INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**UTILIZAÇÃO DE ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS PARA O ESTUDO E
RENATURAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ESTRUTURA QUATERNÁRIA**

DANIELLA RODRIGUES

Orientadora:

Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

São Paulo

Setembro de 2012

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**UTILIZAÇÃO DE ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS PARA O ESTUDO E
RENATURAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ESTRUTURA QUATERNÁRIA**

DANIELLA RODRIGUES

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

Orientadora:

Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

São Paulo

Setembro de 2012

A minha querida mãe, por todo amor, apoio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por sempre iluminar meus caminhos.

À minha mãe Cecília, por dedicar sua vida a mim, por ser essa pessoa tão carinhosa e sempre me apoiar em tudo. Mãe, sem você eu não seria nada!

Ao meu padrasto Ricardo, por sempre acreditar nos meus sonhos e em mim. Saudade eterna de você!

Ao Adival, pelo apoio incondicional, pelos bons momentos que passamos juntos e por ser essa pessoa tão especial. Obrigada por tudo.

À minha orientadora Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias, pelos grandes ensinamentos, pela paciência, compreensão, oportunidade e por ter confiado em mim.

Às minhas queridas amigas de laboratório, Natália Malavasi Vallejo, Laura Simoni Lemke e Rosa Maria Chura-Chambi. Obrigada pelos conselhos científicos, pela ajuda no laboratório, mas principalmente obrigada pela amizade, pelas risadas, pelos choros, por me aturarem e pelos conselhos pessoais. Eu aprendi muito com cada uma de vocês e sempre as levarei comigo!

Aos alunos de iniciação científica, Natália Mestre (Moranguinho), Samara, Gleyce, Fabiana, Vivian, Larissa, Roberto, Letícia e Jéssica, pela ajuda e companhia no laboratório.

Ao colaborador e amigo Dr. Luis Ernesto Farinha Arcieri, pela ajuda com os ensaios biológicos da CTB e da RGFA, pelos ensinamentos e conselhos científicos. Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar, pela paciência e pelo bom humor.

Ao Dr. Armando Moraes Ventura do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, por ter gentilmente cedido os vetores de expressão da CTB e da RGFA e por ter me permitido utilizar toda a estrutura do seu laboratório.

À Dra. Regina Affonso do IPEN, pelos ensinamentos, conselhos, paciência e pelos reagentes.

À Dra. Miriam do IPEN, por sempre estar disposta a me ajudar e pelas dicas de biologia molecular.

Aos pesquisadores do Centro de Biotecnologia do IPEN, Dr. Patrick Spencer, Dra. Maria Teresa Ribela, Dra. Olga Zazuco Higa, Dra. Maria Helena Bellini e Dra. Nanci do Nascimento pelos ensinamentos e por me deixarem utilizar a estrutura de seus laboratórios.

Ao grupo de hormônios por toda a ajuda.

À amiga Tamara, por todo o apoio, paciência, ensinamentos e pela ajuda na purificação da CTB.

Aos amigos do IPEN, Adriana, Claudinha, Thais, Roberto, Karina, Daniele, Eliza, Bia, Renata, Vicent, Rodrigo, Bruno, Alisson, Flávio, Marcos, Miriam, Flavinha, Fernanda, Ed Carlos.

Às queridas amigas da UNESP, Ana Garcia, Ana Carolina, Fernanda, Walquíria, Grazielle, Juliana e Karen, pelas maravilhosas lembranças da época da graduação e por serem pessoas tão especiais.

À Arlete e Ruth do IPEN, por sempre me ajudarem.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia do IPEN que de alguma forma colaboraram para o bom andamento deste trabalho.

À CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP pelo financiamento do projeto no qual este trabalho se inseriu.

Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas...

Luis Fernando Veríssimo

UTILIZAÇÃO DE ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS PARA O ESTUDO E RENATURAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ESTRUTURA QUATERNÁRIA

DANIELLA RODRIGUES

RESUMO

A produção de proteínas recombinantes é uma ferramenta essencial para a indústria biotecnológica e suporta a expansão da pesquisa biológica moderna. Uma variedade de hospedeiros pode ser utilizada para produzir estas proteínas e dentre eles, as bactérias *E. coli* são as hospedeiras mais utilizadas. No entanto, a expressão heteróloga de genes em *E. coli* frequentemente resulta em um processo de enovelamento incompleto que leva ao acúmulo de agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão (CI). Altas pressões hidrostáticas são capazes de desfavorecer interações intermoleculares hidrofóbicas e eletrostáticas, levando à dissociação dos agregados e por isso são úteis para solubilizar e renaturar proteínas agregadas em CI. O presente trabalho teve como objetivo o estudo do processo de desagregação dos CI e de renaturação das proteínas oligoméricas subunidade B da toxina colérica (CTB) e região globular da fibra adenoviral (RGFA) utilizando altas pressões hidrostáticas. A toxina colérica (CT) é composta por uma subunidade A e cinco subunidades B combinadas em uma holotoxina AB₅. A CTB é a porção pentamérica não tóxica da CT, responsável pela ligação da holotoxina ao receptor gangliosídeo GM1. A fibra do adenovírus é uma proteína homotrimérica que forma parte do capsídeo viral, organizada em três regiões: a cauda N-terminal, a haste central e a região C-terminal (região globular). A RGFA se liga à proteína de membrana CAR nas células hospedeiras e promove a internalização do vírus. Os estudos apresentados neste trabalho demonstraram que a alta pressão hidrostática foi eficaz na desagregação dos CI da CTB e da RGFA. As condições de renaturação foram otimizadas utilizando-se diferentes proporções do par redox glutatona oxidada e reduzida, concentrações de agentes caotrópicos, presença de aditivos e esquemas diferenciados de compressão/descompressão daqueles previamente descritos na literatura. CTB solúvel e pentamérica foi obtida pela compressão da suspensão de

CI a 2,4 kbar por 16 horas em tampão TrisHCl 50 mM pH 8,5, 1 mM de tween 20 e descompressão direta seguida de incubação em pressão atmosférica. O rendimento de renaturação da CTB solúvel e pentamérica foi de até 45 % e 288 mg de CTB/litro de cultura bacteriana. Esta proteína apresentou estrutura regular e atividade biológica. RGFA trimérica foi obtida pela compressão da suspensão de CI em tampão TrisHCl 50 mM pH 8,0 e 0,5 M de L-arginina a 2,4 kbar por 1,5 horas e 0,4 kbar por 16 horas antes da completa descompressão. O rendimento de proteína solúvel trimérica da RGFA foi de 4 %, porém não foi possível obter a atividade biológica desta proteína.

UTILIZATION OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE FOR THE STUDY AND REFOLDING OF PROTEINS WITH QUATERNARY STRUCTURE

DANIELLA RODRIGUES

ABSTRACT

The production of recombinant proteins is an essential tool for the biotechnology industry and supports the expansion of modern biological research. Recombinant proteins can be produced by a variety of hosts and among them the bacteria *E. coli* is the most commonly used. However, the expression of heterologous genes in *E. coli* often results in an incomplete folding process that leads to the accumulation of insoluble aggregates known as inclusion bodies (IB). The application of high hydrostatic pressure impairs intermolecular hydrophobic and electrostatic interactions of proteins in solution, leading to dissociation of aggregates and is therefore useful tool to solubilize and refold aggregated proteins in IB. This work aimed to study the process of disaggregation of IB and refolding of oligomeric proteins the B subunit of cholera toxin (CTB) and the globular region of the adenoviral fiber (RGFA) using high hydrostatic pressure. The cholera toxin (CT) comprises one A subunit and five B subunits, combined in the AB₅ holotoxin. The pentameric CTB is non-toxic moiety of CT which is responsible for binding to the receptor ganglioside GM1 holotoxin. The adenovirus fiber is a homotrimeric protein wich forms part of the viral capsid and it is organized into three regions: the N-terminal tail, the central rod and the C-terminal region (globular region). The RGFA binds to membrane protein CAR in host cells and promotes the internalization of virus. The studies presented here demonstrate that high hydrostatic pressure was effective in the disaggregation of the CTB and RGFA IB. The refolding conditions were optimized using different proportions of the redox couple oxidated and reduced glutathione, concentrations of chaotropic agents, presence of additives and pressure/decompression schemes distinguished from the previously described in the literature. Soluble pentameric CTB was obtained when the suspension of IB were compressed at 2.4 kbar for 16 hours in 50 mM of Tris-HCl buffer pH 8.5, 1 mM of tween 20, followed by direct decompression and incubation at

atmospheric pressure. The yield of refolded soluble pentameric CTB was up to 45 % and 288 mg of CTB/ liter of bacterial culture. This protein was shown to presented regular structure and biological activity. Trimeric RGFA was obtained by compression of the suspension of IB in 50 mM of Tris-HCl buffer pH 8.0, 0.5M L-arginine at 2.4 kbar for 1.5 hours and at 0.4 kbar for 16 hours prior to the complete decompression. The yield of soluble trimeric RGFA was 4 %, however this protein did not present biological activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Localização e função das proteínas presentes nos adenovírus.	35
Tabela 2 – Antibióticos utilizados para expressão dos genes alvos.....	44
Tabela 3 – Tampões utilizados nas lavagens dos CI	45
Tabela 4 – Condições de pressão e descompressão.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – MEV dos CI do fator estimulador de colônias granulocitárias humano (G-CSF).....	21
Figura 2 – Etapas para a recuperação de proteínas solúveis a partir de CI.....	23
Figura 3 – Efeitos da alta pressão hidrostática sobre proteínas.....	29
Figura 4 – Toxina colérica	30
Figura 5 – Pentâmero da subunidade B da toxina colérica complexado com Nitrofenil Galactosídeo 5	31
Figura 6 – Modo de ação da CT	32
Figura 7 – Representação esquemática da estrutura do adenovírus e localização das suas proteínas	34
Figura 8 – A proteína fibra do adenovírus	36
Figura 9 – Monômero da região globular da fibra adenoviral sorotipo 2 subtipo C.....	37
Figura 10 – Trímero da região globular da fibra adenoviral sorotipo 2 subtipo C	37
Figura 11 – Vaso de Pressão	46
Figura 12 – Espectrofluorímetro conectado a um gerador de pressão.....	49
Figura 13 – Espectrofluorímetro acoplado a uma célula resistente à alta pressão equipada com janelas de zafira	49
Figura 14 – Cubeta de quartzo fechada com uma tampa de silicone.....	50
Figura 15 – Extratos celulares de <i>E. coli</i> contendo o plasmídeo de expressão pAE-ctxB	57
Figura 16 – Efeito da presença de diferentes proporções de GSH e GSSG na renaturação dos CI da CTB submetidos à alta pressão	59
Figura 17 – Efeito da presença de diferentes aditivos na solubilização e renaturação da CTB a partir de CI submetidos à alta pressão.....	62
Figura 18 – Efeito do tween 20 na solubilização e renaturação da CTB submetida a diferentes esquemas de descompressão	62
Figura 19 – Altas pressões hidrostáticas induzem a dissociação dos CI da CTB	64

Figura 20 – Efeito dos diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da CTB	66
Figura 21 – Efeito da incubação por diferentes tempos em pressão atmosférica a 20°C após a pressurização dos CI da CTB a 2,4 kbar por 16 horas..	68
Figura 22 – Efeito de diferentes concentrações proteicas no rendimento da renaturação dos CI da CTB.....	69
Figura 23 – MEV dos CI da CTB	70
Figura 24 – Efeito da temperatura negativa e alta pressão hidrostática na dissociação dos CI da CTB.	72
Figura 25 – Análise da purificação da CTB por cromatografia de afinidade a níquel.	73
Figura 26 – Cromatograma da CTB purificada em coluna de exclusão molecular	74
Figura 27 – Análise da cromatografia por exclusão molecular da CTB	75
Figura 28 – Espectro de dicroísmo circular da CTB renaturada pela alta pressão hidrostática	76
Figura 29 – Espectro de emissão de fluorescência da CTB renaturada pela alta pressão hidrostática	77
Figura 30 – Análise funcional da CTB renaturada pela alta pressão hidrostática	78
Figura 31 – Extratos celulares de <i>E. coli</i> contendo o plasmídeo de expressão pET28b com o gene da RGFA	79
Figura 32 – Solubilização dos CI da RGFA pelo GdnHCl	80
Figura 33 – Efeito da presença de diferentes proporções de GSH e GSSG na renaturação dos CI da RGFA submetidos à alta pressão.	81
Figura 34 – Efeito da presença de diferentes aditivos na solubilização e renaturação da RGFA a partir de CI submetidos à alta pressão	83
Figura 35 – Análise por <i>Western Blot</i> do efeito dos aditivos na solubilização e renaturação da RGFA submetida a diferentes esquemas de descompressão.	83
Figura 36 – Altas pressões hidrostáticas induzem a dissociação dos CI da RGFA	84
Figura 37 – Efeito dos diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da RGFA	85

Figura 38 – MEV dos CI da RGFA	87
Figura 39 – Análise funcional da RGFA renaturada pela alta pressão hidrostática	89
Figura 40 – Análise funcional da RGFA renaturada pela alta pressão hidrostática	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
Å	Angstrons
aa	Aminoácidos
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATCC	<i>American type culture collection</i>
bis-ANS	4,4-dianilino-1,1-binaftil-5,5-sulfonato
BSA	Albumina bovina sérica
CAR	<i>Coxsackie B and adenovirus receptor</i>
CI	Corpos de inclusão
CT	Toxina colérica
CTA	Subunidade A da toxina colérica
CTB	Subunidade B da toxina colérica
Cys	Cisteína
D.O.	Densidade óptica
Da	Daltons
DTT	1,4-ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EL	Espalhamento de luz
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho
g	Aceleração da gravidade
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocitárias humano
GdnHCl	Hidrocloreto de guanidina
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GNBP	<i>Gram-negative bacteria binding proteins</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
IPTG	Isopropil, β -D-tiogalactopiranosídeo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MOI	Multiplicidade de infecção
OPD	O-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salina
PDB	<i>Protein data bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
RGD	Arginina-glicina-aspartato
RGFA	Região globular da fibra adenoviral
SARS-CoV	<i>Acute respiratory syndrome-associated coronavirus</i>
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
TP	<i>Terminal protein</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tween 20	Polioxietileno sorbitol monolaureato
<i>V. Cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial humano.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Expressão de Proteínas Recombinantes	20
1.2. Corpos de Inclusão	20
1.3. Processos Clássicos de Renaturação.....	23
1.4. Alta Pressão Hidrostática	25
1.4.1. Ação da Alta Pressão Hidrostática sobre Proteínas	26
1.4.2. Renaturação de Proteínas Agregadas em CI utilizando Altas Pressões Hidrostáticas	27
1.5. Subunidade B da toxina colérica (CTB)	30
1.6. Região globular da fibra adenoviral (RGFA)	33
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Materiais.....	40
3.1.1. Equipamentos e acessórios principais.....	40
3.1.2. Reagentes e soluções	41
3.1.3. Linhagem celular bacteriana.....	43
3.1.4. Linhagem celular eucariota.....	43
3.1.5. Vetores plasmídicos	43
3.2. Métodos	44
3.2.1. Transformação e expressão	44
3.2.2. Lavagem dos CI.....	44
3.2.3. Solubilização dos CI	45
3.2.4. Pressurização dos CI.....	46
3.2.5. Agentes solubilizantes e de óxido-redução	47
3.2.6. Aditivos	48

3.2.7. Concentração proteica nas suspensões de CI submetidas à alta pressão hidrostática.....	48
3.2.8. Dissociação de agregados proteicos sob alta pressão hidrostática.....	48
3.2.9. Dissociação de agregados proteicos em temperaturas negativas.....	50
3.2.10. MEV	50
3.2.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida	51
3.2.12. <i>Western Blot</i>	51
3.2.13. Quantificação de proteínas.....	52
3.2.14. Purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados.....	53
3.2.15. Purificação por cromatografia de exclusão molecular	53
3.2.16. Dicroísmo circular	54
3.2.17. Fluorescência intrínseca do triptofano	54
3.2.18. Determinação de ligação ao receptor da CTB.....	54
3.2.19. Determinação de atividade biológica da RGFA	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Subunidade B da toxina colérica (CTB)	56
4.1.1. Expressão em diferentes temperaturas da CTB.....	56
4.1.2. Efeito das diferentes proporções de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) na renaturação da CTB	57
4.1.3. Efeito de diversos aditivos na solubilização e renaturação da CTB.....	59
4.1.4. Efeito da alta pressão hidrostática na dissociação dos CI da CTB.....	63
4.1.5. Efeito de diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da CTB	65
4.1.6. Efeito da incubação em pressão atmosférica após pressurização dos CI da CTB	66

4.1.7. Efeito de diferentes concentrações proteicas na renaturação da CTB.....	68
4.1.8. MEV dos CI da CTB	69
4.1.9. Temperaturas negativas em associação com alta pressão hidrostática otimizam a dissociação dos CI da CTB	70
4.1.10. Purificação da CTB por cromatografia de afinidade por metais imobilizados.	72
4.1.11. Purificação da CTB por cromatografia de exclusão molecular	73
4.1.12. Dicroísmo circular da CTB.....	75
4.1.13. Fluorescência intrínseca do triptofano da CTB.....	76
4.1.14. Ensaio de ligação ao receptor da CTB	77
4.2. Região Globular da Fibra Adenoviral (RGFA)	79
4.2.1. Expressão em diferentes temperaturas	79
4.2.2. Efeito das diferentes proporções de GSH e GSSG na renaturação dos CI da RGFA	81
4.2.3. Efeito de diversos aditivos na solubilização e renaturação da RGFA.....	82
4.2.4. Efeito da alta pressão hidrostática na dissociação dos CI da RGFA.....	84
4.2.5. Efeito de diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da RGFA.....	85
4.2.6. MEV dos CI da RGFA.....	86
4.2.7. Ensaio de Atividade Biológica da RGFA.....	87
5. CONCLUSÕES.....	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. Expressão de Proteínas Recombinantes

A produção de proteínas recombinantes é uma ferramenta essencial para a indústria biotecnológica e suporta a expansão da pesquisa biológica moderna, incluindo a genômica estrutural e a proteômica (Ventura e Villaverde, 2006). Uma variedade de hospedeiros pode ser utilizada para produzir proteínas recombinantes e dentre eles, as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) são as hospedeiras mais frequentemente utilizadas. Comparada com outros sistemas de expressão, a *E. coli* oferece várias vantagens, incluindo o crescimento em fontes de carbono de baixo custo, a acumulação rápida de biomassa, a simplicidade e sua genética bem caracterizada. Se a proteína não requer complexas modificações pós-traducionais e é expressa na forma solúvel, a bactéria *E. coli* é geralmente utilizada. No entanto, a expressão heteróloga de genes em *E. coli* frequentemente resulta em um processo de enovelamento incompleto que geralmente leva ao acúmulo de agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão (CI) (Baneyx e Mujacic, 2004). A agregação das cadeias polipeptídicas como CI é um problema para a biotecnologia, pois dificulta a produção e a comercialização de muitas proteínas de interesse (Fahnert *et al.*, 2004).

1.2. Corpos de Inclusão

Os CI são estruturas densas de proteínas agregadas encontradas no citoplasma ou no periplasma da *E. coli* decorrentes dos altos níveis de expressão de proteínas heterólogas. As proteínas nos CI são constituídas de moléculas compostas de intermediários de conformação. Em alguns casos, a formação de CI é resultado do ambiente redutor do citoplasma da *E. coli* que inibe a formação de pontes dissulfetos nativas. Quando a maquinaria das células procarióticas é incapaz de processar os altos níveis de expressão que ocorrem durante a produção de proteínas recombinantes típicas, a expressão proteica resulta na formação de CI (Qoronfleh *et al.*, 2007).

Os CI citoplasmáticos são estruturas ovoides ou cilíndricas (figura 1) com um diâmetro que varia de 0,5 a 1,3 μm e com maior densidade ($\sim 1,3 \text{ mg/ml}$) do que muitos componentes celulares, podendo ser facilmente separados por centrifugação após o rompimento celular. Estas estruturas são altamente hidratadas, possuem uma arquitetura porosa e são relativamente puras (Carrio *et al.*, 2000; Singh e Panda, 2005). As proteínas nos CI são enriquecidas em estruturas de folhas β cruzadas com sequências de aminoácidos (aa) específicos, envoltas por segmentos amorfos e desordenados. O número de segmentos β cruzados é variável e os seus tamanhos tipicamente variam por volta de 7 a 10 resíduos de aa (Wang *et al.*, 2008).

Figura 1 – MEV dos CI do fator estimulador de colônias granulocitárias humano (G-CSF). Retirado de Peternel *et al.*, 2008.

Vários sistemas de expressão e condições de cultivo foram desenvolvidos para tentar evitar a formação de CI. Contudo, a formação destes agregados proteicos ainda é muito comum e muitas vezes inevitável (Qoronfleh *et al.*, 2007). Apesar da produção dos CI ser, de modo geral, indesejada, sua formação pode ser vantajosa. Os principais benefícios associados aos CI são: produção de elevados níveis de proteínas, baixo custo, homogeneidade da proteína alvo, resistência proteolítica e como resultado, baixos níveis de degradação da proteína expressa, fácil isolamento e purificação. 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 (Clark, 2001; Singh e Panda, 2005).

Inicialmente as proteínas nos CI eram consideradas como totalmente inativas. No entanto, o conhecimento atual sobre CI evoluiu e hoje em dia se reconhece que proteínas agregadas em CI não são necessariamente inativas (de Groot e Ventura,

2006). Por meio de espectroscopia de infravermelho (FT-IR) se demonstrou que as proteínas nos CI possuem estruturas secundárias semelhantes às daquelas das proteínas em seu estado nativo (Ami *et al.*, 2006). Além disso, dados recentes indicam a presença de certa porcentagem de proteínas apresentando estruturas terciárias com conformação nativa em CI, fato de grande importância para a produção de proteínas recombinantes, pois sugere que as proteínas podem ser liberadas dos CI em um estado funcional, desde que se utilizem condições que desarranjem a rede de contatos intermoleculares sem desnaturarem as estruturas nativas que estão embebidas nestes agregados (de Groot e Ventura, 2006).

A estratégia geral para recuperar proteínas nativas a partir de CI envolve três etapas: isolamento e lavagem dos CI, solubilização dos agregados proteicos e renaturação das proteínas solubilizadas (figura 2). As células contendo os CI são geralmente rompidas através de uma combinação de métodos químicos, mecânicos e enzimáticos. A suspensão restante é então centrifugada para a separação das proteínas solúveis do particulado e alguns passos de lavagens são realizados para a remoção de proteínas de membrana e outros contaminantes dos CI. Uma variedade de métodos pode ser utilizada para solubilizar e renaturar os CI, contudo não há um método universal para todas as proteínas. A renaturação de CI frequentemente requer um extensivo processo de tentativa e erro (Clark, 2001).

Figura 2 – Etapas para a recuperação de proteínas solúveis a partir de CI. Adaptado de Clark, 2001.

1.3. Processos Clássicos de Renaturação

A renaturação a partir de CI requer que as proteínas sejam desagregadas e então renaturadas para a obtenção de sua conformação nativa. Os processos clássicos de renaturação de proteínas a partir de agregados em CI requerem o uso de agentes desnaturantes químicos fortes em altas concentrações. Comumente, agregados de proteínas são solubilizados em agentes caotrópicos fortes como, por exemplo, 6 M de hidrocloreto de guanidina (GdnHCl) ou 8 M de uréia (St John *et al.*, 2002; Clark, 2001). Estes agentes solubilizam e desnaturam os CI através de uma combinação de ações. Primeiramente, a estrutura da água é perturbada e desta forma as moléculas hidrofóbicas se tornam mais solúveis neste solvente. Em seguida, os agentes desnaturantes ligam-se aos grupos polares das proteínas, rompendo as interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio que mantêm a estrutura proteica, resultando em uma desnaturação completa das moléculas de proteína (Caballero-Herrera *et al.*, 2005).

Uma vez solúveis e desnaturadas, as proteínas são primeiramente diluídas e então renaturadas pela remoção do agente caotrópico por diálise, diluição adicional

ou métodos de fase sólida. Contudo, estes métodos convencionais de renaturação frequentemente geram novos agregados de proteínas durante o processo de remoção do agente caotrópico, o que resulta na necessidade de utilização de concentrações proteicas muito baixas (10 a 50 µg/ml) a fim de evitar a reagregação (Clark, 2001). Com a finalidade de minimizar a agregação proteica durante a renaturação, certos aditivos químicos são utilizados. Estes aditivos auxiliam a renaturação da proteína para o estado nativo através de vários mecanismos. Alguns aditivos ligam-se nas regiões hidrofóbicas expostas para proteger a proteína da agregação (como por exemplo, os surfactantes), outros estabilizam os estados de conformação intermediária (açúcares e alguns sais) (Cowan *et al.*, 2008).

Proteínas que possuem cisteínas envolvidas na formação de pontes dissulfeto necessitam de uma renaturação mais elaborada, ou seja, a renaturação deve ser realizada na presença de agentes oxidantes e redutores que auxiliem a formação de pontes dissulfeto nativas. A oxidação da proteína pode ser realizada através da adição de uma mistura de reagentes oxidados e reduzidos, como as glutathionas, cisteínas e cistaminas. A renaturação utilizando glutathionas envolve a quebra das pontes não nativas e formação de pontes dissulfeto entre a glutathiona e a proteína, seguida de renaturação. A utilização destes reagentes é capaz de aumentar a solubilidade da proteína durante a renaturação, auxiliando na diminuição da formação de pontes dissulfeto não nativas (Clark, 2001; Singh e Panda, 2005).

Portanto, o passo de renaturação nos métodos clássicos é difícil e depende fortemente das condições de renaturação. Por exemplo, condições de redox, pH, taxas de diálise e concentração proteica devem ser empiricamente otimizados para cada proteína. Encontrar as condições que levem a rendimentos aceitáveis de renaturação, se possível, usualmente requer a seleção de um grande número de condições de renaturação (Clark *et al.*, 1999; Vincentelli *et al.*, 2004). Frequentemente, após pesquisa extensiva, os rendimentos de renaturação continuam muito baixos. Além disso, baixas concentrações de proteína necessárias para rendimentos de renaturação aceitáveis levam a grandes volumes de processamento e requerem grandes quantidades de agentes caotrópicos corrosivos e tóxicos (St John *et al.*, 2001).

1.4. Alta Pressão Hidrostática

Estudos têm demonstrado que altas pressões hidrostáticas são uma alternativa atrativa às técnicas tradicionais de desnaturação e diluição, em termos de concentração proteica, simplicidade no processo, custo e potencial para aumentar rendimentos de proteínas com conformação nativa e atividade biológica a partir de agregados (Seefeldt *et al.*, 2004).

Altas pressões hidrostáticas foram descritas como capazes de solubilizar e renaturar proteínas agregadas em CI (Foguel *et al.*, 1999; St John *et al.*, 1999, 2001, 2002; Randolph *et al.*, 2002). Por exemplo, em estudos que utilizaram agregados do hormônio de crescimento recombinante, da lisozima e da β -lactamase, o processo de renaturação em alta pressão hidrostática levou a altos rendimentos (>90 %) de proteínas nativas, mesmo na presença de altas concentrações proteicas (St John *et al.*, 1999, 2001, 2002).

Sob altas pressões ocorre a entrada de água nas estruturas proteicas. Pressões da ordem de 1 a 3 kbar desfavorecem interações intermoleculares hidrofóbicas e eletrostáticas, levando à dissociação de agregados. Os mesmos tipos de interação são também responsáveis pela manutenção das estruturas proteicas nos estados nativos. No entanto, normalmente as proteínas não são desnaturadas até pressões de 5 kbar em temperatura ambiente. Então, a dissociação de complexos macromoleculares pela aplicação de pressão de 2 a 3 kbar não é acompanhada de perda de estruturas secundárias e terciárias existentes nos estados dissociados. Em contraste, as pontes de hidrogênio não são sensíveis à alta pressão hidrostática devido à desprezível mudança de volume associada ao rompimento dessas pontes (Randolph *et al.*, 2002). Alterações de temperatura e/ou pequenas concentrações (não desnaturantes) de agentes caotrópicos como GdnHCl foram descritas como úteis para facilitar a quebra das pontes de hidrogênio entre proteínas nos agregados (St John *et al.*, 2002).

A alta pressão também não quebra pontes dissulfeto que fazem ligações cruzadas covalentes entre agregados de proteínas. Nos casos de polipeptídeos contendo pontes dissulfeto, um par óxido-redutor pode ser incluído nas soluções na pressurização de modo a facilitar a quebra das pontes dissulfeto intermoleculares e formação de pontes dissulfeto nativas (St John *et al.*, 2002; Chura-Chambi *et al.*,

2008). Após a desagregação induzida por pressão, a quebra de ligações não nativas e formação de pontes dissulfeto nativas são necessárias para permitir a formação de moléculas mais estáveis com as menores energias livres (St John *et al.*, 2002).

Estas propriedades claramente diferenciam a alta pressão hidrostática dos métodos tradicionais que utilizam altas concentrações de agentes caotrópicos. As principais vantagens associadas à utilização da alta pressão para dissociação de CI e renaturação de proteínas recombinantes são: a solubilização e renaturação da proteína agregada ocorrem no mesmo processo, não requer o uso de altas concentrações de agentes caotrópicos e desse modo, permite a manutenção da estrutura secundária e terciária existentes na proteína, desagrega CI e renatura proteínas rapidamente. Deste modo, a alta pressão é uma ferramenta útil para dissociação de agregados protéicos em proteínas nativas, facilitando a preparação de proteínas para estudos estruturais e funcionais e também para aplicações em indústria biotecnológica (Kim *et al.*, 2006).

1.4.1. Ação da Alta Pressão Hidrostática sobre Proteínas

A pressão é um parâmetro físico que modula as interações proteína-solvente através da mudança de volume do sistema (Kim *et al.*, 2006). Os efeitos da pressão na interação entre segmentos de subunidades de uma proteína ou entre ligações intramoleculares são ditados por reações similares, que produzem essencialmente o desvio do equilíbrio pela pressão em favor dos reagentes que ocupam o menor volume (princípio de Le Chatelier). A perturbação na estrutura terciária de proteínas mediada por alta pressão ocorre devido às mudanças de volume associadas com a alteração de acessibilidade do solvente nos diferentes estados conformacionais de uma proteína, ou seja, quando em soluções aquosas e em altas pressões, as proteínas são infiltradas por água (Silva e Weber, 1993). Assim, conformações parcialmente enoveladas de proteínas sob ação de alta pressão ligam uma quantidade substancial de água e a desnaturação por altas pressões não ocorre na ausência de água (Mozhaev *et al.*, 1996).

Volumes específicos nas proteínas agregadas são maiores do que nos estados nativos devido à presença de cavidades intermoleculares não expostas à água. Em soluções aquosas de proteínas sob altas pressões hidrostáticas, o decréscimo no

volume específico de proteínas quando do desenovelamento parcial ou total é causado por uma combinação de vários efeitos: 1) rompimento de pontes salinas, seguido por hidratação e decréscimo de volume correspondente devido à eletrorestrição; 2) hidratação de resíduos polares e não polares recém-expostos; 3) perda de volume livre que aparece de defeitos no empacotamento de cavidades livres de água (figura 3). A magnitude da diminuição do volume proteico é pequena, 0,5 a 1 % do volume total específico da proteína e as mudanças de volume para a população de estados intermediários tendem a ser ainda menores. Desta forma, a aplicação de alta pressão favorece estados proteicos contendo cavidades mínimas, estados com maior exposição de grupos hidrofóbicos e estados mais altamente ionizados (Mozhaev *et al.*, 1996; Randolph *et al.*, 2002; Silva e Weber, 1993; Seefeldt *et al.*, 2004).

A alta pressão hidrostática também tem sido utilizada como uma ferramenta importante para o estudo do enovelamento de proteínas e da dinâmica e estrutura de estados intermediários do caminho de enovelamento, pois possibilita sua estabilização, tornando possível a caracterização da estrutura e dinâmica destes estados. O estudo da ação de altas pressões sobre as proteínas tem possibilitado o melhor entendimento de como os polipeptídeos se enovelam em conformações altamente estruturadas (Silva *et al.*, 2001).

1.4.2. Renaturação de Proteínas Agregadas em CI utilizando Altas Pressões Hidrostáticas

Poucas publicações já descreveram processos de renaturação de proteínas a partir de CI: das proteínas β -lactamase (St John *et al.*, 1999), membros da família de receptores nucleares (Schoner *et al.*, 2005), as proteínas de *Drosophila melanogaster* “Gram-negative bacteria binding proteins” (GNBP 1, GNBP 2 e GNBP 3), duas fosfatases humanas (PTPRS e DUSP7) (Lee *et al.*, 2006) e o fator de crescimento vascular endotelial humano (VEGF) (Cothran *et al.*, 2011). Dentre estas publicações estão algumas do nosso grupo que realizou a renaturação da proteína antiangiogênica endostatina (Chura-Chambi *et al.*, 2008), da bothropstoxina 1 de *Bothrops jararacussu* (Balduino *et al.*, 2011) e a renaturação da proteína GFP (*green fluorescent protein*) (Malavasi *et al.*, 2011).

No presente trabalho foram utilizadas duas proteínas oligoméricas para os estudos de renaturação de proteínas agregadas em CI utilizando altas pressões hidrostáticas: a subunidade B da toxina colérica de *Vibrio cholerae* (*V.cholerae*) e a região globular da fibra adenoviral. Estas proteínas são objeto de estudo do Dr. Armando Moraes Ventura, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

1 bar

- Presença de cavidades dentro da proteína

1~3 kbar

- Dissociação de Cl
- Eletrorestrição
- Formação de clatratos ao redor dos resíduos hidrofóbicos

~5 kbar

- Flutuações conformacionais fornecem vias para a penetração da água nas cavidades
- Inchaço do núcleo hidrofóbico

5~10 kbar

- Ruptura da estrutura terciária
- Perda de cavidades dentro da proteína

Figura 3 – Efeitos da alta pressão hidrostática sobre proteínas. Adaptado de Boonyaratanakornkit *et al.*, 2002.

1.5. Subunidade B da toxina colérica (CTB)

Em muitos países em desenvolvimento, a cólera é uma importante causa de doença e morte em crianças e ainda representa um importante problema de saúde pública (Holmgren, 1981). Os principais sintomas clínicos da cólera são principalmente induzidos por uma toxina liberada pela bactéria *V. cholerae* no intestino delgado do hospedeiro, a toxina colérica (CT). A CT (figura 4) é uma proteína de massa molecular de 85 kDa composta por uma subunidade A (CTA) e cinco subunidades B (CTB), combinadas em uma holotoxina AB₅ (Areas *et al.*, 2002).

Figura 4 – Toxina colérica. Fonte: *Protein Data Bank* (PDB ID: 1XTC).

A CTA composta por 2 polipeptídeos ligados por uma ponte dissulfeto (A₁ com 22 kDa e A₂ com 5 kDa) é responsável pela atividade tóxica, através da ativação da adenilato ciclase. Como resultado, há acumulação de AMPc nas células da mucosa intestinal, levando à diarreia grave característica da cólera (L'hoir *et al.*, 1990; Mekalanos *et al.*, 1983). A CTB (figura 5) é a porção pentamérica não tóxica da toxina colérica, responsável pela ligação da holotoxina ao receptor gangliosídeo GM1. O pentâmero de CTB (massa molecular de 58 kDa) se liga ao gangliosídeo GM1 na superfície celular e promove a endocitose de CT (Areas *et al.*, 2002 e 2004).

Figura 5 – Pentâmero da subunidade B da toxina colérica complexado com Nitrofenil Galactosídeo 5. Fonte: *Protein Data Bank* (PDB ID: 1PZJ).

Depois que é secretada pela membrana externa de *V. cholerae*, a CT é proteolicamente clivada dentro do hospedeiro em dois domínios: A₁, que é tóxico e A₂ (Spangler, 1992). A ligação da CTB ao receptor GM1 e o transposto da CTA para o lúmen do retículo endoplasmático promove a intoxicação das células (Fujinaga *et al.*, 2003). Neste compartimento, a CTB permanece ligada ao lúmen do retículo endoplasmático enquanto a CTA é reduzida, gerando o domínio A₁ que é desligado do resto da toxina. A translocação de A₁ permite que a toxina atinja o citosol e induza uma cascata de sinalização, levando à abertura dos canais de Cl⁻ na membrana celular (Lencer e Tsai, 2003). A secreção de íons cloreto e água para a luz intestinal causa a forte diarreia característica da cólera (figura 6) (Bernardi *et al.*, 2008).

Figura 6 – Modo de ação da CT. Retirado de Thiagarajah e Verkman, 2005.

A CTB é composta por cinco peptídeos idênticos que formam um pentâmero através das interações entre as folhas β adjacentes dos monômeros. O pentâmero é mantido unido através de 130 pontes de hidrogênio e 20 pontes salinas. Cada monômero da CTB possui em sua sequência 103 resíduos de aa e uma ponte dissulfeto intramolecular entre Cys⁹ e Cys⁸⁶. Um poro de 11 a 15 Å está presente no centro do pentâmero e é composto por cinco α hélices anfipáticas que estão intimamente envolvidas na estabilização do pentâmero. A porção C-terminal do peptídeo A₂ se insere neste poro e interage com os resíduos polares e carregados do anel pentamérico da CTB. A porção N-terminal de A₂ é uma longa α hélice que se estende para fora do pentâmero e interage com o peptídeo A₁ (Mekalanos *et al.*, 1983; L'hoir *et al.*, 1990; Merritt *et al.*, 1994; Sánchez e Holmgren, 2011).

O pentâmero da CTB se liga com alta afinidade ao receptor gangliosídeo GM1. GM1 é um glicolípídeo expresso na superfície de vários tipos celulares, incluindo células do sistema imunológico (Thomas *et al.*, 2004). Cada subunidade da CTB possui um sítio de ligação para o receptor GM1 e a ligação ocorre através da galactose terminal. No entanto, o pentâmero da CTB possui uma maior afinidade de ligação ao receptor. (Merritt *et al.*, 1994; de Haan *et al.*, 1998).

Vários estudos têm descrito as propriedades imunológicas da CTB, abrindo muitas perspectivas para futuras aplicações terapêuticas e biotecnológicas. Formas recombinantes da CTB já foram utilizadas com sucesso como adjuvante de mucosas em vacinas para uso humano, tais como a vacina contra a cólera (Quiding *et al.*, 1991) e a vacina contra *E. coli* que causa diarreia (Peltola *et al.*, 1991; Qadri *et al.*, 2000). Analogamente, a CTB provou ser bom adjuvante para uma vacina celular para *Streptococcus pneumoniae* (Malley *et al.*, 2004) e para o vírus SARS-CoV (*acute respiratory syndrome-associated coronavirus*) (Qu *et al.*, 2005) quando administrada por via intranasal em camundongos. Em vista do potencial de CTB como um regulador da resposta imune, esta subunidade tem sido produzida em vários sistemas biológicos, incluindo a expressão em *E.coli* (Areas *et al.*, 2002 e 2004). Contudo, a expressão da CTB recombinante nesta bactéria ocorre na fração insolúvel, na forma de CI (L'hoir *et al.*, 1990).

1.6. Região globular da fibra adenoviral (RGFA)

Os adenovírus são vírus de DNA de dupla fita pertencentes à família *Adenoviridae* que infectam vertebrados. Em humanos, 51 sorotipos são caracterizados e agrupados em 6 distintas classes (A a F) de acordo com suas características antigênicas, morfológicas e moleculares (Berk, 2007; Fauquet *et al.*, 2007). Os adenovírus humanos, classificados dentro do gênero *Mastadenovirus*, são responsáveis por uma variedade de doenças respiratórias, conjuntivite e gastroenterite em crianças. Em indivíduos imunocomprometidos como pacientes com Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e transplantados, estes vírus podem causar infecções generalizadas (Kojaoghlanian *et al.*, 2003).

Os adenovírus são vírus não envelopados de simetria icosaédrica regular com aproximadamente 90 nm de diâmetro. Estes vírus são constituídos por um capsídeo externo, um núcleo protéico central que cobre o DNA linear e várias proteínas acessórias. O capsídeo é composto de três diferentes proteínas: o hexon, que forma quase toda a superfície do capsídeo, o penton, localizado em cada vértice do icosaedro e a fibra, que se projeta de cada vértice (figura 7) (Berk, 2007). O capsídeo é composto por 252 subunidades denominadas capsômeros. Desses capsômeros, 240 são hexagonais (hexon) distribuídos nas 20 faces do icosaedro e

12 são pentagonais (penton) localizados nos vértices do icosaedro (Martínez - Flores *et al.*, 2006).

Figura 7 – Representação esquemática da estrutura do adenovírus e localização das suas proteínas. Retirado de Russel, 2009.

A partícula viral é constituída por 11 proteínas, denominadas polipetídeos (II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e TP). Destes polipetídeos, 7 constituem o capsídeo (II → hexon, III → penton, IV → fibra, IIIa, VI, VIII e IX). A tabela 1 apresenta as proteínas constituintes da partícula viral, sua localização e funções. O peptídeo II (967 aa) é o constituinte mais abundante do vírus. Os polipetídeos VI (217 aa), VIII (134 aa) e IX (139 aa) encontram-se associados à proteína hexon, sendo responsáveis pela estabilidade da partícula viral. Os peptídeos VI e VIII estão associados à superfície interna do capsídeo viral. Cinco unidades do peptídeo III (571 aa) formam a base do penton. O peptídeo IIIa (566 aa) permite a ligação do penton com o hexon e também funciona como ponto de união entre o hexon e o peptídeo VII do núcleo. O peptídeo IV (582 aa) forma a fibral adenoviral trimérica. O

núcleo do vírus contém quatro proteínas associadas ao DNA viral: V (368 aa), VII (174 aa), X (19 aa) e TP (*terminal protein* com 671 aa). O polipeptídeo VII é o constituinte majoritário do núcleo viral e atua de maneira análoga às histonas. O polipeptídeo V ancora o DNA viral ao vértice do capsídeo. A TP se liga covalentemente a extremidade 5' de cada fita de DNA e a função da proteína X permanece desconhecida (Martínez - Flores *et al.*, 2006; Russel, 2009).

Tabela 1 – Localização e função das proteínas presentes nos adenovírus. Retirado de Siqueira-Silva, 2008.

Proteína (polipeptídeo)	Localização no virion	Funções
II	Monômero do <i>hexon</i>	Majoritaria no capsídeo (estrutural)
III	Base do <i>penton</i>	Penetração na célula
IIIa	Associada à base do <i>penton</i>	Formação da partícula viral; Estabilização
IV	Fibra	Reconhecimento do receptor primário
V	<i>Core</i> : associado ao DNA e à base do <i>penton</i> ; peptídeo associado ao <i>penton</i>	Empacotamento
VI	Peptídeo associado ao <i>hexon</i>	Contato do <i>hexon</i> com o <i>core</i> , estabilização.
VII	<i>Core</i>	Histona
VIII	Peptídeo associado ao <i>hexon</i>	Estabilização
IX	Peptídeo associado ao <i>hexon</i>	Estabilização
X (μ)	<i>Core</i>	Desconhecida
TP	Genoma	Replicação do DNA

A fibra do adenovírus é uma proteína homotrimérica, organizada em três regiões bem definidas: a cauda N-terminal, a haste central e a região C-terminal (região globular - RGFA) (figura 8). A RGFA (195 aa) se liga à proteína de membrana CAR (*Coxsackie B and Adenovirus Receptor*) nas células hospedeiras e promove a internalização do vírus por endocitose mediada por receptor (Louis *et al.*, 1994; Chroboczek *et al.*, 1995). Após a ligação inicial ao receptor CAR, as integrinas *avb3* ou *avb5* servem como receptores secundários interagindo com um motivo RGD (Arg-Gli-Asp) altamente conservado na base do penton. O vírus então é transportado para endossomos, onde a acidificação resulta na desmontagem parcial do capsídeo,

vai para o citoplasma e é transportado para o núcleo, onde ocorre a replicação (Meier e Greber, 2004; Cusack, 2005).

Figura 8 – A proteína fibra do adenovírus. Cada polipeptídeo está representado por uma cor diferente. **(A)** Modelo espacial do penton e da fibra adenoviral. Adaptado de Cusack, 2005. **(B)** Representação da estrutura da fibra adenoviral. Adaptado de Nicklin *et al.*, 2005.

O CAR é uma proteína integral de membrana (46 kDa de massa molecular), membro da superfamília das imunoglobulinas. Embora sua distribuição em tecidos humanos não esteja bem definida, o RNA mensageiro desta proteína está presente em alguns órgãos, como o coração, cérebro, pâncreas e intestino (Tomko *et al.*, 1997), bem como nos pulmões, fígado e rins (Fechner *et al.*, 1999). A estrutura cristalina da RGFA ligada ao domínio CAR (Freimuth *et al.*, 1999) revelou que o receptor CAR interage com um sítio na superfície externa do trímero da RGFA (Roelvink *et al.*, 1999; Zhang e Bergelson, 2005).

A principal característica do monômero da RGFA (22 kDa - figura 9) é uma folha β antiparalela formada por dois conjuntos de quatro folhas β e sua sequência de aa contém 3 cisteínas e 4 triptofanos. No trímero (60 kDa - figura 10), um dos dois conjuntos de folhas β está exposto ao solvente e o outro está voltado para o interior. O núcleo hidrofóbico entre as folhas β contém muitos resíduos conservados na maioria das sequências da RGFA e é constituído principalmente por aa aromáticos.

As fitas β são conectadas por longos laços de estrutura irregular contendo muitas voltas reversas (van Raaij *et al.*, 1999). O trímero possui inúmeros contatos entre os monômeros que envolvem interações como ponte de hidrogênio, pontes salinas e ligações de van der Waals (Howitt *et al.*, 2003).

Figura 9 – Monômero da região globular da fibra adenoviral sorotipo 2 subtipo C.
Fonte: *Protein Data Bank* (PDB ID: 1QHV).

Figura 10 – Trímero da região globular da fibra adenoviral sorotipo 2 subtipo C. Fonte:
Protein Data Bank (PDB ID: 1QHV).

Os vetores recombinantes de adenovírus possuem um grande potencial terapêutico. Estes vetores são amplamente utilizados para estudos de transferência de genes *in vitro* e *in vivo* e em experimentos de terapia gênica. Eles também têm sido utilizados com êxito como vacinas genéticas e adjuvantes em que são expressas proteínas do capsídeo viral (Sharma *et al.*, 2009). Em vista disto, a RGFA de vários sorotipos tem sido produzida em vários sistemas de expressão procarióticos e eucarióticos. Para os sorotipos 2 e 5, a proteína apresentou-se em forma de trímeros e com capacidade de ligação ao CAR inalterada (Louis *et al.*, 1994; Henry *et al.*, 1994). A RGFA sorotipo 2 subtipo C já foi expressa em *E. coli* na forma insolúvel (Luis Ernesto Farinha Arcieri e Armando Morais Ventura, dados não publicados).

Considerando o amplo potencial biomédico da CTB e da RGFA e sua grande utilização em pesquisas científicas, a renaturação destas proteínas com estrutura quaternárias a partir de CI utilizando altas pressões hidrostáticas contribuirá de sobremaneira para a otimização da obtenção de proteínas recombinantes biofuncionais. Os nossos estudos tiveram como finalidade a aquisição de conhecimentos que possam ser utilizados para a otimização de protocolos que favoreçam a solubilização em condições não desnaturantes sob pressão e o enovelamento de proteínas oligoméricas agregadas em CI.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o estudo do processo de desagregação e de renaturação das proteínas oligoméricas subunidade B da toxina de *Vibrio cholerae* e região globular da fibra adenoviral sorotipo 2 subtipo C agregadas em corpos de inclusão expressos em *Escherichia coli* utilizando altas pressões hidrostáticas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Equipamentos e acessórios principais

- Agitador, modelo Ts-2000^a, Vertex.
- Aparelho Mili-Q Plus, purificador de água, Milipore.
- Autoclave, modelo 12 LI/LA, Kavo.
- Autoclave, modelo 415, Fanem.
- Balança analítica, modelo AW 220, Shimadzu.
- Balança de precisão, modelo P1200, Mettler.
- Banho-maria, modelo 100, Fanem.
- Banho-maria, modelo Type 16500 Dry-Bath, Thermolyne.
- Banho-maria, modelo Cool Tech 320, Thermo Scientific.
- Bomba peristáltica, modelo P1TM, GE Healthcare.
- Câmera fotográfica, modelo DMC-FX100, Lumix Panasonic.
- Centrífuga refrigeradora automática, modelo 5810R, Eppendorf.
- Centrífuga refrigeradora automática, modelo RC2-B, Sorvall Speed.
- Coluna de afinidade, modelo His Trap HP, GE Healthcare.
- Coluna de exclusão molecular, modelo Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare.
- Eletroporador, modelo II, Invitrogen.
- Espectrofluorímetro, modelo Cary Eclipse, Varian.
- Espectrofotômetro, modelo Genesys 6, Thermo Scientific.
- Espectropolarímetro, modelo J-720, Jasco.
- Estufa de CO₂ para cultura celular, modelo 3158, Farma Scientific.
- Estufa para cultura bacteriana, modelo Q-316B, Quimis.
- Filmes radiográficos, Kodak Dental.
- Filtro Centricon 30, GE Healthcare.
- Fluxo laminar, modelo 2256, Trox.
- Freezer -20°C, Bosch.

- Freezer -80°C, modelo AL880 E, American Lab.
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421, Tecnal.
- Leitor de D.O., modelo Ultrospec 10, Amersham Bioscience.
- Leitor de ELISA, modelo Zenyth 200 st, Antos Labtec Instruments GmbH.
- Microondas, LG.
- Microscópio de fluorescência invertido, Carl Zeiss.
- Microscópio eletrônico de varredura, modelo XL200, Phillips.
- Microscópio óptico Axio Imager A1, Carl Zeiss.
- 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.
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Thermolyne.
- Sistema semi-seco de eletrotransferência, Sigma-Aldrich.
- Sonicador, modelo 3000, Biologics.
- Transiluminador, modelo Mocrouve, Hoefer.
- Vaso de alta pressão, modelo R4-6-40 e bomba, modelo P40, High Pressure Equipment.

3.1.2. Reagentes e soluções

- Ácido acético glacial, Merck.
- Ácido clorídrico, Merck.
- Acrilamida, Reagen.
- Ágar, Difco.
- Agarose, BioAgency.
- Ampicilina, Bayer.
- Bis-acrilamida, BioAgency.
- Bis-ANS, Sigma-Aldrich.
- Brometo de etídio, Bio Basic.
- BSA, Sigma-Aldrich.
- Canamicina, Invitrogen.

- Casaminoácidos, BD.
- Cloreto de cálcio, Sigma-Aldrich.
- Cloreto de sódio, Synth.
- Comassie brilliant Blue G-250, Sigma-Aldrich.
- Deoxicolato de sódio, Sigma-Aldrich.
- Dimetilssulfóxido, Merck.
- 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.
- Padrão de massa molecular, GE Healthcare.
- PEG 600, Sigma-Aldrich.
- Persulfato de amônio, BioAgency.
- Sacarose, In Lab.
- SDS, Êxodo Científica.
- SBF, Gibco.
- BSA, Sigma-Aldrich.
- Sulfato de magnésio, Synth.
- Sulfato de níquel, GE Healthcare.
- Sulfato de potássio, Synth.
- Temed, BioAgency.
- Triptona, Difco.
- Tris, Vetec.
- Triton X-100, Sigma-Aldrich.

- Tubo de diálise, Sigma-Aldrich.
- Tween-20, Merck.
- Uréia, Polyscience.

3.1.3. Linhagem celular bacteriana

A cepa de *E. coli* utilizada para a expressão das proteínas CTB e RGFA foi a BL-21(DE3) pLysS: [F⁻, amp^rT, hsdS_b (r_B⁻ m_B⁻), gal, dcm λ (DE3)] (Novagen EMD Biosciences, Inc.).

3.1.4. Linhagem celular eucariota

A linhagem celular HEK-293 foi utilizada para os ensaios de atividade biologia da RGFA. Esta linhagem é oriunda de rim de embrião humano que possui a região E1 do genoma do adenovírus humano do tipo 5 integrada no seu genoma (Graham *et al.*, 1977). A HEK-293 é usada na obtenção de adenovírus recombinantes que não possuam os genes E1 e E3, fornecendo o produto dos mesmos *in trans* e viabilizando a replicação desses adenovírus. As células foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC: CRL-1573).

3.1.5. Vetores plasmídicos

pAE-ctxB: vetor de expressão descrito no artigo Arêas *et al.*, 2002 (Arêas *et al.*, 2002), clonado no laboratório do Dr. Paulo Lee Ho, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. Este plamídeo consiste no vetor pAE que contém o gene codificador da subunidade B da toxina colérica (ctxB).

pET28b: vetor de expressão que contém clonado o gene codificador da região globular da fibra de adenovírus sorotipo 2. Construído previamente pelo Dr. Luis Ernesto Farinha Arcieri do laboratório de Vetores Virais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.2. Métodos

3.2.1. Transformação e expressão

As cepas BL21(DE3) de *E. coli* foram transformadas por eletroporação, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do eletroporador (Invitrogen) e em seguida plaqueadas em meio ágar LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l NaCl e 15 g/l de ágar), contendo o antibiótico adequado (tabela 2). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C por 16 horas. As colônias transformantes foram escolhidas aleatoriamente e repicadas em 15 ml de meio rico 2HKII (20 g/l de triptona, 10 g/l de extrato de levedura, 4 g/l de casaminácidos, 0,8 g/l de sulfato de magnésio, 0,08 g/l de cloreto de cálcio, 3,1 g/l de sulfato de potássio e 320 µl/l de solução traço de metais) na presença do antibiótico específico e mantidas em incubadora a 37°C com agitação de 200 rpm. Este volume foi então diluído em 250 ml de meio de cultura rico, em erlenmeyer de 1000 ml, contendo o antibiótico específico e mantidas a 200 rpm a 37°C até atingirem a densidade óptica (D.O._{600 nm}) de 3,0. As culturas foram então induzidas pela adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em concentração final de 0,5 mM e incubadas às temperaturas de 20°C, 30°C e 37°C com agitação por mais 16 horas.

Tabela 2 – Antibióticos utilizados para expressão dos genes alvos.

Proteína	Antibiótico
CTB	Ampicilina (100 µg/ml)
RGFA	Canamicina (30 µg/ml)

3.2.2. Lavagem dos CI

As suspensões contendo as bactérias foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados insolúveis foram ressuspensos em tampão A₁ adequado para cada proteína (tabela 3) e 50 µg/ml de lisozima foi adicionada às soluções. As suspensões foram então incubadas em

temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida foram sonicadas na presença de 0,1 % de deoxicolato de sódio por 5 períodos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos a 60 Hz em banho de gelo. As suspensões contendo os CI foram lavadas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados insolúveis foram ressuspensos em tampão A₂ (tabela 3). As suspensões foram novamente sonicadas e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. O procedimento de lavagem dos CI foi repetido mais uma vez. Após a lavagem, os CI foram ressuspensos em tampão A₃ adequado para cada proteína (tabela 3). A suspensão foi sonicada e centrifugada. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e após o término das lavagens, os CI foram ressuspensos em tampão A₃ e armazenados a -20°C.

Tabela 3 – Tampões utilizados nas lavagens dos CI.

Proteína	Tampão A ₁	Tampão A ₂	Tampão A ₃	Tampão de diálise
CTB	100 mM de TrisHCl pH 8,5 e 5 mM de EDTA	100 mM de TrisHCl pH 8,5, 5 mM de EDTA e 0,1 % de deoxicolato de sódio	50 mM de TrisHCl pH 8,5 e 1 mM de EDTA	50 mM de TrisHCl pH 8,5
RGFA	100 mM de TrisHCl pH 8,0 e 5 mM de EDTA	100 mM de TrisHCl pH 8,0, 5 mM de EDTA e 0,1% de deoxicolato de sódio	50 mM de TrisHCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA	50 mM de TrisHCl pH 8,0

3.2.3. Solubilização dos CI

As suspensões dos CI da RGFA, obtidas do cultivo de *E. coli* nas temperaturas de 20°C, 30°C e 37°C, foram ajustadas para uma D.O. de 0,5 (A_{350nm}) e diluídas em tampão A₃ (tabela 3) contendo concentrações crescentes de GdnHCl (0 a 6 M). As reações foram deixadas incubando por 67 horas em temperatura ambiente para atingir equilíbrio. O efeito do desnaturante na solubilização dos CI foi monitorado pelas mudanças de absorbância a 350 nm em um espectrofotômetro.

3.2.4. Pressurização dos CI

Amostras de 1 ml da suspensão dos CI com D.O. de 1 para a CTB e 2 para a RGFA (A_{350nm}) 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 (figura 11) e submersos em uma mistura de água e óleo. O vaso foi fechado e pressurizado a 2,4 kbar utilizando um compressor de ar ligado a uma bomba capaz de injetar óleo no vaso de pressão. As amostras foram submetidas a diversas condições de compressão/descompressão (tabela 4). Após a descompressão, as amostras foram retiradas dos recipientes plásticos e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos para a remoção de agregados insolúveis. Os sobrenadantes foram dialisados contra tampão adequado para cada proteína (tabela 3) e centrifugados novamente para a remoção de agregados. As frações solúveis foram estocadas a -20°C para posterior análise.

Figura 11 – Vaso de Pressão.

Tabela 4 – Condições de pressão e descompressão.

Condição	Esquema de Pressão/Descompressão
A	2,4 kbar por 1,5 horas, descompressão direta e incubação em pressão atmosférica por 16 horas
B	2,4 kbar por 16 horas e descompressão direta
C	2,4 kbar por 1,5 horas, descompressão em degraus e incubação em pressão atmosférica por 16 horas
D	2,4 kbar por 1,5 horas, descompressão para 0,8 kbar por 16 horas e descompressão direta
E	2,4 kbar por 1,5 horas, descompressão para 0,4 kbar por 16 horas e descompressão direta
F	2,4 kbar por 1,5 horas, descompressão para 0,2 kbar por 16 horas e descompressão direta.

3.2.5. Agentes solubilizantes e de óxido-redução

Com a finalidade de otimizar o protocolo de renaturação sob alta pressão hidrostática, agentes solubilizantes e um par óxido-redutor foram adicionados ao tampão A₃ utilizado nas suspensões dos CI da CTB e da RGFA. O GdnHCl e a L-arginina foram utilizados como agentes solubilizantes. Os reagentes glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), em uma concentração total de 10 mM, foram utilizados como par óxido-redutor e as proporções de cada uma das glutatonas foram variadas. As proporções de GSH e GSSG testadas foram respectivamente: 1:9; 1:4; 1:2; 2:3; 1:1; 3:2; 2:1; 4:1 e 9:1. Como controle utilizou-se a suspensão sem adição destes agentes e na qual não foi aplicada alta pressão. Os sobrenadantes das amostras pressurizadas na presença de glutatonas, GdnHCl e L-arginina foram dialisados contra tampão de diálise apropriado (tabela 3) para a remoção destes reagentes, centrifugados e congelados para posterior análise.

3.2.6. Aditivos

Também foi testada a utilidade da presença de aditivos no rendimento de renaturação das proteínas estudadas submetidas à alta pressão hidrostática. Os aditivos testados foram os normalmente utilizados nos processos tradicionais de renaturação: NaCl (0,15 M), L-arginina (0,5 M), L-arginina (0,5 M) com GdnHCl (1,5 M), Glicose (1 M), Sacarose (1 M), PEG 6000 (0,1 %), Glicerol (2,5 M), Tween 20 (1 mM), Triton X-100 (0,5 mM), e o Bis-ANS (10 vezes a concentração molar de cada proteína). Como controle foi utilizada a suspensão sem adição destes aditivos e também uma amostra na qual não foi aplicada alta pressão. Os sobrenadantes das amostras foram dialisados contra tampão de diálise apropriado (tabela 3), centrifugados e congelados para posterior análise.

3.2.7. Concentração proteica na suspensões de CI submetidas à alta pressão hidrostática

Com o intuito de otimizar o rendimento de renaturação da CTB, foram utilizadas diferentes concentrações proteicas dos CI desta proteína nas amostras submetidas à alta pressão hidrostática. As concentrações proteicas testadas foram: 1920 µg/ml, 960 µg/ml, 480 µg/ml, 240 µg/ml, 120 µg/ml, 60 µg/ml, 30 µg/ml. Os sobrenadantes das amostras pressurizadas na presença do aditivo já padronizado no ensaio anterior foram dialisados contra tampão de diálise apropriado (Tabela 3), centrifugados e congelados para posterior análise.

3.2.8. Dissociação de agregados proteicos sob alta pressão hidrostática

Para a análise de dissociação dos CI submetidos a altas pressões hidrostáticas em tempo real, foram realizadas medidas de espalhamento de luz na faixa visível em espectrofluorímetro acoplado a uma célula equipada com três janelas de zafira (ISS) conectada a um gerador de pressão (figuras 12 e 13). As suspensões de CI da CTB e da RGFA foram colocadas em cubetas de quartzo fechadas com tampas flexíveis de silicone (figura 14) e colocadas em célula resistente à alta pressão, preenchida

com etanol. As medidas de espalhamento de luz (excitação em 320 nm e varredura entre 300 e 350 nm) foram realizadas durante a pressurização a 2,4 kbar das amostras de CI até as leituras de espalhamento de luz se estabilizarem.

Figura 12 – Espectrofluorímetro conectado a um gerador de pressão.

Figura 13 – Espectrofluorímetro acoplado a uma célula resistente à alta pressão equipada com janelas de zafira.

Figura 14 – Cubeta de quartzo fechada com uma tampa de silicone.

3.2.9. Dissociação de agregados proteicos em temperaturas negativas

A dissociação dos agregados proteicos sob alta pressão associada à utilização de temperaturas negativas foi avaliada pela queda nos valores de espalhamento de luz. Estas medidas foram realizadas em espectrofluorímetro acoplado a uma célula de alta pressão conectada a um gerador de pressão e a um banho termostaticado. Assim, suspensões de CI da CTB foram submetidas a patamares de pressão de 0,5 até 3,0 kbar a 20°C e mantidas nestas condições durante 10 minutos (tempo suficiente para a leitura de espalhamento de luz se estabilizar). Após este período, a temperatura foi diminuída gradualmente de 20°C até -10°C durante a pressurização a 3,0 kbar e por fim retornou-se para a pressão atmosférica. Para realizar as leituras de espalhamento de luz sob altas pressões, as amostras de CI foram colocadas em cubetas de quartzo fechadas com tampas flexíveis de silicone e colocadas em célula resistente à alta pressão, preenchida com etanol. As medidas de espalhamento de luz (excitação em 320 nm e leituras entre 300 e 350 nm) foram realizadas enquanto as amostras se encontraram em alta pressão e após o retorno a pressão atmosférica.

3.2.10. MEV

A magnitude de desagregação e possíveis mudanças no tamanho e morfologia dos CI submetidos à ação da pressão (2,4 kbar) foram visualizadas por MEV. Para tal análise, os CI antes da pressurização e também os precipitados que

permaneceram insolúveis após pressurização foram lavados com água destilada para a retirada do TrisHCl da solução tampão com a finalidade de evitar a formação de cristais. Após a lavagem, 50 µl dos precipitados foram aplicados em porta-amostras e secados em dessecador por 16 horas. As amostras receberam então um banho de ouro a 38 mA por 120 segundos e foram visualizadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura operando a 15 kV.

3.2.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise das amostras renaturadas (sobrenadantes após pressão) foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições não redutoras, devido ao fato de se tratarem de proteínas com estrutura quaternária. As corridas eletroforéticas foram realizadas seguindo o protocolo de Laemmli (1970). Nas alíquotas das proteínas foi adicionado um tampão de amostra diferenciado (com 0,1 % de SDS) e as amostras não foram fervidas e não houve a adição de DTT. No caso da análise das proteínas nos CI, as suspensões foram submetidas a aquecimento em tampão em condição redutora (1M de DTT) e fervidas por 5 minutos antes da aplicação no gel de eletroforese. Os géis de poliacrilamida utilizados possuíam 12 % de concentração e o tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina. As condições de corrida foram: 90V de voltagem e 70 mA de corrente. Finalizada a corrida, os géis foram corados com Comassie Blue G-250 e descorados em solução descorante de ácido acético glacial a 10 %. Para realização de *western blot* os géis não foram corados e seguiram para transferência.

A quantificação das proteínas de interesse foi realizada pela análise dos géis de eletroforese pela comparação com uma curva padrão de soroalbumina bovina pura. A determinação da porcentagem de solubilização de cada amostra foi realizada pela comparação da banda obtida com a banda referente ao mesmo volume da suspensão de CI. A análise das bandas nas fotografias dos géis de eletroforese foi realizada utilizando-se o programa Image J.

3.2.12. Western Blot

Para o *western blot* as amostras foram submetidas a SDS-PAGE 12 % e em seguida foram transferidas por eletroeluição para uma membrana de nitrocelulose umedecida com tampão de transferência (0,3 % de glicina, 0,6 % de Tris, 0,04 % de SDS e 20 % de metanol). A corrente foi fixada de acordo com a área do gel (0,85 mA por cm²) e a transferência total das proteínas ocorreu durante 1,5 horas. Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante 1 hora a 4°C em tampão de bloqueio TBS (10 mM de TrisHCl pH 7,5 e 0,9 % de NaCl) e 5 % de leite desnatado. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti His-tag (diluição 1:3000) Sigma em T-TBS (TBS+0,1 % de tween 20) e 5 % de leite desnatado, sob agitação por 16 horas a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem T-TBS e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (diluição 1:2000) Sigma durante 1 hora sob agitação. A membrana foi lavada novamente com T-TBS e a análise da reação foi realizada utilizando-se um kit de quimioluminescência (Imobilon, Millipore). A membrana foi então exposta a filmes de radiografia que foram revelados.

3.2.13. Quantificação de proteínas

As concentrações proteicas totais das amostras renaturadas foram determinadas através de três técnicas de medição. A primeira consiste na utilização do reagente de Bradford (Bradford, 1976), método colorimétrico medido no comprimento de onda de 595 nm utilizando albumina bovina sérica (BSA) pura como padrão. Este método foi utilizado para a quantificação das proteínas utilizadas nos ensaios biológicos e para as amostras purificadas por cromatografia de afinidade.

O segundo método baseia-se na leitura da absorbância direta da proteína a 280 nm baseando-se na predição da massa molecular e coeficiente de extinção da proteína obtidos com a ferramenta ProtParam Tool (ExPASy <http://www.expasy.ch>). Este método foi utilizado para a quantificação das proteínas utilizadas nos ensaios de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca do triptofano.

A terceira técnica baseia-se na análise das bandas correspondentes às proteínas de interesse em fotografias digitais dos géis de eletroforese. Esta análise foi realizada utilizando-se o programa Image J para determinação de rendimentos de

renaturação das proteínas submetidas a alta pressão, considerando como 100% a quantidade de proteína nos CI.

3.2.14. Purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados.

Amostras renaturadas da CTB foram submetidas a purificação por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel His Trap HP (GE Healthcare) de 1 ml carregada com sulfato de níquel (NiSO_4) e bomba peristáltica (GE Healthcare). O fluxo utilizado foi o de 1 ml por minuto e a coluna foi pré-lavada com 5 volumes de tampão TrisHCl 50 mM, pH 8,5 contendo 0,5 M de NaCl e 40 mM de imidazol. As amostras, no mesmo tampão, foram aplicadas na coluna de purificação. A resina foi lavada com 5 volumes do tampão TrisHCl 50 mM, pH 8,5 contendo 0,5 M de NaCl e 60 mM de imidazol para retirar ligantes fracos ou proteínas que não se ligaram à matriz. A CTB foi eluída em 10 volumes do mesmo tampão contendo 500 mM de imidazol e posteriormente dialisada em TrisHCl 50 mM pH 8,5. As amostras resultantes foram submetidas à análise de Bradford para quantificação proteica e determinação da fração de interesse. 2 ml das amostras purificadas foram concentradas em filtros centricon 30 (GE Healthcare). As amostras foram lavadas com tampão 50 mM de TrisHCl pH 8,5 e centrifugadas durante 15 minutos, 3000 g a 4°C até que o volume da CTB purificada fosse reduzido a 500 µl. Esta amostra seguiu para purificação por cromatografia de exclusão molecular.

3.2.15. Purificação por cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular em HPLC foi realizada utilizando-se uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) de 24 ml ambientada em tampão 50 mM de TrisHCl pH 8,5 acoplada ao sistema ÄKTA. Após a concentração das amostras da CTB por cromatografia de afinidade, 500 µl de amostra foram injetados na coluna. O fluxo utilizado foi de 0,8 ml por minuto e foram coletadas frações de 500 µl. As amostras foram detectadas por absorbância em UV em comprimento de onda de 220 nm e 280 nm.

3.2.16. Dicroísmo circular

A determinação da estrutura secundária da CTB foi realizada através de dicroísmo circular em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Inc.). Foi utilizada CTB pura e renaturada pela alta pressão hidrostática na concentração de 5 μM . Os espectros foram coletados entre os comprimentos de onda de 195 a 260 nm a 22°C, de 0,5 em 0,5 nm, a uma velocidade de 50 nm.min⁻¹, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 0,1 mm de caminho óptico.

3.2.17. Fluorescência intrínseca do triptofano

Estudos de emissão intrínseca de fluorescência do triptofano da CTB foram realizados no espectrômetro de fluorescência Cary Eclipse, utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As amostras foram excitadas a 285 nm e a emissão da fluorescência foi monitorada no intervalo de 300 - 400 nm. Para os estudos de desnaturação química, a amostra de CTB purificada (1 μM) foi diluída em uma solução contendo uma concentração desnaturante de uréia (8 M) e incubada por 2 horas sob agitação. Após este período, a medida de fluorescência do triptofano foi realizada.

3.2.18. Determinação de ligação ao receptor da CTB

A análise da funcionalidade da proteína CTB foi realizada pelo ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent assay*) (Areas *et al.*, 2004). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μl de GM1 ou BSA (2 $\mu\text{g/ml}$) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida por 4 horas. As placas foram lavadas duas vezes com tampão PBS (2,7 mM de cloreto de potássio, 137 mM de cloreto de sódio, 8,1 mM de fosfato dibásico de sódio e 1,5 mM de fosfato monobásico de potássio) e a cada poço foram adicionados 200 μl de tampão de bloqueio PBS contendo BSA a 2 %. As placas foram incubadas por 16 horas a 4°C em atmosfera úmida. Posteriormente, as placas foram lavadas duas vezes com PBS. Diluições seriadas das proteínas renaturadas ou BSA (100 μl) em tampão PBS contendo 2 % de BSA foram aplicadas aos poços e

a placa foi incubada por 2 horas a 37°C em atmosfera úmida. Proteínas não ligadas foram removidas das placas mediante a realização de quatro lavagens com T-PBS (PBS contendo 0,05 % de tween). A detecção da ligação da CTB ao receptor foi realizada pela aplicação de 100 µl de um anticorpo policlonal de coelho anti-CTB (Sigma - diluição 1:1000 em tampão de bloqueio) seguido de incubação da placa por 90 minutos e lavagens com T-PBS. Um volume de 100 µl do anticorpo anti-IgG (Sigma - diluição 1:2000 em tampão de bloqueio) de coelho conjugado a peroxidase foi então aplicado aos poços por 1 hora. As placas foram lavadas e a determinação da presença de proteína CTB ligada ao receptor foi realizada pela aplicação de solução de o-fenilenodiamina (OPD) (24,4 mM de ácido cítrico; 48,8 mM de Na₂HPO₄; 10 mg de OPD; 0,03 % de H₂O₂). As placas foram incubadas por 10 minutos no escuro e foram adicionados 25 µl de H₂SO₄ a 2 M para parar a reação. A absorbância de cada poço foi medida em comprimento de onda de 492 nm.

3.2.19. Determinação de atividade biológica da RGFA

A atividade biológica da RGFA foi determinada pela inibição de infecção por adenovírus contendo o gene da EGFP (Adeno-EGFP), por meio da competição pela ligação ao receptor celular CAR em células HEK-293 de acordo com o protocolo já descrito (Muotri *et al.*, 2002). As células HEK-293 (1x10⁵ células) foram cultivadas em placas de 24 poços durante 24 horas. Em seguida, as células foram infectadas com o Adeno-EGFP a uma multiplicidade de infecção (MOI) de ~1, em presença da RGFA ou BSA. Foram utilizados três controles: células incubadas só com vírus, células incubadas só com a proteína e células não tratadas. Todos os tratamentos foram realizados por duas horas, em meio de cultivo suplementado com 2 % de soro fetal bovino (SFB). Finalizado este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas em meio suplementado com 5 % de SFB por 72 horas. Para a visualização da expressão da EGFP internalizada nas células utilizou-se microscópio de fluorescência e filtro adequado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Subunidade B da toxina colérica (CTB)

4.1.1. Expressão em diferentes temperaturas da CTB

A expressão da proteína CTB recombinante foi realizada a partir de bactérias transformadas com o vetor pAE-ctxB (Areas *et al.*, 2002). Este vetor expressa a proteína CTB com uma cauda de histidina na porção N-terminal, o que facilita a sua purificação devido à afinidade deste peptídeo por níquel imobilizado em resina. O meio utilizado para a expressão foi o 2HKII, um meio rico que possibilita a obtenção de alta densidade celular e também altos níveis de expressão de proteínas recombinantes (Chura-Chambi, 2009).

Para verificar se a expressão da proteína CTB recombinante em *E. coli* BL21(DE3) resulta na formação de agregados insolúveis, alíquotas das frações solúveis (após a lise das bactérias) e das frações insolúveis (CI) de extratos celulares de bactérias cultivadas em diferentes temperaturas foram analisadas em gel de poliacrilamida (figura 15). Foram observadas bandas da proteína correspondendo à massa molecular da CTB recombinante. A CTB recombinante possui mobilidade eletroforética anômala e possui massa molecular aparente de ~15 kDa. Nota-se que mesmo antes da indução da expressão por IPTG, há presença de CTB, indicando um ligeiro escape da expressão (figura 15A – coluna 1). Os resultados também demonstram que a CTB é expressa majoritariamente na forma de precipitados insolúveis, independentemente da temperatura de expressão utilizada, já que não se observa CTB na fração solúvel (figura 15B). A expressão desta proteína na forma de CI já foi relatada na literatura por diversos autores (L'hoir *et al.*, 1990; Areas *et al.*, 2002; Bublin *et al.*, 2007).

A quantidade de CTB produzida na fração insolúvel nas três diferentes temperaturas foi muito similar, indicando que mudanças na temperatura de expressão não afetaram o nível de expressão. Em vista disto, optou-se por expressar a CTB na menor temperatura analisada (20°C), considerando que a renaturação de CI produzidos em *E. coli* cultivada em baixas temperaturas produz

agregados mais solúveis e com proteínas apresentando estruturas mais similares às nativas, possibilitando maiores rendimentos de obtenção de polipeptídeos ativos do que quando são empregadas temperaturas mais altas (de Groot e Ventura, 2006). Foi demonstrado na literatura que o cultivo em altas temperaturas promove a formação de agregados mais estáveis, pois esta condição favorece interações intermoleculares à custa de contatos intramoleculares nativos (Carrio *et al.*, 2005).

Figura 15 – Extratos celulares de *E. coli* contendo o plasmídeo de expressão pAE-ctxB. **A)** Análise da expressão da proteína CTB em diferentes temperaturas. M- Marcador de massa molecular; 1- Expressão não induzida (sem IPTG); 2- Extrato celular total produzido a 20°C; 3- Extrato celular total produzido a 30°C; 4- Extrato celular total produzido a 37°C. **B)** Análise das frações solúveis e insolúveis da expressão da proteína CTB em diferentes temperaturas. M- Marcador de massa molecular; 1- Fração solúvel produzida a 20°C; 2- Fração insolúvel produzida a 20°C; 3- Fração solúvel produzida a 30°C; 4- Fração insolúvel produzida a 30°C; 5- Fração solúvel produzida a 37°C; 6- Fração insolúvel produzida a 37°C. Foram aplicadas alíquotas correspondentes a 0,1 de D.O. de suspensões bacterianas (A_{600nm}).

4.1.2. Efeito das diferentes proporções de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) na renaturação da CTB

Qualquer processo de renaturação de proteínas invariavelmente inicia-se pela solubilização dos agregados insolúveis. Um dos fatores que podem dificultar a renaturação de proteínas a partir de agregados insolúveis é a presença de pontes de

dissulfeto não nativas. Quanto maior o número de pontes dissulfeto, maior deverá ser a dificuldade de renaturação de uma proteína, devido à formação de pontes intermoleculares e intramoleculares não nativas, o que leva à agregação. O interior das células bacterianas é um ambiente redutor, assim as pontes dissulfeto das proteínas agregadas em CI permanecem como cisteínas livres. Quando os CI são purificados a partir destas células, as cisteínas são oxidadas, formando pontes dissulfeto intermoleculares e intramoleculares não nativas. Para desagregar os CI com pontes dissulfeto cruzadas, agentes oxidantes e redutores devem ser adicionados ao tampão de renaturação para facilitar a formação e dissociação destas ligações (St John *et al.*, 2002). *In vitro*, a razão apropriada de cada um dos agentes oxidante ou redutor do par redox e sua concentração podem variar para cada proteína. No caso da ausência de pontes dissulfeto na proteína nativa, agentes redutores podem ser adicionados para prevenir a formação de pontes não nativas durante o enovelamento (Clark *et al.*, 1998).

Cada monômero da CTB possui uma ponte dissulfeto intramolecular entre Cys⁹ e Cys⁸⁶. Deste modo, para estabelecer a melhor condição para romper as pontes dissulfeto não nativas e possibilitar a formação de pontes dissulfetos nativas, foi adicionado ao tampão 10 mM de GSH e GSSG em diferentes proporções. Considerando que as pontes de hidrogênio são outro tipo de ligação que não são rompidas pela ação de alta pressão, o reagente GdnHCl em concentração que normalmente não é desnaturante (1,5 M) também foi adicionado ao tampão. 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. Após a descompressão, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi dialisado para a retirada do agente caotrópico e do par redox.

O efeito das diferentes proporções dos agentes oxidante e redutor na solubilização da CTB submetida à alta pressão hidrostática é mostrado na figura 16.

Nota-se que a condição de renaturação em que o tampão continha 1 de GSH : 9 de GSSG (coluna 1) foi a que apresentou melhor rendimento de CTB solúvel na forma oligomérica quando comparada com as outras condições. A amostra na presença da proporção 9 de GSH : 1 de GSSG (coluna 9) e a amostra na ausência do par redox (coluna 10) não apresentaram CTB monomérica tampouco pentamérica. Em quase todas as condições testadas observou-se a presença de

grande porcentagem de CTB monomérica, indicando que parte das moléculas solubilizadas pela alta pressão não se associaram na forma de pentâmeros. A condição 1 de GSH : 9 de GSSG foi a utilizada nos ensaios subsequentes de pressurização.

Figura 16 – Efeito da presença de diferentes proporções de GSH e GSSG na renaturação dos CI da CTB submetidos à alta pressão. M- Marcador de massa molecular; Amostras 1 a 9, proporções de GSH:GSSG; 1- 1:9; 2- 1:4; 3- 1:2; 4- 2:3; 5- 1:1; 6- 3:2; 7- 2:1; 8- 4:1; 9- 9:1; 10- Ausência de glutatonas; 11- CI em condição redutora.

4.1.3. Efeito de diversos aditivos na solubilização e renaturação da CTB

A formação de agregados e espécies incorretamente enoveladas é a principal causa da diminuição do rendimento de renaturação. Uma estratégia muito eficiente para suprimir a formação destes estados proteicos é a inibição de interações intermoleculares que levam à agregação (Clark, 2001). Sabe-se que a adição de compostos químicos, como baixas concentrações de agentes caotrópicos, aminoácidos, surfactantes e osmólitos pode ser uma ferramenta muito útil para modular a termodinâmica e a cinética das reações que ocorrem sob altas pressões hidrostáticas (Kim *et al.*, 2006). Contudo, somente a adição de GdnHCl ou uréia é insuficiente e outros co-solutos devem ser utilizados. Sem eles, o processo de renaturação pode gerar uma variedade de moléculas enoveladas incorretamente (Tsumoto *et al.*, 2003).

Estas pequenas moléculas são relativamente fáceis de serem removidas da solução e podem ser classificadas em dois grupos de acordo com sua influência no processo de renaturação. Alguns aditivos auxiliam na renaturação e outros atuam como supressores de agregação, reduzindo a associação de intermediários de conformação sem interferir com o processo de renaturação (Tsumoto *et al.*, 2003). Os aditivos mais comumente utilizados nos processos de renaturação são: L-arginina (0,4 a 1 M), baixas concentrações de agentes caotrópicos como o GdnHCl (0,5 a 1,5 M) e a uréia (1 a 2 M) e surfactantes (como o triton X-100, SDS, tween 20). Os surfactantes como triton X-100 e tween 20 minimizam as interações hidrofóbicas proteína-proteína, que podem levar à agregação. Sacarose, glicose, glicerol e polietilenoglicol (PEG) estabilizam os estados protéicos mais compactos. Sais como o NaCl elevam a força iônica do meio e sua presença pode ser favorável para o caso de proteínas que são sensíveis à baixa força iônica. Aminoácidos como a L-arginina são classificados tanto como supressores de agregação como agentes solubilizantes (Arakawa e Timasheff, 1982; Tsumoto *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). No entanto, não há nenhum método universal que seja eficaz para impedir a reagregação e promover a renaturação de todas as proteínas. Consequentemente, uma grande variedade de condições precisa ser testada para identificar quais aditivos irão auxiliar na renaturação da proteína agregada para a forma nativa (Cowan *et al.*, 2008).

Para avaliar se a solubilização e a renaturação da CTB poderiam ser otimizadas, alguns aditivos foram adicionados à solução contendo os CI da CTB. Os reagentes GdnHCl (1,5 M) e 1 GSH: 9 GSSG (10 mM) também foram adicionados ao tampão. Estas alíquotas foram pressurizadas a 2,4 kbar por 16 horas e a descompressão foi realizada em degraus de 0,4 kbar a cada 30 minutos. O efeito da presença de alguns aditivos na renaturação da CTB pode ser visualizado na figura 17.

CTB solúvel e pentamérica foi obtida quando se utilizaram os aditivos NaCl (coluna 1), tween 20 (coluna 8) e triton X-100 (coluna 9). A amostra que não continha aditivos (coluna 11) apresentou grande porcentagem da forma monomérica da CTB, mas ausência da sua forma pentamérica, indicando que a presença de alguns aditivos (principalmente os surfactantes) é necessária para a formação do oligômero da CTB.

O melhor rendimento de CTB pentamerizada foi obtido na presença do tween 20. O tween 20 é um surfactante não-iônico que minimiza as interações hidrofóbicas que podem levar à agregação, afetando a estabilidade da proteína em solução. A ligação do surfactante a intermediários de conformação proteicos previne a agregação durante o processo de renaturação, possivelmente pela interação das moléculas do surfactante com as superfícies hidrofóbicas expostas da proteína que levam a interações intermoleculares (Bam *et al.*, 1996; Bam *et al.*, 1998). Vários relatos na literatura comprovam a eficácia do tween 20 em melhorar o rendimento de renaturação de diversas proteínas (Bam *et al.*, 1996; Bam *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2006; Machida *et al.*, 2000). Lee e colaboradores (2006) demonstraram que o tween 20 é um aditivo que induz a formação de espécies oligoméricas de diversas proteínas, fato que corrobora os resultados encontrados no presente estudo. Desta forma, o surfactante tween 20 atuaria como uma chaperona molecular, prevenindo a associação incorreta de intermediários de conformação e melhorando os rendimentos de renaturação da CTB.

A análise por *western blot* do efeito do tween 20 na renaturação da CTB revelou a presença de diferentes formas oligoméricas (figura 18 - colunas 2 e 3). Observamos que o tratamento com alta pressão hidrostática juntamente com a ação do tween 20 favoreceu a formação de intermediários oligoméricos, além da CTB pentamérica. Neste ensaio também foi avaliado outro esquema de descompressão além da descompressão em degraus, onde os CI da CTB foram comprimidos a 2,4 kbar durante 1,5 horas e sofreram descompressão para 0,4 Kbar, condição em que as suspensões foram incubadas por 16 horas antes da completa descompressão. Observou-se que o esquema utilizado nos ensaios anteriores (com descompressão em degraus - coluna 2) foi o que apresentou a forma pentamérica da CTB, demonstrando que a aplicação do nível de pressão intermediária (0,4 kbar) provavelmente não foi eficaz na renaturação da forma ativa da CTB.

Figura 17 – Efeito da presença de diferentes aditivos na solubilização e renaturação da CTB a partir de CI submetidos à alta pressão na presença de 1 GSH: 9GSSG e 1,5 M de GdnHCl. M- Marcador de massa molecular; 1- 0,15 M NaCl; 2- 0,5 M L-arginina sem GdnHCl; 3- 0,5 M L-arginina; 4- 1 M Glicose; 5- 1 M Sacarose; 6- 0,1 % PEG; 7- 2,5 M Glicerol; 8- 1 mM Tween 20; 9- 0,5 mM Triton; 10- 6,7 mM Bis-ANS; 11- Amostra sem aditivos; 12- CI em condição redutora.

Figura 18 – Efeito do tween 20 na solubilização e renaturação da CTB submetida a diferentes esquemas de descompressão. Todas as amostras continham 1 GSH: 9GSSG e 1,5 M de GdnHCl. 1- Amostra contendo 1 mM de tween 20 e descompressão em degraus; 2- Amostra contendo 1 mM de tween 20 e descompressão para 0,4 Kbar por 16 horas; 3- Amostra com 1 mM de tween 20 (amostra reduzida).

4.1.4. Efeito da alta pressão hidrostática na dissociação dos CI da CTB

A alta pressão hidrostática é um método eficiente para dissociar complexos macromoleculares porque, dependendo do nível aplicado, não provoca alterações profundas na estrutura secundária ou terciária (Silva *et al.*, 2006). Para determinar o efeito da alta pressão na dissociação dos CI da CTB, uma suspensão de CI contendo 1 mM de tween 20 foi submetida a uma pressão de 2,4 kbar e o espalhamento de luz (EL) foi monitorado durante 60 minutos (figura 19). Neste e nos próximos ensaios que serão apresentados da CTB, não foram utilizados o par redox GSH e GSSG e o agente caotrópico GdnHCl. Em um ensaio realizado (dados não mostrados) foi comparado o efeito da utilização destes agentes em associação com o tween 20 com a utilização somente do surfactante tween 20. Observou-se que a porcentagem de CTB pentamérica renaturada foi muito similar nos dois ensaios, revelando que somente a presença de tween 20 na solução de CI é necessária para otimizar a renaturação da CTB pentamérica.

Analisando os resultados mostrados na figura 19, observa-se que durante a elevação da pressão o EL decresceu rapidamente e após aproximadamente 10 minutos de compressão houve uma diminuição de 56 % do valor inicial, sugerindo a dissociação dos CI em partículas menores. Após este período, as medidas de EL se estabilizaram, sugerindo que a grande maioria das partículas agregadas sensíveis à ação da alta pressão foram dissociadas com apenas 10 minutos de compressão. A porcentagem de EL residual (44 %) provavelmente representa as partículas resistentes à alta pressão.

Para avaliar a porcentagem de dissociação dos CI da CTB submetidos a 16 horas de alta pressão hidrostática, suspensões dos CI (D.O. de 1) contendo 1 mM de tween 20 foram submetidas a compressão de 2,4 kbar e descompressão direta. Alíquotas do pellet (agregado obtido após centrifugação da fração solúvel) e do sobrenadante (fração solúvel) após o tratamento com a alta pressão foram aplicadas em gel de poliacrilamida e o resultado foi analisado pelo programa Image J. O CI da CTB não submetido à pressão foi considerado como 100 %. Os resultados mostraram que cerca de 36 % da amostra não foi dissociada pela alta pressão ou sofreu reagregação após o retorno da mesma para pressão atmosférica e cerca de 64 % dos CI da CTB foram dissociados nas 16 horas de tratamento em alta pressão

(dados não mostrados). Apesar do tratamento em alta pressão por 16 horas apresentar uma porcentagem de dissociação (64 %) muito similar com a porcentagem obtida com poucos minutos em alta pressão (56 %), acreditamos que a incubação dos CI da CTB por várias horas seja necessária para permitir a renaturação de estados mais estáveis, ou seja, menos propensos a reagregação e capazes de se associar na forma de pentâmeros, elevando consideravelmente o rendimento de renaturação da CTB.

Juntos, estes resultados indicam que os CI da CTB são sensíveis à ação da alta pressão e que poucos minutos de compressão a 2,4 kbar já são efetivos na dissociação dos CI em partículas com menor capacidade de espalhamento de luz.

Figura 19 – Altas pressões hidrostáticas induzem a dissociação dos CI da CTB. Uma suspensão contendo os CI da CTB ($D.O_{350nm}=0,5$) e 1 mM de tween 20 foi submetida a 2,4 kbar de pressão e o espalhamento de luz (EL) foi monitorado em função do tempo. O EL em cada tempo foi dividido pelo valor de EL obtido em pressão atmosférica e multiplicado por 100 (os resultados são apresentados na forma de porcentagem). As medidas de EL foram realizadas em comprimento de onda de excitação de 320 nm e leituras em 300 a 350 nm. A seta indica o momento onde a pressão atingiu 2,4 kbar.

4.1.5. Efeito de diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da CTB

O efeito da alta pressão sobre a dissociação de agregados e de oligômeros é amplamente conhecido (Silva e Weber, 1993). No entanto, a literatura é controversa quando se trata dos níveis ótimos de pressão para a renaturação. Alguns dos estudos realizados com a finalidade de obtenção de renaturação proteica a partir de agregados sugerem que a dissociação dos agregados e sua renaturação para a forma nativa ocorrem nos mesmos níveis de pressão (1,5 a 2,5 kbar) (St John *et al.*, 2001 e 2002). Entretanto, em estudos realizados por Malavasi e colaboradores (Malavasi *et al.*, 2011) utilizando CI da proteína GFP, foi demonstrado que a dissociação dos CI ocorre em 2,4 kbar e a renaturação da GFP, determinada pela elevação da intensidade de fluorescência característica desta proteína (em 509 nm, com excitação em 470 nm) quando na conformação nativa, não ocorre nesse nível de pressão. A renaturação da GFP somente ocorre quando a pressão é liberada para níveis menores após a dissociação dos agregados. O nível de pressão que induziu a dissociação dos agregados de GFP foi 3,5 a 7 vezes maior do que as condições ideais para a renaturação desta proteína monomérica. As condições ideais de pressão para a renaturação da GFP foram: compressão em 2,4 kbar por 30 minutos para a dissociação dos agregados, seguida de descompressão para 0,35 - 0,7 kbar por 16 horas, condição onde ocorre a renaturação da GFP. Finalmente, em estudos realizados com a proteína oligomérica tailspike demonstrou-se que os agregados desta proteína dissociados por altas pressões (2 kbar por 90 minutos) somente renaturaram para o estado nativo trimérico após completa descompressão para pressão atmosférica (Foguel *et al.*, 1999; Lefebvre *et al.*, 2004).

Com o objetivo de elevar o rendimento de obtenção de CTB pentamérica e com base no exposto acima, alguns esquemas de compressão/descompressão foram testados (figura 20). O esquema de compressão a 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão direta e incubação em pressão atmosférica por 16 h (esquema A) foi o mais eficaz para a obtenção de CTB pentamérica, sugerindo que a formação de oligômeros de CTB ocorre preferencialmente em pressão atmosférica. Apesar de a incubação de 1,5 hora em pressão de 2,4 kbar (esquemas A, C, D, E e F) ser eficaz para desagregar os CI da CTB, a incubação neste nível de pressão por um tempo

maior, 16 horas (esquema B) elevou de forma significativa o rendimento de formas monoméricas solúveis. Visando a geração de alta concentração das formas monoméricas solúveis que pudessem interagir para a formação das formas oligoméricas de interesse, a compressão por 16 horas a 2,4 kbar foi utilizada no ensaio subsequente.

Figura 20 – Efeito dos diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da CTB. Todas as amostras continham 1 mM de tween 20 e foram submetidas a alta pressão hidrostática da seguinte forma: A- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão direta e incubação em pressão atmosférica por 16 h; B- 2,4 kbar por 16 h e descompressão direta; C- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão em degraus e incubação em pressão atmosférica por 16 h; D- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão para 0,8 kbar por 16 horas e descompressão direta; E- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão para 0,4 kbar por 16 horas e descompressão direta; F- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão para 0,2 kbar por 16 horas e descompressão direta. **A)** Análise da porcentagem de proteína solúvel monomérica e pentamérica em função do esquema de descompressão utilizado. Para o cálculo das proporções das bandas visualizadas no gel de poliacrilamida (dado não mostrado) foi utilizado o programa Image J. **B)** Análise por *Western Blot* do efeito dos diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da CTB.

4.1.6. Efeito da incubação em pressão atmosférica após pressurização dos CI da CTB

Já foi descrito na literatura (Foguel *et al.*, 1999; Lefebvre *et al.*, 2004) que a renaturação de proteínas com estrutura quaternária ocorre após a descompressão para pressão atmosférica. Em um estudo realizado por Lefebvre e colaboradores (Lefebvre *et al.*, 2004) utilizando a proteína tailspike P22 (homotrímero) como modelo, demonstrou-se que após a aplicação da alta pressão hidrostática (2 kbar) apenas monômeros, dímeros e agregados estavam presentes. No entanto, quando a incubação em pressão atmosférica procedeu por no mínimo 4 dias, observou-se que os monômeros formados em alta pressão pela dissociação dos agregados foram capazes de formar trímeros, elevando o rendimento de proteína oligomérica solúvel. Deste modo, visando avaliar o efeito da incubação por longos tempos em pressão atmosférica na renaturação dos CI da CTB, uma solução contendo os CI (D.O._{350nm}=1) e 1 mM de tween 20 foi submetida a pressão de 2,4 kbar durante 16 horas. A descompressão foi realizada de forma direta e as amostras foram incubadas em pressão atmosférica por vários períodos: 0, 24, 96, 120, 144 e 168 horas e em seguida foram dialisadas contra tampão Tris 50 mM, pH 8,5.

A amostra que não foi incubada em pressão atmosférica e a que permaneceu somente 24 horas nesta condição (figura 21 – colunas 1 e 2, respectivamente) não apresentaram a forma pentamérica da CTB, somente monômeros e outras formas de massa molecular intermediária entre o monômero e o pentâmero de CTB. Em contrapartida, as amostras que foram incubadas durante 96, 120, 144 e 168 horas (colunas 3, 4, 5 e 6, respectivamente) apresentaram a forma pentamérica da CTB. Observou-se também que as formas de menor massa molecular que o pentâmero estão predominantemente presentes nos primeiros períodos analisados em comparação com os períodos de 120, 144 e 168 horas. Portanto, longos períodos (acima de 96 horas) de incubação em pressão atmosférica são necessários para possibilitar a formação de CTB pentamérica, elevando para 17 % o rendimento de proteína solúvel e ativa.

Figura 21 – Efeito da incubação por diferentes tempos em pressão atmosférica a 20°C após a pressurização dos CI da CTB a 2,4 kbar por 16 horas. Todas as amostras continham 1 mM de tween 20. M- Marcador de massa molecular; 1- Amostra não incubada em pressão atmosférica; 2- Amostra incubada por 24 horas em pressão atmosférica; 3- Amostra incubada por 96 horas em pressão atmosférica; 4- Amostra incubada por 120 horas em pressão atmosférica; 5- Amostra incubada por 144 horas em pressão atmosférica; 6- Amostra incubada por 168 horas em pressão atmosférica; 7- CI em condição redutora.

4.1.7. Efeito de diferentes concentrações proteicas na renaturação da CTB

Com a finalidade de verificar se a concentração proteica da suspensão submetida a alta pressão pode influenciar no rendimento de renaturação da forma pentamérica da CTB, diferentes concentrações foram testadas (figura 22). Para isto, as soluções contendo os CI da CTB e 1 mM de tween 20 foram submetidas à pressão de 2,4 kbar durante 16 horas. A descompressão foi realizada de forma direta e as amostras foram incubadas em pressão atmosférica por 168 horas e em seguida foram dialisadas contra tampão Tris 50 mM, pH 8,5. A concentração proteica de 120 µg de CTB/ml corresponde a D.O. de 1 (600 nm) e é a concentração proteica utilizada na maioria dos ensaios anteriores. Como controle foi utilizado a suspensão de CI não submetida à pressão (100 %).

Os resultados demonstram que a elevação na concentração de CTB na suspensão dos CI submetidos à alta pressão elevou em 2,6 vezes o rendimento de

renaturação, em relação à concentração utilizada nos ensaios anteriores. As concentrações de 1920 µg/ml e 960 µg/ml foram as que apresentam maior porcentagem de rendimento de proteína CTB pentamérica, totalizando 44,0 % e 45,6 % de pentâmeros de CTB, respectivamente. Estes resultados sugerem que o rendimento de oligomerização dos monômeros de CTB pode ser elevado utilizando-se maiores concentrações proteicas. Por este motivo, para a purificação da CTB por cromatografia de afinidade foi utilizada a concentração de 960 µg/ml de CI na suspensão.

Figura 22 – Efeito de diferentes concentrações proteicas no rendimento da renaturação dos CI da CTB. Todas as amostras continham 1 mM de tween 20 e foram submetidas a 2,4 kbar de compressão durante 16 horas e descompressão direta. Os resultados são expressos na forma de porcentagem de proteína solúvel pentamérica em função da concentração proteica da suspensão de CI.

4.1.8. MEV dos CI da CTB

Para caracterizar o tamanho e a morfologia dos CI da CTB e avaliar a magnitude da desagregação promovida pela alta pressão hidrostática foi realizada uma MEV (figura 23). Para isto, os CI da CTB foram produzidos a 20°C e ajustados para uma D.O. de 3. As amostras foram pressurizadas a 2,4 kbar durante 16 horas e sofreram

descompressão direta na presença de 1 mM de tween 20. Foram avaliados os CI da CTB antes da aplicação da alta pressão (figura 23A) e a fração de CI da CTB insolúvel após a aplicação da alta pressão (figura 23B). Observa-se que antes da compressão há uma grande concentração de agregados proteicos com morfologia variando de oval a cilíndrica, como já descrito na literatura para CI de outras proteínas (Carrio *et al.*, 2000). O tratamento por pressão nos CI promoveu uma redução muito efetiva na concentração dos mesmos, indicando que a alta pressão hidrostática foi eficaz na desagregação das proteínas agregadas. Nota-se também que a morfologia dos CI submetidos à compressão sofreu modificações, indicando que possivelmente estes agregados insolúveis podem ser produtos da reagregação proteica após o retorno à pressão atmosférica.

Figura 23 – MEV dos CI da CTB. O aumento utilizado foi de 5000 X. **A)** CI antes da pressão e **B)** fração insolúvel dos CI que foram tratados em alta pressão hidrostática.

4.1.9. Temperaturas negativas em associação com alta pressão hidrostática otimizam a dissociação dos CI da CTB

Sob altas pressões o ponto de congelamento da água é abaixado, o que permite estudos dos efeitos da aplicação de altas pressões concomitantemente com temperaturas abaixo de 0°C em soluções aquosas. Em baixas temperaturas as proteínas são levadas a um estado de menor entropia que favorece a interação de aminoácidos não polares com a água (Tsai *et al.*, 2002). Assim, o efeito da alta

pressão em proteínas pode ser potencializado pelo uso de temperaturas negativas, com o aumento da exposição de resíduos hidrofóbicos ao solvente e a dissociação dos agregados. A utilização de baixas temperaturas juntamente com elevadas pressões com o objetivo de aumentar a dissociação dos agregados nos CI foi utilizada pelo nosso grupo de pesquisa para outras proteínas (endostatina e EGFP), aumentando de 30 % a 50 % o rendimento de obtenção das proteínas renaturadas (dados não publicados). Portanto, visando o maior rendimento possível de desagregação das proteínas nos CI, foi avaliado o efeito da aplicação de altas pressões e baixas temperaturas na dissociação dos CI da CTB (figura 24).

A aplicação de baixas temperaturas (-10°C) juntamente com altas pressões (3 kbar) aos CI da CTB induziu uma maior dissociação, visualizada pela queda nos valores de EL. O valor de EL decresceu em cerca de 82 % do valor inicial quando a temperatura de -10°C foi aplicada, representando um incremento de cerca de 26 % de dissociação dos CI da CTB quando submetidos somente à ação da alta pressão. Pelo que é de nosso conhecimento, não foi descrita na literatura a utilização de baixas temperaturas juntamente com a aplicação de alta pressão para a dissociação de CI com o objetivo de elevar o rendimento de renaturação de proteínas. Esses resultados indicam que a aplicação de temperaturas negativas em associação com a alta pressão pode elevar o rendimento de renaturação de CTB. No entanto, os ensaios de renaturação utilizando esta condição não foram realizados devido à impossibilidade de aplicação temperaturas abaixo de zero ao vaso de pressão.

Figura 24 – Efeito da temperatura negativa e alta pressão hidrostática na dissociação dos CI da CTB. (■) EL da suspensão contendo os CI da CTB ($D.O_{350nm}=0,5$) e 1 mM de tween 20 foi monitorado em função da pressão e temperatura. (★) EL obtido após retorno a pressão atmosférica. As medidas de EL foram realizadas em comprimento de onda de excitação de 320 nm e leituras em 300 a 350 nm. Os resultados são apresentados na forma de porcentagem de EL.

4.1.10. Purificação da CTB por cromatografia de afinidade por metais imobilizados.

Para a retirada dos poucos contaminantes de *E. coli* encontrados na solução da proteína após o tratamento com a alta pressão e para a concentração da amostra, foi realizada a purificação da CTB em coluna de níquel (figura 25).

A amostra de CI da CTB (960 $\mu\text{g/ml}$) foi submetida de 2,4 kbar de pressão durante 16 horas, descompressão direta e incubação em pressão atmosférica por 168 horas na presença de 1 mM de tween 20. A CTB foi então dialisada contra tampão Tris 50 mM, pH 8,5 e submetida à purificação.

A purificação por cromatografia de afinidade da CTB se mostrou muito eficiente para a concentração da amostra. A amostra purificada (coluna 2) apresentou uma banda intensa da forma pentamérica. Com relação à retirada dos poucos contaminantes existentes na solução tratada com alta pressão, a amostra purificada não diferiu muito da amostra antes da purificação (coluna 1), demonstrando que a lavagem dos CI da CTB já havia eliminado grande parte das proteínas contaminantes. A amostra purificada e concentrada (coluna 2) apresentou uma mistura de formas da CTB. Por este motivo, uma segunda purificação foi necessária para isolar a forma pentamérica das demais formas da CTB.

Figura 25 – Análise da purificação da CTB por cromatografia de afinidade a níquel. M- Marcador de massa molecular; 1- Amostra não purificada; 2- Amostra purificada; 3- flowthrough; 4- Lavagem.

4.1.11. Purificação da CTB por cromatografia de exclusão molecular

A segunda etapa de purificação da CTB foi realizada em coluna de exclusão molecular em HPLC. O cromatograma desta purificação (figura 26) apresentou três picos bem definidos. O pico principal apresentou um tempo de retenção de 10 minutos (eluiu nos tubos 24, 25 e 26). A análise dos picos obtidos da purificação por exclusão molecular é mostrada na figura 27.

A purificação conseguiu separar a forma monomérica da pentamérica da CTB. A amostra que eluiu no tubo 25 (coluna 4) apresentou grande porcentagem da forma pentamérica da CTB e foi utilizada para os ensaios de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca do triptofano.

Figura 26 – Cromatograma da CTB purificada em coluna de exclusão molecular. A seta indica o volume de retenção observado para o padrão BSA (66 KDa). A linha vermelha representa a absorbância em UV em comprimento de onda de 220 nm e a linha azul representa a absorbância em UV em comprimento de onda de 280 nm.

Figura 27 – Análise da cromatografia por exclusão molecular da CTB. M- Marcador de massa molecular; 1- Amostra antes da purificação por exclusão molecular; 2- Tubo 20; 3- Tubo 21; 4- Tubo 25; 5- Tubo 27; 6- Tubo 29; 7- Tubo 30; 8- Tubo 31.

4.1.12. Dicroísmo circular da CTB

A caracterização da estrutura secundária da CTB renaturada pela alta pressão hidrostática e purificada por exclusão molecular foi realizada através de dicroísmo circular (figura 28). O resultado obtido foi comparado com perfis de dicroísmo circular da CTB nativa (Dertzbaugh, *et al.*, 1990) e CTB recombinante (Ramos, 2009) relatados na literatura.

A CTB renaturada apresentou um perfil muito similar aos perfis já publicados, com um pico negativo a 215 nm, demonstrando uma estrutura regular. Estes dados confirmam que a CTB renaturada pela alta pressão possui estrutura secundária muito próxima da CTB nativa e evidenciam a eficiência do processo de renaturação utilizando altas pressões hidrostáticas para esta proteína.

Figura 28 – Espectro de dicroísmo circular da CTB renaturada pela alta pressão hidrostática.

4.1.13. Fluorescência intrínseca do triptofano da CTB

A estrutura terciária da CTB renaturada pela alta pressão hidrostática foi analisada através da emissão de fluorescência do aminoácido triptofano. Foi utilizada uma amostra de CTB renaturada pela alta pressão e purificada, e logo após a medição da fluorescência, uma alíquota da mesma amostra foi desnaturada com 8 M de uréia.

Cada monômero da CTB possui em sua sequência um resíduo de triptofano, totalizando cinco triptofanos na estrutura pentamérica. O espectro de fluorescência da CTB renaturada pela alta pressão mostrou uma emissão máxima a 350 nm quando excitada a 285 nm (figura 29). Estes dados estão de acordo com os espectros para a CTB nativa relatados na literatura (Mertz *et al.*, 1996). A amostra que foi desnaturada na presença de 8 M de uréia apresentou uma emissão máxima da fluorescência a 354 nm, mostrando um deslocamento para o vermelho. Isto indica maior exposição dos triptofanos ao solvente aquoso, caracterizando a desnaturação proteica.

Figura 29 – Espectro de emissão de fluorescência da CTB renaturada pela alta pressão hidrostática. A linha contínua representa a CTB renaturada pela alta pressão hidrostática e a linha pontilhada a CTB desnaturada com 8 M de uréia.

4.1.14. Ensaio de ligação ao receptor da CTB

A análise da funcionalidade da CTB foi realizada pelo ensaio de ELISA (figura 30). Para tanto, foram utilizadas amostras de CTB renaturada pela alta pressão hidrostática e sua ação foi comparada com uma CTB desnaturada na presença de 8 M de uréia (controle negativo). A CTB renaturada pela alta pressão foi pressurizada a 2,4 kbar por 16 horas na presença de 1 mM de tween 20. A descompressão foi realizada de forma direta e a amostra foi incubada em pressão atmosférica durante 168 horas e em seguida dialisada.

A amostra de CTB renaturada pela alta pressão hidrostática foi capaz de se ligar ao receptor GM1 de maneira diretamente proporcional à concentração proteica. Portanto, a renaturação da CTB utilizando a alta pressão foi efetiva e a proteína se encontra na forma ativa.

Figura 30 – Análise funcional da CTB renaturada pela alta pressão hidrostática.

4.2. Região globular da fibra adenoviral (RGFA)

4.2.1. Expressão em diferentes temperaturas da RGFA

A expressão da proteína RGFA recombinante foi realizada a partir de bactérias transformadas com o vetor pET28b (Farinha-Arcieri, dados não publicados). Este vetor expressa a proteína RGFA com uma cauda adicional de histidina no extremo carboxila.

A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos proteicos de *E. coli* cultivadas em diferentes temperaturas mostra que houve a expressão da RGFA recombinante (massa molecular de 22 kDa) após a indução da expressão (figura 31). Esta proteína foi obtida na forma de CI nas três temperaturas testadas (figura 31A e 31B). Foi expressa RGFA em maiores níveis na temperatura de 37°C quando comparada com as culturas bacterianas que foram cultivadas nas temperaturas de 20°C e 30°C.

Figura 31 – Extratos celulares de *E. coli* contendo o plasmídeo de expressão pET28b com o gene da RGFA. **A)** Análise da expressão da proteína RGFA em diferentes temperaturas. M- Marcador de massa molecular. M- Marcador de massa molecular; 1- Expressão não induzida (sem IPTG); 2- Extrato celular total produzido a 20°C; 3- Extrato celular total produzido a 30°C; 4- Extrato celular total produzido a 37°C. **B)** Análise das frações solúveis e insolúveis da expressão da proteína RGFA em diferentes temperaturas. M- Marcador de massa molecular; 1- Fração solúvel produzida a 20°C; 2- Fração insolúvel produzida a 20°C; 3- Fração solúvel produzida a 30°C; 4- Fração insolúvel produzida a 30°C; 5- Fração solúvel

produzida a 37°C; 6- Fração insolúvel produzida a 37°C. Foram aplicadas alíquotas correspondentes a 0,1 de D.O. de suspensões bacterianas ($A_{600\text{ nm}}$).

Para verificar se a temperatura de cultivo da bactéria hospedeira influencia na solubilidade dos agregados da RGFA frente à desnaturação química pela ação do agente caotrópico GdnHCl, CI desta proteína produzida por bactérias cultivadas em temperaturas de 20°C, 30°C e 37°C foram incubados em concentrações de GdnHCl variando de 0 a 6 M. As reações foram incubadas em temperatura ambiente por 67 horas para atingir o equilíbrio e então o efeito do desnaturante foi medido pelo monitoramento de mudanças na absorbância em 350 nm.

A figura 32 mostra que os CI produzidos a 37°C são mais resistentes à solubilização pela ação do GdnHCl do que os agregados proteicos produzidos a 20°C e 30°C, indicando que a temperatura de cultivo determina a estabilidade de ligações intermoleculares que mantém os agregados. Deste modo, optou-se por produzir a RGFA na temperatura de 20°C com a finalidade de facilitar a dissociação destes CI pela ação da alta pressão.

Figura 32 – Solubilização dos CI da RGFA pelo GdnHCl.

4.2.2. Efeito das diferentes proporções de GSH e GSSG na renaturação dos CI da RGFA

Com a finalidade de otimizar as condições de renaturação da RGFA submetida à alta pressão hidrostática foram testadas as proporções de GSH e GSSH. 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. O agente caotrópico GdnHCl na concentração de 1,5 M também foi adicionado ao tampão.

O efeito das diferentes proporções do par óxido-redutor na solubilização da RGFA promovida pela alta pressão pode ser conferido na figura 33. Em nenhuma das condições testadas houve a obtenção da forma trimérica ativa desta proteína. No entanto, nas condições com maior proporção de GSH (colunas 6 a 10) houve formação de uma pequena quantidade da forma dimérica da RGFA. A condição escolhida para ser utilizada nos ensaios posteriores foi a 9 de GSH : 1 de GSSG.

Figura 33 – Efeito da presença de diferentes proporções de GSH e GSSG na renaturação dos CI da RGFA submetidos à alta pressão. M- Marcador de massa molecular; Amostras 1 a 9, proporções de GSH:GSSG; 1- 1:9; 2- 1:4; 3- 1:2; 4- 2:3; 5- 1:1; 6- 3:2; 7- 2:1; 8- 4:1; 9- 9:1; 10- Ausência de glutationas; 11- CI em condição redutora.

4.2.3. Efeito de diversos aditivos na solubilização e renaturação da RGFA

Os efeitos da presença de diferentes aditivos na solubilização dos agregados e renaturação da RGFA podem ser conferidos na figura 34. As condições que auxiliaram na formação de oligômeros foram as com que continham presença de L-arginina e tween 20 (colunas 2 e 8, respectivamente). A análise por *western blot* (figura 35) revelou que somente a condição com adição de L-arginina e descompressão para 0,4 kbar por 16 horas, antes da completa descompressão para pressão atmosférica (coluna 3) foi efetiva para a formação do trímero da RGFA.

Dentre os vários aditivos utilizados para auxiliar na renaturação de proteínas, o aminoácido L-arginina é um dos mais usados devido ao seu excelente efeito na solubilização (Tsumoto *et al.*, 2003) e na inibição da agregação de diferentes proteínas (Arora *et al.*, 2012; Tsumoto *et al.*, 2003). A L-arginina contém um grupo guanidina positivamente carregado similar ao do GdnHCl. Este aminoácido pode auxiliar na solubilização dos agregados, podendo apresentar um efeito mais pronunciado do que o do GdnHCl em concentração de até 2 M (Tsumoto *et al.*, 2003; Trivedi *et al.*, 1997).

Os mecanismos de ação da L-arginina ainda não estão bem definidos. Três possíveis mecanismos têm sido propostos: (1) A L-arginina pode interagir favoravelmente com a maioria das cadeias laterais dos aminoácidos de modo a reduzir as pontes de hidrogênio, as interações iônicas e interações hidrofóbicas (Arakawa *et al.*, 2007). (2) Possivelmente, a L-arginina aumenta seletivamente a energia livre de complexos proteína-proteína e retarda as associações de proteínas apresentando pouco efeito sobre a taxa de renaturação proteica (Baynes *et al.*, 2005) e (3) É provável que a L-arginina aumente a estabilidade e solubilidade de proteínas desnaturadas e estados parcialmente enovelados, desfavorecendo a reagregação (Reddy *et al.*, 2005).

Figura 34 – Efeito da presença de diferentes aditivos na solubilização e renaturação da RGFA a partir de CI submetidos à alta pressão na presença de 9 GSH: 1GSSG e 1,5 M de GdnHCl. M- Marcador de massa molecular; 1- 0,15 M NaCl; 2- 0,5 M L-arginina sem GdnHCl; 3- 0,5 M L-arginina; 4- 1 M Glicose; 5- 1 M Sacarose; 6- 0,1 % PEG; 7- 2,5 M Glicerol; 8- 1 mM Tween 20; 9- 0,5 mM Triton; 10- 6,7 mM Bis-ANS; 11- Amostra sem aditivos; 12- CI em condição redutora.

Figura 35 – Análise por *Western Blot* do efeito dos aditivos na solubilização e renaturação da RGFA submetida a diferentes esquemas de descompressão. Todas as amostras continham 9 GSH: 1GSSG e 1,5 M de GdnHCl. 1- Amostra sem aditivos; 2- Amostra contendo 0,5 M de L-arginina e descompressão em degraus; 3- Amostra contendo 0,5 M de L-arginina e descompressão para 0,4 Kbar por 16 horas; 4- Amostra contendo 1 mM de tween 20; 5- Amostra com 0,5 M de L-arginina (amostra reduzida).

4.2.4. Efeito da alta pressão hidrostática na dissociação dos CI da RGFA

Para avaliar a ação da alta pressão hidrostática sobre os CI da RGFA, uma suspensão destes agregados contendo 0,5 M de L-arginina foi submetida a uma pressão de 2,4 kbar e o espalhamento de luz (EL) foi monitorado durante 60 minutos (figura 36). Durante a elevação da pressão há uma queda acentuada do EL e após 40 minutos há um decréscimo de 65 % do valor inicial, se mantendo estável no restante do período analisado. Estes dados demonstram que os CI da RGFA são dissociados sob a ação da alta pressão hidrostática.

Figura 36 – Altas pressões hidrostáticas induzem a dissociação dos CI da RGFA. Uma suspensão contendo os CI da RGFA ($D.O_{350nm}=0,5$) e 0,5 M de L-arginina foi submetida a 2,4 kbar de pressão e o espalhamento de luz (EL) foi monitorado em função do tempo. O EL em cada tempo foi dividido pelo valor de EL obtido em pressão atmosférica e multiplicado por 100 (os resultados são apresentados na forma de porcentagem). As medidas de EL foram realizadas em comprimento de onda de excitação de 320 nm e leituras em 300 a 350 nm. A seta indica o momento onde a pressão atingiu 2,4 kbar.

4.2.5. Efeito de diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação dos CI da RGFA

As figuras 37A e 37B mostram o efeito da aplicação de diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação RGFA. O esquema no qual houve a formação de maior porcentagem de RGFA trimérica foi a aplicação de 2,4 kbar por 1,5 h, seguido de incubação a 0,4 kbar por 16 horas, com formação de 4 % de trímero. O esquema F (aplicação de 2,4 kbar por 1,5 h, seguido de incubação a 0,2 kbar por 16 horas) apresentou um rendimento semelhante de proteína solúvel trimérica (3 %). É provável que a formação de trímeros de RGFA a partir dos monômeros possa ser favorecida nesta pressão relativamente baixa, enquanto a reagregação é desfavorecida em alta pressão hidrostática.

Neste ensaio também se observou que a incubação em pressão de 2,4 kbar por 16 horas (esquema B) foi responsável pela formação de uma maior quantidade de proteína monomérica solúvel em comparação com os outros esquemas testados. Nota-se que na maioria dos esquemas aplicados houve formação de maior porcentagem de formas diméricas solúveis da RGFA do que das formas triméricas de interesse.

Figura 37 – Efeito dos diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da RGFA. Todas as amostras continham 9 GSH: 1GSSG, 0,5 M de L-arginina e foram submetidas à alta pressão hidrostática da seguinte forma: A- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão direta e incubação à pressão atmosférica por 16 h; B- 2,4 kbar por 16 h e descompressão direta; C- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão em degraus e incubação à pressão atmosférica por 16 h; D- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão para 0,8 kbar por 16

horas e descompressão direta; E- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão para 0,4 kbar por 16 horas e descompressão direta; F- 2,4 kbar por 1,5 h, descompressão para 0,2 kbar por 16 horas e descompressão direta. **A)** Análise da porcentagem de proteína solúvel proteína solúvel monomérica, dimérica e trimérica em função do esquema de descompressão utilizado. Para o cálculo das proporções das bandas visualizadas no gel de poliacrilamida (dado não mostrado) foi utilizado o programa Image J. **B)** Análise por *Western Blot* do efeito dos diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da RGFA.

4.2.6. MEV dos CI da RGFA

O tamanho e a morfologia dos CI da RGFA também foram avaliados através da MEV (figura 38). Os CI da RGFA foram produzidos a 20°C e ajustados para uma D.O. de 2. As amostras foram pressurizadas na presença de 0,5 M de L-arginina a 2,4 kbar durante 1,5 horas, seguida de uma descompressão para 0,4 kbar, onde as amostras permaneceram 16 horas antes da completa descompressão para pressão atmosférica. Foram avaliados os CI da RGFA antes da aplicação da alta pressão (figura 38A) e a fração de CI da RGFA insolúvel após a aplicação da alta pressão (figura 38B). Nota-se que antes do tratamento em alta pressão há grande quantidade destes agregados proteicos. A morfologia variou de oval a cilíndrica em grande parte da amostra. Após a compressão, a fração insolúvel da RGFA apresentou redução quase total na quantidade de CI. Isto indica que a alta pressão hidrostática foi muito efetiva na desagregação e solubilização da proteína RGFA produzida em *E. coli*, pois em muitos campos avaliados através da MEV não foi evidenciada a presença de CI da RGFA (dados não mostrados).

Figura 38 – MEV dos CI da RGFA. O aumento utilizado foi de 5000 X. **A)** CI antes da pressão e **B)** fração insolúvel dos CI dissociados pela alta pressão hidrostática.

4.2.7. Ensaio de Atividade Biológica da RGFA

Para avaliar se a RGFA renaturada pela alta pressão hidrostática é capaz de se ligar ao receptor CAR, foi realizado um ensaio de inibição da infecção adenoviral. Neste ensaio foi utilizado um vetor que expressa a *Enhanced Green Fluorescent Protein*, o Adeno-EGFP (Muotri *et al.*, 2002). As células HEK-293 foram infectadas com o Adeno-EGFP na presença de quantidades crescentes da RGFA renaturada pela alta pressão e BSA como controle do ensaio. A RGFA utilizada nesse experimento foi obtida mediante o protocolo de pressurização a 2,4 kbar por 1,5 horas, e descompressão para 0,4 kbar por 16 horas na presença de 0,5 M de L-arginina. A descompressão foi realizada de forma direta e a amostra seguiu para diálise.

Caso a RGFA estivesse enovelada corretamente e na sua forma ativa, ela competiria com o vírus na ligação ao receptor CAR e uma diminuição na fluorescência das células infectadas poderia ser visualizada. Como pode ser conferido na figura 39, os tratamentos com RGFA solubilizada pela pressão (painéis A, B e C) não impediram a infecção do Adeno-EGFP. Muitas células apresentaram fluorescência e, portanto a RGFA não foi capaz de competir com o Adeno-EGFP pela ligação ao receptor CAR. Foi observada a diminuição da fluorescência das mesmas células quando amostras controle de RGFA trimérica e ativa foram adicionados às mesmas (dados não mostrados).

A figura 40 mostra os resultados de outro ensaio de inibição da infecção adenoviral realizado. Neste ensaio, foram utilizadas concentrações maiores de RGFA renaturada pela alta pressão (painéis A e B) na tentativa de impedir infecção do adenovírus nas células HEK-293. A amostra de RGFA foi submetida a pressão do mesmo modo que foi a amostra do ensaio anterior. Foram utilizados como controle positivo uma RGFA corretamente enovelada e ativa (painel C), um controle tratado só com o vírus Adeno-EGFP (painel D) e um controle onde as células não receberam nenhum tipo de tratamento (painel E). Novamente, a RGFA renaturada pela alta pressão não foi capaz de impedir a infecção, pois muitas células apresentaram fluorescência e um grande efeito citopático. O controle positivo da RGFA demonstrou inibição da infecção pelo adenovírus e as células tratadas só o vírus (controle negativo) apresentaram grande fluorescência, evidenciando que o ensaio foi bem sucedido.

Estes resultados sugerem que a forma trimérica e ativa da RGFA renaturada pela alta pressão pode não estar corretamente enovelada ou que a porcentagem desta forma oligomérica na solução proteica é muito pequena para impedir a infecção pelo Adeno-EGFP nas células HEK-293. Uma tentativa de melhorar estes resultados seria purificar a RGFA por exclusão molecular e concentrar a forma trimérica. Desta forma, maior porcentagem da RGFA trimérica estaria presente na solução e a probabilidade da proteína renaturada pela alta pressão se ligar ao receptor CAR seria maior, impedindo a infecção pelo vírus.

Figura 39 – Análise funcional da RGFA renaturada pela alta pressão hidrostática. As células HEK-293 foram infectadas com o Adeno-EGFP (MOI de 1) na presença de RGFA renaturada pela alta pressão (A-C) e com BSA (D). A-C: células tratadas com 10, 5, 1 µg de RGFA, respectivamente; D: células tratadas com 10 µg de BSA (controle).

Figura 40 – Análise funcional da RGFA renaturada pela alta pressão hidrostática. As células HEK-293 foram infectadas com o Adeno-EGFP (MOI de 1) na presença de RGFA renaturada pela alta pressão. A e B: células tratadas com 200 e 250 μ g de RGFA, respectivamente; C: células tratadas com 250 μ g de RGFA ativa (controle positivo); D: células tratadas só com Adeno-EGFP (controle negativo); E: células sem tratamento.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho propôs a dissociação e renaturação de CI de proteínas oligoméricas utilizando altas pressões hidrostáticas. A utilização da alta pressão para este fim é um processo novo e pouco estudado. Proteínas oligoméricas apresentam uma dificuldade a mais para a formação do estado nativo, que é favorecer a associação das subunidades, sem, no entanto, possibilitar a reagregação dessas subunidades, tornando a experiência adquirida neste trabalho muito útil para a renaturação de proteínas com estrutura quaternária de difícil obtenção por outros métodos.

Os estudos apresentados neste trabalho demonstraram que a alta pressão hidrostática foi eficaz na desagregação dos CI da CTB e da RGFA. A solubilização e oligomerização da CTB e da RGFA promovida pela alta pressão foi otimizada na presença de aditivos (tween 20 para a CTB e L-arginina para a RGFA) e com esquemas de pressão diferenciados daqueles anteriormente descritos na literatura para proteínas monoméricas e oligoméricas. Para a CTB a pressão de 2,4 kbar durante 16 horas e descompressão direta foi o esquema que possibilitou maior rendimento de proteína monomérica e pentamérica. Já para a RGFA o esquema de 2,4 kbar por 1,5 horas, descompressão para 0,4 kbar seguido de descompressão direta foi o que permitiu (dentre os esquemas avaliados) maior formação de trímeros (4 %).

Para a CTB, a incubação por longos períodos em pressão atmosférica foi essencial para o aumento do rendimento de renaturação de pentâmero. Outro fator que possibilitou o aumento do rendimento da forma pentamérica desta proteína foi a concentração proteica de CI na solução. A concentração de 960 µg/µl de CI na solução elevou o rendimento para 45 % de pentâmero. Desta forma, o melhor protocolo para a renaturação da CTB sob altas pressões foi o que utilizou 960 µg/µl de CI, compressão na presença de 1 mM de tween 20 a 2,4 kbar durante 16 horas, descompressão direta e incubação em pressão atmosférica.

A MEV demonstrou que tanto para a CTB quanto para a RGFA o tratamento com alta pressão foi efetivo na dissociação dos agregados proteicos, sendo que para a RGFA houve desagregação quase total dos CI.

A associação entre altas pressões hidrostáticas e temperatura negativa se mostrou eficiente para aumentar a dissociação dos agregados proteicos da CTB. Acreditamos que a utilização de temperaturas negativas em associação com o protocolo já padronizado para a renaturação da CTB deverá aumentar significativamente o rendimento de renaturação desta proteína.

A purificação da CTB e separação das formas geradas depois do tratamento com alta pressão se mostrou trabalhosa, devido à presença de formas monoméricas juntamente com os pentâmeros de interesse. Foram necessárias duas etapas de purificação para se obter CTB pentamérica com alto grau de pureza.

O rendimento final de CTB pentamérica foi de 288 mg por litro de bactérias cultivadas em meio muito rico (2HK2) em que foram expressos um total de 640 mg de CTB/L. O procedimento de clonagem do gene de CTB no plasmídeo de expressão utilizado no presente estudo (pAE-ctxB) foi descrito no artigo de Areas e colaboradores (Areas *et al.* 2002). Neste mesmo artigo é descrita também a renaturação de CTB, com obtenção de 13 mg de CTB pentamérica em 1L de bactérias cultivadas em meio LB, um meio de cultura mais pobre do que aquele descrito no presente estudo, e no qual foram expressos um total de 120mg de CTB. O rendimento de renaturação de CTB pentamérica descrito pelos autores (11%) foi 4 vezes menor do que aquele descrito no presente estudo (45%). Lembramos, no entanto, que este rendimento se refere à quantificação de proteína pentamérica já purificada em resina de afinidade por metais imobilizados, o que não é o nosso caso.

Os ensaios de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca do triptofano demonstraram que a CTB renaturada pela alta pressão hidrostática possui estrutura secundária e terciária regular e semelhante à já descrita na literatura. Além disso, a CTB renaturada pela alta pressão hidrostática a partir de CI apresentou atividade biológica e, portanto a alta pressão hidrostática se mostrou uma técnica efetiva para renaturar esta proteína.

A RGFA renaturada pela alta pressão hidrostática não apresentou atividade biológica, provavelmente devido à pequena porcentagem de proteínas com estrutura trimérica e ativa presentes na solução ou ao incorreto envelamento desta forma. Outra hipótese para a ausência de atividade biológica da RGFA renaturada pela alta pressão consiste no fato já descrito na literatura (Chen *et al.*, 2008) que certas proteínas não são corretamente enoveladas na presença da L-arginina, apesar deste

aditivo manter a sua solubilidade. É possível que a presença da L-arginina possa ter perturbado a estabilidade da forma trimérica da RGFA e portanto a utilização deste aditivo não seria útil para a renaturação desta proteína. Novos protocolos com diferentes aditivos poderiam ser testados para a obtenção da forma trimérica da RGFA em maior porcentagem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ami, D., A. Natalello, G. Taylor, G. Tonon e S. M. Doglia (2006). *Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics **1764**(4): 793-799.
- Arakawa, T. e S. N. Timasheff (1982). *Stabilization of Protein-Structure by Sugars*. Biochemistry **21**(25): 6536-6544.
- Arakawa, T., D. Ejima, K. Tsumoto, N. Obeyama, Y. Tanaka, Y. Kita e S. N. Timasheff (2007). *Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects*. Biophysical Chemistry **127**(1-2): 1-8.
- Areas, A. P. D., M. L. S. de Oliveira, C. R. R. Ramos, M. E. Sbrogio-Almeida, I. Raw e P. L. Ho (2002). *Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in Escherichia coli*. Protein Expression and Purification **25**(3): 481-487.
- Areas, A. P. M., M. L. S. Oliveira, E. N. Miyaji, L. C. C. Leite, K. A. Aires, W. O. Dias e P. L. Ho (2004). *Expression and characterization of cholera toxin B - pneumococcal surface adhesin A fusion protein in Escherichia coli: ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice*. Biochemical and Biophysical Research Communications **321**(1): 192-196.
- Arimitsu, H., K. Tsukamoto, S. Ochi, K. Sasaki, M. Kato, K. Taniguchi, K. Oguma e T. Tsuji (2009). *Lincomycin-induced over-expression of mature recombinant cholera toxin B subunit and the holotoxin in Escherichia coli*. Protein Expression and Purification **67**(2): 96-103.

- Arora, T. K., A. K. Malhotra, R. Ivatury e M. J. Mangino (2012). *L-Arginine infusion during resuscitation for hemorrhagic shock: Impact and mechanism*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery **72**(2): 397-402.
- Balduino, K. N., P. J. Spencer, N. V. Malavasi, R. M. Chura-Chambi, L. S. Lemke e L. Morganti (2011). *Refolding by High Pressure of a Toxin Containing Seven Disulfide Bonds: Bothropstoxin-1 from Bothrops jararacussu*. Molecular Biotechnology **48**(3): 228-234.
- Bam, N. B., J. L. Cleland e T. W. Randolph (1996). *Molten globule intermediate of recombinant human growth hormone: Stabilization with surfactants*. Biotechnology Progress **12**(6): 801-809.
- Bam, N. B., J. L. Cleland, J. Yang, M. C. Manning, J. F. Carpenter, R. F. Kelley e J. W. Randolph (1998). *Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions*. Journal of Pharmaceutical Sciences **87**(12): 1554-1559.
- Baneyx, F. e M. Mujacic (2004). *Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli*. Nature Biotechnology **22**(11): 1399-1408.
- Baynes, B. M., D. I. C. Wang e B. L. Trout (2005). *Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation*. Biochemistry **44**(12): 4919-4925.
- Berk, A. J. (2007). *Adenoviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Knipe, D. M., Howley, P. M., Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2395-2436.
- Bernardi, K. M., M. L. Forster, W. I. Lencer e B. Tsai (2008). *Derlin-1 facilitates the retro-translocation of cholera toxin*. Molecular Biology of the Cell **19**(3): 877-884.

Boonyaratanakornkit, B. B., C. B. Park e D. S. Clark (2002). *Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology **1595**(1-2): 235-249.

Bradford, M. M. (1976). *Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.

Bublin, M., E. Hoflehner, B. Wagner, C. Radauer, S. Wagner, K. Hufnagl, D. Allwardt, M. Kundi, O. Scheiner, U. Wiedermann e H. Breiteneder (2007). *Use of a genetic cholera toxin B subunit/allergen fusion molecule as mucosal delivery system with immunosuppressive activity against Th2 immune responses*. Vaccine **25**(50): 8395-8404.

Caballero-Herrera, A., K. Nordstrand, K. D. Berndt e L. Nilsson (2005). *Effect of urea on peptide conformation in water: Molecular dynamics and experimental characterization*. Biophysical Journal **89**(2): 842-857.

Carrio, M. M., R. Cubarsi e A. Villaverde (2000). *Fine architecture of bacterial inclusion bodies*. Febs Letters **471**(1): 7-11.

Carrio, M., N. Gonzalez-Montalban, A. Vera, A. Villaverde e S. Ventura (2005). *Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies*. Journal of Molecular Biology **347**(5): 1025-1037.

Chen, J., Liu, Y. Wang, Y. Ding, H. e Z. Su (2008). *Different effects of L-arginine on protein refolding: suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding*. Biotechnology Progress **24**(6): 1365-72.

Chroboczek, J., Ruigrok, R. W., Cusack, S (1995). *Adenovirus fiber*. Current Topics in Microbiology and Immunology **199** (Pt 1):163-200.

Chura-Chambi, R. M. (2009). *Proteínas de fusão endostatina-peptídeos com atividade apoptótica: expressão e estudo de atividade antiangiogênica*. Tese de

Doutorado em Tecnologia Nuclear. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares da Universidade de São Paulo.

Chura-Chambi, R. M., L. A. Genova, R. Affonso e L. Morganti (2008). *Refolding of endostatin from inclusion bodies using high hydrostatic pressure*. Analytical Biochemistry **379**(1): 32-39.

Clark, E. D. (1998). *Refolding of recombinant proteins*. Current Opinion in Biotechnology **9**(2): 157-163.

Clark, E. D. (2001). *Protein refolding for industrial processes*. Current Opinion in Biotechnology **12**(2): 202-207.

Clark, E. D., E. Schwarz e R. Rudolph (1999). *Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding*. Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates **309**: 217-236.

Cothran, A., R. J. St John, C. H. Schmelzer e S. A. Pizarro (2011). *High-Pressure Refolding of Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Recombinantly Expressed in Bacterial Inclusion Bodies: Refolding Optimization, and Feasibility Assessment*. Biotechnology Progress **27**(5): 1273-1281.

Cowan, R. H., R. A. Davies e T. T. J. Pinheiro (2008). *A screening system for the identification of refolding conditions for a model protein kinase, p38 alpha*. Analytical Biochemistry **376**(1): 25-38.

Cusack, S. (2005). *Adenovirus complex structures*. Current Opinion in Structural Biology **15**(2): 237-243.

de Groot, N. S. e S. Ventura (2006). *Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies*. Febs Letters **580**(27): 6471-6476.

de Haan, L., W. Verweij, E. Agsteribbe e J. Wilschut (1998). *The role of ADP-ribosylation and G(M1)-binding activity in the mucosal immunogenicity and adjuvanticity of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin and Vibrio cholerae cholera toxin.* Immunology and Cell Biology **76**(3): 270-279.

Dertzbaugh, M. T., D. L. Peterson e F. L. Macrina (1990). *Cholera-Toxin B-Subunit Gene Fusion - Structural and Functional-Analysis of the Chimeric Protein.* Infection and Immunity **58**(1): 70-79.

Fahnert, B., J. Veijola, G. Roel, M. K. Karkkainen, A. Railo, O. Destree, S. Vainio e P. Neubauer (2004). *Murine Wnt-1 with an internal c-myc tag recombinantly produced in Escherichia coli can induce intracellular signaling of the canonical Wnt pathway in eukaryotic cells.* Journal of Biological Chemistry **279**(46): 47520-47527.

Farinha-Arcieri, L. E., B. M. Porchia, C. Carromeu, F. M. Simabuco, R. E. Tamura, L. C. S. Ferreira, L. F. Zerbini e A. M. Ventura (2008). *Expression and purification of a recombinant adenovirus fiber knob in a baculovirus system.* Intervirology **51**(3): 189-195.

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (2007). *Virus taxonomy: Eighth Report of editors.* Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2395-2436.

Fechner, H., A. Haack, H. Wang, X. Wang, K. Eizema, M. Pauschinger, R. G. Schoemaker, R. van Veghel, A. B. Houtsmuller, H. P. Schultheiss, J. M. J. Lamers e W. Poller (1999). *Expression of Coxsackie adenovirus receptor and alpha(v)-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers.* Gene Therapy **6**(9): 1520-1535.

Foguel, D., C. R. Robinson, P. C. de Sousa, J. L. Silva e A. S. Robinson (1999). *Hydrostatic pressure rescues native protein from aggregates.* Biotechnology and Bioengineering **63**(5): 552-558.

Freimuth, P., K. Springer, C. Berard, N. Hainfeld, M. Bewley e J. Flanagan (1999). *Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12*. Journal of Virology **73**(2): 1392-1398.

Fujinaga, Y., A. A. Wolf, C. Rodighiero, H. Wheeler, B. Tsai, L. Allen, M. G. Jobling, T. Rapoport, R. K. Holmes e W. I. Lencer (2003). *Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum*. Molecular Biology of the Cell **14**(12): 4783-4793.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell e R. Nairn (1977). *Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type-5*. Journal of General Virology **36**(Jul): 59-72.

Henry, L. J., D. Xia, M. E. Wilke, J. Deisenhofer e R. D. Gerard (1994). *Characterization of the Knob Domain of the Adenovirus Type-5 Fiber Protein Expressed in Escherichia-Coli*. Journal of Virology **68**(8): 5239-5246.

Holmgren, J. (1981). *Actions of Cholera-Toxin and the Prevention and Treatment of Cholera*. Nature **292**(5822): 413-417.

Howitt, J., C. W. Anderson e P. Freimuth (2003). *Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR*. Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions **272**: 331-364.

Kim, Y. S., T. W. Randolph, M. B. Seefeldt e J. F. Carpenter (2006). *High-pressure studies on protein aggregates and amyloid fibrils*. Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates, Pt C **413**: 237-253.

Kojaoghlanian, T., P. Flomenberg e M. S. Horwitz (2003). *The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host*. Reviews in Medical Virology **13**(3): 155-171.

L'hoir, C., A. Renard e J. A. Martial (1990). *Expression in Escherichia-Coli of 2 Mutated Genes Encoding the Cholera Toxin-B Subunit*. Gene **89**(1): 47-52.

Laemmli, U. K. (1970). *Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4*. Nature **227**(5259): 680-685.

Lee, S. H., J. F. Carpenter, B. S. Chang, T. W. Randolph e Y. S. Kim (2006). *Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure*. Protein Science **15**(2): 304-313.

Lefebvre, B. G., M. J. Gage e A. S. Robinson (2004). *Maximizing recovery of native protein from aggregates by optimizing pressure treatment*. Biotechnology Progress **20**(2): 623-629.

Lencer, W. I. e B. Tsai (2003). *The intracellular voyage of cholera toxin: going retro*. Trends in Biochemical Sciences **28**(12): 639-645.

Louis, N., P. Fender, A. Barge, P. Kitts e J. Chroboczek (1994). *Cell-Binding Domain of Adenovirus Serotype-2 Fiber*. Journal of Virology **68**(6): 4104-4106.

Machida, S., S. Ogawa, X. H. Shi, T. Takaha, K. Fujii e K. Hayashi (2000). *Cycloamylose as an efficient artificial chaperone for protein refolding*. Febs Letters **486**(2): 131-135.

Malavasi, N. V., D. Foguel, C. F. S. Bonafe, C. A. C. A. Braga, R. M. Chura-Chambi, J. M. Vieira e L. Morganti (2011). *Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model*. Process Biochemistry **46**(2): 512-518.

Malley, R., S. C. Morse, L. C. C. Leite, A. P. M. Areas, P. L. Ho, F. S. Kubrusly, I. C. Almeida e P. Anderson (2004). *Multiserotype protection of mice against pneumococcal colonization of the nasopharynx and middle ear by killed nonencapsulated cells given intranasally with a nontoxic adjuvant*. Infection and Immunity **72**(7): 4290-4292.

- Martínez-Flores, F., F. A. Jiménez-Orozco, H. Villegas-Castrejón (2006). *Biología molecular de los vectores adenovirales*. Cirugía y Cirujanos **74**(6):483-493.
- Meier, O. e U. F. Greber (2004). *Adenovirus endocytosis*. Journal of Gene Medicine **6**: S152-S163.
- Mekalanos, J. J., D. J. Swartz, G. D. N. Pearson, N. Harford, F. Groyne e M. Dewilde (1983). *Cholera-Toxin Genes - Nucleotide-Sequence, Deletion Analysis and Vaccine Development*. Nature **306**(5943): 551-557.
- Merritt, E. A., S. Sarfaty, F. Vandenakker, C. Lhoir, J. A. Martial e W. G. J. Hol (1994). *Crystal-Structure of Cholera-Toxin B-Pentamer Bound to Receptor G(M1) Pentasaccharide*. Protein Science **3**(2): 166-175.
- Mertz, J. A., J. A. McCann e W. D. Picking (1996). *Fluorescence analysis of galactose, lactose, and fucose interaction with the cholera toxin B subunit*. Biochemical and Biophysical Research Communications **226**(1): 140-144.
- Mozhaev, V. V., E. V. Kudryashova e N. Bec (1996). *Modulation of enzyme activity and stability by high pressure: alpha-chymotrypsin*. High Pressure Bioscience and Biotechnology **13**: 221-226.
- Muotri A. R., M. C. Marchetto, L. F. Zerbini, T. A. Libermann, A. M. Ventura, A. Sarasin e C.F. Menck (2002). *Complementation of the DNA repair deficiency in human xeroderma pigmentosum group a and C cells by recombinant adenovirus-mediated gene transfer*. Human Gene Therapy **13**(15):1833-44.
- Nicklin, S. A., E. Wu, G. R. Nemerow e A. H. Baker (2005). *The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy*. Molecular Therapy **12**(3): 384-393.

Peltola, H., A. Siitonen, H. Kyrönseppä, I. Simula, L. Mattila, P. Oksanen, M. J. Kataja e M. Cadoz (1991). *Prevention of Travelers Diarrhea by Oral B-Subunit Whole-Cell Cholera Vaccine*. Lancet **338**(8778): 1285-1289.

Peternel, S., S. Jevsevar, M. Bele, V. Gaberc-Porekar e V. Menart (2008). *New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology*. Biotechnology and Applied Biochemistry **49**: 239-246.

Qadri, F., C. Wenneras, F. Ahmed, M. Asaduzzaman, D. Saha, M. J. Albert, R. B. Sack e A. M. Svennerholm (2000). *Safety and immunogenicity of an oral, inactivated enterotoxigenic Escherichia coli plus cholera toxin B subunit vaccine in Bangladeshi adults and children*. Vaccine **18**(24): 2704-2712.

Qoronfleh, M. W., L. K. Hesterberg e M. B. Seefeldt (2007). *Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens*. Protein Expression and Purification **55**(2): 209-224.

Qu, D., B. J. Zheng, X. Yao, Y. Guan, Z. H. Yuan, N. S. Zhong, L. W. Lu, J. P. Xie e Y. M. Wen (2005). *Intranasal immunization with inactivated SARS-CoV (SARS-associated coronavirus) induced local and serum antibodies in mice*. Vaccine **23**(7): 924-931.

Quiding, M., I. Nordström, A. Kilander, G. Andersson, L. A. Hanson, J. Holmgren e C. Czerkinsky (1991). *Intestinal Immune-Responses in Humans - Oral Cholera Vaccination Induces Strong Intestinal Antibody-Responses and Interferon-Gamma Production and Evokes Local Immunological Memory*. Journal of Clinical Investigation **88**(1): 143-148.

Ramos, H. R. (2009). *Desenvolvimento e caracterização de uma vacina antiesquistossomose composta pela proteína Sm14 de Schistosoma mansoni utilizando a subunidade B da toxina colérica (CTB) como adjuvante*. Tese de Doutorado em Bioquímica. São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Randolph, T. W., M. Seefeldt e J. F. Carpenter (2002). *High hydrostatic pressure as a tool to study protein aggregation and amyloidosis*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology **1595**(1-2): 224-234.

Reddy, R. C., H. Lilie, R. Rudolph e C. Lange (2005). *L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme*. Protein Science **14**(4): 929-935.

Roelvink, P. W., G. M. Lee, D. A. Einfeld, I. Kovesdi e T. J. Wickham (1999). *Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae*. Science **286**(5444): 1568-1571.

Russell, W. C. (2009). *Adenoviruses: update on structure and function*. Journal of General Virology **90**: 1-20.

Sanchez, J. e J. Holmgren (2011). *Cholera toxin - A foe & a friend*. Indian Journal of Medical Research **133**(2): 153-163.

Schoner, B. E., K. S. Bramlett, H. H. Guo e T. P. Burris (2005). *Reconstitution of functional nuclear receptor proteins using high pressure refolding*. Molecular Genetics and Metabolism **85**(4): 318-322.

Seefeldt, M. B., J. Ouyang, W. A. Froland, J. F. Carpenter e T. W. Randolph (2004). *High-pressure refolding of bikunin: Efficacy and thermodynamics*. Protein Science **13**(10): 2639-2650.

Sharma, A., X. X. Li, D. S. Bangari e S. K. Mittal (2009). *Adenovirus receptors and their implications in gene delivery*. Virus Research **143**(2): 184-194.

Silva, J. L. e G. Weber (1993). *Pressure Stability of Proteins*. Annual Review of Physical Chemistry **44**: 89-113.

Silva, J. L., D. Foguel e C. A. Royer (2001). *Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure*. Trends in Biochemical Sciences **26**(10): 612-618.

Silva, J. L., Y. Cordeiro e D. Foguel (2006). *Protein folding and aggregation: Two sides of the same coin in the condensation of proteins revealed by pressure studies*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics **1764**(3): 443-451.

Singh, S. M. e A. K. Panda (2005). *Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins*. Journal of Bioscience and Bioengineering **99**(4): 303-310.

Siqueira-Silva, J. (2008). *Estudo da interação do adenovírus humano, sorotipo 41 (HAdV-41), com células permissivas*. Tese de Doutorado em Microbiologia. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Spangler, B. D. (1992). *Structure and Function of Cholera-Toxin and the Related Escherichia-Coli Heat-Labile Enterotoxin*. Microbiological Reviews **56**(4): 622-647.

St John, R. J., J. F. Carpenter e T. W. Randolph (1999). *High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(23): 13029-13033.

St John, R. J., J. F. Carpenter e T. W. Randolph (2002). *High-pressure refolding of disulfide-cross-linked lysozyme aggregates: Thermodynamics and optimization*. Biotechnology Progress **18**(3): 565-571.

St John, R. J., J. F. Carpenter, C. Balny e T. W. Randolph (2001). *High pressure refolding of recombinant human growth hormone from insoluble*

aggregates - Structural transformations, kinetic barriers, and energetics.

Journal of Biological Chemistry **276**(50): 46856-46863.

Thiagarajah, J. R. e A. S. Verkman (2005). *New drug targets for cholera therapy.* Trends in Pharmacological Sciences **26**(4): 172-175.

Thomas, S., A. Preda-Pais, S. Casares e T. D. Brumeanu (2004). *Analysis of lipid rafts in T cells.* Molecular Immunology **41**(4): 399-409.

Tomko, R. P., R. L. Xu e L. Philipson (1997). *HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(7): 3352-3356.

Tsai, C. J., J. V. Maizel e R. Nussinov (2002). *The hydrophobic effect: A new insight from cold denaturation and a two-state water structure.* Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **37**(2): 55-69.

Tsumoto, K., M. Umetsu, I. Kumagai, D. Ejima e T. Arakawa (2003). *Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine.* Biochemical and Biophysical Research Communications **312**(4): 1383-1386.

Tsumoto, K., M. Umetsu, I. Kumagai, D. Ejima, J. S. Philo e T. Arakawa (2004). *Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification.* Biotechnology Progress **20**(5): 1301-1308.

Trivedi, V. D., B. Raman, C. M. Rao e T. Ramakrishna (1997). *Co-refolding denatured-reduced hen egg white lysozyme with acidic and basic proteins.* Febs Letters **418**(3): 363-366.

van Raaij, M. J., N. Louis, J. Chroboczek e S. Cusack (1999). *Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1.5 angstrom resolution*. Virology **262**(2): 333-343.

Ventura, S. e A. Villaverde (2006). *Protein quality in bacterial inclusion bodies*. Trends in Biotechnology **24**(4): 179-185.

Vincentelli, R., S. Canaan, V. Campanacci, C. Valencia, D. Maurin, F. Frassinetti, L. Scappucini-Calvo, Y. Bourne, C. Cambillau e C. Bignon (2004). *High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies*. Protein Science **13**(10): 2782-2792.

Wang, L., S. K. Maji, M. R. Sawaya, D. Eisenberg e R. Riek (2008). *Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure*. Plos Biology **6**(8): 1791-1801.

Zhang, Y. M. e J. M. Bergelson (2005). *Adenovirus receptors*. Journal of Virology **79**(19): 12125-12131.