Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**RENATURAÇÃO SOB ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA DE TIORREDOXINAS
DE *XYLELLA FASTIDIOSA***

LAURA SIMONI LEMKE

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora: Dra. Lúcia Ely Morganti Ferreira Dias

São Paulo

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Henrique e Angela.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a **Deus** pela vida e por me guiar.
- Aos meus pais, **Henrique e Angela**, agradeço por todo carinho e paciência, por terem me ensinado que o sucesso é do tamanho do nosso esforço, por acreditarem em mim e por terem confiado na minha decisão de seguir por este caminho, sem nunca terem me deixado faltar nada.
- À minha irmã **Paula**, que é o meu maior exemplo de mulher batalhadora, decidida e independente, obrigada por sempre ter me apoiado. E ao meu cunhado **Willian**, o irmão que eu ganhei, pelos conselhos que sempre deu à mim e por ter sempre uma piada para me fazer rir.
- À minha orientadora **Dra. Ligia Morganti**, exemplo de pesquisadora competente, séria e dedicada. Obrigada pela oportunidade, confiança, paciência e por estar sempre disposta a ajudar sem necessidade de hora marcada.
- Agradeço as minhas colegas de laboratório, com cada uma delas aprendi coisas que vou levar para o resto da vida: com **Daniella Rodrigues** aprendi o real sentido das palavras comprometimento e seriedade; com **Rosa Maria Chura-Chambi** aprendi o que é excelência profissional, dizem que faz bem aquele que gosta do que faz, e no que diz respeito a Rosa, isso é indiscutível; com a **Natália Malavasi Vallejo** aprendi que o bom humor é essencial, independente do quão ruim for a situação, as coisas irão ficar muito piores se perdermos o bom humor. Agradeço a elas, de uma maneira geral, pelo convívio durante todo esse tempo, pelos conselhos, por toda a ajuda em laboratório e principalmente pelas gargalhadas, sem elas as coisas teriam sido muito difíceis!

- Aos alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório e aos que ainda estão lá: **Natália Moranguinho, Samara, Vivian, Fabiana, Gleyce, Roberto, Letícia, Larissa, Mariana.**
- Ao **Dr. Luis Eduardo Soares Netto**, do Instituto de Biologia da USP, agradeço por ter cedido os plasmídeos das proteínas de *X. fastidiosa* e por ter disponibilizado seu laboratório para a execução dos experimentos de atividade biológica.
- Ao **Dr. José Renato Cussiol**, agradeço pela ajuda com os ensaios de atividade biológica, por tirar as minhas infinitas dúvidas sempre com paciência e bom humor e por ter ajudado na correção dessa dissertação.
- A todos os amigos que fiz no IPEN: **Karina, Tamara, Rodrigo, Vincent, Renata, Eliza, Claudinha, Bia, Fernanda, Thais, Roberto, Miriam, Vanessa, Flavinha, Larissa, Bruno, Alisson** e a tantos outros.
- Ao **Dr. Patrick Jack Spencer**, por toda a ajuda e conselhos durante a execução deste trabalho.
- A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial a **Arlete e Ruth.**
- Agradeço aos meus amigos queridos, que são irmãos de alma: **Juliana, Karine, Milenny, Fernanda, Danielle, Géssika e Felipe**, obrigada por compreenderem a minha ausência mesmo nos momentos em que eu mais precisava estar presente, pelo apoio incondicional, pelos conselhos, broncas e risadas.
- Agradeço ao **CNPq** pela concessão da bolsa e à **FAPESP** pelo financiamento do projeto.

**“I am not discouraged, because every wrong
attempt discarded is another step forward”**

Thomas Edison

RENATURAÇÃO SOB ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA DE TIOREDOXINAS DE *XYLELLA FASTIDIOSA*

LAURA SIMONI LEMKE

RESUMO

Muitas das proteínas de valor biomédico relevante são encontradas em baixas concentrações em suas fontes nativas. O alto nível de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, muitas vezes gera o acúmulo de proteínas como agregados insolúveis no citoplasma e/ou periplasma da bactéria, denominados de corpos de inclusão (CI). A alta pressão tem sido amplamente utilizada no estudo da conformação das proteínas, ela modula as interações proteína-proteína e proteína-solvente através de mudanças no volume das mesmas, promovendo a entrada de água nas cavidades não expostas da molécula e promovendo hidratação e solubilização dos agregados. O presente trabalho teve como objetivo a renaturação de proteínas recombinantes expressas como CI em *Escherichia coli* usando alta pressão hidrostática como condição branda de dissociação dos agregados. As tiorredoxinas TsnC e TrxA, a proteína YbbN e a proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp), todas de *Xylella fastidiosa*, foram estudadas neste trabalho. As condições de renaturação foram otimizadas, utilizando-se diferentes proporções do par redox, concentrações de GdnHCl, presença de aditivos e esquemas de descompressão. Para a quantificação e análise da eficácia do processo de renaturação das proteínas sob pressão foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura dos CI e de SDS-PAGE, e ensaios de atividade enzimática das proteínas.

A TsnC foi renaturada em Tris HCl 50 mM com proporção de 10GSH:1GSSG em concentração final de 10 mM, 0,75 M GdnHCl, na presença de 0,5 M de Triton-X e a pressão utilizada foi de 2,4 kbar por 1 hora e 30 minutos seguida de descompressão direta e incubação por 16 horas em pressão atmosférica. O rendimento final de obtenção de TsnC solúvel foi altíssimo, de até 89,9%. A renaturação de proteína YbbN, nunca antes descrita, foi obtida em tampão de renaturação Tris HCl 50 mM, na presença de 0,5 M de L-Arginina e a pressão

utilizada foi de 2,4 kbar por 1 hora e 30 minutos seguida de descompressão direta e incubação por 16 horas em pressão atmosférica. A proteína YbbN, que apresentou atividade de tioredoxina, foi renaturada com rendimento de até 98% a partir da proteína insolúvel nos CI. Foi possível a solubilização da tioredoxina TrxA e Bcp sob alta pressão hidrostática em tampão de renaturação Tris HCl 50 mM, utilizando diferentes proporções do par redox na concentração final de 10 mM e 1,5 M de GdnHCl, porém não foi possível obter a atividade biológicas destas proteínas.

Mostramos também que a L-Arginina apresenta efeito auxiliar na solubilização dos CI induzida pela alta pressão, e ao mesmo tempo se mostrou altamente protetora contra a inativação da atividade da YbbN promovida pela incubação em altas temperaturas, o que sugere que a presença deste aminoácido pode ter alta aplicabilidade juntamente com a aplicação de altas pressões para elevar os rendimentos de renaturação de proteínas recombinantes a partir de CI.

RENATURATION UNDER HIGH HIDROSTATIC PRESSURE OF THIOREDOXINS OF XYLELLA FASTIDIOSA

LAURA SIMONI LEMKE

ABSTRACT

Many of the relevant proteins are found in low concentrations in their native sources. The high level expression of recombinant heterologous proteins in *Escherichia coli* often causes their accumulation as insoluble aggregates in the cytoplasm or periplasm of bacteria in a mainly inactive form, known as inclusion bodies (IB). The high pressure has been widely used to study the conformational states of proteins. It modulates the protein-protein and protein-solvent interactions by changing the volume of the system, promoting the entrance of water into the cavities unexposed to water, exposing hydrophobic regions and promoting solubilization of the aggregates. The present study aimed to refold recombinant proteins expressed in *E. coli* as IB using high hydrostatic pressure as a mild condition for IB dissociation. The thioredoxins TsnC, TrxA and Ybbn and the protein comigratory with bacterioferritin (Bcp) of *Xylella fastidiosa* were studied in this work. The conditions for refolding were optimized for proportions of the redox pair, GdnHCl concentration, presence of additives and schemes for decompression. To analyze the effectiveness of the process of refolding under pressure we have used, scanning electron microscopy of the IB and SDS-PAGE and enzymatic activity assays for quantification and analysis of the solubilized proteins.

The TsnC was renatured in 50 mM TrisHCl at a ratio of 10GSH: 1GSSG in 10 mM final concentration, 0.75 M GdnHCl in the presence of 0.5M Triton X-100 and application of 2.4 kbar for 1.5 hours, followed by direct decompression and incubation for 16 h at atmospheric pressure. The final yield of soluble and biological active TsnC was very high, up to 89,9%. The refolding of protein YbbN was obtained by application of 2.4 kbar for 1.5 h to an IB suspension in buffer 50 mM Tris HCl, in the presence of 0.5 M L-arginine, followed by direct decompression and incubation for 16 h at atmospheric pressure. We also show that L-arginine had a highly protective effect on the inactivation of biological activity of YbbN promoted by incubation at high temperatures. The final yield of refolded YbbN, that present thioredoxin activity, was also very high: 98%. TrxA and Bcp thioredoxins were

solubilized at 2.4 kbar and step decompression. However, these proteins did not present biological activity.

We also show that L-arginine has an auxiliary effect on the solubilization of IB induced by high pressure, while its presence proved highly protective against inactivation of the enzymatic activity promoted by incubation at high temperatures. These results suggest that the presence of this amino acid can have high applicability to increase the yield of refolding of recombinant proteins from the IC at high pressure.

LISTA DE ABREVIATURA

Bcp – Proteína comigratória com bacterioferritina

BIS-ANS - 4,4-dianilino- 1,1-binaphthyl-5,5-sulfonate

BSA – soro albumina bovina

CI – corpos de inclusão

CVC – Clorose Variegada dos Citrus

DTNB – ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico)

DTPA – ácido dietileno triamino pentacético

DTT – 1,4-ditiotreitol

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – ácido etileno diamina tetra acético

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

GdnHCl – hidrocloreto de guanidina

GSH – glutationa reduzida

GSSG – glutationa oxidada

IPTG - Isopropil, β -D-tiogalactopiranosíde

L-Arg – L-arginina

MEV – microscopia eletrônica de varredura

NADPH – β -nicotinamida adenina dinucleotídeo 2' – fosfato reduzido

NaCl – Cloreto de sódio

ORF – quadro de leitura aberto (*open reading frame*)

PEG – polietileno glicol

Prx – peroxirredoxina

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante

TNB - ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

T-BHP – *terc*-butilhidroperóxido

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

Trx – tiorredoxina

TrxA – tiorredoxina A

TsnC – tiorredoxina C

X. fastidiosa – *Xylella fastidiosa*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Renaturação de proteínas.....	15
1.2 Corpos de inclusão e enovelamento de proteínas	17
1.3 Aplicação de alta pressão hidrostática à renaturação de proteínas	20
1.4 Xylella fastidiosa	22
1.4.1 Superfamília das tiorredoxinas.....	23
1.4.2 Proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp).....	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Materiais	31
3.1.1 Equipamentos.....	31
3.1.2 Reagentes e soluções	32
3.1.3 Linhagem bacteriana	34
3.2 Métodos	35
3.2.1 Transformação e expressão.....	35
3.2.2 Lavagem dos Cl.....	35
3.2.3 Renaturação.....	36
3.2.4 Agentes solubilizantes e de óxido-redução.....	37
3.2.5 Aditivos.....	37
3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura	37
3.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida	38
3.2.8 Purificação da tiorredoxina TsnC e da proteína YbbN.....	38
3.2.9 Dicroísmo circular.....	38
3.2.10 Espalhamento de luz.....	39
3.2.11 Determinação de atividade biológica das tiorredoxinas TrxA e TsnC e da proteína YbbN	39
3.2.12 Determinação da atividade biológica da proteína YbbN inativada pela temperatura	39
3.2.13 Determinação de atividade biológica da proteína Bcp	40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 TsnC	41
4.1.1 <i>Expressão em diferentes meios de cultura da tiorredoxina TsnC</i>	<i>41</i>
4.1.2 <i>Expressão da tiorredoxina TsnC em diferentes temperaturas</i>	<i>42</i>
4.1.3 <i>Renaturação da tiorredoxina TsnC na presença de diferentes proporções do par redox (GSH/GSSG).....</i>	<i>43</i>
4.1.4 <i>Renaturação da tiorredoxina TsnC na presença de diferentes concentrações de GdnHCl.....</i>	<i>44</i>
4.1.5 <i>Renaturação da tiorredoxina TsnC na presença de diferentes aditivos.....</i>	<i>46</i>
4.1.6 <i>Renaturação da tiorredoxina TsnC utilizando diferentes esquemas de descompressão</i>	<i>47</i>
4.1.7 <i>Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) dos CI da tiorredoxina TsnC</i>	<i>49</i>
4.1.8 <i>Dicroísmo circular.....</i>	<i>49</i>
4.2 YbbN.....	51
4.2.1 <i>Expressão da proteína YbbN em diferentes meios de cultura.....</i>	<i>51</i>
4.2.2 <i>Expressão da proteína YbbN em diferentes temperaturas</i>	<i>51</i>
4.2.3 <i>Renaturação da proteína YbbN na presença de diferentes proporções do par redox (GSH/GSSG).....</i>	<i>53</i>
4.2.4 <i>Renaturação da proteína YbbN na presença de diferentes concentrações de GdnHCl.....</i>	<i>54</i>
4.2.5 <i>Renaturação da proteína YbbN na presença de diferentes aditivos.....</i>	<i>55</i>
4.2.6 <i>Renaturação da proteína YbbN utilizando diferentes esquemas de descompressão</i>	<i>57</i>
4.2.7 <i>Dissociação dos CI sob pressão.....</i>	<i>58</i>
4.2.8 <i>Atividade biológica da proteína YbbN incubadas em diferentes temperaturas</i>	<i>60</i>
4.2.9 <i>Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) da proteína YbbN.....</i>	<i>61</i>
4.2.10 <i>Dicroísmo circular.....</i>	<i>62</i>
4.3 TrxA	64
4.3.1 <i>Expressão da tiorredoxina TrxA em diferentes meios de cultura</i>	<i>64</i>
4.3.2 <i>Expressão da tiorredoxina TrxA em diferentes temperaturas</i>	<i>64</i>

4.3.3 Renaturação da tiorredoxina TrxA na presença de diferentes proporções do par redox (GSH/GSSG).....	65
4.4 Bcp.....	67
4.4.1 Expressão da proteína Bcp em diferentes meios de cultura.....	67
4.4.2 Expressão da proteína Bcp em diferentes temperaturas.....	67
4.4.3 Renaturação da proteína Bcp na presença de diferentes proporções do par redox (GSH/GSSG).....	69
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

Muitas das proteínas de valor biomédico relevante são encontradas em baixas concentrações em suas fontes nativas. Com o avanço da tecnologia de DNA recombinante, a expressão de proteínas heterólogas tornou-se uma ferramenta importante nos estudos da estrutura e função de proteínas conhecidas e também de identificação de novas proteínas. A bactéria *Escherichia coli* é um microorganismo extremamente útil não só para a produção de proteínas de interesse comercial em grande escala, como também para a produção de proteínas utilizadas em estudos estruturais e funcionais.

O alto nível de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, muitas vezes gera o acúmulo de proteínas como agregados insolúveis no citoplasma e/ou periplasma da bactéria na sua forma inativa. Esses agregados são conhecidos como corpos de inclusão (CI) [1].

A formação dos CI é atribuída ao fato de que as células bacterianas não possuem as ferramentas necessárias para o processamento pós-traducional que leva ao enovelamento para a conformação nativa de proteínas heterólogas expressas em altos níveis [2]. Algumas proteínas endógenas quando superexpressas em *E. coli* também podem se acumular e formar CI [3]. A expressão de proteínas em CI possui algumas vantagens como a produção de elevados níveis de proteínas altamente enriquecidas, chegando a mais de 90% do total de proteínas celulares em alguns casos [4], baixo custo e homogeneidade da proteína alvo. Retidas em agregados insolúveis, essas proteínas são parcialmente protegidas da degradação proteolítica. No caso da proteína de interesse ser tóxica para as células hospedeiras, a produção em CI se torna praticamente a única opção viável de expressão [5].

1.1 Renaturação de proteínas

A renaturação de proteínas para a conformação nativa a partir de CI não é um processo simples, exigindo, muitas vezes, uma abordagem extensa de tentativa e erro. Há três questões importantes na recuperação de proteínas ativas de CI, ou seja, extração e lavagem dos CI, solubilização dos agregados e renaturação dos estados não nativos para a conformação nativa [5].

Os CI são geralmente liberados mecanicamente ou quimicamente por ruptura das células [6], e a seguir uma etapa de centrifugação ou filtração é realizada para separação das frações solúvel e insolúvel. O sucesso desta separação pode variar e depende de diferenças na base da composição da proteína, estrutura e conformação dos polipetídeos dos CI [7]. Há evidências de que contaminantes presentes em preparações de CI podem reduzir significativamente o rendimento da renaturação das proteínas. Em um estudo feito utilizando lisozima de clara de ovo, contaminantes foram adicionados às soluções e os efeitos nas taxas de renaturação e agregação foram monitorados. A elevação na taxa de reagregação foi observada quando DNA plasmidial, lipossacarídeos ou proteínas que colaboram com a agregação foram adicionados à suspensão de CI submetidos à renaturação [8]. O método mais comumente utilizado para a separação dos CI da fração celular solúvel é a centrifugação seguida de repetidas lavagens utilizando um agente desnaturante (1- 4 M de uréia ou GdnHCl), sacarose ou detergentes com a finalidade de reduzir os níveis de contaminantes [9].

A escolha dos agentes utilizados para solubilização dos CI desempenha um papel fundamental na eficiência do processo. O método mais utilizado é a solubilização utilizando agentes desnaturantes, entre os quais estão o hidrocloreto de guanidina (GdnHCl) e a uréia [10]. A dissociação dos agregados utilizando estes reagentes pode levar à desnaturação completa da proteína ou apenas a ruptura de interações intermoleculares sem provocar a perda de estruturas secundárias existentes. A chave para o desenvolvimento de um processo de renaturação mais eficiente é a utilização de quantidades mínimas de agentes desnaturantes. A maioria dos artigos publicados sobre a renaturação de proteínas a partir de CI utiliza altas concentrações de agentes caotrópicos para a dissociação dos agregados, o que promove a desnaturação proteica [11-14]. Porém, menores concentrações de GdnHCl (1-2 M) em pH altamente alcalino (12,5) foram descritas para a dissociação branda de agregados com vantagens em relação à rendimento de renaturação e pureza da preparação [5].

O processo de renaturação proteico é iniciado quando ocorre a redução da concentração do agente desnaturante utilizado na etapa de solubilização por diálise, diluição ou ainda outro processo [15] e não ocorre em uma única etapa, competindo com a formação de estados com conformação não nativa e a reagregação [16]. O

citossól da bactéria é um meio com potencial redutor, principalmente devido à presença de moléculas com potencial óxido redutor como a glutathiona (GSH), um tiól de baixo peso molecular presente em concentrações milimolares, a proteína tiorredoxina (Trx) e uma dissulfeto redutase [17]. As cisteínas das proteínas agregadas intracelulares permanecem em sua forma reduzida (Cys-SH) [18]. Quando a proteína nativa contém aminoácidos cisteína envolvidos em pontes dissulfeto, a obtenção de proteínas nativas a partir de CI é complicada devido à formação de pontes dissulfídicas intermoleculares, pois quando os CI são purificados, essas cisteínas são oxidadas, frequentemente formando pontes dissulfeto não nativas. Desagregar proteínas em CI com ligações dissulfeto, além do agente caotrópico, requer o uso de agentes redutores. Durante a remoção do agente desnaturante para a renaturação as pontes dissulfeto nativas devem ser favorecidas. Os agentes óxido-redutores glutathiona reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG), que permitem a quebra de pontes dissulfeto não nativas e a formação de novas pontes dissulfeto nativas, foram amplamente utilizados para a renaturação proteica [5].

O passo de renaturação, no entanto, é difícil e depende fortemente das condições de renaturação. Por exemplo, condições de redox, pH, taxas de diálise e concentração protéica devem ser empiricamente otimizadas para cada proteína. Muitas vezes a proteína é solubilizada, porém em uma conformação que não apresenta atividade biológica. Além disso, a reagregação é favorecida sobre a renaturação em concentrações protéicas altas. Então, para se estabelecer condições que levem a rendimentos aceitáveis de proteínas renaturadas freqüentemente se utiliza concentrações protéicas muito baixas (10 a 100 µg/ml) antes de se retirar o agente caotrópico [10]. Encontrar as condições que levem a rendimentos aceitáveis de renaturação, se possível, usualmente requer a seleção de um grande número de condições de renaturação [19].

1.2 Corpos de inclusão e enovelamento de proteínas

As proteínas nos CI possuem estruturas secundárias semelhantes às daquelas das proteínas em seu estado nativo [20], e até certa porcentagem de estados com estrutura terciária nativa e atividade biológica foram descritas nos CI [21, 22].

Foi recentemente estudado o efeito da temperatura de cultivo das bactérias hospedeiras nas características das proteínas nos CI. O cultivo em altas temperaturas promove a formação de agregados mais estáveis, condição que favorece interações intermoleculares à custa de contatos intramoleculares nativos [23], pois as cadeias polipeptídicas não corretamente enoveladas são propensas à formação e estabilização de estruturas de folhas β não nativas, características de agregados protéicos [24]. Estes resultados possuem implicações importantes para a produção de proteínas recombinantes nativas, pois sugerem que a dissociação de CI produzidos em menores temperaturas pode ser realizada em condições mais brandas. Assim, os estados funcionais podem ser liberados dos CI utilizando-se condições que quebrem a rede de contatos intermoleculares, solubilizando as proteínas de forma menos drástica, mantendo as estruturas secundárias e terciárias existentes.

A trajetória completa do enovelamento de proteínas somente foi descrita a nível atômico de resolução para proteínas muito simples [25], mas experimentos biofísicos e teóricos revelam que o enovelamento de proteínas em geral é uma reação seqüencial e altamente cooperativa [26]. De modo a prever os tipos de conformação disponíveis para cada sequência individual de polipeptídeos em determinada condição, o conceito de funil de energia foi introduzido [27-29]. Este formalismo teórico descreve a progressão de cadeias de polipeptídeos desenoveladas ao longo de um funil de energia rumo à estrutura nativa compacta (figura 1). [30]. Sequências polipeptídicas grandes possuem funis energéticos mais acidentados [31, 32], contendo diversos possíveis estados conformacionais.

O processo de enovelamento de proteínas é uma seleção estocástica das muitas conformações acessíveis a uma cadeia polipeptídica [27, 28, 33, 34]. As flutuações inerentes à conformação de uma cadeia polipeptídica não completamente enovelada possibilitam até mesmo contatos entre resíduos em posições muito distantes na cadeia de aminoácidos. Devido ao fato de que as interações nativas entre diferentes resíduos são geralmente mais estáveis do que as interações não nativas, no processo de seleção é encontrada a estrutura nativa, com menor nível de energia [26]. Conforme o enovelamento progride, o alto grau de desordem da cadeia polipeptídica é reduzido, pois a entalpia mais favorável associada às interações nativas pode compensar a entropia decrescente, quando a estrutura vai se tornando mais ordenada. Os resultados de vários estudos sugerem que o mecanismo

fundamental de enovelamento pode ser descrito como nucleação-condensação, no qual um núcleo de enovelamento contendo um pequeno número de interações entre resíduos-chave ocorre, ao redor do qual o resto da estrutura se forma [35]. Um aspecto crucial dos estados de transição da maioria das proteínas é que eles possuem a mesma topologia geral do que a proteína nativa. Esta topologia pode resultar da aquisição de um ambiente semelhante ao da proteína nativa para um número muito pequeno de resíduos-chave que constituem o núcleo de enovelamento das proteínas e que forçam a cadeia a adotar uma arquitetura rudimentar semelhante à nativa [36, 37]. Uma vez que esta topologia foi adotada, a estrutura nativa é quase invariavelmente gerada quando o resto da proteína se une em volta deste núcleo. Inversamente, se estas interações chave não se formam a proteína geralmente não é capaz de enovelar diretamente para uma estrutura globular estável. As proteínas maiores geralmente se enovelam em módulos, isto é, o enovelamento ocorre independentemente em diferentes segmentos ou domínios da proteína [38]. Nestes casos, interações chave definem o enovelamento nas regiões ou domínios da proteína e subsequentemente outras interações específicas são necessárias para que estas regiões inicialmente enoveladas interajam apropriadamente para formar a estrutura completa correta. A estrutura totalmente nativa somente é adquirida, no entanto, quando todas as interações nativas forem formadas dentro dos domínios e entre eles, o que ocorre em um passo de enovelamento cooperativo final e quando a água for excluída do núcleo da proteína [39, 40]. Em vista do exposto, fica evidente que o enovelamento de proteínas é facilitado na presença de interações nativas.

Figura 1. Representação esquemática do funil de energia livre de um experimento de alta pressão aplicada a uma proteína, provocando o desnovelamento proteico. O eixo vertical do funil representa a energia interna de uma molécula de proteína hidratada, isto é, a energia livre, em paralelo com a ordem conformacional da cadeia polipeptídica. A escala horizontal representa a entropia conformacional. A densidade de pontos em cada posição do funil representa o equilíbrio populacional da molécula. Em vermelho estão representadas as estruturas proteicas altamente desordenadas. Neste caso aparecem dois estados nativos (N1 e N2), com conformações similares, sendo que o N1 é o estado de menor energia e maior volume. Entre I e N existe uma barreira energética. É representado também o estado desenovelado (D) e um estado intermediário (I). Retirado de [41].

1.3 Aplicação de alta pressão hidrostática à renaturação de proteínas

A alta pressão tem sido amplamente utilizada no estudo da conformação das proteínas [41-44]. A pressão hidrostática modula as interações proteína-proteína e proteína-solvente através de mudanças no volume das mesmas, promovendo a entrada de água nas cavidades não expostas da molécula, expondo resíduos hidrofóbicos e promovendo hidratação e solubilização dos agregados. [45].

Foi demonstrado que as altas pressões hidrostáticas são capazes de promover a dissociação dos agregados e a renaturação de algumas proteínas [46-49]. A aplicação da alta pressão é uma técnica suave de dissociação para proteínas agregadas que não requer o uso de altas concentrações de agentes caotrópicos e permite a manutenção da estrutura secundária e terciária da molécula (Chura-Chambi, *et al* – dados não publicados).

A aplicação de pressões entre 1 - 3 kbar é capaz de romper interações eletrostáticas e hidrofóbicas intermoleculares, promovendo assim a dissociação de proteínas oligoméricas e agregadas. É importante lembrar que os mesmos tipos de

interação responsáveis pela manutenção dos estados agregados são também responsáveis pela manutenção de estruturas secundárias e terciárias de proteínas em sua conformação nativa. No entanto, a hidratação proteica mais eficiente, com ruptura das ligações intramoleculares e a consequente desnaturação das proteínas geralmente ocorrem em níveis mais elevados de pressão, entre 4 - 5 kbar [43, 50]. O nível de pressão em que a renaturação acontece é controverso. Enquanto alguns artigos relatam que a dissociação e a renaturação ocorrem concomitantemente a níveis de pressão entre 2 - 2,5 kbar [11, 48], o nosso grupo de pesquisa tem mostrado que esta faixa de pressão solubiliza os agregados, mas que a renaturação proteica ocorre em níveis mais baixos de pressão [21].

Devido ao fato de que cada proteína apresenta características bioquímicas únicas, as condições para melhorar o rendimento de recuperação de cada uma delas são diferentes e podem ser identificadas sistematicamente usando reagentes específicos. São conhecidos alguns aditivos, especialmente os de baixo peso molecular, que podem melhorar significativamente o rendimento do processo de renaturação. Esses aditivos podem ser classificados em dois grupos: o primeiro aumenta a renaturação proteica e o segundo suprime a reagregação [16].

Poucas publicações descreveram processos de renaturação de proteínas a partir de CI: das proteínas β -lactamase [46], membros da família de receptores nucleares [51], as proteínas de *Drosophila melanogaster* “Gram-negative bacteria binding proteins” (GNBP 1, GNBP 2 e GNBP 3) e duas fosfatases humanas (PTPRS e DUSP7) [49]. Dentre estas publicações estão algumas do nosso grupo que realizou a renaturação da proteína antiangiogênica endostatina [52], da bothropstoxina 1 de *Bothrops jararacussu* [53] e a renaturação da GFP (green fluorescence protein) [21].

Uma grande parte dos artigos que descrevem a renaturação de proteínas utilizam a dosagem proteica na fração solúvel como o método de determinação da eficiência do processo [54, 55]. No entanto, o fato de uma proteína se encontrar solúvel não necessariamente implica que ela se encontre na conformação nativa. Por este motivo no presente projeto foram escolhidas enzimas, cujas atividades biológicas são facilmente determinadas, de forma a podermos verificar de maneira confiável a atividade biológica das proteínas de interesse, além da porcentagem de solubilização obtida no processo.

A renaturação de proteínas provenientes dos estudos de genoma e proteoma de *X. fastidiosa*, de agregados insolúveis e inativos para proteínas com propriedades biológicas é de grande interesse para estudos de estrutura e de atividade destas proteínas, que podem resultar em métodos de tratamento eficientes para esta doença que provoca perdas de produtividade e por isso possui grande interesse econômico.

1.4 *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa é uma bactéria gram-negativa patogênica que contamina inúmeras plantas, incluindo culturas de grande importância econômica, tais como: uva, laranja, ameixa, pêssago, café e amêndoas, bem como plantas ornamentais [56]. No Brasil, é responsável pela doença Clorose Variegada dos Citrus (CVC), que provoca perdas anuais de cerca de US\$ 100 milhões para a agroindústria cítrica. Em pomares afetados pela doença, os frutos ficam duros, pequenos e amadurecem precocemente, resultando numa rápida diminuição da produção. A perda de peso do fruto pode chegar a 75%. Por essa razão, um grupo de pesquisadores brasileiros sequenciou o genoma da cepa 9a5c de *X. fastidiosa* que se tornou o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente sequenciado [57]. Esse projeto foi iniciado no ano de 1997 e concluído no ano 2000. Em consequência do sucesso do projeto, no ano de 1999 surgiu o Projeto Proteoma *Xylella* Funcional, que visa expressar e pesquisar as proteínas envolvidas na patologia desta bactéria. Ambos os projetos foram financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

A *X. fastidiosa* é transmitida por insetos conhecidos como cigarrinhas (ordem Hemiptera, subordem Homoptera, família Cicadellidae, subfamília Cicadellinae), que se alimentam do xilema da planta e ao sugar a seiva de uma planta contaminada levam as bactérias aderidas ao seu trato bucal, carregando-as para outras plantas. Todas as espécies do vetor podem transmitir todas as cepas do patógeno.

A *X. fastidiosa* é o único entre os fitopatógenos que pode ser transmitida sem requerer um período de latência no vetor [58]. Há discordâncias consideráveis sobre os mecanismos de patogenicidade dessa bactéria. No entanto, a oclusão vascular por agregados de bactérias e a produção de polissacarídeos extracelulares, levando ao

estresse hídrico é a teoria mais aceitável como causa da doença [59]. O alto estresse hídrico que é observado nas folhas infectadas pela CVC é caracterizado por uma diminuição drástica no potencial de água, induzindo a folha a murchar inclusive em plantas cultivadas em solo úmido. Os sintomas de deficiência de água nas plantas afetadas pela CVC ocorrem devido ao aumento da resistência do fluxo de água ao longo dos vasos do xilema [60].

1.4.1 Superfamília das tiorredoxinas

As enzimas tiorredoxinas (Trx) foram isoladas pela primeira vez em 1964 e são doadoras de hidrogênio para síntese de desoxirribonucleotídeos pela enzima ribonucleosídeo redutase, utilizada durante a síntese e reparação de DNA, em *E. coli* [61]. A superfamília das tiorredoxinas inclui tiól transferases, cujos membros encontrados no citoplasma das células são as tiorredoxinas (TsnC e TrxA) e as glutarredoxinas 1, 2 e 3 [62].

As Trx são pequenas proteínas de aproximadamente 12 kDa com uma sequência conservada do sítio ativo Trp-Cys-Gly-Pro-Cys que catalisa reações de óxido-redução pela da oxidação reversível de um ditiol a um dissulfeto. A Trx oxidada é regenerada para sua forma reduzida pela tiorredoxina redutase à custa da oxidação de NADPH (Figura 3). Da mesma forma que a glutathione redutase, a tiorredoxina redutase contém FAD como grupo prostético sendo, portanto, uma flavoenzima [63]. Estas proteínas estão presentes em todos os organismos vivos e tem sido isoladas e caracterizadas de uma ampla variedade de células procarióticas e eucarióticas [61].

Hoje se sabe que as Trx exercem diversas outras funções, tanto em células procarióticas como eucarióticas, como doação de hidrogênio para 3'-Fosfoadenosina-5'-fosfosulfato redutase na via de assimilação do sulfato, bem como para a enzima metionina sulfóxido redutase [64, 65]. Também é necessária para o ciclo de vida de alguns bacteriófagos como T7, M13 e f1 [66-68]. Além disso, as Trx podem facilitar a renaturação de proteínas que contém pontes dissulfetos [69], ativar receptores de interleucina-2 [70], modular a ligação do DNA com alguns fatores de transcrição, por exemplo, NF- κ B [71] e estimular a proliferação de células linfóides [72]. Outras

funções conhecidas são a capacidade de reduzir peróxido de hidrogênio [73], eliminar os radicais livres [74] e proteger a célula do estresse oxidativo [75].

As estruturas tridimensionais das Trxs de *E. coli* foram determinadas por técnica de ressonância magnética nuclear bem como por difração de raio-x [76, 77] (Figura 2).

Figura 2: Estrutura da superfamília de Trx de *E. coli* (PDB ID: 1XOA); [77] representativo do enovelamento de Trx.

Uma das características das enzimas da superfamília das tiorredoxinas é o alto grau de semelhança estrutural entre seus membros, consistindo basicamente em uma folha β formada por quatro ou cinco fitas β que estão flanqueadas por α hélices, na configuração $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\alpha 3-\beta 4-\alpha 4-\beta 5-\alpha 5$, possuem aproximadamente 100 resíduos e quase todas são monômeros [78]. Todas essas enzimas apresentam um motivo CxxC conservado no sítio ativo, sendo que a sulfidrila da cisteína N-terminal deste motivo é mais exposta e desprotonada em pH fisiológico e é designada cisteína nucleofílica. A outra cisteína, não está exposta e é geralmente protonada. A cisteína nucleofílica e a cisteína não exposta são as de resíduo 32 e 35, respectivamente. Os aminoácidos entre essas cisteínas variam muito entre as diferentes enzimas pertencentes a esta família, porém as Trx apresentam uma glicina e uma prolina. Esta região é altamente conservada e está presente no fim de uma α -hélice em todas as

Trx [79]. Nas imediações das cisteínas presentes no sítio ativo existem uma série de resíduos que podem desempenhar um papel na estabilização da cisteína N-terminal na forma desprotonada e, portanto, na forma mais reativa. Asp26, que é completamente conservado nas Trx está muito próximo a um resíduo carregado positivamente, a Lys57, com o qual pode formar uma ponte salina ou uma ponte de hidrogênio. A Lys57 é conservada apenas em Trx de células procarióticas, as Trx de mamíferos apresentam um resíduo altamente conservado de lisina na posição 39, que pode exercer o mesmo papel que o resíduo de Lys57 em células procarióticas. Próximo ao sítio ativo das Trx existe uma região hidrofóbica, que provavelmente está envolvida no reconhecimento molecular do substrato e em Trx de *E. coli* é formada por Gly33, Pro34, Ile74, Pro76 e Ala93, [80].

Figura 3. Mecanismo proposto para redução de dissulfetos em proteínas por tiorredoxina. (A) A proteína Trx possui as duas cisteínas do sítio ativo reduzidas, enquanto a proteína alvo encontra-se oxidada (com uma ponte dissulfeto). (B) O ataque nucleofílico da cisteína 32 da Trx resulta na formação de um dissulfeto misto entre a proteína e a proteína alvo. (C) Ocorre o ataque nucleofílico da cisteína 35 da Trx à ligação dissulfeto mista, resultando na Trx oxidada e a proteína alvo reduzida [81].

As tiorredoxinas A (TrxA) e C (TsnC) de *Xylella fastidiosa* são proteínas pequenas, de aproximadamente 12 kDa, com motivo CxxC relacionado à catálise de reações de troca tiól-dissulfeto [82]. Assim como a TrxA de *E. coli*, as proteínas TrxA e TsnC de *Xylella fastidiosa* possuem uma prolina conservada, que no caso de TrxA de *E. coli* está localizada no sítio ativo e é requerida para interação com o substrato peptídico [83]. Estas proteínas também apresentam um aspartato conservado, que precede em seis resíduos o motivo CxxC e tem sido relacionado com a abstração do próton da cisteína C-terminal, necessária para o ataque nucleofílico desta cisteína ao dissulfeto misto formado entre a cisteína N-terminal e a proteína alvo [84]. O motivo

CxxC e os aminoácidos Pro e Asp conservados, sugerem que os produtos das ORFs XF2698 (TsnC) e XF1199 (TrxA) de *Xylella fastidiosa* sejam proteínas com atividade de tiorredoxina.

Embora o papel das Trx na resposta ao estresse oxidativo seja bem definido, existe um grande número de proteínas que podem conter um ou mais domínios similares aos de Trx fundidos a vários outros domínios. Apesar da existência de uma grande quantidade dessas proteínas, as suas funções e estruturas ainda são pouco conhecidas [85]. A YbbN é uma proteína que possui um domínio de Trx e apresenta massa molecular de aproximadamente 31 kDa. Ela apresenta uma forte identidade de sequência com a região N-terminal das Trx TsnC e TrxA, o que equivale a 111 aminoácidos, porém essa proteína apresenta uma região C-terminal contendo 173 aminoácidos que possui função desconhecida. Apesar de sua extensa similaridade com as Trx, a YbbN não possui o motivo CxxC conservado no sítio ativo mas possui o motivo SxxC. Apesar de CxxC ser o motivo principal envolvido na formação, redução e isomerização de pontes dissulfídicas, motivos derivado como CxxS, SxxC, CxxT e TxxC, são amplamente encontrados em várias proteínas redox, incluindo as glutarredoxinas, arsenatos redutases, metionina sulfóxido redutase, peroxirredoxinas entre outras [86]. A YbbN de *E. coli* possui duas cisteínas redox em seu sítio ativo, a Cys38, presente no motivo SxxC e a Cys63 que fica próxima espacialmente da cisteína que está presente no motivo SxxC. YbbN interage fisiologicamente com múltiplos componentes da haloenzima DNA polimerase III e com as chaperonas DnaK e GroEL, o que sugere que esta proteína pode auxiliar a promover a conformação apropriada das proteínas envolvidas na replicação do DNA e resposta ao estresse oxidativo [87].

A alta homologia da região N-terminal do produto do gene ORF XF2174 (YbbN) de *Xylella fastidiosa* com as Trx de *E. coli*, sugere que ela possa ter uma atividade de Trx.

1.4.2 Proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp)

Peroxirredoxinas (Prxs) são peroxidases cisteíno-dependentes e são encontradas em quase todos os grupos taxonômicos. As Prxs convertem H_2O_2 em duas moléculas de H_2O , enquanto as catalases convertem H_2O_2 em H_2O e O_2 [88]. Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com a presença ou ausência de uma cisteína conservada adicional [89].

As Prxs que contêm duas cisteínas conservadas são chamadas de 2-Cys Prx, enquanto aquelas que possuem apenas uma cisteína conservada são chamadas de 1-Cys Prx. Em ambos os casos, a cisteína reativa, que está na forma desprotonada ataca o hidroperóxido e este é oxidado a ácido sulfênico. Esta cisteína que interage diretamente com os peróxidos está localizada na região N-terminal da proteína. Três classes de Prx podem ser encontradas com base na etapa seguinte do ciclo catalítico: 1-Cys Prx, 2-Cys Prx típica e 2-Cys Prx atípica. A primeira, 1-Cys Prx típica apresenta um mecanismo mais simples, ela é oxidada em um ácido sulfênico estável e em seguida reduzida por um agente redutor. Na 2-Cys Prx típica o ácido sulfênico reage com a segunda cisteína conservada de outra molécula de Prx formando uma ponte dissulfeto intermolecular. A 2-Cys Prx atípica forma pontes dissulfetos intramoleculares (Figura 4) [17].

Figura 4. Mecanismo catalítico da peroxirredoxinas. (A) Mecanismo característico das 1-Cys Prx (representado pela 1-Cys Prx humana; [90]). (B) Mecanismo característico das 2-Cys Prx típicas (representado pela Tsa1 de *S. cerevisiae*; [91]) (C) Mecanismo característico das 2 Cys Prx atípicas (representado pela PrxQ de *D. leneare*; [92]). Independente do mecanismo catalítico, a soma feral das reações parciais resulta na reação geral catalisada pelas peroxirredoxinas [17].

Em eucariontes as Prxs participam de complexos sistemas de regulação da sinalização celular, resistência ao tratamento com radiação e supressão tumoral. *E. coli* possui três subfamílias diferentes de Prx: AhpC (subfamília Prx1/AhpC), TPX (subfamília TPX) e a Bcp (proteína comigratória com bacterioferritina) [88].

As estruturas terciárias das Prxs são muito similares entre si. Com exceção da presença de inserções de elementos de estrutura secundária, todas possuem o enovelamento característico da superfamília das tioredoxinas [83]. Nas Prxs, o enovelamento Trx ainda contém uma extensão N-terminal, uma inserção entre a fita $\beta 1$ e hélice $\alpha 2$ e, nas Prx de classe 4, uma extensão C-terminal. Em geral, as Prxs possuem, no mínimo, sete fitas β e cinco hélices α (Figura 5) [17, 89].

A proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp) é uma tioredoxina que foi inicialmente encontrada em *E. coli* como uma proteína com massa molecular de 18 kDa que comigra com bacterioferritina em eletroforese em gel de poliacrilamida [93].

Figura 5. Estrutura da tiól peroxidase de *S. pneumoniae* (PDB ID: 1PSQ; Kniewel, et al., dados não publicados), representativo da estrutura de peroxirredoxinas. Em magenta, localização da cisteína peroxidásica.

A proteína Bcp está envolvida na resistência de *E. coli* à vários agentes oxidantes [94] e é superexpressa na bactéria fixadora de nitrogênio *Frankia sp.*, durante a formação da simbiose com a planta *Alnus glutinosa* [95]. Até pouco tempo, acreditava-se que o mecanismo de ação utilizado pela Bcp era o 1-Cys Prx com base em observações feitas nessa enzima de *E. coli*, porém através da aplicação de espectrometria de massa de alta resolução, a Bcp foi classificada como uma enzima 2-Cys Prx atípica, pois forma uma ponte dissulfeto intramolecular entre as duas cisteínas [96].

Devido à alta homologia com a Bcp de *E. coli* acredita-se que, o produto do gene XF0961 de *X. fastidiosa* seja uma Bcp com atividade semelhante à de *E. coli*.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo padronizar o processo de solubilização e renaturação das tiorredoxinas TsnC e TrxA, da proteína YbbN e da proteína comigratória com bacterioferritina (Bcp), todas de *X. fastidiosa*, a partir de agregados em CI utilizando altas pressões hidrostáticas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

- Agitador, modelo Ts-2000^a, Vertex.
- Aparelho Mili-Q Plus, purificador de água em sistema MilliQ (18Ω), Milipore.
- Autoclave, modelo 415, Fanem.
- Autoclave, modelo 12 LI/LA, Kavo.
- Banho Maria, modelo 100, Fanem.
- Balança analítica, modelo AW 220, Shimazu.
- Balança de precisão, modelo P1200, Mettler.
- Câmera fotográfica, modelo DMC-FX100, Lumix Panasonic.
- Centrífuga refrigeradora automática, modelo 5810R, Eppendorf.
- Centrífuga modelo, RC2-B, Sorvall Speed.
- Coluna HisTrap, GE Healthcare.
- Eletroporador, modelo II, Invitrogen.
- Espectrofotômetro, modelo Genesys 6, Thermo Scientific.
- Espectropolarímetro, Jasco J-715, Jasco Inc.
- Espectrofluorímetro modelo Cary Eclipse, Varian.
- Estufa para cultura bacteriana, modelo Q-316B, Quimis.
- Fluxo laminar, modelo 2256, Trox.
- Freezer -80 °C, modelo AL880 E, American Lab.
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421, Tecnal.

- Leitor de Elisa, modelo Zenyth 200 st, Antos Labtec Instruments GmbH.
- Microondas, LG.
- Microscópio eletrônico de varredura, modelo XL200, Phillips.
- Vaso de alta pressão modelo R4-6-40 e bomba modelo P40, High Pressure Equipment.
- Transiluminador, modelo Mocrouve, Hoefer.
- Seladora a vácuo, modelo TM 150, TecMaq.
- Sistema de Eletroforese horizontal, modelo EPS 500/400, Pharmacia Fine Chemicals.
- Sistema de Eletroforese vertical, modelo Tetra System, Bio-Rad.
- Sonicador, modelo 3000, Biologics.

3.1.2 Reagentes e soluções

- Ácido Acético Glacial, Merck
- Ácido Clorídrico, Merck
- Acrilamida, Reagen
- Agar, Difco
- Agarose, BioAgency
- Ampicilina, Bayer
- Bis-acrilamida, BioAgency
- Bis-ANS, Sigma-Aldrich
- Brometo de etídio, Bio Basic
- Casaaminoácidos, BD

- Cloreto de cálcio, Sigma-Aldrich
- Cloreto de sódio, Synth
- Comassie Blue G-250, Sigma-Aldrich
- Deoxicolato de sódio, Sigma-Aldrich
- DTNB, Sigma-Aldrich
- DPTA, Sigma-Aldrich
- DTT, Sigma-Aldrich
- EDTA, GE Healthcare
- Extrato de levedura, BD
- Glicerol, Serva
- Glicina, Sigma-Aldrich
- Glicose, Casa Americana
- Glutathionas reduzida e oxidada, Sigma-Aldrich
- Guanidina, Sigma-Aldrich
- Imidazol, Sigma-Aldrich
- Isopropil, β -D-tiogalactopiranosíde IPTG, Fermentas
- L-Arginina, Sigma-Aldrich
- Lisozima, Sigma-Aldrich
- NADPH, Sigma-Aldrich
- Padrão de peso molecular, GE Healthcare
- Persulfato de amônio, BioAgency
- PEG 600, Sigma-Aldrich

- Sacarose, In Lab
- SDS, Êxodo Científica
- Soroalbumina bovina, Sigma-Aldrich
- Sulfato de Magnésio, Synth
- Sulfato de Potássio, Synth
- Sulfato de Níquel, GE Healthcare
- Temed, BioAgency
- T-BHP, Sigma-Aldrich
- Triptona, Difco
- Tris, Vetec
- Triton X-100, Sigma-Aldrich
- Tubo de diálise, Sigma-Aldrich
- Tween-20, Merck

3.1.3 Linhagem bacteriana

Para a expressão das tiorredoxinas TrxA e TsnC, da proteína YbbN e da Bcp foi utilizado o plasmídeo pET15b contendo o respectivo cDNA. Os plasmídeos foram doados pelo Dr. Luis Eduardo Soares Netto, pesquisador do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo (IB-USP). A cepa de *E. coli* hospedeira utilizada para a expressão foi a BL-21(DE3).

3.2 Métodos

3.2.1 Transformação e expressão

As cepas BL21(DE3) de *E. coli* foram transformadas por eletroporação, seguindo protocolo descrito pelo fabricante do eletroporador (Invitrogen) e em seguida inoculadas em meio Ágar LB (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl), contendo o antibiótico ampicilina (100µg/ml). As culturas foram mantidas em estufa por 16 horas a 37 °C. Colônias foram aleatoriamente escolhidas e repicadas em 15 mL de meio LB ou em meio rico 2HKII [97], também contendo ampicilina e mantidas em incubadora a 37 °C com agitação de 150 rpm. Este volume foi então diluído em 250 mL de meio de cultura rico, em erlenmeyer de 1000 mL, contendo o antibiótico ampicilina e mantidas a 200 rpm a 37°C até atingirem a densidade ótica (D.O. _{600 nm}) entre 1,5 e 2,0 para o meio 2HKII e 0,5 para o meio LB. As culturas foram então ativadas pela adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em concentração final de 0,5 mM e incubadas às temperaturas de 20°C, 30°C ou 37°C e mesma rotação por mais 16 horas, no caso da cultura feita em meio 2HKII e por 3 horas na cultura feita em meio LB.

3.2.2 Lavagem dos CI

As suspensões contendo as bactérias foram centrifugadas a 2.500 g por 15 min, sendo descartado o sobrenadante. Os precipitados insolúveis foram ressuspensos em tampão de lise (0,1 M de Tris HCl pH 8,0 e 5 mM de EDTA). Foi adicionada lisozima em uma concentração final de 50 µg/mL e 0,1% de deoxicolato de sódio. As suspensões foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida foram sonicadas por 5 períodos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos a 60 Hz em banho de gelo. As suspensões foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 15 min, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados insolúveis foram ressuspensos em tampão de lavagem (0,1 M de Tris HCl pH 8,0, 5 mM de EDTA e 0,1% de deoxicolato de sódio). As suspensões foram sonicadas para homogeneização das suspensões. O procedimento de lavagem dos CI foi repetido mais uma vez. Após a lavagem com o este tampão, os CI foram lavados com o

tampão de renaturação (0,05 M de Tris HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA), este procedimento foi repetido por mais duas vezes.

Após o término das lavagens, os CI foram ressuspensos em tampão de renaturação e armazenados a -20 °C.

3.2.3 Renaturação

Os CI lavados foram diluídos em tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,0 e 1 mM de EDTA e as densidades ópticas a 350 nm das suspensões de CI foram determinadas em espectrofotômetro. Amostras de 2 mL de suspensão com 2 de densidade ótica foram colocadas em saquinhos plásticos que foram selados. Os saquinhos foram introduzidos em um único saco plástico maior, o qual foi selado a vácuo. Os sacos plásticos foram então colocados no vaso de pressão e submersos em uma mistura de água e óleo. O vaso foi fechado e pressurizado a 2,4 kbar por 16 horas utilizando um compressor de ar ligado a uma bomba capaz de injetar óleo no vaso de pressão à altas pressões. A descompressão das amostras foi realizada em degraus (0,4 kbar a cada 30 minutos), ou foram também utilizados patamares de pressão em que a pressurização a 2,4 kbar por 1,5 horas foi seguida de descompressão até 0,8, 0,4 e 0,2 kbar, condição na qual as amostras ficaram por 16 horas. Também foi testada a condição na qual as amostras ficaram por 1,5 horas em uma pressão de 2,4 kbar, seguida de descompressão direta e a amostra ficaram em pressão atmosférica por 16 horas. As amostras foram então retiradas dos sacos plásticos e centrifugadas a 12.000 g por 15 min para a remoção de agregados insolúveis. Os sobrenadantes foram dializados contra o tampão Tris HCl 0,05 M e centrifugados novamente para a remoção de agregados insolúveis que possam ter se formado durante o processo de diálise. Posteriormente as frações solúveis foram analisadas por SDS-PAGE, juntamente com o mesmo volume da suspensão de CI, utilizado para quantificação da porcentagem de solubilização.

3.2.4 Agentes solubilizantes e de óxido-redução

Com a finalidade de otimizarmos o protocolo de renaturação sob pressão, foram testados as seguintes condições:

- A presença de hidrocloreto de guanidina (GdnHCl) foi utilizado como agente solubilizante, em concentrações que variaram entre 0 e 6 M.

- Os reagentes glutathionas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram utilizados como par oxido/redutor. Foi variada a proporção de cada uma das glutathionas, sendo estas proporções de: 1:10; 1:5; 1:1; 5:1; 10:1, em concentração total de 10 mM.

3.2.5 Aditivos

Os aditivos testados foram: NaCl (0,15 M), L-Arginina (0,5 M), Triton X-100 (0,5 M), Glicose (1 M), Sacarose (1 M), PEG 6000 (0,1 %), Glicerol (2,5 M), Tween 20 (1 mM) e o Bis-ANS (10 vezes a concentração molar de cada proteína), no tampão de renaturação adequado.

3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi efetuada para observarmos se a quantidade e forma dos CI foi modificada durante o processo de renaturação, o que indicaria se eles foram solubilizados durante a pressurização. Foram feitas MEV dos CI e do precipitado remanescente após a pressurização. Os precipitados foram lavados com água destilada para que fosse retirado todo o Tris da solução tampão, pois este reagente forma cristais que interferem na visualização dos agregados. Após a lavagem das amostras insolúveis elas foram suspensas em 50 a 100 µL de água e foram aplicadas em porta-amostras para análise em microscopia eletrônica. As amostras foram secas em dessecador e em seguida foi aplicado banho de ouro a 38 mA por 120 segundos. As amostras foram visualizadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura.

3.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada com géis de poliacrilamida em concentrações de 15% para YbbN e 12 % para as demais proteínas, seguindo o protocolo de[98]. Os géis foram corados com Comassie Blue G-250.

A quantificação das proteínas de interesse na fração solúvel após tratamento em alta pressão foi realizada pela análise dos géis de eletroforese pela comparação com uma curva padrão de soroalbumina bovina (SBA) pura e a determinação da porcentagem de solubilização de cada amostra foi realizada pela comparação com a banda referente ao mesmo volume da suspensão de CI em condição redutora nos géis de eletroforese. Os géis corados foram então fotografados para determinação da porcentagem de proteínas na fração solúvel. A quantificação das bandas correspondentes à cada condição para cada proteína foi realizada pela análise de fotografias dos géis com o auxílio do programa Image J.

3.2.8 Purificação da tiorredoxina TsnC e da proteína YbbN

Amostras renaturadas de TsnC e YbbN foram submetidas à purificação em coluna HisTrap (GE Healthcare) de 1 mL carregada com Níquel (NiSO_4), pré-lavada com tampão TrisHCl 0,05 M, pH 8,0 contendo 0,5 M de NaCl. As amostras, no mesmo tampão, foram aplicadas na coluna de purificação. A resina foi lavada com 5 ml do mesmo tampão contendo 20 mM de imidazol para se retirar ligantes fracos ou proteínas que não se ligaram à matriz. Ambas as proteínas foram eluídas no mesmo tampão contendo 300 mM e 500 mM de imidazol. As amostras resultantes foram submetidas à análise de Bradford para quantificação.

3.2.9 Dicroísmo circular

A determinação da estrutura secundária da tiorredoxina TsnC e YbbN foi realizada através de dicroísmo circular em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Inc.). Foram utilizadas ambas as proteínas renaturadas pela alta pressão hidrostática e

purificadas na concentração de 20 μ M. Os espectros foram coletados entre os comprimentos de onda de 200 a 300 nm a 20°C utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico. Os dados da curva de elipticidade foram obtidos pela análise da média de três medidas e analisados pelo programa K2D.

3.2.10 Espalhamento de luz

A determinação do espalhamento de luz de suspensões de CI da proteína YbbN foi realizada no espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). A excitação das amostras foi realizada em 320 nm e as leituras foram realizadas em comprimentos de onda de 300 a 350 nm.

3.2.11 Determinação de atividade biológica das tiorredoxinas TrxA e TsnC e da proteína YbbN

A determinação da atividade biológica das tiorredoxinas TrxA e TsnC e da proteína YbbN foi feita pela determinação da atividade dissulfeto redutase pelo ensaio do DTNB. Este ensaio mede a redução do composto DTNB a TNB pelo sistema tiorredoxina/tiorredoxina redutase/NADPH, conforme descrito em Riddles e colaboradores [99]. Foram incubados 0,2 mM de NADPH, 0,5 mM de DTNB, 1 μ M de TrR, 20 mM de Tris HCl pH 8,0, 0,1 mM de DTPA e a respectiva proteína a ser analisada em concentração de 1 μ M. A redução de DTNB a TNB ($\epsilon_{412\text{ nm}} = 14150\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) foi iniciada pela adição de DTNB e acompanhada a 37°C. Este ensaio foi monitorado em leitor de placas em comprimento de onda de 412 nm em um volume de reação de 370 μ l. Como controle, amostras sem a adição das tiorredoxinas e da proteína YbbN foram utilizadas.

3.2.12 Determinação da atividade biológica da proteína YbbN inativada pela temperatura

Amostras contendo 2 μ M da proteína pura em tampão contendo Tris 0,05 M pH 8,0 ou em pH 11,0, na presença ou ausência de L-Arginina em pH 11,0, foram

incubadas por 30 minutos em diferentes temperaturas (20°C-100°C). Foi realizada a determinação da atividade biológica da proteína YbbN pela determinação da atividade dissulfeto redutase pelo ensaio do DTNB, como descrito anteriormente.

3.2.13 Determinação de atividade biológica da proteína Bcp

A atividade biológica desta proteína foi realizada pelo ensaio de determinação de atividade peroxidásica da proteína Bcp pelo ensaio de consumo de NADPH. O consumo de NADPH, ($\epsilon_{340\text{ nm}} = 6200\text{ M}^{-1}\cdot\text{Cm}^{-1}$) pelo sistema tioredoxina foi monitorado a 340 nm pelo decaimento da absorbância devido a oxidação a NADP^+ , conforme Chae e colaboradores [100]. A reação foi realizada a 37°C contendo 0,2 mM de NADPH, 0,5 mM de DTNB, 5 μM de TrR, 20 mM de Tris HCl em pH 8,0, 1 μM de TsnC, 200 μM de T-BHP e Bcp em concentração de 1 μM , em um volume de reação de 370 μl . A reação foi iniciada pela adição de hidroperóxido (T-BHP) e a atividade peroxidásica foi monitorada a 340 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TsnC

4.1.1 Expressão em diferentes meios de cultura da tiorredoxina TsnC

Com a finalidade de verificarmos qual o meio de cultura mais adequado para a produção da TsnC recombinante, foram realizadas culturas das bactérias transformadas em diferentes meios de cultura. A tiorredoxina TsnC foi expressa nos meios de cultura LB, um meio relativamente rico e no meio muito rico 2KHII. Para a quantificação de TsnC produzida pelas bactérias transformadas, um volume de bactérias correspondente a 0,1 de densidades ópticas (medidas em 350 nm) em condições redutoras foram aplicados em gel de eletroforese de poliacrilamida para cada condição. Quando a mesma quantidade de bactérias hospedeiras foi analisada em gel de eletroforese, maior concentração de TsnC foi obtida no meio mais pobre (Figura 6). Porém, levando em consideração que quando em meio 2HKII, o crescimento bacteriano foi 3,9 vezes maior, optamos por utilizar este meio para a produção de CI de TsnC.

Figura 6. Produção de tiorredoxina TsnC (12,5 kDa) em *E. coli* cultivadas nos meios de cultura LB e 2HK2. M: marcador de massa molecular; N: bactérias não induzidas; A: bactérias induzidas.

4.1.2 Expressão da tiorredoxina TsnC em diferentes temperaturas

A literatura sugere que a produção de CI recombinantes produzidos em temperaturas brandas promove a formação de agregados menos estáveis, pois esta condição favorece interações intramoleculares nativas à custa de contatos intermoleculares do que quando as proteínas são expressas em temperaturas maiores [101]. A renaturação de CI produzidos em *E. coli* cultivadas em baixas temperaturas produz agregados menos densos e com proteínas apresentando estruturas mais similares às nativas [102].

Com o objetivo de determinarmos a temperatura de cultivo mais adequada para obtermos a TsnC em CI, realizamos experimentos de cultivo em diferentes temperaturas. Nas figuras 7 e 8, pode-se observar a TsnC nas frações solúvel e insolúvel produzidas pelas bactérias cultivadas nas temperaturas de 20°C, 30°C e 37°C. Nota-se que quando cultivadas a 20°C as bactérias hospedeiras produzem TsnC em maior quantidade na fração solúvel, de acordo com o que já havia sido descrito na literatura [81]. Porém nas temperaturas de 30°C e 37°C, a TsnC foi produzida em maior quantidade de forma insolúvel. Optamos por produzir a TsnC à temperatura de 30°C, pois a literatura indica que os agregados protéicos produzidos nesta temperatura sejam mais facilmente desagregados do que aqueles produzidos a 37°C.

Figura 7. Produção de tiorredoxina TsnC (12,5 kDa) em *E.coli* cultivadas em meio 2HKII em diferentes temperaturas. M: marcador de massa molecular; N: bactérias não induzidas; A: bactérias induzidas.

Figura 8. Produção de tioredoxina TsnC (12,5 kDa) em *E.coli* cultivadas em meio 2HKII em diferentes temperaturas. M: marcador de massa molecular; T: amostra total; I: fração insolúvel; S: fração solúvel.

4.1.3 Renaturação da tioredoxina TsnC na presença de diferentes proporções do par redox (GSH/GSSG)

A ação da alta pressão não é capaz de romper as pontes dissulfídicas que fazem ligações cruzadas covalentes intermoleculares em agregados protéicos. Assim sendo, nos casos de polipeptídeos contendo pontes dissulfeto, um par óxido-redutor pode ser incluído nas soluções de renaturação de modo a facilitar a quebra das ligações dissulfídicas inter-moleculares e formação de pontes dissulfídicas nativas [48].

Com o intuito de padronizar as condições de renaturação da TsnC primeiramente procuramos aperfeiçoar o tampão utilizado no processo de renaturação sob alta pressão. Para tanto, utilizamos o tampão básico (Tris HCl 0,05 M, contendo EDTA 1 mM, pH 8,0) e as condições de pressão (2,4 kbar durante 16 horas) já descritas em artigo anterior do nosso grupo para outra proteína [52]. Foi feita uma curva para padronizar as proporções de glutatona reduzida e oxidada utilizadas na renaturação da TsnC. Todas as amostras foram pressurizadas a 2,4 Kbar por 16 horas e a descompressão foi realizada em degraus de 0,4 Kbar a cada 30 minutos. Foi utilizada uma concentração final de par redox de 10 mM e uma concentração de GdnHCl de 1,5 M. As figuras 9A e 9B mostram o rendimento de proteína solúvel que foi obtida após a pressurização e diálise e a atividade biológica da proteína solúvel, respectivamente para cada condição utilizada. Maior concentração do reagente redutor do que do oxidante é necessária para a

renaturação de TsnC. Alta atividade biológica foi obtida na condição de 10 de GSH : 1 de GSSG e portanto essa condição foi utilizada nos ensaios subsequentes.

Figura 9. Efeito da presença de diferentes proporções de GSH/GSSG na solubilização e atividade biológica da TsnC obtida por tratamento de uma suspensão de CI em alta pressão. A.: Determinação das porcentagens de obtenção de TsnC solúvel após compressão das suspensões de CI na presença de diferentes proporções de glutatona reduzida (GSH)/oxidada (GSSG) em concentração de 10 mM e após diálise; B.: Determinação da atividade biológica das amostras de TsnC obtidas como descrito na figura 9A na concentração de 1 μ M. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA e 1,5 M de GdnHCl.

4.1.4 Renaturação da tiorredoxina TsnC na presença de diferentes concentrações de GdnHCl

Durante o processo de renaturação, a solubilização da proteína de interesse pode ser obtida através da adição de altas concentrações de agentes caotrópicos como a uréia e a GdnHCl. Foi demonstrado que pontes de hidrogênio não nativas entre moléculas nos agregados, as quais são insensíveis à aplicação de pressão, interferem com a dissolução induzida pela pressão e que a presença de GdnHCl ou uréia em baixas concentrações podem auxiliar a romper essas pontes e permitir a dissolução dos agregados insolúveis de forma relativamente branda [11]. Com a finalidade de otimizarmos a concentração de GdnHCl necessária para favorecer a dissociação dos agregados e renaturação de TsnC, foram realizados experimentos utilizando o tampão de renaturação contendo diferentes concentrações de GdnHCl.

Todas as amostras foram pressurizadas a 2,4 Kbar por 16 horas e a descompressão foi realizada em degraus de 0,4 Kbar a cada 30 minutos. Foi utilizada uma concentração final de par redox de 10 mM e uma concentração de GdnHCl de 1,5 M. As figuras 10A e 10B mostram o rendimento de proteína solúvel que foi obtida após a pressurização e diálise e a atividade biológica, respectivamente. Devido ao fato de altas pressões favorecerem a desagregação de proteínas, no caso de renaturação nessas condições foi necessária a utilização de concentrações de GdnHCl abaixo daquelas normalmente utilizadas para a solubilização de CI em pressão atmosférica. Maior concentração de TsnC solúvel após diálise e com alta atividade biológica foi obtida na condição de 0,75M GdnHCl e portanto, esta condição foi utilizada no ensaio subsequente. A presença de 2M de GdnHCl durante a compressão elevou o rendimento de TsnC solúvel, mas a atividade enzimática desta proteína foi baixa. A presença de quantidades ainda mais elevadas de GdnHCl (4 e 6M) baixaram o rendimento de solubilização proteica, fato que provavelmente se deve à elevação da taxa de reagregação da TsnC, mais desenovelada e com maior exposição de regiões hidrofóbicas, durante a diálise para retirada do agente desnaturante.

Figura 10. Efeito da presença de diferentes concentrações de GdnHCl na solubilização e atividade biológica da TsnC obtida por tratamento de uma suspensão de CI em alta pressão A: Determinação das porcentagens de TsnC solúvel após compressão das suspensões de CI na presença de diferentes concentrações de Gdn HCl e diálise da fração solúvel . B: Determinação da atividade biológica da TsnC em concentração de 1 mM após compressão e diálise na presença de diferentes concentrações de Gdn. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA e 10 mM do par redox (10 GSH: 1 GSSG).

4.1.5 Renaturação da tiorredoxina TsnC na presença de diferentes aditivos

O problema mais frequente encontrado durante a renaturação de proteínas é a reagregação das proteínas devido à interação entre domínios hidrofóbicos e a formação de pontes dissulfídicas intermoleculares. Sabe-se que a presença de compostos de baixo peso molecular (açúcares, polióis, sais, aminoácidos, etc) pode influenciar a estabilidade de uma proteína durante a renaturação proteica [103-106]. Aditivos que suprimem a reagregação (chamados de co-solutos, co-solventes e excipientes) têm sido amplamente utilizados na produção, purificação e formulação e eles ainda são a opção mais viável [104, 107, 108]. Alguns tipos de açúcares e polióis (por exemplo, sacarose, glicose, trealose, glicerol, etc) em combinação com outros componentes que influenciam na estabilidade da proteína, tais como: tampões, sais e agentes tensoativos, são utilizados para inibir a agregação [104]. No entanto, não existem aditivos universais que sejam eficazes para impedir reagregação e promover a renaturação de todas as proteínas [109].

Com a finalidade de testarmos a utilidade de utilização deste tipo de reagentes que podem aumentar a solubilidade ou elevar o correto enovelamento proteico, foram realizados ensaios de compressão na presença de alguns aditivos já relatados na literatura. As figuras 11A e 11B, representam respectivamente a quantidade solúvel e a atividade biológica de TsnC, após serem submetidas a uma pressão de 2,4 Kbar por 16 horas e descompressão em degraus na presença de diferentes aditivos no tampão de renaturação. Apesar de a amostra que continha o reagente PEG ter um rendimento de proteína solúvel considerável e uma atividade biológica maior que a amostra que continha o reagente Triton, que é um surfactante capaz de minimizar as interações hidrofóbicas proteína- proteína, que podem levar a agregação [110], decidimos utilizar este reagente, pois a porcentagem de proteína solúvel da TsnC foi elevada na presença do aditivo Triton quando comparada com a TsnC renaturada sob pressão na presença dos outros aditivos. Houve uma elevação da atividade biológica desta tiorredoxina na presença desse mesmo aditivo quando comparado à amostra controle.

Figura 11. Efeito da presença de diferentes aditivos na solubilização e atividade biológica da TsnC obtida por tratamento de uma suspensão de CI em alta pressão A: Determinação das porcentagens de TsnC solúvel após compressão das suspensões de CI na presença de diferentes aditivos e diálise da fração solúvel. B: Determinação da atividade biológica da TsnC em concentração de 1 mM após compressão e diálise na presença de diferentes aditivos. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA e 0,75 M de GdnHCl.

4.1.6 Renaturação da tioredoxina TsnC utilizando diferentes esquemas de descompressão

Alguns autores citam que a renaturação de proteínas monoméricas ocorre durante a incubação por períodos longos (16-125 horas) a pressões, entre 1,5 a 2,5 KBar e sugerem que a dissociação e a renaturação ocorrem concomitantemente no mesmo nível de pressão [11, 46-49, 51]. No entanto, foi demonstrado pelo nosso grupo que, apesar de pressões entre 1,5-2,5 KBar se mostrarem eficazes para dissociação de agregados em CI, pressões entre 0,35 a 0,69 KBar se mostraram mais eficazes para a renaturação da proteína monomérica Green fluorescent protein (GFP) do que a incubação em pressões mais elevadas [21].

Fizemos um estudo no qual as suspensões de CI foram comprimidas e mantidas durante 16 horas a 2,4 Kbar e descomprimidas diretamente ou em degraus de 0,4 Kbar. Em outro esquema as amostras foram mantidas a 2,4 kbar por 90 minutos e em pressões menores, indicadas nas figuras 12A e 12B, durante 16

horas. A amostra que foi mantida a 2,4 KBar por uma hora e meia, foi despressurizada diretamente e ficou em pressão atmosférica por 16 horas apresentou bom rendimento de proteína solúvel e também alta atividade biológica, possivelmente porque a renaturação de TsnC ocorre em nível baixo de pressão (Figuras 12A e 12B). Esta amostra apresentou rendimentos de solubilização e de atividade biológica levemente mais elevados do que as amostras incubadas por 16 horas a 2,4 kbar e descomprimidas diretamente a 1 bar. A incubação por 16 horas nas pressões intermediárias de 0,8, 0,4 ou 0,2 kbar não apresentaram bons resultados de solubilização ou de atividade biológica da proteína solúvel.

Figura 12. Efeito da condição de descompressão na solubilização e atividade biológica da TsnC obtida por tratamento de uma suspensão de CI em alta pressão. A.: Determinação das porcentagens de TsnC solúvel após compressão das suspensões de CI e diálise da fração solúvel. B.: Determinação da atividade biológica da TsnC em concentração de 1 μ M após compressão e diálise. As amostras identificadas como “2,4 Kbar” e “descompressão em degraus” ficaram em 2,4 Kbar por 16 horas. A amostra indicada como “2,4 Kbar” foi descomprimida de forma direta até pressão atmosférica e a amostra identificada “descompressão em degraus” foi descomprimida de 0,4 Kbar a cada 30 minutos. Todas as outras amostras ficaram por 90 minutos em 2,4 Kbar e foram descomprimidas até a pressão indicada nas figuras, condição em que foram mantidas por 16 horas antes da descompressão até 1 bar. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA, 10 mM do par redox (10 GSH: 1 GSSG) e o aditivo Triton.

4.1.7 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) dos CI da tiorredoxina TsnC

As figuras 13A e 13B mostram fotografias em microscopia eletrônica de varredura dos CI (Figura 13A) e da fração de CI de TsnC que permaneceu insolúvel após ter sido submetida ao processo de compressão (Figura 13B). Nestas figuras pode-se observar que os agregados formados após a pressurização estão em menor quantidade e que eles possuem tamanhos muito menores do que os CI não submetidos à alta pressão. Os resultados sugerem que os agregados restantes foram parcialmente solubilizados ou alternativamente que eles são resultantes da reagregação proteica.

Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura (MEV). A.: CI de TsnC; B.: fração insolúvel da suspensão de CI após tratamento sob alta pressão. Foi usado um aumento de 15000X. A barra indica um tamanho de 2 μ m.

4.1.8 Dicroísmo circular

A presença de estrutura secundária ordenada foi determinada por dicroísmo circular (CD). Esta técnica é baseada no fato de que as moléculas com centros assimétricos (quirais) absorvem de forma diferente a luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda, promovendo um desvio no ângulo da polarização da luz incidente (elipticidade), que é medido pelo polarímetro. Os cromóforos que originam os espectros de CD em peptídeos e proteínas são as ligações amida, os resíduos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) e as pontes de dissulfeto [111].

A presença de estrutura secundária ordenada foi determinada por dicroísmo circular. A tioredoxina TsnC purificada apresentou espectros típicos de proteínas com estrutura secundária regular, indicando que possuem integridade estrutural (Figura 14). A análise do espectro indicou que a proteína possui 12% de α -hélice e 40 % de folhas β , o que é compatível com a estrutura descrita para a TsnC.

Figura 14. Análise da estrutura secundária da tioredoxina TsnC por dicroísmo circular. Os espectros foram obtidos em tampão Tris 0,05 M pH 8,0 no intervalo de comprimento de onda (λ) de 200 a 300 nm, e expressos em termos de elipsidade molar residual $[\theta]$. Foram efetuadas três medidas de cada amostra para obtenção da média dos valores.

Após otimização do processo de renaturação da proteína, foi obtida TsnC solúvel e com atividade biológica. O rendimento obtido foi muito alto, chegando a 89,9% de TsnC solúvel e com atividade biológica a partir de CI, enquanto o rendimento das suspensões de CI nas mesmas condições de tampão foram mantidas em pressão atmosférica, apresentaram somente a 4%.

4.2 YbbN

4.2.1 Expressão da proteína YbbN em diferentes meios de cultura

A Figura 15 mostra um gel de eletroforese no qual foram aplicadas a mesma quantidade de bactérias cultivadas em meio LB ou 2HK2 e ativadas com IPTG. Maior quantidade de proteína YbbN foi produzida por bactérias cultivadas no meio de cultura 2HKII quando comparada à produção de proteína em LB. Além disso, a densidade ótica a 350 nm da cultura em meio 2HK2 foi 4,2 vezes maior do que no meio LB, indicando um crescimento bacteriano maior no meio muito rico. Por isto o meio 2HK2 foi escolhido para os ensaios posteriores.

Figura 15. Produção de YbbN (37,2 kDa) em *E. coli* cultivadas nos meios de cultura LB e 2HK2. M: marcador de massa molecular; N: bactérias não induzidas; A: bactérias induzidas.

4.2.2 Expressão da proteína YbbN em diferentes temperaturas

A utilização de baixas temperaturas de cultivo em bactérias *E. coli* frequentemente resulta na produção de proteínas recombinantes solúveis no citoplasma bacteriano geralmente apresentando um certo grau de atividade biológica. No entanto, algumas proteínas continuam sendo expressas como agregados insolúveis [112].

A proteína YbbN, independentemente da temperatura de cultivo das bactérias hospedeiras, é expressa preponderantemente na forma insolúvel (Figuras 16 e 17). A temperatura de 30°C foi escolhida para os ensaios posteriores, pelo fato de que nesta condição houve a produção de maiores níveis de YbbN como CI.

Figura 16. Produção de YbbN (37,2 kDa) em *E. coli* cultivadas em meio 2HKII em diferentes temperaturas. M: marcador de massa molecular; N: bactéria não induzida; A: bactéria induzida.

Figura 17. Produção de YbbN (37,2 kDa) em *E. coli* cultivadas em meio 2HKII mostrando suas frações solúveis e insolúveis em diferentes temperaturas. M: marcador de massa molecular; T: amostra total; I: fração insolúvel; S: fração solúvel.

4.2.3 Renaturação da proteína YbbN na presença de diferentes proporções do par redox (GSH/GSSG)

Foi realizado um ensaio de padronização das proporções de glutatona reduzida e oxidada, assim como no caso da tioredoxina TsnC. A figura 18A apresenta a determinação da porcentagem da proteína YbbN solúvel, após pressurização na presença de diferentes proporções do par óxido-redutor e diálise. Na figura 18B, vemos a atividade biológica apresentada pelas amostras de YbbN. A condição escolhida para os ensaios subsequentes foi aquela na ausência do par redox, pois nesta condição se obteve um maior rendimento de proteína com atividade enzimática.

Figura 18. Efeito da presença de diferentes proporções de GSH/GSSG na solubilização e atividade biológica da YbbN obtida por tratamento de uma suspensão de CI em alta pressão. A.: Determinação das porcentagens de obtenção de YbbN solúvel após compressão das suspensões de CI na presença de diferentes proporções de glutatona reduzida (GSH)/oxidada (GSSG) em concentração de 10 mM e após diálise; B.: Determinação da atividade biológica das amostras de YbbN obtidas como descrito na figura 17A na concentração de 1 μ M. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA e 1,5 M de GdnHCl.

4.2.4 Renaturação da proteína YbbN na presença de diferentes concentrações de GdnHCl

Nas figuras 19A e 19B, pode-se verificar os dados obtidos na padronização das concentrações de GdnHCl utilizadas no processo de renaturação da YbbN. O gráfico da figura 18A representa a porcentagem proteína YbbN que foi solubilizada pela aplicação de alta pressão e o gráfico da figura 19B, a atividade biológica das amostras testadas. Apesar de ter sido obtido um rendimento maior de YbbN solúvel e ainda apresentando atividade biológica (Figura 19B) na condição em que se utilizou 6 M de GdnHCl, optou-se por utilizar uma concentração de 1 M de Gdn HCl pelo fato de ser uma condição mais branda de solubilização.

Figura 19. Efeito da presença de diferentes concentrações de GdnHCl na solubilização e atividade biológica da YbbN obtida por tratamento de uma suspensão de CI em alta pressão A: Determinação das porcentagens de YbbN solúvel após compressão das suspensões de CI na presença de diferentes concentrações de Gdn HCl e diálise da fração solúvel . B: Determinação da atividade biológica da YbbN em concentração de 1 μ M após compressão e diálise na presença de diferentes concentrações de Gdn HCl. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA.

4.2.5 Renaturação da proteína YbbN na presença de diferentes aditivos

Neste ensaio as amostras contendo os CI foram submetidas à alta pressão hidrostática contendo em seu tampão alguns aditivos.

Entre os vários aditivos descritos, o mais utilizado é a L-Arginina. Este é um aminoácido que apresenta carga positiva, com um ponto isoelétrico elevado de 10,76 [113]. L-Arginina contém um grupo guanidina positivamente carregado similar ao do GdnHCl. Este aminoácido pode auxiliar na solubilização dos agregados, podendo apresentar efeito mais pronunciado do que o do GdnHCl em concentração de até 2M [114] [115].

Devido à eficácia na inibição da interação proteína-proteína, a L-Arginina tem sido aplicada universalmente para auxiliar na renaturação de diversas proteínas, como a lisozima [116, 117], caseína quinase II [118], neurotrofinas recombinantes humanas [119], interleucina-21 [120], imunotoxinas recombinantes [121], fragmentos de Fab-recombinante [122] e ativadores de plaminogênio humano [123]. Aparentemente sua ação na estabilização ou solubilização de agregados independe do tamanho e ponto isoelétrico das proteínas [124].

Os mecanismos de ação da L arginina que foram destacados nos últimos 20 anos ainda não estão completamente elucidados. Três possíveis mecanismos têm sido propostos: (1) A arginina pode interagir favoravelmente com a maioria das cadeias laterais de aminoácidos de modo a reduzir as pontes de hidrogênio, as interações iônicas e interações hidrofóbicas [125]. (2) Possivelmente, a L-Arginina aumenta seletivamente a energia livre de complexos proteína-proteína e retarda as associações de proteínas, mas apresentando pouco efeito sobre a taxa de renaturação proteica [126] e (3) É provável que a arginina aumente a estabilidade e solubilidade de proteínas desnaturadas e estados intermediários, desfavorecendo a reagregação [127].

Foi obtida elevação nos rendimentos de solubilização de YbbN nas amostras submetidas à alta pressão na presença de sacarose, de glicerol, de Triton X-100, Tween e de L-arginina na ausência de GdnHCl em relação à amostra controle na ausência de aditivos (Figura 20A e 20B). No entanto, a amostra na qual se obteve YbbN com maior rendimento e alta atividade biológica foi aquela submetida à alta

pressão na presença de L-Arginina e na ausência de GdnHCl (Figura 20).

Figura 20. Efeito da presença de diferentes aditivos na solubilização e atividade biológica da YbbN obtida por tratamento de uma suspensão de CI em alta pressão A: Determinação das porcentagens de YbbN solúvel após compressão das suspensões de CI na presença de diferentes aditivos e diálise da fração solúvel. B: Determinação da atividade biológica da YbbN em concentração de 1 mM após compressão e diálise na presença de diferentes aditivos. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA e 1 M de GdnHCl.

Como descrito na literatura, a concentração de L-Arginina pode influenciar no rendimento de renaturação proteica, como demonstraram os estudos com as proteínas Anidrase Carbonica Bovina (CAB), com um Fator estimulador de colônia humano recombinante (rhG-CSF), com a Green fluorescence protein (GFP) [124] e com os hormônios de crescimento de camundongo e de porco [128].

A presença de L-Arginina na concentração de 0,5M elevou em 3 vezes o rendimento de solubilização de YbbN (Figura 21A), o que indica uma ação significativa deste aminoácido na solubilização dos agregados. A variação de atividade biológica da YbbN foi pequena entre as amostras submetidas à compressão na presença ou na ausência deste aminoácido (Figura 21B). Escolhemos a concentração de 0,5 M de L-Arginina, pois nesta condição foi alto o rendimento de renaturação de YbbN pela ação de alta pressão.

Figura 21. Efeito da presença de diferentes concentrações de L-Arginina na solubilização e atividade biológica da YbbN obtida por tratamento de uma suspensão de CI em alta pressão A: Determinação das porcentagens de YbbN solúvel após compressão das suspensões de CI na presença de diferentes concentrações de L-Arginina e diálise da fração solúvel . B: Determinação da atividade biológica da YbbN em concentração de 1 μ M após compressão e diálise na presença de diferentes concentrações de L-Arginina. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA.

4.2.6 Renaturação da proteína YbbN utilizando diferentes esquemas de descompressão

A diferença entre os rendimentos de YbbN solúvel obtidos a partir das suspensões de CI tratados com os diferentes esquemas de compressão e descompressão foi pequena. No entanto, a amostra mantida por 16 horas em pressão atmosférica foi aquela na qual se obteve o melhor rendimento de YbbN (Figura 22A). A atividade enzimática obtida nesta condição também foi boa (Figura 22B) e portanto, a condição escolhida foi a de pressurização em 2,4 KBar por uma hora e meia, descompressão direta e incubação por 16 horas em pressão atmosférica.

Figura 22. Efeito da condição de descompressão na solubilização e atividade biológica da YbbN obtida por tratamento de uma suspensão de CI em alta pressão. A.: Determinação das porcentagens de YbbN solúvel após compressão das suspensões de CI e diálise da fração solúvel. B.: Determinação da atividade biológica da YbbN em concentração de 1 μ M após compressão e diálise. As amostras identificadas como “2,4 Kbar” e “descompressão em degraus” ficaram em 2,4 Kbar por 16 horas. A amostra indicada como “2,4 Kbar” foi descomprimida de forma direta até pressão atmosférica e a amostra identificada “descompressão em degraus” foi descomprimida de 0,4 Kbar a cada 30 minutos. Todas as outras amostras ficaram por 90 minutos em 2,4 Kbar e foram descomprimidas até a pressão indicada nas figuras, condição em que foram mantidas por 16 horas antes da descompressão até 1 bar. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA e 0,5 M de L -Arginina.

4.2.7 Dissociação dos CI sob pressão

A associação da utilização de alta pressão hidrostática na presença da arginina, duas metodologias suaves de solubilização de proteínas agregadas, foi muito eficiente para a renaturação da YbbN, mostrando-se complementares. Devido ao fato de que a presença de arginina mostrou eficácia para elevar os rendimentos de renaturação de Ybbn e também de outras proteínas em estudo pelo nosso grupo, resolvemos estudar melhor a ação deste aminoácido na solubilização dos CI de Ybbn sob alta pressão, em comparação com a ação do GdnHCl. A aplicação de pressão crescente a uma suspensão de CI ocasionou a queda nas leituras de espalhamento de luz visível (320nm), que indica a solubilização dos agregados

(Figura 23). A presença de arginina na concentração de 0,5 M ocasionou uma maior solubilização dos CI do que a observada na ausência do aminoácido e com valores de espalhamento de luz semelhantes àqueles detectados na presença de 1M de GdnHCl. Os valores de espalhamento de luz da suspensão na presença do tampão no mesmo pH que a solução de arginina (pH 11,0) foram similares aos valores obtidos na presença de TrisHCl 0,05 M, pH 8,0, o que indica que a ação sobre a solubilização dos agregados se deve à arginina em pH muito alcalino e não somente ao efeito do pH extremo. Esses dados indicam que a arginina na concentração de 0,5M tem efeito elevando a dissociação dos CI exercida pela alta pressão, corroborando os resultados obtidos na Figura 21A.

Figura 23. Determinação do espalhamento de luz da proteína YbbN pura, na concentração de 2)μM, na presença ou ausência de L-Arginina e GdnHCl e em tampões Tris 0,05 M com diferentes pHs. Tampão: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 e 11,0, L-Arginina 0,5 M pH 8,0 e 11,0 e GdnHCl 1 M.

4.2.8 Atividade biológica da proteína YbbN incubadas em diferentes temperaturas

Os dados da literatura sobre a ação da arginina são conflitantes e por este motivo, com a finalidade de verificarmos se a arginina apresenta efeito desnaturante ou protetor sobre a YbbN, resolvemos também verificar a ação deste aminoácido na inativação de sua atividade enzimática promovidas pela temperatura. Para estes ensaios foi utilizada YbbN nativa e purificada.

A incubação da YbbN por 30 minutos em temperaturas crescentes promoveu a queda nos valores de atividade enzimática. No entanto, a presença de arginina teve efeito altamente protetor na inativação da atividade da YbbN promovida pela incubação a temperaturas acima de 40°C (Figura 24). A proteína que foi incubada por 30 minutos na presença de L-Arginina a 100°C ainda apresentou uma atividade de aproximadamente 30%.

Assim, demonstramos que a presença de arginina tem efeito de dissociação dos agregados de CI que se soma ao da alta pressão e, além disso, apresenta efeito protetor sobre a desnaturação da YbbN. Por estes motivos, é possível que a aplicação de alta pressão associada à presença de arginina possa ser amplamente utilizada em processos de renaturação a fim de elevar os rendimentos de obtenção de proteínas solúveis e nativas a partir de agregados, substituindo a utilização de GdnHCl.

Figura 24. Determinação da atividade biológica da YbbN pura na concentração de 2 μ M, incubada em diferentes temperaturas, na presença ou ausência de L-Arginina. Tampão: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 e L-Arginina 0,5 M.

4.2.9 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) da proteína YbbN

A comparação dos CI de YbbN (Figura 25A) com a fração insolúvel da suspensão submetida à alta pressão (Figura 25B), indica que houve mudança na quantidade e morfologia dos agregados proteicos, demonstrando que houve uma alta taxa de desagregação pela pressurização da suspensão.

Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de agregados insolúveis. A: CI não submetidos à pressurização; B: fração insolúvel das amostras submetidas à pressurização.

4.2.10 Dicroísmo circular

A presença de estrutura secundária foi determinada por dicroísmo circular. A proteína YbbN purificada apresentou espectros típicos de proteínas com estrutura secundária regular, indicando que possuem integridade estrutural (Figura 26). A análise do espectro indicou que a proteína possui 43% de α -hélice e 16 % de folhas β , o que é compatível com a estrutura descrita para a YbbN de *E. coli*.

Figura 26. Análise da estrutura secundária da proteína YbbN por dicroísmo circular. Os espectros foram obtidos em tampão Tris 0,05 M pH 8,0 no intervalo de comprimento de onda (λ) de 200 a 300 nm, e expressos em termos de elipsidade molar residual $[\theta]$. Foram efetuadas três medidas de cada amostra para obtenção da média dos valores.

Os rendimentos de renaturação da YbbN foram de 98%, enquanto as suspensões de CI nas mesmas condições de tampão foram mantidas em pressão atmosférica, apresentaram um rendimento de proteína solúvel de apenas 11,3%.

4.3 TrxA

4.3.1 Expressão da tiorredoxina TrxA em diferentes meios de cultura

A figura 27 mostra que houve uma expressão de TrxA muito mais elevada pelas bactérias cultivadas no meio mais rico. Além disso, a tiorredoxina TrxA apresentou um crescimento bacteriano 3,6 vezes maior em meio 2HKII quando comparado ao meio LB, por isso optamos por utilizar o meio 2HKII para o cultivo bacteriano e expressão da proteína recombinante.

Figura 27. Produção de TrxA (11,9 kDa) por *E. coli* cultivadas nos meios de cultura LB e 2HK2. M: marcador de massa molecular; N: bactérias não induzidas; A: bactérias induzidas.

4.3.2 Expressão da tiorredoxina TrxA em diferentes temperaturas

Realizamos experimentos de cultivo das bactérias transformadas com o plasmídeo de expressão do gene da TrxA em diferentes temperaturas. Nas figuras 28 e 29, pode-se observar a produção de TrxA pelas bactérias cultivadas nas temperaturas de 20°C, 30°C e 37°C e suas frações solúvel e insolúvel. A temperatura escolhida para produção desta tiorredoxina foi a de 30°C.

Figura 28. Produção de tiorredoxina TrxA (11,9 kDa) em *E.coli* cultivadas em meio 2HKII em diferentes temperaturas. M: marcador de massa molecular; N: bactérias não induzidas; A: bactérias induzidas.

Figura 29. Produção de TrxA (11,9 kDa) por *E.coli* cultivada em meio 2HKII mostrando suas frações solúveis e insolúveis em diferentes temperaturas. M: marcador de massa molecular; T: amostra total; I: fração insolúvel; S: fração solúvel.

4.3.3 Renaturação da tiorredoxina TrxA na presença de diferentes proporções do par redox (GSH/GSSG)

Fizemos um ensaio para verificar qual a proporção de glutatona reduzida e oxidada seria ideal para otimização do processo de renaturação da TrxA. Todas as amostras foram pressurizadas a 2,4 Kbar por 16 horas e a descompressão foi realizada em degraus de 0,4 Kbar a cada 30 minutos. Foi utilizada uma

concentração final de par redox de 10 mM e uma concentração de GdnHCl de 1,5 M. Apesar de conseguirmos obter TrxA na sua forma solúvel (Figura 30), não foi possível obter a atividade biológica dessa tiorredoxina. Existe a possibilidade de que a tiorredoxina redutase (Trr), produzida em laboratório, utilizada na reação estivesse com uma baixa atividade, prejudicando o ensaio de determinação da atividade biológica da TrxA. A tiorredoxina TrxA apesar de solúvel, também pode estar na conformação incorreta, o que explicaria a ausência de atividade enzimática. Devido aos resultados pouco promissores, decidimos por não continuar os estudos de renaturação da proteína TrxA.

Figura 30. Determinação das porcentagens de obtenção de TrxA solúvel após compressão das suspensões de CI na presença de diferentes proporções de glutatona reduzida (GSH)/oxidada (GSSG) em concentração de 10 mM e após diálise. Tampão de renaturação: TrisHCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA e 1,5 M de GdnHCl.

4.4 Bcp

4.4.1 Expressão da proteína Bcp em diferentes meios de cultura

Foi testada a expressão da proteína Bcp em diferentes meios de cultura (LB e 2HKII), a fim de verificar qual o mais apropriado para sua cultura. A maior quantidade de proteína Bcp foi produzida por bactérias cultivadas no meio de cultura 2HKII quando comparada à produção de proteína em LB. O crescimento bacteriano foi de 4 vezes maior no meio 2HK2 do que no meio mais pobre. Por isto o meio 2HK2 foi escolhido para os ensaios posteriores (Figura 31).

Figura 31. Produção de Bcp (17,8 kDa) por *E. coli* cultivadas nos meios de cultura LB e 2HKII. M: marcador de massa molecular; N: bactérias não induzidas; A: bactérias induzidas.

4.4.2 Expressão da proteína Bcp em diferentes temperaturas

As figuras 32 e 33, mostram a produção da Bcp pelas bactérias cultivadas nas temperaturas de 20°C, 30°C e 37°C e suas frações solúvel e insolúvel. Quando as bactérias foram cultivadas na temperatura de 20°C, a proteína Bcp foi produzida predominantemente de forma solúvel. Optamos por produzir as proteínas a 30°C, a

condição de temperatura mais branda na qual ainda se observa uma produção alta de Bcp na forma insolúvel.

Figura 32. Produção de Bcp (17,8 kDa) em *E.coli* cultivadas em meio 2HKII em diferentes temperaturas. M: marcador de massa molecular; N: bactérias não induzidas; A: bactérias induzidas.

Figura 33. Produção de Bcp (17,8 kDa) em *E.coli* cultivadas em meio 2HKII mostrando suas frações solúveis e insolúveis em diferentes temperaturas. M: marcador de massa molecular; T: amostra total; I: fração insolúvel; S: fração solúvel.

4.4.3 Renaturação da proteína Bcp na presença de diferentes proporções do par redox (GSH/GSSG)

Foi feita uma curva de diferentes proporções do par redox (glutathionas reduzida e oxidada) com o objetivo de otimizar o processo de renaturação da proteína Bcp. Todas as amostras foram pressurizadas a 2,4 Kbar por 16 horas e a descompressão foi realizada em degraus de 0,4 Kbar a cada 30 minutos. Foi utilizada uma concentração final de par redox de 10 mM e uma concentração de GdnHCl de 1,5 M.

A figura 34 mostra o rendimento de proteína solúvel que foi obtida após a pressurização e diálise da proteína, porém não conseguimos atividade biológica desta proteína. É possível que não tenha sido obtida atividade enzimática da Bcp porque a proteína, embora solúvel, esteja na conformação não nativa, ou as enzimas Trr ou da TsnC utilizadas no ensaio poderiam ter baixa atividade.

Devido aos resultados pouco promissores, decidimos não continuar com os testes de renaturação da proteína Bcp sob pressão.

Figura 34. Determinação das porcentagens de obtenção de Bcp solúvel após compressão das suspensões de CI na presença de diferentes proporções de glutathionas reduzida (GSH)/oxidada (GSSG) em concentração de 10 mM e após diálise. Tampão de renaturação: Tris HCl 0,05 M pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA e 1,5 M de GdnHCl.

5. CONCLUSÕES

A metodologia de renaturação utilizando alta pressão hidrostática é um processo que foi descrito recentemente e relativamente poucos artigos foram publicados sobre este tema.

Considerando que existe a presença de estruturas secundárias e terciárias nativas nos CI, principalmente aqueles expressos pelas bactérias em temperaturas relativamente baixas [129], que a alta pressão é capaz de induzir a dissociação de proteínas agregadas em condições brandas, e que a desnaturação proteica promovida pela ação da alta pressão de modo geral é reversível [50], a renaturação em condição de alta pressão se apresenta como uma ferramenta muito interessante para a obtenção de altos rendimentos de proteínas nativas a partir de CI.

Provavelmente devido ao fato de que a L-arginina promove a dissociação de agregados em condições não-desnaturantes, a utilização deste aditivo se apresentou tão efetiva, elevando em 3,3 vezes o rendimento de solubilização dos agregados de YbbN e obtenção de proteína renaturada com atividade enzimática (Figura 20). Através do espalhamento de luz demonstramos que a desagregação dos CI na presença de 0,5 M de L-Arginina foi tão efetiva quanto aquela obtida para a amostra contendo 1 M de GdnHCl, sendo assim menos agressiva para a proteína (Figura 23). Mostramos também que a L-Arginina teve efeito altamente protetor na inativação da atividade da YbbN promovida pela incubação à temperaturas acima de 40°C (Figura 24).

Na maioria dos casos descritos na literatura o desenvolvimento dos processos de renaturação é baseado nos resultados de quantificação da proteína de interesse na fração solúvel. Entre as proteínas avaliadas no nosso estudo, em alguns dos casos foi observada discrepância entre as melhores condições obtidas para a solubilização proteica e as condições nos quais foram obtidos melhores valores de atividade biológica. Um exemplo disso pode ser observado na Figura 9, na qual se observa pouca diferença entre os valores de solubilização proteica de TsnC obtidos pela compressão na presença de diferentes proporções de GSH:GSSG (Figura 9A), enquanto atividade enzimática 5,6 vezes superior foi observada pela proteína que foi pressurizada na presença de 10GSH:1GSSG do que na amostra contendo

1GSH:10GSSG (Figura 9B). Esses resultados indicam que a avaliação baseada somente no grau de solubilização pode ser equivocada em alguns casos e que, portanto, a avaliação da solubilização juntamente com a determinação de atividade biológica realizada no presente estudo se mostrou bastante vantajosa.

Obtivemos a dissociação sob pressão e renaturação de uma proteína pequena, contendo somente um domínio, a TsnC e outra proteína maior, a YbbN apresentando dois domínios estruturais, uma proteína de enovelamento provavelmente mais elaborado.

Foi descrito neste trabalho um processo de renaturação com obtenção de YbbN de *X. fastidiosa* em altos níveis a partir de CI e pela primeira vez foi observada a atividade de oxidoredutase para uma enzima do tipo YbbN.

O motivo CXXC, característico de tiol-dissulfeto oxidoredutases como tiorredoxina, glutarredoxina e PDI é pouco conservado em ortólogos de YbbN em ambas as posições de cisteína. Além disso, vários YbbN homólogos não possuem nenhuma das duas cisteínas potencialmente ativas, levando à suposição de que o grupo inteiro de homólogos de Ybbn são oxidoredutases não funcionais. Em artigo recente foi descrita a estrutura da YbbN de *Escherichia coli*. O sítio característico de oxidoredutases CXXC (resíduos 35 a 38) contém uma substituição da primeira cisteína para uma serina. (SXXC) na YbbN de *E. coli* e nesta proteína de *Xylella fastidiosa*, não tendo sido observada atividade de oxidoredutase na proteína de *E. coli* [130]. Em contraste, no presente trabalho mostramos que a YbbN de *X. fastidiosa* renaturada em condição de alta pressão possui alta atividade de oxidoredutase. Foi sugerido que a atividade de oxidoredutase poderia ser efetiva pela formação de um sítio ativo que compreenderia a Cys-38 conservada e a Cys-63 situada mais distante na sequência de aminoácidos, porém altamente conservada como segundo resíduo ativo de cisteína [131]. O rendimento do processo de renaturação de YbbN utilizando-se alta pressão foi bastante alto, chegando a 98%.

A renaturação da proteína TsnC a partir de proteínas agregadas em CI também foi obtida com rendimento alto, chegando a 89,9% de proteína, solúvel e apresentando atividade biológica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hartley, D.L. and J.F. Kane, *Properties of inclusion bodies from recombinant Escherichia coli*. Biochem Soc Trans, 1988. **16**(2): p. 101-2.
2. Mitraki, A. and J. King, *Protein Folding Intermediates and Inclusion Body Formation*. Bio-Technology, 1989. **7**(7): p. 690-697.
3. Schein, C.H., *Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria*. Bio-Technology, 1989. **7**(11): p. 1141-1147.
4. Gatti-Lafranconi, P., et al., *Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology*. Febs Journal, 2011. **278**(14): p. 2408-2418.
5. Clark, E.D., *Protein refolding for industrial processes*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(2): p. 202-7.
6. Middelberg, A.P.J., *Process-Scale Disruption of Microorganisms*. Biotechnology Advances, 1995. **13**(3): p. 491-551.
7. Middelberg, A.P.J., *Preparative protein refolding*. Trends in Biotechnology, 2002. **20**(10): p. 437-443.
8. MaachupalliReddy, J., B.D. Kelley, and E.D. Clark, *Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme*. Biotechnology Progress, 1997. **13**(2): p. 144-150.
9. Fischer, B., I. Sumner, and P. Goodenough, *Isolation, Renaturation, and Formation of Disulfide Bonds of Eukaryotic Proteins Expressed in Escherichia-Coli as Inclusion-Bodies*. Biotechnology and Bioengineering, 1993. **41**(1): p. 3-13.
10. Clark, E.D., et al., *Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs aggregation*. Biotechnology Progress, 1998. **14**(1): p. 47-54.
11. St John, R.J., et al., *High pressure refolding of recombinant human growth hormone from insoluble aggregates - Structural transformations, kinetic barriers, and energetics*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(50): p. 46856-46863.
12. Misawa, S. and I. Kumagai, *Refolding of therapeutic proteins produced in Escherichia coli as inclusion bodies*. Biopolymers, 1999. **51**(4): p. 297-307.
13. Clark, E.D., E. Schwarz, and R. Rudolph, *Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding*. Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates, 1999. **309**: p. 217-236.
14. Muller, C. and U. Rinas, *Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant Escherichia coli using size-exclusion chromatography*. Journal of Chromatography A, 1999. **855**(1): p. 203-213.
15. Swietnicki, W., *Folding aggregated proteins into functionally active forms*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(4): p. 367-72.
16. Tsumoto, K., et al., *Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies*. Protein Expression and Purification, 2003. **28**(1): p. 1-8.
17. Netto, L.E., et al., *Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2007. **146**(1-2): p. 180-93.
18. Rudolph, R., *Renaturation of Recombinant, Disulfide-Bonded Proteins from Inclusion-Bodies*. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1989. **370**(8): p. 771-772.
19. Vincentelli, R., et al., *High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies*. Protein Science, 2004. **13**(10): p. 2782-2792.
20. Ami, D., et al., *Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(4): p. 793-9.
21. Malavasi, N.V., et al., *Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model*. Process Biochemistry, 2011. **46**(2): p. 512-518.

22. Vera, A., et al., *The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures*. Biotechnology and Bioengineering, 2007. **96**(6): p. 1101-1106.
23. de Groot, N.S. and S. Ventura, *Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies*. Febs Letters, 2006. **580**(27): p. 6471-6476.
24. Carrio, M., et al., *Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies*. Journal of Molecular Biology, 2005. **347**(5): p. 1025-1037.
25. Fersht, A.R. and V. Daggett, *Protein folding and unfolding at atomic resolution*. Cell, 2002. **108**(4): p. 573-82.
26. Dinner, A.R., et al., *Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(7): p. 331-9.
27. Wolynes, P.G., J.N. Onuchic, and D. Thirumalai, *Navigating the folding routes*. Science, 1995. **267**(5204): p. 1619-20.
28. Dill, K.A. and H.S. Chan, *From Levinthal to pathways to funnels*. Nat Struct Biol, 1997. **4**(1): p. 10-9.
29. Jahn, T.R. and S.E. Radford, *Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways*. Arch Biochem Biophys, 2008. **469**(1): p. 100-17.
30. Watters, A.L., et al., *The highly cooperative folding of small naturally occurring proteins is likely the result of natural selection*. Cell, 2007. **128**(3): p. 613-24.
31. Vendruscolo, M., et al., *Structures and relative free energies of partially folded states of proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 14817-21.
32. Brockwell, D.J. and S.E. Radford, *Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes?* Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(1): p. 30-7.
33. Karplus, M., *The Levinthal paradox: yesterday and today*. Fold Des, 1997. **2**(4): p. S69-75.
34. Dobson, C.M., *Principles of protein folding, misfolding and aggregation*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 3-16.
35. Fersht, A.R., *Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1525-9.
36. Vendruscolo, M., et al., *Three key residues form a critical contact network in a protein folding transition state*. Nature, 2001. **409**(6820): p. 641-5.
37. Makarov, D.E. and K.W. Plaxco, *The topomer search model: A simple, quantitative theory of two-state protein folding kinetics*. Protein Sci, 2003. **12**(1): p. 17-26.
38. Panchenko, A.R., Z. Luthey-Schulten, and P.G. Wolynes, *Foldons, protein structural modules, and exons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 2008-13.
39. Cheung, M.S., A.E. Garcia, and J.N. Onuchic, *Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 685-90.
40. Dobson, C.M., *Protein folding and misfolding*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 884-90.
41. Kitahara, R. and K. Akasaka, *Close identity of a pressure-stabilized intermediate with a kinetic intermediate in protein folding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3167-72.
42. Gross, M. and R. Jaenicke, *Proteins under Pressure - the Influence of High Hydrostatic-Pressure on Structure, Function and Assembly of Proteins and Protein Complexes*. European Journal of Biochemistry, 1994. **221**(2): p. 617-630.
43. Silva, J.L. and G. Weber, *Pressure Stability of Proteins*. Annual Review of Physical Chemistry, 1993. **44**: p. 89-113.
44. Mozhaev, V.V., et al., *High pressure effects on protein structure and function*. Proteins-Structure Function and Genetics, 1996. **24**(1): p. 81-91.
45. Kim, Y.S., et al., *High-pressure studies on protein aggregates and amyloid fibrils*. Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates, Pt C, 2006. **413**: p. 237-253.
46. St John, R.J., J.F. Carpenter, and T.W. Randolph, *High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(23): p. 13029-13033.

47. Seefeldt, M.B., et al., *High-pressure refolding of bikunin: Efficacy and thermodynamics*. Protein Science, 2004. **13**(10): p. 2639-2650.
48. St John, R.J., J.F. Carpenter, and T.W. Randolph, *High-pressure refolding of disulfide-cross-linked lysozyme aggregates: Thermodynamics and optimization*. Biotechnology Progress, 2002. **18**(3): p. 565-571.
49. Lee, S.H., et al., *Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure*. Protein Science, 2006. **15**(2): p. 304-313.
50. Silva, J.L., D. Foguel, and C.A. Royer, *Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure*. Trends in Biochemical Sciences, 2001. **26**(10): p. 612-618.
51. Schoner, B.E., et al., *Reconstitution of functional nuclear receptor proteins using high pressure refolding*. Molecular Genetics and Metabolism, 2005. **85**(4): p. 318-322.
52. Chura-Chambi, R.M., et al., *Refolding of endostatin from inclusion bodies using high hydrostatic pressure*. Analytical Biochemistry, 2008. **379**(1): p. 32-39.
53. Balduino, K.N., et al., *Refolding by high pressure of a toxin containing seven disulfide bonds: bothropstoxin-1 from Bothrops jararacussu*. Mol Biotechnol, 2009. **48**(3): p. 228-34.
54. Patra, A.K., et al., *Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2000. **18**(2): p. 182-92.
55. St John, R.J., J.F. Carpenter, and T.W. Randolph, *High-pressure refolding of disulfide-cross-linked lysozyme aggregates: thermodynamics and optimization*. Biotechnol Prog, 2002. **18**(3): p. 565-71.
56. Barnard, E.L., et al., *Distribution of Xylella fastidiosa in oaks in Florida and its association with growth decline in Quercus laevis*. Plant Disease, 1998. **82**(5): p. 569-572.
57. Simpson, A.J.G., et al., *The genome sequence of the plant pathogen Xylella fastidiosa*. Nature, 2000. **406**(6792): p. 151-157.
58. Chatterjee, S., R.P.P. Almeida, and S. Lindow, *Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of Xylella fastidiosa*. Annual Review of Phytopathology, 2008. **46**: p. 243-271.
59. Coletta-Filho, H.D., et al., *Differentiation of strains of Xylella fastidiosa by a variable number of tandem repeat analysis*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(9): p. 4091-5.
60. Purcino, R.P., et al., *Xylella fastidiosa disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in sweet orange Citrus sinensis cv. Pera*. J Exp Bot, 2007. **58**(11): p. 2733-44.
61. Laurent, T.C., E.C. Moore, and P. Reichard, *Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from Escherichia Coli B*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 3436-44.
62. Miranda-Vizuet, A., et al., *Cloning, expression, and characterization of a novel Escherichia coli thioredoxin*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30841-7.
63. Holmgren, A., *Thioredoxin*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 237-71.
64. Tsang, M.L. and J.A. Schiff, *Sulfate-reducing pathway in Escherichia coli involving bound intermediates*. J Bacteriol, 1976. **125**(3): p. 923-33.
65. Ejiri, S.I., H. Weissbach, and N. Brot, *Reduction of methionine sulfoxide to methionine by Escherichia coli*. J Bacteriol, 1979. **139**(1): p. 161-4.
66. Chamberlin, M., *Isolation and characterization of prototrophic mutants of Escherichia coli unable to support the intracellular growth of T7*. J Virol, 1974. **14**(3): p. 509-16.
67. Russel, M. and P. Model, *Thioredoxin is required for filamentous phage assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(1): p. 29-33.
68. Lim, C.J., B. Haller, and J.A. Fuchs, *Thioredoxin is the bacterial protein encoded by fip that is required for filamentous bacteriophage f1 assembly*. J Bacteriol, 1985. **161**(2): p. 799-802.
69. Lundstrom, J. and A. Holmgren, *Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity*. J Biol Chem, 1990. **265**(16): p. 9114-20.
70. Tagaya, Y., et al., *ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction*. EMBO J, 1989. **8**(3): p. 757-64.

71. Matthews, J.R., et al., *Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(15): p. 3821-30.
72. Wakasugi, N., et al., *Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(21): p. 8282-6.
73. Spector, A., et al., *The effect of H2O2 upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells*. J Biol Chem, 1988. **263**(10): p. 4984-90.
74. Schallreuter, K.U. and J.M. Wood, *The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **136**(2): p. 630-7.
75. Nakamura, H., et al., *Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide*. Immunol Lett, 1994. **42**(1-2): p. 75-80.
76. Katti, S.K., D.M. LeMaster, and H. Eklund, *Crystal structure of thioredoxin from Escherichia coli at 1.68 Å resolution*. J Mol Biol, 1990. **212**(1): p. 167-84.
77. Jeng, M.F., et al., *High-resolution solution structures of oxidized and reduced Escherichia coli thioredoxin*. Structure, 1994. **2**(9): p. 853-68.
78. Holmgren, A., *Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide*. Structure, 1995. **3**(3): p. 239-43.
79. Carvalho, A.P., P.A. Fernandes, and M.J. Ramos, *Similarities and differences in the thioredoxin superfamily*. Prog Biophys Mol Biol, 2006. **91**(3): p. 229-48.
80. Eklund, H., F.K. Gleason, and A. Holmgren, *Structural and functional relations among thioredoxins of different species*. Proteins, 1991. **11**(1): p. 13-28.
81. Horta, B.B., *Caracterização funcional e estrutural de peroxidases dependentes de tiól da bactéria fitopatogênica Xylella fastidiosa.*, in Instituto de Biociências. 2009, Universidade de São Paulo: São Paulo.
82. Arner, E.S. and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6102-9.
83. Copley, S.D., W.R. Novak, and P.C. Babbitt, *Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor*. Biochemistry, 2004. **43**(44): p. 13981-95.
84. Chivers, P.T. and R.T. Raines, *General acid/base catalysis in the active site of Escherichia coli thioredoxin*. Biochemistry, 1997. **36**(50): p. 15810-6.
85. Atkinson, H.J., et al., *Using sequence similarity networks for visualization of relationships across diverse protein superfamilies*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4345.
86. Fomenko, D.E. and V.N. Gladyshev, *Identity and functions of CxxC-derived motifs*. Biochemistry, 2003. **42**(38): p. 11214-25.
87. Kthiri, F., et al., *The thioredoxin homolog YbbN functions as a chaperone rather than as an oxidoreductase*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **374**(4): p. 668-72.
88. Nelson, K.J., et al., *Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis*. Proteins, 2011. **79**(3): p. 947-64.
89. Wood, Z.A., et al., *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(1): p. 32-40.
90. Kang, S.W., I.C. Baines, and S.G. Rhee, *Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6303-11.
91. Chae, H.Z., T.B. Uhm, and S.G. Rhee, *Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7022-6.

92. Kong, W., et al., *A novel peroxiredoxin of the plant Sedum lineare is a homologue of Escherichia coli bacterioferritin co-migratory protein (Bcp)*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 107-14.
93. Neidhardt, F.C., et al., *Gene-protein index of Escherichia coli K-12*. Microbiol Rev, 1983. **47**(2): p. 231-84.
94. Jeong, W., M.K. Cha, and I.H. Kim, *Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2924-30.
95. Hammad, Y., et al., *Modification of the protein expression pattern induced in the nitrogen-fixing actinomycete Frankia sp. strain ACN14a-tsr by root exudates of its symbiotic host Alnus glutinosa and cloning of the sodF gene*. Can J Microbiol, 2001. **47**(6): p. 541-7.
96. Clarke, D.J., et al., *Interrogating the molecular details of the peroxiredoxin activity of the Escherichia coli bacterioferritin comigratory protein using high-resolution mass spectrometry*. Biochemistry, 2009. **48**(18): p. 3904-14.
97. Jensen, E.B. and S. Carlsen, *Production of recombinant human growth hormone in Escherichia coli: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts*. Biotechnol Bioeng, 1990. **36**(1): p. 1-11.
98. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
99. Riddles, P.W., R.L. Blakeley, and B. Zerner, *Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination*. Anal Biochem, 1979. **94**(1): p. 75-81.
100. Chae, H.Z., S.J. Chung, and S.G. Rhee, *Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27670-8.
101. Przybycien, T.M., et al., *Secondary Structure Characterization of Beta-Lactamase Inclusion-Bodies*. Protein Engineering, 1994. **7**(1): p. 131-136.
102. de Groot, N.S. and S. Ventura, *Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies*. FEBS Lett, 2006. **580**(27): p. 6471-6.
103. Chi, E.Y., et al., *Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation*. Pharmaceutical Research, 2003. **20**(9): p. 1325-1336.
104. Wei, W., *Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **185**(2): p. 129-188.
105. Timasheff, S.N., *The Control of Protein Stability and Association by Weak-Interactions with Water - How Do Solvents Affect These Processes*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1993. **22**: p. 67-97.
106. Davis-Searles, P.R., et al., *Interpreting the effects of small uncharged solutes on protein-folding equilibria*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2001. **30**: p. 271-306.
107. Manning, M.C., et al., *Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update*. Pharmaceutical Research, 2010. **27**(4): p. 544-575.
108. Cleland, J.L., M.F. Powell, and S.J. Shire, *The Development of Stable Protein Formulations - a Close Look at Protein Aggregation, Deamidation, and Oxidation*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1993. **10**(4): p. 307-377.
109. Jorgensen, L., et al., *Recent trends in stabilising peptides and proteins in pharmaceutical formulation - considerations in the choice of excipients*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2009. **6**(11): p. 1219-1230.
110. Arakawa, T. and S.N. Timasheff, *[Mechanism of stabilization of proteins by glycerol and sucrose]*. Seikagaku, 1982. **54**(11): p. 1255-9.
111. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(2): p. 119-39.

112. Scharnagl, C., M. Reif, and J. Friedrich, *Stability of proteins: Temperature, pressure and the role of the solvent*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2005. **1749**(2): p. 187-213.
113. David, L.N., & Michael, M. C. , *Lehninger principles of biochemistry*. 2000, New York: Worth Publishers.
114. Tsumoto, K., et al., *Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies*. Protein Expr Purif, 2003. **28**(1): p. 1-8.
115. Trivedi, V.D., et al., *Co-refolding denatured-reduced hen egg white lysozyme with acidic and basic proteins*. Febs Letters, 1997. **418**(3): p. 363-366.
116. Armstrong, N., A. De Lencastre, and E. Gouaux, *A new protein folding screen: Application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase*. Protein Science, 1999. **8**(7): p. 1475-1483.
117. Ho, J.G.S., et al., *The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient*. Protein Science, 2003. **12**(4): p. 708-716.
118. Lin, W.J. and J.A. Traugh, *Renaturation of Casein Kinase-II from Recombinant Subunits Produced in Escherichia-Coli - Purification and Characterization of the Reconstituted Holoenzyme*. Protein Expression and Purification, 1993. **4**(3): p. 256-264.
119. Rattenholl, A., et al., *The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies*. European Journal of Biochemistry, 2001. **268**(11): p. 3296-3303.
120. Asano, R., et al., *Antitumor activity of interleukin-21 prepared by novel refolding procedure from inclusion bodies expressed in Escherichia coli*. Febs Letters, 2002. **528**(1-3): p. 70-76.
121. Brinkmann, U., J. Buchner, and I. Pastan, *Independent Domain Folding of Pseudomonas Exotoxin and Single-Chain Immunotoxins - Influence of Interdomain Connections*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(7): p. 3075-3079.
122. Buchner, J. and R. Rudolph, *Renaturation, Purification and Characterization of Recombinant Fab-Fragments Produced in Escherichia-Coli*. Bio-Technology, 1991. **9**(2): p. 157-162.
123. Rudolph R, F.S., *Process for obtaining renatured proteins*. 1990.
124. Chen, J., et al., *Different Effects of L-Arginine on Protein Refolding: Suppressing Aggregates of Hydrophobic Interaction, Not Covalent Binding*. Biotechnology Progress, 2008. **24**(6): p. 1365-1372.
125. Arakawa, T., et al., *Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects*. Biophysical Chemistry, 2007. **127**(1-2): p. 1-8.
126. Baynes, B.M., D.I.C. Wang, and B.L. Trout, *Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation*. Biochemistry, 2005. **44**(12): p. 4919-4925.
127. Reddy, R.C., et al., *L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme*. Protein Science, 2005. **14**(4): p. 929-935.
128. Bajorunaite, E., J. Sereikaite, and V.A. Bumelis, *L-Arginine suppresses aggregation of recombinant growth hormones in refolding process from E-Coli inclusion bodies*. Protein Journal, 2007. **26**(8): p. 547-555.
129. Jevsevar, S., et al., *Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted*. Biotechnol Prog, 2005. **21**(2): p. 632-9.
130. Lin, J. and M.A. Wilson, *Escherichia coli thioredoxin-like protein YbbN contains an atypical tetratricopeptide repeat motif and is a negative regulator of GroEL*. J Biol Chem. **286**(22): p. 19459-69.
131. Caldas, T., et al., *The Escherichia coli thioredoxin homolog YbbN/Trxsc is a chaperone and a weak protein oxidoreductase*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(3): p. 780-6.