contato, como também a energia devido ao fenômeno da solvatação, reorganização molecular e mudanças conformacionais, a energia de diluição das espécies envolvidas no experimento, além da energia devido à agitação mecânica (48).

A variação da entalpia ( $\Delta H$ ) da reação, que mede o calor da reação, vai ser um valor positivo para as reações endotérmicas e negativo para as exotérmicas. Já a entropia do sistema ( $\Delta S$ ), mede o grau de “desordem”, se  $\Delta S < 0$  a reação ocorrida foi uma reação espontânea na qual o calor é liberado, e se  $\Delta S > 0$  a reação não foi espontânea e o calor é absorvido (49). Esta técnica permite a determinação direta de todos estes parâmetros termodinâmicos, envolvidos em interações entre ligantes específicos e macromoléculas ou agregados moleculares, incluindo ligações covalentes e/ou não-covalentes a uma determinada temperatura, através da medição direta do calor absorvido ou liberado durante a ligação. Também podem ser analisados de forma a obter valores das constantes de associação ( $K_A$ ) e calcular os valores de variação na energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) resultando em informações importantes sobre o tipo de interação predominante. O  $\Delta G$  é calculado da seguinte forma:

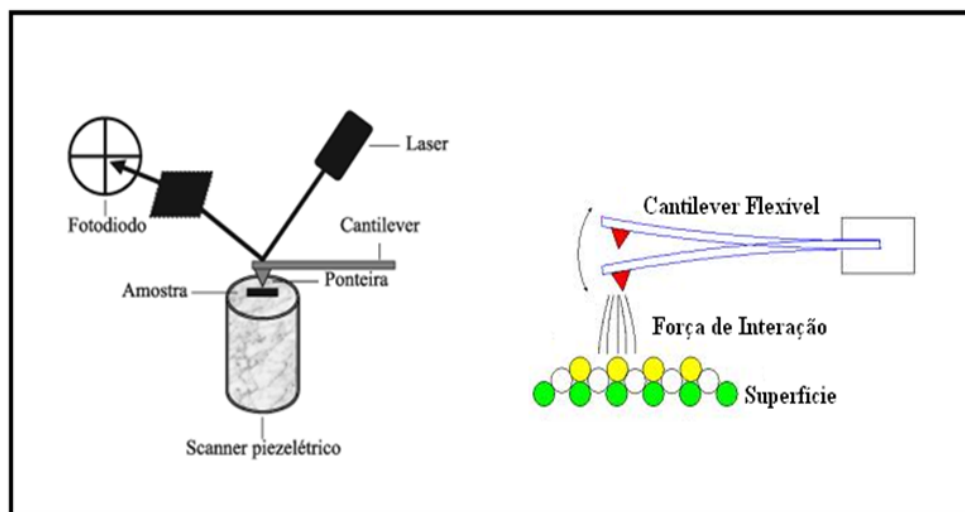
( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ) e  $K_A$  através da relação: ( $K_A = e^{-\Delta G/RT}$ ) onde R é a constante de gases e T é a temperatura absoluta na reação (49).

Esta técnica foi utilizada para estudar e comparar a interação do cálcio com as duas centrinas de *B.emersonii* e também verificar o número de sítios que ligam cálcio presentes em cada uma delas. As medidas foram realizadas no microcalorímetro *VP-ITC Microcal*, com células de 1.4 mL de amostra e referência. A titulação de cálcio nas células contendo as proteínas BeCen1 (30  $\mu$ M) e BeCen3 (30  $\mu$ M) foram realizadas em tampão Tris 20 mM contendo NaCl 10 mM em pH 7 (50 injeções de 2,5  $\mu$ l) em temperatura fixa de 25<sup>0</sup>C.

Com a colaboração do Dr. Helton Wiggers do departamento de química da universidade Federal de São Carlos e supervisão do professor Dr. Carlos Alberto Montanari do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), os dados foram analisados utilizando o programa ORIGIN para ITC (MicroCal).

### 2.13 Microscopia de Força Atômica – AFM

A Microscopia de Força Atômica (AFM) possibilita a reconstrução tridimensional de superfícies com rugosidades extremamente pequenas, da ordem de décimos de nanômetros até a faixa de micrometros (50). Esta técnica não exige o uso de agentes contrastantes na preparação das amostras, ou vácuo na medida. A amostra pode ser apenas depositada sobre uma superfície lisa, neste caso mica ou silício, seca e medida em condições ambiente. O AFM pode ser operado de diversos modos, entretanto, seu princípio fundamental baseia-se especialmente nas forças de atração de Van der Waals entre a sonda (cantilever ou ponteira) e a amostra. Esta interação sonda-amostra causa deflexão (modo contato) e/ou alteração na frequência de ressonância (modo dinâmico) da sonda. As imagens são geradas com varreduras que podem manter a interação sonda-amostra constante ou ainda manter a distância sonda-amostra constante (Figura 13) (51).



**Figura 13 - Princípio de funcionamento AFM.** No detalhe colorido a representação das interações entre a ponta do cantilever e a superfície da amostra analisada. Modificada de (52).

As proteínas BeCen1 e BeCen3 foram incubadas com EGTA ou com cálcio a 50°C durante 30 minutos antes de serem depositadas sob mica, pela técnica de *Deep Coating*. Duas

amostras de cada proteína foram preparadas: a primeira contendo 10  $\mu\text{M}$  de BeCen1 ou BeCen3 com 1 mM de EGTA e a outra 10  $\mu\text{M}$  de BeCen1 ou BeCen3 com 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ , ambas em tampão Tris 20 mM, NaCl 10 mM, pH 7. As medidas foram realizadas a uma velocidade de 1HZ, no modo dinâmico, a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) após 48 horas de secagem em ambiente com umidade de 40% a  $36^\circ\text{C}$ . As imagens foram adquiridas com um Microscópio de Força Atômica da marca shimatzu, modelo 9500J, no laboratório de Física da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR com auxílio do professor Dr. Paulo Cesar de Camargo. Contamos também com a colaboração do pesquisador Paulo Renato Orlandi Lasso na EMBRAPA - São Carlos.

#### **2.14 Microscopia eletrônica de transmissão – MET**

O microscópio eletrônico é um dos principais instrumentos utilizados na caracterização de materiais, devido ao seu grande poder de resolução. As informações obtidas por esta técnica são provenientes da interação sofrida pelo feixe de elétrons ao atravessar a matéria, e a imagem que obtemos com MET é uma reprodução ampliada da distribuição de elétrons que deixam a amostra (53).

BeCen1 e BeCen3 (ambas 10  $\mu\text{M}$ ) purificadas foram incubadas com EGTA (1 mM) ou com  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) a  $50^\circ\text{C}$  durante 60 minutos. As amostras foram aplicadas sobre um filme de carbono em grades próprias para a visualização no MET. As grades, com as amostras depositadas, foram então fixadas com acetato de uranila 1% filtrado e, conseqüentemente, lavadas para retirar o excesso do reagente. As imagens foram adquiridas com um Microscópio Eletrônico de Transmissão de 120 Kv JEOL JEM 1230, no centro de Investigações Biológicas Madri-Espanha, em colaboração com o doutorando Julio Cesar Pissuti Damalio, do Instituto de Física de São Carlos (IFSC).



## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

---

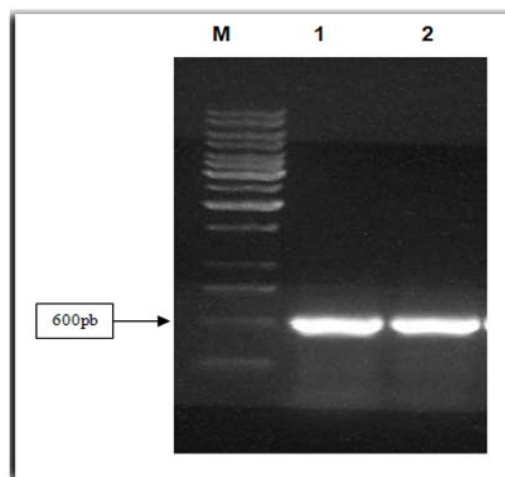


### **3. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **3.1 Amplificação e clonagem do cDNA de BeCen 1 e BeCen3**

A reação de amplificação do cDNA foi realizada de acordo com as condições descritas em materiais e métodos. A enzima *Taq* Platinum High Fidelity (Promega) foi usada para reduzir o risco de pareamento incorreto de nucleotídeos, já que possui atividade exonucleásica 3' 5'. O DMSO 5% foi adicionado à reação de PCR do gene da proteína BeCen3, para auxiliar na desnaturação, uma vez que a seqüência possui um alto conteúdo de bases guanina (G) e citosina (C)

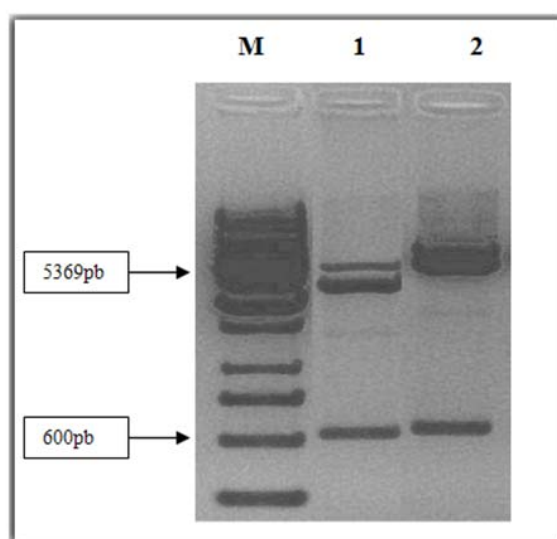
Como pode ser verificado na figura 14, os produtos resultantes da amplificação possuíam bandas compatíveis a aproximadamente 600 pb.



**Figura 14 - Amplificação do cDNA da BeCen1 e BeCen3.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE[1X]. (M) 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); (1) BeCen1; (2) BeCen3.

### 3.1.1 Subclonagem no vetor de expressão

Inicialmente os produtos amplificados foram clonados com sucesso no vetor de propagação *pGEMT-Easy* e, em seguida, os fragmentos foram subclonados no vetor de expressão pET28a. Uma análise de restrição com as enzimas *NdeI* e *BamHI* foi feita para a confirmação da clonagem (Figura 15).



**Figura 15 - Análise de restrição dos vetores de expressão (pET28a).** Eletroforese em gel de agarose 0,8% TAE [1X]. (M) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). (1) BeCen1 e (2) BeCen3.

### 3.2. Análise de seqüências

A partir da dedução da seqüência primária das proteínas de interesse (Figura 16) foi possível localizar os potenciais sítios de ligação de cálcio, e também os aminoácidos que são conservados em ambas as seqüências. A figura 16 nos permite visualizar os domínios “EF-Hand”, que são conservados em diversas centrinas, e o alinhamento entre elas. Nota-se que a proteína BeCen1 possui um potencial sítio funcional de ligação de cálcio a mais que BeCen3.



**Figura 16 - Alinhamento de várias sequências de centrinas.** HsCen1, HsCen2 e HsCen3 centrinas humanas, BeCen1 and BeCen3 de *Blastocladia emersonii*, CrCenp de *Chlamydomonas reinhardtii* e CDC31 de *Sacharomyce cerevisiae*. As regiões sublinhadas indicam as regiões ligantes de cálcio que são funcionais e em negrito estão as regiões da volta “EF-Hand” de cada proteína. PROSITE database (54).

O terceiro motivo “EF-Hand” presente na proteína BeCen1 possui um resíduo de asparagina (N) na posição 12 e por esta razão pode não ser funcional, uma vez que o resíduo desta posição possui um papel estrutural importante, fornecendo uma ligação extra de hidrogênio que estabiliza a estrutura.

No segundo motivo ligante de cálcio da proteína BeCen3, existe um resíduo de glutamina (Q) na sexta posição ao invés de um resíduo de glicina (G), o resíduo G é essencial para promover uma volta de 90° no domínio. No terceiro motivo ligante de cálcio da proteína BeCen3, o resíduo da quinta posição é uma lisina (K), ao invés de um resíduo polar ou carregado negativamente e provavelmente isso afeta a funcionalidade deste (6).

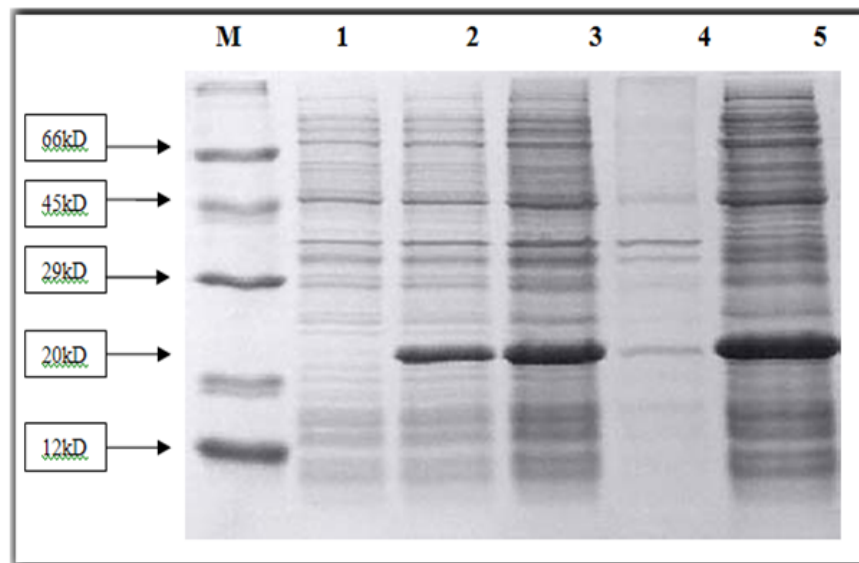
Nota-se que a proteína BeCen1 possui uma alta identidade com as centrinas humanas HsCen1 (70%), HsCen2 (70%) e também com a centrina de alga verde CrCenp (72%), as

quais são responsáveis por funções contráteis. BeCen3 possui uma maior identidade com a centrina humana HsCen3 (52%) e com a centrina de levedura Cdc31p (53%), responsáveis pela duplicação dos centros organizadores de microtúbulos. BeCen1 e BeCen3 compartilham somente 44% de identidade entre elas. Estes dados reforçam a idéia de que as duas centrinas presentes em *Blastocladiella emersonii* desempenham diferentes funções no fungo e podem ser divididas em duas subfamílias diferentes, BeCen3 pertencente à subfamília Cdc31p de *Saccharomyces cerevisiae*, e BeCen1 pertencente a subfamília CrCenp de *Chlamydomonas reinhardtii* nunca descrita antes em fungos.

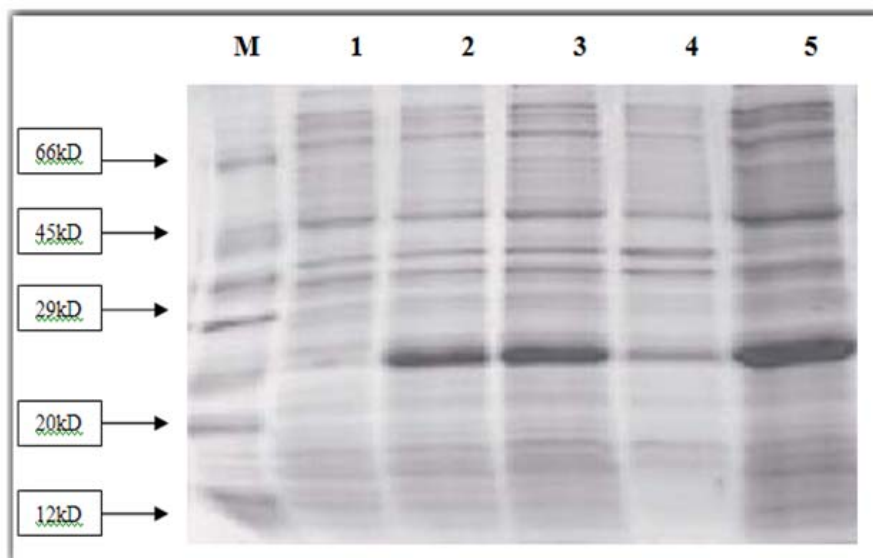
### **3.3 Expressão recombinante, análise da solubilidade e purificação**

Por gel SDS-PAGE 15% foi possível verificar a expressão a partir das construções plasmidiais, assim como a solubilidade das proteínas resultantes (Figuras 17 e 18).

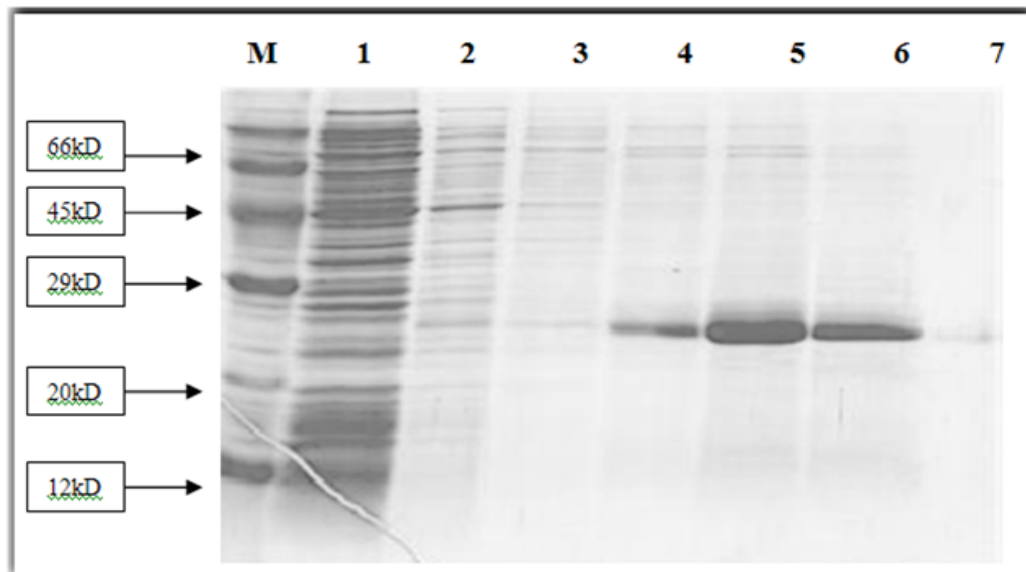
É possível observar a expressão das proteínas recombinantes BeCen1 (figura 17) e, BeCen3 (figura 18) presentes na fração solúvel, apesar das proteínas recombinantes também aparecerem na fração insolúvel em menor quantidade. Nas figuras 19 e 20 observa-se o resultado da purificação por afinidade (Ni-NTA).



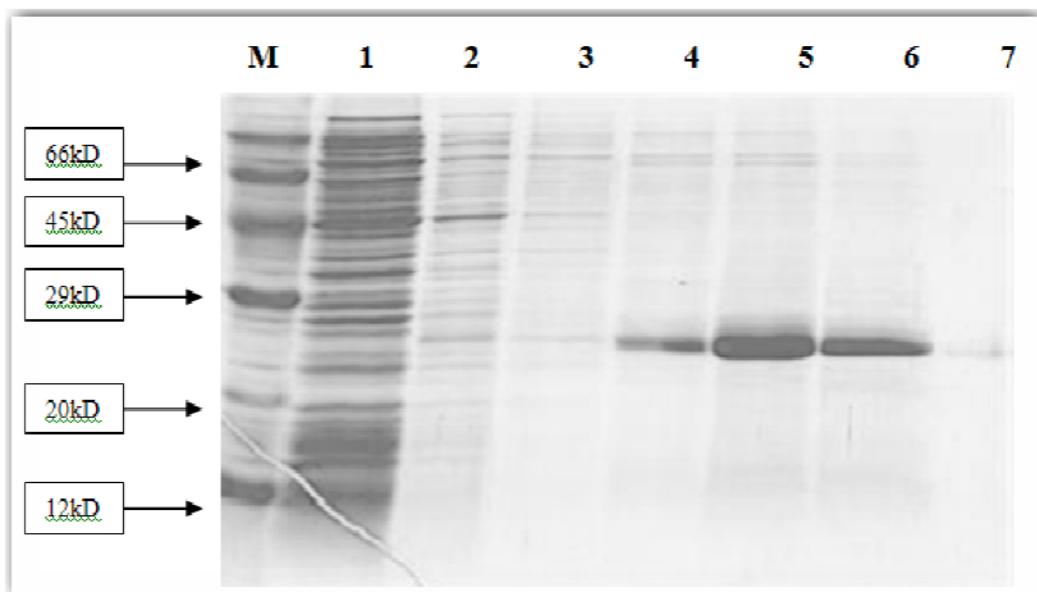
**Figura 17 - Expressão recombinante de BeCen1 em *E.coli* BL21(DE3)pET28a e ensaio de solubilidade.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). (M) Marcador de massa molecular (66 kDa albumina sérica bovina; 45 kDa ovalbumina; 29 kDa anidrase carbônica bovina; 20 kDa inibidor de tripsina de soja; 12 kDa citocromo C); (1) cultura de células BL21(DE3) + pET28a(+) antes da indução; (2) após 2 horas de indução com 0,4 mM de IPTG; (3) após 4 horas de indução; (4) precipitado; (5) sobrenadante.



**Figura 18 - Expressão recombinante de BeCen3 em *E.coli* BL21(DE3)pET28a e ensaio de solubilidade.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). (M) Marcador de massa molecular (66 kDa albumina sérica bovina; 45 kDa ovalbumina; 29 kDa anidrase carbônica bovina; 20 kDa inibidor de tripsina de soja; 12 kDa citocromo C); (1) cultura de células BL21(DE3) + pET28a(+) antes da indução; (2) após 2 horas de indução com 0,4 mM de IPTG; (3) após 4 horas de indução; (4) precipitado; (5) sobrenadante.



**Figura 19 - Ensaio de purificação BeCen1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). (M) Marcador de massa molecular (66 kDa albumina sérica bovina; 45 kDa ovalbumina; 29 kDa anidrase carbônica bovina; 20 kDa inibidor de tripsina de soja; 12 kDa citocromo C). Proteínas totais de *E. coli*BL21(DE3) + pET28BeCen1: (1) Eluição do material não retido na resina, (2) Eluição com 5mM de Imidazol, (3) Eluição com 10mM de Imidazol, (4) Eluição com 40mM de Imidazol, (5) Eluição com 100mM Imidazol, (6) Eluição com 250mM de Imidazol e (7) Resto de material na coluna com 250mM de Imidazol.



**Figura 20 - Ensaio de purificação BeCen3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). (M) Marcador de massa molecular (66 kDa albumina sérica bovina; 45 kDa ovalbumina; 29 kDa anidrase carbônica bovina; 20 kDa inibidor de tripsina de soja; 12 kDa citocromo C). Proteínas totais de *E. coli*BL21(DE3) + pET28a BeCen3: (1) Eluição do material não retido na resina, (2) Eluição com 5mM de Imidazol, (3) Eluição com 10mM de Imidazol, (4) Eluição com 40mM de Imidazol, (5) Eluição com 100mM Imidazol, (6) Eluição com 250mM de Imidazol e (7) Resto de material na coluna com 250mM de Imidazol.

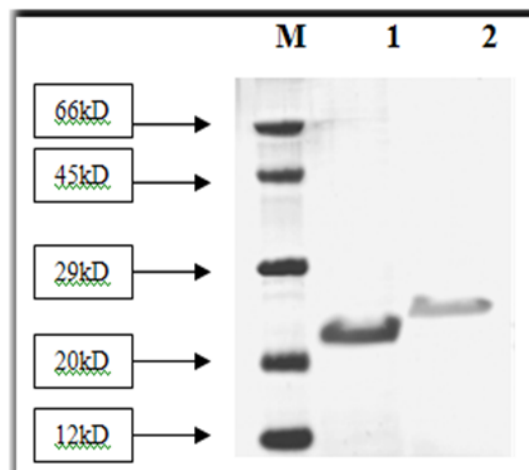


Os mesmos resultados foram obtidos com outros protocolos de expressão, utilizando temperaturas mais baixas e tempos de incubação mais longos. Por isso, todas as etapas de expressão das proteínas BeCen1 e BeCen3, foram padronizadas conforme o protocolo descrito.

### 3.4 Cromatografia de Exclusão Molecular: purificação e estados conformacionais

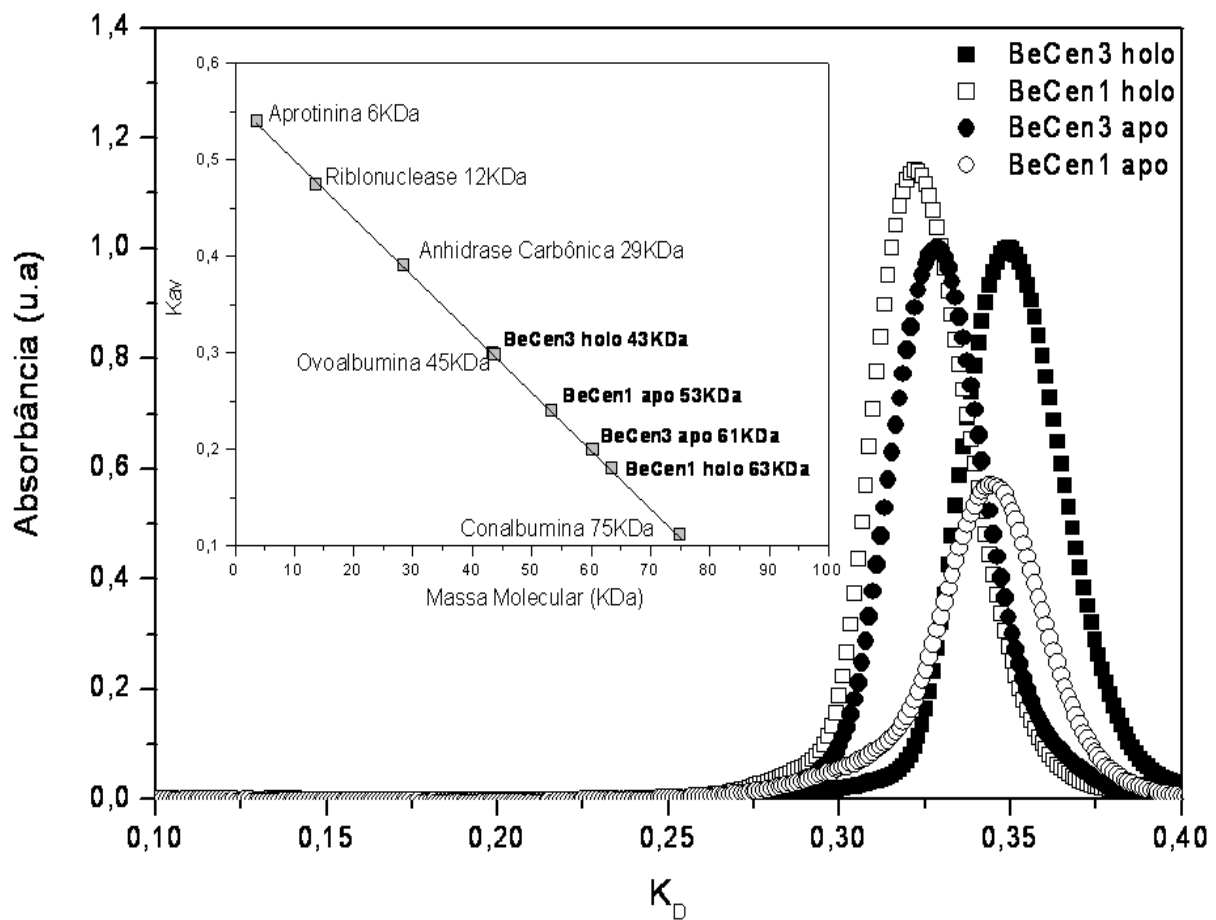
Em virtude das proteínas não estarem com o grau de pureza desejável para os estudos subseqüentes, após a purificação por afinidade outro procedimento foi necessário.

A cromatografia de exclusão de peso molecular foi utilizada para fazer a próxima etapa de purificação de ambas às proteínas. Na figura 21 podemos visualizar as duas proteínas com o grau de pureza desejada. O rendimento final das proteínas foi de aproximadamente 5mg/l de cultura.



**Figura 21 - Análise da Pureza de BeCen1 e BeCen3 por SDS-PAGE 15%:** (M) Marcador de massa molecular (66 kDa albumina sérica bovina; 45 kDa ovalbumina; 29 kDa anidrase carbônica bovina; 20 kDa inibidor de tripsina de soja; 12 kDa citocromo C). (1) BeCen1; (2) BeCen3.

A técnica de exclusão de peso molecular também foi utilizada para mostrar a diferença de conformação das formas apo (com EGTA) e holo (com cálcio) da BeCen1 e BeCen3. A proteína BeCen1 tem um comportamento onde a adição de cálcio resulta em uma forma molecular da proteína mais estendida, eluindo assim em frações anteriores à amostras contendo EGTA (Figura 22). Já no caso da proteína BeCen3 o inverso ocorre, tornando-se uma molécula mais compacta com a adição de cálcio (Figura 22).



**Figura 22 - Cromatografia de Exclusão de Peso Molecular de BeCen1 e BeCen3 na presença e ausência de cálcio.** A figura inserida no gráfico mostra a curva de calibração com os respectivos padrões: conalbumina (75 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbonica (29 kDa), ribonuclease (13 kDa) e aprotinina (6.5 kDa).

Este comportamento observado para BeCen3 está de acordo com as observações descritas por Wiech et al. o qual descreve este mesmo fenômeno para a proteína Cdc31p que

possui 52% e 53% de identidade com a BeCen3 e HsCen3, respectivamente (55). Neste mesmo trabalho é relatado que as proteínas HsCen1 e HsCen2 não sofrem modificações significativas na forma molecular com a adição de cálcio, o que não quer dizer que estas não sofram alterações conformacionais, apenas que tais alterações (se ocorrem) não foram visualizadas pela cromatografia.

As centrinas são moléculas alongadas, principalmente quando na forma apo e geralmente apresentam massa molecular aparente 1.7 vezes maior do que seu peso molecular quando calculado utilizando, como padrões, proteínas globulares (55). É o caso das centrinas de *Blastocladiella emersonii* que quando comparadas com proteínas globulares apresentam peso molecular maior do que seu peso molecular estimado por sua composição de resíduos de aminoácidos. Esses resultados sugerem uma natureza monomérica para essas proteínas.

### **3.5 Dinamic Light Scattering (DLS)**

Para verificar o estado oligomérico das proteínas BeCen1 e BeCen3 estas foram submetidas a medidas de DLS com um feixe de 633 nm. As formas apo e holo de ambas foram comparadas para verificarmos a existência de uma mudança de oligomerização em função do cálcio. Como podem ser observadas na tabela II, as proteínas possuem um diâmetro efetivo em torno de 7.2 nm, correspondendo a um monômero. Na gel filtração notam-se mudanças conformacionais em função da adição do cálcio em ambas as proteínas, no entanto por esta técnica não é possível distinguir se as mudanças foram em suas formas ou então foram mudanças nos estados oligoméricos destas. Com este experimento, altamente reprodutível de DLS (633nm), confirma-se que, nesta concentração, as proteínas BeCen1 e BeCen3, tanto apo quando holo, estão monoméricas em solução. Assim pode-se concluir que as mudanças em função do cálcio afetam sim suas formas (alongada ou compacta), mas não seus estados oligoméricos. Este dado é imprescindível para a análise e compreensão de vários experimentos. Medidas em função de concentração de proteína não puderam ser realizadas, pois o equipamento utilizado, requeria um volume muito grande de amostra

(aproximadamente 3 ml) e o máximo de proteína concentrada que foi possível medir foi de 25  $\mu\text{M}$ .

**Tabela II - Medidas de Diâmetro Efetivo:** proteínas BeCen1 e BeCen3 em suas formas apo (1 mM EGTA) ou holo (2 mM cálcio).

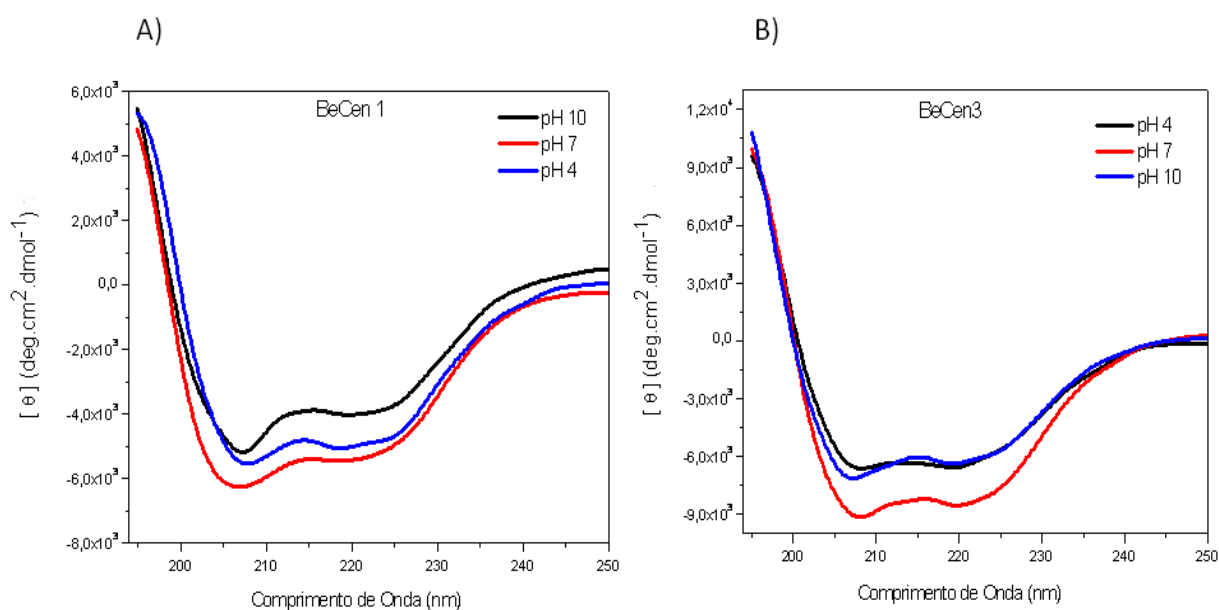
PROTEÍNA (25 $\mu\text{M}$ )	DIÂMETRO EFETIVO
apo-BeCen1	7.0 nm
apo- BeCen3	7.2 nm
holo-BeCen1	6.9 nm
holo-BeCen3	7.8 nm

### 3.6 Aspectos Estruturais da BeCen1 e BeCen3 investigados neste trabalho

#### 3.6.1 Estudos estruturais utilizando a técnica de Dicroísmo Circular - CD

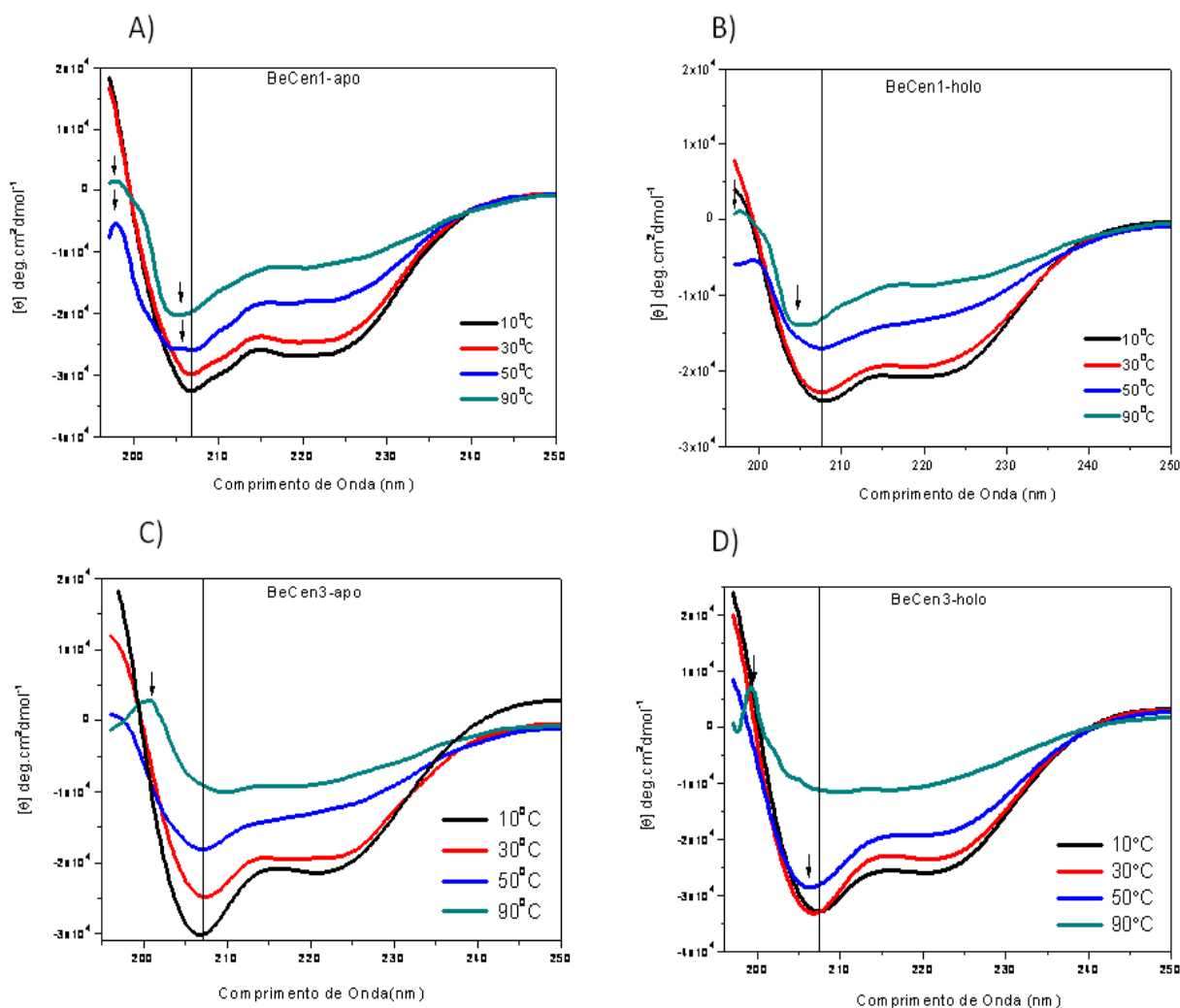
A técnica de CD, utilizando o UV distante, é muito sensível para detectar mudanças na conformação de proteínas e por isso utilizamos esta para verificar mudanças com relação à presença ou ausência de cálcio e outros íons, a variações de temperatura e variações no pH.

Para investigar a estabilidade das proteínas BeCen1 e BeCen3 em relação a diferentes pHs, estas foram diluídas em tampões que variaram de pH 4 a 10 e monitorados por CD. Na figura 23 ambas mostram estabilidade numa ampla faixa de pH, ocorrendo uma diminuição no conteúdo em hélice próximo aos pHs extremos 4.0 e 10.0. Com este experimento, concluiu-se que estas proteínas são estáveis em relação a diferentes soluções de pHs, podendo optar em trabalhar com o valor de pH que melhor se encaixa no experimento a ser feito.



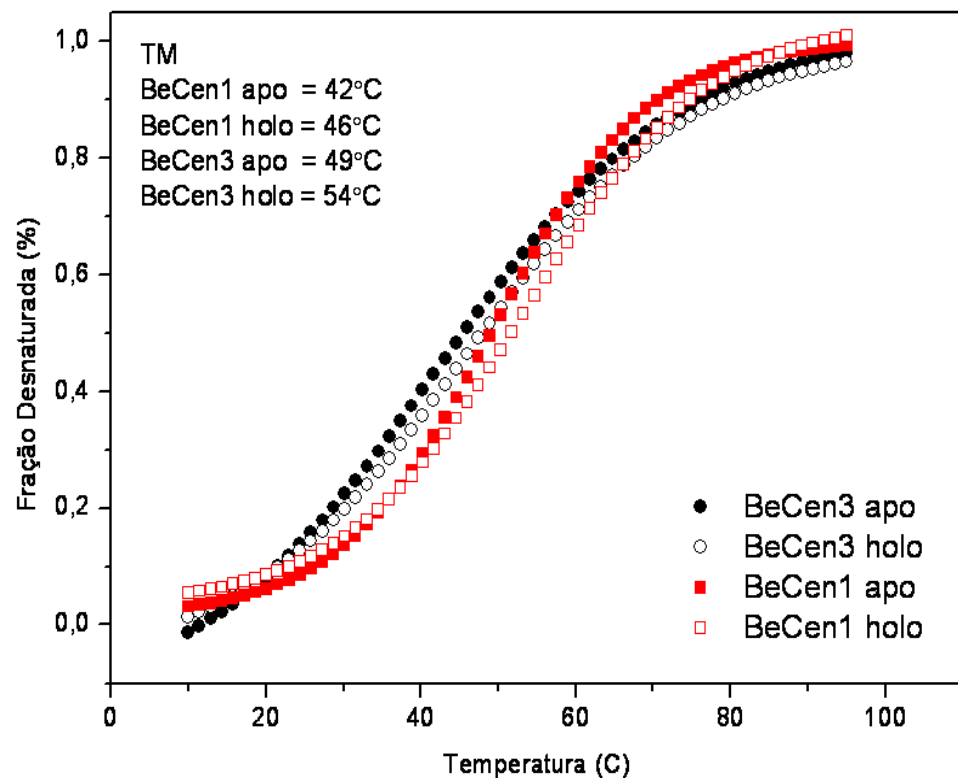
**Figura 23 - Espectros de CD das proteínas BeCen1 e BeCen3 em diferentes valores de pH. (A) BeCen1; (B) BeCen3.**

Experimentos realizados com as proteínas BeCen1 e BeCen3, mostram que ambas apresentam espectros característicos de proteínas com estrutura secundária predominante em  $\alpha$ -hélice, com mínimos redor de 208 nm e 222 nm (Figura 24). À medida que a temperatura aumenta ocorre diminuição dos mínimos, em relação à temperatura inicial, na ausência e presença de cálcio. O espectro da proteína BeCen1, sem o cálcio, apresenta um deslocamento do mínimo em 208 nm a partir de 50°C indicando perda de estrutura secundária (Figura 24A). Já na presença de cálcio, este deslocamento em 208 nm, ocorre em temperaturas mais altas (Figura 24B). Como já descrito para outras proteínas, os ligantes podem levar a estabilidade da proteína para temperaturas mais altas (56). Nas figuras 24C e 24D são mostrados os resultados do mesmo experimento para BeCen3, onde pode ser visto que a 50°C, na ausência de cálcio, já ocorre significativa diminuição da intensidade dos mínimos. A proteína BeCen3 na presença de cálcio apresenta a mudança mais evidente, onde ocorre uma grande perda nos mínimos, somente a partir de 70°C e a 90°C onde pode ser visto uma tendência a formação de um pico negativo na região de 197 nm indicando a desnaturação da proteína. Estes resultados indicam que o ligante também aumentou a estabilidade da proteína em relação à temperatura.



**Figura 24 - Desnaturação Térmica monitorada por UV-CD.** As temperaturas mostradas variam de 10 a 90°C. (A) BeCen1-apo, (B) BeCen1-holo. (C) BeCen3-apo e (D) BeCen3-holo. As setas indicam os principais deslocamentos nos espectros.

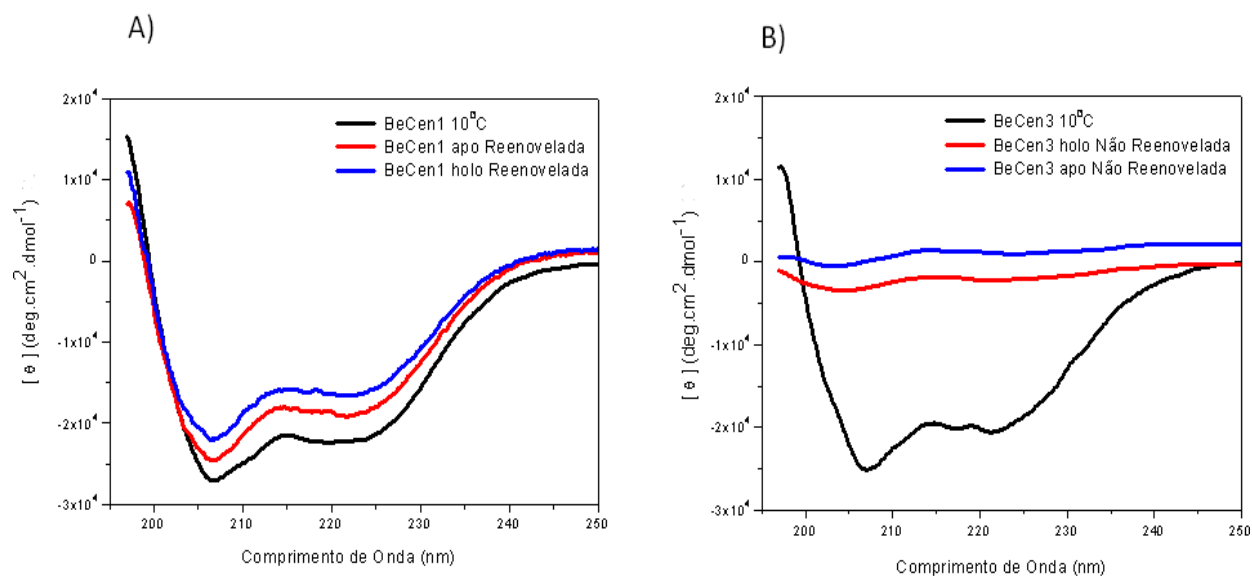
A figura 25 mostra curvas correspondentes aos experimentos de desnaturação térmica das formas apo e holo das centrinas BeCen1 e BeCen3. Na presença de cálcio a BeCen1 aumenta em 4°C e a BeCen3 em 5°C suas estabilidades ou temperaturas médias de transição (TM), como mostrado nos experimentos anteriores. A curva de desnaturação térmica para a proteína BeCen1, possui maior tendência a ser uma curva sigmóide, indicando uma maior estabilidade térmica quando comparada as curvas para a proteína BeCen3. No entanto, a partir de 70°C as duas curvas tendem a sofrer menor variação, com tendência a atingir um *plateau* acima desta temperatura.



**Figura 25 - Curvas de Transição de Temperatura Média (TM) monitorada a 222 nm.** Para as formas apo os valores de TM calculados foram de 42°C para BeCen1 e 49°C para BeCen3. Nas formas holo estas proteínas aumentaram seus valores de TM em aproximadamente 4°C e 5°C, respectivamente.

Após atingirem 90°C, ambas as proteínas foram colocadas a 4°C durante 24 horas, no sentido de verificar o comportamento destas proteínas quanto a possibilidade de um processo de renovelamento. Ao realizar medidas, com as amostras resfriadas, nota-se no espectro de CD da proteína BeCen1 que a proteína sofreu um processo de renovelamento (Figura 26A), tanto na presença como ausência de cálcio. Pode-se perceber que o mínimo em aproximadamente 208 nm que em 90°C estava deslocado à esquerda, volta para a posição inicial. Existem relatos na literatura mostrando que a proteína HsCen2 possui propriedades parecidas com a BeCen1, onde a temperatura média de transição aumenta em 4°C da forma apo para holo e em ambos os casos a curva de desnaturação é reversível (57). Entretanto, para a BeCen3 não foi observado o mesmo comportamento, os espectros da proteína resfriada

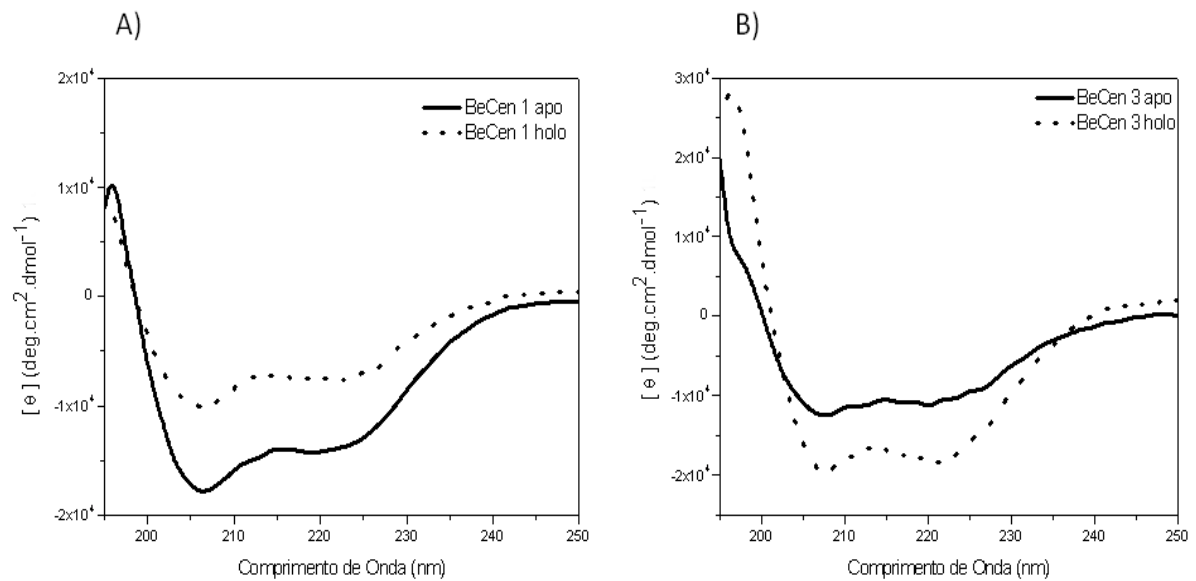
continuam demonstrando a desnaturação, tanto para a forma apo, quanto para forma holo (Figura 26B).



**Figura 26 - Espectros de CD antes e depois das centrinas atingirem 90°C e serem resfriadas. (A) BeCen1, mostrando o processo de reenovelamento e (B) BeCen3, mostrando que não foi possível reenovelar-se.**

Ainda para estudar mudanças conformacionais das proteínas na ausência e presença de cálcio, foram realizadas medidas utilizando as duas proteínas em suas duas formas, apo e holo, em temperatura ambiente para evidenciar as diferenças na presença de cálcio. O resultado mostra que as duas têm novamente um comportamento oposto, onde a proteína BeCen1 tem uma diminuição nos mínimos do espectro de CD com a adição de cálcio e a proteína BeCen3 tem um aumento nos mesmos (Figura 27).





**Figura 27 - Espectros de CD das proteínas nas formas apo e holo. (A) BeCen1; (B) BeCen3.**

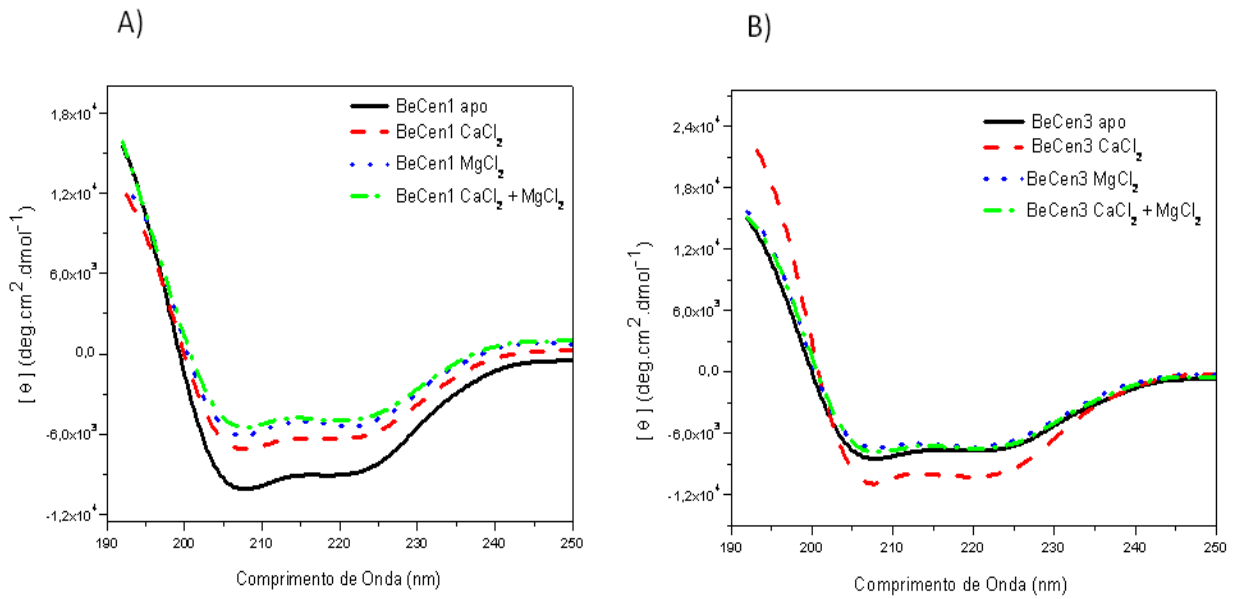
Realizando a deconvolução dos espectros obtidos neste experimento, observa-se que para a proteína BeCen1, apresenta um decaimento no conteúdo de elementos  $\alpha$ -hélice da forma apo para a holo, ao contrário da proteína BeCen3, que apresenta um aumento nos elementos  $\alpha$ -hélice da forma apo para holo (Tabela III). No trabalho de Wiech et al., 1996 a proteína HsCen2 (maior identidade com BeCen1) também sofre um decaimento no conteúdo de elementos  $\alpha$ -hélice quando muda da forma apo para holo e a proteína Cdc31p (maior identidade com BeCen3) sofre um aumento no conteúdo de elementos  $\alpha$ -hélice quando muda da forma apo para holo (55). Estes dados são muito parecidos com os resultados apresentados, sugerindo uma semelhança de comportamento entre a BeCen1 e HsCen2 e entre BeCen3 e Cdc31p. Vale resaltar que quando fala-se em diminuição ou aumento do conteúdo de estrutura secundária, no caso das  $\alpha$ -hélices, o que ocorre é o rearranjo destes elementos e não seu desaparecimento ou aparecimento, resultando no aumento ou diminuição do sinais característico de  $\alpha$ -hélices.

**Tabela III** - Conteúdo em frações de estrutura secundárias obtidas a partir da deconvolução dos espectros de CD da BeCen1 e BeCen3, utilizando o programa CONTILL (38).

	ELEMENTOS DE HÉLICE	ELEMENTOS DE BETA	VOLTAS	DESORDENADA	RMS*
<b>BeCen1</b>	59%	14%	9%	18%	1
<b>APO</b>					
<b>BeCen1</b>	45%	6%	15%	34%	1
<b>HOLLO</b>					
<b>BeCen3</b>	17%	31%	16%	36%	1
<b>APO</b>					
<b>BeCen3</b>	35%	16%	16%	33%	1
<b>HOLLO</b>					

\* *RMS* (root mean square) refere-se ao desvio médio quadrático.

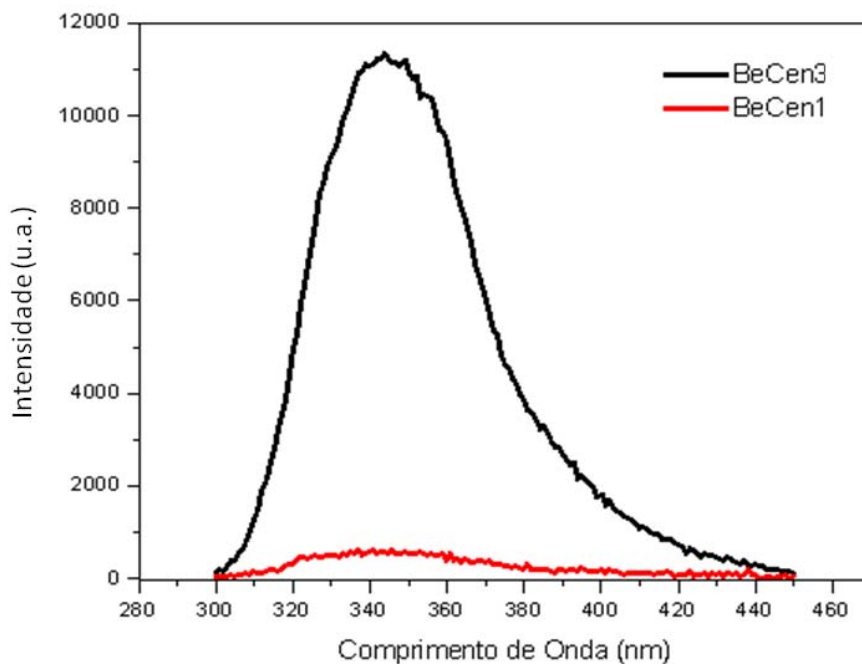
Experimentos para verificar mudanças conformacionais em relação à ligação do magnésio e do cálcio juntamente com o magnésio, também foram realizados utilizando a técnica de CD. Ambas as proteínas sofrem uma diminuição nos mínimos de elipticidade quando o magnésio está presente e também na presença de cálcio com magnésio. Podemos perceber que mesmo a proteína BeCen3, que sofre um aumento de sinal na presença de cálcio, não tem o mesmo comportamento quando o magnésio está presente (Figura 28B), mostrando que o comportamento é exclusivo da interação com o íon de cálcio. Estabelecendo uma conexão com os dados de cromatografia, pode-se dizer que a proteína BeCen3 torna-se mais compacta na presença de cálcio e por isso apresenta-se menos flexível e com um aumento no sinal de CD para hélices. É interessante ressaltar que a proteína BeCen3 parece não alterar sua estrutura secundária na presença de magnésio, somente com cálcio sozinho, diferentemente do comportamento proteína HsCen3 em relação ao magnésio que apresenta uma diminuição no sinal de  $\alpha$ -hélices (58). Já no caso da proteína BeCen1 ocorre o inverso, na presença de íons como cálcio e magnésio a molécula parece estar mais flexível e por isso, aparentemente, apresenta-se mais alongada na cromatografia e apresenta uma diminuição no sinal de CD para  $\alpha$ -hélices (Figura 28A).



**Figura 28 - Dicroísmo Circular das centrinas.** Medidas realizadas a  $10^\circ\text{C}$  na presença de EGTA (1 mM),  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) e/ou  $\text{MgCl}_2$  (2 mM). (A) BeCen1 e (B) BeCen3

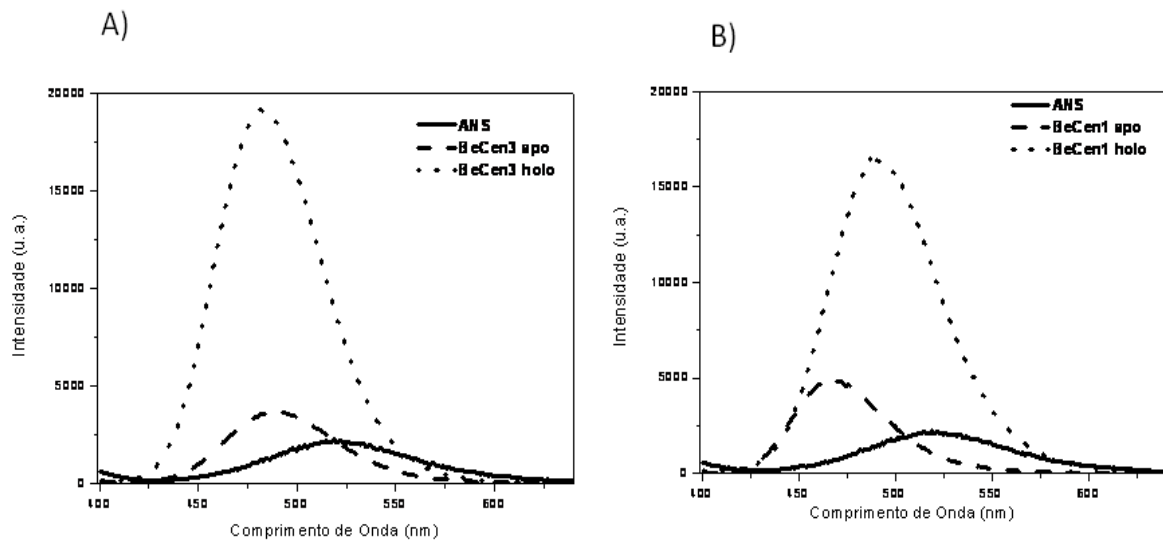
### 3.6.2 Estudos Estruturais Utilizando Emissão de Fluorescência

Estruturalmente BeCen1 e BeCen3 possuem características que as distinguem, como a presença de três potenciais sítios ligantes de cálcio em BeCen1, além da ausência do resíduo W e presença de apenas um resíduo de Y; em BeCen3 ocorrem dois sítios ligantes de cálcio, um resíduo de W e três de Y. Estas últimas características irão refletir nos espectros de emissão de fluorescência intrínseca de ambas, quando excitadas em 280 nm (Figura 29).



**Figura 29 - Espectros de emissão das proteínas BeCen1 e BeCen3.** As amostras foram excitadas em 280 nm e suas emissões monitoradas entre 300 e 450 nm.

A emissão de fluorescência é um método utilizado na investigação de mudanças conformacionais em locais específicos das proteínas, em função de alteração nos espectros de emissão. Como no caso da BeCen1 é difícil monitorar a fluorescência intrínseca devido a sua composição de aminoácidos, optou-se por realizar experimentos utilizando a sonda extrínseca ANS e assim investigar alterações na ausência de cálcio ou presença de cálcio e também magnésio. Ensaio utilizando a sonda ANS nas centrinas BeCen1 e BeCen3 ilustram as mudanças conformacionais típicas de proteínas ligantes de cálcio, sugerindo a exposição de uma região hidrofóbica quando o cálcio está ligado (Figura 30).



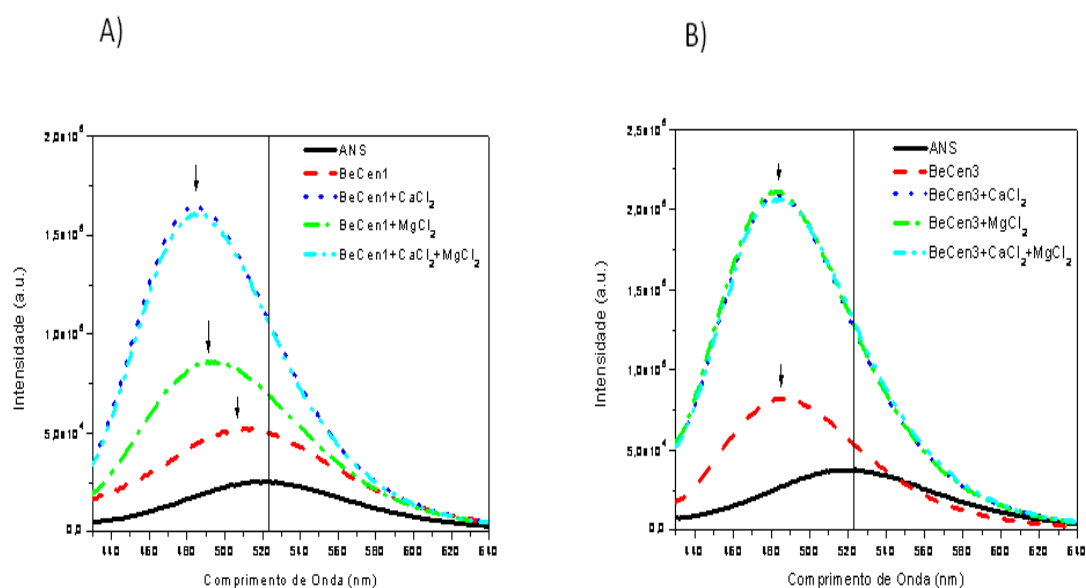
**Figura 30 - Emissão de Fluorescência da sonda ANS.** Mudanças conformacionais em ambas as proteínas: (A) BeCen1 e (B) BeCen3.

Uma vez já comprovado que o cálcio influencia ambas as proteínas a expor uma região hidrofóbica, indicado pelo aumento de intensidade de emissão e deslocamento para esquerda, foram realizados também experimentos para avaliar a influência dos íons de magnésio. Os resultados mostram que quando o magnésio está sozinho na solução de BeCen1, ocorre a diminuição de intensidade de emissão e leve deslocamento para direita, (comparado a resposta ao cálcio) indicando regiões hidrofóbicas menores sendo expostas nesta condição (Figura 31A). Nesta situação a proteína BeCen1 expõe menos regiões hidrofóbicas que a proteína holo ou com cálcio mais magnésio, porém ainda expoe mais regiões hidrofóbicas do que na sua forma apo. Seria um meio termo entre as formas apo e holo. Estudos com a centrina humana HsCen2 mostram que esta possui o mesmo comportamento que BeCen1 em relação ao cálcio e o magnésio, este fato não é contraditório uma vez que estas proteínas possuem 70% de identidade entre si.

Os experimentos com a proteína BeCen3, utilizando magnésio, mostram um aumento de intensidade de emissão acompanhado de um deslocamento para a esquerda, similar aos resultados com cálcio (Figura 31B). Os resultados sugerem que a proteína BeCen3 possui o mesmo comportamento com cálcio ou com magnésio, aumentando a exposição de regiões

hidrofóbicas igualmente na presença de ambos os íons estudados, e na sua forma apo apresenta menos regiões hidrofóbicas acessíveis.

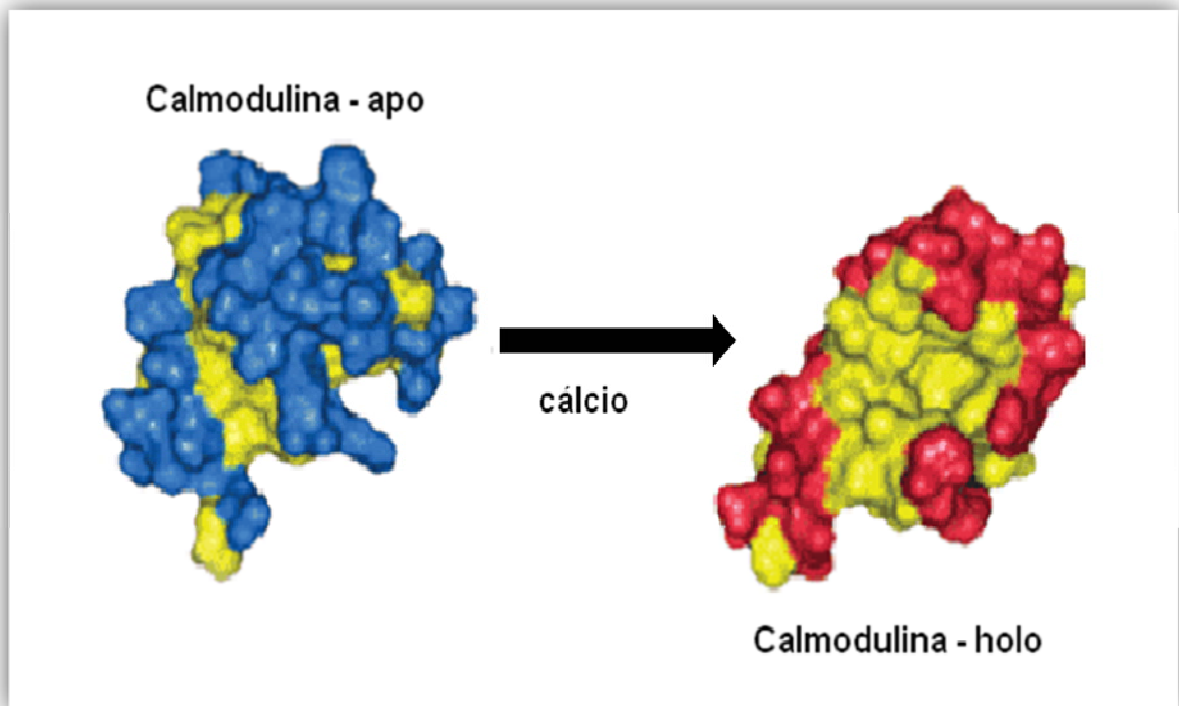
A diferença no comportamento entre estas duas proteínas pode ser explicada pela natureza do terceiro sítio de ligação ao cálcio presente na proteína BeCen1. As proteínas ligantes de cálcio, que possuem um resíduo de asparagina (N) na posição 12 do motivo ligante de cálcio, podem favorecer a ligação de magnésio (6). Estes resultados sugerem que o magnésio esteja interagindo com este terceiro sítio da proteína BeCen1 e promovendo a exposição de somente algumas regiões hidrofóbicas oriundas desta ligação. Novamente a centrina humana HsCen2 compartilha da mesma característica, possuindo esta mesma diferença no terceiro sítio “EF-Hand”, colaborando com a teoria (59). No caso da proteína BeCen3, todos os sítios ativos favorecem a ligação de íons de cálcio, mas quando este não está presente, o magnésio também pode se ligar promovendo as mesmas alterações na sua forma.



**Figura 31 - Espectros de emissão da sonda ANS.** Excitados em 280 nm e emissão monitorada entre 400 e 640nm. (A) BeCen1 nas formas apo, holo e holo + magnésio e (B) BeCen3 nas formas apo, holo e holo + magnésio. As setas indicam o deslocamentos dos máximos de emissão.

Para ilustrar estas mudanças nas regiões hidrofóbicas das proteínas BeCen1 e BeCen3 podemos fazer uma comparação com a figura 32. Esta figura mostra, justamente, o domínio “EF-Hand” da porção N-terminal da proteína Calmodulina e as mudanças provocadas pela adição de cálcio (60). É possível verificar a exposição de uma grande porção hidrofóbica

quando o cálcio está presente, representando mudanças parecidas com as verificadas para as centrinas de *B. emersonii*. Dentro das células, a exposição de regiões hidrofóbicas, em função do cálcio, pode ocorrer para que outras proteínas ou moléculas específicas possam se ligar a estas proteínas moduladoras de cálcio, ou mesmo para a sua autoorganização em forma de filamentos quando requerida.



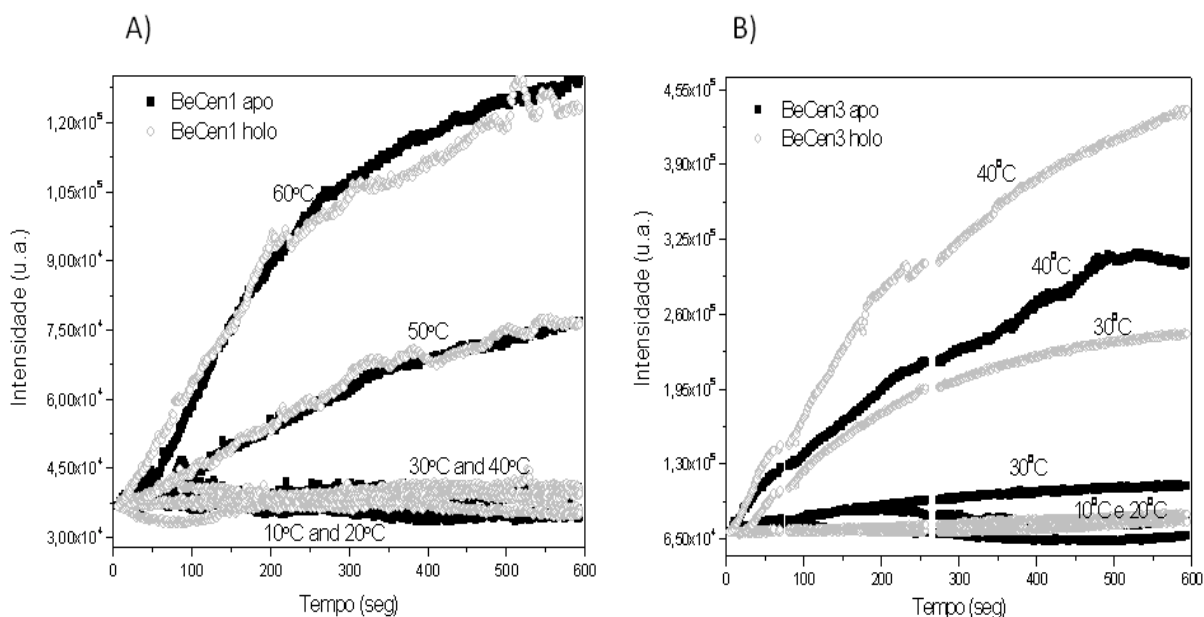
**Figura 32 - Mudanças no domínio “EF-Hand” presente na porção N-terminal da proteína Calmodulina.** A porção de cor amarela representa a região hidrofóbica da proteína, a molécula na cor azul representa a forma apo e na cor vermelha a forma holo. Moficada a partir de (60).

### 3.7 Investigação da Formação de Filamentos

Algumas proteínas ligantes de cálcio têm a propriedade de mudar sua estrutura conformacional, passando de uma forma monomérica, solúvel, para uma forma “filamentosa”, insolúvel, na presença de cálcio e/ou em função da temperatura (17). Este é um assunto ainda pouco discutido e documentado, principalmente quando se trata de imagens por microscopia eletrônica e/ou de força atômica.

### 3.7.1 Espalhamento de Luz em função da Temperatura – Right Angle Light Scattering - RALS

Para investigar se estas centrinas apresentam a capacidade de formar filamentos, foram realizadas medidas de espalhamento de luz, em 340 nm. A figura 33 mostra o espalhamento de luz destas centrinas, na presença e ausência de cálcio, em função da temperatura. BeCen1 e BeCen3 provavelmente encontram-se monoméricas em temperaturas abaixo de 40°C e 30°C, respectivamente, passando para um estado possivelmente “filamentoso” (observado, inclusive a olho nu, pela turgidez) acima destas temperaturas. Estes resultados mostram que estas proteínas tem comportamento similar aos descritos para a HsCen2 humana (17).



**Figura 33 - Oligomerização monitorada por espalhamento de luz a 340 nm.** Amostras contendo 25  $\mu\text{M}$  de proteína, Tris-HCl 20 mM, NaCl 10 mM e cálcio 2 mM, ou EGTA 1 mM pH 7,0, foram incubadas a 10, 20, 30, 40, 50 e 60°C monitoradas durante 10 minutos em cada temperatura. (A) BeCen1 e (B) BeCen3.

Com a técnica de RALS, podemos perceber que com o aumento da temperatura ocorre uma agregação de material e por isso observamos um maior espalhamento. No entanto, com estes resultados não é possível distinguir se esta agregação é um processo organizado que leva a formação de fibras ou aleatório formando agregados amorfos. A microscopia é uma



ferramenta fundamental nesta tentativa de caracterização da forma e organização destas proteínas.

### 3.7.2 Microscopia de Força Atômica - AFM

Sendo a microscopia de força atômica uma ferramenta capaz de obter imagens com resolução de nanômetros, esta foi utilizada para visualizarmos os possíveis filamentos formados, pelas centrinas 1 e 3 do fungo *Blastocladiella emersonii*.

Na literatura, existem dois estudos que mostram algum tipo de imagem dos filamentos de centrinas, o primeiro, de 1996, mostra por microscopia eletrônica algumas imagens de centrinas da alga verde *Scherffelia dubia* (SdCen) na presença de cálcio. Este trabalho mostra que as proteínas SdCen-holo são capazes de formar uma rede de filamentos em função da concentração, porém, para tal processo foram necessários 1,5 mM de proteína e os filamentos observados mediam de aproximadamente 30 nm de diâmetro (55). No segundo trabalho, de 2006, foram publicadas algumas imagens de microscopia eletrônica do complexo formado pela proteína Sfi1p mais a centrina Cdc31p de *Sacharomyces cerevisiae* (27). Estes complexos, denominados filamentosos, são de apenas alguns nanômetros de diâmetro e não dependem da presença de cálcio para se formar, no entanto, por não se tratarem de filamentos formados somente por centrinas não espera-se que possuam o mesmo diâmetro que as estruturas encontradas em nosso experimento.

Analisando as imagens de BeCen1 e BeCen3 por microscopia de força atômica, visualizam-se estruturas filamentosas nas amostras que não possuem adição de cálcio (Figura 34). Estes filamentos tem espessuras de pouco mais de 100 nm, condizendo com as imagens de microscopia eletrônica realizadas nas mesmas proteínas, mostradas no próximo tópico. As estruturas formadas pela proteína BeCen1-apo (Figuras 34A, 34B, 34C e 34D) são diferentes das estruturas formadas por BeCen3-apo (Figuras 35A, 35B, 35C e 35D). Estruturas filamentosas formadas por BeCen1-apo estão distribuídas em todo campo analisado, diferentemente da BeCen3-apo que aparece em locais específicos e podendo-se observar a superfície da mica ao fundo. O processo de formação de estruturas mais organizadas e maiores aparentam terem sido interrompidas nas amostras com a BeCen1-apo, isso pode ter

relação com o fato de que os resultados de RALS, para BeCen1, mostraram que a proteína começa a espalhar mais luz somente em temperaturas ao redor de 50°C e não logo acima de 30°C, como para BeCen3. O tempo de incubação das amostras pode ter sido insuficiente para a formação de estruturas mais regulares.

As estruturas visualizadas nas figuras 35A e 35B, formadas pela proteína BeCen3-apo, lembram fibras amilóides, formadas pela agregação de algumas proteínas específicas (61). Estudos mostram que algumas sequências repetitivas de aminoácidos hidrofóbicos como valina (V), leucina (L) e alanina (A) podem formar fibras muito parecidas com as fibras amilóides. Em 2007, Mercato *et al.*, mostrou algumas fibras formadas por uma sequência de peptídeos sintetizados poli (Val-Gli-Gli-Leu-Gli), estas possuíam aproximadamente 120 nm de diâmetro e se assemelham as fibras das figuras 35A e 35B (62). Outras estruturas observadas nas amostras BeCen3-apo foram vários “glóbulos” agrupados, com tendência a formarem estruturas maiores e bem organizadas (Figura 35C e 35D). Estruturas como estas podem vir a servir de base para a formação de estruturas filamentosas bem maiores, na ordem de  $\mu\text{m}$ , como os agregados pericentrolares formados antes dos centríolos nas células durante a mitose (22).

Com a técnica de AFM visualizam-se estruturas filamentosas formadas apenas por centrinas, diferentemente de Sam, Li. *et al.* 2006 com o complexo protéico Sfi1p-centrina, onde a proteína Cdc31p foi utilizada para fazer imagens de microscopia eletrônica juntamente com o peptídeo Sfi1p. As estruturas mostradas com centrinas são maiores, enquanto as imagens de Sam Li. *et al.*, 2006 apresentam filamentos de aproximadamente 60 nm, as observadas neste trabalho possuem pouco mais de 100 nm. No entanto, no caso do complexo estudado (Sfi1p-centrina), as técnicas de microscopia foram diferentes e as imagens foram feitas priorizando a visualização de proteínas individuais ligadas aos peptídeos e não de estruturas maiores formadas somente por proteínas, como no caso das proteínas BeCen1 e BeCen3. Ao contrário do trabalho de Wiech, H. *et al.* 1996, as imagens que mais se assemelham a estruturas filamentosas, são provenientes das amostras sem cálcio, mostrando que o processo observado não depende do íon, por outro lado, o processo de formação de fibras com a proteína SdCen não era dependente da temperatura e sim de altas concentrações de proteína (55).

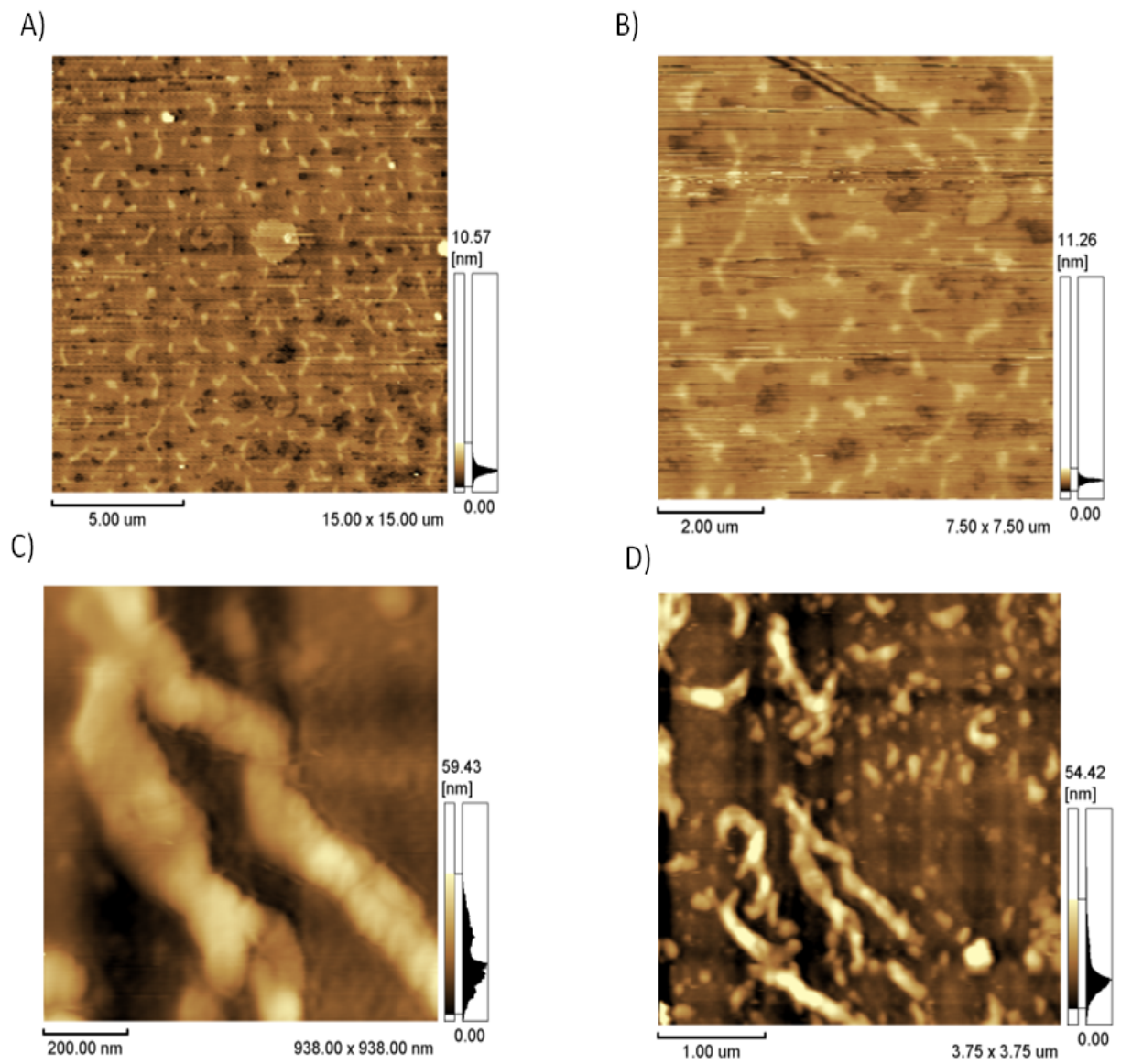
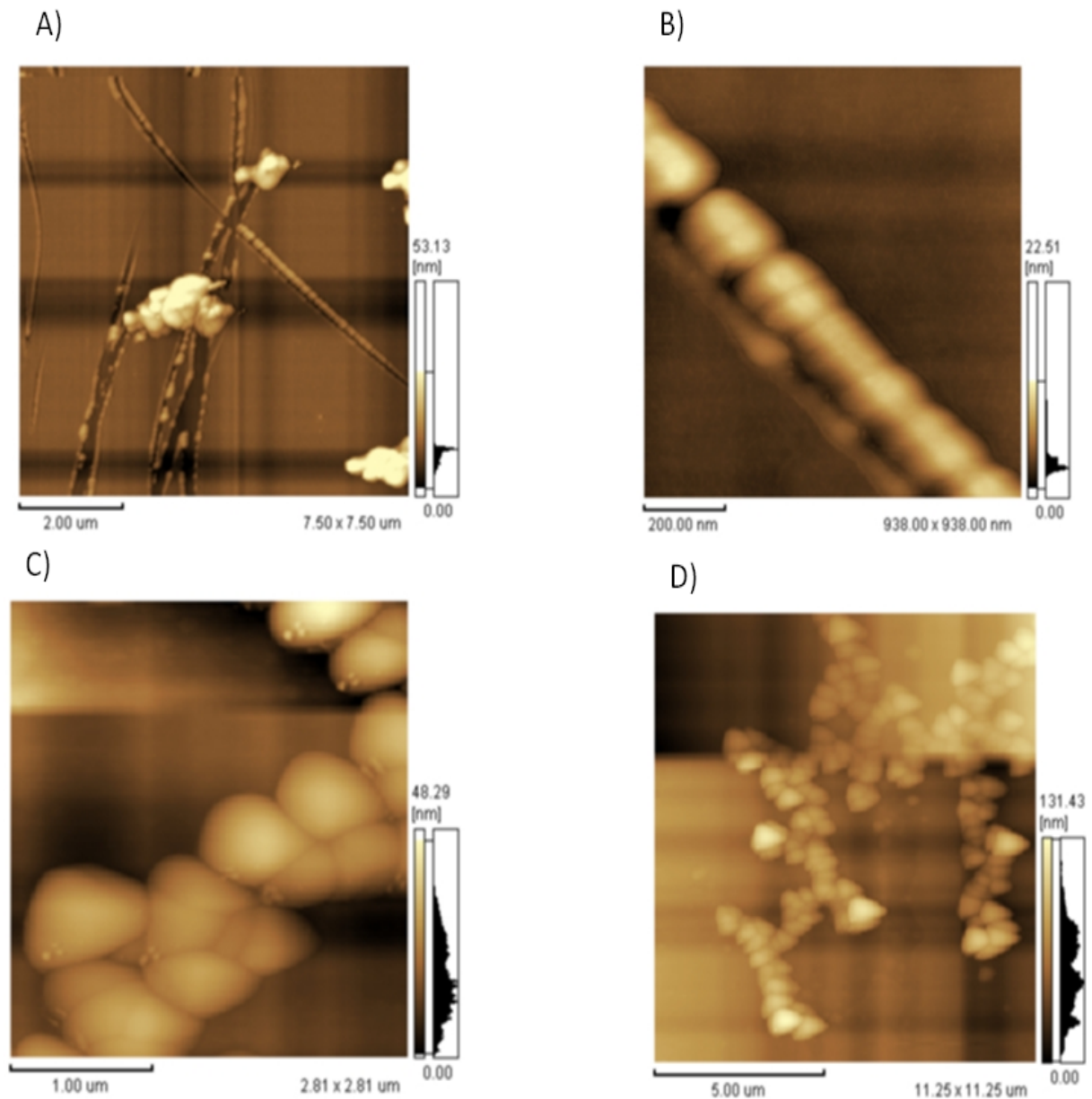


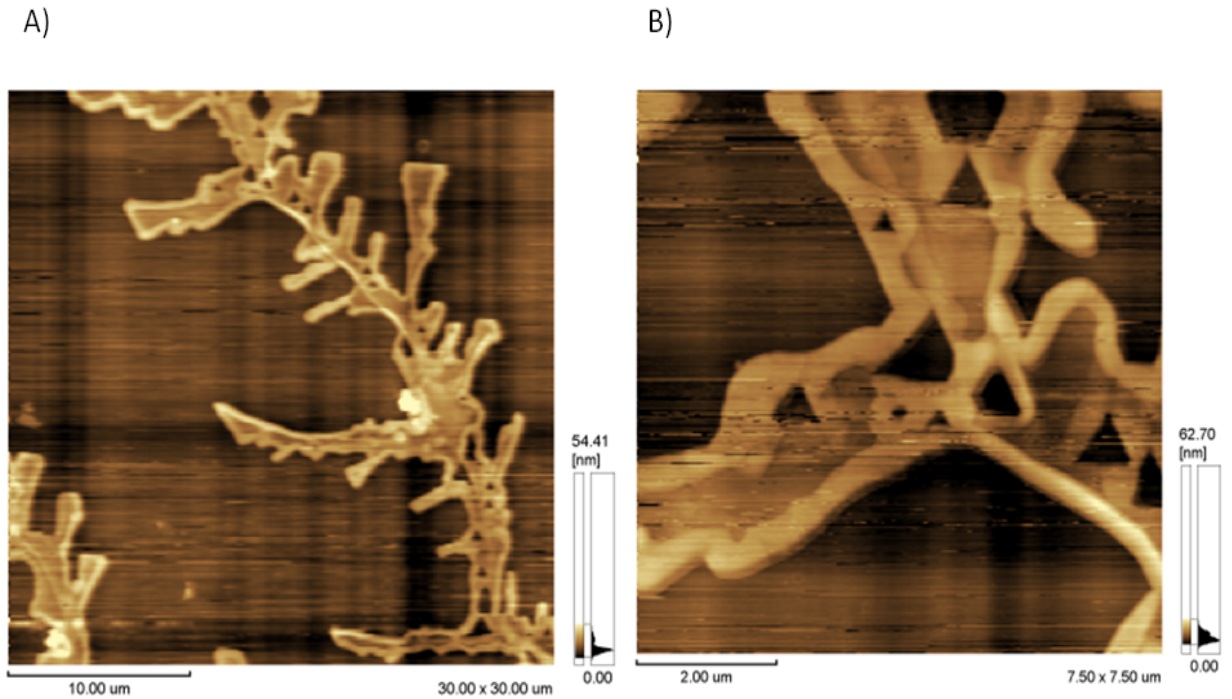
Figura 34 - Imagens de AFM da proteína BeCen1-apo.



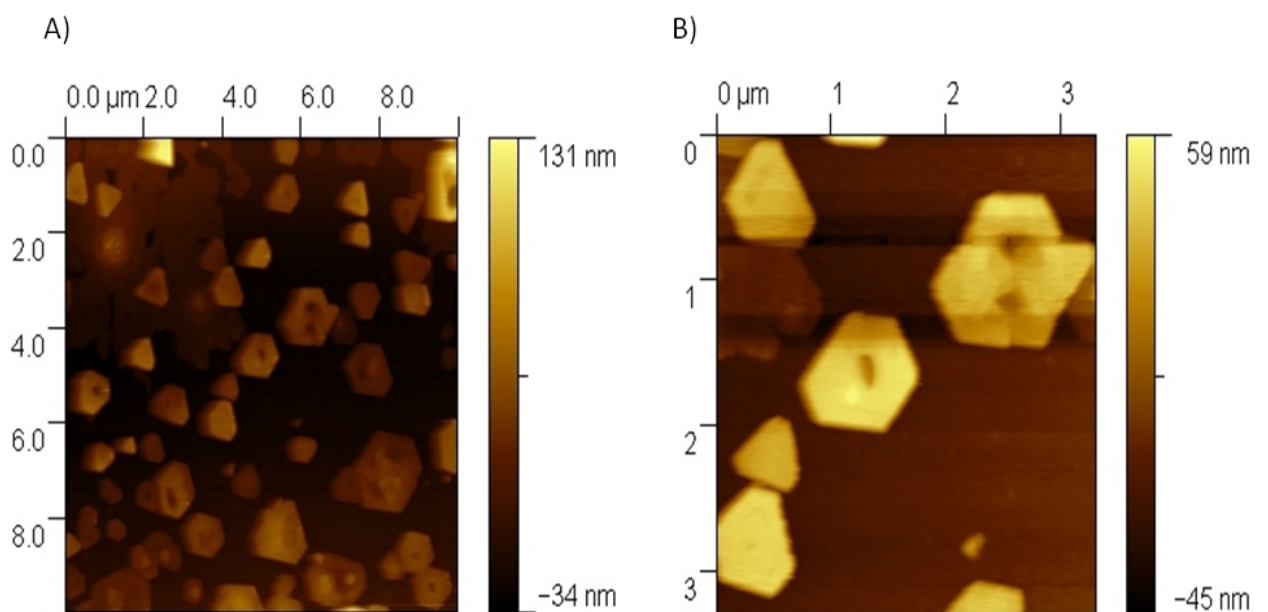
**Figura 35 - Imagens de AFM da proteína BeCen3-*apo*.**

As amostras com cálcio apresentaram estruturas muito grandes e aglomeradas (Figuras 36 e 37). Algumas imagens apresentam estruturas que parecem que sofreram um processo de cristalização, semelhantes a “árvores” com “ramos” e algumas estruturas triangulares (36A e 36B) ou estruturas hexagonais (37A e 37B). Como o cálcio parece retardar o processo de formação de filamentos, mostrado por experimentos de espalhamento de luz, para a proteína BeCen3, o tempo de incubação pode não ter sido suficiente para que as amostras com cálcio formassem filamentos, ou então, o cálcio pode favorecer a formação de cristais e/ou

aglomerados amorfos e não de filamentos. O curioso é que em todas as amostras com cálcio, notamos a presença de estruturas altamente ordenadas, indicando um processo de cristalização.



**Figura 36 - Imagens de AFM da proteína BeCen1-holo.**



**Figura 37 - Imagens de AFM da proteína BeCen3-holo.**



### 3.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

Ainda na tentativa de investigar a formação de filamentos nas centrinas de *B. emersonii* e entender melhor sua formação, amostras de centrinas 1 e 3 foram enviadas para o Centro de Investigações Biológicas de Madri, para medidas de microscopia eletrônica de transmissão. Nesta tentativa as duas proteínas forneceram imagens promissoras, no entanto, novamente, somente nas condições com EGTA (1 mM) é que obtivemos imagens de filamentos e nas amostras com cálcio nada foi encontrado. Os filamentos observados variam de 100 a 200 nm de diâmetro, e em comprimento chegam a alguns micrometros (Figuras 38 e 39). Utilizando a técnica de microscopia de força atômica também observamos filamentos com aproximadamente as mesmas medidas em BeCen1 e BeCen3 na ausência de cálcio, condizendo com as imagens obtidas por MET.

A)



B)

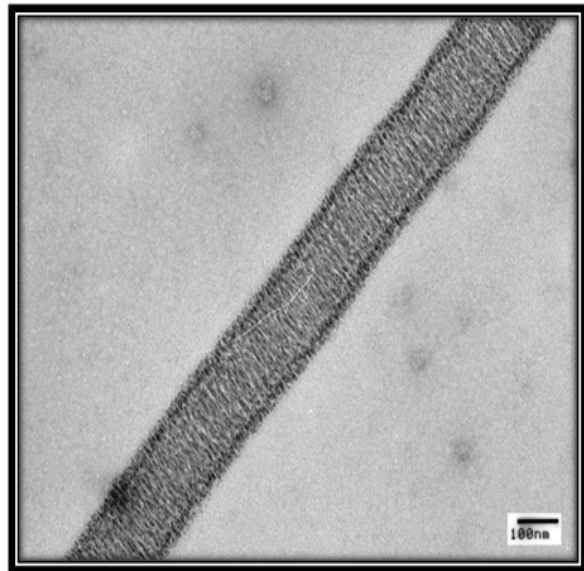
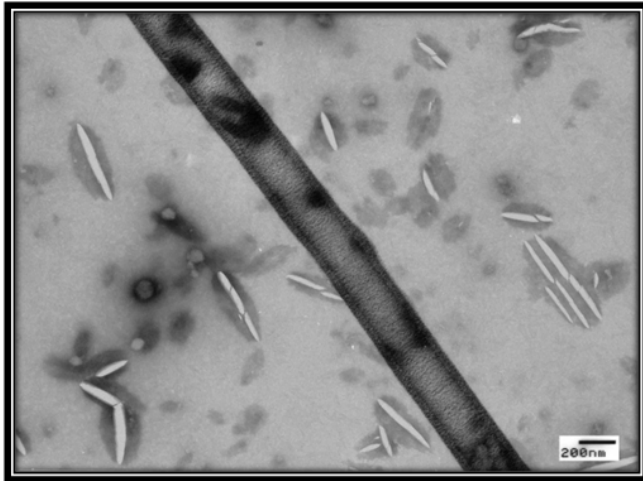


Figura 38 - Imagens de MET da proteína BeCen1-apo.



**Figura 39 - Imagens de MET da proteína BeCen3-apo.**

### 3.8 Calorimetria – ITC

Os pulsos ou sinais térmicos podem ser observados nas figuras 40 e 41 indicando o momento da adição, de um volume pré-determinado do titulante contido na seringa (neste caso  $\text{CaCl}_2$ ) no titulado contido na cela calorimétrica (contendo proteína). As reações endotérmicas, como a ligação de cálcio na proteína BeCen1, geram picos positivos (Figura 40) e as reações exotérmicas, como a ligação do cálcio na proteína BeCen3, geram picos negativos (Figura 41). O registro de um valor constante de energia indica que o sistema atingiu o equilíbrio. Neste caso, a energia registrada pela linha base é proporcional à energia necessária para manter a diferença de temperatura entre a célula de referência e o isolamento adiabático. Pequenos sinais térmicos observados após a saturação são causados pela energia relacionada à diluição das espécies químicas (principalmente do titulante), e pela energia relacionada a processos não específicos.

A constante de equilíbrio de associação  $K_a$  é a medida da afinidade entre duas moléculas, neste caso, entre o cálcio e cada sítio (motivo) de ligação das centrinas. Para fazer medidas em reações que possuem valores de  $K_a$  muito grandes, concentrações muito baixas de titulado são necessárias, podendo tornar os sinais térmicos gerados imperceptíveis. Por este motivo valores de  $K_a$  acima de  $10^9 \text{ M}^{-1}$  ( $\Delta G \sim -50 \text{ kJ mol}^{-1}$  na temperatura ambiente) não podem ser medidos com exatidão. Por outro lado, no caso de constantes de equilíbrio muito pequenas, as medidas requerem altas concentrações de sítios de interação e a agregação dos

reagentes devido às altas concentrações torna-se um problema. No caso da ligação de cálcio às centrinas de *B. emersonii*, os valores de  $K_a$  apresentam-se em torno de  $10^8 \text{ M}^{-1}$  a  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , fornecendo ótimos dados utilizando concentrações não muito altas de proteínas ou cálcio no sistema, descartando a agregação ou sinais imperceptíveis na medida.

Os motivos “EF Hand” apresentam constantes de afinidade que variam entre  $10^9 \text{ M}^{-1}$  a  $10^4 \text{ M}^{-1}$  variando bastante entre as famílias e subfamílias (6). Quando o cálcio se liga ao motivo “EF-Hand” as moléculas de água que estavam “aprisionadas” são liberadas para o solvente, e este ganho de entropia no solvente é grande suficiente para favorecer um aumento de  $\Delta G$  que ocorre quando o cálcio se liga ao motivo. A magnitude desta modificação entrópica é dependente do número de ligantes de água, substituídos por ligantes de proteína: quanto mais ligantes de água sobram menor é a afinidade. A cadeia lateral do resíduo de ácido glutâmico (E) ou glutamina (Q), localizado na nona posição da volta do motivo e na décima segunda posição, tem a habilidade de quelar diretamente o íon de cálcio, não precisando formar uma ponte com a molécula de água, como no caso de resíduos com cadeias laterais mais curtas. Motivos “EF-Hand” que não possuem estes resíduos nestas posições podem ter seus valores de afinidade diminuídos. Nas medidas utilizando as centrinas observamos que, no caso da BeCen1, os motivos 1 e 2 possuem resíduos de ácido aspártico (D) na posição 9 e resíduos de ácido glutâmico (E) na posição 12 da volta, o motivo 3 não liga cálcio e o motivo 4 possui resíduo de asparagina (N) na posição 9 e ácido aspártico (D) na posição 12. Como o ácido glutâmico pode promover um aumento na afinidade de cálcio pela proteína, a ausência deste resíduo no motivo 4 deve contribuir para o menor valor de  $K_a$  obtido (Tabela IV). A proteína BeCen3 possui somente dois motivos funcionais e em ambos estão presentes resíduos de ácido aspártico (D) na posição 9 e ácido glutâmico (E) na posição 12 da volta, porém, seus valores de  $K_a$  são muito distintos, não podendo ser explicado por esta diferença de composição na volta do motivo. A estabilidade da proteína na sua forma apo também pode ser um fator que interfere na afinidade pelo íon. Quanto mais instável é a proteína na sua forma apo mais alto tende ser sua constante de afinidade, devido a grande diferença de energia livre nos estados apo e holo. A diferença de afinidade por cálcio entre as centrina 1 e 3 pode ser devido a BeCen3 - apo apresentar-se numa forma mais estendida, tornando-se mais compacta na forma holo, diminuindo assim seu valor de entropia e apresentando um maior valor de  $K_a$  para o segundo sítio.

A ligação de cálcio à proteínas, geralmente, é entropicamente dirigida ( $\Delta H < 0$ ) devido a alta desidratação entálpica de cations bivalentes. No entanto, a entalpia geral da ligação do



cátion bivalente pode ser exotérmica ( $\Delta H > 0$ ), se a reação for acoplada a um processo entalpicamente favorável. A maior contribuição para a entalpia favorável, diante a ligação de cálcio, é a formação de interações eletrostáticas formadas entre os ligantes da volta e o cálcio ligado e também as interações inter-hélices. Muitas transformações físicas e químicas ocorrem com absorção de calor. Isto acontece porque as espécies químicas que sofrerão a transformação têm uma energia química acumulada menor que a dos produtos da transformação. É necessário fornecer calor aos reagentes (neste caso BeCen1 e  $\text{CaCl}_2$ ) para que seja atingida a energia química acumulada nos produtos (BeCen1 - holo). Conseqüentemente estas transformações são reações endotérmicas.

Provavelmente, como a forma apo da proteína BeCen1 está em uma forma mais compacta, para deixá-la mais estendida, o sistema demanda energia suficiente para a quebra de todas as interações que atrapalham a ligação de cálcio às regiões da volta “EF-Hand”. Neste caso a vizinhança cede energia, na forma de calor, para que as moléculas de proteína exponham seus sítios de ligação e para que o cálcio possa se ligar, impedindo que a proteína volte a ficar na sua forma compacta. O balanço energético no final do experimento mostra uma absorção de energia, na forma de calor pelo sistema, e a ligação de cálcio à proteína BeCen1 é uma reação endotérmica (Figura 40).

Para a proteína BeCen3 os valores de  $\Delta S$  indicam uma diminuição da entropia do sistema, talvez causado pelo cálcio que promoveu uma diminuição da entropia translacional da molécula em solução (Tabela IV). Indicando também que a reação ocorrida foi espontânea e exotérmica. O  $\Delta S$  negativo deve, neste caso, indicar uma diminuição no grau de liberdade da proteína em solução. Os valores de  $\Delta H$  negativos também indicam uma interação eletrostática forte entre a molécula e o ligante. A ligação exotérmica, resultando na liberação de calor, para a ligação de cálcio à proteína BeCen3 (Figura 41), deve estar relacionada ao fato desta molécula apresentar-se em uma forma mais compacta, talvez mais rígida, quando na forma holo. Neste caso a diminuição da entropia do sistema explicaria a compactação desta molécula, tornando-a menos flexível de quando na sua forma mais alongada e sem o ions de cálcio presentes.

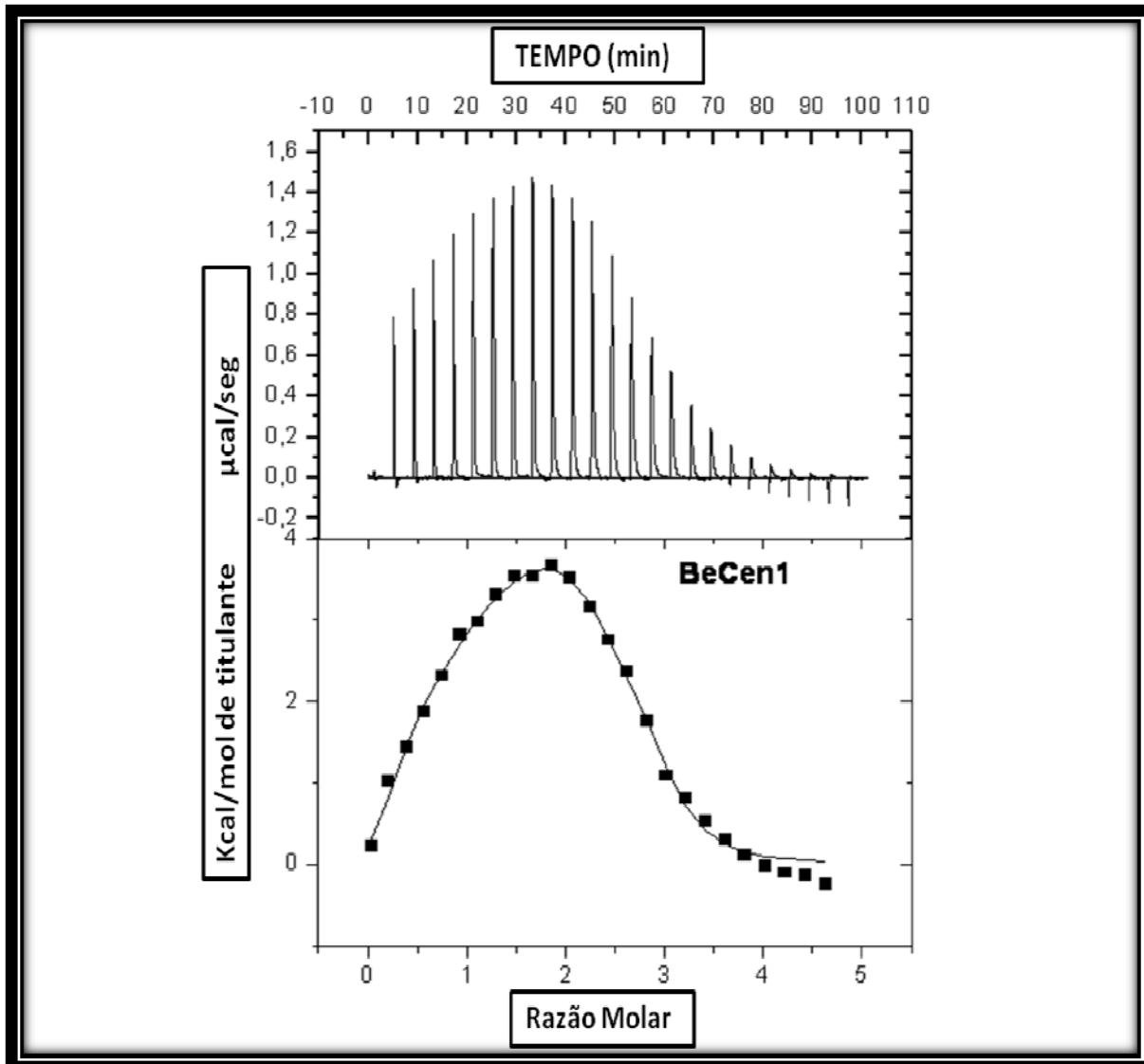


Figura 40 – Termograma da Titulação Isotérmica de cálcio na proteína BeCen1.

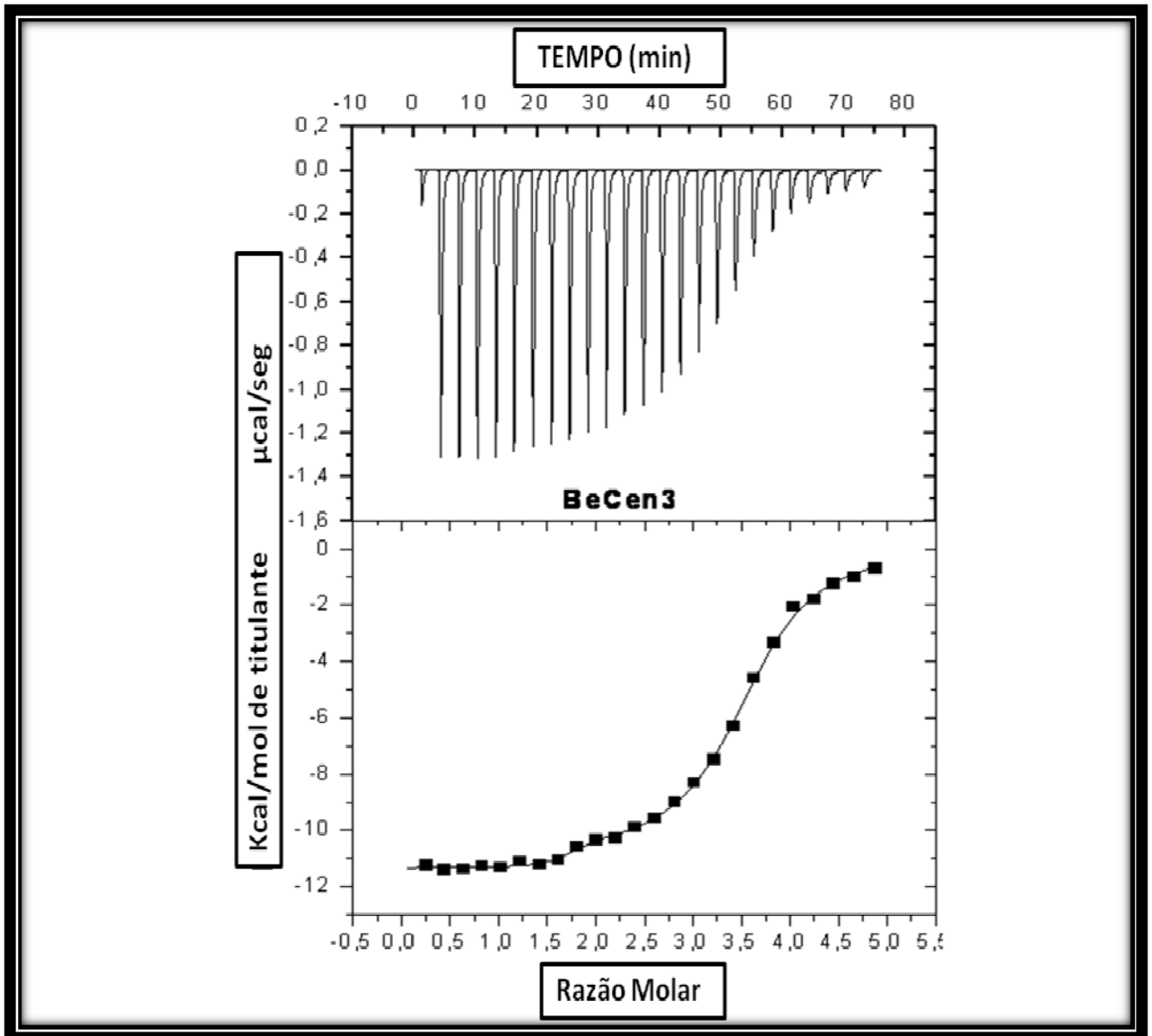


Figura 41 – Termograma da Titulação Isotérmica de cálcio na proteína BeCen3.

Tabela IV - Dados Termodinâmicos obtidos para a ligação de cálcio às proteínas BeCen1 e BeCen3.

PROTEÍNA	LIGANTE	$K_1$	$K_2$	$K_3$	$\Delta H_1$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_2$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_3$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_1$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_2$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_3$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
30uM <b>BeCen1</b>	0,45uM CaCl <sub>2</sub>	9,12 E <sup>6</sup>	4,62 E <sup>6</sup>	5,05E <sup>5</sup>	237,3	5912	2007	32,6	50,3	32,8
30uM <b>BeCen3</b>	0,45uM CaCl <sub>2</sub>	1,45 E <sup>6</sup>	2,08 E <sup>8</sup>	-----	-1, 077 E <sup>4</sup>	-1, 033 E <sup>4</sup>	-----	-7,93	0,06	-----

## **CONCLUSÕES**

---



## 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizados estudos estruturais e termodinâmicos de duas centrinas de *Blastocladiella emersonii*, BeCen1 e BeCen3. Sabe-se que as duas centrinas presentes neste fungo são consideradas uma novidade do ponto de vista evolutivo, pois outros fungos conhecidos possuem apenas um tipo de centrina em seu genoma. A centrina presente na maioria dos fungos, pertence à divisão das centrinas com funções de duplicação dos centros organizadores de microtúbulos, como as centrinas humanas HsCen3, e a Cdc31p de fungo *Sacharomices cerevisiae*. Já as centrinas caracterizadas por possuírem funções contráteis, como a centrina humana HsCen1 e de *Clamidomonas reinhardtii* CrCenp, são as extintas em fungos, mas presentes em *Blastocladiella emersonii*. Diante desse achado, descrito por Ribichich e Gomes, 2005 (29) propusemos um estudo estrutural comparativo entre as proteínas recombinantes BeCen1 e BeCen3, buscando identificar diferenças entre suas estruturas e propriedades físico-químicas, que pudessem explicar a presença dessas duas proteínas no fungo *Blastocladiella emersonii*.

Ambas as proteínas foram produzidas de forma recombinante em *E. coli*, purificadas e analisadas quanto às suas semelhanças e diferenças.

Ferramentas de bioinformática foram utilizadas para comparar a estrutura primária de BeCen1 e BeCen3 entre si, assim como entre outras centrinas. Com estas comparações foi possível estabelecer que, com relação à identidade sequencial, as centrinas HsCen2, HsCen1 e CrCenp são as mais parecidas com a centrina de *B. emersonii* BeCen1. Já a centrina BeCen3, assemelha-se mais com HsCen3 e Cdc31p. Portanto, BeCen1 e BeCen3 podem ser classificadas em dois grupos distintos, de acordo com as funções já descritas para as centrinas: BeCen1 estaria associada a classe das CrCenp, associada a funções contráteis, e BeCen3 estaria associada a classe da SsCdc31p relacionada a duplicação de centros mitóticos.

Em relação ao número de sítios ativos que ligam cálcio, ferramentas de previsão foram utilizadas para analisar cada motivo “EF-Hand”. De acordo com estas análises e com experimentos de calorimetria, BeCen1 possui três motivos ligantes de cálcio funcionais, enquanto BeCen3 possui apenas dois. Os primeiros motivos de ligação de cálcio de ambas

apresentam valores de constante de afinidade da mesma ordem de grandeza. O segundo sítio que liga cálcio na proteína BeCen1 possui um valor de  $K_a$  próximo ao primeiro, no entanto, o segundo sítio de ligação da proteína BeCen3 é o que possui maior afinidade com o cálcio, apresentando o maior valor de  $K_a$ . Finalmente, o terceiro sítio ligante de cálcio em BeCen1, apresenta um valor de afinidade um pouco menor que os seus outros dois sítios. Os valores termodinâmicos calculados com a técnica de ITC, para ambas as centrinas de *B. emersonii*, estão de acordo com os valores já descritos para centrinas de outros organismos (6).

Com estudos de dicroísmo circular pode-se obter dados sobre a estrutura secundária de BeCen1 e BeCen3, e também compará-las com dados da literatura. Características como aumento da estabilidade térmica com a adição de cálcio, observado para estas proteínas, já foram descritas para outras centrinas (57); aumento e diminuição da intensidade dos mínimos observados nos espectros de CD, característico para  $\alpha$ -hélices, também foram observados em BeCen1 e BeCen3; mudanças na intensidade dos espectros de CD, após adição de cálcio, mostraram uma movimentação das hélices, BeCen1-holo mostra diminuição da intensidade do sinal de  $\alpha$ -hélices, enquanto BeCen3-holo mostra aumento da intensidade deste sinal; BeCen1 mostrou um espectro de CD compatível com proteína envelhada (reenovelada), após desnaturação térmica e incubação a 4°C por 24 horas, enquanto BeCen3, submetida às mesmas condições permaneceu com o espectro de CD característico de proteína desnaturada.

Investigações sobre a ligação de cálcio e magnésio às centrinas também foram feitas por meio de fluorescência extrínseca, e ambas mostraram capacidade de ligarem o magnésio, em pelo menos um de seus sítios “EF-Hand”. Mais uma vez, BeCen1 e BeCen3 tiveram respostas diferentes sob as mesmas condições, reforçando a idéia que cada uma possui funções distintas no fungo.

Por cromatografia de exclusão de peso molecular identificamos algumas diferenças na forma das proteínas BeCen1 e BeCen3, em relação a presença ou ausência de cálcio. Estas informações foram úteis na interpretação dos dados de calorimetria, podendo sustentar a natureza das reações endotérmica e exotérmica das centrinas BeCen1 e BeCen3.

A tendência de BeCen1 e BeCen3 formarem fibras foi investigada pela técnica de espalhamento de luz, indicando uma processo de agregação (organizada ou não) em temperaturas acima de 30°C e 40°C, respectivamente. A formação de estruturas maiores e regulares, somente foi identificada em amostras aderidas em substratos sólidos, com o uso da



microscopia de força atômica. A interpretação dos dados sobre este aspecto ainda é complexo, pois nossos dados representam os primeiros relatos sobre o assunto na literatura. A microscopia eletrônica de transmissão complementou os dados de AFM, sendo ambas as técnicas adequadas para os estudos futuros de fibras formadas por proteínas. A elaboração do protocolo de preparação de amostras, deposição do material e superfície utilizada em cada técnica, desenvolvido neste trabalho, será promissora para estudos subsequentes.

Este trabalho estabeleceu o primeiro protocolo para a expressão e purificação das centrinas de *B. emersonii*. Foi o primeiro estudo de caracterização estrutural e termodinâmica das proteínas BeCen1 e BeCen3 , além de investigar as propriedades inéditas destas proteínas no processo de formação de filamentos.

As centrinas possuem diversas funções ainda desconhecidas dentro da célula, mas certamente possuem função determinante nos centros organizadores de microtúbulos e na contração de cílios e flagelos de uma grande diversidade de organismos. A caracterização estrutural e termodinâmica das centrinas de *B. emersonii* é fundamental para o entendimento dos mecanismos de ligação de cálcio e/ou magnésio, envolvido em diversos processos celulares. Como as centrinas parecem desempenhar um papel fundamental no ciclo celular, estas proteínas podem tornar-se alvos para auxiliar no tratamento de patologias que resultam em hiperplasia, por exemplo. Além disso, por serem proteínas com produção solúvel e viável, apresentam potencial uso na nanotecnologia e/ou produção de fármacos.



## **PERSPECTIVAS**

---



## **5. PERSPECTIVAS**

Experimentos de ITC, utilizando construções da região N-terminal e C-terminal das proteínas BeCen1 e BeCen3, podem fornecer mais informações sobre os sítios específicos que participam da ligação ao cálcio. Utilizar nestas medidas o íon magnésio também seria interessante, para a obtenção de valores da afinidade deste íon para ambas as centrinas.

A partir da descoberta da capacidade, das centrinas estudadas, em formarem filamentos, iniciamos estudos em colaboração com o Professor Dr. Valtencir Zucolloto do Grupo de Biofísica Molecular do IFSC. O objetivo geral foi a obtenção e caracterização de BeCen1 e/ou BeCen3 complexadas com nanopartículas de ouro. Os dois aspectos relevantes são a identificação da forma e a quantidade de ouro agregado às proteínas. Há também a possibilidade destas proteínas levarem ao alinhamento das nanopartículas no complexo, formando assim estruturas organizadas, por exemplo, “fios de ouro” muito convenientes na nanotecnologia (63).

Investigações mais detalhadas sobre a formação de filamentos devem ser feitas, variações de concentração de proteína e tempo de incubação são fatores que certamente devem influenciar neste processo. A quantidade de sal na amostra também pode influenciar na formação de filamentos e também nos processos que parecem ser cristalizações, por isso devem ser mais estudados.

Estudos sobre a estrutura tridimensional destas moléculas já estão sendo realizados. Utilizando a técnica de SAXS (*Small Angle X-Ray Scattering*) obtivemos o envelope molecular das duas proteínas em questão, e estamos analisando os dados sobre a influência de cálcio e das variações de temperatura, na estrutura destas proteínas. Este trabalho vem sendo realizado em colaboração com os professores Dr. Leandro R. S. Barbosa e Dra. Rosângela Itri, do laboratório de cristalografia no Instituto de Física de São Paulo (IFUSP).



## REFERÊNCIAS

---





## REFERÊNCIAS

1. MULDER NJ, APWEILER R, ATTWOOD TK, BAIROCH A, BATEMAN A, BINNS D. New developments in the InterPro database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database issue, p.224-8, Jan 2007.
2. BERRIDGE MJ, BOOTMAN MD, RODERICK HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**. v.4, n.7, p.517-29, Jul 2003.
3. VOGEL, H. J. Calcium-Binding Protein Protocols. **Humana Press Inc.**, v. I, 2002.
4. KRETSING.RH; NOCKOLDS, CE. Carp Muscle Calcium-Binding Protein 2: structure determination and general description. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 9, p. 3313-3326, 1973.
5. GRABAREK, Z. Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 359, n. 3, p. 509-525, Jun 9 2006.
6. GIFFORD, J. L.; WALSH, M. P.; VOGEL, H. J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. **Biochemistry Journal**, v. 405, n. 2, p. 199-221, Jul 2007.
7. MARSDEN, B. J.; SHAW, G. S.; SYKES, B. D. Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. **Biochemistry of Cell Biology**, v. 68, n. 3, p. 587-601, Mar 1990.
8. BABINI, E, BERTINI, I., CAPOZZI, F., LUCHINAT, C., QUATTRONE, A., TURANO, M. Principal component analysis of the conformational freedom within the EF-hand superfamily. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 6, p. 1961-1971, Nov-Dec 2005.
9. NELSON, M. R.; CHAZIN, W. J. An interaction-based analysis of calcium-induced conformational changes in Ca<sup>2+</sup> sensor proteins. **Protein Science**, v. 7, n. 2, p. 270-282, Feb 1998.
11. JURADO, L. A.; CHOCKALINGAM, P. S.; JARRETT, H. W. Apocalmodulin. **Physiological Review**, v. 79, n. 3, p. 661-82, Jul 1999.

12. CATES, M.S., BERRY, M.B., HO, E.L., LI, Q., POTTER, J.D., PHILLIPS, G.N. Metal-ion affinity and specificity in EF-hand proteins: coordination geometry and domain plasticity in parvalbumin. **Structure**, v. 7, n. 10, p. 1269-1278, Oct 15 1999.
13. COLING, D. E.; SALISBURY, J. L. Characterization of the calcium-binding contractile protein centrin from *Tetraselmis striata* (Pleurostrophyceae). **Journal of Protozoology**, v. 39, n. 3, p. 385-91, May-Jun 1992.
14. ERRABOLU, R.; SANDERS, M. A.; SALISBURY, J. L. Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 9-16, Jan 1994.
15. LEE, V. D.; HUANG, B. Molecular cloning and centrosomal localization of human caltractin. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11039-43, Dec 1993.
16. OGAWA, K.; SHIMIZU, T. Cdna Sequence for Mouse Caltractin. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1216, n. 1, p. 126-128, Oct 19 1993.
17. TOURBEZ, M., FIRANESCU, C., YANG, A., UNIPAN, L., DUCHAMBON, P., BLOUQUIT, Y., CRAESCU, C.T. Calcium-dependent self-assembly of human centrin 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 47672-80, Nov 12 2004.
18. MARTINEZ-SANZ, J., KATEB, F., ASSAIRI, L., BLOUQUIT, Y., BODENHAUSEN, G., ABERGEL, D., MOUAWAD, L., CRAESCU, C.T. Structure, dynamics and thermodynamics of the human centrin 2/hSfi1 complex. **Journal of Molecular Biology**, v. 395, n. 1, p. 191-204, Jan 8 2010.
19. SANDERS, M. A.; SALISBURY, J. L. Centrin Plays an Essential Role in Microtubule Severing during Flagellar Excision in *Chlamydomonas-Reinhardtii*. **Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 5, p. 795-805, Mar 1994.
20. SCHIEBEL, E.; BORNENS, M. In Search of a Function for Centrins. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 5, p. 197-201, May 1995.
21. PAOLETTI, A., MOUDJOU, M., PAINTRAND, M., SALISBURY, J.L., BORNENS, M. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. **Journal of Cell Science**, v. 109 ( Pt 13), p. 3089-102, Dec 1996.

22. LA TERRA, S., ENGLISH, CN., HERGERT, P., MCEWEN, BF., SLUDER, G., KHODJAKOV, A. The de novo centriole assembly pathway in HeLa cells: Cell cycle progression and centriole assembly/maturation. **Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 5, p. 713-722, Feb 28 2005.
23. LEVY, YY., LAI, EY., REMILLARD, SP., HEINTZELMAN, MB., FULTON, C. Centrin is a conserved protein that forms diverse associations with centrioles and MTOCs in *Naegleria* and other organisms. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 33, n. 4, p. 298-323, 1996.
24. ARAKI M., MASUTANI, C., TAKEMURA, M., UCHIDA, A., SUGASAWA, K., KONDOH, J., OHKUMA, Y., HANAOKA, F. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 22, p. 18665-72, Jun 2001.
25. MIDDENDORP, S., KUNTZIGER, T., ABRAHAM, Y., HOLMES, S., BORDES, N., PAINTRAND, M., PAOLETTI, A., BORNENS, M. A role for centrin 3 in centrosome reproduction. **Journal of Cell Biology**, v. 148, n. 3, p. 405-415, Feb 7 2000.
26. THOMPSON, JR., RYAN, ZC., SALISBURY, JL., KUMAR, R. The structure of the human centrin 2-xeroderma pigmentosum group C protein complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18746-18752, Jul 7 2006.
27. LI, S., SANDERCOCK, AM., CONDUIT, P., ROBINSON, CV., WILLIAMS, RL., KILMARTIN, JV. Structural role of Sfi1p-centrin filaments in budding yeast spindle pole body duplication. **Journal of Cell Biology**, v. 173, n. 6, p. 867-77, Jun 19 2006.
28. MIDDENDORP, S., PAOLETTI, A., SCHIEBEL, E., BORNENS, M. L. Identification of a new mammalian centrin gene, more closely related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC31 gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 94, n. 17, p. 9141-6, Aug 1997.
29. RIBICHICH, K. F.; GOMES, S. L. *Blastocladiella emersonii* expresses a centrin similar to *Chlamydomonas reinhardtii* isoform not found in late-diverging fungi. **FEBS Letters**, v. 579, n. 20, p. 4355-60, Aug 15 2005.
30. LOVETT, J. S. Growth and differentiation of the water mold *Blastocladiella emersonii*: cytodifferentiation and the role of ribonucleic acid and protein synthesis. **Bacteriological Reviews**, v. 39, n. 4, p. 345-404, Dec 1975.

31. COUTINHO, E. C.; CORREA, L. C. The induction of sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* is dependent on extracellular calcium. **Fems Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 353-359, Oct 15 1999.
32. SALISBURY, J. L. BARON, A., SUREK, B., MELKONIAN, M. Striated flagellar roots: isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle. **Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 3, p. 962-70, Sep 1984.
33. SAMBROOK, J., FRITISH, EF , MANIATIS, T. Molecular cloning: a Laboratory Manual. . **Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Sping Harbor, NY.**, v. 3rd ed. , 2001.
34. SAMBROOK, J.; FRITISH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring harbor Laboratory Press. 1 1989.
35. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970.
36. WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, May 2008.
37. KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica Et Biophysica Acta - protein structure and molecular enzymology**, v. 1338, n. 2, p. 161-185, Apr 4 1997.
38. SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-60, Dec 15 2000.
39. COMPTON, L. A.; JOHNSON, W. C., JR. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. **Analytical Biochemistry**, v. 155, n. 1, p. 155-67, May 15 1986.
40. SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. **Protein Science**, v. 8, n. 2, p. 370-80, Feb 1999.
41. YANG, J. T.; WU, C. S.; MARTINEZ, H. M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. **Methods Enzymology**, v. 130, p. 208-69, 1986.

42. TANNER, RE., HERPIGNY, B., CHEN, SH., RHA, CK. Conformational Change of Protein Sodium Dodecyl-Sulfate Complexes in Solution - a Study of Dynamic Light-Scattering. **Journal of Chemical Physics**, v. 76, n. 8, p. 3866-3872, 1982.
43. GAMBLIN, TC., KING, ME., DAWSON, H., VITEK, MP., KURET, J., BERRY, RW., BINDER, LI. In vitro polymerization of tau protein monitored by laser light scattering: Method and application to the study of FTDP-17 mutants. **Biochemistry**, v. 39, n. 20, p. 6136-6144, May 23 2000.
44. JUE, T. **Fundamental concepts in biophysics**. New York: Humana, 2009. xi, 240 p., 16 .
45. LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd. New York: Springer, 2006. xxvi, 954 p.
46. ALLEN, J. P. **Biophysical Chemistry**. Hong Kong: Blackwell Publishing, 2008.
47. MATULIS, D.; LOVRIEN, R. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. **Biophysical Journal**, v. 74, n. 1, p. 422-9, Jan 1998.
48. SALIM, N. N.; FEIG, A. L. Isothermal titration calorimetry of RNA. **Methods**, v. 47, n. 3, p. 198-205, Mar 2009.
49. VELAZQUEZ-CAMPOY, A., OHTAKA, H., NEZAMI, A., MUZAMMIL, S., FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry. **Current Protocols in Cell Biology**, v. Capiulo 17, p. Unidade 17 8, Sep 2004.
50. MAGONOV, S. N. Atomic force microscopy of polymers and related compounds. **Polymer Science, Series B. polymer chemistry**, v. 38, n. 1, p. 143-182, Jan 1996.
51. SNYDER, S. R.; WHITE, H. S. Scanning Tunneling Microscopy, Atomic Force Microscopy, and Related Techniques. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 12, p. R116-R134, Jun 15 1992.
52. FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Atomic force microscopy applied to immunoassays. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, Jan-Feb 2006.

53. FULTZ, B., HOWE, J. **Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials**. 3rd ed. New York: Springer, 2008.
54. MULDER NJ, APWEILER R, ATTWOOD TK, BAIROCH A, BATEMAN A, BINNS D. New developments in the InterPro database. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database issue, p.224-8, Jan 2007.
55. WIECH, H. GEIER, BM., PASCHKE, T., SPANG, A., GREIN, K., STEINKOTTER, J., MELKONIAN, M., SCHIEBEL, E. Characterization of green alga, yeast, and human centrin. Specific subdomain features determine functional diversity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 37, p. 22453-61, Sep 13 1996.
56. YANG, A., MIRON, S., DUCHAMBON, P., ASSAIRI, L., BLOUQUIT, Y., CRAESCU, CT. The n-terminal domain of human centrin 2 has a closed structure, binds calcium with a very low affinity, and plays a role in the protein self-assembly. **Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 880-889, Jan 24 2006.
57. YANG, A., MIRON, S., MOUAWAD, L., DUCHAMBON, P., BLOUQUIT, Y., CRAESCU, CT. Flexibility and plasticity of human centrin 2 binding to the xeroderma pigmentosum group C protein (XPC) from nuclear excision repair. **Biochemistry**, v. 45, n. 11, p. 3653-63, Mar 21 2006.
58. COX, JA., TIRONE, F., DURUSSEL, I., FIRANESCU, C., BLOUQUIT, Y., DUCHAMBON, P., CRAESCU, CT. Calcium and magnesium binding to human centrin 3 and interaction with target peptides. **Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 840-50, Jan 25 2005.
59. DURUSSEL, I., BLOUQUIT, Y., MIDDENDORP, S., CRAESCU, CT., COX, JA. Cation- and peptide-binding properties of human centrin 2. **Febs Letters**, v. 472, n. 2-3, p. 208-212, Apr 28 2000.
60. AKKE, M.; CHAZIN, W. J. An open and shut case. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 11, p. 910-912, Nov 2001.
61. IONESCU-ZANETTI, C., KHURANA, R., GILLESPIE, JR., PETRICK, JS., TRABACHINO, LC., MINERT LJ, CARTER, SA., FINK, AL. Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13175-13179, Nov 9 1999.
62. DEL MERCATO, LL., POMPA, PP., MARUCCIO, G., DELLA TORRE, A., SABELLA, S., TAMBURRO, AM., CINGOLANI, R., RINALDI, R. Charge transport and intrinsic

fluorescence in amyloid-like fibrils (vol 104, pg 18019, 2007). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 16, p. 6208-6208, Apr 22 2008.

63. KATZ, E.; WILLNER, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 45, p. 6042-108, Nov 19 2004.