AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**CLONAGEM DE SERINO PROTEASES DO VENENO DA
CASCVEL *Crotalus durissus terrificus* E EXPRESSÃO DA
GIROXINA EM CÉLULA DE MAMÍFERO**

CAMILA MIYAGUI YONAMINE

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

Orientadora:
Dra. Maria Aparecida Pires Camillo

**São Paulo
2007**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**CLONAGEM DE SERINO PROTEASES DO VENENO DA CASCABEL
Crotalus durissus terrificus E EXPRESSÃO DA GIROXINA EM
CÉLULA DE MAMÍFERO.**

CAMILA MIYAGUI YONAMINE

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

Orientadora:
Dra. Maria Aparecida Pires Camillo

SÃO PAULO

2007

**Aos meus pais e às minhas
irmãs com amor e carinho**

AGRADECIMENTOS

À orientadora Dra. Maria Aparecida Camillo, pelos valiosos ensinamentos ministrados e por ter sempre acreditado em mim durante todo o Mestrado.

Ao co-orientador Dr. Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva, do Instituto Butantan, pela dedicação e incentivo e cujo conhecimento e experiência na área de biologia molecular foram fundamentais para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Tetsuo Yamane, pelas orientações sábias e sempre valiosas e por permitir utilizar toda a infra-estrutura de seus laboratórios, essencial para a obtenção dos resultados alcançados.

Ao Dr. Gandhi Rádis Baptista, da Universidade Federal de Pernambuco, pelos valiosos ensinamentos nos cursos de Toxinologia molecular, pelas sugestões apresentadas, pelas discussões científicas e por ter cedido gentilmente a biblioteca de cDNA da cascavel *Crotalus durissus terrificus*.

À Dra Ligia Ely Morganti Ferreira Dias, pelo uso do seu laboratório de cultura celular e pela colaboração na clonagem e expressão da giroxina-símile em célula CHO DXB11 *dhfr*.

Ao Dr. Geraldo Santana Magalhães, do Instituto Butantan, pela colaboração nos experimentos de RT-PCR e expressão da giroxina-símile em célula COS-7, e pela paciência que teve durante todo o meu aprendizado no decorrer dos experimentos.

À Dra Regina Affonso pelo apoio dado e pelas discussões científicas realizadas em torno do projeto.

Ao Msc. Ricardo Tsuneo Yassaka, do Instituto de Nanotecnologia do Japão, pela ajuda e incentivo dados no início do projeto.

À Rosa Maria Chura Chambi, pela amizade e pelo auxílio na clonagem da giroxina-símile e na área de cultura celular.

À Juliana Branco Novo, do Instituto Butantan, pela amizade, pelo compartilhamento dos resultados obtidos e pela colaboração científica.

A Flávia Calil Ambiel, pela sua amizade, colaboração e por compartilhar o gosto pela biologia molecular.

À Dra. Olga Zazuco Higa que, com sua vasta experiência na área de pesquisas, sempre me incentivou a prosseguir com o meu projeto.

À Dra Nanci do Nascimento, gerente do Centro de Biotecnologia, pelo apoio.

Aos amigos, José Alberto Alves da Silva, Janaína Baptista, Danielle Borim, Natália Malavasi, Keli Nunes Balduino, Eduardo de Moura, Larissa Miranda e Vanessa Magalhães, do Centro de Biotecnologia do IPEN, pela amizade e grandes momentos de descontração.

Aos meus pais e às minhas irmãs, pelo grande apoio e incentivo que me deram durante a realização deste projeto de Mestrado.

Ao William Issao Asanuma, pelo amor e compreensão.

À CAPES pela bolsa de Mestrado e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

**CLONAGEM DE SERINO PROTEASES DO VENENO DA CASCAVEL
Crotalus durissus terrificus E EXPRESSÃO DA GIROXINA EM CÉLULAS
DE MAMÍFERO.**

Camila Miyagui Yonamine

Resumo

As serino proteases participam de diversos processos fisiológicos (tal como o de coagulação) e patológicos. Essas enzimas estão amplamente distribuídas entre as espécies, são também toxinas dos venenos de serpentes, sendo denominadas SVSPs (*snake venom serine proteases*). Essas SVSPs são multifuncionais e contêm uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos HDS. Algumas SVSPs são comercialmente disponíveis, sendo indicadas para o tratamento de infarto do miocárdio, trombozes e embolia pulmonar. No veneno de *Crotalus durissus terrificus* estão descritas até o momento, apenas duas SVSPs sendo que a mais estudada é a giroxina que representa cerca de 2,5% do veneno total. No presente estudo foi reportado a clonagem de sete serino proteases amplificadas a partir de uma biblioteca de cDNA de glândula de veneno de um único espécime adulto de *Crotalus durissus terrificus*. Estes clones foram analisados com relação à organização do cDNA, estrutura e prováveis funções. A construção do modelo tridimensional da giroxina permitiu verificar as similaridades com tripsina, trombina e outras SVSPs.

A glicosilação e a presença de muitas pontes dissulfetos dificultam a obtenção das SVSP recombinantes na forma solúvel e com atividade, por expressão em *E.coli*. Assim, neste trabalho foi abordada a expressão em células de mamífero (que realiza as modificações pós-traducionais) com resultados promissores. Para tanto, o peptídeo sinal de Igk, a sequência madura e a região 3'UTR da giroxina foram clonados no vetor pED, originando um novo vetor (pED-Giro). Este vetor carrega o peptídeo sinal de Igk, o que possibilitou a secreção da giroxina para o meio de cultura. O vetor pED-Giro foi transfectado em células CHO DXB11 *dhfr*⁻ e COS-7. A giroxina foi detectada no extrato total das células COS-7 por *western blot* e, em seguida, purificada do meio de cultura com coluna de afinidade (Benzamidina Sepharose) e demonstrado sua integridade pelo ensaio de atividade esterásica.

CLONING OF SERINE PROTEASES FROM THE VENOM OF RATTLESNAKE *Crotalus durissus terrificus* AND EXPRESSION OF A GYROXIN IN MAMMALIAN CELLS.

Camila Miyagui Yonamine

Abstract

The serine proteases affect several physiological processes (such as the coagulation cascade) and pathological ones. These enzymes are widely distributed beyond the species; they are also toxins from snake venoms and are called SVSPs (snake venom serine proteases). These SVSPs are multi-functional and have a catalytic triad formed by HDS amino acids. Some of them are commercially available for use in clinical treatment for heart attack, trombooses and pulmonary embolism. So far, in *Crotalus durissus terrificus* venom only two SVSPs are described and gyroxin is considered the most studied SVSP which represents about 2,5% of the total venom. In the present study was reported the cloning of seven serine proteases amplified from a cDNA library of a venomous gland of a single adult specimen from *Crotalus durissus terrificus* venom. These clones have been analyzed in relation to the cDNA organization, structure and probable functions. The three-dimensional model of the gyroxin made possible the analysis of similarities with trypsin, thrombin and other SVSPs.

The glycosylation and many disulfide bonds of the SVSPs make difficult the expression in *E.coli* to obtain the soluble recombinant toxin with activity. The expression in mammalian cells is very promising, because it is possible to make pos translation modification and to obtain the recombinant toxin secreted to the culture medium. The IgK signal peptide, the mature sequence and 3'UTR region of gyroxin were cloned in the pED expression vector resulting in a new vector (pED-Giro). This vector carries the Igk signal peptide, which allows the secretion of the protein to the culture medium. The pED-Giro vector was transfected in CHO DXB11 *dhfr*⁻ and COS-7 cells. The gyroxin was detected in COS-7 total extract by *western blot* and after, purified from the medium culture and its integrity was confirmed by esterase activity assay.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As serpentes	2
1.1.1. As cascavéis e o veneno	3
1.2. Serino proteases.....	3
1.2.1. Subfamília S1A.....	4
1.2.2. Serino proteases no veneno da cascavel <i>Crotalus durissus</i> <i>terrificus</i>	5
1.2.2.1. Trombina-símile.....	5
1.2.2.2. Giroxina.....	5
1.3. Serino proteases recombinantes dos venenos de serpentes	8
1.4. Glicosilação	8
1.5. Sistemas de expressão de proteína recombinante	10
1.5.1. Sistemas de expressão em <i>Escherichia coli</i>	10
1.5.2. Sistemas de expressão em eucarioto	11
1.5.2.1. <i>Pichia pastoris</i>	11
1.5.2.2. Célula de mamífero	11
1.6- Aplicações das serino proteases do veneno de serpente em saúde ...	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. MATERIAIS	15
3.1.1. Materiais utilizados nos ensaios de Biologia Molecular, Cultura de Células e Análises de Proteínas.....	15
3.1.2. Equipamentos	17
3.1.3. Ferramentas de Bioinformática	18
3.2. MÉTODOS	20
3.2.- Obtenção do clone pCR2.1 TOPO-B2.1.....	20
3.2.1. Definição do primer GYR SE	20
3.2.2. Análise de seqüências	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As serpentes	2
1.1.1. As cascavéis e o veneno	3
1.2. Serino proteases.....	3
1.2.1. Subfamília S1A.....	4
1.2.2. Serino proteases no veneno da cascavel <i>Crotalus durissus</i> <i>terrificus</i>	5
1.2.2.1. Trombina-símile.....	5
1.2.2.2. Giroxina.....	5
1.3. Serino proteases recombinantes dos venenos de serpentes	8
1.4. Glicosilação	8
1.5.Sistemas de expressão de proteína recombinante	10
1.5.1. Sistemas de expressão em <i>Escherichia coli</i>	10
1.5.2. Sisitemas de expressão em eucarioto	11
1.5.2.1. <i>Pichia pastoris</i>	11
1.5.2.2. Célula de mamífero	11
1.6- Aplicações das serino proteases do veneno de serpente em saúde ...	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. MATERIAIS	15
3.1.1. Materiais utilizados nos ensaios de Biologia Molecular, Cultura de Células e Análises de Proteínas.....	15
3.1.2. Equipamentos	17
3.1.3. Ferramentas de Bioinformática	18
3.2. MÉTODOS	20
3.2.- Obtenção do clone pCR2.1 TOPO-B2.1.....	20
3.2.1. Definição do primer GYR SE	20
3.2.2. Análise de seqüências	21

3.3. Clonagem de isoformas de serino proteases similares a giroxina	22
3.3.1. Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-GPSs.	22
3.3.2. Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-PST7s.....	23
3.4. Análise das seqüências de cDNA e de proteínas dos clones obtidos...	24
3.4.1. Alinhamento e Dendrograma.....	24
3.4.2. Análise dos precursores.....	24
3.4.3. Análise das toxinas maduras	25
3.5. Comparação das toxinas maduras dos clones obtidos com outras toxinas	25
3.6. Modelo tridimensional.....	26
3.7. Construção do vetor de expressão pED-Giro.....	27
3.7.1. Obtenção do inserto da giroxina madura.....	27
3.7.2. Preparo do vetor pSecTag2 Hygro A	28
3.7.3. Ligação do inserto giroxina-símile em pSecTag2Hygro A e seleção do clone pSecTag2-Giro.....	28
3.7.4. Mutagênese sítio dirigida	29
3.7.4.1. Preparo de DNA de fita simples.....	29
3.7.4.2. Fosforilação do <i>primer</i>	30
3.7.4.3. Reação de mutagênese.....	30
3.7.5. Seleção do clone mutante pSecTag2-Igk-Giro	31
3.7.6. Obtenção do inserto IgK-Giro	32
3.7.7. Preparo do vetor pED para subclonagem do inserto IgK Giro	32
3.7.8. Ligação do inserto IgK-Giro no vetor pED e seleção do clone pED-Giro.....	32
3.8. Expressão do vetor pED-Giro em células CHO DXB11 <i>dhfr</i> ⁻	33
3.8.1. Seleção e amplificação dos clones.....	33
3.8.2. Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED- Giro em células CHO DXB11 por SDS-PAGE e <i>western blot</i>	34
3.8.3- Detecção do vetor integrado ao genoma da célula CHO DXB11.....	34
3.8.4- Detecção do mRNA expresso pela célula CHO-DXB11x pED- Giro.....	35
3.9. Expressão transiente do vetor pED-Giro em células COS-7	36

3.9.1. Purificação do produto recombinante expresso pelo vetor pED Giro em células COS-7	38
3.9.1.1. Dosagem de proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células COS-7.....	38
3.9.1.2- Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células COS-7 por SDS-PAGE e <i>western blot</i>	39
3.9.2. Ensaio de atividade enzimática da giroxina recombinante purificada por benzamidina sepharose	39
4- RESULTADOS	41
4.1. Clonagem da toxina madura.....	41
4.1.1. Análises dos clones correspondentes às bandas B0, B1 e B2	41
4.1.2. Análise do clone B2.1	42
4.2. Clonagem de isoformas de serino proteases similares a giroxina	43
4.2.1. Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-GPSs.	43
4.2.1.1. Análises das seqüências de cDNA e de proteína dos clones GPSs	43
4.2.1.2- Análise do clone GPS:2e5	44
4.2.1.3-Análise do clone GPS:3e4	45
4.2.2. Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-PST7s.....	46
4.2.2.1. Análises das seqüências de cDNA e de proteínas dos clones PST7.....	47
4.2.2.2. Análise do clone PST7:3.....	47
4.2.2.3. Análise do clone PST7:4.....	48
4.2.2.4. Análise do clone PST7:7e8	48
4.2.2.5. Análise do clone PST7:5.....	49
4.2.3. Comparação dos cDNA dos clones B2.1, GPSs e PST7s com os éxons do gene de Batroxobin	50
4.3. Análise das seqüências de cDNA e de proteínas dos clones obtidos...	51
4.3.1. Alinhamento e Dendrograma.....	51
4.3.2. Análise do peptídeo sinal dos precursores	52
4.3.3. Análise das toxinas maduras	53
4.4. Comparação das toxinas maduras dos clones obtidos com outras toxinas	53

4.5. Modelo tridimensional.....	54
4.6. Construção do vetor de expressão pED-Giro.....	55
4.6.1. Obtenção do inserto da gioxina madura.....	55
4.6.2. Preparo do vetor pSecTag2 Hygro A.....	55
4.6.3. Seleção do clone pSecTag2-Giro	55
4.6.4. Seleção do clone mutante pSecTag2 Igk-Giro.....	56
4.6.5. Obtenção do inserto IgK-Giro	57
4.6.6. Preparo do vetor pED para subclonagem do inserto IgK-Giro....	57
4.6.7. Seleção do clone pED-Giro	57
4.7. Expressão do vetor pED-Giro em células CHO DXB11 <i>dhfr</i> ⁻	58
4.7.1. Seleção e amplificação dos clones.....	58
4.7.2. Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células CHO DXB11 por SDS-PAGE e <i>western blot</i>	58
4.7.3. Detecção do vetor integrado ao genoma da célula CHO DXB11.....	58
4.7.4. Detecção do mRNA expresso pela célula CHO-DXB11x pED-Giro.....	59
4.8. Expressão transiente do vetor pED-Giro em células COS-7	62
4.8.1. Purificação do produto recombinante expresso pelo vetor pED-Giro em células COS-7.....	62
4.8.1.1 Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células COS-7 por SDS-PAGE e <i>western blot</i>	62
4.9. Ensaio de atividade enzimática da gioxina recombinante purificada por benzamidina sepharose	64
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	83
7. FIGURAS	
Figura 1. Filogenia sugerida para a subfamília <i>Crotalinae</i>	84
Figura 2. Cascavel apresentando o chocalho (guizo) e a distribuição geográfica <i>Crotalus durissus terrificus</i>	84
Figura 3. Sítio ativo de uma serino protease.....	85
Figura 4. Estrutura tridimensional da tripsina.....	85

Figura 5. Algumas serino proteases do veneno de serpentes agindo na cascata de coagulação.....	86
Figura 6. Seqüências do N-terminal da giroxina de <i>C.d.terrificus</i>	87
Figura 7. Pontos de clivagem da molécula do fibrinogênio	88
Figura 8. Definição do <i>primer</i> GYR SE	89
Figura 9. Esquema do PCR para obter o clone B2.1.	90
Figura 10. Esquema do PCR para obter os clones GPSs	90
Figura 11. Esquema do PCR para obter os clones PST7s.....	90
Figura 12. Esquema da construção do vetor de expressão da giroxina em células CHO-DXB11 <i>dhfr</i> ⁻ e COS-7	91
Figura 13. Detecção do vetor pED-Giro integrado ao genoma da célula CHO-DXB11.	92
Figura 14. Detecção do mRNA expresso pela célula CHO-DXB11x pED-Giro.....	93
Figura 15. Amplificação da biblioteca de cDNA da glândula de veneno da cascavel <i>Crotalus durissus terrificus</i> por PCR.....	94
Figura 16. Seleção do clone B2.1 por PCR	94
Figura 17. Comparação dos 30 primeiros aminoácidos do clone de giroxina B2.1 com as seqüências N-terminais da giroxina isolada do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	95
Figura 18. Organização do cDNA do clone B2.1 (895pb).....	96
Figura 19. Organização do cDNA do clone GPS2 e 5 (998pb)	97
Figura 20. Organização do cDNA do clone GPS3 e 4 (973pb)	98
Figura 21. Região de hibridação do <i>primer</i> para o peptídeo sinal	99
Figura 22. Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-PST7s.....	100
Figura 23. Organização do cDNA do clone PST7:3 (1429pb)	101
Figura 24. Organização do cDNA do clone PST7:4 (1420pb)	102
Figura 25. Organização do cDNA do clone PST7:7e8 (1407pb).....	103
Figura 26. Organização do cDNA do clone PST7:5 (1272pb)	104
Figura 27. Análise da organização dos cDNAs.	105
Figura 28. Dendrograma das seqüências de nucleotídeos dos clones de cDNA B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:5 e PST7:7e8 ...	106

Figura 29. Alinhamento em nucleotídeos e aminoácidos dos clones B2.1, GPS: 2e5, PST7:3, PST7:7e8, GPS: 3e 4, PST7:4 e PST7:5	107
Figura 30. Análise do precursor.....	108
Figura 31. Predição de clivagem do peptídeo sinal do clone PST7:3 ..	109
Figura 32. Dendrograma das seqüências de aminoácidos correspondentes às toxinas maduras codificadas pelos clones: B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4 e PST7:7e8.....	110
Figura 33. Dendrograma funcional de serino proteases do veneno de serpentes	111
Figura 34. Alinhamento de serino proteases do veneno de serpente .	112
Figura 35. Modelo tridimensional da giroxina	113
Figura 36. Comparação do modelo da giroxina com o modelo cristalográfico da tripsina bovina (2ptc).	114
Figura 37. Comparação dos modelos tridimensionais da giroxina e crotalase com o modelo cristalográfico da cadeia pesada da α - trombina humana (1c50).....	115
Figura 38. Esquema do vetor PCR2.1-Giro (clone B2.1)	116
Figura 39. Esquema do vetor pSecTag2-Giro antes da mutagênese ..	117
Figura 40. Seleção do clone pSecTag2-Giro	118
Figura 41. Análise por PCR do clone pSecTag2-Giro recombinante....	118
Figura 42. Seleção por PCR dos clones pSecTag2-IgK-Giro obtidos após a mutagênese sítio dirigida.	119
Figura 43. Análise de restrição dos clones mutantes pSecTag2-IgK-Giro.....	119
Figura 44. Esquema do vetor pSecTag2-IgKGiro após a mutagênese	120
Figura 45. Seleção por tamanho dos clones recombinantes pED-Giro.....	121
Figura 46. Análise por PCR do clone pED-Giro recombinante.....	121
Figura 47. Esquema do vetor pED-Giro	122
Figura 48. Uma colônia de células CHO-DXB11 transfectada com o vetor pED-Giro	123

Figura 49. Detecção do vetor pED-Giro integrado no genoma da célula CHO DXB11.....	123
Figura 50. RNA total isolado das amostras célula CHO-K1 <i>dhfr</i> ⁺ , clones 4 e 8 (CHO-DXB11 x pED-Giro) na presença e ausência de MTX.....	124
Figura 51. Detecção do mRNA expresso pelos clones 4 e 8 (CHO-DXB11 x pED-Giro) por RT-PCR.	124
Figura 52. RNA total isolado das amostras clone 4 e 6 na presença e ausência de MTX e célula CHO-DXB11 <i>dhfr</i> ⁻	125
Figura 53. Detecção do mRNA expresso pelos clones 4 e 6 na ausência e presença de MTX por RT-PCR.....	125
Figura 54. Transfecção da célula COS-7x pED-Giro.....	126
Figura 55. Detecção da proteína recombinante expresso pelo vetor pED-Giro em células COS-7.....	127
Figura 56. Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células COS-7 e purificada pela resina de afinidade benzamidina sepharose	128
Figura 57. Ensaio de atividade enzimática da gioxina recombinante expresso em COS-7 após a purificação por afinidade em resina benzamidina sepharose.	129
8. TABELAS	
Tabela 1. Descrição dos vetores.....	130
Tabela 2. Descrição dos <i>primers</i> utilizados para clonagem e sequenciamento, mutagênese e RT-PCR	131
Tabela 3. Descrição dos <i>primers</i> universais	132
Tabela 4. Enzimas utilizadas na manipulação do DNA ou RNA	133
Tabela 5. Descrição das bactérias eletrocompetentes e quimicamente competentes utilizadas.....	134
Tabela 6. Análise dos clones pelo <i>software</i> Phred	135
Tabela 7. Análise de homologia do cDNA do clone B2.1 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	136
Tabela 8. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone B2.1 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.	136

Tabela 9. Análise de homologia do cDNA do clone GSP:2e5 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	137
Tabela 10. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone GPS:2e5 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	137
Tabela 11. Análise de homologia do cDNA do clone GSP:3e4 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	138
Tabela 12. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone GPS:3e4 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	138
Tabela 13. Análise de homologia do cDNA do clone PST7:3 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	139
Tabela 14. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone PST7:3 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	139
Tabela 15. Análise de homologia do cDNA do clone PST7:4 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	140
Tabela 16. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone PST7:4 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	140
Tabela 17. Análise de homologia do cDNA do clone PST7:7e8 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	141
Tabela 18. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone PST7:7e8 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI	141
Tabela 19. Análise de homologia do cDNA do clone PST7:5 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	142
Tabela 20. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone PST7:5 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.....	142
Tabela 21. Análise da organização dos cDNAs Giroxina símile em relação ao gene de Batroxobin.....	143
Tabela 22. Similaridades em porcentagem entre as seqüências de cDNA dos clones de B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:5 e PST7:7e8.....	144
Tabela 23. Similaridade em porcentagem das toxinas maduras dos clones B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:7e8	144

Tabela 24. Seqüências homólogas com mais alto escore de similaridade em relação à toxina madura codificada pelos clones B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:7e8	145
--	-----

Tabela 25. Concentração do RNA total isolado das amostras dos clones de célula CHO-DXB11 x pED-Giro na presença ou ausência de MTX para RT-PCR e da célula controle negativo CHO-DXB11 <i>dhfr</i>	146
--	-----

Tabela 26. Quantificação de proteína e atividade específica da proteína recombinante antes e após a purificação por resina de afinidade benzamidina-sepharose	147
---	-----

9. APÊNDICES	148
--------------------	-----

9.1. Protocolos de Biologia Molecular	148
---	-----

9.1.1- Eletroforese em gel de agarose	148
---	-----

9.1.2-Reação de ligação.....	148
------------------------------	-----

9.1.2.1-Topoisomerase (pCR2.1TOPO).....	148
---	-----

9.1.2.2- T4 DNA ligase	148
------------------------------	-----

9.1.3- Métodos de transformação.....	149
--------------------------------------	-----

9.1.3.1-Bactérias competentes	149
-------------------------------------	-----

9.1.3.2-Método de transformação por eletroporação	149
---	-----

9.1.3.3-Método de transformação por choque térmico	149
--	-----

9.1.4- Isolamento de colônias transformantes	149
--	-----

9.1.5- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para clonagens	149
--	-----

9.1.6- Purificação por fenol/clorofórmio e precipitação do DNA	150
--	-----

9.1.7- Seleção dos clones recombinantes	150
---	-----

9.1.7.1- por α -complementação.....	150
--	-----

9.1.7.2-Por tamanho do plasmídeo recombinante.....	150
--	-----

9.1.7.3-Por PCR de colônias	151
-----------------------------------	-----

9.1.7.4-Por mapa de restrição	151
-------------------------------------	-----

9.1.8- Preparação de DNA plasmidial e purificação do DNA em gel de agarose.....	152
---	-----

9.2. Meios de cultura	152
-----------------------------	-----

9.2.1-Meio líquido	152
--------------------------	-----

9.2.1.1- LB (Meio <i>Luria Bertani</i>).....	152
---	-----

9.2.1.2-LB ^{AMP}	152
---------------------------------	-----

9.2.1.3-SOB e SOC	152
9.2.2-Meios sólidos	153
9.2.2.1- LB-ágar	153
9.2.2.2-LB ^{AMP} - Agar	153
9.2.2.3- LB ^{AMP} /X-gal e IPTG Ágar.....	153
9.2.2.4-Meio YT	153
9.3- Enzimas	153
9.4-Vetores	154
9.4.1- Vetor pCR2.1 TOPO	154
9.4.2- Vetor pSecTag2HygroA	154
9.4.3- Vetor pED.....	155
9.5- Seqüenciamento.....	156
9.6- Análise de proteína	158
9.6.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.....	158
9.6.2- <i>Western Blots</i>	158
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160

1. INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes apresentam diversas toxinas com atividade de enzimas proteolíticas que afetam diversos processos fisiológicos, entre eles o processo de coagulação. Até hoje somente 40 enzimas trombina-símile foram isoladas e caracterizadas. No entanto o seqüenciamento diretamente da proteína é um método trabalhoso e demorado o que talvez justifique o reduzido número (CASTRO *et al.*, 2004). Essas toxinas são pouco caracterizadas bioquimicamente, podendo existir isoformas no veneno de serpentes que ainda são desconhecidas.

Nos últimos 5 anos, devido ao avanço na área de biologia molecular este quadro está mudando, pois a clonagem molecular permite conhecer como ocorre o processamento do gene, qual é a seqüência da região não traduzida 5'UTR, a região codificante para o peptídeo sinal, para o pré-peptídeo, para a toxina madura e a região não traduzida 3'UTR. Uma vez obtida a seqüência de cDNA é possível prever a seqüência primária da toxina e verificar a existência de isoformas.

As toxinas dos venenos de serpentes apresentam diversas pontes dissulfetos, aumentando sua estabilidade e tolerância às mudanças de pH fisiológico e temperatura que acontecem entre o lúmen da glândula da serpente e a distribuição nos tecidos da presa. Muitas das toxinas, incluindo as com atividade enzimática, além das pontes dissulfetos, apresentam N-glicosilações. Estas duas características associadas à citotoxicidade de muitas toxinas podem justificar as dificuldades de obtê-las na forma recombinante.

Muitas tentativas relativas à expressão de toxinas animais em bactéria, freqüentemente em *E.coli*, foram publicadas (MAEDA *et al.*1991; HAHN *et al.*1996; PAN *et al.*,1999; HUNG & CHIOU,2000; GUO *et al.*,2001; ZHA *et al.*2003; YANG *et al.*,2003, YUAN *et al.*,2004) principalmente com os objetivos de caracterização e melhor conhecimento da função, no entanto neste sistema de expressão procariótico não ocorrem as modificações pós-traducionais e a maioria das proteínas recombinantes são obtidas em corpos de inclusão, sem atividade biológica frustrando o objetivo inicial. Assim novos métodos de *refolding in vitro* têm sido desenvolvidos na tentativa de solucionar esse problema, mas nos resultados ainda há muita variabilidade na eficiência no processo de renaturação da proteína, com baixo rendimento e, em alguns

casos, a toxina expressa renaturada apresenta atividade biológica diminuída (HUNG & CHIOU 2000; YUAN *et al*, 2004).

Neste contexto, este trabalho visa contribuir desenvolvendo a expressão de uma toxina de serpente em um sistema eucariótico - em célula de mamífero. Este sistema de expressão eucarioto é capaz de formar pontes dissulfetos e modificações pós-traducionais como a glicosilação, permitindo a obtenção e a secreção de uma proteína recombinante em sua forma ativa de forma similar à glândula de veneno. Para tanto, foi escolhida a gioxina - uma proteína do veneno da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* com atividades neurotóxica e trombina símile, porém com baixa citotoxicidade.

1.1-As serpentes.

As serpentes estão distribuídas pelo mundo e habitam o solo, as árvores ou a água. Elas são classificadas em 14 ou 15 famílias com 2.400 espécies. As serpentes da família Viperidae apresentam duas subfamílias principais: *Viperinae* e *Crotalinae*.

Os membros da subfamília *Viperinae* são encontrados na Europa, Ásia e África, menos em Madagascar. Esta subfamília apresenta nove gêneros e aproximadamente 54 espécies, sendo que o gênero *Vipera* contém 22 espécies sendo amplamente distribuídas desde o norte da Escandinávia, até o leste do Japão e na região sul de Taiwan.

Já a subfamília *Crotalinae* (*pit vipers*) ocorre na Ásia (*Calloselasma rhodostoma* - sudeste asiático, *Deinagkistrodon* - Ásia, *Gloydius* - Ásia e Japão, *Trimeresurus* - Ásia, *Agkistrodon* - América do Norte e América Central, *Crotalus* - América do Norte até o América do Sul, *Sistrurus* América do Norte, América Central, *Lachesis*- América Central e América do Sul, *Bothrops*- América do Sul. Esta subfamília é mais especializada que a *Viperinae* por apresentar a fosseta loreal, órgão sensorial capaz de perceber variações de temperatura de até 0,01°C, localizado em uma cavidade entre o olho e a narina. Todas as serpentes dessa subfamília são potencialmente perigosas ao homem (BRATTSTROM, 1964; MATTISON, 1995, GUTBERLET JR, R. L. & CAMPBELL, J. A, 2001).

Na figura 1 podemos observar uma filogenia que traça a relação das serpentes dos gêneros *Trimeresurus*, *Bothrops*, *Agkistrodon*, *Lachesis* com as serpentes do gênero *Crotalus*. As serpentes pertencentes ao gênero

Agkistrodon e *Trimeresurus* são as mais primitivas dessa subfamília *Crotalinae*. (BRATTSTROM, 1964). É possível encontrar toxinas similares em *Lachesis* e *Crotalus*, como o análogo de trombina-símile/giroxina encontrada nas serpentes *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus* (MAGALHÃES *et al*, 1993, CAMILLO *et al*, 2001).

1.1.1- As cascavéis e o veneno.

As cascavéis pertencem à família *Viperidae* subfamília *Crotalinae* e gênero *Crotalus*. Este gênero possui 26 espécies encontradas desde o norte do Canadá até o sul da Argentina e apresenta como principal característica o guizo ou chocalho (Do grego: *krotalon*).

A subespécie *Crotalus durissus terrificus* pode ser encontrada em regiões normalmente semi-áridas e secas do território brasileiro até países vizinhos onde a sua picada é muito temida (AMARAL, 1978) (figura 2). Em seu veneno existem 4 grupos de toxinas majoritárias:

- Fosfolipases A₂ (crotoxina, principal neurotoxina do veneno descrita por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938).
- Metaloproteases (convulxina descrita por PRADO-FRANCESCHI & VITAL BRAZIL, 1981.).
- Miotoxinas (crotamina descrita por GONÇALVES & VIEIRA, 1950).
- Serinoproteases (giroxina descrita por BARRIO, 1961 e uma trombina-símile descrita por RAW *et al*, 1986). Estas toxinas estão apenas parcialmente caracterizadas sendo que a giroxina está envolvida em efeitos neurotóxico e coagulante.

1.2- Serino proteases.

As serino proteases são enzimas proteolíticas que utilizam serina no seu sítio catalítico, são muito freqüentes e formam a maior superfamília das peptidases, sendo encontradas desde vírus e bactérias, até em eucarióticos (RAWLINGS & BARRETT, 1993).

As serino proteases possuem uma ampla gama de atividades incluindo exopeptidases, endopeptidases, oligopeptidases e omega-peptidases. Mais de 20 famílias (denominadas de S1 a S66) de serino proteases foram identificadas até o momento e são agrupadas segundo sua similaridade estrutural e evidências funcionais (RAWLINGS & BARRETT 1994).

As famílias das serino proteases podem ter diferentes origens evolutivas e, portanto, diferentes estruturas tridimensionais. Entretanto, a reação proteolítica compartilha uma similaridade no mecanismo sendo que a quimotripsina, a subtilisina e a carboxipeptidase C tem em comum uma tríade catalítica formada por serina, ácido aspártico e histidina. A serina age como nucleófilo, o aspartato como eletrófilo e a histidina como base (figura 3).

1.2.1- Subfamília S1A.

As serino proteases da subfamília S1A apresentam como principal característica um domínio tripsina.

A subfamília S1A (família da quimotripsina bovina) é a maior de todas as famílias de proteases, com mais de 4875 seqüências de enzimas identificadas até ao momento. Apresentam a tríade catalítica His-Asp-Ser e as seqüências de aminoácidos ao redor do sítio catalítico formam motivos muito conservados. Suas estruturas tridimensionais são extremamente conservadas. Até o momento todas as proteases da família S1 são endopeptidases.

Diversas serino proteases da família da quimotripsina já tiveram sua estrutura tridimensional determinada. A quimotripsina apresenta dois barris- β em amarelo, dispostos em um ângulo reto entre si. O padrão cruzado das folhas β pregueadas é denominado de Chave Grega (*Greek Key*). Apresentam 6 pontes dissulfetos em azul e 2 α -hélices em vermelho (figura 4).

As proteases desta família desempenham muitos papéis biológicos, principalmente na digestão (*p.ex.* a tripsina e a quimotripsina), homeostase (fatores da coagulação), resposta imune mediada por IgA (*p.ex.* a triptase e a *chymase* encontradas em células citotóxicas e em mastócitos) entre muitas outras atividades importantes. Por essa razão, elas têm relevância farmacêutica e biomédica como alvo de drogas, relacionadas à hemostase e ativação do sistema complemento.

As funções biológicas são tão diversas quanto os diferentes grupos que compõem a subfamília S1A, entre elas podem ser citadas: quimotripsinas, elastases, enteroquinases, calicreínas, fatores da coagulação do sangue VII, IX, X, XI e XII, trombina, plasminogênio e proteína C, além das proteases do veneno de serpentes, tais como: ancrod, batroxobin, flavoxobin, toxina ativadora de proteína C, crotalase, etc.

As serino proteases de venenos de serpentes (SVSPs - *Snake venom serine protease*) apresentam muitas destas funções, sendo bem estabelecidas as ações na cascata da coagulação, conforme ilustrado para algumas toxinas mostradas na figura 5.

1.2.2-Serino proteases no veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus*.

Até o momento, apenas duas serino proteases foram isoladas e caracterizadas no veneno de *Crotalus durissus terrificus*: a giroxina (BARRABIN *et al.*;1978; SEKI *et al.*,1980) e uma enzima trombina símile (RAW *et al.*,1986, BERCOVICI *et al.*, 1987 e RUIZ DE TORRENT *et al.*, 2007). Apenas para a giroxina há dados sobre a seqüência, embora ainda parciais, ou seja, dos 30 aminoácidos N-terminal (DA SILVA *et al.*,1989) (figura 6).

1.2.2.1-Trombina-símile.

RAW *et al.*, 1986, demonstraram que a enzima trombina símile e a giroxina se separam em picos diferentes no fracionamento do veneno bruto com sulfato de amônio. Mas como não estão totalmente seqüenciadas podem ser isoformas de uma mesma proteína.

A enzima trombina símile descrita comportou-se como uma proteína de cadeia única com peso molecular de 34 kDa determinado em eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). No teste de coagulação clivou apenas a cadeia A α do fibrinogênio humano e o pH ótimo foi 8. O tempo de coagulação do plasma variou para diferentes espécies sendo em ordem crescente rato, homem, coelho e cavalo.

De acordo com RUIZ DE TORRENT *et al.*, 2007, a enzima trombina símile do veneno de *C.d.terrificus* apresenta efeitos neurotóxicos, mas não ocasiona o rolamento em barril.

1.2.2.2-Giroxina.

De acordo com CAMILLO *et al.*, 2001, a giroxina corresponde a 2,5% da quantidade total de proteínas deste veneno. Em um fracionamento do veneno total o pico referente à giroxina apresenta contaminantes que provavelmente estão relacionados a associações entre moléculas da própria giroxina formando dímeros, ou à formação de complexos entre a giroxina e

outras proteínas do veneno resultando em "agregados" com diferentes tamanhos moleculares (CAMILLO *et al*, 2001, BARRABIN *et al*, 1978). Este dado sugere que a ligação existente é fraca e com a adição de ureia ou β -mercaptoetanol ocorre a dissociação, confirmando tratar-se de uma proteína de cadeia única. A giroxina, após ser purificada por gel filtração e afinidade, apresentou por análise de eletroforese em gel SDS-PAGE com β -mercaptoetanol o peso molecular entre 30 e 36kDa.

-Efeito Hemotóxico - Algumas SVSPs de serpentes são classificadas como trombina-símile, pois também são enzimas que agem na coagulação mimetizando a ação da trombina (uma enzima multifuncional), promovendo a conversão do fibrinogênio em fibrina. No entanto, a maioria destas enzimas (denominadas de venombina A) atuam liberando apenas o fibrinopeptídeo (FPA) da cadeia A α do fibrinogênio, produzindo apenas o monômero de fibrina ("rede frouxa") que não liga o fator XIII, portanto não há formação do polímero. Algumas poucas SVSPs clivam o fibrinogênio formando FPB-fibrinopeptídeo B (denominadas de venombina B) ou ambos (venombinas AB) mas não com a mesma eficiência quando comparadas à trombina. (MARSH, 1998, SERRANO & MAROUN, 2005, CASTRO *et al*, 2004) (figura 7).

A giroxina é uma serino protease trombina-símile com um único domínio tripsina semelhante ao subdomínio serina-protease da trombina. Apresenta atividades esterásica e amidásica (BARRABIN *et al*, 1978, ALEXANDER *et al*, 1988). Os resultados de nosso laboratório demonstraram a ação da giroxina clivando fibrinogênio e liberando preferencialmente o fibrinopeptídeo A (FPA). (ARRUDA PAES *et al*, 1996).

-Efeito neurotóxico - A giroxina além de atuar sobre a coagulação apresenta uma marcante atividade neurotóxica diferenciando das outras SVSPs; gera uma síndrome que ocasiona um rolamento em barril. Este comportamento também foi descrito até hoje para as serino proteases crotalase (*Crotalus atrox*), ancrod (*Agkistrodon rhodostoma*) e análogo de giroxina (*Lachesis muta muta*) (ALEXANDER *et al*, 1988).

Esse efeito neurotóxico da giroxina do veneno crotálico foi descrita por BARRIO (1961). Após injeção endovenosa ou intraperitoneal em ratos e camundongos, induz sintomas como a falta de coordenação dos movimentos

resultando em perda de equilíbrio, e após uma breve fase tônica o animal gira ao longo do eixo longitudinal do corpo lembrando o rolar de um barril (daí o nome "rolamento em barril"). O mesmo animal gira sempre para o mesmo lado com 3% de exceções (WURPEL *et al.*, 1986a). Alguns animais morrem, em geral por dificuldades respiratórias, enquanto outros se recuperam ficando completamente assintomáticos em aproximadamente 1 hora. Muitos animais que não desenvolvem a rotação em barril apresentam um ou mais sintomas, tais como imobilidade, alguns graus de ataxia, extensão dos membros posteriores e limpeza.

Outras características importantes do rolamento em barril são:

⇒ É um fenômeno tudo ou nada. Não apresentando relação dose/resposta (WURPEL *et al.*, 1986a).

⇒ Sofre sensibilização. Uma segunda injeção de arginina-vasopressina, via intracerebroventricular induz o rolamento em barril em um número maior de ratos e causa uma diminuição do tempo de latência em relação ao primeiro dia (WURPEL *et al.*, 1986b; WILLCOX *et al.*, 1992). No entanto, a síndrome do rolamento em barril não é induzida por uma nova injeção da giroxina logo após a recuperação do animal (ALEXANDER *et al.*, 1988).

⇒ Ocorre degeneração do sistema nervoso. Análises histológicas do hipocampo de ratos após injeções intracerebroventricular de giroxina crotálica foram caracterizadas pelo aparecimento de danos neuronais presentes tanto no local da injeção quanto em áreas distantes do sítio de aplicação (MOREIRA, 1993).

Alguns autores sugeriram que esta síndrome seria semelhante à lesão labiríntica (BARRIO, 1961; SEKI *et al.*, 1980); enquanto que outros acreditam que teria um efeito indireto sobre o sistema nervoso central (ALEXANDER *et al.*, 1988; DA SILVA *et al.*, 1989). Esta hipótese parece ser a mais provável, pois CAMILLO *et al.* 2001 demonstraram que a giroxina não modifica a liberação *in vitro* de dopamina ou acetilcolina em tecido estriatal de ratos ou de camundongos.

A giroxina por ser uma serino protease, pode estar correlacionada com os receptores PARs (*protease activated receptors*), uma vez que as atividades fisiológicas das serino proteases, como trombina, tripsina e enzimas trombina-símbles são mediadas por estes receptores. Os PARs foram descritos em cérebros de mamíferos e a sua ativação faz com que algumas serino proteases

aumentem a permeabilidade das células endoteliais. Esses receptores podem estar correlacionados com a neurotoxicidade da giroxina. (ALVES DA SILVA *et al*, 2006). No entanto o mecanismo pelo qual a giroxina induz o rolamento em barril assim como os processos patológicos envolvidos nesta síndrome ainda são desconhecidos.

A caracterização bioquímica da giroxina irá permitir realizar estudos mais detalhados de estrutura-atividade. Neste sentido, a biologia molecular tem muito a contribuir, pois possui ferramentas para determinar a organização gênica desta toxina, o precursor (pois a toxina é secretada na forma de um zimógeno inativo que posteriormente é clivada por autocatálise) e definir a estrutura primária da toxina madura que ainda é desconhecida, ou seja, contribuir para resolver questões que até hoje não tem respostas.

1.3-Serino proteases recombinantes dos venenos de serpentes.

As enzimas trombinas-símbles dos venenos de serpentes apresentam 12 resíduos de cisteínas e formam 6 pontes dissulfetos. As toxinas secretadas pelo epitélio glandular sofrem modificações pós traducionais como clivagem do peptídeo sinal, maturação no complexo de Golgi com a conseqüente glicosilação e o processamento do pró-peptídeo (ativação do zimógeno). Estas são características de proteínas secretadas eucarióticas. Portanto, o sistema de expressão recombinante tem de ser igualmente apto em realizar essas funções.

1.4- Glicosilação.

A giroxina purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta 3,8% de açúcares totais (CAMILLO *et al*, 2005).

A maioria das SVSPs é N-glicosilada, com exceção da trombina-símble contortrixobin de *Agkistrodon contortrix contortrix* e flavoxobin de *Trimeresurus flavoviridis* (AMICONI *et al*, 2000). A glicosilação pode variar conforme a posição da asparagina e não são bem caracterizadas quais são as cadeias de açúcares presentes.

As serino proteases I e II do veneno de *Agkistrodon acutus* (AaV-SP-I e AaV-SP-II) são descritas por serem pouco glicosiladas na asparagina 35. Na figura 35 é mostrado o modelo da DAV-PA (Aav-SP-II) contendo a glicosilação na asparagina 35 com o monossacarídeo NAG³⁰¹. A serino protease AaV-SP-I

apresenta 9% de carboidratos sendo descrita por apresentar o trissacarídeo NAG³⁰¹-FUC-³⁰²-NAG³⁰³ (N-acetil- β -glicosamina) e a serino protease AaV-SP-II apresenta 4% de carboidratos apresentando um monossacarídeo NAG³⁰¹. No entanto, esses carboidratos se encontram próximos do sítio ativo e os diferentes tipos de açúcares influenciam a estrutura do sítio ativo e conseqüentemente, resultam na alteração da atividade amidolítica (ZHU *et al*, 2005).

Duas proteínas muito parecidas em sua função apresentam quantidades de açúcares muito diferentes, como a toxina ancrod (*Agkistrodon rhodostoma*) e batroxobin (*B. moojeni*) – ambas são N-glicosiladas, mas possuem respectivamente 31% e 5,8% de massa de carboidratos neutros. Estudos estruturais mostraram que os 5 sítios de N-glicosilação da ancrod apresentam um padrão heterogêneo de glicoproteína sendo a maioria açúcares complexos di-tri- e tetra antena do tipo 1 (Gal β 3GlcNacB), N-acetilagalactosamina sialidada e uma pequena proporção de oligossacarídeos (2 a 3% dos açúcares totais) apresentam um braço NeuAc α 3GalNac β 4GlcNac.

A batroxobin do veneno da serpente Sul Americana *Bothrops moojeni* (que é uma glicoproteína com propriedades enzimáticas muito próximas da ancrod) apresenta açúcares complexos diantena, carregando exclusivamente a antena GalNac β 4GlcNac, sendo uma pequena parte substituída por Neu5Ac ou Neu4,5Ac2 com adição de resíduos fucose e uma pequena quantidade de espécies híbridas (LOCHNIT & GEYER, 1995).

Qual o papel dos açúcares na atividade biológica? Será que as diferenças na glicosilação entre duas toxinas, com funções biológicas muito próximas e comercialmente usadas como agentes anticoagulantes, podem contribuir para que o ancrod ocasione o rolamento em barril não descrito para a batroxobin? Esta ainda é uma questão em aberto, pois entre as toxinas que causam o rolamento em barril, a crotalase e a giroxina são pouco glicosiladas em contraste com o ancrod que é muito glicosilado.

A importância da glicosilação foi também descrita para metaloproteases. De acordo com GARCÍA *et al*, 2004, a N-glicosilação da jararagina e da ACLH (que são metaloproteases hemorrágicas do veneno de *Bothrops jararaca* e de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, respectivamente) é fundamental para a atividade hemorrágica. Essas toxinas foram expressas em *E.coli* e após o *refolding* da proteína recombinante não foi verificada a

atividade. Da mesma forma, as toxinas nativas deglicosiladas também perderam a atividade, no entanto, a presença da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi mantida. A ACLH apresenta o ácido siálico terminal $\alpha(2-6)$ ligado a uma galactose na cadeia de N-glicosilação.

1.5. Sistemas de expressão de proteína recombinante.

1.5.1- Sistema de expressão em *Escherichia coli*.

As produções dessas enzimas em sistemas procarióticos resultam em sua maioria, na formação de corpos de inclusão como o obtido para a batroxobina de *Bothrops atrox* (MAEDA *et al*, 1991) e acutina de *Agkistrodon acutus* (PAN *et al*, 1999).

Segundo YUAN *et al*, 2004, a expressão de uma trombina-símile em *E.coli* DE3 gera a formação de corpúsculo de inclusão por tratar-se de uma proteína eucariótica rica em cisteínas, logo com muitas pontes dissulfetos. Para tentar solucionar este problema, os autores fizeram uma co-expressão juntamente com a tioredoxina (TrxA) e obtiveram a calobina-T - uma enzima trombina símile da serpente *Agkistrodon caliginosus* na forma solúvel. No entanto, a proteína recombinante apresentou baixa atividade amidolítica em substrato sintético devido à má formação das pontes dissulfeto. Em uma segunda abordagem, a isomerase dissulfídica (DsbC) foi introduzida na célula hospedeira e coexpressou juntamente com a calobina na presença de TrxA formando a calobina-TD. Com este sistema obteve-se um aumento da solubilidade e da atividade enzimática, mas ainda foi mantida baixa a atividade amidolítica. No entanto, ambas as formas recombinantes apresentaram atividade enzimática sobre fibrinogênio embora o produto obtido fosse isento da capacidade de coagulação; a ação da calobina TD foi maior do que a calobina-T.

Em um sistema de expressão em *E.coli*, através de um método inovador, HUNG e CHIOU 2000 expressaram a serino protease Tm-5 da serpente *Trimeresurus mucrosquamatus* com atividade calicreína símile. No sistema de expressão colocaram a cauda de polihistidina ligada a um sítio autocatalítico que pode ser clivado especificamente pela serino protease. Esta montagem resultou em uma enzima recombinante ativa, mas com um baixo rendimento (2%), indicando uma baixa eficiência no processo de "refolding" da proteína.

MEMARI *et al* 2006, utilizaram a expressão da serino protease calicreína 9 de tecido humano (KLK9) em *E.coli*, purificada e utilizada para a obtenção de um imunógeno adequado para produzir anticorpos monoclonais. Neste trabalho também foram apresentados resultados referentes à clonagem e expressão desta enzima, contendo o pre-pro peptídeo, em células CHO. O rendimento foi 200 µg/L e a proteína recombinante apresentou massa molecular maior do que a produzida em *E.coli*, provavelmente devido à presença da cadeia glicosídica.

1.5.2- Sistema de expressão em eucarioto.

1.5.2.1-*Pichia pastoris*.

A expressão da batroxobin (enzima trombina símile da serpente *Bothrops atrox moojeni*) em um sistema de expressão eucarioto na levedura *Pichia pastoris* resultou em uma proteína recombinante ativa e obtida com bom rendimento (7mg/L do meio de cultura, com rendimento de 53,2%). Nos testes de atividade enzimática pro-coagulante *in vitro* e *in vivo*, a enzima foi ativa pois ocasionou uma diminuição da concentração do fibrinogênio no plasma de rato, assim como, reduziu o tempo de sangramento da cauda e o tempo total de coagulação. No entanto houve uma diferença na massa molecular em relação à toxina nativa. A toxina nativa apresentou 37kDa, enquanto que a batroxobin recombinante apresentou 33kDa. Esta diferença foi atribuída à diferença de glicosilação realizada pela levedura, que é diferente da realizada pela glândula da serpente. A batroxobin recombinante expresso pela *Pichia pastoris* pareceu apresentar estruturas de carboidratos típicos de levedura (YOU *et al*, 2004).

1.5.2.2-Célula de mamífero.

Há poucos trabalhos sobre expressão de SVSPs em células de mamíferos. Um é referente ao ativador de protrombina presente no veneno da *Pseudonaja textilis*, que foi expresso em célula de rim humano (H293F). Nesta construção, o cDNA completo codifica para o peptídeo sinal, propeptídeo, cadeia leve e cadeia pesada relacionada com o fator X de mamífero. A expressão eficiente da protease foi alcançada em construções em que o peptídeo sinal foi deletado e o sítio de clivagem entre a cadeia leve e a cadeia pesada foi modificado, ou o peptídeo sinal foi substituído por um peptídeo

envolvido no processamento de receptor de insulina. A protease foi expressa ocasionando uma eficiente coagulação do sangue e do plasma (FILIPPOVICH *et al*, 2005).

A Bothrojaracin do veneno de *Bothrops jararaca* é um potente inibidor de trombina. Essa protease recombinante foi expressa em célula de rim de macaco COS-7, sendo secretada para o meio de cultura com a capacidade de se ligar e inibir a trombina (AROCAS *et al*, 1997).

As referências comentadas acima evidenciam a dificuldade de se expressar uma SVSP com rendimento aceitável e com estrutura e atividade similar à proteína nativa. Observamos que expressar em um sistema procarioto é problemático devido à presença das pontes dissulfetos que dificultam a obtenção da toxina na conformação correta, portanto em sua forma ativa; assim como não ocorre o processamento pós traducional, como a glicosilação, que parece ser essencial para a atividade biológica.

1.6- Aplicações das serino proteases do veneno de serpente em saúde.

Com relação às serino proteases do veneno de serpente, há um interesse comercial para tratamento clínico de infarto do miocárdio, trombooses em veias profundas, pancadas ou embolia pulmonar (MARKLAND,1988). As enzimas trombina-símile denominadas de venombina A comercialmente disponíveis são: ancrod (Arvin® da *Agkistrodon rhodostoma*) sendo eficaz em limitar o volume do infarto; batroxobin (Defibrase® da *Bothrops moojeni*), sendo utilizado para remover o fibrinogênio do plasma, crotalase (de *Crotalus atrox*). Outras SVSPs que atuam sobre o fibrinogênio são: análogo da giroxina (*Lachesis muta muta*), acutobin (*Agkistrodon acutus*), bothrombin (*Bothrops jararaca*).

Segundo THOMAZINI-SANTOS *et al*,2001, há uma aplicação em fase experimental referente a utilização em cirurgias da fração trombina-símile isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em conjunto com o fibrinogênio animal, com o intuito de produzir uma "cola de fibrina" que pode usada com alternativa à sutura tradicional capaz de reduzir a morbidade no pós-operatório e excelentes resultados em feridas com cicatrização difícil como em câncer de pele, cirurgias cardíacas, fístulas estomacais e intestinais, entre outros e melhores efeitos cosméticos evitando a formação de quelóides.

Estudos com SVSPs demonstraram que além de ser trombina-símile, apresentam diversas outras atividades específicas, tais como ativadores de plasminogênio: LV-PA (*Lachesis muta muta*), TSV-PA (*Trimeresurus stejnegeri*), PA-BJ (*Bothrops jararaca*); ativadores de proteína C: como a toxina ativadora de proteína C de *Agkistrodon contortrix contortrix* (ACC-C) que é uma enzima trombina-símile comercialmente vendida (Protac® da *Agkistrodon contortrix*), um anticoagulante utilizado para inibir a oclusão das artérias em como em pacientes que possuem válvulas artificiais ou que sofreram cirurgias cardíacas (KOH et al, 2006).

2. OBJETIVOS

Neste sentido, esperamos ter deixado claro a importância das SVSPs e as aplicações em saúde, a atividade sobre diversos sistemas biológicos e a peculiaridade da giroxina em induzir o rolamento em barril, as lacunas na caracterização de serino proteases do veneno da mais abundante cascavel brasileira e finalmente a ausência de um sistema de expressão adequado para esta classe de enzimas.

Assim como objetivo geral, o presente trabalho visa contribuir com a clonagem e seqüenciamento da giroxina e possíveis variantes e desenvolver um sistema de expressão de serino protease de venenos de serpente na sua forma ativa, com as pontes dissulfetos e modificações pós traducionais, expressando-a em células de mamíferos.

De modo específico os objetivos são:

- Obter a seqüência da giroxina e a organização do cDNA a partir de uma biblioteca de cDNA de uma glândula de veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
- Pesquisar a presença de variantes da giroxina nesta biblioteca.
- Analisar as seqüências obtidas por similaridade em bancos de dados e correlacionar a função e a estrutura tridimensional.
- Clonar e expressar a giroxina em célula de mamífero.
- Isolar e verificar a atividade da giroxina recombinante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

- ✓ A água utilizada em todos os experimentos foi purificada em sistema MILLI Q (18 Ω).
- ✓ Todos os reagentes foram de pureza grau analítico ou grau de biologia molecular.
- ✓ Todos os seqüenciamentos foram realizados pelo serviço de seqüenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano-Instituto de Biociências (USP) (protocolo descrito no apêndice 9.5).

3.1.1. Materiais utilizados nos ensaios de Biologia Molecular, Cultura de Células e Análises de Proteínas.

- ✓ Agarose, Grau Biologia Molecular, (*BioRad*).
- ✓ Linhagens de bactérias *E.coli* (vide tabela 5):
 - TOP 10, DH5 α -T1R, adquiridos no kit pCR2.1 TOPO (*Invitrogen*).
 - Hb 101 (ATCC).
 - NIH RZ 1032 (ATCC).
- ✓ Biblioteca de cDNA da glândula da serpente *Crotalus durissus terrificus* preparada pelo método descrito em RÁDIS-BAPTISTA *et al*, 1999 e gentilmente cedida pelos autores.
- ✓ Desoxinucleotídeos - dATP, dCTP, dGTP e dTTP (*Invitrogen*).
- ✓ Enzimas utilizadas para clonagens, subclonagens, ligação inserto/vetor, fosforilação de *primer* e manipulação de RNA, vide tabela 4.
- ✓ Kit SuperScript III *First-Strand Synthesis System* for RT-PCR (*Invitrogen*).
- ✓ kits de Purificação de DNA plasmidial:
 - S.N.A.P Miniprep (*Invitrogen*).

- WizardPlus S. V. Minipreps (*Promega*).
- ✓ Kits de purificação do DNA em gel de agarose:
 - S.N.A.P UV-FREE *Gel Purification* (*Invitrogen*).
 - QIAquick *Gel Extraction* (*Qiagen*).
- ✓ Lipofectamine™ 2000 (*Invitrogen*).
- ✓ Marcadores de pares de bases de DNA:
 - 1kb *Plus DNA Ladder* -100pb a 12kb (*Invitrogen*).
 - λ DNA/Hind III *fragments*- 125pb-23,1kb (*Invitrogen*).
 - 250pares de bases -250 a 3,5kb (*Invitrogen*).
- ✓ Os vetores utilizados (vide apêndice 9.4 e tabela 1):
 - pCR2.1 TOPO (*Invitrogen*).
 - pSecTag2Hygro A (*Invitrogen*).
 - pED cedido gentilmente por Kauffman (Kauffman, 2000).
 - pEGFP-N1 (*Biosciences Clontech*).
- ✓ *Primers* utilizados para clonagem e seqüenciamento, mutagênese e RT-PCR, vide tabela 2.
- ✓ *Primers* comerciais:
 - M13 sense, M13 antisense, T3 sense , T7 antisense, vide tabela 3.
- ✓ Linhagens celulares:
 - células de ovário de hamster chinês deficientes no gene da enzima diidrofolato redutase CHO DXB11 dhfr- gentilmente cedida pelo Dr. L. Chasin (Columbia University, NY, EUA); CHO-K1 dhfr+ (ATCC:CRL-9618) e célula de rim de macaco COS-7 (*Cercopithecus aethiops*) (ATCC: CRL-1651).
- ✓ Meio mínimo essencial α-MEM contendo 10 mg/L de ribonucleosídeos e desoxiribonucleosídeos (*Cultilab*).
- ✓ Meio mínimo essencial α-MEM na ausência de ribonucleosídeos e desoxiribonucleosídeos (*Cultilab*).

- ✓ Meio D-MEM- *High Glucose* (Invitrogen).
- ✓ Soro fetal bovino (Cultilab).
- ✓ Soro fetal bovino dialisado (Life Technologies).
- ✓ Tripsina (Sigma).
- ✓ Penicilina (Invitrogen).
- ✓ Estreptomicina (Invitrogen).
- ✓ Anfotericina B- fungizona (Invitrogen).
- ✓ L-glutamina (Gibco).
- ✓ Veneno liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* e antisoro crotálico gentilmente cedido pelo Instituto Butantan.
- ✓ Anticorpo anti-IgG eqüina biotinilada feito em coelho conjugada com peroxidase (Sigma).
- ✓ Kit ECL + PLUS quimioluminescente- *Western blotting detection system* (Amershan Pharmacia).
- ✓ Marcador de peso molecular *Low-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (45KDa - 2,5KDa) (Amersham Biosciences).
- ✓ Membrana de nitrocelulose-Hybond-ECL, (Amershan Biosciences).
- ✓ Resina benzamidina sepharose 4B (*Benzamidine Sepharose 4B Fast Flow*) (Amershan Biosciences).
- ✓ TAME (N- tosyl-arginina-metil éster) (Sigma).
- ✓ Trizol (Invitrogen).

3.1.2. Equipamentos.

- ✓ Agitador (*Tayo Rotator*).
- ✓ Aparelho Mili-Q-plus, purificador de água (Millipore).
- ✓ Autoclave, modelo SS-245E (Tomy).
- ✓ Banho-maria, modelo 100, (Fanem).
- ✓ Cubeta de eletroporação (BioRad).
- ✓ Electroporador, modelo II (Invitrogen).
- ✓ Espectrofotômetro (Beckman).
- ✓ Estufa bacteriológica (QUIMIS).
- ✓ Freezer -80°C, modelo 939 (Forma Scientific, Inc)
- ✓ Fluxo laminar modelo 2256 (TROX).
- ✓ Image Master VDS (Amershan pharmacia).

- ✓ Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421 (TECNAL).
- ✓ Integrated Speed Vack System, Farmingdale, NY (Savant Instruments INC).
- ✓ Microscópio invertido, modelo TMS (Nikon).
- ✓ Microscópio óptico modelo Axioskop 40 FL (Carl Zeiss).
- ✓ PCR 2400 24 poços (Perkin Elmer Gene amplification).
- ✓ Sistema de eletroforese horizontal- Submarine type electrophoresis system (MUPID-2plus).
- ✓ Sistema de eletroforese vertical, modelo SE250, Hoefer (Pharmacia Biotech).
- ✓ Sistema semi-seco de eletrotransferência (BioRad).
- ✓ Sonicador, Danbury Connecticut U.S.A (Sonics & Materials Inc).

3.1.3. Ferramentas de Bioinformática.

- ✓ BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* ⁽¹⁾ (BLASTn-nucleotídeos e BLASTp-proteína).
- ✓ CLUSTAL W: *European Bioinformatics Institute Sequence Analysis* ⁽²⁾
- ✓ EXPASY - *Expert Protein Analysis System- (Post-translational modification prediction e Pattern and profile search-ScanProsite)* ⁽³⁾
- ✓ Fator de confiança do SWISS-MODEL (ProModII) ⁽⁴⁾
- ✓ NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 3.1 presentes no site CBS - *Center for Biological Sequence Analysis* ⁽⁵⁾.
- ✓ MACAW (*Multiple Alignment Construction & Analysis Workbenck*) (SCHULER et al, 1993)
- ✓ PHYLIP (*Phylogeny Inference Package*) versão 3.2 (FELSENSTEIN, J. 1989).
- ✓ Programa *Graph Pad Prism* ⁽⁶⁾

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

² <http://www.ebi.ac.uk>

³ <http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>

⁴ <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>

⁵ <http://www.cbs.dtu.dk/>

⁶ <http://www.graphpad.com/>

- ✓ Programa *Phred* (⁷) (EWING *et al*, 1988).
- ✓ Programa *WHAT IF* (⁸)
- ✓ RCSB PDB - *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank* (⁹).
- ✓ SignalP versão 3.0 *Prediction of signal peptide cleavage sites* presente no site CBS - *Center for Biological Sequence Analysis* (¹⁰)
- ✓ SPIDEY: *mRNA to-genomic alignment program created by WHEELAN, S* (¹¹)
- ✓ SWISS-MODEL (¹²) Programa DEEP VIEW versão 3.7 (*Swiss Pdb-Viewer*).
- ✓ Método de minimização de energia utilizou-se o programa Gromos 96 (GUEx & PEITSCH, 1997).

⁷ <http://www.phrap.org/>

⁸ <http://swift.cmbi.kun.nl/whatif/>

⁹ <http://www.rcsb.org>.

¹⁰ <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

¹¹ [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey)

¹² <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>

3.2. MÉTODOS

3.2. Obtenção do clone pCR2.1 TOPO-B2.1.

3.2.1. Definição do *primer* GYR SE.

Foram verificadas em banco de dados as seqüências de nucleotídeos (BLASTn) e proteínas (BLASTp) depositadas para serino proteases do veneno de serpentes.

O alinhamento de algumas destas e a comparação com a seqüência N-terminal de giroxina de *Crotalus durissus terrificus* descrito em DA SILVA *et al*, 1989 utilizando-se o CLUSTAL W, permitiu definir as tríades codantes mais freqüentes para cada aminoácido, a partir da qual foi desenhado um *primer* específico para a giroxina, sendo o *primer* GYR SE complementar aos 24 primeiros nucleotídeos da região que codifica o início do N-terminal. A definição do *primer* se encontra na figura 8.

O PCR foi realizado com uma alíquota da biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *Crotalus durissus terrificus* como DNA molde, o *primer* sense GYR SE e com o *primer* antisense T7 (que é complementar a uma região flanqueadora do sitio de clonagem presente no vetor UniZAP XR). Foi utilizado a Taq DNA polimerase recombinante. Dessa forma, o produto amplificado corresponde à toxina madura e à região não traduzida 3'UTR. A seqüência do *primer* GYR SE se encontra na tabela 2 e do *primer* antisense T7 na tabela 3 e a região de hibridação desses *primers* está representada na figura 9.

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,5%, juntamente com o marcador de DNA de 1kb Plus. Uma alíquota do produto de PCR (inserto) foi clonada no vetor pCR2.1 TOPO e o produto da reação de ligação vetor-inserto foi inserida em *E. coli* TOP 10 (bactéria quimicamente competente).

As colônias recombinantes (brancas) foram selecionadas da placa LB^{AMP} /X-gal e IPTG ágar e cresceram em meio líquido LB^{AMP} por 24h com agitação. Por meio de PCR de colônias (protocolo descrito no apêndice 9.1.7.3), com os *primers* universais M13 sense e antisense e análise em eletroforese em gel de agarose 1,5%, foram identificados os clones recombinantes (com tamanhos aproximados de 1200pb, 900pb e 550pb).

As colônias recombinantes foram inoculadas separadamente em 3 mL de meio LB^{AMP} e cresceram durante a noite com agitação (200rpm). Posteriormente foi realizada a extração do DNA plasmidial, purificação (*kit S.N.A.P Miniprep*) e seqüenciamento. Para a confirmação da seqüência foram necessários vários seqüenciamentos de cada clone.

3.2.2. Análise de seqüências.

Todas as seqüências obtidas nas diferentes etapas deste trabalho foram comparadas com banco de dados de seqüências de nucleotídeos usando o *programa* BLASTn. As seqüências de aminácidos foram traduzidas usando a ferramenta do *translate* do EXPASY e submetidas a uma comparação com bancos de dados de proteínas usando o BLASTp.

A qualidade dos seqüenciamentos foi verificada pelo *software* Phred.

As informações sobre domínio da família, o sítio ativo, pontes dissulfetos e sítio de modificação pós traducional foram previstas utilizando-se a ferramenta de bioinformática EXPASY. Especificamente na predição da modificação pós traducional para os sítios potenciais de glicosilação foram utilizadas as ferramentas de bioinformática NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 3.1.

A predição do peptídeo sinal dos clones (quando presente) foi realizada utilizando-se o programa SignalP, específico para predição de seqüências sinais de secreção de proteínas de eucariotos.

As regiões correspondentes aos éxons nas seqüências dos clones de cDNA foram identificadas por comparação com o alinhamento do gene da batroxobin de *Bothrops atrox* (X12747) (ITOH *et al*, 1988) utilizando-se o programa *Spidey*.

Os cDNA, as toxinas maduras dos clones obtidos e outras seqüências de serino proteases de venenos de serpentes foram alinhados utilizando-se o programa MACAW com a matriz BLOSUM 62.

O dendrograma do alinhamento das seqüências de cDNA foi realizado pelo programa PHYLIP, a matriz de distâncias foi calculada utilizando-se a ferramenta DNAdist. A categoria de substituição de nucleotídeos utilizada foi a F84 em que incorpora diferentes taxas de transição e transversão do DNA, mas também permite diferentes frequências para os 4 nucleotídeos. A árvore foi construída pelo método de *Neighbor-joining*.

Os dendrogramas do alinhamento das toxinas maduras traduzidas dos clones de cDNA, entre si, ou alinhando-se com toxinas homólogas de outras serpentes, foram realizados pelo programa PHYLIP e a matriz de distância foi calculada utilizando-se a ferramenta PROTdist. Para esta análise foi escolhida a categoria de substituição química de aminoácidos de Hall que organiza grupos com propriedades físico-químicas similares: ácidos ou negativos (Glu, Gln, Asp, Asn), básicos ou positivos (Lys, Arg, His), aromáticos não carregados (Phe, Tyr, Trp), apolares hidrofóbicos (Met, Val, Leu, Ileu), polares não carregados (Gly, Ala, Ser, Thr), Cys e Pro. O método de construção foi *Neighbor-joining*.

Para se realizar os modelos tridimensionais da giroxina e Crotalase foi utilizada a ferramenta SWISS-MODEL e o programa DEEP VIEW e para o método de minimização de energia utilizou-se o programa GROMOS 96.

Os modelos cristalográficos do ativador de plasminogênio TSV-PA (1bqy) de *Trimeresurus stejnejeri*, das serino proteases AaV-SP-I (1op0) e AaV-SP-II/DAV-PA de *Agkistrodon acutus* (1op2), da tripsina bovina (2ptc) e da α -trombina humana (1c50) foram obtidos no banco de proteínas RCSB PDB.

3.3. Clonagem de isoformas de serino proteases similares a giroxina.

3.3.1. Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-GPSs.

Com a finalidade de conhecer a sequência a 5'UTR- *untranslated terminal region* e a região codificante para o peptídeo sinal, para o pré-peptídeo e para a toxina madura do clone da giroxina-símile foi realizado um PCR utilizando-se a Taq DNA polimerase *Platinum*, com os *primers* T3 *sense* (que é complementar a uma região flanquadora do sítio de clonagem presente no vetor UniZAP XR) e GYR AS1 que é complementar à região codificante do C-terminal da toxina imediatamente antes do stop códon. A sequência do *primer* T3 se encontra na tabela 3 e do *primer* GYR AS1 na tabela 2 e a região de hibridação desses *primers* está mostrada na figura 10.

Os clones amplificados com esses *primers* foram denominados de giroxina peptídeo sinal (GPS) e não apresentam a região 3' não traduzida (3'UTR).

A banda de maior peso molecular identificada pela análise em gel de agarose 1,5% foi recortada, purificada (*kit S.N.A.P UV-FREE Gel Purification*) e clonada no vetor pCR2.1 TOPO, sendo em seguida inserida em *E. coli* DH5 α -T1R (bactérias eletrocompetentes).

As colônias recombinantes (brancas) foram selecionadas da placa LB^{AMP}/X-gal e IPTG ágar e incubadas no meio líquido LB^{AMP} durante a noite com agitação (200rpm).

Através do PCR de colônias (protocolo descrito no apêndice 9.1.7.3), utilizando os *primers* universais M13 *sense* e *antisense*, em análise em eletroforese em gel de agarose 1,5% foram identificados os produtos de amplificação positivos (que apresentaram um tamanho de inserto de aproximadamente 1200pb). Em seguida estes foram inoculados separadamente em 3 mL de meio LB^{AMP} e cresceram durante a noite com agitação. Após a extração e purificação (*kit S.N.A.P Miniprep*), o DNA plasmidial dessas bactérias foram enviados para seqüenciamento.

As seqüências de cDNA dos clones GPSs foram analisadas de forma similar ao descrito para o clone giroxina-símile, quanto à presença do peptídeo sinal e modificações pós traducionais e comparadas com homólogos presentes em banco de dados do *Expasy*.

O programa MACAW permitiu realizar o alinhamento com seqüências precursoras codificantes para o peptídeo sinal, própeptídeo e toxina madura. Com base neste alinhamento foi desenhado um *primer* peptídeo sinal PS que é complementar aos 18 primeiros nucleotídeos que codificam para a região do peptídeo sinal como mostrado na figura 21 e na tabela 2.

3.3.2. Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-PST7s.

Com a finalidade de conhecer a seqüência precursora completa do clone de giroxina-símile, foi realizado um PCR com a Taq DNA polimerase *Platinum* e os *primers* peptídeo sinal P.S *sense* e T7 *antisense*. Nessas condições de reação esses clones somente não apresentam a região 5'UTR. A seqüência do *primer* peptídeo sinal PS se encontra na tabela 2 e do *primer* T7 na tabela 3 e a região de hibridação desses *primers* é mostrada na figura 11.

A banda de maior peso molecular obtida com o produto de PCR e identificada na análise em gel de agarose 1,5% foi recortada, com o auxílio de

um estilete, purificada (*kit S.N.A.P UV-FREE Gel Purification*), clonada no pCR2.1 TOPO e inserida em *E. coli*. TOP 10 (bactérias eletrocompetentes).

Após crescimento e seleção dos clones recombinantes por PCR de colônias (conforme protocolo descrito no apêndice 9.1.7.3), as colônias que apresentaram bandas de DNA correspondente ao inserto de aproximadamente 1600 pb, foram cultivadas separadamente em 3 mL de meio LB^{AMP}, durante a noite com agitação. Após a extração do DNA plasmidial dessas bactérias (*kit S.N.A.P Miniprep*), o plasmídeo foi seqüenciado. Para obter as seqüências completas dos clones foi necessário sintetizar o *primer* interno *antisense* PST7 AS, que é complementar a região de 1006 a 1023pb do clone PST7:3. e seqüenciar os clones com os *primers* P.S e PST7 AS. As seqüências dos *primers* estão descritas na tabela 2.

Os resultados obtidos foram submetidos a uma comparação com bancos de dados de seqüências de nucleotídeos e proteínas usando os programas BLASTn e BLASTp e analisadas quanto à presença do peptídeo sinal e modificações pós traducionais por comparação com homólogos presentes em banco de dados do EXPASY.

A caracterização das regiões dos éxons foi realizada utilizando-se o programa *Spidey* conforme descrito no subitem 3.2.2- Análise de seqüências (página 21).

3.4. Análise das seqüências de cDNA e de proteínas dos clones obtidos.

3.4.1. Alinhamento e Dendrograma.

Os clones de cDNA obtidos foram alinhados no programa MACAW e o dendrograma foi realizado pelo programa PHYLIP conforme descrito no subitem 3.2.1.2- Análise de seqüências.

Posteriormente foram realizados os alinhamentos de nucleotídeos e aminoácidos evidenciando-se as similaridades e diferenças entre os clones.

3.4.2. Análise dos precursores.

O estudo das seqüências relacionadas aos precursores e toxinas maduras foram realizados por dois métodos: 1) por comparação das seqüências precursoras com toxinas maduras identificando-se o ponto de clivagem e 2) pela análise com o programa SignalP.

1) Comparação das seqüências precursoras com toxinas maduras identificando-se o ponto de clivagem: para essa análise foi utilizado o programa MACAW comparando os clones com as seguintes seqüências: Catroxase I de *Crotalus atrox* (AF227153.1); Serino protease 1 de *Crotalus adamanteus* (AJ251525.1); Protrimubin de *Trimeresurus mucrosquamatus* (U31417); Serino protease de *Trimeresurus gramineus* (D67083.1); Serino protease de *Bothrops jararacussu* (AY251282.1); HS 120 de *Bothrops jararaca* (AB178323.1); Precursor de Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* (P47797); (toxina madura) de *Agkistrodon rhodostoma* (P26324) conforme mostrado na figura 30.

2) Análise com o programa SignalP: a seqüência de um dos precursores foi analisada no programa SignalP permitindo identificar com uma melhor precisão o sítio de clivagem do peptídeo sinal conforme mostrado na figura 31.

3.4.3. Análise das toxinas maduras.

As toxinas maduras foram alinhadas pelo programa MACAW e construído um dendrograma com o programa PHYLIP.

3.5. Comparação das toxinas maduras dos clones obtidos com outras toxinas.

As 29 seqüências de serino proteases de venenos de serpentes escolhidas para a construção do dendrograma funcional, cujas características funcionais estariam relacionadas com as toxinas maduras dos clones obtidos, foram: Tripsina de suíno, *Sus scrofa* (P00761- HUANG *et al* 1993); FVA Factor V-activating enzyme, *Vipera lebetina* (Q9PT41- SIIGUR *et al*, 1999); RVV-Va *Vipera russelli* proteinase, *Daboia russelli siamensis* (P18964 - TOKUNAGA *et al*.1988); Catroxase-2, *Crotalus atrox* (Q8QHK2- BJARNASON *et al*, 1983); Dav-PA, *Agkistrodon acutus* (Q9I8X1- WANG *et al*, 2001); Flavoxobin, *Trimeresurus flavoviridis* (P05620-DESHIMARU *et al*, 1996); Contortrixobin, *Agkistrodon contortrix contortrix* (P82981- AMICONI *et al*, 2000); PA-BJ, *Bothrops jararaca* (P81824-SERRANO *et al*, 1995); LV-PA, *Lachesis muta muta* (P84036-SANCHEZ *et al*, 2000);TSV-PA, *Trimeresurus stejnegeri* (Q91516-ZHANG *et al*, 1995); Calobin, *Agkistrodon caliginosus* (Q91053- HAHN *et al*. 1996); Pallabin-2, *Agkistrodon halys pallas* (Q9YGI6- FAN *et al*,1999);

Halystase, *Agkistrodon halys blomhoffii* (P81176- MATSUI *et al.* 1998); KN-BJ, *Bothrops jararaca* (O13069- SERRANO *et al.*,1998); Venom serine proteinase Sp1, *Crotalus adamanteus* (Q8UUK2); Catroxase-1, *Crotalus atrox* (Q8QHK3); Elegaxobin-1, *Trimeresurus elegans* (P84788- OYAMA & TAKAHASHI, 2002); Mucrofibrase-1, *Trimeresurus mucrosquamatus* (Q91507- HUNG *et al.*, 1994); Dav-KN, *Agkistrodon acutus* (Q9I8X0- WANG *et al.*, 2001); ACC-C Protein C activator; *Agkistrodon contortrix contortrix* (P09872- MCMULLEN *et al.*, 1989); PST7: 7 e 8 de *Crotalus durissus terrificus*; CPI enzyme-2, *Agkistrodon caliginosus* (O42207- HAHN *et al.*, 1998); Bilineobin, *Agkistrodon bilineatus* (Q9PSN3- NIKAI *et al.*, 1995); Gyroxin analog, *Lachesis muta muta* (P33589- MAGALHÃES *et al.*,1993); Ancrod, *Agkistrodon rhodostoma* (P26324 - BURKHART *et al.*,1992); Crotalase, *Crotalus adamanteus* (HENSCHEN-EDMAN *et al.*,1999); PST7: 3 de *Crotalus durissus terrificus*; Gyroxin-like B2.1, *Crotalus durissus terrificus* (Q58G94); GPS: 2 e 5 de *Crotalus durissus terrificus*; PST7: 4 de *Crotalus durissus terrificus*; GPS: 3 e 4 de *Crotalus durissus terrificus*; Dav-X, *Agkistrodon acutus* (Q9I8W9-WANG *et al.*, 2001); Acutobin, *Agkistrodon acutus* (Q9I8X2- WANG *et al.*, 2001); TLG-2B, *Trimeresurus gramineus* (O13061- DESHIMARU *et al.*,1996); Bothrombin, *Bothrops jararaca* (P81661- NISHIDA *et al.*, 1994); Batroxobin, *Bothrops atrox* (P04971- ITOH *et al.*, 1987).

A sequência de tripsina de suíno *Sus scrofa* foi utilizada como grupo externo uma vez que a árvore não tem raiz e sendo a tripsina a sequência menos homóloga em relação as toxinas utilizadas, permitiram evidenciar melhor as similaridades existentes. Também foram eliminadas as sequências com similaridade acima de 90% entre si e os peptídeos sinais dos precursores realizando-se portanto, um alinhamento somente das sequências maduras buscando refletir a similaridade funcional da toxina tal como se encontra no veneno.

3.6. Modelo tridimensional.

Os modelos tridimensionais foram construídos por homologia utilizando-se a ferramenta SWISS-MODEL e o programa DEEP VIEW. Foram construídos para a Crotalase e giroxina-símile, tomando como base os dados cristalográficos do ativador de plasminogênio TSV-PA de *Trimeresurus stejnegeri* (1bqy), das serino proteases AaV-SP-I (1op0) e AaV-SP-II/DAV-PA

(1op2) de *Agkistrodon acutus*. A qualidade dos modelos foi avaliada pelo programa WHAT IF e de acordo com o fator de confiança do SWISS-MODEL (ProModII).

Em seguida, foi realizada a comparação dos modelos tridimensionais obtidos com os modelos cristalográficos da tripsina bovina (2ptc), TSV-PA (1bqy), DAV-PA (1op2) e da região correspondente à cadeia pesada da α -trombina humana (1c50) (aminoácidos 16 a 247).

3.7. Construção do vetor de expressão pED-Giro.

Para a expressão do inserto correspondente à toxina madura de giroxina-símile, o cDNA do clone B2.1 foi clonado no vetor pSecTag2hygro A, que contém o peptídeo sinal IgK. Foi realizada uma mutagênese sítio dirigida para deletar os nucleotídeos presentes entre o peptídeo sinal IgK e o inserto giroxina-símile. Após essa deleção o inserto da fusão IgK-Giro foi clonado no vetor pED, resultando no vetor pED-Giro que possibilitou expressar o cDNA correspondente à toxina madura nas células CHO-DXB11 e células COS-7 e secretar a toxina recombinante no meio de cultura.

É possível observar na figura 12 o esquema da construção do vetor de expressão pED-Giro. As condições de reação com as enzimas de restrição, de modificação e amplificação de DNA estão especificadas na tabela 4 e apêndice 9.3.

O clone giroxina B2.1 escolhido para a expressão contendo um inserto de 1200pb foi obtido com os *primers* GYR SE e T7 *antisense* conforme descrito no subitem 3.2.1.1. Definição do *primer* GYR SE.

3.7.1. Obtenção do inserto da giroxina madura.

O vetor pCR2.1TOPO-Giro B2.1 (19 μ g) foi digerido com a enzima Spe I. Em seguida, o DNA foi purificado por fenol/clorofórmio e precipitado de acordo com o protocolo descrito na apêndice 9.1.6, inativando-se a enzima. Ressuspendeu-se em 85 μ l de água.

Posteriormente 16 μ g do vetor linear foi tratado com o fragmento de Klenow da DNA polimerase, juntamente com 0,05mM dos 4 dNTPs, para preencher a extremidade coesiva obtendo-se uma extremidade de ponta cega. Após a inativação da enzima por calor, o DNA foi precipitado e ressuspenso em 15 μ L de água destilada.

O vetor linearizado pCR2.1TOPO-Giro (20µg) foi a seguir digerido com a enzima de restrição Not I e o produto da digestão analisado em gel de agarose 1% na qual se esperava obter dois fragmentos: o vetor e o inserto correspondente a giroxina-símile com extremidade coesiva Not I a 5' e uma extremidade cega a 3' utilizado como inserto para se ligar no vetor pSecTag2hygro A.

A banda de DNA do inserto giroxina-símile foi recortada do gel de agarose 1% e purificada (*kit S.N.A.P-UV-FREE Gel Purification*). A recuperação do inserto foi confirmado por nova análise em gel de agarose 1%.

3.7.2. Preparo do vetor pSecTag2 Hygro A.

O vetor pSecTag2hygro A (3µg) foi digerido com a enzima de restrição Xho I. Em seguida o DNA foi purificado por fenol/clorofórmio e precipitado de acordo com o protocolo descrito no apêndice 9.1.6, inativando a enzima. O DNA foi ressuspense em 26µl de água destilada.

Posteriormente 2,9µg de vetor linear foi tratado com o fragmento de Klenow da DNA polimerase I, juntamente com 0,05mM dos 4dNTPs, para preencher a extremidade coesiva e obter uma extremidade de ponta cega. Em seguida a enzima foi inativada por calor. O DNA foi precipitado e ressuspense em 25µL de água destilada.

Posteriormente 4µg de vetor linear foi digerido com a enzima de restrição Not I. Após esta reação inativou-se a enzima por calor, obtendo-se um fragmento do vetor com a extremidade coesiva Not I a 5' e uma extremidade cega a 3' para ligar com o inserto giroxina-símile com extremidades compatíveis.

3.7.3. Ligação do inserto giroxina-símile em pSecTag2Hygro A e seleção do clone pSecTag2-Giro.

O inserto giroxina-símile com extremidade Not I a 5' e extremidade cega a 3' foi ligado ao vetor pSecTag2/Hygro A, linearizado com os mesmos tipos de extremidades, permitindo a subclonagem direcional do inserto.

Após a ligação com a enzima T4 DNA ligase, foi realizada a transformação em *E. coli* TOP 10 (bactéria quimicamente competente). Após o crescimento das colônias recombinantes em placas LB^{AMP}- Agar e seleção dos clones por tamanho de plasmídeo recombinante (protocolo descrito no

apêndice 9.1.7.2), a amostra que apresentou uma migração aparente maior do que o tamanho do vetor vazio (não recombinante) é provavelmente o pSecTag2-Giro.

A construção do vetor pSecTag2-Giro foi confirmada por PCR de colônias (protocolo descrito no apêndice 9.1.7.3) utilizando-se os *primers* GYR SE e GYR AS1 tendo como amostras uma alíquota da suspensão bacteriana contendo o plasmídeo recombinante, como controles negativos três clones não recombinantes e o vetor vazio não recombinante. Essas amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5%.

O clone positivo (pSecTag2-Giro) foi crescido em meio LB^{AMP} durante a noite com agitação, para posterior extração do DNA plasmidial (*kit WizardPlus S. V. Minipreps*).

3.7.4. Mutagênese sítio dirigida

3.7.4.1. Preparo de DNA de fita simples.

A produção de DNA de fita simples, baseada em KUNKEL 1985, foi realizada com a intenção de deletar a sequência intervalar entre IgK e giroxina

Este método utiliza a bactéria *E. coli* RZ1032 que é uma linhagem deficiente na enzima dUTPase (produto do gene *dut*). Esta característica resulta no aumento intracelular de dUTP, que compete pelo dTTP na incorporação ao DNA. A uracila incorporada não é retirada devido à deficiência da enzima uracila glicosilase, enzima esta (produto do gene *ung*) responsável por retirar as bases uracilas incorporadas erroneamente ao DNA, trocando-as por timidina, dessa forma a fita simples produzida terá uracila no lugar de timidina.

Uma alíquota de 80 µL de *E.coli* RZ1032 (*dut*⁻/*ung*⁻) (bactéria eletrocompetente) foi transformada com 2 µL do DNA plasmidial purificado do clone pSecTag2-Giro. A colônia recombinante (pSecTag2-Giro) selecionada da placa LB^{AMP}- ágar foi incubada em meio YT acrescido de ampicilina (50 µg/mL), durante a noite, a 37°C com agitação de 200 rpm.

Posteriormente 15 µL desta cultura foram adicionados em 1,5 mL de meio YT, cultivando-se nas mesmas condições até atingir a densidade óptica de 0,2 em 600 nm. Adicionaram-se 10 µL do fago auxiliar R408 para ativar a origem de replicação (f1) do vetor e sintetizar a fita simples de DNA contendo uracila. Incubou-se a 37°C, com agitação de 200 rpm, durante um período de

5 a 6 horas. Após este período, centrifugou-se a cultura a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifuga.

O DNA do sobrenadante foi precipitado acrescentando-se 200 μL de uma solução PEG 8000 a 20% em NaCl 2,5M. Agitou-se por inversão e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente. Após este período a cultura foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos, descartado o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 100 μL de TE (Tris EDTA).

Essa solução contendo o DNA de fita simples foi purificada por fenol clorofórmio e o DNA foi precipitado, sendo ressuspendido em 15 μL de TE e estocado a -20°C . A confirmação da presença do DNA simples fita (sfDNA) foi obtida por uma análise em gel de agarose 0,6%.

3.7.4.2. Fosforilação do *primer*.

A fosforilação de 1 μL do *primer* para a mutagênese (200 pmoles/ μL) foi realizada a 37°C por 45 minutos com 2 μL de 1X tampão kinase (10x Tris HCl pH 8,0; 100mM MgCl_2 ; 50mM DTT; 4mM ATP), 30 unidades da enzima T_4 polinucleotídeo kinase, completando com água para uma reação final de 20 μL . Após este período a enzima foi inativada a 65°C por 10 minutos. O *primer* foi diluído com água destilada até a concentração de 5 pmoles/ μL para ser usado na reação de mutagênese.

3.7.4.3. Reação de mutagênese.

A mutagênese sítio dirigida permite alterar seqüências específicas de nucleotídeos (KUNKEL, 1985). Nessa reação os moldes sfDNAs contendo resíduos uracila hibridam com o *primer* de mutagênese cuja seqüência contém a mutação de interesse, a seqüência é polimerizada com o fragmento de Klenow da DNA polimerase I e as extremidades são ligadas com T_4 DNA ligase.

Para tanto, foram misturados e homogeneizados 5 μL do DNA de fita simples, 1 μL do *primer* fosforilado, 1 μL do tampão de anelamento (NaCl 500mM, Tris HCl 100mM pH 8,0; MgCl_2 100mM e DTT 10mM) e 3 μL de água destilada. Esta reação foi incubada por 55°C por 5 minutos e resfriada por 10 minutos em temperatura ambiente.

O molde de DNA foi copiado após a adição dos seguintes reagentes: 4 μL de cada desoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) na concentração de 2,5 mM cada, 1 μL do tampão ligase (Tris HCl 660nM pH 7,5; MgCl_2 50mM; e

DTT 50mM), 1 μ L de ATP 10 mM, 5 unidades do fragmento de Klenow da DNA polimerase I, 2 μ L de água destilada e 3,2 unidades da enzima T₄ DNA ligase. A mistura da reação foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Adicionaram-se 30 μ L de água destilada, 25 μ L de acetato de amônio 7,5M e 150 μ L de etanol 95%. Incubou-se 10 minutos em temperatura ambiente, centrifugou-se por 12.000 rpm por 15 minutos. Após descartar o sobrenadante, lavou-se o precipitado de DNA com etanol 70% e ressuspendeu em 10 μ L de água destilada.

Uma alíquota de 2 μ L foi utilizada para transformação de bactérias *E.coli* HB101 (*dut*⁺/*ung*⁺) eletrocompetentes. Nestas cepas *dut*⁺ a fita contendo os resíduos uracil (parental não mutado) é destruída, liberando uma simples com timina que contém a mutação de interesse.

Após a incubação por 2 horas no meio SOC, alíquotas das bactérias foram plaqueadas em LB^{AMP}- ágar.

3.7.5. Seleção do clone mutante pSecTag2-Igk-Giro.

Após a mutagênese sítio dirigida, as colônias recombinante foram selecionadas da placa LB^{AMP} -ágar e cultivadas em meio líquido LB^{AMP} durante a noite com agitação e amplificadas por PCR (protocolo descrito no apêndice 9.1.7.3) com os *primers* GYR AS1 e T7. Como controle negativo foi utilizada uma alíquota de suspensão bacteriana transformada com o vetor parental pSecTag2-Giro antes da mutagênese.

A análise em gel de agarose 1,5% identificou os clones positivos (pSecTag2-Igk-Giro), ou seja, aqueles cujos produtos de amplificação que apresentaram um tamanho aparente menor do que os controles (vetor parental pSecTag2-Giro antes da mutagênese), indicando a deleção da região esperada.

Esses clones positivos foram cultivados em meio líquido LB^{AMP} sendo realizada a extração do DNA plasmidial (*kit WizardPlus S. V. Minipreps*).

Os DNAs plasmidiais purificados foram digeridos e analisados para verificar a perda do sítio de restrição Not I, Eco RV e BamHI, presente no sítio de policlonagem do vetor parental pSecTag2-Giro, na região que se desejava deletar. Os clones positivos (pSecTag2-IgK-Giro) foram seqüenciados para a confirmação da mutagênese, para tanto foi necessário sintetizar o *primer*

antisense GYR AS2, que corresponde a região de 257 a 274pb do clone da giroxina-símile (tabela 2).

3.7.6. Obtenção do inserto IgK-Giro.

O plasmídeo pSecTag2IgK-Giro (42µg) foi digerido com a enzima de restrição Xho I. Em seguida o DNA foi purificado por fenol/clorofórmio e precipitado de acordo com o protocolo descrito na apêndice 9.1.6, inativando-se a enzima. O DNA foi ressuspenso em 80µl de água destilada.

Posteriormente 40µg do DNA linear foi tratado com o fragmento de Klenow da DNA polimerase I, juntamente com 0,05mM dos 4dNTPs obtendo-se extremidade de ponta cega. Após a inativação da enzima por calor, o DNA foi precipitado e ressuspenso em 16µL de água destilada.

Posteriormente 20µg de DNA foi digerido com a enzima de restrição Nhe I. Após este período inativou-se a enzima por calor.

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% na qual se buscou obter dois fragmentos: o vetor e o inserto de 958 pb correspondente ao IgK-Giro com extremidade coesiva Nhe I a 5' e com extremidade cega a 3' para ligar no vetor pED.

A banda IgK-Giro foi cortada do gel de agarose 1%, e purificada (*kit QIAquick Gel Extraction*). Para confirmação do isolamento foi realizada uma análise em gel de agarose 1%.

3.7.7 Preparo do vetor pED para subclonagem do inserto IgK-Giro.

O plasmídeo (20µg) foi digerido com a enzima de restrição SmaI. Posteriormente na mesma reação, acrescentou-se a enzima de restrição Xba I e incubou-se durante toda a noite sendo em seguida, inativada por calor.

A análise em gel de agarose 1% confirmou a completa digestão do vetor com as enzimas Xba I e Sma I tornando o vetor apto a receber o inserto IgK-Giro.

3.7.8. Ligação do inserto IgK-Giro no vetor pED e seleção do clone pED-Giro.

O inserto Igk-Giro com extremidade 5'-Nhe I e 3'-cega foi subclonado no vetor linear de expressão pED com extremidade 5'-Xba I e 3'-Sma I. A extremidade coesiva Nhe I do inserto IgK-Giro é compatível com a

extremidade Xba I do vetor pED. A extremidade 3' cega do inserto IgK-Giro (digerido com Xho I e tratado com Klenow) é compatível com a extremidade 3' cega do vetor pED (digerido com Sma I).

Após a ligação utilizando-se a enzima T4 DNA ligase, foi realizada a transformação em *E. coli* TOP 10 (bactéria quimicamente competente). Após o crescimento das colônias recombinantes em placas LB^{AMP}- Agar e seleção dos clones por tamanho de plasmídeo recombinante (protocolo descrito no apêndice 9.1.7.2), a amostra do plasmídeo que apresentou uma migração aparente maior do que o tamanho do vetor vazio (não recombinante) é provavelmente o pED-Giro.

A construção deste vetor foi confirmada por PCR (protocolo descrito no apêndice 9.1.7.3) com os *primers* GYR SE e GYR AS1 tendo como amostras uma alíquota da suspensão bacteriana contendo o plasmídeo recombinante e como controles negativos um clone não recombinante e o vetor vazio não recombinante. Essas amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5%.

O clone positivo pED-Giro foi cultivado em meio LB^{AMP} durante a noite com agitação e realizada a extração do DNA plasmidial (*kit WizardPlus S. V. Minipreps*).

3.8. Expressão do vetor pED-Giro em células CHO DXB11 *dhfr*⁻.

3.8.1. Seleção e amplificação dos clones.

As células CHO DXB11 *dhfr*⁻ foram cultivadas em placas de 50cm² com o meio de cultura essencial mínimo α -MEM suplementado com 50 U/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina, 1,25 μ g/mL de anfotericina B e 2mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino e quando estas células atingiram a semi-confluência, o plasmídeo pED-Giro foi transfectado pelo método de fosfato de cálcio (GRAHAM & VAN DER EB, 1973), passando a se integrar no genoma da célula CHO-DXB11.

Os clones celulares transfectados foram isolados e cultivados em uma placa 4 cm². A seleção dos clones transfectados foi realizada em meio seletivo α -MEM na ausência de ribonucleosídeo e desoxiribonucleosídeo com as mesmas concentrações de penicilina, estreptomicina, anfotericina B e L-glutamina descritos anteriormente, suplementado com 10% de soro fetal bovino dialisado. Em torno de 2-3 semanas, alguns clones *dhfr* positivos, foram submetidos a incrementos graduais de concentrações de metotrexato

(MTX:5, 20, 80, 320 e 1280nM) e em cada etapa de amplificação alíquotas dos clones foram congelados em nitrogênio líquido.

Os diferentes momentos do cultivo celular foram registrados utilizando-se o microscópio óptico com aumento de 400x.

3.8.2- Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células CHO DXB11 por SDS-PAGE e *western blot*.

As amostras do extrato celular bruto de células CHO-DXB11 transfectadas e não transfectadas com o plasmídeo pED-Giro e o meio de cultura em que cresceram esses clones em diversas concentrações de MTX foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* (protocolos descritos respectivamente nos apêndices 9.6.1 e 9.6.2).

3.8.3 Detecção do vetor pED-Giro integrado ao genoma da célula CHO-DXB11.

Para detectar a presença do vetor pED-Giro integrado no genoma da célula CHO-DXB11 foi cultivado um clone transfectado sem amplificação, nas condições descritas anteriormente, até atingir a semi-confluência. Como controle negativo foi utilizado a célula não transfectada (CHO-DXB11 *dhfr*⁻) e como controle positivo o plasmídeo pED-Giro.

As células foram tripsinizadas e transferidas para um microtubo de 2mL e contrifugadas por 5 minutos a 1500rpm. O precipitado foi lavado 2 vezes com 500μL de PBS. Após esta etapa, para se preparar o DNA genômico as células foram ressuspensas em 500 μL do tampão K (1x do tampão de PCR:20mM Tris-HCl pH 8,4 e 50mM KCl, 0,5% de Tween-20 e 100μg/ml de proteinase K) e incubado a 55°C por 1h. Inativou-se a proteinase K a 95°C por 10 minutos (KAWASAKI, 1990).

O PCR foi realizado com os *primers* IgK SE e DHFR AS (figura 13-A), IgK SE e GYR AS1 (figura 13-B) e DHFR SE/AS (figura 13-C) e 4 μL do lisado celular. Como um controle positivo da reação foi utilizado 1 μL do plasmídeo pED-Giro e como controle negativo água destilada. As condições de reação foram as mesmas descritas no apêndice 9.1.5. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1.0%.

3.8.4. Detecção do mRNA expresso pela célula CHO-DXB11 x pED-Giro.

Com a finalidade de verificar a presença do mRNA da gíroxina B2.1 foram realizados ensaios de RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), com alguns clones transfectados com o plasmídeo pED-Giro na ausência e na presença de duas concentrações de MTX (20nM e 320nM). Como controles foram utilizadas as células não transformadas CHO-K1 *dhfr*⁺ que deve dar bandas quando amplificados com *primers* específicos para DHFR mas não quando amplificados com *primers* específicos para gíroxina. E as células CHO-DXB11 *dhfr*⁻ que não deve dar sinal em ambos os casos.

Os clones utilizados foram: clones 4, 6, 8 sem amplificação com MTX, o clone 4 amplificado com 20nM de MTX e o clone 6 amplificado com 320nM de MTX. Os pares *primers* GYR SE/DHFR AS (figura 14-A) e IgK SE/DHFR AS (figura 14-D) foram utilizados com a finalidade de verificar se o mRNA da fusão entre a gíroxina e o DHFR se encontra na forma dicitrônica, os pares *primers* GYR SE/AS (figura 14-C) e IgK SE/GYR AS (figura 14-F) foram utilizados para verificar se o mRNA gíroxina foi expresso separado do mRNA *dhfr* que é detectado pelo par de *primers* DHFRSE/AS (figura 14-B ou E).

Os clones celulares foram cultivados em placas de 40cm² no meio de cultura α -MEM na ausência de ribonucleosídeo e desoxiribonucleosídeo até atingirem a semi-confluência. As células CHO-K1 *dhfr*⁺ e CHO DXB11 *dhfr*⁻ foram cultivadas em meio de cultura α -MEM. As condições de cultivo foram descritas no subitem 3.8.1-Seleção e amplificação dos clones (página 33). Os clones celulares e as células controle negativo foram submetidos à extração do RNA e precipitação segundo protocolo do reagente Trizol.

O RNA foi ressuspenso em 80 μ l de água. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1% e quantificadas no espectrofotômetro em uma absorbância de 260nm.

Para a síntese de primeira fita de cDNA por RT-PCR foi utilizado o *kit SuperScript III* (Invitrogen) seguindo-se o protocolo do fabricante. Foram realizados seis ensaios de RT-PCR denominados de A, B, C, D, E e F sendo que o esquema das reações estão mostradas na figura 14.

Nos ensaios A, B e C foram utilizados 3,5 μ g de RNA total dos clones 4 e 8 e da célula CHO-K1 *dhfr*⁺ (controle negativo) e nos ensaios D, E e F foram utilizados 8 μ L de RNA total isolados dos clones 4 e 6 na ausência de MTX,

clone 4 com 20nM MTX, clone 6 com 320nM de MTX e da célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻ (controle negativo).

Para realizar a síntese de primeira fita de cDNA foram utilizados 1 µL do *primer* antisense, os RNAs isolados dos clones e das células controles negativos CHO-K1 *dhfr*⁺ e CHO-DXB11 *dhfr*⁻, 1 µL de 10 mM DNTPs e água tratada com DEPC (0.1% *Diethyl Pyrocarbonate* em água) para um volume final de 10 µL. Após incubar 65°C por 5 minutos, foram adicionados 2 µL do 10 x tampão de RT-PCR (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl); 4 µL de 25 mM MgCl₂; 2 µL de 0,1M DTT; 1 µL de inibidor de RNase (*RNAse Out*) e 1 µL da enzima transcriptase reversa *SuperScript III*, com exceção do controle, obtendo-se um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 50°C por 1h, inativadas a 85°C por 5 minutos e mantidas em gelo.

Para a síntese da segunda fita de cDNA, as amostras foram amplificadas por PCR com os *primers* GYR SE/DHFR AS (figura 14-A), DHFR SE/AS (figura 14-B), GYR SE/AS1 (figura 14-C), IgkSE/DHFR AS (figura 14-D), DHFR SE/AS (figura 14-E) e Igk SE/GYR AS1 (figura 14-F). Como controle da reação foi utilizada a água.

O PCR consiste de 40 ciclos de 94°C por 3 minutos, 94°C por 45 segundos, para denaturar o DNA molde, 56°C por 45 segundos para o anelamento dos *primers*, 72°C por 1 minuto para polimerização. Ao final dos ciclos de polimerização a reação foi finalizada por um ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos e mantidas a 4°C até a análise em gel de agarose 1,0% com o marcador 250 pb *DNA ladder*.

3.9. Expressão transiente do vetor pED-Giro em células COS-7.

As células COS-7 foram transfectadas com os plasmídeos pED-Giro e pSecTag-IgK-Giro (após a mutagênese) com a finalidade de verificar a funcionalidade desses vetores.

As células COS-7 foram cultivadas em garrafa de cultura de 75cm² com 10mL de meio D-MEM contendo 50U/mL de penicilina, 50µg/mL de estreptomicina na presença de antibiótico e com 10% de soro fetal bovino, até atingirem a semi-confluência. Em seguida foram tripsinizadas e contadas em uma câmara de Malassez e distribuídas em uma placa de 6 poços (450.000 células por poço, equivalente a 10cm²) contendo 5mL de meio em cada poço.

Após 24h, quando as células atingiram a semi-confluência, foram realizadas as transfecções em duplicatas utilizando-se 4 µg dos plasmídeos pED-Giro, pSecTag-IgK-Giro e como controle positivo o plasmídeo pEGFP-N1. Este plasmídeo expressa a proteína fluorescente GFP (obtida da medusa bioluminescente- *Aequora victoria*) sendo detectada em 395nm. Como controle negativo foram utilizados as células COS-7 não transfectadas. As transfecções foram realizadas segundo o protocolo do reagente *Lipofectamine*.

As células COS-7 transfectadas com os plasmídeos pED-Giro e pEGFP-N1 foram fotografadas no microscópio utilizando-se filtro fluorescente ultravioleta, com o aumento de 400x.

Os meios de cultura em que cresceram as células COS-7, COS-7 transfectadas com os plasmídeos pED-Giro e pSecTag-IgK-Giro em 24 e 48h foram coletados (10mL de meio) e as células foram coletadas por tripsinização após 72h da transfecção (conforme descrito no subitem 3.8.2 - Detecção do vetor pED-Giro integrado ao genoma da célula-página 34). Após o precipitado celular ser lavado com PBS, os materiais foram congelados a -20°C. As amostras do meio de cultura, precipitado celular e o sobrenadante do lisado foram analisadas em SDS-PAGE e *western blot* com a finalidade de se detectar a presença da proteína recombinante. Os protocolos das análises dos SDS-PAGE e *western Blot* se encontram respectivamente nos apêndices 9.6.1 e 9.6.2.

Em um segundo momento, o plasmídeo pED-Giro foi transfectado em duplicata uma escala maior (20µg de plasmídeo para 2.000.000 células, em uma placa de 50cm² contendo 10mL de meio) para se obter a giroxina recombinante em uma quantidade suficiente para realizar os ensaios de caracterização. Os meios de cultura em que cresceram as células (20mL) foram coletados 24h e 48h após a transfecção com o plasmídeo pED-Giro e congelados. Após 72h as células foram coletadas e o precipitado celular foi lavado 3 vezes com PBS.

Nesta nova preparação, o precipitado celular foi ressuspenso em 2mL de tampão 50mM Tris HCl pH 9,0 contendo 400mM NaCl e sonificado 2 vezes com 2 pulsos de 5 segundos cada, com amplitude 70. Esta amostra foi centrifugada e separado o sobrenadante solúvel correspondente ao lisado celular e o precipitado. Ambos foram analisados por SDS-PAGE e *western blot*.

3.9.1 Purificação do produto recombinante expresso pelo vetor pED-Giro em células COS-7.

Para separação da proteína recombinante do meio de cultura e/ou dos lisados celulares, foi utilizada a resina de afinidade Benzamidina Sepharose 4B em sistema "in batch". Esta resina possui como ligante p-aminobenzamidina (pABA) com a capacidade de ligar até 35mg tripsina/mL. Inicialmente, a resina foi ativada com 3 lavagens alternadas de tampão Tris HCl 100mM pH 8,5 contendo 400mM NaCl e Acetato de Sódio 100mM pH 4,5 contendo 500mM NaCl.

A adsorção do produto recombinante foi realizada a 4°C, com agitação suave durante a noite, com um volume fixo de 100µL de resina ativada e volumes variáveis das seguintes amostras: meio de cultura controle negativo, meio de cultura 24h após a transfecção da célula COS-7 x pED-Giro, meio de cultura 48h após a transfecção da célula COS-7 x pED-Giro, o sobrenadante do lisado das células COS-7 controle negativo e das células COS-7xpED-Giro.

No dia seguinte as amostras que ficaram incubando com a resina foram centrifugadas a 700rpm, 5 minutos, 4°C. O sobrenadante foi separado para análises posteriores e o precipitado com a resina foi lavado 3 vezes com o tampão 50 mM Tris HCl pH 9,0 contendo 400 mM NaCl, sendo em seguida eluída com tampão Acetato de Amônio 100mM pH 5,0.

As amostras foram separadas em alíquotas e secas durante a noite no *Speed Vack*. Estas alíquotas das diferentes amostras foram analisadas por dosagem de proteínas, SDS-PAGE, *Western blot* e atividade enzimática.

3.9.1.1. Dosagem de proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células COS-7.

A determinação do conteúdo protéico das amostras permitiu avaliar o rendimento da expressão e purificação da proteína recombinante assim como as comparações nos ensaios de caracterização.

O método utilizado foi o descrito por BRADFORD, 1976. Este método se baseia na capacidade do corante *Coomassie Blue* R-250 de se ligar as proteínas, em meio altamente ácido, resultando na modificação proporcional da cor, detectável em 595nm.

Para a curva padrão utilizou-se a albumina bovina sérica (SAB) 1mg/ml em solução salina (0,9% NaCl) em diferentes diluições: 2,5µl (2,5 µg),

5 µl (5 µg) ,10 µl (10µg),12,5µl (12,5µg),15µl (15µg),17,5µl (17,5µg) e 20µl (20µg). Em seguida o volume foi completado para 100µl com a solução salina e adicionados 1mL do reagente de Bradford.

As amostras foram todas analisadas nas mesmas condições. Após 10 minutos, à temperatura ambiente, foi medida a densidade ótica, em espectrofotômetro. Todos os pontos foram duplicatas e os dados da curva padrão foram ajustados com o programa *Graph Pad Prims*, por regressão linear com a equação $y=ax+b$ para calcular a concentração proteica das amostras, sendo (y) a densidade ótica, (x) a concentração proteica, (a) o coeficiente angular da reta e (b) o intercepto da reta.

3.9.1.2. Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células COS-7 por SDS-PAGE e western blot.

Os ensaios para detecção da proteína recombinante foram realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blot*.

Foram coletadas amostras de culturas de células COS-7 não transfectadas e transfectadas com o plasmídeo pED-Giro, após serem tripsinizadas, centrifugadas e lavadas com PBS. As células foram sonicadas para preparo das amostras do sobrenadante e do precipitado do lisado celular. O sobrenadante do lisado e os meios de cultura em que cresceram as células por 24h e 48h após a transfecção com o pED-Giro foram utilizados para preparar amostras antes e após a purificação por afinidade em resina de afinidade benzamidina sepharose (vide item 3.9.1-Purificação do produto recombinante expresso pelo vetor pED-Giro em células COS-7).

Como controles foram utilizados 3µg de tripsina (controle negativo) e 3µg de giroxina purificada do veneno de *C.d.terrificus* (controle positivo).

3.9.2. Ensaio de atividade enzimática da giroxina recombinante purificada por benzamidina sepharose.

Com a finalidade de se verificar se o produto recombinante do clone B2.1 giroxina está sendo expressa pelo vetor pED-Giro na forma ativa, foi realizado o teste de atividade esterásica. Neste ensaio foi utilizado o método descrito por NOLAN *et al*, 1976. As amostras da proteína recombinante purificada foram dissolvidas em tampão Tris HCl 80mM pH 8,1 contendo 20mM de CaCl₂. Como padrão foram utilizados 100ng e 1µg de tripsina de pâncreas

de porco (1mg/mL) dissolvidos em 0,001N de HCl e giroxina purificada do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 100ng e 2µg dissolvido em tampão 40mM Tris HCl pH 7,4.

Na reação foram incubados 1mL do substrato TAME com 2 µg de cada amostra e medida a densidade ótica em 247nm após 5 minutos de reação, à temperatura ambiente.

4-RESULTADOS

4.1. Clonagem da toxina madura.

O produto da reação de PCR amplificando uma alíquota da biblioteca com os *primers* GYR SE (específico para a região N-terminal da giroxina) e T7 segundo esquema mostrado na figura 9, resultou em 3 bandas, com tamanhos aproximados de 1200pb, 900pb, e 550pb sendo denominadas respectivamente de bandas B2, B1 e B0 (figura 15). O produto da reação foi diretamente clonada no vetor pCR-2.1TOPO e bactérias *E. coli* TOP10 (quimicamente competentes) foram transformadas e selecionadas em meio LB^{AMP}-Agar com X-Gal/IPTG segundo esquema mostrado na figura 38.

Os clones obtidos (1 a 9) com tamanho aparente do produto de amplificação por PCR da biblioteca (bandas B2, B1 e B0) foram isolados pelo protocolo 9.1.7.3 (apêndice) - seleção dos clones por PCR de colônias (figura 16). Foram numerados de acordo com o tamanho da banda da seguinte forma: clone B1.1; clone B0.1; clone B0.2; clone B2.1; clone B0.3; clone B0.4; clone B1.2; clone B1.3; clone B1.4. Cada clone isolado foi seqüenciado nas fitas direta e reversa.

4.1.1. Análises dos clones correspondentes às bandas B0, B1 e B2.

A comparação das seqüências de cDNA e proteínas dos clones B2.1, B1.1, B1.2, B1.3, B1.4, B0.1, B0.2, B0.3, B0.4 com bancos de dados, permitiu verificar que somente o clone B2.1 é uma isoforma completa de giroxina. Os clones B1.1, B1.2, B1.3 e B1.4 apresentaram seqüências parciais de serino proteases e os clones B0.1, B0.2 e B0.3 não apresentaram similaridade com toxinas de serpentes. Os valores obtidos pela análise de Phred da seqüência do clone B2.1 se encontra na tabela 6 e foi na média superior a 30% demonstrando a alta qualidade da seqüência.

Nas tabelas 7 e 8 são mostradas as cinco seqüências de nucleotídeos e proteínas de serino proteases do veneno de serpentes mais similares com o clone B2.1.

O alinhamento do clone B2.1-giroxina com seqüências do N-terminal da giroxina purificada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* (figura 17)

evidenciou diferenças entre as seqüências N-terminais, sendo o clone B2.1 denominado de giroxina-símile.

A seqüência do clone B2.1 foi depositada como "gyroxin-like" no Banco Internacional de Dados de seqüências de nucleotídeos GenBank, sob o número de acesso AY954040 *Crotalus durissus terrificus* gyroxin-like B2.1 precursor, mRNA, partial cds (coding domain sequence) (figura 18).

4.1.2- Análise do clone B2.1

A comparação dos éxons do cDNA do clone B2.1 com o gene da batroxobin apresentado esquematicamente na figura 27 permitiu observar a presença de 4 possíveis éxons (também identificado figura 18): éxon 2 (1-137pb), éxon 3 (138-379pb), éxon 4 (389-548pb) e éxon 5 (549-881pb). A tríade catalítica se encontra nos éxons: 2 (H43), 3 (D88) e 5 (S184). O éxon 1 corresponde à região do 5'UTR e a região codificante para o peptídeo sinal e pro-peptídeo, que está ausente neste clone, é decorrente da estratégia de clonagem. Lembrando, este clone foi amplificado utilizando-se o *primer sense* GYR SE que é complementar aos 24 primeiros nucleotídeos da região que codifica o início do N-terminal da giroxina de *Crotalus durissus terrificus* e o *primer antisense* T7 que é complementar a uma região flanqueadora do sítio de clonagem do vetor λ -ZAP-XR da biblioteca. A definição do *primer* GYR SE se encontra na figura 8 e a região de hibridação desses *primers* (GYR SE e T7) está representada na figura 9.

O cDNA se subdivide em uma região de 714pb que codifica para uma toxina madura de 238 aminoácidos e uma região 3'UTR curta de 181pb. O *stop* códon se encontra na posição 715pb e o sinal de poliadenilação na posição 857pb. A cauda de poli A está presente. O sítio potencial de N-glicosilação apresenta o seguinte consenso: Asn-Xaa-Ser/Thr, na qual Xaa pode ser qualquer aminoácido exceto prolina. Na giroxina-símile, o sítio potencial de N-glicosilação encontrado foi na asparagina 81 e o de O-glicosilação na treonina 127. Este clone também permite predizer por homologia a presença de 6 pontes dissulfetos entre as seguintes cisteínas: 7-141, 28-44, 78-236, 120-190, 152-169, 180-205 (figura 34).

A seqüência de cDNA e de aminoácidos de SVSPs que apresentaram maior homologia com o clone B2.1 foram respectivamente: Tlg2b de *Trimeresurus gramineus* e bilineobin de *Agkistrodon bilineatus*.

A SVSP mais homóloga com a parte correspondente da toxina madura foi bilineobin de *Agkistrodon bilineatus* (tabela 24).

4.2. Clonagem de isoformas de serino proteases similares a giroxina.

4.2.1. Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-GPSs.

Com base na seqüência do clone B2.1 foi possível sintetizar o *primer antisense* GYR AS1 que com o *primer sense* T3 permitiu reamplificar a biblioteca e clonar seqüências de giroxina contendo a região a 5' segundo o esquema mostrado na figura 10. A seqüência de complementaridade do *primer* GYR AS1 é mostrada na figura 29.

A análise do produto de PCR em gel de agarose 1,5% correspondente aos clones GPSs (giroxina peptídeo sinal), resultou em três bandas similares as mostradas na figura 15, sendo que a primeira banda de 1200pb foi excisada do gel, purificada e clonada no vetor pCR2.1 TOPO, pois as bandas de menor tamanho podem representar seqüências degradadas presentes na biblioteca (dados não mostrados).

Após a transformação da ligação (vetor-inserto) em bactéria quimicamente competente e seleção das colônias recombinantes pelo protocolo descrito no apêndice 9.1.7.3, foram obtidas 4 colônias sendo denominadas GPS:2, GPS:3, GPS:4 e GPS:5. Estes clones foram totalmente seqüenciados e as análises em banco de dados revelaram similaridades com serino proteases do veneno de serpentes. Os valores obtidos pela análise de Phred das seqüências dos clones GPSs se encontram na tabela 6 sendo que as bases apresentaram uma qualidade superior a 30% evidenciando a alta qualidade dos seqüenciamentos.

4.2.1.1. Análises das seqüências de cDNA e de proteína dos clones GPSs.

Os clones GPS:2 e GPS:5 assim como os GPS:3 e GPS:4 representam clones com a mesma seqüência, passando a serem denominados GPS:2e5 e GPS:3e4. A organização do cDNA do clone GPS:2e5 está mostrada na figura 19 e a do clone GPS:3e4 está mostrada na figura 20.

Estes clones possuem as regiões correspondentes à região não traduzida 5'UTR, à região codificante para o peptídeo sinal, à região codificante para o pré-peptídeo e à região codificante para a toxina madura. A correspondência dos cDNAs em comparação com os éxons do gene da batroxobin dos clones GPS:2e5 e GPS:3e4 está mostrada na figura 27 e na tabela 21. Assim sendo, estes clones contêm o cDNA correspondente a todos os cinco éxons do gene da batroxobin, sendo a região correspondente ao éxon 5 está presente apenas parcialmente faltando toda a 3'UTR, pois foi limitada pelo *primer* GYR AS1. Estes clones não apresentam *stop* códon pois o *primer* GYR AS1 foi baseada na sequência C-terminal do clone B2.1 giroxina-símile imediatamente antes do *stop* códon. O esquema de hibridação do *primer* GYR AS se encontra na figura 10.

4.2.1.2- Análise do clone GPS:2e5.

Podemos observar na figura 19 a presença de 5 possíveis éxons mostradas na figura 27 e na tabela 21: éxon 1 (31-264pb), éxon 2 (265-421pb), éxon 3 (442-663pb), éxon 4 (664-832pb) e éxon 5 (833-998pb). A tríade catalítica se encontra nos éxons: 2 (H67), 3 (D112) e 5 (S208). As análises do clone GPS:2e5 permitiram identificar o sítio potencial de N-glicosilação na asparagina 105 e o sítio potencial de O-glicosilação na treonina 151. O cDNA se subdivide em uma região 5'UTR de 212pb, uma região de 54pb que codifica para o peptídeo sinal de 18 aminoácidos, uma região de 18pb que codifica para o pró-peptídeo de 6 aminoácidos e uma região de 714pb que codifica para a toxina madura de 238 aminoácidos. A região de Kozak representado pelo códon -3 (G) se encontra na posição 210pb e o códon de início da tradução se encontra na posição 213pb. As 6 pontes dissulfetos preditas seriam entre as cisteínas 7-141, 28-44, 78-236, 120-190, 152-169, 180-205 (figura 34).

Nas tabelas 9 e 10 são mostradas as cinco seqüências de cDNA e precursores de serino proteases de venenos de serpentes mais similares a este clone. A seqüência de cDNA e o precursor que apresentaram maior homologia com este clone GPS:2e5 foram respectivamente: calobin de *Agkistrodon ussuriensis* e stejnobin de *Trimeresurus stejnegeri*.

A SVSP mais homóloga com a parte correspondente da toxina madura foi bilineobin de *Agkistrodon bilineatus* (tabela 24).

4.2.1.3-Análise do clone GPS:3e4.

Com relação à organização do cDNA deste clone podemos observar na figura 20 a presença de 5 possíveis éxons mostradas na figura 27 e na tabela 21: éxon 1 (1-239pb), éxon 2 (240-396pb), éxon 3 (397-600pb), éxon 4 (661-807pb) e éxon 5 (808-976pb). A tríade catalítica se encontram nos éxons: 2 (H 67), 3 (D 112) e 5 (S 208). Os sítios potenciais de N-glicosilação encontrados neste clone foram nas asparaginas 105 e 255 e o sítio potencial de O-glicosilação na treonina 152. O cDNA se subdivide em uma região 5'UTR de 187pb, uma região de 54pb que codifica para o peptídeo sinal de 18 aminoácidos, uma região de 18pb que codifica para o pró-peptídeo de 6 aminoácidos e uma região de 714pb que codifica para a toxina madura de 238 aminoácidos. A região de Kozak representado pelo códon -3 (G) se encontra na posição 185pb e o códon de início da tradução se encontra na posição 188pb. As 6 pontes dissulfetos preditas por similaridades seriam entre as cisteínas 7-141, 28-44, 78-236, 120-190, 152-169, 180-205 (figura 34).

Da mesma forma que para o clone GPS:2e5 as cinco seqüências de cDNA e proteínas de SVSPs com maior similaridade com o clone GPS:3e4, foram relacionadas nas tabelas 11 e 12. A seqüência de cDNA e o precursor que apresentaram maior homologia com este clone foram respectivamente: calobin de *Agkistrodon ussuriensis* e stejnobin de *Trimeresurus stejnegeri*.

A SVSP mais homóloga com a parte correspondente da toxina madura foi stejnobin de *Trimeresurus stejnegeri* (tabela 24).

O alinhamento da região do peptídeo sinal, pré-peptídeo e início da toxina madura dos clones B2.1, GPS:2e5 e GPS:3e4 com outras seqüências de precursores de serino proteases mostra seqüências de nucleotídeos correspondentes ao início da região codificante a 5' (figura 21). Permite observar que a alta conservação da região do peptídeo sinal e pré-peptídeo dos clones GPS:2e5 e GPS:3e4 também ocorre com outras seqüências de precursores de serino proteases como as enzimas de cascavéis norte americanas ou seqüências de enzimas de serpentes evolutivamente distantes da cascavel sul americana, tais como as serpentes asiáticas do gênero *Trimeresurus* ou seqüências de serino proteases pertencentes a serpentes de outros gêneros tais como as dos gênero *Bothrops* ou *Agkistrodon*.

4.2.2. Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-PST7s.

Conhecendo-se a sequência do clone B2.1 e as seqüências dos clones GPS e tendo em vista a elevada conservação do peptídeo sinal, foi possível sintetizar um *primer* peptídeo sinal P.S *sense* mostrado na figura 21 que foi utilizado com o *primer antisense* T7 para novamente reamplificar a biblioteca de acordo com o esquema da figura 11, obtendo-se as seqüências precursoras completas que denominamos clones PST7. Esses clones contêm a região codificante para o peptídeo sinal, para a toxina madura e a região 3'UTR. A região de hibridação do *primer* peptídeo sinal P.S *sense* pode ser vista na figura 29.

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,5% resultando novamente em três bandas sendo que a primeira com tamanho aproximado de 1600pb e maior intensidade, foi excisada do gel e purificada (figura 22).

As bandas de menor tamanho podem representar seqüências parciais presentes na biblioteca tal como aconteceu nos clones B1 e B0 mostrados na figura 15.

Após a clonagem no vetor pCR2.1 TOPO e seleção das colônias recombinantes pelo protocolo descrito no apêndice 9.1.7.3, obteve-se 5 clones sendo denominados PST7:3, PST7:4, PST7:5, PST7:7 e PST7:8. As análises desses clones com seqüências depositadas em banco de dados, revelaram similaridades com serino proteases de venenos de serpentes.

Os valores obtidos pela análise de Phred das seqüências dos clones PST7s se encontram na tabela 6, sendo que na médias as bases apresentaram uma qualidade superior a 30% evidenciando a alta qualidade dos seqüenciamentos.

Podemos observar que estes clones apresentam a região codificante para o peptídeo sinal, para o pré-peptídeo, para a toxina madura e a região não traduzida 3'UTR. A correspondência dos cDNAs em comparação com os éxons do gene da batroxobin dos clones PST7s está mostrada na figura 27 e na tabela 21. Assim sendo, estes clones contêm o cDNA correspondente a todos os cinco éxons do gene da batroxobin, sendo a região correspondente ao éxon 1 apenas parcial, pois é limitada pelo *primer* peptídeo sinal PS *sense*, faltando toda a 5'UTR.

4.2.2.1. Análises das sequências de cDNA e de proteínas dos clones PST7s.

As análises das sequências dos clones PST7:3, PST7:4, PST7:5, PST7:7 e PST7:8 permitiu concluir que os clones PST7:7 e PST7:8 são a mesma sequência, passando a ser denominado de clone PST7:7e8.

4.2.2.2- Análise do clone PST7:3.

Com relação a organização do cDNA deste clone (figura 23), podemos observar a presença de 5 regiões correspondentes aos éxons do gene de batroxobin mostradas na figura 27 e na tabela 21: éxon 1 (1-52pb), éxon 2 (53-209pb), éxon 3 (210-451pb), éxon 4 (452-620pb) e éxon 5 (621-1401). A tríade catalítica se encontra nos éxons: 2 (H67), 3 (D112) e 5 (S208). O sítio potencial de N-glicosilação encontrado neste clone foi asparagina 105 e o sítio potencial de O-glicosilação na treonina 152.

O cDNA se subdivide em uma região de 54pb que codifica para o peptídeo sinal de 18 aminoácidos, uma região de 18pb que codifica para o pró-peptídeo de 6 aminoácidos, uma região de 714pb que codifica para a toxina madura de 238 aminoácidos e uma região 3'UTR longa de 643pb.

O códon de início da tradução se encontra na posição 1, o *stop* códon se encontra na posição 787pb. Foram encontrados dois sinais de poliadenilação, um na posição 929pb e o outro na posição 1380pb. A cauda de poli A se encontra presente. As 6 pontes dissulfetos preditas por similaridades seriam entre as cisteínas 7-141, 28-44, 78-236, 120-190, 152-169, 180-205 (figura 34). Podemos observar nas tabelas 13 e 14 a comparação com as cinco sequências mais similares de cDNA e precursores de serino proteases de venenos de serpentes presentes no banco de dados do NCBI. A sequência de cDNA e o precursor que apresentaram maior homologia com este clone PST7:3 foram respectivamente: Tlg2b de *Trimeresurus gramineus* e stejnobin de *Trimeresurus stejnegeri*.

A SVSP mais homóloga com a parte correspondente da toxina madura foi bilineobin de *Agkistrodon bilineatus* (tabela 24).

4.2.2.3- Análise do clone PST7:4.

Podemos observar na figura 24 a presença de 5 regiões correspondentes aos éxons do gene de batroxobin mostradas na figura 27 e na tabela 21: éxon 1 (1-52pb), éxon 2 (53-209pb), éxon 3 (210-473pb), éxon 4 (474-620pb) e éxon 5 (621-1401). A tríade catalítica se encontra nos éxons: 2 (H67), 3 (D112) e 5 (S208). O sítio potencial de N-glicosilação foi encontrado na asparagina 105 e o de O-glicosilação na treonina 152.

O cDNA se subdivide em uma região de 54pb que codifica para o peptídeo sinal de 18 aminoácidos, uma região de 18pb que codifica para o pró-peptídeo de 6 aminoácidos, uma região de 714pb que codifica para a toxina madura de 238 aminoácidos e uma região 3'UTR longa de 643pb. O códon de início da tradução se encontra na posição 1, o *stop* códon se encontra na posição 787pb e o sinal de poliadenilação na posição 1381pb. A cauda de poli A se encontra presente. Apresenta 6 pontes dissulfetos preditas por similaridades entre as cisteínas 7-141, 28-44, 78-236, 120-190, 152-169, 180-205 (figura 34).

Nas tabelas 15 e 16 são mostradas a comparação com as cinco seqüência mais similares de cDNA e precursores de serino proteases do veneno de serpentes presentes no banco de dados do NCBI. A seqüência de cDNA e o precursor que apresentaram maior homologia com este clone PST7:4 foram respectivamente: Tlg2b de *Trimeresurus gramineus* e stejnobin de *Trimeresurus stejnegeri*.

A SVSP mais homóloga com a parte correspondente da toxina madura foi stejnobin de *Trimeresurus stejnegeri* (tabela 24).

4.2.2.4- Análise do clone PST7:7e8.

Na figura 25 podemos observar a presença de 4 possíveis regiões correspondetes aos éxons de batroxobin mostradas na figura 27 e na tabela 21: éxon 1 (1-52pb), éxon 2 (52-200pb), éxon 3 (201-460pb), éxon 4 (461-611pb) e éxon 5 (612-1398). A tríade catalítica se encontra nos éxons: 2 (H64), 3 (D109) e 5 (S205). Os sítios potenciais de N-glicosilação encontrados foram nas asparaginas 78 e 102 e o de O-glicosilação nas treonina 148 e 256.

O cDNA se subdivide em uma região de 54pb que codifica para o peptídeo sinal de 18 aminoácidos, uma região de 18pb que codifica para o pró-peptídeo de 6 aminoácidos, uma região de 705pb que codifica para a

toxina madura de 235 aminoácidos e uma região 3'UTR longa de 702pb. O códon de início da tradução se encontra na posição 1, o *stop* códon se encontra na posição 778pb e o sinal de poliadenilação na posição 1372pb. A cauda de poli A se encontra presente. As 6 pontes dissulfetos preditas por similaridades seriam entre as cisteínas 7- 138, 25-41, 73-233, 117-187, 145-162, 173-198 (figura 34). Podemos observar nas tabelas 17 e 18 as cinco seqüências mais similares de cDNA e precursores de serino proteases do veneno de serpentes presentes no banco de dados do NCBI. A seqüência de cDNA e o precursor que apresentaram maior homologia com este clone PST7:7e8 foram respectivamente: preprotrimubin de *Trimeresurus mucrosquamatus* e serino protease CL5 de *Trimeresurus stejnegeri*.

A SVSP mais homóloga com a parte correspondente da toxina madura foi a serino protease CL5 de *Trimeresurus stejnegeri* (tabela 24).

4.2.2.4- Análise do clone PST7:5.

Com relação à organização do cDNA deste clone (figura 26) podemos observar a presença de 4 regiões correspondentes aos éxons do gene de batroxobin mostradas na figura 27 e tabela 21: éxon 1 (1-52pb), éxon 2 (53-209pb), éxon 3 (210-469pb) e éxon 5 (470-1255), sendo que o éxon 4 se encontra ausente neste clone. Os aminoácidos pertencentes à tríade catalítica se encontram nos éxons: 2 (H67) e 3 (D112).

O cDNA se subdivide em uma região de 54pb que codifica para o peptídeo sinal de 18 aminoácidos, uma região de 18pb que codifica para o pró-peptídeo de 6 aminoácidos, uma região que codifica para a toxina madura que vai da posição 73 a 471pb e se encontra interrompida por um *stop códon* na posição 472pb e uma região 3'UTR longa de 702pb. O códon de início da tradução se encontra na posição 1 e o sinal de poliadenilação na posição 1235pb. A cauda de poli A se encontra presente. O sítio potencial de N-glicosilação se encontra na asparagina 105 e não foi encontrado nenhum sítio potencial de O-glicosilação. A seqüência codificante do clone PST7:5 apresenta um *stop códon* que interrompe a toxina madura. A comparação desta seqüência com banco de dados de nucleotídeos e proteínas pode-se constatar que se encontra interrompida. Nas tabelas 19 e 20 estão as cinco seqüências mais similares de cDNA e precursores de serino proteases do veneno de serpentes presentes no banco de dados do NCBI. A seqüência de cDNA e o

precursor de serino protease do veneno de serpente que apresentaram maior homologia com o clone PST7:5 foram respectivamente: Tlg2b de *Trimeresurus gramineus* e salmobin de *Gloydius halys*.

4.2.3. Comparação dos cDNA dos clones B2.1, GPSs e PST7s com os éxons do gene de Batroxobin.

Como encontramos seqüências longas (completas) e curtas (interrompidas), foi realizado um estudo da organização do cDNA em relação aos éxons usando-se o programa *Spidey*. Para esta análise, o gene de batroxobin foi utilizado como referência para análise da organização do cDNA dos clones (B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:5 e PST7:7e8). Observou-se que todas as seqüências mostraram a mesma organização do cDNA da batroxobin permitindo estimar qual região do cDNA é codificada pelo éxon específico, tal como mostra a figura 27 e a tabela 21.

O clone B2.1 apresenta as regiões dos éxons 2, 3, 4 e 5. Entretanto, a região do éxon 5 é mais curta, 333 pb para B2.1 quando comparados com a mesma região no cDNA de batroxobin que tem 723 pb e inclusive em relação aos outros clones PST7 da mesma biblioteca. Apesar disso, este clone parece ter regiões 3'UTR completas apresentando o *stop* códon e o sinal consenso de poliadenilação, além da cauda poliA⁽⁺⁾. No entanto este clone não apresenta o éxon 1 que corresponde à região do 5'UTR e a região codificante para o peptídeo sinal e pro-peptídeo, devido a estratégia de clonagem, pois foi amplificado com os *primers* GYR SE, que codifica para os 24 primeiros nucleotídeos da região que codifica o início do N-terminal da gioxina de *Crotalus durissus terrificus*, e *antisense* T7 que é complementar a uma região flangeadora do sítio de clonagem do vetor λ -ZAP-XR da biblioteca.

Os clones GPS:2e5 e GPS:3e4 apresentam todos os cinco éxons, sendo o último éxon 5 parcial, pois é limitada pelo *primer antisense* GYR AS1, faltando toda a 3'UTR. A região do éxon 1 está quase completa, com 234 pb no clone GPS:2e5 e 239 pb no clone GPS:3e4, correspondendo à mesma região no gene batroxobin (240 pb) e compreende parte da região 5'UTR, apresenta a região de Kozak que determina o códon iniciador da tradução e a quase do peptídeo sinal.

Os segmentos do cDNA correspondentes aos éxons 2, 3 e 4 também estão completos e compreendem a seqüência codificante para o fim do

peptídio sinal e as regiões codificantes para a toxina madura de maneira análoga ao cDNA de batroxobin.

Os clones PST7:3, PST7:4, PST7:5 e PST7:7e8 não apresentam a região 5'UTR, pois é limitada pelo *primer* peptídeo sinal PS *sense*, apenas parte codificadora do cDNA correspondente ao primeiro éxon está representado. Assim sendo, o cDNA é completo em relação às regiões codificadoras e 3'UTR correspondentes aos éxons 2, 3, 4 e 5, exceto no caso do clone PST7:5.

No clone PST7:5 nota-se a total ausência da região correspondente ao éxon 4, possivelmente devido a um "erro" de edição ("*splicing*") na remoção dos íntrons, ocorrendo uma união do éxon 3 diretamente com o éxon 5. Essa ausência do éxon 4 justifica a interrupção da proteína pela presença do *stop* códon conforme descrito no subitem anterior.

Nestes clones PST7s a região correspondente ao éxon 5 é longa (~780 pb), estendendo-se entre o *stop códon* e o sinal de poliadenilação que está presente em todos os clones. A região 3'UTR desses clones é inclusive mais longa em comparação com o éxon 5 do batroxobin que contém 723 pb.

4.3. Análise das seqüências de cDNA e de proteínas dos clones obtidos.

4.3.1. Alinhamento e Dendrograma.

O dendrograma gerado pelo alinhamento de nucleotídeos dos clones de cDNA B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:5, PST7:7 se encontra na figura 28. É possível observar que os clones se dividem em 3 grupos distintos: (I)- GPS:2e5, B2.1 e PST7:3; (II)- PST7:4, GPS:3e4 e PST7:5 e (III)-PST7:7e8

Os valores de similaridade em porcentagem da tabela 22 refletem os grupos de similaridades observados no dendrograma, mostrando que os clones de cDNA pertencentes a um mesmo grupo apresentam uma elevada similaridade e que o clone de cDNA PST7:7e8 é o mais divergente. As similaridades entre as seqüências de cDNA variam de 99,87% a 83,21% ($\Delta=16,66\%$) e entre as seqüências das toxinas maduras variam de 99,57% a 77,21% ($\Delta=22,36\%$), ou seja, há mais variações nas seqüências das toxinas maduras do que nas seqüências de cDNA.

O alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos destes mesmos clones se encontra na figura 29. O clone PST7:7e8 por ser o mais divergente está destacado na caixa de cor cinza claro.

É possível observar que o clone PST7:3 apresenta 2 possíveis sinais de poliadenilação (5'-AATAAA-3') nas posições 929pb e 1380pb, sendo que o primeiro sinal de poliadenilação alinha com o sinal de poliadenilação do clone B2.1 que se encontra na posição 857pb. Os demais clones apresentam G no lugar de T na mesma região alinhada com o sinal de poliadenilação do clone B2. Os sinais de poliadenilação dos clones PST7:4, PST7:5 e PST7:7e8 se encontram respectivamente nas posições: 1381pb, 1235pb e 1372pb.

4.3.2. Análise do peptídeo sinal dos precursores.

A figura 30 mostra a comparação das seqüências de aminoácidos dos precursores (deduzidas a partir do cDNA) com as de toxinas maduras (isoladas do veneno). De maneira similar ao que foi mostrado no caso do cDNA (figura 21), os peptídeos sinais são muito conservados em serpentes evolutivamente próximas (cascavéis norte americanas) e distantes da cascavel sul americana (*Trimeresurus*, *Bothrops* e *Agkistrodon*), existindo algumas diferenças nas seqüências de nucleotídeos (figura 21) que pode ocasionar em mudanças no aminoácido (figura 30), que será abordado posteriormente na discussão.

O peptídeo sinal apresenta 18 aminoácidos sendo clivado após a alanina (A) no aminoácido nº 18, o pró-peptídeo apresenta 6 aminoácidos das posições de nº19 a 24 e a toxina madura começa na posição nº25 com os aminoácidos valina (V) ou isoleucina (I) pois a seqüência de aminoácidos da toxina madura ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* começa em valina (V) aminoácido nº 25.

A predição de clivagem do clone PST7:3 foi realizado pelo programa SignalP revelando a presença das seguintes regiões: n aminoácidos carregados positivamente, h região transmembrânica de hidrofobicidade e c a região que contém aminoácidos mais polares na região do C-terminal que define o sítio de clivagem (figura 31) (VON HEIJNE, 1985).

4.3.3. Análise das toxinas maduras.

O alinhamento em aminoácidos apenas da parte madura dos clones B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:7e8 gerou um dendrograma apresentado na figura 32. A sequência de aminoácidos do clone PST7:5 não foi alinhada devido a ausência da região correspondente ao éxon 4 apresentando um *stop códon* como mostrada na figura 26.

Podemos observar a presença de três grupos distintos: (I)-PST7:4 e GPS:3e4; (II)-GPS:2e5, B2.1 e PST7:3 e (III)-PST7:7e8. Estes dados estão de acordo com o dendrograma de cDNA dos clones (figura 28), na qual observamos 3 grupos formados pelos mesmos clones.

A tabela 23 confirma o dendrograma, mostrando que as toxinas maduras pertencentes a um mesmo grupo apresentam uma elevada similaridade entre si e que a toxina madura PST7:7e8 é a mais divergente.

4.4. Comparação das toxinas maduras dos clones obtidos com outras toxinas.

A tabela 24 mostra sequências de serino proteases de venenos de serpentes mais similares a cada toxina madura. O clone PST7:5 conforme descrito anteriormente não foi analisado porque falta a região correspondente ao éxon 4 apresentando um *stop códon*. Podemos observar que os clones B2.1, GPS:2e5, PST7:3 apresentaram alta similaridade de 79-80% com Bilineobin (*Agkistrodon bilineatus*), os clones GPS:3e4 e PST7:4 apresentaram 78% similaridade com Stejnobin de *Trimeresurus stejnegeri* e o clone PST7:7e8 apresentou 77% de similaridade com *serine protease* CL5 precursor de *Trimeresurus stejnegeri*, ou seja os clones pertencentes ao mesmo grupo das figuras 28 e 32 foram homólogos à mesma toxina, sendo o clone PST7:7e8 o mais divergente.

Na figura 33 podemos observar um dendrograma funcional gerado pelo alinhamento das toxinas maduras dos clones com 29 outras sequências de toxinas conhecidas. No dendrograma encontramos quatro grupos de toxinas sendo que o grupo I ativam o fator V da cascata de coagulação, o grupo II ativam o plasminogênio, o grupo III são fibrinogenases que se subdivide em dois grupos: IIIa- α fibrinogenases (venombina A) e IIIb- α e/ou β fibrinogenases (venombinas A e/ou B) e o grupo IV são enzimas trombina-símile que se subdivide em dois grupos: IVa-enzimas que atuam sobre a

coagulação e IVb- enzimas que pertencem ao grupo da toxina ativadora de proteína C (ACC-C) de *Agkistrodon contortrix contortrix*. Nos ramos do dendrograma encontramos serpentes de diferentes espécies organizadas por similaridade em grupos de mesma atividade biológica evidenciando que o dendrograma reflete uma possível diferença funcional de cada toxina.

A figura 34 apresenta o alinhamento das toxinas maduras dos clones obtidos e algumas outras analisadas no dendrograma funcional. As 6 pontes dissulfetos se encontram entre as seguintes cisteínas 7-141, 28-44, 78-236, 120-190, 152-169, 180-205 e os aminoácidos que compõem a tríade catalítica (H43), (D88) e (S184). A numeração das pontes dissulfetos e dos aminoácidos da tríade catalítica foram baseadas na sequência da giroxina-símile B2.1 mostrada na figura 18.

4.5. Modelo tridimensional.

Pela primeira vez foi realizado um modelo tridimensional da giroxina B2.1 que permitiu estudar a conformação do sítio catalítico, as pontes dissulfetos, o exossítio de ligação ao fibrinogênio e a comparação com outras estruturas de serino proteases, para esse fim foi realizado um modelo estrutural da crotalase.

O modelo tridimensional foi baseado na sequência do clone B2.1 foi realizado por modelagem de homologia com os modelos cristalográficos de AaV-SP-I (1opO) e AaV-SP-II/DAV-PA (1op2) de *Agkistrodon acutus*. Na figura 35 o modelo tridimensional do clone B2.1 é comparado com os modelos cristalográficos da TSV-PA (1bqy), DAV-PA (1op2) e da tripsina. Pode-se observar nos três modelos a presença das 6 pontes dissulfetos em azul, a presença de dois barris- β de terminação aberta (em amarelo), dispostos em ângulo reto um em relação ao outro e duas α -hélices (vermelho), sendo uma delas C-terminal.

As serino proteases do veneno de serpente apresentam um segmento C-terminal mais longo que as outras serino proteases; este é estabilizado pela última ponte dissulfeto e localizado em posição geométrica que difere da tripsina cujo C-terminal é mais curto e composto unicamente pela α -hélice.

No modelo de superfície da giroxina mostrado na figura 35 é possível visualizar a asparagina 81 em azul e o ponto do possível sítio de glicosilação

em vermelho, em verde é mostrado a tríade catalítica no fundo da fenda do sítio proteolítico. No modelo da DAV-PA o monossacarídeo NAG³⁰¹ está na asparagina 35, mostrada em magenta.

A figura 36 mostra o modelo tridimensional da giroxina e a comparação com o modelo cristalográfico da tripsina (2ptc) permitindo observar a sobreposição da região da tríade catalítica dos dois modelos.

A figura 37 identifica o exossítio de ligação ao fibrinogênio na α -trombina e na crotalase (roxo) e evidencia um exossítio alternativo presente na crotalase (rosa) e ausente na α -trombina (MASSOVA *et al*, 1996). Comparando-se o modelo da giroxina com o da crotalase, é possível encontrar os mesmos aminoácidos que compõem os dois exossítios, o de ligação ao fibrinogênio e o alternativo.

4.6. Construção do vetor de expressão pED-Giro.

O passos de subclonagem necessários para produzir o vetor pED-Giro são mostrados na figura 12.

O seqüenciamento do clone B2.1 mostrou que este cDNA foi inserido no vetor pCR2.1 TOPO em sentido oposto ao promotor do LacZ (figura 38).

4.6.1. Obtenção do inserto da giroxina madura.

O vetor pCR2.1 Giro após ser clivado com as enzimas de restrição SpeI (extremidade coesiva preenchida com Klenow DNA pol. I) e Not I, gerou o inserto da giroxina B2.1 (943pb) contendo a extremidade coesiva Not I a 5' e a extremidade cega 3'.

4.6.2. Preparo do vetor pSecTag2 Hygro A.

O vetor pSecTag2 Hygro A após ser digerido com as enzimas de restrição Xho I (a extremidade coesiva tratada com klenow da DNA pol. I) e Not I, gerou um fragmento de DNA de 5700 pares de bases (pb) contendo a extremidade coesiva Not I à 5' e a extremidade cega a 3'.

4.6.3. Seleção do clone pSecTag2-Giro.

O fragmento de giroxina após ser inserido no vetor pSecTag2 HygroA e realizado a seleção das colônias recombinantes, a figura 40 mostra que

somente o clone 1 apresentou um tamanho aparente maior que o vetor vazio (não recombinante), sendo provavelmente um clone positivo, correspondendo ao plasmídeo pSecTag2 Giro. Entretanto todos os outros clones aparentavam ser negativos e para confirmar esse fato as alíquotas da suspensão bacteriana dos clones 1 (recombinante), 2, 3 e 4 e do vetor vazio (não recombinantes-controles negativos) foram utilizados na reação de PCR, com os *primers*: GYR SE e GYR AS1.

Na figura 41 podemos observar que somente o clone 1 foi amplificado, confirmando que este clone contém o inserto correto.

O seqüenciamento do clone pSecTag2-Giro mostra que o inserto de giroxina B2.1 não está em fase de leitura em relação ao peptídeo sinal de Igk, devido a presença de um fragmento do sítio policlonal do vetor pCR2.1 TOPO (LaZ mostrado em azul na figura 39) portanto o precursor não será formado nem clivado e não resultando em uma giroxina-símile madura funcional. Para tanto foi necessário realizar a mutagênese sítio dirigida para retirar os nucleotídeos correspondentes a região LacZ presentes entre o peptídeo sinal e o inserto de giroxina B2.1 sendo o esquema mostrado na figura 12.

4.6.4. Seleção do clone mutante pSecTag2 Igk-Giro.

Na figura 42 os clones que apresentaram um tamanho aparente menor do que os clones controles (vetor parental pSecTag2-Giro antes da mutagênese), no caso os clones 4, 5, 6, 8 e 12 provavelmente sofreram a mutagênese e contém o plasmídeo mutante pSecTag2 Igk-Giro, perdendo aproximadamente as 133 pares de bases.

Os clones 4, 6 e 8 foram escolhidos aleatoriamente e submetidos a uma extração do DNA plasmidial e em seguida foram digeridos com as enzimas de restrição Not I, Eco RV e Bam HI com a finalidade de verificar a perda desses sítios de restrição que estão presentes no sítio de policlonagem do vetor parental pSecTag2-Giro, na região que se desejava deletar (figura 43). No vetor parental ao clivar com a enzima de restrição Bam HI, ocorre a liberação de um inserto, pois existem 2 sítios de Bam HI, um na giroxina madura e outro na região que se deseja deletar sendo o esquema mostrado na figura 39. Já nos clones mutantes (pSecTag2-IgK-Giro) não há liberação de inserto, apenas linearização do plasmídeo, porque só existe 1 sítio de Bam HI

na gioxina madura, o outro sítio é perdido nos mutados conforme esquema mostrado na figura 44.

A reação de mutagênese foi confirmada pelo seqüenciamento, utilizando-se o *primer antisense* interno a gioxina GYR AS2 (a região de hibridação do *primer* é mostrada na figura 29), mostrando que o inserto da gioxina ficou em fase de leitura com o peptídeo sinal de IgK e a seqüência intercalante foi deletada conforme mostrado na figura 44 sendo o clone 4 (pSecTag-IgK-Giro) escolhido para dar continuidade com a subclonagem no vetor de expressão pED. Para certificarmos que o peptídeo sinal será corretamente clivado a seqüência foi submetida ao SignalP 3.0.

4.6.5. Obtenção do inserto IgK-Giro.

O clone 4 pSecTag2 IgK-Giro após ser digerido com as enzimas de restrição Xho I (a extremidade coesiva foi preenchida com Klenow da DNA pol I para gerar uma extremidade em ponta cega) e Nhe I, gerou o fragmento IgK-Giro de 968 pb contendo uma extremidade 5' coesiva (NheI) e uma extremidade cega a 3'

4.6.6. Preparo do vetor pED para subclonagem do inserto IgK-Giro.

O plasmídeo pED após ser digerido com as enzimas de restrição Xba I e Sma I, obteve-se um fragmento de DNA de 5730 pares de bases (pb) contendo a extremidade coesiva Xba I a 5' e a extremidade cega Sma I a 3'.

4.6.7. Seleção do clone pED-Giro.

O fragmento IgK-Giro após ser ligado no vetor pED, é possível observar na figura 45 que a colônia 3, apresentou um tamanho aparente maior que o vetor vazio (não recombinante), sendo provavelmente o clone positivo (pED-Giro).

Para confirmar a presença do inserto IgK-Giro no clone 3, as alíquotas da suspensão bacteriana dos clones foram analisados por PCR. Entretanto todos os outros clones aparentavam ser negativos, para confirmar esse fato foi escolhido um clone aleatoriamente (clone 12) e o vetor vazio (não recombinante) sendo utilizados como controles negativos da reação de PCR, com os *primers*: GYR SE e GYR AS1.

Podemos observar na figura 46 que somente o clone 3 foi amplificado, confirmando a presença do inserto IgK-Giro inserida no vetor pED conforme esquema mostrado na figura 47.

Após a extração do DNA plasmidial pED-Giro do clone 3, foi realizada a transfecção nas células CHO-DXB11 *dhfr*⁻.

4.7. Expressão do vetor pED-Giro em células CHO DXB11 *dhfr*⁻.

4.7.1. Seleção e amplificação dos clones.

Após a transfecção, os clones celulares foram isolados (figura 48). Durante o período de amplificação algumas dificuldades foram encontradas: muitos clones morreram ao aumentar a concentração de MTX, outros clones demoraram mais de 3 semanas para chegar a semi-confluência e passar para a próxima etapa de amplificação totalizando 6 meses de cultivo, selecionando os clones até 1280nM de MTX.

4.7.2- Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células CHO DXB11 por SDS-PAGE e *western blot*

Nos clones que sobreviveram, em diferentes concentrações de MTX, a análise do extrato celular não detectou a presença da giroxina recombinante em eletroforese em gel de poliacrilamida e *western blot* (dados não mostrados).

4.7.3. Detecção do vetor pED-Giro integrado ao genoma da célula CHO-DXB11.

Com o intuito de verificar se o vetor pED-Giro foi integrado ao genoma da célula CHO-DXB11, foi realizado um PCR com o extrato total da célula transfectada (clone 6) mostrada na figura 49. Ao utilizar os *primers* IgK-SE/DHFR AS segundo o esquema mostrado na figura 13-A mostrou que o DNA genômico IgK-Giroxina-*dhfr* está inteiro presente no clone 6 (canaleta 2) e no plasmídeo pED-Giro (canaleta 3) com uma banda de aproximadamente 2100pb, conforme mostrado na figura 49-A. Não houve amplificação ao utilizar a célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻ não transfectada (canaleta 1), sendo o esperado.

No entanto o clone 6 (canaleta 5) ao ser amplificado com os *primers* IgK SE/GYR AS1 segundo esquema mostrado na figura 13-B resultou em 2 bandas, na qual uma banda está na altura do plasmídeo pED-Giro (canaleta 6) de aproximadamente 780pb e a outra banda se encontra na mesma altura que a banda presente na célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻ não transfectada (canaleta 4), de acordo com a figura 49-B. Esta banda deve estar relacionada com seqüências presentes no DNA genômico da célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻ complementares aos *primers* específicos para a gioxina.

Os *primers* DHFR SE/AS amplificaram a região do *dhfr* segundo o esquema mostrado na figura 13-C presente no clone 6 (canaleta 8) e no plasmídeo pED-Giro (canaleta 9) com uma banda de aproximadamente 600pb de acordo com a figura 49-C. Na canaleta 7 a célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻ não transfectada, não amplificou com estes *primers* conforme o esperado. Na canaleta 10 ao ser utilizada água na reação não amplificou nenhuma banda, ou seja, não houve contaminação e as amplificações foram específicas conforme mostrada na figura 49.

4.7.4. Detecção do mRNA expresso pela célula CHO-DXB11x pED-Giro.

As extrações dos RNAs totais dos clones 4, 8 na ausência de MTX, clones 4 e 8 na presença de 20nM MTX e da célula controle negativo CHO-K1 *dhfr*⁺, ocorreram com sucesso pois as bandas recombinantes dos RNAs ribossomais se encontram íntegras (figura 50).

Devido à intensa densidade celular da célula controle negativo CHO-K1 *dhfr*⁺ (canaleta 1) e dos clones 8 sem MTX (canaleta 2) e 4 sem MTX (canaleta 4), estes foram reservados para realizar o ensaio de RT-PCR e os clones 8 com 20nM de MTX (canaleta 3) e 4 com 20nM de MTX (canaleta 5) devido a baixa intensidade celular não foram utilizados nesse ensaio.

A concentração dos RNAs totais em uma absorbância de 260nm foram CHO-K1 *dhfr*⁺: 1245ng/μl; clone 4: 696ng/μl e clone 8: 884ng/μl.

Na figura 51 ao utilizar 3,5μg de RNA total isolado das amostras, com os *primers* GYR SE e DHFR AS segundo o esquema mostrado na figura 14-A, podemos observar na figura 51- A que não ocorreu nenhuma amplificação na célula CHO-K1 *dhfr*⁺ e nos clones 4 e 8 (canaletas 1 a 3), ou seja, não há a

formação de um único mRNA giroxina-*dhfr*. Mas ao utilizar os *primers* GYR SE/AS1 segundo o esquema mostrado na figura 14-C podemos observar na figura 51-C a presença de uma banda na célula controle negativo CHO-K1 *dhfr*⁺ e nos clones 4 e 8 (canaletas 4, 5 e 6) de aproximadamente 700pb.

Ao utilizar os *primers* DHFR SE/AS segundo o esquema mostrado na figura 14-B podemos observar na figura 51-B a presença de uma banda de aproximadamente 600pb na célula controle negativo CHO-K1 *dhfr*⁺ e nos clones 4 e 8 (canaletas 7, 8 e 9) na mesma altura que o controle positivo pED-Giro amplificado com o mesmo par de *primers* (canaleta 10). A célula CHO-K1 *dhfr*⁺ amplificou uma banda pois é uma linhagem que não apresenta deficiência do gene *dhfr* e a presença das bandas nos clones 4 e 8 (pED-Giro transfectado na célula CHO-DXB11 deficientes do gene *dhfr*) indica a presença do *dhfr* proveniente do plasmídeo pED-Giro presente nos clones transfectados.

Nesse ensaio de RT-PCR as sequências dos *primers* GYR SE/AS 1 amplificou uma sequência do mRNA presente na célula CHO-K1 *dhfr*⁺, confirmando o resultado anterior em que esse mesmo par de *primer* amplificou uma banda presente na célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻. O mRNA da giroxina está presente mas em uma baixa concentração e se encontra separado do mRNA *dhfr*.

Como na célula CHO-K1 *dhfr*⁺ amplificou uma banda com os *primers* GYR SE/AS1, fomos verificar por RT-PCR se na célula não transfectada CHO-DXB11 *dhfr*⁻, também apresentava ou não a mesma amplificação. Além disso nesse RT-PCR fomos verificar se o dicístron mRNA IgK-giroxina-*dhfr* realmente se encontra clivado.

Um novo ensaio de RT-PCR foi realizado com 8μL de RNA total dos clones 4 e 6 sem tratamento com MTX, clones 4 com 20nM de MTX e 6 com 320nM de MTX e como controle negativo as células CHO-DXB11 *dhfr*⁻. As extrações dos RNAs totais dessas amostras ocorreram com sucesso, pois da mesma forma que a extração descrita anteriormente, as bandas recombinantes dos RNAs ribossomais se encontram íntegras (figura 52). Podemos observar que o clone 4 (canaleta 1) apresentou uma menor intensidade, influenciando no próximo resultado.

As concentrações do RNA das amostras em ng/ μ L e as concentrações em μ g do RNA total utilizado na reação se encontram na tabela 25 e o RNA total isolado das amostras se encontra na figura 53.

Ao utilizar os *primers* IgK SE e DHFR AS segundo o esquema mostrado na figura 14 D, não ocorreu nenhuma amplificação, ou seja, não há a formação de um único mRNA dicistrônico IgK-giroxina-*dhfr* conforme mostrado na figura 53-D. Ao utilizar os *primers* IgK SE e GYR AS1 segundo o esquema mostrado na figura 14 F, a presença de bandas dos clones 4 com 20nM MTX, 6 e 6 com 320nM MTX (canaletas 7,8 e 9) na altura do controle positivo pED-Giro amplificado com o mesmo par de *primers* (canaleta 17) de aproximadamente 780pb e a ausência de banda na célula controle negativo CHO DXB11 *dhfr*⁻ (canaleta 10) revela a presença do mRNA giroxina nos clones transfectados no entanto separado do mRNA- *dhfr* conforme mostrado na figura 53 F.

Na figura 53-F o clone 4 não amplificou com os *primers* Igk SE/GYR AS1 (canaleta 6), pois foi utilizada uma baixa concentração de RNA (1,6 μ g) na reação de RT-PCR sendo que o mesmo clone 4 amplificado com 20nM MTX ao ser colocado 5,4 μ g de RNA na reação de RT-PCR conforme mostrado na tabela 25, amplificou uma banda (canaleta 7) na altura do controle positivo pED-Giro (canaleta 17), indicando a presença do mRNA giroxina do vetor pED-Giro.

Ao utilizar os *primers* DHFR SE/AS segundo o esquema mostrado na figura 14 E verificou-se a presença de bandas dos clones 4, 4 com 20nM MTX, 6 e 6 com 320nM MTX (canaletas 1 a 4) na mesma altura do controle positivo pED-Giro amplificado com o mesmo par de *primers* (canaleta 16) de aproximadamente 600pb, indica a presença da região do *dhfr* proveniente do plasmídeo pED-Giro presente nos clones transfectados conforme mostrado na figura 53 E. A ausência da banda na célula controle negativo CHO-DXB11 *dhfr*⁻ (canaleta 5), está de acordo com o esperado. A intensidade da banda obtida para *dhfr* é muito maior que a intensidade do mRNA-giroxina confirmando que o mRNA da giroxina está separado do mRNA *dhfr*.

Ao utilizar somente água na reação não houve nenhuma amplificação (canaleta 19), ou seja, não houve contaminação e as amplificações foram específicas.

4.8. Expressão transiente do vetor pED-Giro em células COS-7.

Após realizar a transfecção com os plasmídeos pSecTag2-IgK-Giro e pED-Giro e como controle positivo o pGEF-N1 a transfecção ocorreu com sucesso, pois em torno de 90% das células COS-7 estão expressando a proteína fluorescente GFP conforme mostrado na figura 54-A. O mesmo deverá ter ocorrido com as transfecções dos clones pED-Giro (figura 54-B) e pSecTag-IgK-Giro.

4.8.1. Purificação do produto recombinante expresso pelo vetor pED-Giro em células COS-7.

Durante o processo de purificação foi utilizado a mesma quantidade de resina de afinidade benzamidina em todas as amostras (100 μ L). O meio de cultura em que cresceram as células COS-7xpED-Giro 24h foi utilizado para purificar com a resina de afinidade benzamidina. O teste de atividade esterásica foi realizado com o meio de cultura antes e após a purificação apresentando respectivamente as atividades 541,8 (tabela 26-amostra F) e 0,5 (tabela 26-amostra I), ou seja, foi recuperado uma baixa concentração da proteína durante o processo de purificação apresentando uma baixa atividade específica U/mg de proteína, provavelmente porque a quantidade de proteína total excedeu a capacidade da resina.

Ao realizar a curva padrão da albumina bovina sérica o dado da curva padrão ajustados pelo programa *Graph Pad Prims*, pela regressão linear é: $y = 0,03521x$.

4.8.1.1. Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células COS-7 por SDS-PAGE e western blot.

O perfil eletroforético da giroxina nativa purificada com a resina de afinidade benzamidina, reage com o soro policlonal anticrotálico do Instituto Butantan resultando em duas bandas com aproximadamente 33kDa, sendo a primeira banda é mais intensa que a segunda (figura 55-B-canaletas 7 e 8). A giroxina recombinante expressa pelo plasmídeo pED-Giro reagiu com o soro anticrotálico apresentando o mesmo comportamento da giroxina nativa purificada, com a presença das duas bandas, a primeira mais intensa que a

segunda e na mesma posição de 33KDa, ou seja o plasmídeo pED-Giro expressou uma giroxina recombinante igual a giroxina encontrada no veneno.

O plasmídeo pSecTag-2 IgK-Giro expressou a giroxina recombinante, mas com uma intensidade muito menor que o plasmídeo pED-Giro, indicando que foi uma boa estratégia ter retirado a giroxina recombinante do pSecTag-IgK-Giro e clonado no vetor pED de acordo com o esquema mostrado na figura 12.

Após uma nova transfecção do plasmídeo pED-Giro nas células COS-7, o "extrato celular bruto", o sobrenadante e o precipitado do lisado da célula, antes da purificação com a resina de afinidade benzamidina, o sobrenadante do lisado da célula e o meio de cultura 24h após a transfecção do vetor pED-Giro nas células COS-7 foram purificados com a resina de afinidade benzamidina e analisados em gel de poliacrilamida e *western blot* (figura 56). Podemos observar que o gel de poliacrilamida corado com *Comassie Blue* (figura 56-A), mostra que a giroxina nativa purificada do veneno cora muito mal, pois com 3µg de giroxina purificada do veneno (canaleta 15) é possível observar somente 1 banda de intensidade fraca.

A amostra extrato celular COS-7 pED-Giro (canaleta 3), o sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 transfectada com o plasmídeo pED-Giro (canaleta 5), o precipitado do lisado da célula COS-7 transfectada com o plasmídeo pED-Giro (canaleta 7) reagiram com o soro anticrotálico apresentando as mesmas duas bandas encontradas na giroxina nativa purificada do veneno, descrito anteriormente. No entanto essas bandas não se encontram na mesma posição que a giroxina nativa, pois esta sofreu uma distorção durante a corrida eletroforética (figura 56 B).

A amostra precipitado do lisado da célula sonicada COS-7 pED-Giro (canaleta 7) se encontra 10x mais concentrada do que a amostra sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 transfectada com o plasmídeo pED-Giro (canaleta 5), mostrando que uma parte do produto de expressão do vetor pED-Giro giroxina-símile B2.1 se encontra no precipitado celular e uma outra parte se encontra solúvel no sobrenadante após sonicação. Após incubar o sobrenadante do lisado da célula COS-7 transfectadas com o plasmídeo pED-Giro com a resina de afinidade benzamidina e realizar a eluição, não foi possível detectar a presença da proteína recombinante no material eluído (canaletas 8-13). Este fato é um

indicativo que expressar direto no meio de cultura é uma boa estratégia pois auxilia na purificação da toxina recombinante sem a interferência do material celular.

O meio de cultura em que cresceram as células COS-7 24h após a transfecção com o plasmídeo pED-Giro antes da purificação também não foi possível ser visualizado pelo ensaio de *western blot* (dado não mostrado). Já o meio de cultura em que cresceram as células COS-7 24h após a transfecção com o plasmídeo pED-Giro incubado com resina de afinidade benzamidina reagiu com o soro anticrotálico sendo possível observar a presença de duas bandas na mesma posição de 33kDa das bandas encontradas na giroxina nativa purificada do veneno após a concentração do material eluído (figura 56 C) demonstrando que a giroxina recombinante foi secretada para o meio de cultura.

Com a finalidade se verificar se a giroxina-símile B2.1 está sendo secretada no meio de cultura na forma ativa, foi realizado o teste de atividade esterásica.

4.9. Ensaio de atividade enzimática da giroxina recombinante purificada por benzamidina sepharose.

Os sobrenadantes do lisado celular e os meios de cultura foram incubados com a resina de afinidade Benzamidina Sepharose 6B com o intuito de detectar a presença da giroxina recombinante.

A figura 57 mostra a atividade esterásica da giroxina recombinante. O controle negativo com o meio de cultura D-MEM apresentou uma pequena atividade esterásica sugerindo que algum componente presente pode ter essa atividade e foi considerada como basal. O sobrenadante do lisado da célula COS-7 (controle negativo das células) não apresentou nenhuma atividade, conforme o esperado. No entanto, o sobrenadante do lisado da célula COS-7 transfectada com o vetor pED-Giro apresentou pequena atividade, um pouco acima do basal; o que está de acordo com a figura 56-B. Neste resultado anterior no sobrenadante do lisado após a purificação com a resina de afinidade, não foi detectada em *western blot*; considerando que o material celular é bastante viscoso pode ter ocorrido interferência com a purificação da proteína recombinante, resultando na baixa atividade esterásica.

Na figura 57 verificamos que o meio de cultura em que cresceram as células COS-7 24h após a transfecção com o vetor pED-Giro apresentou uma elevada atividade (U/mL) indicando que a giroxina B2.1 foi secretada e purificada do meio de cultura. Esse resultado está de acordo com a figura 56-C na qual observamos no western blot na canaleta 1 a presença da giroxina B2.1 purificada do meio de cultura em que cresceram durante célula COS-7 com o vetor pED-Giro durante 24h. O fato da giroxina B2.1 ser secretada para o meio de cultura facilita o processo de purificação, pois há poucas proteínas contaminantes.

No meio de cultura 48h após a transfecção, apesar das células se encontrarem envelhecidas e provavelmente secretando metabólitos para o meio de cultura, ainda foi possível observar uma elevada atividade esterásica, no entanto menor do que a determinada no meio de cultura em 24h.

Concluindo, foi possível realizar a construção de um vetor pED aliado a um peptídeo sinal IgK que secreta para o meio de cultura a giroxina B2.1 recombinante ativa facilitando a purificação com o perfil eletroforético similar a giroxina nativa purificada do veneno.

5- DISCUSSÃO

As enzimas dos venenos de serpentes caracterizadas como serino proteases (SVSPs) apresentam mecanismos catalíticos em comum, que inclui um resíduo de serina altamente reativo e importante na formação do complexo enzimático, o qual é estabilizado na presença dos resíduos de histidina e ácido aspártico, que também fazem parte do sítio ativo (SERRANO *et al*, 2005) (figuras 3 e 4).

É conhecido que existem mais de 150 seqüências de SVSPs publicadas (WANG *et al.*, 2001) a maioria obtida por seqüenciamento de cDNA. Apesar da grande similaridade na sua estrutura tridimensional estas toxinas variam muito em relação às funções, devido a diferenças sutis de aminoácidos da proteína sem afetar sua conformação global, pois existe uma pressão seletiva positiva para que toxinas de venenos atuem em diferentes alvos celulares e/ou diferentes presas animais, conferindo vantagem às espécies de serpentes que possuem novas e diferentes toxinas. Refletindo essa variabilidade funcional, a seqüência primária dos aminoácidos de determinadas regiões da toxina madura também é mais variável, enquanto outras, são estruturalmente conservadas. A variabilidade também se reflete nas diferentes atividades e alvos celulares com que elas interagem (coagulação, pressão arterial, inflamação entre outros).

Uma atividade peculiar é o rolamento em barril descrito originalmente para a giroxina e mais tarde, para a ancrod e crotalase (ALEXANDER *et al*, 1988). A giroxina é uma serino protease do veneno de cascavel *Crotalus durissus terrificus* (CAMILLO, 1998) e a ancrod e a crotalase também são SVSPs dos venenos de *Agkistrodon rhodostoma* e *Crotalus atrox* respectivamente, que agem sobre a coagulação (trombina-símile).

No caso do rolamento em barril não é conhecido o mecanismo que o gera assim como as relações estrutura/atividade envolvidas. Neste estudo foram obtidas e analisadas seqüências de SVSPs similares à giroxina que podem contribuir para esclarecer estes pontos. Assim o clone obtido com o *primer* específico desenhado para a região N-terminal da giroxina foi denominado B2.1.

A seqüência do clone B2.1-giroxina revelou diferenças em relação aos 30 primeiros aminoácidos de giroxina anteriormente descritos em DA SILVA *et*

et al, 1989. Na figura 17 podemos observar que o seqüenciamento de giroxina obtido por Simpson e por Kaiser e a seqüência de aminoácidos do clone B2.1-giroxina, obtida através do cDNA, apresentou duas diferenças de aminoácidos em relação a seqüência N-terminal descrito por Simpson (R→ H, posição nº 12 e Q → E, posição nº 24).

Para ambos os casos a mutação encontrada pode ter sido ocasionada pela Taq DNA polimerase recombinante de baixa fidelidade utilizada na amplificação do gene.

A troca do aminoácido arginina (R) para histidina (H) pode ser uma mutação conservada que ocorre naturalmente uma vez que a característica físico-química em relação à carga positiva é preservada tornando essa mutação freqüente. Isto é válido também para o segundo caso, em que os aminoácidos glutamina (Q) e ácido glutâmico (E) são estruturalmente muito semelhantes, sendo esta mutação especialmente freqüente da mesma forma que é a mutação da asparagina (N) e ácido aspártico (D) verificado quando se alinha seqüências de proteínas e de cDNA. Por outro lado a diferença encontrada entre glutamina (Q) e ácido glutâmico (E) pode estar relacionada à desaminação da proteína, uma vez que o ácido glutâmico foi identificado por degradação de Edman.

Ao analisar os clones de cDNA amplificados B2.1 (figura 18), GPS:2e5 (figura 19), GPS:3e4 (figura 20), PST7:3 (figura 23), PST7:4 (figura 24) e PST7:7e8 (figura 25) podemos observar que apresentam a tríade catalítica HDS (histidina, ácido aspártico, serina), com exceção do clone PST7:5 que apresenta somente os aminoácidos H e D devido a ausência da seqüência correspondente ao éxon 4 (figura 26). Todos esses clones mostrados na figura 29 podem ser considerados serino proteases pertencendo à família de tripsina S1A, a maior família de serino proteases (SERRANO *et al*, 2005). A similaridade também está presente na conformação observada pela sobreposição da região da tríade catalítica que se encontra na fenda entre os dois barris- β no clone B2.1 e na tripsina (figura 36).

Outra característica importante das serino proteases do veneno de serpentes é a glicosilação. Esta modificação pós-traducional está presente na maioria das células secretadas (GOOCHEE *et al*, 1991) sendo que as serino proteases do veneno de serpentes apresentam oligossacarídeos covalentemente ligadas em uma cadeia lateral de asparagina (N-glicosilação)

e poucas serino proteases apresentam oligossacarídeos covalentemente ligados à cadeia lateral de treonina ou serina (O-glicosilação), sendo raras as serino proteases não glicosiladas como a trombina-símile contortrixobin de *Agkistrodon contortrix contortrix* e flavoxobin de *Trimeresurus flavoviridis* (AMICONI *et al*, 2000).

A glicosilação também está presente nas SVSPs e foi mais bem estudada em algumas proteínas como, por exemplo, a *Bothrops* protease A, a kangshuamei, a ancrod e a batroxobin (MURAYAMA *et al* 2003, SAKAI *et al*, 2006 e LOCHNIT & GEYER, 1995).

Segundo MURAYAMA *et al* 2003, na *Bothrops* protease A (*Bothrops jararaca*) foram encontrados 8 sítios potenciais de N-glicosilação e 2 sítios potenciais de O-glicosilação na qual o experimento de deglicosilação confirmou que os 10 potenciais sítios estão presentes.

Os processos de N-glicosilação e O-glicosilação estão descritos em GOOCHEE *et al*, 1991. Os clones de cDNA obtidos B2.1 (figura 18), GPS:2e5, (figura 19), PST7:3 (figura 23) e PST7:4 (figura 24) apresentam 1 potencial sítio de N-glicosilação sendo encontrados 2 sítios nos clones GPS:3e4 (figura 20) e PST7:7e8 (figura 25). Com exceção do clone PST7:5, todos os demais apresentam 1 potencial sítio de O-glicosilação sendo que o clone PST7:7e8 apresenta dois sítios, sendo o clone mais glicosilado potencialmente.

A glândula de veneno sintetiza, estoca e secreta na forma aproximadamente 100-200 componentes de proteínas/peptídeos com diferentes estruturas e funções. O percurso da toxina do aparelho de Golgi ao lúmen do epitélio glandular é guiado por um peptídeo sinal que é muito conservado. A razão desta elevada conservação é que o peptídeo sinal de um determinado grupo de toxinas tem sempre a mesma função - dirigir a secreção da toxina através das membranas celulares sendo, portanto praticamente invariante (MATSUI *et al*, 2000; DESHIMARU *et al.*, 1996). A maioria das proteínas secretadas são glicosiladas e como os clones obtidos apresentaram sítios potenciais de N-glicosilação e a giroxina purificada do veneno de cascavel *Crotalus durissus terrificus* é glicosilada, apresentando 3,8% de açúcares totais (CAMILLO *et al*, 2005), é acertado expressar a giroxina em célula de mamífero.

Na figura 21, alinhando-se os clones GPS:2e5 e GPS:3e4 com outras seqüências de precursores de serino proteases pudemos comprovar uma

elevada conservação na região do peptídeo sinal. Devido a essa conservação mesmo entre espécies diferentes, foi possível desenhar um *primer sense* para a região do peptídeo sinal denominado *primer* peptídeo sinal P.S, que com o *primer antisense* T7 foi possível amplificar seqüências precursoras similares ao clone B2.1 conforme o esquema mostrado na figura 11.

Existem algumas diferenças de nucleotídeos que podem resultar ou não em mudanças de aminoácidos; alguns exemplos foram analisados e estão mostrados nas figuras 21 (cDNA) e 30 (aminoácidos):

- o nucleotídeo 18 (A) da seqüência de serino protease de *Bothrops jararacussu* (AY251282.1) não resulta na mudança do 6º aminoácido pois GTA e GTG codificam para Valina (V),
- o nucleotídeo 19 (A) da seqüência HS 120 de *Bothrops jararaca* (AB178323.1) resulta em mudança de no 7º aminoácido, pois ATA codifica para Isoleucina (I) e nas outras seqüências CTA codifica para Leucina (L),
- o nucleotídeo 31 (G) da seqüência precursor de Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* resulta na mudança do 11º aminoácido, pois GTG codifica para Valina (V) e nas outras seqüências CTG codifica para Leucina (L).

O sítio de clivagem entre o peptídeo sinal (18 aminoácidos) e a toxina secretada na glândula pôde ser predito comparando-se seqüências de precursores com seqüências de toxinas maduras (figura 30) e utilizando-se o programa *SignalP* 3.0 (figura 31). No caso das SVSPs após o peptídeo sinal existe um pró-peptídeo para manter a toxina inativa em relação à sua atividade enzimática na forma de um zimógeno. Após a extração do veneno o zimogênio é convertido em toxina com atividade proteolítica pela clivagem do pró-peptídeo. Esse pró-peptídeo apresenta seis aminoácidos que são clivados pós-secreção por proteólise parcial do N-terminal (figura 30).

Com a finalidade de verificar as diferenças entre nucleotídeos e aminoácidos entre as toxinas maduras dos clones B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:5 e PST7:7e8, foi realizado o alinhamento em nucleotídeos e aminoácidos (figura 29).

Conforme já comentado anteriormente, existem muitas diferenças de nucleotídeos que ocasionam em mudanças de aminoácidos, mas existem também muitas diferenças de nucleotídeos que não afetam a proteína, são as denominadas "mutações silenciosas". O clone PST7:7e8 apresentou muitas diferenças em relação aos demais clones e pudemos observar também que

existem algumas seqüências de nucleotídeos dos clones B2.1, GPS:2e5 e PST7:3 que diferem dos clones GPS:3e4, PST7:4 e PST7:5. Assim, podemos relacionar as seguintes diferenças:

- a seqüência **GGT** nos clones B2.1 e PST7:7e8 codifica para o aminoácido G (4º aminoácido do clone B2.1 e 28º aminoácido do clone PST7:7e8) sendo que os outros clones apresentam a seqüência **GGA** codificando para o mesmo aminoácido G (nº 28).

- a seqüência **GGT** no clone B2.1 pode ter sido ocasionada pelo *primer* GYR SE, pois na figura 8 podemos observar que essa região GTC ATT GGA **GGT** faz parte do *primer* GYR SE, sendo introduzida essa diferença no nucleotídeo nº 12 (T) do clone B2.1.

- a seqüência **GGT** (**T** de nº 84) no clone PST7:7e8 codifica para o aminoácido G (nº 28) e nos demais clones (com exceção do clone B2.1) a seqüência é **GGA** (**A** de nº 84) que também codifica para o mesmo aminoácido G (nº 28). Como o código genético é degenerado (mais de uma trinca de códon pode codificar para o mesmo aminoácido) a mutação do código genético, no caso A por T não implicou em mudança de aminoácido e consequentemente da proteína. No entanto, de acordo com KIMCHI-SAFARTY *et al*, 2006 mutações silenciosas nem sempre são "silenciosas", pois mutações no código genético que são traduzidas na mesma seqüência de aminoácido, podem ter implicações, na taxa de transcrição e tradução e por conseguinte no dobramento da proteína e na regulação de sua função.

Os três grupos formados pelos clones de cDNA B2.1, PST7:3 e GPS:2e5 (I), PST7:4, GPS:3e4 e PST7:5 (II) e o clone mais divergente PST7:7e8 (III) (figura 28) está de acordo com o dendrograma das toxinas maduras codificadas pelos clones de cDNA (figura 32), sendo o clone PST7:5 devido ao erro de edição na remoção dos íntrons, faltando o éxon 4 não foi alinhada. A seqüência da região da toxina madura de SVSPs mais similar com cada clone (tabela 24) é concordante com o agrupamento, bilineobina para o primeiro grupo, stejnobin para o segundo grupo e serino protease CL5 para o clone PST7:7e8 que é o mais divergente. A stejnobin é uma serino protease da *Trimeresurus stejnegeri* com ação trombina-símile, mas não ativa outros fatores da coagulação como plasminogênio, protrombina e fator X (Zhang *et al*, 1998), a bilineobina é uma enzima trombina-símile da *Agkistrodon bilineatus* que converte o fibrinogênio em fibrina, liberando os fibrinopeptídeos

A α e B β , (KOMORI *et al.*, 1993). O grupo I (formado pelos clones B2.1, PST7:3 e GPS:2e5) apresentou o mais alto escore de similaridade com bilineobina e sua ação é similar à da giroxina. A seqüência da serino protease CL5 da *Trimeresurus stejnegeri* está depositada no banco de dados mas os dados sobre a atividade dessa serino protease não está descrito na literatura.

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* apresenta 2 serino proteases descritas: a giroxina (BARRABIN *et al.*;1978; SEKI *et al.*,1980) e uma enzima trombina símile (RAW *et al.*,1986 e RUIZ DE TORRENT *et al.*, 2007). Os clones do grupo I podem ser giroxina ou isoformas de giroxina devido a possíveis erros introduzidos pela Taq DNA polimerase, o grupo II podem ser isoformas de giroxina também por possíveis erros introduzidos pela Taq DNA polimerase ou ser a trombina-símile e o clone PST7:7e8 é o mais divergente de todos os outros grupos.

Com relação à região 3'UTR podemos observar na figura 29 que o clone B2.1 tem uma 3' UTR mais curta, mas a análise deste clone, utilizando-se o programa *Spidey*, com um gene da batroxobin mostrou que o clone B2.1 apresenta sinal de poliadenilação e cauda de poli A, sendo que o cDNA de batroxibin apresenta um 3'UTR mais curto que os clones PST7s conforme mostrados na tabela 21 e figura 27.

Outras seqüências de serino proteases de serpente têm 3'UTR de tamanho similar. Entretanto, podemos verificar que no clone PST7:3 existem dois sinais potenciais de poliadenilação (5'-AATAAA-3'), um na posição 929pb e o outro na posição 1380pb. O sinal real de poliadenilação do clone PST7:3 está imediatamente antes da cauda de poliadenina (posição 1380pb). Entretanto, é possível que ambos os sítios possam ser reconhecidos e clivados para se acrescentar uma cauda de poliadeninas criando uma 3' UTR mais curta ou mais longa dependendo do sítio reconhecido. O sinal de poliadenilação do clone B2.1 (posição 857pb) alinha com o sítio potencial de poliadenilação do clone PST7:3 (posição 929pb). Os clones PST7:4, PST7:5, e PST7:7e8 apresentam a seqüência 5'-AAGAAA- 3' nas respectivas posições 1381pb, 1235pb e 1372pb que alinha com o sinal de poliadenilação do clone B2.1. O clone B2.1 pode representar o mesmo clone PST7:3 e as três diferenças de aminoácidos encontradas no clone B2.1 em relação ao clone PST7:3 observado na figura 29, podem ter sido introduzidas durante o PCR, pois na clonagem do clone B2.1 foi utilizada uma Taq DNA polimerase recombinante

de baixa fidelidade e na clonagem do clone PST7:3 foi utilizada uma Taq DNA polimerase *Platinum* (com maior fidelidade). Nesse caso, a presença de dois sinais de poliadenilação do clone PST7:3 resultariam em dois transcritos com diferentes 3'UTRs, sendo que o menor transcrito pode corresponder a B2.1. Por outro lado pode existir na glândula de veneno um mRNA com 3'UTR curta ou um mRNA com 3'UTR longa contendo 2 sinais de poliadenilação.

No ensaio de PCR para obter os clones PST7s (figura 22), os mRNAs de 3'UTRs curtos podem estar presentes na banda imediatamente abaixo da banda excisada do gel, sendo que a banda clonada deve conter somente mRNAs de 3'UTRs longos.

A possibilidade de existirem mRNAs com 3'UTRs de diferentes tamanhos baseia-se em CHARBONNIER *et al*, 2002, que isolou por RT-PCR uma forma longa de miogenina de *Xenopus laevis* (XmyogU2) que apresentava dois sinais de poliadenilação (5'AATAAA 3') na posição 1054 e 1328pb, enquanto que a sequência do clone XmyogU1 apresentava somente o segundo sinal de poliadenilação na posição 1328pb. Esse resultado sugere que a presença de pelo menos dois sinais de poliadenilação do clone XmyogU2 resulta em dois transcritos com diferentes tamanhos de 3'UTRs.

A organização éxon/intron de diversas proteases da família de serino proteases mostra que estas podem ser divididas em diversas subfamílias. Em relação à organização éxon/intron o gene de batroxobin (figura 27) apresenta a mesma estrutura de 5 éxons e 4 íntrons dos genes de calicreína e Tripsina. Novos íntrons surgem na região da protease para os genes de outras serino proteases: um novo íntron para o ativador tissular de plasminogênio e para os genes de urokinases. Dois novos íntrons para o gene do quimiotripsinogênio e 3 novos íntrons para os genes das elastases. Já os íntrons para a trombina fator IX e fator do complemento B são completamente diferentes das outras serino proteases evidenciando que se tratam de famílias com diferentes origens gênicas.

A organização do cDNA de todas as sequências obtidas pode ser feita tomando como referência a batroxobin. O gene de batroxobin tem uma extensão de ~8kbp e contém 5 éxons intervalados por 4 íntrons. A extremidade 5' do gene contém fração da região 5'UTR, a sequência consenso para o TATA-box e o sítio do início da transcrição (+1 ATG). O primeiro éxon compreende grande parte da região da sequência codificante do peptídeo sinal

e corresponde a 240 pares de bases (pb). O éxon 2 tem um comprimento de 151 pb e codifica para o fragmento final do peptídeo sinal, para o pró-peptídeo e para a região N-terminal da toxina madura. O éxon 3 contém 260 pb e codifica parte da toxina madura. O éxon 4 também codifica um fragmento da toxina madura e tem 134 pb. O éxon 5 com 728 pb compreende o C-terminal da toxina madura o *stop códon* (TGA) a região 3'UTR com 360 pb e o sinal de poliadenilação. O cDNA de batroxobin se ajusta adequadamente aos éxons presentes na sequência genômica do gene de Batroxobin. Estes cinco éxons são interrompidos por quatro íntrons, sendo que o íntron 1 tem 2,5 kpb, o íntron 2 tem 1,7 kpb, o íntron 3 tem 1,8 kpb e o íntron 4 tem 0,35 kpb. As regiões que dividem o éxon/íntron concordam com a regra GT/AG. Como a toxina madura é codificada separadamente pelos éxons de 2 a 5, os resíduos do sítio catalítico da batroxobin também estão distribuídos em éxons separados. His-41 (éxon 2), Asp-86 (éxon 3) e Ser-178 (éxon 5) (ITOH *et al*, 1988).

O tipo e a localização dos íntrons 2, 3 e 4 do gene da batroxobin são muito semelhantes aos encontrados nos genes de tripsina e de calicreína, sendo o íntron 2 do tipo II, o íntron 3 do tipo I e o íntron 4 do tipo O. Estes resultados indicam que o gene da batroxobin é um membro da família gênica das tripsinas/calicreínas. Como muitas das proteases dos venenos das serpentes apresentam seletividade por substrato e ações proteolíticas similares à ação da trombina sobre o fibrinogênio essas enzimas de serpente são comumente chamadas de trombina-símile. Mas a organização genômica da batroxobin deixa claro que o seu gene não pertence à família gênica da trombina e sim à família das tripsinas/calicreína. Como as glândulas de veneno das serpentes podem ter origem nas glândulas submaxilares que são ricas em calicreínas é hipoteticamente possível que as serinoproteases do veneno de serpentes derivem de genes da família das calicreínas glandulares (ITOH *et al*, 1987, ITOH *et al*, 1988).

Ao analisar as seqüências de cDNA de sete clones giroxina símile de *Crotalus durissus terrificus* (B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:5 e PST7:7e8) com o gene de batroxobin foi possível identificar a mesma organização de exóns e estimar qual região do cDNA é codificada pelo éxon específico (figura 27 e tabela 21).

O clone PST7:5 não apresenta o éxon 4 sendo que a hipótese mais provável é que ocorreu um erro de edição na remoção dos íntrons 3 e 4 (*splicing* alternativo) eliminando o éxon 4. A edição alternativa através de diferentes combinações de remoção dos íntrons é um mecanismo usado para ativar ou reprimir a expressão de um gene. É importante ressaltar que no éxon 4 não está presente os resíduos do sítio catalítico podendo gerar uma proteína funcional, mas o fato do éxon 5 quando diretamente ligado em sequência ao éxon 3 faz surgir um stop códon que quando incorporado no mRNA a transcrição da proteína será interrompida prematuramente, gerando um polipeptídeo truncado. Em alguns casos dois éxons que carregam diferentes moléculas de RNA podem sofrer a remoção dos íntrons ao mesmo tempo, gerando uma única molécula de RNA. Esse processo é conhecido como *trans-splicing*, sendo um processo que ocorre em quase todos os mRNAs de tripanossomas (WATSON *et al*, 2004). De acordo com DOSSIN & SCHENKMAN, 2005 a RNA polimerase II de tripanossomas, transcreve um longo mRNA policistrônico que não apresenta 5'CAP, mas é processado através de *trans-splicing* e poliadenilação para formar o mRNA maduro.

Com a finalidade de se predizer uma eventual função para os clones obtidos, a sequência correspondente à toxina madura destes clones foram organizados em um dendrograma funcional (figura 33) alinhados com diversas toxina cuja atividade hemotóxica é bem descrita. As seqüências puderam ser divididos em 4 grupos, ficando claro que todas as toxinas atuam na cascata de coagulação, porém algumas apresentam funções extras, com características intermediárias entre um grupo e outro.

No grupo I estão os ativadores de fator V, VLFVA-ativador de Fator V de *Vipera lebetina* (SIIGUR *et al*, 1999) e RVV-V α de *Vipera Russeli* ; enzima que ativa o fator V na mesma extremidade que a α -trombina (TOKUNAGA *et al*, 1988).

No grupo II estão os ativadores de plasminogênio. Duas enzimas (TSV-PA e Haly-PA) confirmaram apresentar a função de ativador de plasminogênio e facilitar a solubilização dos monômeros de fibrina. Os membros ativadores de cininogênio e ativador de plasminogênio são pouco ou totalmente não glicosilados (WANG *et al*, 2001).

No grupo III estão as fibrinogenases sendo que algumas toxinas têm sido caracterizadas por também serem capazes de clivar o cininogênio,

produzindo bradicina (cinina) responsável por induzir hipotensão. Segundo CASTRO *et al*, 2004, KN-BJ produz bradicinina e curiosamente, elegaxobin de *Trimeresurus elegans* é a única SVSP citada até o momento capaz de liberar Lys-bradicinina do plasma. Além disso a elegaxobin atua como heterólogo da C3 convertase que cliva independentemente C3 humano e inicia a cascata do sistema complemento.

Essas enzimas em geral não clivam o fibrinogênio, mas algumas clivam a cadeia B β ou ambas as cadeias A α e B β do fibrinogênio: halystase e calobin clivam ambas as cadeias A α e B β do fibrinogênio (WANG *et al*, 2001), palabin deve apresentar uma função similar por estar no mesmo ramo que a halystase e calobin sendo aqui denominado o grupo IIIb. As enzimas que se encontram no ramo IIIa como catroxase I, elegaxobin, mucrofibrase I são capazes de clivar a cadeia A α do fibrinogênio.

As trombinas símiles mais conhecidas que convertem o fibrinogênio em fibrina como: crotalase, ancrod (comercialmente vendida como Arvin® da *Calloselasma rhodostoma*), acutobin, batroxobin (Defibrase® da *Bothrops moojeni*), bothrombin, se encontram no grupo IVa- enzimas que atuam sobre o fibrinogênio, sendo caracterizadas por liberarem o fibrinopeptídeo A α e serem altamente glicosiladas (WANG *et al*, 2001).

A giroxina isolada do veneno de cascavel *Crotalus durissus terrificus* (CAMILLO *et al*, 2001), o análogo de giroxina isolada do veneno de *Lachesis muta muta* (DA SILVA *et al*, 1989; MAGALHÃES *et al*, 1993) e a crotalase (MASSOVA *et al*, 1997), são descritos por liberarem preferencialmente o fibrinopeptídeo A α . É importante ressaltar que as toxinas pertencentes ao grupo IVa podem apresentar outras funções ainda não bem descritas. A sequência da giroxina símile B2.1 e dos clones análogos (PST7:3, GPS:2e5, PST7:4,GPS:3e4) isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* se encontram todas nesse grupo.

No grupo IVb se encontram as toxinas CPI enzyme-2 e a ativadora de proteína C (ACC-C) que além de atuarem sobre o fibrinogênio apresentam algumas outras características: A CPI enzyme-2 aumenta a permeabilidade vascular e a ACC-C é uma toxina de serpente capaz de ativar a proteína C da coagulação, sendo que a sequência PST7:7e8 se encontra nesse grupo se mostrando mais divergente no alinhamento em relação as demais seqüências isoladas na biblioteca de cDNA. É interessante notar que VITAL-BRAZIL (1980)

relata o isolamento da delta toxina, uma toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, capaz de alterar a permeabilidade capilar e causar grande hemoconcentração.

Segundo SHIMOKAWA & TAKAHASHI, 1997 a CPI enzyme-2 cliva a cadeia B β do fibrinogênio, liberando peptídeos que aumentam a permeabilidade capilar. O ativador de proteína C (ACC-C) de *A. c. contortrix* é comercializada como Protac[®] (STOCKER *et al*, 1987). A proteína C é uma glicoproteína vitamina K dependente que circula no sangue como um zimógeno de serino protease. É ativada pela trombina na superfície endotelial na presença de trombomodulina. Uma vez que a proteína C é ativada, degrada o fator Va e apresenta uma ação anticoagulante (SERRANO & MAROUN, 2005). Algumas serino proteases trombina-símbles são capazes de ativar a proteína C como a toxina ativadora de proteína C (ACC-C) sendo descrita por STOCKER *et al* 1987, que demonstraram que a ativação da proteína C pela toxina ACC-C de *A. c. contortrix* degrada os fatores Va e VIIIa apresentando uma ação anticoagulante.

O dendrograma funcional mostra que os clones B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4 e PST7:5 são homólogos a enzimas coagulantes que clivam o fibrinogênio liberando o fibrinopeptídeo A α e o clone PST7:7e8 é mais homólogo a CPI enzyme-2 e a toxina ativadora de proteína C.

As diferenças nas atividades biológicas dessas serino proteases do veneno de serpentes estão provavelmente relacionadas a diferenças na composição dos aminoácidos compondo sítios específicos, ainda que a estrutura terciária geral seja similar.

O modelo tridimensional da giroxina foi comparado com os modelos cristalográficos de TSV-PA (1bqy), DAV-PA (1op2) e tripsina bovina (2ptc) (figura 35).

As diferenças encontradas na região do C-terminal das SVSP em relação à tripsina é uma importante característica, pois a região do C-terminal nos domínios de protease apresenta uma importante função nessa classe de enzimas que desenvolveram uma grande variedade de substratos específicos e funções biológicas importantes. Essa região é freqüentemente codificada por um único éxon que apresenta a maioria dos resíduos que formam a superfície de contato no sítio ativo para os resíduos P1- P3 do substrato, assim como

domínios responsáveis pela modulação da atividade catalítica (KREM *et al*, 1999).

Na figura 35 é possível observar que o sítio potencial de glicosilação na asparagina 85 da giroxina codificada pelo clone B2.1 se encontra muito distante do sítio ativo, ao contrário do que acontece nas glicosilações das serino proteases AaV-SPI e AaV-SPII de *Agkistrodon acutus* que se encontra muito próximo, resultando em alterações na atividade amidolítica (ZHU *et al*, 2005).

A figura 36 mostra que a tríade catalítica da giroxina se sobrepõe muito bem com relação a da tripsina (2ptc), ou seja, a giroxina B2.1 deve ter atividade proteolítica similar a tripsina.

Na figura 37, é possível comparar o modelo tridimensional da giroxina e crotalase com o modelo cristalográfico da α -trombina humana (1c50). Segundo MASSOVA *et al*, 1996, o exossítio de ligação ao fibrinogênio na trombina é formado por duas alças (Phe-34 a Leu-41 e Lys-70 a Glu-80). A segunda alça é composta por resíduos básicos na crotalase (Arg-58, Lys 64, Arg 67 e Arg 68) e na α -trombina (Arg 67, Lys 70, Arg 73, Arg 75, Arg 77 e Lys 81) representado de roxo. No entanto na crotalase é encontrada uma outra alça na qual se encontra um exossítio alternativo de ligação ao fibrinogênio, ausente na trombina, que é formada pela adição de cinco aminoácidos básicos (Arg 46, Lys 71, Lys 73, Arg 93 e Lys 96) representado em rosa. As posições 71, 73 e 96 encontradas na crotalase são bastante conservadas em algumas serino proteases, sendo os resíduos todos básicos. Podemos observar a presença dos mesmos aminoácidos na estrutura tridimensional da giroxina, sugerindo a existência deste exossítio alternativo. Funcionalmente este sítio alternativo poderia estar relacionado com a neurotoxicidade da giroxina, como o rolamento em barril. A numeração dos aminoácidos corresponde à posição na seqüência primária da toxina. A cadeia pesada da α -trombina corresponde aos aminoácidos 16 a 247.

Com relação às serino proteases do veneno de serpente, há um interesse no seu uso para tratamento clínico de infarto do miocárdio, trombozes em veias profundas, pancadas ou embolia pulmonar (MARKLAND, 1988). Existem 4 enzimas semelhantes à trombina comercialmente disponíveis já descritas anteriormente: ancrod (Arvin® da *Calloselasma rhodostoma*); batroxobin (Defibrase® da *Bothrops moojeni*);

crotalase (de *Crotalus atrox*) e uma enzima trombina-símile ativador de proteína C (Protac[®] da *Agkistrodon contortrix*). Segundo THOMAZINI-SANTOS *et al.*, 2001, há uma nova aplicação em fase experimental referente a utilização da gioxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* como "cola de fibrina".

No entanto o uso de enzimas trombinas-símbles tem sido limitado por: disponibilidade de veneno de serpentes, reações imunológicas em pacientes, contaminações em preparações comerciais de proteínas oriundas do veneno que não estão de acordo com as boas práticas de fabricação. Isso justifica a produção de uma toxina recombinante em célula de mamífero, uma vez que se trabalha em condições estéreis e o produto formado será livre de contaminações por vírus, bactérias e fungos.

A produção de enzimas trombina-símile recombinantes é uma maneira de contornar esses problemas (KINI, 2006; YANG *et al.*, 2002; WARKENTIN, 1998, STOCKER *et al.*, 1987).

As variadas aplicações destas enzimas justificam as tentativas relativas a sistemas de expressão para se obter SVSPs recombinantes. Até o momento, foram usados vetores de expressão em bactéria *E.coli* (MAEDA *et al.* 1991; HAHN *et al.* 1996; PAN *et al.*, 1999; HUNG & CHIOU, 2000; GUO *et al.*, 2001; ZHA *et al.* 2003; YANG *et al.*, 2003, YUAN *et al.*, 2004); baculovírus (PARK *et al.*, 1998). As proteínas recombinantes foram obtidas com rendimento aquém dos desejáveis e/ou não apresentaram as atividades biológicas ou apresentaram baixa atividade quando comparadas com as toxinas nativas.

As proteínas recombinantes presentes em corpúsculos de inclusão, geralmente após sua solubilização e renaturação são obtidas com pouca atividade biológica e de difícil renaturação. Assim, sistemas de expressão com células de mamíferos poderiam ser mais adequados, pois estão presentes as vias de glicosilação e de modificações pós-traducionais mais similares às que ocorrem no epitélio glandular da serpente quando comparado com sistemas de expressão em células de leveduras.

O clone B2.1 foi utilizado para subclonagens em vetores de expressão para célula de mamífero (pED), capaz de dirigir a secreção da toxina para o meio de cultura por intermédio de um peptídeo sinal de IgKappa murina

(obtido do vetor pSecTag2 Hygro A) (figuras 38, 39, 44 e 47). Para os passos de subclonagem veja a figura 12.

Em um estudo prévio de citotoxicidade em células CHO-K1 *dhfr*⁺ com giroxina purificada obtivemos a CT₅₀ de 200 µg/mL, o que permite supor que não teríamos problemas de toxicidade da enzima recombinante sobre o sistema de expressão (a concentração esperada é ao redor de 100µg/ml) (HASHIZUME & CAMILLO, 2005).

Após a seleção dos clones de células CHO-DXB11 transfectadas com vetor pED-giroxina, cada cultura celular foi submetida a uma amplificação com aumento gradual da concentração do MTX, selecionando os clones por 6 meses.

Segundo KAUFFMAN, 1990, a expressão transiente nas células COS-1 resulta em 1µg de proteína/10⁶ células. O rendimento da proteína secretada no meio de cultura geralmente é de 0,3-1µg/mL sendo rápida a caracterização dos clones (48-72 horas). Na transfecção realizada nas células CHO-DXB11 *dhfr*⁻ a expressão é estável, podendo detectar altos níveis de expressão da proteína. É possível detectar a proteína recombinante após a amplificação por MTX na concentração de 20nM, no entanto os clones selecionados por MTX, não foi possível detectar a expressão em até 1280nM. No ensaio de RT-PCR de acordo com os nossos resultados verificamos que o mRNA giroxina-*dhfr* não foi produzido na forma dicistrônica estando separado em 2 mensageiros: para a giroxina e para o *dhfr*. Portanto ao selecionarmos os clones fortemente para *dhfr* podemos favorecer as células que perderam a capacidade de formar o mRNA giroxina ou esse mensageiro pode ser degradado rapidamente.

Segundo YUK *et al*, 2002 durante o processo de expressão estável de uma proteína problemas podem ocorrer pois a expressão estável de proteínas recombinantes em célula de mamífero é muitas vezes um processo demorado devido ao fato de somente uma pequena porcentagem de células transfectadas expressarem uma quantidade suficiente de proteína. Por isso o número de clones a serem selecionados e amplificados é necessariamente muito grande. O próprio processo de amplificação pode causar a morte do clone.

Com o intuito de verificar se o plasmídeo pED-Giro se encontra integrado no genoma da célula, podemos observar na figura 49 que os *primers* Igk SE/DHFR AS (A) amplificaram a seqüência IgK-DHFR presente no extrato

do clone 6 (CHO-DXB11 transfectada com o plasmídeo pED-Giro) mostrando que o plasmídeo estava integrado no genoma da célula. No entanto, os *primers* IgK SE/GYR AS1 (B) além de amplificar a seqüência IgK-Giro, também está amplificando alguma seqüência similar no genoma da célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻, esta seqüência homóloga pode prejudicar a expressão do produto recombinante nessa célula hospedeira.

Com o intuito de verificar a presença de um único mRNA giroxina-*dhfr*, foi realizado um ensaio de RT-PCR de acordo com o esquema mostrado na figura 14. Ao utilizar os *primers* GYR SE/DHFR AS (figura 51-A) não verificamos a presença de bandas, mostrando que não há a formação de um único mRNA. O par de *primers* GYR SE/AS 1 (figura 51-C) além de amplificar o mRNA giroxina está amplificando alguma seqüência similar presente na célula controle negativo CHO-K1 *dhfr*⁺. O mRNA *dhfr* foi amplificado com os *primers* DHFR SE/AS (figura 51-B), sendo a banda mais intensa do que o mRNA giroxina.

O esquema do segundo ensaio de RT-PCR é mostrado na figura 14. Ao utilizar os *primers* IgK SE/DHFR AS (figura 53-D) confirmou o ensaio anterior, não há a formação de um único mRNA giroxina-*dhfr*, ao utilizar o par de *primers* IgK-SE/ GYR AS 1 (figura 53-F), observamos a presença do mRNA giroxina. O mRNA *dhfr* foi amplificado com o par de *primers* DHFR SE/AS (figura 53-E) apresentando uma intensidade maior do que a giroxina. O fato de ter inserido a região 3'UTR, sinal de poliadenilação e cauda de poli A do cDNA da giroxina do clone B2.1 pode ter contribuído para que a região 3'UTR do mRNA fosse modificada ocorrendo a sua clivagem e logo em seguida a adição de uma cauda de poli A, pois é sabido que a *Poliadenilation binding protein* cliva a região 3'UTR logo após encontrar um sinal de poliadenilação antes de acrescentar a cauda de adeninas (LEWIN, 1994).

O mRNA IgK-giroxina por estar com uma intensidade bem menor que o mRNA *dhfr*, parece que se encontra instável. Isso sugere que o mRNA da giroxina, seja rapidamente degradado em comparação ao mRNA de *dhfr*, pois como o dicístron giroxina-*dhfr* se encontra clivado e a célula precisa aumentar a produção do *dhfr* para sobreviver, há a necessidade de altas quantidade do mRNA *dhfr*. Segundo KAUFFMAN, 1990, é recomendado remover as

seqüências 3' não traduzidas do cDNA, pois essas seqüências podem levar a uma instabilidade do mRNA.

Com a finalidade de validar a construção do vetor pED-Giro B2.1 a despeito do mRNA que deveria de ser dicistrônico se encontra separado em dois mensageiros (giroxina e *dhfr*) e verificar se o mRNA giroxina é traduzido, obtendo-se a expressão da giroxina B2.1 em curto prazo, foi realizada a transfecção transiente do plasmídeo pED-Giro e pSecTag Igk-Giro em outra linhagem celular COS-7.

O clone pED-Giro foi expresso e secretado no meio de cultura com sucesso nas células COS-7 sendo a giroxina recombinante detectada pelo soro anticrotálico do Instituto Butantan, apresentando as mesmas duas bandas e estando na mesma altura de 33kDa que a giroxina purificada do veneno, indicando que a giroxina recombinante deve estar glicosilada da mesma forma (figura 55). Assim, ainda que se formem 2 mensageiros giroxina e *dhfr*, o mRNA de giroxina é estável o suficiente para acumular proteína recombinante em um sistema transiente. Podemos perceber que apesar do vetor pSecTag2-HygroA ser um vetor comercial, a expressão do clone pSecTag Igk-Giro foi muito menor com relação a expressão obtida com o clone pED-Giro que apresenta o peptídeo sinal IgK do vetor pSecTag2Hygro A, mas um promotor mais forte, sendo que o vetor pED é descrito por KAUFFMAN, 2000 por ser um vetor eficiente para transfecção transiente e também pode ser utilizada para transfecção permanente. Esse vetor pED tem sido descrito por SOARES *et al*, 2000; PERONI *et al*, 2002; CHURA-CHAMBI *et al*, 2004 por obterem bons níveis de expressão de prolactina, hormônio tireotrófico e endostatina em uma transfecção permanente em célula CHO-DXB11.

Na figura 56-B podemos observar que a amostra com precipitado do lisado da célula sonicada COS-7 transfectada com pED-Giro (canaleta 7) apresentou uma banda muito mais intensa que a amostra sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 transfectada com o plasmídeo pED-Giro (canaleta 5) pois está 10x mais concentrada que a fração solúvel. Entretanto, a precipitação da proteína recombinante pode ser explicada pelo fato de que em muitos casos, a translocação da proteína é limitada. Estudos com expressão de diversas proteínas mostraram que as proteínas que transitam no compartimento de secreção apresentam uma taxa limitada de secreção no

transporte do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi (KAUFMAN, 1992).

É conhecido que a expressão de uma proteína heteróloga de secreção, a partir de um gene transfectado introduzido em uma célula, pode ser limitada devido ao transporte ineficiente do retículo endoplasmático para o Complexo de Golgi. Uma grande variedade de etapas pós-traducionais, que são necessárias para a maturação apropriada e a atividade biológica da proteína, podem ficar saturadas se a expressão da proteína específica é aumentada (KAUFMAN, 1992).

Além disso a giroxina B2.1 recombinante foi eficientemente expressa e secretada para o meio de cultura, sendo purificada do meio de cultura 24h após a transfecção com o plasmídeo pED-Giro, apresentando as mesmas duas bandas e na mesma altura de 33kDa que a giroxina purificada do veneno conforme mostra a figura 56-C. A giroxina recombinante purificada do meio de cultura apresentou uma elevada atividade esterásica de acordo com a figura 57.

A obtenção da giroxina recombinante foi obtida com sucesso pois mostramos que é possível expressar uma serino protease de serpente em um sistema de expressão transiente em célula de mamífero no meio de cultura com atividade biológica. Este é um sistema de expressão muito interessante para se caracterizar outras toxinas e proteínas com funções ainda desconhecidas facilitando o processo de purificação com um elevado grau de pureza pela secreção direta no meio de cultura.

6-CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível:

- Determinar a sequência de nucleotídeos da giroxina madura do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* que ainda não havia sido descrita e depositar no banco de dados GenBank (AY954040).
- Comparar a similaridade da sequência primária da giroxina com outras serino proteases de venenos de serpentes (SVSPs), identificando a tríade catalítica HDS típica de serino proteases, as posições das cisteínas e os potenciais sítios de glicosilação.
- Determinar as sequências de nucleotídeos de 6 novas serino proteases comparando-as com sequências SVSPs presentes em banco de dados.
- Identificar as regiões de 5 *éxons* nos clones em comparação com o gene de batroxobin. No entanto verificamos que no clone PST7:5 o éxon 4 está ausente possivelmente decorrente de um erro de edição na remoção dos *introns*.
- Realizar um dendrograma funcional com a giroxina e as variantes identificadas, comparando-as com outras serino proteases de venenos de serpentes.
- Realizar um modelo tridimensional de homologia da giroxina, identificando o sítio catalítico, a conformação do C-terminal, o sítio potencial de glicosilação e a comparação com o modelo tridimensional da crotalase, com os cristalográficos da TSV-PA (1bqy), AaV-SP-I (1op0), DAV-PA (1op2), α -trombina humana (2c50) e da tripsina bovina (2ptc).
- Construir um vetor dicistrônico pED-Giro e transfectar em células CHO-DXB11 *dhfr*⁻. No entanto essa construção foi inútil, pois observamos a presença do mRNA giroxina separado do mRNA *dhfr*.
- Construir um vetor de expressão eucariótica pED-Giro com o peptídeo sinal Igk que possibilitou expressar a giroxina recombinante em célula de mamífero COS-7 e obter a sua secreção para o meio de cultura.
- Purificar a giroxina recombinante do meio de cultura e demonstrar a sua atividade esterásica.

Figura 1: Filogenia sugerida para a subfamília *Crotalinae* (BRATTSTROM, 1964).

Foto: Camila Yonamine

Figura 2: Cascavel apresentando o chocalho (guizo) e a distribuição geográfica *Crotalus durissus terrificus* mostrada em vermelho.

Figura 3: Sítio ativo de uma serino protease.
Compartilhamento de pontes de hidrogênio mostradas em verde entre a tríade catalítica de uma protease da família S1.

Figura 4: Estrutura tridimensional da tripsina.
Em amarelo são mostradas as folhas β -pregueadas que compõem os dois domínios em barril- β . Em vermelho as α -hélices, em azul as pontes dissulfetos e em verde os aminoácidos da tríade catalítica.

Figura 5: Algumas serino proteases do veneno de serpentes agindo na cascata de coagulação. (Baseado em MARKLAND, 1998).

FGDP: *Fibrinogen degradation products*; FNDP: *Fibrin degradation products*; FPA: *Fibrinopeptide A*; FPB: *Fibrinopeptide B*.

KN-BJ, *Bothrops jararaca* (O13069- Serrano et al,1998); **Dav-KN**, *Agkistrodon acutus* (Q9I8X0- Wang et al, 2001); **Elegaxobin-1**, *Trimeresurus elegans* (P84788- Oyama et al, 2002); **ACC-C** Protein C activator; *Agkistrodon contortrix contortrix* (P09872- McMullen et al, 1989); **RVV-Vα** *Vipera russelli proteinase*, *Daboia russelli siamensis* (P18964 - Tokunaga et al,1988); **FVA** *Factor V-activating enzyme*, *Vipera lebetina* (Q9PT41- Siigur et al, 1999), **Halystase**, *Agkistrodon halys blomhoffii* (P81176- Matsui et al. 1998); **Calobin**, *Agkistrodon caliginosus* (Q91053 - Hahn et al. 1996), **Gyroxin-like B2.1**, *Crotalus durissus terrificus* (Q58G94); **Gyroxin analog**, *Lachesis muta muta* (P33589 - Magalhães et al,1993); **Crotalase**, *Crotalus adamanteus* (Henschen-Edman et al,1999); **Ancrod**, *Agkistrodon rhodostoma* (P26324 - Burkhart et al,1992); **Batroxobin**, *Bothrops atrox* (P04971- Itoh et al, 1987); **Bilineobin**, *Agkistrodon bilineatus* (Q9PSN3- Nikai et al, 1995); **TSV-PA**, *Trimeresurus stejnegeri* (Q91516 - Zhang et al, 1995); **LV-PA**, *Lachesis muta muta* (P84036-Sanchez et al, 2000); **PA-BJ**, *Bothrops jararaca* (P81824-Serrano et al, 1995).

Figura 6: Sequências do N-terminal da girosina de *C.d.terrificus* (DA SILVA et al, 1989).

Figura 7: Pontos de clivagem da molécula do fibrinogênio.

A figura mostra as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ clivada pela trombina e as cadeias $A\alpha$ e/ou $B\beta$ clivadas pelas serino proteases do veneno de serpentes (SVSPs). CASTRO *et al*, 2004 modificado.

N-terminal de Giroxina de *C.d.terrificus* V I G G D E C N
(Simpson) (Da Silva et al, 1989).

GT AT GG GG GA GA TG AA

Calobin	1	GTCATTGGAGGTGATGAATGTAAC
Salmobin	2	GTCATTGGAGGTGATGAATGTAAC
Trimumbin	3	GTCATTGGAGGTGATGAATGTAAC
Mucrofibrase-2	4	GTCATTGGAGGTGATGAATGTAAC
Ancrod	5	GTCATTGGAGGTGATGAATGTAAC
Stejnobin	6	GTCATTGGAGGTGATGAATGTAAT
Catroxase I	7	ATCATCGGAGGTGATGAATGTAAC
 Primer GYR SE 5' -GTCATTGGAGGTGATGAATGTAAC-3'		

Figura 8: Definição do *primer* GYR-SE.

1- Calobin de *Agkistrodon ussuriensis* (AUU32937); 2- Salmobin de *Gloydius halys* (Af056033); 3-Trimubin de *Trimeresurus mucrosquamatus* (TMU31417); 4- Mucrofibrase-2 de *Trimeresurus mucrosquamatus* (X83222); 5-Ancrod de *Calloselasma rhodostoma* (L07308); 6- Stejnobin de *Trimeresurus stejnegeri* (AF545576); 7-Catroxase I de *Crotalus atrox* (AF227153.1).

Figura 9: Esquema do PCR para obter o clone B2.1. Na reação foi utilizada a biblioteca de cDNA de *Crotalus durissus terrificus* com os primers GYR SE e T7.

Figura 10: Esquema do PCR para obter os clones GPSs. Na reação foi utilizada a biblioteca de cDNA de *Crotalus durissus terrificus* com os primers T3 e GYR AS1.

Figura 11: Esquema do PCR para obter os clones PST7s. Na reação foi utilizada a biblioteca de cDNA de *Crotalus durissus terrificus* com os primers P.S e T7.

Figura 12: Esquema da construção do vetor de expressão da giroxina em células CHO-DXB11 *dhfr* e COS-7.

O **pCR 2.1 TOPO** contém: fragmento do LacZa (Plac lacZa); a origem f1 (f1 ori); resistência para kanamicina (Kan^r); resistência para ampicilina (Amp^r) e a origem do pUC (pUC ori).
O **pSecTag 2 Hygro A** contém: promotor do citomegalovírus (PCMV); peptídeo sinal da cadeia Ig Kappa murina (IgK); sítio de poliadenilação BGH; origem f1 (f1 ori); promotor do vírus SV40 (PSV40); resistência para higromicina (Hygro^r); sítio de poliadenilação do SV40 (SV40); origem do pUC (pUC) e resistência para ampicilina (Amp^r). O **pED** contém: origem de replicação do vírus SV40 e o elemento ativador da transcrição (SV40); promotor derivado do adenovírus (AdMLP); sequência "leader" derivada do adenovírus (AdTLP); tronco híbrido composto pela sequência 5' leader não traduzida derivada do adenovírus e uma sequência 3' do gene da imunoglobulina (IVS); região 5' "leader" não traduzida do gene da encelamomiocardite (ECM-L); região que codifica para o gene da enzima diidrofolato redutase murina (*dhfr*); região de poliadenilação do SV40 (SV40pa).

Figura 13: Detecção do vetor pED-Giro integrado ao genoma da célula CHO-DXB11
 Região de complementaridade dos *primers* IgK SE, GYR AS1, DHFR SE, DHFR AS presentes no vetor pED-Giro.

Amostras	Primer (síntese da primeira fita de cDNA)	Primer (síntese da segunda fita de cDNA)	Ensaio de RT-PCR
4,8 e CHO-K1 <i>dhfr</i> ⁺	DHFR AS	GYR SE/DHFR AS e DHFR SE/ AS	mRNA da fusão giro-DHFR (A) mRNA de DHFR (B)
4,8 e CHO-K1 <i>dhfr</i> ⁺	GYR AS	GYR SE/ AS	mRNA de Giro (C)
4,6,4+20nM, 6+320nM CHO-DXB11 <i>dhfr</i> ⁻	DHFR AS	IgK SE/DHFR AS e DHFR SE/ AS	mRNA da Fusão Giro DHFR (D) mRNA de DHFR (E)
4,6,4+20nM, 6+320nM CHO-DXB11 <i>dhfr</i> ⁻	GYR AS	IgK SE/ GYR AS	mRNA giro (F)

Figura 14: Detecção do mRNA expresso pela célula CHO-DXB11x pED-Giro. Região de complementaridade dos *primers* IgK SE, GYR SE, GYR AS1, DHFR SE, DHFR AS presentes no vetor pED-Giro utilizados nas reações A, B, C, D, E e F.

Figura 15: Amplificação da biblioteca de cDNA da glândula de veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* por PCR.

Análise em gel de agarose 1,5% correspondente a amplificação da biblioteca de cDNA com um *primer sense* específico para a giroxina madura GYR SE e o *primer* T7.

Figura 16: Seleção do clone B2.1 por PCR.

Análise em gel de agarose 1,5% correspondente a amplificação dos clones recombinantes (1 a 9) utilizando-se os *primers* M13 *sense* e *antisense*. Na primeira canaleta indicado B2, B1 e B0 corresponde a 3 bandas do produto de amplificação da biblioteca de cDNA com os *primers* GYR SE e T7.

Figura 17: Comparação dos 30 primeiros aminoácidos do clone de gioxina B2.1 com as seqüências N-terminais da gioxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

1-B2.1 Gioxina; 2- Gioxina (Simpson) (DA SILVA *et al*, 1989); 3-Gioxina (Kaiser) (DA SILVA *et al*, 1989).

Figura 18: Organização do cDNA do clone B2.1 (895pb).

possíveis éxons são: éxon 2 (1-137pb), éxon 3 (138-379pb), éxon 4 (380-548pb), éxon 5 (549-881pb). A região codificante para a toxina madura está representada pela cor rosa claro e a região codificante para o 3'UTR está representada pela cor roxa. A região destacada em amarela na posição 857pb representa o sítio de poliadenilação. O códon de parada (*Stop códon*-TGA) se encontra em 631pb. A tríade catalítica (HDS) se encontra em diamante vermelho e o sítio potencial de N- glicosilação se encontra em diamante

Região 5'UTR Região codificante para o peptídeo sinal Região codificante para o pró-peptídeo
Região codificante para toxina madura Região 3'UTR

Figura 19: Organização do cDNA do clone GPS2e5 (998pb).

possíveis éxons são: éxon 1 (31-264pb), éxon 2 (265-421pb), éxon 3 (422-663pb), éxon 4 (664-832pb), éxon 5 (833-998pb). A região 5'UTR : é representada pela cor amarela, a região codificante para o peptídeo sinal está representada pela cor escuro, a região codificante para o pró-peptídeo está representada pela cor rosa, a região codificante para a toxina madura está representada pela cor rosa claro e a região 3'UTR está representada pela cor roxa. A região do Kozak está representado em negrito pela região -3 (G) e o início (start) +1 (A). O códon de início (ATG) está representado em negrito. A tríade catalítica (HDS) se encontra em diamante vermelho e o sítio potencial de N-glicosilação se encontra em diamante

Figura 20: Organização do cDNA do clone GPS3e4 (973pb).

possíveis éxons são: éxon 1 (1-239pb), éxon 2 (240-396pb), éxon 3 (397-660pb), éxon 4 (661-807pb), éxon 5 (808-976pb). A região 5'UTR : representada pela cor amarela, a região codificante para o peptídeo sinal está representada pela cor rosa escuro, a região codificante para o pró-peptídeo está representada pela cor rosa, a região codificante para a toxina madura está representada pela cor rosa claro e a região 3'UTR está representada pela cor roxa. A região do Kozak está representado em negrito pela região -3 (G) e o início (start) +1 (A). O códon de início (ATG) está representado em negrito. A tríade catalítica (HDS) se encontra em diamante vermelho e o sítio potencial de N-glicosilação se encontra em diamante

Figura 21: Região de hibridação do *primer* para o peptídeo sinal.

1) B2.1 de *Crotalus durissus terrificus* (AY954040); 2) GPS:2e5 de *Crotalus durissus terrificus*; 3) GPS:3e4 de *Crotalus durissus terrificus*; 4) Catroxase I de *Crotalus atrox* (AF227153.1); 5) Serino protease 1 de *Crotalus adamanteus* (AJ251525.1); 6) Protrimubin de *Trimeresurus mucrosquamatus* (U31417); 7) Serino protease de *Trimeresurus gramineu* (D67083.1); 8) Serino protease de *Bothrops jararacussu* (AY251282.1); 9) HS 120 de *Bothrops jararaca* (AB178323.1); 10) Precursor de Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* (L07308.1). A da região de hibridação do *primer* corresponde aos nucleotídeos 1 a 18 do início do peptídeo sinal.

Figura 22: Obtenção dos clones pCR2.1 TOPO-PST7s. Eletroforeses em gel de agarose 1,5% do produto de amplificação da biblioteca de cDNA com os *primers* Peptídeo Sinal PS *sense* e T7.

Exon 1 (1-52 pb)	1 M V L I R V L A N L L I L Q L S Y A Q K S S E L V I G G D E C N I N E 1 ATGGTGCTGATCAGAGTGCCTAGCAAACTTCTGATACTACAGCTTTCTTACGCACAAAAGTCTTCTGAGCTGGTCATTGGAGGAGATGAATGTAACATAAATGAA <i>NheI, 19</i>
Exon 2 (53-209 pb)	36 H N F L V A L Y E Y W S Q S F L C G G T L I N G E W V L T A A C D R 106 CATAATTTCTTGTAGCCTTGTATGAATATTGGTCTCAGAGTTTTCTCTGCGGTGGGACTTTGATCAACGGGGAATGGGTGCTCACTGCTGCACACTGCGACAGG 71 K H I L I Y V G V H D R S V Q F D K E Q R R F P K E K Y F F N C R N 211 AAACATATCTTAATATACGTTGGTGTGCATGACCGAAGTGTGCAATTTGACAAGGAGCAGAGAAGATTCCCAAAGAGAAAGTACTTTTTTAAGTGTAGAAATAAC <i>ScaI, 293</i>
Exon 3 (210-451 pb)	106 F T K W D K I M L I R L N K P V S Y S E H I A P L S L P S S P P I V 316 TTTACCAAATGGGACAAGGACATCATGTTGATCAGGCTGAACAACTGTTAGTTACAGTGAACACATCGCACCTCTCAGCTTGCCTTCCAGCCCTCCCATTGTG 141 G S V C R V M G W G T I K S P Q E T L P D V P H C A N I N L L D Y E V 421 GGATCAGTTTGCCGTGTTATGGGATGGGGTACAATCAAATCTCCTCAAGAGACTTTGCCTGATGTCCCTCATTGTGCTAACATTAACCTACTTGATTATGAAGTG
Exon 4 (452-620 pb)	176 C R T A H P Q F R L P A T S R I L C A G V L E G G I D T C H R D G G 526 TGTGCAACAGCTCACCACAATTTGCGTTGCCAGCGACAAGCAGAATATTGTGTGCAGGTGTCTGGAAGGAGGCATAGATACATGTCATCGTGACTCTGGGGGA 211 P L I C N G E F Q G I V S W G D G P C A Q P D K P A L Y S K V F D H L 631 CCCCTCATCTGTAATGGAGAATTCAGGGCATTGTATCTTGGGGAGACGGTCCTTGTGCCCAACCGGATAAGCCTGCCCTCTACAGCAAGGTCTTCGATCATCTT <i>EcoRI, 650</i> 246 D W I Q N I I A G S E T V N C P S <i>Stop códon</i> 736 GACTGGATCCAGAACATTATTGCAGGAAGTGAACTGTGAATTGCCCTCGTGAaaaacttttgaaaaagttaagaggagaaaatgtaacatattagtacatctct <i>BamHI, 741</i>
Exon 5 (621-1401 pb)	841 tctatatccctaaccatattccaactacattggaatatatccccaggcagtaagcttttttagactcaaataaggactgcctttggagtaataaataactcaaaata <i>HindIII, 892</i> 946 gtgctgcaattatcatgtcccatattttcagtataaaacaatctcagcaaaatgcaggcctgttttaggggtgaggtgcaaaatttctgaccctaaaatggacca 1051 ttccaaatattttaatctctgaatatctttccattttctgtccactttctgggacagtggggtccttgatgctctctgagcttcttcttgcagacgtttcattac 1156 ccagctaggttaacatcatcagtgctacaatattcttcttatttaataacttctgtggcatttacaatacgctcatatggagtcagtcgggtcactccacaaacatat <i>NdeI, 1229</i> 1261 ccatatacccagggtcccactgttgccataaaaagaatcccagattaagccccacttcccaatcactaaatagaatcttttaagaatcatgttttcatgtaaattct <i>sinal de poliadenilação</i> 1366 caggtatccacagcaataaaatcgtataaatcgtcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Região codificante para o peptídeo sinal Região codificante para o pró-peptídeo Região codificante para toxina madura Região 3'UTR

Figura 23: Organização do cDNA do clone PST7:3 (1429pb).

Os possíveis éxons são: éxon 1 (1-52pb), éxon 2 (53-209pb), éxon 3 (210-451pb), éxon 4 (452-620pb), éxon 5 (621-1401pb). A região codificante para o peptídeo sinal está representada pela cor rosa escuro, a região codificante para o pró-peptídeo está representada pela cor rosa, a região codificante para a toxina madura está representada pela cor rosa claro e a região 3'UTR está representada pela cor roxa. O códon de início (ATG) e o códon de parada (*Stop códon*-TGA) se encontram em destaque. O primeiro sítio na posição 929pb destacado em amarelo representa um sítio potencial de poliadenilação. O segundo sítio na posição 1380pb representa o sítio de poliadenilação. A tríade catalítica (HDS) se encontra em diamante vermelho e o sítio potencial de N-glicosilação se encontra em diamante azul.

on 1 52 pb)	1 M V L I R V L A N L L I L Q L S Y A Q K S S E L V I G G D E C N I N E 1 ATG GTGCTGATCAGAGTGCTAGCAAACCTTCTGATACTACAGCTTTCTTACGCACAAAAGTCTTCTGAGCTGGTCATTGGAGGAGATGAATGTAACATAAATGAA <i>NheI, 19</i>
n 2 09 pb)	36 H N F L V A L Y E Y W S Q S F L C G G T L I N G E W V L T A A C D R 106 CATAATTTCTTGTAGCCTTGTATGAATATTGGTCTCAGAGTTTTCTCTGCGGTGGGACTTTGATCAACGGAGAATGGGTGCTCACTGCTGCACACTGCGACAGG 71 T H F L I Y V G V H D R S V Q F D K E Q R R F P K E K Y F F N C G N 211 ACACATTTCTTAATATACGTTGGTGTGCATGACCGAAGTGTGCAATTTGACAAGGAGCAGAGAAGATTCCCAAAGGAGA AGTACT TTTTAACTGTGGCAATAAC <i>ScaI, 293</i>
n 3 73 pb)	106 F T K W D K I M L I R L N K P V R N N E H I A P L S L P S S P P S V 316 TTTACCAAATGGGACAAGGACATCATGTTGATCAGGCTGAACAAACCTGTTAGGAACAATGAACATATCGCGCCTCTCAGCTTGCCTTCCAGCCCTCCCAGTGTG 141 G S V C R V M G W G Q T T S P Q N T L P D V P H C A N I N L L D Y E V 421 GGCTCAGTTTGCCGTGTTATGGGATGGGGCCAAACCACATCTCCTCAAAACACTTTGCCCGATGTCCCTCATTGTGCTAACATTAACCTACTCGATTATGAGGTG
n 4 20 pb)	176 C R T A L P Q L R L P A T S R I L C A G V L E G G I D T C N R D G G 526 TGTCGAACAGCTCTCCACAACCTGAGGTTGCCAGCGACAAGCAGAATATTGTGTGCAGGTGTCTGGAAGGAGGCATAGATACATGTAATCGTGACTCTGGGGGA 211 P L I C N G E F Q G I V F W G P D P C A Q P D K P A L Y S K V F D H L 631 CCCCTCATCTGTAATGGAGAATTCCAGGGCATTGTATTTTGGGGACCTGATCCTTGTGCCCAACCGGATAAGCCTGCCCTCTACAGCAAGGTCTTCGATCATCTT <i>EcoRI, 650</i> 246 D W I Q S I I A G N T I V N C P P Stop códon 736 GACTGGATCCAGAGCATTATTGCAGGAAATACAATTGTGAATTGCCCCCG TGA aaacttttgaaaaagttaagaggagaaaaatgtaacatgttagtacatctct <i>BamHI, 741</i> 841 tctatatccctaaccatatccaactgcattggaatatatccccaggcagtaagcttttttagactcaaataaggactgccttttgagtaagaaatgctccaaata <i>HindIII, 892</i> 946 gtgctgcagagatcatgtcccattaatttcagtataaaacaatctcagcaaaatgcaggcctgttttagggtaggtgcaaaattttctgactctaaaatggacc <i>PstI, 954</i> 1051 attccaaatattttaatctctgaatatcattccatttctgtccacttctgggacagtggggtccttgatgctctctgagcttcttcttgcagacgtttcatta 1156 cccagctaggtaacatcatcagtgtacaatatttcttctattaataacttctgtggcatttacaatacgtcatatggagtcatgcggtcaccacgaacata <i>NdeI, 1230</i> 1261 tccatatacccaggtccactgttgccataaaaaggatccagattaagccccacttcccaatcactaaatagaatcttttaagaatcatgttttcatgtaaattc <i>sinal de poliadenilação</i> 1366 tcaggtatccacagcaataaaatcgataaatcgttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Região codificante para o peptídeo sinal Região codificante para o pró-peptídeo Região codificante para toxina madura Região 3'UTR

24: Organização do cDNA do clone PST7:4 (1420pb).

Os possíveis éxons são: éxon 1 (1-52pb), éxon 2 (53-209pb), éxon 3 (210-473pb), éxon 4 (474-620pb), éxon 5 (621-1401pb). A região codificante para o peptídeo está representada pela cor rosa escuro, a região codificante para o pró-peptídeo está representada pela cor rosa, a região codificante para a toxina madura está representada pela cor rosa claro e a região 3'UTR está representada pela cor roxa. A tríade catalítica (HDS) se encontra em diamante vermelho e o sítio potencial de poliadenilação se encontra em diamante azul. O sinal de início (ATG) e o códon de parada (*Stop códon*-TGA) se encontram em negrito. O sítio destacado em amarelo na posição 1381pb representa o sinal de poliadenilação.

on 1 52 pb)	1 M V L I R V L A N L L I L Q L S Y A Q K S S E L V I G G D E C N I N E 1 ATGGTGCTGATCAGAGTGCTAGCAAACCTTCTGATACTACAGCTTTCTTACGCACAAAAGTCTTCTGAACTGGTCATTGGAGGTGATGAATGTAACATAAATGAA <i>NheI, 19</i>
n 2 0 pb)	36 H R L L A I V Y T N S S Q C A G T L I N Q E W V L T A A C D G E N M 106 CATCGTCTCCTTGCAATCGTGTACACTAACAGCTCTCAATGCGCTGGGACTTTGATCAACCAGGAATGGGTGCTCACTGCTGCACACTGTGACGGGGAAAATATG 71 D I Y L G V H E S V Q Y D D E E G R V A A E K F F C L S S R Y T K 211 GACATATACCTTGGTGTGCATAACGAAAGTGTAATATGACGATGAGGAGGGAAGAGTCGCAGCGGAGAAGTTCTTTTGCCTCAGTAGCAGAACTATACCAA
n 3 60pb)	106 W D K I M L I R L N I P V R N S T H I A P L S L P S S P P S V G S V 316 TGGGACAAGGACATCATGTTGATCAGGCTGAACATACCTGTTAGGAACAGTACACACATCGCGCCTCTCAGCTTGCTTCCAGCCCTCCAGTGTGGGCTCAGTT 141 C R V M G W G T I T S P N E T Y P D V P H C A N I N L F D Y E V C L A 421 TGCCGTGTTATGGGATGGGGCACAAATCACATCTCCTAATGAGACTTATCCCGATGTTCTCATTGTGCTAACATTAACCTATTTCGATTATGAGGTGTGTCTAGCA
n 4 1 pb)	176 A Y P E F G L P A T S R T L C A G I Q Q G G K D T C G S D G G S L I 526 GCTTACCCAGAATTTGGGTTGCCGGCGACAAGTAGAACATTGTGTGCAGGTATCCAGCAAGGAGGCAAAGATACATGTGGGTCTGACTCTGGGGGATCCCTCATC 211 C N G Q F Q G I V S W G D N P C A Q P H K P A L Y T K V L D D T E W I 631 TGTAATGGACAATTCAGGGCATTGTATCTTGGGGAGACAATCCTTGTGCCCAACCGCATAAGCCTGCCCTCTACACCAAAGTCCTCGATGATACTGAGTGGATC 246 Q S I I A G N T A V T C P P <i>Stop códon</i> 736 CAGAGCATTATTGCAGGAAATACAGCTGTGACTTGCCCCCATGAaaacttttgaaaaagttaagaggagaaaatgtaacatattagtagcatctcttctatatct
5 99 pb)	841 ctaaccatatccaattacattggaatatattcccagacagtaagctttttttacactcaaacaggacttcctttggagtaagaaatgctcaagatagtgctgcag <i>HindIII, 883</i> 946 ggatcatgtcccatTTAATTTcagtataaaacaatctcagtaaaatggaggcctgttttaggggtgaggtgcaaaatTTTctgactctaaaatggaccattccaaa <i>PstI, 945</i> 1051 tatttttaacctctgaatatctttccatttctgtccacttctgggacagtgggtctttgatgctctctgagcttcttcttgcagacgtttcattaccagcta 1156 ggtaacatcatcagtgtagaatattctcttctatttggtacttgtgtggcatttacaatagctcatgtggagtcagtcagtcaccataaacatatccatatac 1261 ccgggtcccatgttgctctaaaaaggatcccagattaagcctcacttcccaatcactaaatagaatcttttgagaatcatgttttcatgtaaattctcaggtatc <i>SmaI, 1263 sinal de poliadenilação</i> 1366 cacagaaataaaattgtataaatcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Região codificante para o peptídeo sinal Região codificante para o pró-peptídeo Região codificante para toxina madura Região 3'UTR

25: Organização do cDNA do clone PST7:7e8 (1407pb).

íveis éxons são: éxon 1 (1-52pb), éxon 2 (53-200pb), éxon 3 (201-460pb), éxon 4 (461-6110pb), éxon 5 (612-1389pb). A região codificante para o peptídeo está representada pela cor rosa escuro, a região codificante para o pró-peptídeo está representada pela cor rosa, a região codificante para a toxina madura está representada pela cor rosa claro e a região 3'UTR está representada pela cor roxa. O sítio destacado em amarelo na posição 1372pb representa o sinal de poliadenilação. O códon de início (ATG) e o códon de parada (*Stop códon*-TGA) se encontram em negrito. A tríade catalítica (HDS) se encontra em diamante vermelho e os potenciais de N-glicosilação se encontram em diamantes azuis.

on 1 52 pb)	1 M V L I R V L A N L L I L Q L S Y A Q K S S E L V I G G D E C N I N E 1 ATGG TGCTGATCAGAGTGGCTAGCAAACCTTCTGATACTACAGCTTTCTTACGCACAAAAGTCTTCTGAGCTGGTCATTGGAGGAGATGAATGTAACATAAATGAA <i>NheI, 19</i>
on 2 09 pb)	36 H N F L V A L Y E Y W S Q S F L C G G T L I N G E W V L T A A C D R 106 CATAATTTCTTGTAGCCTTGTATGAATATTGGTCTCAGAGTTTTCTCTGCGGTGGGACTTTGATCAACGGGGAATGGGTGCTCACTGCTGCACACTGCGACAGG
on 3 69 pb)	71 T H F L I Y V G V H D R S V Q F D K E Q R R F P K E K Y F F N C G N 211 ACACATTTCTTAATATACGTTGGTGTGCATGACCGAAGTGTGCAATTTGACAAGGAGCAGAGAAGATTCCCAAAGGAGA AGTACT TTTTTAACTGTGGCAATAAC <i>ScaI, 293</i>
on 4 ente)	106 F T K W D K I M L I R L N K P V R N N E H I A P L S L P S S P P S V 316 TTTACCAAATGGGACAAGGACATCATGTTGATCAGGCTGAACAAACCTGTTAGGAACAATGAACATATCGCGCCTCTCAGCTTGCCTTCCAGCCCTCCCAGTGTG 141 G S V C R V M G W G Q T T S P Q T Stop códon 421 GGCTCAGTTTGGCGTGTTATGGGATGGGGCCAAACCACATCTCCTCAAAC CGTGA ctctgggggacccctcatctgtaatggagaattccagggcattgtattttg <i>EcoRI, 654</i>
on 5 55 pb)	526 gggacctgatccttgtgccaaccggataagcctgccctctacagcaaggtcttcgatcatcttgactggatccagagcattattgcaggaaatacaattgtgaa <i>BamHI, 595</i> 631 ttgcccccggtgaaaacttttgaaaaagttaagaggagaaaaatgtaacatgttagtacatctcttctatatccctaaccatatccaactgcattggaatatatcc <i>PciI, 678</i> 736 ccaggcagtaagcttttttagactcaaataaggactgcctttggagtaagaaatgctccaaatagtgtctgcagagatcatgtcccatTTAATTTcagtataaaac <i>HindIII, 746</i> <i>PstI, 808</i> 841 aatctcagcaaaatgcaggcctgttttagggtaggtgcaaaatTTTctgactctaaaatggaccattccaaatattttaatctctgaatatctttccattttctg 946 tccacttctgggacagtggggtccttgatgctctctgagcttctcttcttgagacgtttcattaccagctaggtaacatcatcagtgtacaatatctcttc 1051 tattaatacttctgtggcatttacaatacgtcatatggagtcacgtgcgggtcacccacaaacatatccatataccaggtcccactgttgctaaaaaggatccca <i>NdeI, 1085</i> <i> sinal de poliadenilação</i> <i>BamHI, 1149</i> 1156 gattaagccccacttcccaatcactaaatagaatcttttaagaatcatgttttcatgtaaattctcaggtatccacagcaataaaatcgtataaatcgttaaaaa 1261 aaaaaaaaaa

Região codificante para o peptídeo sinal Região codificante para o pró-peptídeo Região codificante para toxina madura Região 3'UTR

26: Organização do cDNA do clone PST7:5(1272pb).

íveis éxons são: éxon 1 (1-52pb), éxon 2 (53-209pb), éxon 3 (210-469pb), éxon 4 (ausente), éxon 5 (470-1255pb). A região codificante para o peptídeo sinal apresentada pela cor rosa escuro, a região codificante para o pró-peptídeo está representada pela cor rosa, a região codificante para a toxina madura está representada pela cor rosa claro e a região 3'UTR está representada pela cor roxa. O sítio destacado em amarelo na posição 1235pb representa o sinal de enilação. O códon de início (ATG) e o códon de parada (*Stop códon*-TGA) se encontram em negrito. A tríade catalítica (HDS) se encontra em diamante vermelho e s potenciais de N-glicosilação se encontram em diamantes azuis.

Figura 27: Análise da organização dos cDNAs.

As seqüências de 7 clones Giroxina símile em relação à organização genômica do gene de Batroxobin de *Bothrops atrox* (X12747) e o cDNA de Batroxobin (J02684).

Figura 28: Dendrograma das seqüências de nucleotídeos dos clones de cDNA B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:5 e PST7:7e8.

Figura 30: Análise do precursor.

1) B2.1 de *Crotalus durissus terrificus* (AY954040); 2) GPS:2e5 de *Crotalus durissus terrificus*; 3) GPS:3e4 de *Crotalus durissus terrificus*; 4) PST7:3 de *Crotalus durissus terrificus*; 5) PST7:4 de *Crotalus durissus terrificus*; 6) PST7:5 de *Crotalus durissus terrificus*; 7) PST7:7e8 de *Crotalus durissus terrificus*; 8) Catroxase I de *Crotalus atrox* (AF227153.1); 9) Serino protease 1 de *Crotalus adamanteus* (AJ251525.1); 10) Protrimubin de *Trimeresurus mucrosquamatus* (U31417); 11) Serino protease de *Trimeresurus gramineu* (D67083.1); 12) Serino protease de *Bothrops jararacussu* (AY251282.1); 13) HS 120 de *Bothrops jararaca* (AB178323.1); 14) Precursor de Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* (P47797); 15) Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* (P26324). A seta indica o sítio de clivagem do peptídeo sinal.

Figura 31: Predição de clivagem do peptídeo sinal do clone PST7:3.

O peptídeo sinal é clivado na posição 18 entre os aminoácidos A – Q, liberando uma toxina inativa com um pró-peptídeo de 6 aminoácidos.

Figura 32: Dendrograma das seqüências de aminoácidos correspondentes às toxinas maduras codificadas pelos clones: B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4 e PST7:7e8.

Figura 33: Dendrograma funcional de serino proteases do veneno de serpentes.

I -Ativador de Fator V. II -Ativador de Plasminogênio. III -Fibrinogenases. IIIa- α fibrinogenases.

IIIb- α e/ou β fibrinogenases. IV- enzimas trombina-símile. IVa-enzimas que atuam sobre a coagulação.

IVb-enzimas que pertencem ao grupo da toxina ativadora de proteína C (ACC-C) de *Agkistrodon contortrix contortrix*.

A tripsina foi usada como grupo externo.

Trypsin Tripsina de suíno, *Sus scrofa* (P00761- Huang *et al* 1993); **FVA** Factor V-activating enzyme, *Vipera lebetina* (Q9PT41- Siigur *et al*, 1999); **RVV-V α** *Vipera russelli* proteinase, *Daboia russelli siamensis* (P18964 - Tokunaga *et al*, 1988); **Catroxase-2**, *Crotalus atrox* (Q8QHK2- Bjarnason *et al*, 1983); **Dav-PA**, *Agkistrodon acutus* (Q918X1- Wang *et al*, 2001); **Flavoxobin**, *Trimeresurus flavoviridis* (P05620-Deshimaru *et al*, 1996); **Contortrixobin**, *Agkistrodon contortrix contortrix* (P82981- Amiconi *et al*, 2000); **PA-BJ**, *Bothrops jararaca* (P81824-Serrano *et al*, 1995); **LV-PA**, *Lachesis muta muta* (P84036-Sanchez *et al*, 2000); **TSV-PA**, *Trimeresurus stejnegeri* (Q91516 - Zhang *et al*, 1995); **Calobin**, *Agkistrodon caliginosus* (Q91053 - Hahn *et al*, 1996); **Pallabin-2**, *Agkistrodon halys pallas* (Q9YGI6- Fan *et al*, 1999); **Halystase**, *Agkistrodon halys blomhoffii* (P81176- Matsui *et al*, 1998); **KN-BJ**, *Bothrops jararaca* (O13069- Serrano *et al*, 1998); **Venom serine proteinase Sp1**, *Crotalus adamanteus* (Q8UUK2); **Catroxase-1**, *Crotalus atrox* (Q8QHK3); **Elegaxobin-1**, *Trimeresurus elegans* (P84788- Oyama *et al*, 2002); **Mucrofibrase-1**, *Trimeresurus mucrosquamatus* (Q91507- Hung *et al*, 1994); **Dav-KN**, *Agkistrodon acutus* (Q918X0- Wang *et al*, 2001); **ACC-C** Protein C activator; *Agkistrodon contortrix contortrix* (P09872- McMullen *et al*, 1989); **PST7: 7e8** de *Crotalus durissus terrificus*; **CPI enzyme-2**, *Agkistrodon caliginosus* (O42207- Hahn *et al*, 1998); **Bilineobin**, *Agkistrodon bilineatus* (Q9PSN3- Nikai *et al*, 1995); **Gyroxin analog**, *Lachesis muta muta* (P33589 - Magalhães *et al*, 1993); **Ancrod**, *Agkistrodon rhodostoma* (P26324 - Burkhardt *et al*, 1992); **Crotalase**, *Crotalus adamanteus* (Henschen-Edman *et al*, 1999); **PST7: 3** de *Crotalus durissus terrificus*; **Gyroxin-like B2.1**, *Crotalus durissus terrificus* (Q58G94); **GPS: 2e5** de *Crotalus durissus terrificus*; **PST7: 4** de *Crotalus durissus terrificus*; **GPS: 3e4** de *Crotalus durissus terrificus*; **Dav-X**, *Agkistrodon acutus* (Q918W9-Wang *et al*, 2001); **Acutobin**, *Agkistrodon acutus* (Q918X2- Wang *et al*, 2001); **TLG2B**, *Trimeresurus gramineus* (O13061- Deshimaru *et al*, 1996); **Bothrombin**, *Bothrops jararaca* (P81661- Nishida *et al*, 1994); **Batroxobin**, *Bothrops atrox* (P04971- Itoh *et al*, 1987).

SCORE

FIGURA 34. Alinhamento de serino proteases do veneno de serpente.

1) Gioxina- smle B2.1 de *Crotalus durissus terrificus* (Q58G94), 2) PST7.3 de *Crotalus durissus terrificus*, 3) GPS: 2e5 de *Crotalus durissus terrificus*, 4) GPS: 3e4 de *Crotalus durissus terrificus*, 5) PST7.7e8 de *Crotalus durissus terrificus*, 6) PST7.4 de *Crotalus durissus terrificus*, 7) Bilineobin de *Agkistrodon bilineatus* (Q9PSN3 - Nikai et al. 1995), 8) Crotalase de *Crotalus adamanteus* (Henschen-Edman et al. 1999), 9) Ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* (P26324 - Burkhardt et al. 1992), 10) Gyroxin analog de *Lachesis muta muta* (P33589 - Magalhes et al 1993), 11) Acutobin de *Agkistrodon acutus* (Q918X2- Wang et al, 2001), 12) Calobin de *Agkistrodon caliginosus* (Q91053 - Hahn et al. 1996), 13) KN-BJ de *Bothrops jararaca* (O13069- Serrano et al, 1998), 14) Sp1 Venom serine proteinase de *Crotalus adamanteus* (Q8UUK2), 15) CROAT Catroxase-1 de *Crotalus atrox* (Q8QHK3), 16) ACC-C Protein C activator de *Agkistrodon contortrix contortrix* (P09872- McMullen et al, 1998), 17) CPI enzyme de *Agkistrodon caliginosus* (O42207- Hahn et al, 1998), 18) Dav-PA de *Agkistrodon acutus* (Q918X1- Wang et al, 2001), 19) Catroxase-2 de *Crotalus atrox* (Q8QHK2- Bjarnason et al, 1983), 20) PA-BJ de *Bothrops jararaca* (P81824-Serrano et al, 1995), 21) TSV-PA de *Trimeresurus stejnegeri* (Q91516 - Zhang et al. 1995), 22) LV-PA de *Lachesis muta muta* (P84036-Sanchez et al, 2000), 23) Batroxobin de *Bothrops atrox* (P04971- Itoh et al, 1987). A numerao das pontes dissulfetos foram baseadas na seqncia da gioxina-smle B2.1.

Figura 35: Modelo tridimensional da giroxina.

A estrutura terciária da giroxina pode ser comparada com a estrutura terciária do modelo cristalográfico da TSV-PA (1bqy), da DAV-PA (1op2) e da tripsina (2ptc). Em amarelo são mostradas as folhas β -pregueadas que compõem os dois domínios em barril- β . Em vermelho as α -hélices, em azul as pontes dissulfeto e em verde os aminoácidos da tríade catalítica. No modelo de superfície da giroxina é possível visualizar em azul a cadeia lateral da asparagina 81 estando mostrado em vermelho o nitrogênio do sítio potencial de N-glicosilação. Em verde está mostrado a posição dos aminoácidos que participam da tríade catalítica. No modelo da DAV-PA é mostrado o sítio de glicosilação da asparagina 35 com o monossacarídeo NAG.

Figura 36: Comparação do modelo da giroxina com o modelo cristalográfico da tripsina bovina (2ptc). O modelo da giroxina foi baseado no modelo cristalográfico de *Trimeresurus stejnegeri* TSV-PA (1bqy), de *Agkistrodon acutus* AaV-SP I (1op0), de *Agkistrodon acutus* AaV-SP II- DAV-PA (1op2). Nos modelos da giroxina e da tripsina, as folhas β -pregueadas que compõem os dois domínios em barril- β estão mostrados em vermelho e em rosa respectivamente, as α -hélices em laranja e vermelho respectivamente, as pontes dissulfeto estão em azul e em verde os aminoácidos da tríade catalítica.

Figura 37: Comparação dos modelos tridimensionais da giroxina e crotalase com o modelo cristalográfico da cadeia pesada da α -trombina (1c50). Amarelo são mostradas as folhas β -pregueadas que compõem os dois domínios em barril- β , em vermelho as α -hélices, em azul as pontes dissulfeto e em verde os aminoácidos da tríade catalítica. Em rosa está representado as cadeias laterais dos aminoácidos que compõem um sítio alternativo de ligação ao fibrinogênio e em roxo as cadeias laterais dos aminoácidos que compõem o sítio de ligação ao fibrinogênio.

[illegible]

O vetor pCR2.1 -Giro foi clivado com a enzima de restrição Spe I e o vetor pSecTag2-hygroA com Xho I, as extremidades foram preenchidas com Klenow DNA pol. I, se clivados com Not I, permitindo a clonagem direcional do inserto giroxina-simile no vetor pSecTag2-hygroA.

Figura 40: Seleção do clone pSecTag2-Giro.
Análise em gel de agarose 1,5% relativo à seleção dos clones recombinantes por tamanho.

Figura 41: Análise por PCR do clone pSecTag2-Giro recombinante.
Eletoforese em gel de agarose 1,5%. O plasmídeo pSecTag2 vazio (controle negativo) e os clones de 1 a 4 foram amplificados por PCR com os *primers* GYR SE e GYR AS1.

Figura 42: Seleção por PCR dos clones pSecTag2-IgK-Giro obtidos após a mutagênese sítio dirigida. Análise de gel de agarose 1,5% referente à seleção dos clones recombinantes por PCR utilizando-se os *primers sense* T7 e GYR AS1. A dupla banda amplificada é devido a dois sítios do *primer* T7 presente na construção pSecTag2-IgK-Giro. Os clones controles correspondem ao vetor parental pSecTag2-Giro não mutado.

Figura 43: Análise de restrição dos clones mutantes pSecTag2-IgK-Giro. Análise em gel de agarose 1,5% do produto da digestão dos clones recombinantes. Como controle negativo foi utilizado o vetor parental pSecTag2-Giro não mutado.

...AATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGC

747 CGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTGCTAGCCACC ATG M

Promotor T7/Primer T7

NheI Kozak

— Sítio de clivagem do peptídeo sinal

Peptídeo sinal Taxk

[illegible]

999 TGG TCT CAG AGT TTT CTC TGC GGT GGT GAG GAA TGG GTG CTC ACT GCT GCA CAC TGC GAC AGG AAA CAT ATC TTA ATA TAC GTT GGT
W S Q S F L C G G T T T G A T T T G A T T A A H C D R K H I L I Y V G

1109 AGT GTG CAA TTT GAC AAG GAG CAG AGA AGA TTC CCA AAA GAG AAG TAC TTT TTT AAC TGT AGA AAT AAC TTT ACC AAA TGG GAC AAG GAC ATC ATG TTG
S V Q F D K E Q R R F F P K E K Y F F N C R N N N F T K W D K D I M L

11109 AGT GTG CAA TTT GAC AAG GAG CAG AGA AGA TTC CCA AAA GAG AAG TAC TTT TTT AAC TGT AGA AAT AAC ACC AAA TGG GAC AAG GAC ATC ATG TTG
S V Q F D K E Q R R F P K E K Y F F N C R N N F T K W D K D I M L

1209 AAA CCT GTT AGT TAC AGT GAA CAC ATC GCA CCT CTC AGC TCG CCT TCC AGC CCT CCC ATT GTG GGA TCA GTT TGC CGT GGT ATG GGA TGG GGT ACA ATC
K P V S Y S E H I A P L S L P S S P P I V G S S V C R V M G W G T I

1209 AAA CCT GTT AGT TAC AGT GAA CAC ATC GCA CCT CTC AGC TCC AGC CCT CCC ATT GTG GGA TCA GTT TGC CGT GTT ATG GGA TGG GGT ACA ATC
K P V S Y S E H I A P L S L P S S P P I V G S V C R V M G W G T I

1309 GAG ACT TTG CCT GAT GTC CCT CAT TGT GCT AAC ATT AAC CTA CTT GAT TAT GGA GTG TGT CGA ACA GCT CAC CCA CAA TTT CGG TTG CCA GCG ACA AGC
E T L P D V P H C A N I N L L L D Y G V C R T A H P Q F R L P A T S

1309 GAG ACT TTG CCT GAT GTC CCT CAT TGT GCT AAC ATT AAC CTA CTT GAT TAT GGA GTG TGT CGA ACA GCT CAC CCA CAA TTT CGG TTG CCA GCG ACA AGC
E T L P D V P H C A N I N L L L D Y G V C R T A H P Q F R L P A T S

1409 GCA GGT GTC CTG GAA GGA GGC ATA GAT ACA TGT CAT CGT GAC TCT GGG GGA CCC CTC ATC TGT AAT GGA GAA TTC CAG GGC ATT GTA TCT TGG GGA GAC
A G V L E G G I D T C H R D S G G P L I C N G E F Q G I V S W G G D

[illegible]

Códon de p
Signal de poliadeni

Bam HI Hind III

CAA CCG GAT AAG CCT GCC CTC TAC AGC AAG GTC TTC GAT CAT CTT GAC TGG ATC CAG AAC ATT ATT GCA GGA AGT GAA ACT GTG AAT TGC CCC TCG TGA
Q P D K P A L Y S K V F D H L D W I Q N I I A G S E T V N C P S *

TAAGAGGAGAAAATGTACATATTAGTACATCTCTTCTATATCCCTAACCATATCCAACTACATTGGAATATATCCCCAGGCAGTAAGCTTTTTTAGACTCAAATAGGACTGCCCTTTGGAGTAATAAATA

11509 11623

TAAGAGGAGAAATGTAACATATTAGTACATCTCTTCTATATCCCTAACCATATCCCACTACATTGGAATATATCCCCAGGCAGTAAGCTTTTATTAGACTCAAATAGGACTGCCTTTGGAGTAATAATAATA
 Sinal de poliadeni
 Hind III
 Eco RI
 BstX I
 Apa I
 polí A
 Xho I
 Kpn I
 Primer T7

11769
 poli A Xho I Kpn I Primer T7 Eco RI BstX I Apa I
 AAAAAAAAAAAAACTCGAGGGGGGGCCGGTACCCCAATTCGCGCTATATCCCGCTTAAGGTCGTGTGACCGCCCGGCAATGATCTCGAGGAGGGCCCCGAAACAAAACTCATCTCA

Agroxina-símile madura ficou em fase de leitura com o peptídeo sinal IgK.

Figura 45: Seleção por tamanho dos clones recombinantes pED-Giro. Eletroforese em gel de agarose 1,5% da extração do DNA plasmidial dos clones de 1 a 13. Como controle foi utilizado uma colônia transformada com o vetor pED vazio.

Figura 46: Análise por PCR do clone pED-Giro recombinante. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. O plasmídeo pED vazio (controle negativo) e os clones de 3 e 12 foram amplificados por PCR com os *primers* GYR SE e GYR AS1.

AMP ^r	Gene de Resistência à Ampicilina	Gioxina madura
SV40	Origem de replicação do vírus SV40	3' UTR e poliA
AdMLP _{3.3}	Promotor derivado do adenovírus	λ ZAP
AdTPL	Seqüência "leader" derivada do adenovírus	5' não traduzida encefalomiocar
IVS	Íntron híbrido composto pela seqüência 5' "leader" não traduzida derivada do adenovírus e uma seqüência 3' do gene da imunoglobulina	Região que codifica Diidrofolato redu
	Sítio de Multipla Clonagem	Região de polia
IgK	Peptídeo Sinal IgK	

956 ...AAGCTTGAGGTGGCAGGCTTGAGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTTGCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCAGGTCCAACTGCAGGTCTAGCCACC **ATG** M

1091CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC **GTG** **CTC** **ATT** **GGA** **GGT** **GAT** **GAA** **TGT** **AAC** **ATA** **AAT** **GAA** **CGT** **AAT** **TTC** **CTT** **GTA** **GCC** **TA**
L L L W V L L L W V P G S T G D V I G G D E C N I N E R N F L V A

1201TGG TCT CAG AGT TTT CTC TGC GGT GGG ACT TTG ATC AAC GGG GAA TGG GTG CTC ACT GCT GCA CAC TGC GAC AGG AAA CAT ATC TTA ATA TAC GTT GGT GGT
W S Q S F L C G G T L I N G E W V L T A A H C D R K H I L Y V G

1311AGT GTG CAA TTT GAC AAG GAG CAG AGA AGA TTC CCA AAA GAG AAG TAC TTT TTT AAC TGT AGA AAT AAC TTT ACC AAA TGG GAC AAG GAC ATC ATG TTG ATG
S V Q F D K E Q R R F P K E K Y F F N C R N N F T K W D K D I M L

1421AAA CCT GTT AGT TAC AGT GAA CAC ATC GCA CCT CTC AGC CCT TCC AGC CCT CCC ATT GTG GGA TCA GTT TGC CGT GTT ATG GGA TGG GGT ACA ATC ATC
K P V S Y S E H I A P L S L P S S P I V G G S V C R V M G W G T I

1531GAG ACT TTG CCT GAT GTC CCT CAT TGT GCT AAC ATT AAC CTA CTT GAT TAT GGA GTG TGT CGA ACA GCT CAC CCA CAA TTT CGG TTG CCA GCG ACA AGC ACA
E T L P D V P H C A N I N L L D Y G V C R T A H P Q F R L P A T S

1641GCA GGT GTC CTG GAA GGA GGC ATA GAT ACA TGT CAT CGT GAC TCT GGG GGA CCC CTC ATC TGT AAT GGA **GAA** **TTC** **CAG** **GGC** **ATT** **GTA** **TCT** **TGG** **GGA** **GAC** **GAC**
A G V L E G I D T C H R D S G G P L I C N G E F Q G I V S W G D

1751CAA CCG GAT AAG CCT GCC CTC TAC AGC AAG GTC TTC GAT CAT CTT GAC TGG ATC CAG AAC ATT ATT GCA GGA AGT GAA ACT GTG AAT TGC CCC TCG **TGAAA**
Q P D K P A L Y S K V F D H L D W I Q N I I A G S E T V N C P S

1865 TAAGAGGAGAAAATGTAACATATTAGTACATCTCTTCTATATATCCCTAAACCATATCCAACTACATTTGGAATATATCCCCAGGCAGTAAGCTTTTTTTTAGACTCCAATAGGACTGCCTTTTGGAGTAATAAATACT

2011AAAAAAAAAAAAAACTCGAGGGGAATTC...

Hind III Pst I

peptideo sinal Ig k

Sítio de clivagem do peptideo sinal

Sca I

Eco RI

poli A

Eco RI

Códon de parada

Sinal de poliadenilação

Figura 47: Esquema do vetor pED-Giro.

O vetor pSecTag2-IgK-Giro foi clivado com a enzima de restrição Xho I, tratado com Klenow DNA pol. I e clivado com Nhe I (compatível com Xba I). O inserto de extremidade coesiva a 5' e cega a 3' foi clonada no vetor pED (digerido com as enzimas de restrição Xba e Sma I), permitindo a sua clonagem direcional.

Figura 48: Uma colônia de células CHO-DXB11 transfectada com o vetor pED-Giro.

Figura 49: Detecção do vetor pED-Giro integrado no genoma da célula CHO DXB11.

PCR do extrato total das amostras: CHO DXB11 *dhfr*⁻ (1, 4 e 7), clone 6 (2, 5 e 8), plasmídeo pED-Giro (3, 6 e 9), 10- água com os *primers* IgK SE/ GYR AS1. Gel de agarose 1%. O marcador usado foi λDNA/Hind III.

Figura 50: RNA total isolado das amostras célula CHO-K1 *dhfr*⁺, clones 4 e 8 (CHO-DXB11 x pED-Giro) na presença e ausência de MTX.
1: célula CHO-K1 *dhfr*⁺ (controle negativo); 2-Clone 8 sem MTX, 3-Clone 8 com 20nM MTX, 4- Clone 4 sem MTX, 5- Clone 4 com 20nM MTX.O marcador utilizado foi o λ DNA/Hind III. Gel de agarose 1,0%.

Figura 51: Detecção do mRNA expresso pelos clones 4 e 8 (CHO-DXB11 x pED-Giro) por RT-PCR.
RT-PCR das amostras: CHO-K1 *dhfr*⁺ (controle negativo) (1, 4 e 7); clone 4 (2, 5 e 8); clone 8 (3, 6 e 9); 10- pED-Giro com *primers* DHFR SE/AS (B); 11- pED-Giro com os *primers* GYR SE/DHFR AS (A). Gel de agarose 1,0%. O marcador usado foi λ DNA/Hind III.

Figura 52: RNA total isolado das amostras clone 4 e 6 na presença e ausência de MTX e célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻.

1-clone 4; 2-clone 6; 3-clone 4 com 20nM MTX; 4- clone 6 com 320nM MTX e 5- célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻. Gel de agarose 1%. Amostras foram diluídas 1:20.

Figura 53: Detecção do mRNA expresso pelos clones 4 e 6 na ausência e presença de MTX por RT-PCR.

Clone 4 (1, 6 e 11); clone 4 com 20nM MTX (2, 7 e 12); clone 6 (3, 8 e 13); clone 6 com 320nM MTX (4, 9 e 14); CHO DXB11 *dhfr*⁻ (5, 10 e 15); 16- pED-Giro com *primers* DHFR SE/AS (E); 17-pED-Giro com os *primers* IgK SE/ GYR AS1 (F); 18- pED-Giro com os *primers* IgK SE/DHFR AS (D); 19- água com os *primers* IgK SE/ GYR AS1. Gel de agarose 1%. O marcador usado foi de 250pb.

Figura 54: Transfecção da célula COS-7x pED-Giro.

(A) controle da transfecção com o plasmídeo pEGFP-N1, microscópio de fluorescência detectando as células expressando o GFP. (B) célula COS-7 transfectada com os plasmídeos pED-Giro, aumento de 400x.

Figura 55: Detecção da proteína recombinante expresso pelo vetor pED-Giro em células COS-7.

Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S (A) e análise do Westernblot (B) das células COS-7 transfectada com os plasmídeos: 1- padrão de peso molecular Rainbow; 2- pSecTag2-IgK-Giro; 3- pED-Giro; 4- canaleta vazia; 5- células COS-7 (controle negativo); 6- canaleta vazia; 7- 500ng de giroxina purificada do veneno *C. d. terrificus* (controle positivo); 8- 5µg de giroxina purificada do veneno da *C. d. Terrificus* (controle positivo). O anticorpo primário foi o soro anti-crotálico do Instituto Butantan e o anticorpo secundário foi o anti-IgG biotinilada eqüina feito em coelho.

Figura 56: Detecção da proteína recombinante expressa pelo vetor pED-Giro em células COS-7 e purificada pela resina de afinidade benzamidina sepharose.

(A) Gel de poliacrilamida corada com *Comassie Blue* e (B) Análise em *western blot* dos extratos celulares: 1-padrão de peso molecular Rainbow, 2- extrato celular COS-7 (controle negativo), 3- extrato celular COS-7 transfectada com pED-Giro, 4- sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 (controle negativo), 5- sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 transfectada com o pED-Giro, 6-precipitado do lisado da célula sonicada COS-7 (controle negativo), 7- precipitado do lisado da célula COS-7 transfectada com o pED-Giro, 8- sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 incubado com a resina (controle negativo), 9- sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 transfectada com o pED-Giro incubado com a resina, 10- sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 adsorvido a resina (controle negativo), 11- sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 transfectada com o pED-Giro adsorvido a resina, 12- sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 não transfectada eluído da resina, 13- sobrenadante do lisado da célula sonicada COS-7 transfectada com o pED-Giro eluído da resina, 14- 3µg de trispina, 15- 3µg de giroxina purificada do veneno. (C): *western blot* da proteína recombinante purificada do meio de cultura 24h após a transfecção da célula COS-7 com o plasmídeo pED-Giro, (2) 50ng de giroxina purificada (controle positivo) e (3) 500ng de giroxina purificada (controle positivo).

Atividade Esterásica (5 min)

Figura 57: Ensaio de atividade enzimática da gioxina recombinante expresso em COS-7 após a purificação por afinidade em resina benzamidina sepharose. A linha vermelha representa a atividade basal tendo como referência a amostra Meio de cultura controle (-).

Teste de atividade esterásica das amostras após a purificação com a resina de afinidade: meio de cultura controle negativo, o sobrenadante do lisado da célula COS-7 (célula COS-7 controle negativo), sobrenadante do lisado da célula COS-7 transfectada com o plasmídeo pED-Giro (Célula COS-7 x pED-Giro), meio de cultura 24h após a transfecção da célula COS-7 com o plasmídeo pED-Giro (meio 24h COS-7 x pED-Giro), meio de cultura 48h após a transfecção da célula COS-7 com o plasmídeo pED-Giro (meio 48h COS-7 x pED-Giro).

abela 1: Descrição dos vetores.

Vetor	pCR2.1 TOPO	pSecTag2 HygroA	pED	pEGFP-N1
Origem	Invitrogen	Invitrogen	Kauffman, 2000	Biosciences Clontech
Finalidade	Amplificação/ Sequenciamento	Expressão/ Secreção	Expressão/ Amplificação	Expressão
Hospedeiro	<i>E.coli</i> : DH5a™-T1R ou TOP 10.	Célula de mamífero	Célula de mamífero	Célula de mamífero
Promotor	T7	T7	Adenovírus AdMLP	Citomegalovírus
Resistência	Ampicilina Kanamicina	Ampicilina/ Higromicina	Ampicilina	Kanamicina Neomicina
Primers	M13 <i>sense</i> M13 <i>antisense</i>	T7 <i>sense</i> pcDNA3.1/BGH <i>antisense</i>	-----	EGFP-N <i>Sequencing</i> . EGFP-C <i>Sequencing Primer</i> .

Tabela 2: Descrição dos *primers* utilizados para clonagem e sequenciamento, mutagênese e RT-PCR.
 As regiões de hibridação dos *primers* numerados de 1 a 5 se encontram na figura 29.

	Seqüência (5' → 3')	Tm (°C)	Orientação	Finalidade	Região de complementaridade	Síntese do primer
E	GTCATTGGAGGTGATGAATGTAAC	58	Sense 5' → 3'	Clonagem pCR2.1 TOPO Sequenciamento	Aos 24 primeiros nucleotídeos da região que codifica o início do N-terminal da gioxina, segundo Da Silva <i>et al</i> , 1988.	Invitrogen
AS1	CGAGGGGCAATTCACAGT	58	Antisense 3' → 5'	Clonagem pCR2.1 TOPO Sequenciamento	A região de 697 a 714pb que codifica a região do C-terminal do clone B2.1.	Invitrogen
eo sinal PS	ATGGTGCTGATCAGAGTG	56	Sense 5' → 3'	Clonagem pCR2.1TOPO Sequenciamento	Aos 18 primeiros nucleotídeos que codificam para o início do peptídeo sinal.	IDT-Promega
ênese	CATCACCTCCAATGACGTCACCAAGTGAACC	70	Sense 5' → 3'	Mutagênese	Aos 16 primeiros nucleotídeos da região que codificam o início do N-terminal do clone B2.1 (azul) e os 15 últimos nucleotídeos da região codificante do peptídeo sinal IgK do vetor pSecTag2 HygroA (vermelho).	IDT-Promega
AS2	TCAACATGATGTCCTTGT	52	Antisense 3' → 5'	Sequenciamento	A região de 257 a 274pb do clone B2.1 gioxina madura.	IDT-Promega
AS (5)	CACCTCACCTAAAACAG	52	Antisense 3' → 5'	Sequenciamento	A região de 1006 a 1023pb do clone PST7: 3	IDT-Promega
SE	GCCATCATGGTTCGACCATTGA	62	Sense 5' → 3'	RT-PCR	Aos 22 nucleotídeos que codificam para a região N-terminal do DHFR, presente no vetor de expressão pED.	IDT-Promega
AS	GATCTAAAGCCAGCAAAAGTC	54	Antisense 3' → 5'	RT-PCR	A região de 638 a 658pb do C-terminal do DHFR, presente no vetor de expressão pED.	IDT-Promega
eo sinal IgK	ACTGCAGGCTAGCCACCATGGAGACAGACACTC Pst I Nhe I	55	Sense 5' → 3'	RT-PCR	Aos 18 nucleotídeos que codificam para o N-terminal do peptídeo sinal IgK do vetor pSecTag2 HygroA. (região sublinhada).	IDT-Promega

Tabela 3. Descrição dos *primers* universais.

Primer	Sequência (5' → 3')	T _m (°C)	Orientação	Finalidade	Síntese do Primer
M13 _{sense}	GTAAAACGACGGCCAG	53	Sense 5' → 3'	Clonagem pCR2.1 TOPO Sequenciamento	Kit pCR2.1Topo
M13 <i>antisense</i>	CAGGAAACAGCTATGAC	50	Antisense 3' → 5'	Clonagem pCR2.1 TOPO Sequenciamento	Kit pCR2.1Topo
T3 sense	ATTAACCCTCACTAAAG	43, 8	Sense 5' → 3'	Clonagem pCR2.1 TOPO Sequenciamento	IDT-Promega
T7 <i>antisense</i>	TAATACGACTCACTATAGG	50	Antisense 3' → 5'	Clonagem pCR2.1 TOPO Sequenciamento	IDT-Promega

Tabela 4: Enzimas utilizadas na manipulação de DNA ou RNA.

Enzima	Concentração da enzima	Concentração da reação	Fabricantes
Klenow DNA polimerase I	10 U / μ l	1U/ μ g de DNA	Fermentas
Nhe I	10 U / μ l	1U/ μ g de DNA	USB
Not I	10 U / μ L	1U/ μ g de DNA	Jena Bioscience
Inibidor de RNAserecombinante (RNase OUT)	40U/ μ L	8U// μ g de RNA	Invitrogen
Sma I	10 U / μ L	1U/ μ g de DNA	Fermentas
Spe I	10 U / μ L	1U/ μ g de DNA	Q.Bio gene
SuperScript III (transcriptase reversa).	200U/ μ L	40U/ μ g de RNA	Invitrogen
Taq DNA polymerase Recombinante	5 U/ μ L	0,1U/ μ g de DNA	Gibco
Taq DNA polymerase Platinum	5 U/ μ L	0,1U/ μ g de DNA	Invitrogen
T4 DNA ligase	6,2 U /mL	1U/ μ g de DNA	Pharmacia
T4 polinucleotídeo kinase	30 U / μ L		USB
Xba I	14 U / μ L	1U/ μ g de DNA	USB
Xho I	14 U / μ L	1U/ μ g de DNA	Amershan

Tabela 5. Descrição das bactérias eletrocompetentes e quimicamente competentes utilizadas.

Organismo	Designação	Genótipo	Aplicação	Fonte
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ <i>recA1 araD139</i> $\Delta(araleu)$ 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> .	Isolamento de clones, amplificação, sequenciamento.	Catálogo: K4500-01 TOPO TA Cloning. pCR2.1 TOPO
<i>Escherichia coli</i>	DH5a-T1R	F- $\phi80lacZ\Delta M15\Delta(lacZYA-rgF)$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+)</i> <i>phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i> (confere resistência ao fago T1).	Isolamento de clones, amplificação, sequenciamento.	Catálogo: K4500-01 TOPO TA Cloning. pCR2.1 TOPO
<i>Escherichia coli</i>	Hb101	F- <i>supE44 lacY1 ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 leuB6</i> $\Delta(mcrC-mrr)$ <i>recA13 rpsL20 thi-1</i> $\Delta(gpt-proA)62$ <i>hsdSB20</i> λ -	Isolamento de clones, amplificação, sequenciamento.	Número ATCC: 33694™
<i>Escherichia coli</i>	NIH RZ1032	<i>lacZbd-279:Tn10 Hfr dut-1 ung-1</i> derivado da <i>Escherichia coli</i> BW313	DNA de fita simples e mutagênese.	Número ATCC: 39737™

Tabela 6. Análise dos clones pelo *software* Phred (EWING *et al*, 1988).

Clones	Quantidade de seqüenciamentos	Total de Bases	Bases com qualidade > 20	Bases com qualidade >30
B2.1	1	918	588 (64%)	461 (50%)
B2.1	1	906	394 (43%)	245 (27%)
B2.1	1	998	521 (52%)	388 (39%)
TOTAL	3	2822	1503 (53%)	1094 (39%)
GPS:2	1	915	593 (65%)	521 (57%)
GPS:2	1	832	533 (64%)	382 (46%)
TOTAL	2	1747	1126 (64,5%)	903 (51,5)
GPS:3	1	802	548 (68%)	462 (58%)
GPS:3	1	609	435 (71%)	413 (68%)
GPS:3	1	769	526 (68%)	492 (64%)
TOTAL	3	2180	1509 (69%)	1367 (63%)
GPS:4	1	770	648 (84%)	570(74%)
GPS:4	1	816	552 (68%)	471 (58%)
TOTAL	2	1586	1200 (76%)	1041 (66%)
GPS:5	1	902	615 (68%)	534 (59%)
GPS:5	1	882	616 (70%)	530 (60%)
GPS:5	1	900	637 (71%)	569 (63%)
TOTAL	3	2684	1868 (70%)	1633 (61%)
PST7:3	1	720	475 (66%)	392 (54%)
PST7:3	1	797	527 (66%)	391 (49%)
PST7:3	1	933	595 (64%)	528 (57%)
TOTAL	3	2450	1597 (65%)	1311 (54%)
PST7:4	1	873	536 (61%)	388 (44%)
PST7:4	1	879	588 (67%)	516 (59%)
TOTAL	2	1752	1124 (64%)	904 (51,5%)
PST7:5	1	826	597 (72%)	507 (61%)
PST7:5	1	901	564 (63%)	474 (53%)
TOTAL	2	1727	1161 (67,5%)	981 (57%)
PST7:7	1	784	457 (58%)	340 (43%)
PST7:7	1	814	529 (65%)	367 (45%)
PST7:7	1	950	626 (66%)	534 (56%)
TOTAL	3	2548	1612 (63%)	1241 (49%)
PST7:8	1	669	546 (82%)	441 (66%)
PST7:8	1	937	276 (29%)	158 (17%)
TOTAL	2	1606	822 (51%)	599 (37%)

Tabela 7. Análise de homologia do cDNA do clone B2.1 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares ao cDNA do clone B2.1				
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade
D67083.1	Tlg2b serine protease	<i>Trimeresurus gramineus</i>	990	781/895 (87%)
U32937.1	Calobin	<i>Agkistrodon ussuriensis</i>	974	778/896 (86%)
AF056033.1	Salmobin	<i>Gloydius halys</i>	965	776/894 (86%)
U31417.1	Preprotrimubin	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	931	768/891 (86%)
AF545576.1	Stejnobin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	920	711/811 (87%)

Tabela 8. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone B2.1 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares à proteína codificada pelo clone B2.1					
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade	Similaridade
Q9PSN3	Bilineobin	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	404	189/237 (79%)	204/237 (86%)
AAN52347.1	Stejnobin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	398	183/237 (77%)	203/237 (85%)
AAC13280.1	Salmobin	<i>Gloydius halys</i>	392	180/237 (75%)	203/237 (85%)
AAC 61838.1	Salmobin	<i>Gloydius halys</i>	387	178/237 (75%)	201/237 (84%)
P85109	Serine protease kangshuanmei	<i>Gloydius blomhoffi brevicaudus</i>	375	177/237 (74%)	199/237 (83%)

Tabela 9. Análise de homologia do cDNA do clone GSP:2e5 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares cDNA do clone GSP:2e5				
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade
U32937	calobin	<i>Agkistrodon ussuriensis</i>	1075	823/936 (87%)
D67083	TLg2b serine protease.	<i>Trimeresurus gramineus</i>	1057	829/950 (87%)
AF545576	serine protease	<i>Trimeresurus stejnegeri stejnobin</i>	1048	798/907 (87%)
EF690366.	thrombin-like serine protease 2	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	1035	817/938 (87%)
EF690365.	thrombin-like serine protease 1	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	1035	815/936 (87%)

Tabela 10. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone GPS:2e5 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares a proteína codificada pelo clone GPS:2e5					
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade	Similaridade
AAN52347.	stejnobin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	446	207/261 (79%)	228/261 (87%)
AAC13280.	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	436	203/261 (77%)	227/261 (87%)
AAC61838	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	433	202/261 (77%)	226/261 (86%)
ABS12075	thrombin-like serine protease 2	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	419	204/261(78%)	226/261 (86%)
ABS12074.	thrombin-like serine protease 1	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	419	204/261(78%)	227/261 (86%)

Tabela 11. Análise de homologia do cDNA do clone GSP:3e4 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares ao cDNA do clone GPS:				
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade
EF690366.1	thrombin-like serine protease 2	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	1101	827/936(88%)
EF690365.1	thrombin-like serine protease 1	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	1101	825/934 (88%)
D67083	TLg2b serine protease.	<i>Trimeresurus gramineus</i>	1088	838/955 (87%)
AF545576	serine protease	<i>Trimeresurus stejnegeri stejnobin</i>	1075	802/906 (88%)
U32937	calobin	<i>Agkistrodon ussuriensis</i>	1062	827/944 (87%)

Tabela 12. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone GPS:3e4 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares a proteína codificada pelo clone GPS:3e4:					
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade	Similaridade
AAN52347	stejnobin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	449	209/261 (80%)	228/261 (87%)
AAC13280	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	435	204/261 (78%)	225/261 (86%)
AAC61838	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	432	203/261 (77%)	224/261 (85%)
ABS12075	thrombin-like serine protease 2	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	432	210/261(80%)	229/261 (87%)
ABS12074	thrombin-like serine protease 1	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	431	210/261(80%)	230/261 (88%)

Tabela 13. Análise de homologia do cDNA do clone PST7:3 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares ao cDNA do clone PST7:3				
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade
D67083.1	TLg2b serine protease	<i>Trimeresurus gramineus</i>	1792	1268/1408 (90%)
U32937.1	calobin	<i>Agkistrodon ussuriensis</i>	1781	1286/1438 (89%)
U31417.1	preprotrimubin	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	1746	1266/1416 (89%)
D67082.1	TLg2a serine protease	<i>Trimeresurus gramineus</i>	1690	1260/1421 (88%)
D67080.1	TLf3 serine protease	<i>Trimeresurus flavoridis</i>	1681	1254/1415 (88%)

Tabela 14. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone PST7:3 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares à proteína codificada pelo clone PST7:3					
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade	Similaridade
AAN52347	stejnobin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	449	208/261 (79%)	229/261 (87%)
AAC13280	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	438	204/261 (78%)	228/261 (87%)
AAC61838	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	436	203/261 (77%)	227/261 (86%)
ABS12075	thrombin-like serine protease 2	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	422	205/261 (78%)	227/261 (86%)
ABS12074	thrombin-like serine protease 1	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	422	205/261 (80%)	2228/261 (87%)

Tabela 15. Análise de homologia do cDNA do clone PST7:4 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares ao cDNA do clone PST7:4				
ID	Produto	Espécie	Total Score	Identidade
D67083.1	TLg2b serine protease.	<i>Trimeresurus gramineus</i>	1853	1279/1408 (90%),
U32937.1	calobin	<i>Agkistrodon ussuriensis</i>	1792	1291/1441 (89%),
U31417.1	preprotrimubin	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	1790	1273/1414 (90%),
D67082.1	TLg2a serine protease	<i>Trimeresurus gramineus</i>	1722	1268/1423 (89%)
D67080.1	TLf3 serine protease	<i>Trimeresurus flavoridis</i>	1701	1259/1416 (88%),

Tabela 16. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone PST7:4 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares a proteína codificada pelo clone PST7:4					
ID	Produto	Espécie	Total Score	Identidade	Similaridade
AAN52347.	stejnobin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	449	209/262 (79%)	228/262 (87%)
AAC13280.	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	437	205/262 (78%)	226/262 (86%)
AAC61838	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	434	204/262 (77%)	225/262 (85%)
ABS12075	thrombin-like serine protease 2	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	432	210/262(80%)	229/262 (87%)
ABS12074.	thrombin-like serine protease 1	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	431	210/262(80%)	230/262 (87%)

Tabela 17. Análise de homologia do cDNA do clone PST7:7e8 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSP mais similares ao cDNA do clone PST7				
ID	Produto	Espécie	Total Score	Identidade
U31417.1	preprotrimubin	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	1903	1281/1399 (91%)
U32937.1	calobin	<i>Agkistrodon ussuriensis</i>	1857	1294/1430 (90%)
D67080.1	TLf3 serine protease	<i>Trimeresurus flavoridis</i>	1812	1268/1403 (90%)
D67082.1	TLg2a serine protease	<i>Trimeresurus gramineus</i>	1783	1272/1414 (89%)
AF336126	thrombin-like serine protease	<i>Gloydius ussuriensis</i>	1779	1269/1411 (89%)

Tabela 18. Análise de homologia da proteína codificada pelo clone PST7:7e8 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSP mais similares a proteína codificada pelo clone PST7:7e8					
ID	Produto	Espécie	Total Score	Identidade	Similaridade
AAQ02904	serine protease CL5	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	432	206/259 (79%)	219/259 (84%)
AAF25008	salmonase	<i>Gloydius halys brevicaudus</i>	429	205/259 (77%)	220/259 (84%)
AAQ02909.1	serine protease CL4	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	425	201/258 (77%)	217/258 (84%)
Q9PTU8	Protease A	<i>Bothrops jararaca</i>	417	202/260 (77%)	219/260 (84%)
AF370124_1	thrombin-like enzyme	<i>Gloydius ussuriensis</i>	412	199/262 (75%)	219/262 (83%)

Tabela 19. Análise de homologia do cDNA do clone PST7:5 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares ao cDNA do clone PST7:5				
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade
D67083.1	TLg2b serine protease	<i>Trimeresurus gramineus</i>	1206	743/786 (94%)
U32937.1	preprotrimubin	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	1194	745/791 (94%)
U32937	calobin	<i>Agkistrodon ussuriensis</i>	1188	755/808 (93%)
D67082.1	TLg2a serine protease	<i>Trimeresurus gramineus</i>	1177	741/790 (93%)
D67080.1	TLf3 serine protease	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	1166	737/788 (93%)

Tabela 20: Análise de homologia da proteína codificada pelo clone PST7:5 comparando-se com seqüências do banco de dados do NCBI.

Cinco seqüências de SVSPs mais similares a proteína codificada pelo clone PST7:5					
ID	Produto	Espécie	Escore total	Identidade	Similaridade
AAC61838	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	275	131/164 (79%)	144/164 (87%)
AAN52347	stejnobin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	274	128/163 (78%)	144/163 (88%)
AAC13280	salmobin	<i>Gloydius halys</i>	272	130/164 (79%)	143/164 (87%)
ABS12075	thrombin-like serine protease 2	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	251	129/163(79%)	144/163 (88%)
ABS12074	thrombin-like serine protease 1	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	251	128/163(78%)	143/163 (87%)

Tabela 21. Análise da organização dos cDNAs Giroxina símile em relação ao gene de Batroxobin.

Gene x cDNA	Exon 1 240 bp	Exon 2 151 bp	Exon 3 260 bp	Exon 4 134 bp	Exon 5 728 bp	Batroxobin Coordenadas
	5'UTR/ATG/PS 101-340	PS/Toxina 2860-3010	Toxina 4775-5034	Toxina 6821-6954	Toxina/stop/3'UTR 7296-8023	
Batroxobin	110-340 1-231 231 bp 100.0% 0 0	2860-3010 232-382 151 bp 100.0% 0 0	4775-5016 383-624 242 bp 99.6% 1 0	6803-6959 625-781 157 bp 90.4% 15 0	7301-8023 782-1504 723 bp 99.9% 1 0	Genômico mRNA Tamanho Identidade Conflitos Deleções
B2:1		2880-3010 1-137 137 bp 76.6% 32 6	4775-5016 138-379 242 bp 74.4% 62 0	6803-6959 380-548 169 bp 68.6% 53 12	7301-7631 549-881 333 bp 88.0% 40 4	Genômico mRNA Tamanho Identidade Conflitos Deleções
GPS:2e5	107-340 31-264 234 bp 90.6% 22 0	2860-3010 265-421 157 bp 79.0% 33 6	4775-5016 422-663 242 bp 74.4% 62 0	6803-6959 664-832 169 bp 68.6% 53 12	7301-7469 833-1001 169 bp 84.0% 27 0	Genômico mRNA Tamanho Identidade Conflitos Deleções
GPS:3e4	102-340 1-239 239 bp 87.9% 29 0	2860-3010 240-396 157 bp 79.0% 33 6	4775-5038 397-660 264 bp 73.9% 69 0	6825-6959 661-807 147 bp 74.1% 38 12	7301-7469 808-976 169 bp 86.4% 23 0	Genômico mRNA Tamanho Identidade Conflitos Deleções
PST7:3	289-340 1-52 52 bp 94.2% 3 0	2860-3010 53-209 157 bp 79.0% 33 6	4775-5016 210-451 242 bp 74.4% 62 0	6803-6959 452-620 169 bp 68.6% 53 12	7301-8024 621-1401 781 bp 83.9% 126 61	Genômico mRNA Tamanho Identidade Conflitos Deleções
PST7:4	289-340 1-52 52 bp 94.2% 3 0	2860-3010 53-209 157 bp 78.3% 34 6	4775-5038 210-473 264 bp 73.9% 69 0	6825-6959 474-620 147 bp 74.1% 38 12	7301-8022 621-1400 780 bp 84.6% 120 60	Genômico mRNA Tamanho Identidade Conflitos Deleções
PST7:5	289-340 1-52 52 bp 94.2% 3 0	2860-3010 53-209 157 bp 79.0% 33 6	4775-5034 210-469 260 74.6% 66 0		7296-8022 470-1255 786 bp 84.4% 123 63	Genômico mRNA Tamanho Identidade Conflitos Deleções
PST7:7e8	289-340 1-52 52 bp 94.2% 3 0	2860-3010 53-200 148 bp 83.1% 25 3	4775-5034 201-460 260 bp 78.8% 55 0	6821-6959 461-611 151 bp 78.1% 33 12	7301-8020 612-1389 778 bp 84.1% 124 62	Genômico mRNA Tamanho Identidade Conflitos Deleções

Tabela 22: Similaridades em porcentagem entre as seqüências de cDNA dos clones de B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:5 e PST7:7e8.

	B 2.1	GPS: 2 e 5	GPS: 3 e 4	PST7: 3	PST7: 4	PST7: 5	PST7: 7 e 8
B 2.1	100,00	99,58	94,16	99,55	94,40	94,86	84,04
GPS: 2 e 5	99,58	100,00	96,09	99,87	94,72	95,16	83,21
GPS: 3 e 4	94,16	96,09	100,00	95,26	99,62	99,69	83,40
PST7: 3	99,55	99,87	95,26	100,00	96,14	96,67	88,45
PST7: 4	94,40	94,72	99,62	96,14	100,00	99,76	88,57
PST7: 5	94,86	95,16	99,69	96,67	99,76	100,00	89,57
PST7: 7 e 8	84,04	83,21	83,40	88,45	88,57	89,57	100,00

Tabela 23: Similaridade em porcentagem das toxinas maduras dos clones B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:7e8.

	B2.1	GPS:2 e 5	GPS:3e4	PST7:3	PST7:4	PST7:7 e 8
B2.1	100,00	99,15	92,0	98,73	91,56	77,21
GPS:2 e 5	99,15	100,00	92,85	99,57	92,01	78,15
GPS:3 e 4	92,00	92,85	100,00	93,27	99,57	77,31
PST7:3	98,73	99,57	93,27	100,00	92,82	78,48
PST7:4	91,56	92,01	99,57	92,82	100,00	77,73
PST7:7 e 8	77,21	78,15	77,31	78,48	77,73	100,00

Tabela 24: Sequências homólogas com mais alto escore de similaridade em relação à toxina madura codificada pelos clones B2.1, GPS:2e5, GPS:3e4, PST7:3, PST7:4, PST7:7e8.

Clones	D	Produto	Especie	EscoreTotal	Identidade	Similaridade
B2.1	Q9PSN3	Bilineobin	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	404	189/237 (79%)	204/237 (86%)
GPS:2 e 5	Q9PSN3	Bilineobin	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	408	190/237 (80%)	205/237 (86%)
GPS:3 e 4	AAN52347	Stejnobin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	405	186/237 (78%)	204/237 (86%)
PST7:3	Q9PSN3	Bilineobin	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	406	190/237 (80%)	205/237 (86%)
PST7:4	AAN52347	Stejnobin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	405	186/238 (78%)	204/238 (85%)
PST7:7 e 8	AAQ02904	serine protease CL5 precursor	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	389	183/235 (77%)	195/235 (82%)

Tabela 25: Concentração do RNA total isolado das amostras dos clones de célula CHO-DXB11 x pED-Giro na presença ou ausência de MTX para RT-PCR e da célula controle negativo CHO-DXB11 *dhfr*⁻.

Amostras	Concentração total (ng/ μ L)	Concentração (μ g) utilizada em 8 μ L no RT-PCR
Clone 4	206	1,6
Clone 4 + 20nM MTX	675	5,4
Clone 6	494	3,9
Clone 6 + 320nM MTX	326	2,6
CHO-DXB11 <i>dhfr</i> ⁻	1405	11,2

abela 26. Quantificação de proteína e atividade específica da proteína recombinante antes e após a purificação por resina de afinidade benzamidina-sepharose.

	Amostras	Volume da amostra (mL)	mg/mL	Atividade U/2 µg	Atividade U/mL	Atividade Total	Ativ. Específica U/mg proteína
A	Célula COS-7 controle antes BZ	1	0,6186	0,0000	0	0,0	0
B	Célula COS-7 x pED Giro antes BZ	2	1,1477	0,0000	0	0,0	0
C	Célula COS-7 controle após BZ	0,25	0,0010	0,0140	0,0070	0,0	7
D	Célula COS-7 x pED-Giro após BZ	0,5	0,0072	0,1120	0,4056	0,2	56
E	Meio de cultura controle negativo antes BZ	9	1,7087	0,0000	0	0,0	0
F	Meio de um cultivo de 24h COS-7 x pED-Giro antes BZ	19	1,5415	0,0370	28,5171	541,8	18,5
G	Meio de um cultivo de 48h COS-7 x pED-Giro antes BZ	20	1,4814	0,0000	0	0,0	0
H	Meio de cultura controle negativo após BZ	0,187	0,0513	0,0140	0,3588	0,1	7
I	Meio de um cultivo de 24h COS-7 x pED-Giro após BZ	0,25	0,0555	0,0669	1,8573	0,5	33,45
J	Meio de um cultivo de 48h COS-7 x pED-Giro após BZ	0,25	0,0321	0,0620	0,9949	0,2	31

9 APÊNDICES

9.1. Protocolos de Biologia Molecular

9.1.1- Eletroforese em gel de agarose.

Os géis de agarose a 1% e/ou 1,5%, de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA são realizados, aquecendo-se a agarose em 1X tampão TAE (Tris/Acetato/EDTA:40mM de Tris Base, 20 mM de ácido acético glacial e 1 mM de EDTA pH 8,0) sob completa dissolução. Após a agarose polimerizar, realiza-se a eletroforese juntamente com o marcador de DNA, em tampão TAE com brometo de etídio (0,5 µg/mL) a 50V. O gel é visualizado no Image Master VDS.

9.1.2-Reação de ligação

9.1.2.1-Topoisomerase (pCR2.1TOPO).

As reações de ligação foram realizadas incubando-se 30 minutos a temperatura ambiente, o produto de PCR (inserto) contendo terminações 5'-desoxiadenosina com o vetor pCR2.1TOPO com terminações 3'-timidina conjugada à enzima topoisomerase I. A proporção molar utilizada é 3:1 (inserto: vetor), em uma solução de concentração final de 200 mM NaCl e 10 mM MgCl₂ para transformar bactérias quimicamente competentes. No caso de serem usadas bactérias eletrocompetentes a ligação é realizada em uma solução de baixa concentração salina (50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂).

9.1.2.2- T4 DNA ligase.

A reação de ligação é realizada utilizando-se a enzima T4 DNA ligase e 1mM de ATP em um tampão de acordo com as especificações do fabricante e o DNA na proporção picomolar de 3:1 e/ou 1:1 (inserto/vetor). Como controle da reação, utiliza-se 1µL do vetor não recombinante nas mesmas condições, com exceção do inserto.

A reação é incubada a 4°C por 16 horas. Após esse período a enzima é inativada a 65°C por 10 minutos.

9.1.3- Métodos de transformação.

9.1.3.1-Bactérias competentes.

O preparo de bactérias quimicamente ultra competentes foi baseado no método de INOUE *et al* 1990 e o preparo de bactérias eletrocompetentes foi baseado no método descrito em SAMBROOK & RUSSELL, 2001.

9.1.3.2-Método de transformação por eletroporação.

Incubam-se 2 μ L de ligação em 80 μ L de bactérias eletrocompetentes e coloca-se a mistura na cubeta de eletroporação. Ao colocar a cubeta no eletroporador, aplica-se tensão com os seguintes parâmetros: voltagem de 1500V, resistência de 25 Ω e corrente de 25mA por 1 pulso de aproximadamente 1 segundo.

9.1.3.3-Método de transformação por choque térmico.

Adicionam-se 2 μ L do produto de ligação em 80 μ L de bactérias quimicamente competentes e mistura-se gentilmente. Incuba-se no gelo por 30 minutos. Dá-se um choque térmico nas células por 30 segundos a 42°C e transfere-se imediatamente para o gelo por 5 minutos.

9.1.4- Isolamento de colônias transformantes

Após a transformação por um dos métodos descritos, adicionam-se 400 μ L de meio SOC e incuba-se a 37°C, a 200 rpm por 1 hora. Espalham-se 50 μ L, 100 μ L e 200 μ L de cultura bacteriana em placas seletivas de LB^{AMP}-água contendo ou não X-gal/IPTG.

9.1.5- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para clonagens.

Uma reação de PCR com um volume final de 25 μ L contém: 0,2 μ M de cada *primer* específico, 1 a 5U/100 μ L de *Taq* DNA polimerase Recombinante ou Platinum 5U/ μ L, 0,2mM da mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2mM de MgCl₂, 100ng do DNA molde, não ultrapassando 10% do volume final em um tampão de acordo com as especificações do fabricante.

As reações de PCR são feitas em um termociclador térmico (Perkin Elmer 9600) por 94°C por 5 minutos, 10 ciclos de 94°C por 45 segundos, para denaturar o DNA molde, 52°C por 45 segundos para o anelamento dos

primers, 72°C por 1 minuto para polimerização; 25 ciclos de 94°C por 45 segundos, 42°C por 45 segundos para o anelamento dos *primers*, 72°C por 1 minuto. Ao final dos ciclos de polimerização a reação é finalizada por um ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos e mantidas a 4°C até a análise em gel de agarose.

9.1.6- Purificação por fenol/clorofórmio e precipitação do DNA.

O DNA é purificado, acrescentando-se 0,5 x de fenol equilibrado (tamponado em Tris HCl pH 8,0) e 0,5 x clorofórmio. Após a centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos é retirado o sobrenadante e para precipitar o DNA, acrescenta-se 0,1 x acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5 x álcool etílico 100%. Após 20 minutos no gelo, centrifuga-se a 14.000 rpm por 5 minutos, descarta-se o sobrenadante e acrescentam-se 500 µL de álcool etílico a 70% para realizar a lavagem do DNA precipitado, centrifuga-se novamente a 14.000 rpm por 5 minutos e ressuspende-se em água no volume desejado.

9.1.7- Seleção dos clones recombinantes

9.1.7.1- por α -complementação.

Quando for adequado ao tipo de vetor, colônias recombinantes (brancas) são selecionadas das colônias não recombinantes (azuis) em placas de meio seletivo LB^{AMP}/X-gal e IPTG ágar.

9.1.7.2-Por tamanho do plasmídeo recombinante.

Quando for adequado, os plasmídeos recombinantes foram identificados pelo seu tamanho aparente de migração em gel de agarose em comparação com o plasmídeo não recombinante, segundo o método descrito por BEUKEN *et al*, 1998.

Selecionam-se colônias isoladas de bactérias transformadas com o plasmídeo recombinante produto da ligação vetor e inserto. Como controle utiliza-se uma colônia bacteriana transformada com o vetor vazio não recombinante. As colônias selecionadas são cultivadas em 3mL de meio líquido LB^{AMP} à 37°C durante a noite em 200 rotações por minutos.

Retiram-se 150 μL do meio de cultura e centrifuga-se por 20 segundos a 14.000 rpm. O sobrenadante é transferido para um novo tubo de centrifuga e acrescentam-se 40 μL da solução 0,1% de azul de bromofenol, 6% de sacarose e 14 μL de uma solução de fenol equilibrado pH 8,0 e clorofórmio (1:1).

Homogeiniza-se as amostras utilizando-se o vórtex e após lisar as células as amostras são centrifugadas por 3 minutos a 14.000 rpm. Aplica-se 10 μL da fase superior (aquosa) em um gel de agarose 1,5%, juntamente com um marcador de DNA. Em cada extremidade do gel aplica-se uma amostra controle de DNA do respectivo plasmídeo não recombinante e uma alíquota da suspensão bacteriana correspondente ao vetor vazio.

9.1.7.3-Por PCR de colônias.

A reação em cadeia da polimerase de colônias transformadas com o produto de ligação vetor-inserto são cultivadas em 3 mL de meio líquido LB^{AMP}. É realizado o PCR de colônias, na qual cada reação de PCR (15 μL) contém 0,2 μM dos *primers* específicos, (1 a 5U/100 μL) de *Taq* DNA polimerase Recombinante 5U/ μL , 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo - dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 2mM de MgCl₂, 1,5 μL do DNA molde (suspensão da cultura bacteriana), não ultrapassando 10% do volume final em um tampão de acordo com as especificações do fabricante.

A reação é de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto, 72°C por 90 segundos. Ao final dos ciclos de polimerização a reação é finalizada por um ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos e mantidas a 4°C até a análise em gel de agarose.

9.1.7.4-Por mapa de restrição.

Os possíveis plasmídeos recombinantes selecionados por tamanho ou por PCR, após a extração do DNA plasmidial, podem ser confirmados após a digestão com as enzimas adequadas seguindo as instruções do fabricante, realiza-se a eletroforese em gel de agarose 1,5%, juntamente com um marcador de DNA. O tamanho dos fragmentos resultantes da digestão dos plasmídeos recombinantes deverá estar de acordo com o mapa de restrição.

9.1.8- Preparação de DNA plasmidial e purificação do DNA em gel de agarose.

Foram utilizados kits de Miniprep pelo método de lise alcalina e o DNA foi purificado do gel de agarose utilizando-se os protocolos dos kits.

Os plasmídeos preparados por estes métodos foram utilizados como molde para PCR, para clonagens e subclonagens, para seqüenciamento e para transfecção em células de mamíferos.

9.2- Meios de Cultura.

9.2.1-Meio líquido

9.2.1.1- LB (Meio *Luria Bertani*)

O meio LB é composto de triptona (10g/L), extrato de levedo (5g/L) e NaCl (10g/L), o pH final deverá ser ajustado para 7,0 com NaOH 0,1N. O meio deve ser esterilizado por autoclave e estocado a temperatura ambiente.

9.2.1.2-LB^{AMP}

Este meio de cultura seletivo é o meio LB acrescido de 50 µg/mL de ampicilina.

As colônias recombinantes são cultivadas nesse meio de cultura durante a noite, 37°C e com 200 rotações por minutos (rpm).

9.2.1.3-SOB e SOC

O meio SOB consiste de 20 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedo, 0,5 g/L de NaCl. Acrescentam-se 2,5mM de KCl e o pH é ajustado para 7,0 com 5N de NaOH. O meio é esterilizado por autoclave e antes de usar, acrescenta-se 10 mM de MgCl₂. O meio SOC é o meio SOB acrescido de 20 mM de glicose.

9.2.2-Meios sólidos.

9.2.2.1- LB-ágar.

Este meio sólido é o meio LB acrescido de 15 g/L de ágar e o pH final deverá ser ajustado para 7,0. O meio deve ser esterilizado por autoclave. Espera-se esfriar até cerca de 50°C e distribui aproximadamente 30 mL de meio em placas de 50 cm² em superfície plana nivelada e espera-se solidificar. Estocar a 4°C por até 1 mês.

9.2.2.2-LB^{AMP}- Agar.

Este meio de cultura seletivo é o LB-ágar acrescido de 50 µg/mL de ampicilina acrescentada antes da solidificação a uma temperatura aproximada de 46°C.

9.2.2.3- LB^{AMP} /X-gal e IPTG ágar.

Este meio de cultura seletivo é o LB^{AMP} acrescido de 20 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosidase) e 0,1 mM de IPTG (isopropyl-β-D-tio-galactosidase) antes da solidificação a uma temperatura aproximada de 46°C. Com este meio realiza-se a seleção dos clones recombinantes por α-complementação.

9.2.2.4-Meio YT.

Este meio de cultura é composto por triptona 8 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 2,5g/L.

9.3- Enzimas.

Na tabela 4 encontram-se as enzimas de restrição, de modificação e amplificação de DNA. Os ensaios enzimáticos seguiram as condições de reação de acordo com as instruções do fabricante. Quando necessário as enzimas de restrição foram inativadas por calor a 65°C por 20 minutos e a enzima de modificação a 70°C por 10 minutos ou foram inativadas segundo o protocolo purificação por fenol/clorofórmio seguido da precipitação do DNA.

9.4-Vetores.

9.4.1- Vetor pCR2.1 TOPO.

O vetor pCR2.1 TOPO promove uma elevada eficiência de recombinação, sendo um passo de estratégia de clonagem. A partir do produto de PCR amplificado pela TaqDNA polimerase realiza-se uma inserção direta do amplicom nesse vetor, não sendo necessária utilizar a enzima T4 DNA ligase.

Esse vetor é fornecido linearizado com extremidades coesivas contendo uma timidina (T) a 3' e a topoisomerase é covalentemente ligado ao vetor, tornando-o ativo. A enzima Taq polimerase é capaz de adicionar uma adenina (A) na extremidade 3' do produto de PCR. A topoisomerase I do vírus *Vaccinia* cliva a cadeia fosfodiéster promovendo a ligação do inserto ao vetor.

Esse vetor apresenta o gene completo do LacZ α no sítio de clonagem, gene para resistência aos antibióticos ampicilina e kanamicina. O gene lacZ codifica para a enzima β -galactosidase. Essa enzima normalmente cliva dissacarídeos, como lactose em monossacarídeos, mas pode clivar o substrato cromogênico artificial 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosidase (X-gal), sendo possível rastrear a produção da β -galactosidase nas bactérias em placas contendo X-gal e o indutor do gene lacZ -IPTG (isopropyl- β -D-tiogalactosidase). Em uma placa contendo X-gal, IPTG e ampicilina, as colônias que crescerem apresentam resistência a ampicilina devido a presença do plasmídeo. Colônias que contém o plasmídeo sem o inserto (produto do PCR) serão lacZ⁺ e azuis, já as colônias que contém o plasmídeo com o inserto rompendo o gene lacZ serão lacZ⁻ e brancas. A vantagem de se utilizar esse vetor é que devido à ação da topoisomerase I, a quantidade de recombinantes sem inserto é muito reduzida.

9.4.2- Vetor pSecTag2HygroA.

O vetor pSecTag2HygroA é um vetor de expressão e secreção da proteína recombinante em célula de mamífero. A proteína expressa é fusionada com o peptídeo sinal Ig kappa murina promovendo a secreção da proteína e apresenta um peptídeo no C-terminal com o epítipo de *c-myc* e seis resíduos de histidina *in tandem* para detecção e purificação.

Esse vetor apresenta algumas características: o promotor de citomegalovírus humano (CMV) permite uma alta eficiência e elevada expressão da proteína recombinante, o promotor T7/*priming site* permite a transcrição *in vitro* no sentido sense (5' → 3') formando ssDNA que permite seqüenciar o inserto clonado, o códon de início ATG permite o início da tradução da proteína fusionada com o peptídeo sinal Ig kappa murina, o peptídeo sinal Ig kappa murina permite a secreção da proteína fusionada, o sítio de múltipla clonagem permitirá a inserção do gene de interesse, a proteína *c-myc* permite a detecção da proteína fusionada com o anticorpo *anti-myc*, a cauda de polihistidina facilita a purificação pois as histidinas apresentam alta afinidade pela resina quelante de Ni^{2+} , o pcDNA3.1/BGH *reverse priming site* permite sequenciar através do inserto, o sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) é uma terminação eficiente da transcrição e poliadenilação do mRNA, origem f1 permite resgatar DNA de fita simples, a origem e o promotor de SV40 permite uma eficiente e elevada expressão do gene da resistência para higromicina e replicação epissomal em células que expressam o antígeno T SV40, o gene para resistência a higromicina seleciona os clones estáveis em uma transfecção permanente em célula de mamífero, o sinal de poliadenilação SV-40, permite uma terminação da transcrição eficientemente e poliadenilação do RNAm, origem pUC permite uma replicação com um elevado número de cópias em *E.coli* e o gene para resistência a ampicilina (β -lactamase) permite a seleção em *E.coli*.

9.4.3- Vetor pED.

O plasmídeo pED é um vetor na qual o gene do produto de interesse é clonado em fusão com o gene do *dhfr* (dihidrofolato redutase), sendo um vetor eficiente para expressão transiente em células de mamíferos e sendo principalmente usado para transfecção estável, na qual o plasmídeo se integra no cromossomo da célula hospedeira. Este vetor apresenta um sítio interno de ligação aos ribossomos (IRES) isolado do vírus da encefalomiocardite (EMC) entre o gene de interesse e a fusão com o gene de *dhfr*. A presença do fragmento EMC em construções dicistrônicas possibilita obter altos

rendimentos proteicos que se mantêm estáveis mesmo na ausência dos respectivos agentes de seleção/amplificação. Os vetores construídos com essa modificação estão menos sujeitos a deleções ou rearranjos de DNA sendo úteis para obter altos níveis de expressão de genes heterólogos em células eucariotas

Este vetor apresenta origem de replicação do vírus SV40 e o elemento ativador da transcrição (SV40); promotor derivado do adenovírus (AdMLP); sequência "leader" derivada do adenovírus (AdTLP); um íntron híbrido composto pela sequência 5'leader não traduzida derivada do adenovírus e uma sequência 3' do gene da imunoglobulina (IVS); região 5' "leader" não traduzida do vírus da encelamomioscardite (ECM-L); região que codifica da enzima diidrofolato redutase murina (DHFR); região de poliadenilação do SV40 (SV40pa). (KAUFMAN, 2000).

A origem de replicação do vírus simian SV 40 promove uma grande quantidade de cópias nas células COS-1 e utiliza o promotor do adenovírus para iniciar a transcrição. A expressão do mRNA dicistrônico deste vetor pode ser utilizado para selecionar a expressão do DHFR em células deficientes em *dhfr*, como a célula CHO-DXB11 *dhfr*⁻. O *dhfr* é uma marca de seleção amplamente utilizada; cataliza a conversão do folato para o tetrafolato (FH4). O FH4 é necessário para a biossíntese da glicina a partir de serina, para a biossíntese de timidina monofosfatada e para síntese de purinas. O MTX (metotrexato) é um análogo do ácido fólico, na qual se liga e inibe a ação da DHFR levando a célula a morte. Quando as células são selecionadas e aumenta-se a concentração de MTX, a população que sobrevive contém elevados níveis de DHFR que resulta da amplificação do gene *dhfr*, conseguindo dessa forma um elevado nível de expressão (5 a 20 µg/ml) (KAUFMAN, 1990, KAUFMAN 2000).

9.5- Seqüenciamento.

Os plasmídeos recombinantes foram amplificados em bactérias competentes *E.coli* TOP 10 ou DH5α-T1R e purificados com o kit de Miniprep pelo método de lise alcalina *S.N.A.PTM Miniprep kit* (Invitrogen). Após

quantificar o DNA no espectrofotômetro em uma absorbância 260 nm, o DNA foi diluído para uma concentração de 100 ng/μL.

Para realizar o sequenciamento no Centro de Estudo do Genoma Humano⁽¹⁾ os plasmídeos que apresentam um tamanho de até 4kb serão utilizados 200 ng/μL de DNA. Para plasmídeos que apresentam um tamanho de 5 e 6kb serão utilizados respectivamente 250 e 300 ng/μl de DNA. São utilizadas as seguintes quantidades de reagentes por reação: 4 μL do reagente *DyEnamic ET Terminator premix*, 1 μL do primer (5 pmol/ μL), e uma quantidade do plasmídeo equivalente a 200 ng/μL até 300 ng/μl de acordo com o seu tamanho, água deionizada MilliQ (18MΩ) para o volume final de 10 μL.

As condições de termociclagem são: 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 20 segundos; anelamento dos primers na temperatura (°C) de acordo com o seu T_m por 15 segundos e a polimerização a 60°C por 1 minuto e 15 segundos.

Após reação o DNA foi precipitado com o seguinte protocolo: adicionando-se 1 μL de Acetato de Amônio 7,5M e 28 μL de Etanol 100% a cada reação. Agitar os tubos para homogeneizar. A concentração final do Etanol deve ser 70%. Manter os tubos à temperatura ambiente por 15 minutos (em ambiente escuro). Centrifugar os tubos à temperatura ambiente em microcentrífuga por 15 minutos em rotação máxima (aproximadamente 13.000 rpm). Remover o sobrenadante por aspiração (utilize micropipeta). Adicionar 170 μL de Etanol 70% para lavar o *pellet*. Centrifugar nas mesmas condições descritas anteriormente. Remover o sobrenadante por aspiração e deixe o *pellet* secar ao ar (em ambiente escuro). Ressuspender o *pellet* em 20 μL de Loading Solution. Homogeneizar o tubo e manter a 4°C protegido da luz. O seqüenciamento é realizado em sequenciador automático *MegaBACE 1000*, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia *GE Healthcare* de acordo com o protocolo para *MegaBACE 1000* utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator* kit com *Thermo Sequenase™ II* DNA Polimerase) código US81090. As sequências são analisadas pelo *software Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron 3.12*.

¹ <http://genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento.php>

9.6- Análise de proteína.

9.6.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

A análise em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi baseada em LAEMMLI, 1970. As amostras foram dissolvidas em 1x tampão de amostra SDS-PAGE contendo 1% β ME (β mercaptoetanol) e fervidas por 10 minutos, imediatamente antes da aplicação no gel. Para tanto, foi utilizado gel a 15%, medindo 5,5 x 8,5 cm, corrente constante a 90 V e temperatura ambiente. A fixação e coloração foi feita segundo a técnica com *Coomassie Blue R 250* a 0,25% dissolvido em metanol 50%/ácido acético 10%. Para a análise em *Western blot* não foi feita a fixação ou coloração, pois logo após a corrida da eletroforese as amostras começaram a ser transferidas para a membrana de nitrocelulose.

9.6.2- Western Blots.

Os *Western blots* usaram o soro eqüino anti-crotálico do Instituto Butantan. De maneira geral, os protocolos de *western blot* seguiram o protocolo descrito por AUSUBEL *et al*, 1989. Os SDS-PAGEs contendo os extratos celulares e os meios de cultura foram eletrotransferidos em sistema semi-seco para uma membrana de nitrocelulose. O tampão de transferência utilizado foi Tris-HCl 0,94mol/L pH 8,8; glicina 0,33mol/L; SDS 1,5% contendo 10% de metanol. A transferência foi feita com uma corrente de 0,8mA/cm² de gel por 45 minutos. A membrana foi corada com Poceau S 5%, ácido acético 1% por 5 minutos, lavada com água destilada e as posições das canaletas foram marcadas. O padrão de peso molecular utilizado foi o *Low-Range Rainbow Molecular Weight Marker*. O bloqueio foi realizado com TTBS (100mM Tris-HCl pH 7,5; 0,9% NaCl; 0,1% de Tween-20) e 10% de leite em pó desnatado MOLICO por 1 hora.

Como anticorpo primário foi utilizado o soro equinos anti-crotálico (Instituto Butantan) incubando as membranas de nitrocelulose durante a noite numa diluição de 1:1000 em TTBS. No dia seguinte, foram realizadas 4 lavagens de 50ml com TTBS de 10 minutos cada. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG biotinilada eqüina feito em coelho (Sigma) diluído 1:2000

em TTBS. A membrana foi incubada 2h com esse anticorpo. Repetiram-se as lavagens TTBS e por fim a membrana foi lavada com 50ml TBS (TTBS na ausência do Tween 20) por 15 minutos. Para revelar a membrana foi utilizado peroxidase e luminol segundo as especificações do fabricante (kit *ECL + PLUS-Western blotting detection system*).

10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES DA SILVA, J.A, MURAMOTO, E, RIBELA,M.T.C.P, ROGERO,J.R, CAMILLO, M.A.P. Biodistribution of gyroxin using ^{125}I as radiotracer. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.269, n.3, p. 579-583, 2006.
- ALEXANDER, G., GROTHUSEN, J., ZEPEDA, H. & SCHWARTZMAN, R.J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n.10, p. 953-960, 1988.
- AMARAL, A. In.**Serpentes do Brasil: iconografia colorida**. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1978.
- AMICONI, G., AMORESANO, A., BOUMIS, G., BRANCACCIO, A., DE CRISTOFARO, R., DE PASCALIS, A., DI GIROLAMO, S., MARAS, B., SCALONI, A. A Novel Venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: Evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from Thrombin. **Biochemistry**, v. 39, p. 10294-10308, 2000.
- AROCAS, V, CASTRO,H.C,ZINGALI R.B,GUILLIN, M.C, JANDROT-PERRUS, M, BON,C, WISNER,A. Molecular cloning and expression of bothrojaracin, a potent thrombin inhibitor from snake venom. **Eur. J. Biochem.**, v.248, n.2, p. 550-557, 1997.
- ARRUDA PAES, P.C, CAMILLO, M.A P.,ROGERO,J.R. Estudo da ação das toxinas semelhantes à trombina dos venenos de cascavel e surucucu sobre fibrinogênio e plaquetas. **ANAIS DO VI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, Ponta Grossa, PR, 1996.
- AUSUBEL,F.M.,BRENT,R.,KINGSTON,R.E.,MOORE,D.D.,SEIDMAN,J. D.SMITH,J.A.,STRUHL,K. **Current Protocols in Molecular Biology**, v.1, suppl.24 .John Willey & Sons N.Y, 1989.
- BARRABIN, H., MARTIARENA, J.L., VIDAL, J.C., BARRIO, A. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: ROSEMBERG, P. **Toxins: Animals, Plant and Microbial**. New York, USA, Pergamon Press, p. 113-133, 1978.
- BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol. Latinoamer.**, v.11, p. 224, 1961

BERCOVICI,D.,CHUDZINISKI,A.M.,DIAS,W.O,STEVES,M.I.,HIRAICHI, E., OISHI,N.Y., PICARELLI,Z.P., ROCHA,M.C., UEDA,C.M.P.M., YAMANOUYE,N., RAW,I. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem.Inst.Butantan**, v.49,n.3,p.69-78,1987.

BEUKEN,E.,VINK,C.,BRUGGEMAN,C.A. One step procedure for screening recombinant plasmids by size. **BioTechniques**,v.24, p.748-750, 1998.

BJARNASON J.B., BARISH A., DIRENZO G.S., CAMPBELL R., FOX J.W. Kallikrein-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.** v. 258, p.12566-12573, 1983.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dyue binding – **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254. 1976.

BRATTSTROM, B.H. Evolution of the pit vipers. **Transactions of the San Diego Society of Natural History**, v. 13, nº11, p. 185-268, 1964.

BURKHART W., SIMTH G.F.H., SU J.-L., PARIKH I., LEVINE H. I.I.I. Amino acid sequence determination of ancrod, the thrombin-like alpha-fibrinogenase from the venom of *Akistrodon rhodostoma*. **FEBS Lett.** v. 297, p.297-301, 1992.

CAMILLO, M.A.P. **Contribuição ao estudo das giroxinas (enzimas semelhantes à trombina) dos venenos das serpentes brasileiras *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus***.1998 Tese (Doutorado)- Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, São Paulo.

CAMILLO,M.AP., ARRUDA PAES,P.C., TRONCONE, L.R.P.,ROGERO,J.R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon**,v.39,p.843-853, 2001.

CAMILLO, M.A.P, ALVES DA SILVA, J.A., YONAMINE, C.M, HASHIZUME, J. L, CASARE, M.S, HIGA, O. Z. Biological activity and structural alterations in gyroxin induced by gamma radiation. **In: International Nuclear Atlantic Conference Proceedings of VII ENAN. Brazilian Association for Nuclear Energy- ABEN**, Santos-SP, p. 1845-1850, 2005.

CASTRO, H.C., ZINGALI, R.B., ALBUQUERQUE, M.G., PUJOL-LUZ, M., RODRIGUES, C.R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell. Mol. Life. Sci**, v. 61, p. 843-856, 2004.

- CHARBONNIER, F., GASPERA, B.D., ARMAND, A.S., VAN DER LAARSE, W.J., LAUNAY, T., BECKER, C., GALLIEN, C.L., CHANOINE, C. Two myogenin-related genes are differentially expressed in *Xenopus laevis* myogenesis and differ in their ability to transactivate muscle structural genes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 2, p. 1139-1147, 2002.
- CHURA-CHAMBI, R.M., TORNIERI, P.H., SPENCER, P.J., NASCIMENTO, P.A., MATHOR, M.B., MORGANTI, L. High-level synthesis of recombinant murine endostatin in Chinese hamster ovary cells. **Protein Expression and Purification**, v.35, p.11-16, 2004.
- DA SILVA, N.J., AIRD, S.D. SEEBART, C., KAISER, I.I. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). **Toxicon**, v.27, n.7, p.763-771, 1989.
- DESHIMARU, M., OGAWA, T., NAKASHIMA, K.I., NOBUHISA, I., CHIJIWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y., FUKUMAKI, Y., NIWA, M., YAMASHINA, I., HATTORISO HNO, M. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. **FEBS Letters**, v.397, p.83-88, 1996.
- DOSSIN, F.M & SCHENKAN, S. Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot Cell**. v.4, n.5, p.960-70, 2005.
- EWING B, Hillier L, WENDL M, GREEN P: Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, P.175-185, 1998.
- FAN C., QIAN Y., GONG Y., YANG S. Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the cDNA of thrombin like enzyme (pallabin) from *Agkistrodon halys pallas*. **Biochem. Mol. Biol.** v.47, p.217-225, 1999.
- FILIPPOVICH, I, SOROKINA, N, ST PIERRE, L, FLIGHT, S, De JERSEY, J, PERRY, N, MASCI, P.P, LAVIN, M.F. Cloning and functional expression of venom prothrombin activator protease from *Pseudonaja textilis* with whole blood procoagulant activity. **Br. J. Haematol**, v.131, n.2, p. 237-246, 2005.
- FELSENSTEIN, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics**, v. 5, p.164-166, 1989.
- GARCÍA, L.T., PARREIRAS E SILVA, L.T; RAMOS, O.H.P; CARMONA, A.K, BERSANETTI, P.A; SELISTRE-DE -ARAÚJO, H.S. The effect of post translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.138, p.23-32, 2004.
- GRAHAM, F.L & VAN DER EB, A.G. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. **Virology**, v. 54, p. 536-539, 1973.

- GONÇALVES, J.M., VIEIRA, L.G. Estudos sobre veneno de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. **Annais.Acad.Bras.Cienc.**, v.22, n.1, p.141-149, 1950.
- GOOCHEE, C.F., GRAMER, M.J., ANDERSEN, D.C., BAHR, J.B., RASMUSSEN, J.R. Review: The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. **Biotechnology**, v.9, p.1347-1355, 1991.
- GUEx, N & PEITSCH, M.C. Swiss Model and Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n.15, p. 2714-2723, 1997.
- GUO, Y.W, CHANG, T.Y, LIN, K. T, LIU, H.W, SHIH, K. C, CHENG, S.H. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a beta-fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). **Protein Expr. Purif**, v. 23, n. 3, p. 483-490, 2001.
- GUTBERLET JR, R. L. & CAMPBELL, J. A.: **Generic recognition for a neglected lineage of South American pitvipers (Squamata: Viperidae: Crotalinae), with the description of a new species from the Colombian Chacó.**—American Museum Novitates. v.3316, p.1-15, 2001.
- HAHN, B.S, YANG, K.Y, PARK, E.M, CHANG, I.M, KIM, Y.S. Purification and molecular cloning of calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). **J. Biochem** (Tokyo) v.119, n. 5, p. 835-843, 1996.
- HAHN B.-S., BAEK K., KIM W.-S., LEE C.-S., CHANG I.-L., KIM Y.-S.. Molecular cloning of capillary permeability-increasing enzyme-2 from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). **Toxicon** v.36, p. 887-1893, 1998.
- HASHIZUME, J.L, CAMILLO, M. A. P. Ação da gioxina em células endoteliais em cultura. In: **13 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. Resumos do 13 SIICUSP-Ribeirão Preto/SP**. v. 1. p. 3806-3806, 2005.
- HENSCHEN-EDMAN, A.H., THEODOR, I., EDWARDS, B.F., PIRKLE, H. Crotalase, a fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. **Thromb. Haemost.**, v. 81, n. 1, p. 81-86, 1999.
- HUANG, Q., LIU, S., TANG, Y. Refined 1.6-Å resolution crystal structure of the complex formed between porcine beta-trypsin and MCTI-A, a trypsin inhibitor of the squash family. Detailed comparison with bovine beta-trypsin and its complex. **J. Mol. Biol.** v. 229, p.1022-1030, 1993.

- HUNG,C.C & CHIOU,S.H. Expression of a kallikrein-like protease from the snake venom: engineering of autocatalytic site in the fusion protein to facilitate protein refolding. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, v.275,p.924-930,2000.
- HUNG C.-C., HUANG K.F., CHIOU S.-H. Characterization of one novel venom protease with beta-fibrinogenase activity from the Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*):purification and cDNA sequence analysis.**Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.205, p.1707-1715, 1994.
- INOUE, H.,NOJIMA, H.,OKAYAMA,H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**. v.96, p.23-28, 1990.
- ITOH, N., TANAKA, N., FUNAKOSHI, I., KAWASAKI, T., MIHASHI, S., YAMASHINA, I. The complete nucleotide sequence of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **Nucleic Acids Res.**,v 16, n. 21, p.10377-10378,1988.
- ITOH,N., TANAKA,N., MIHASHI,S., YAMASHINA,I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme **J. Biol. Chem.**, v. 262,n. 7, p. 3132-3135, 1987.
- KAUFMAN,R.J. Strategies for obtaining high level expression in mammalian cells. Technique- **A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology**., v.2, n.5, p.221-236, 1990.
- KAUFMAN, R.J. Gene amplification in mammalian cells. Marcel Dekker, Inc. 1992. cap.25- **Amplification and Expression of Transfected Genes in Mammalian Cells**, p. 315-342.
- KAUFMAN,R.J. Overview of vector design for mammalian gene expression. **Molecular Biotechnology**., v.16, p.151-160, 2000.
- KAWASAKI, E.S. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc.1990. cap.18- **Sample preparation from blood, cells and other fluids**.p.146-152.
- KINI, R.M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.**, v.397, p.377-387, 2006.
- KIMICHI-SARFATY,C., MI OH.J., KIM, I-W., SAUNA, Z.E, CALCAGNO, A.M, AMBUDKAR, S.V., GOTTESMA, M.M. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrat specificity. **Science Express**, December 21, 2006.
- KOH, D.C.I. ARMUGAN, A; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life. Sci**, v.63, p.3030-3041, 2006.

- KOMORI Y, NIKAI T, OHARA A, YAGIHASHI S, SUGIHARA H. Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (*Agkistrodon bilineatus*). **Toxicon**, v.31, n.3, p.257-270, 1993.
- KREM, M.M & ROSE,T.,DI CERA, E. The C- terminal sequence encodes function in serine proteases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.40, p.28063-28066, 1999.
- KRUSE,H., GREIDANUS,V.W.Tj.B. & DE WIED, D. Barrel rotation induced by vasopressin and related peptides in rats. Pharmacol. **Biochem. Behav.**, v.7, p.311-313, 1977.
- KUNKEL, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**,v.82, p. 488-492,1985.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** (London), v.227, p.680-685, 1970.
- LEWIN,B. **Genes V**. USA, Oxford University Press and Cell Press, 1994.
- LOCHNIT,G & GEYER,R. Carbohydrate structure analysis of batroxobin, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. **Eur. J.Biochem**, v.228, p.805-816, 1995.
- MAEDA, M., SATOH, S., SUZUKI,S., NIWA, M., ITOH, N., YAMASHINA, I. Expression of cDNA for batroxobin, a thrombin-like enzyme. **J. Biochem.**,v. 109, p.632-637, 1991.
- MAGALHAES A., CAMPOS-BRASIL DA FONSECA B., RIBEIRO DINIZ C., GILROY J., RICHARSON M. The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme/gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*).**FEBS Lett.** v. 329, p.116-120, 1993.
- MARKLAND,F.S. Fibrin(ogen)olytic enzymes from snake venoms. In: PIRKLE,H. & MARKLAND Jr.,F.S. **Hemostasis and animal venoms**. New York, USA, Marcel Dekker Inc.,p.149-172, 1988.
- MARKLAND, F.S. Review: Snake venom and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12,p. 1749-1800. 1998.
- MARSH, N.A. Use of snake venom fractions in the coagulation laboratory. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 9, p. 395-404, 1998.
- MASSOVA, I., PIRKLE, H., EDWARDS, B.F.P., MOBASHERY, S. Insights into the three-dimensional structure of crotalase: implications for biological activity and substrate specificity. **Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.**, v. 7, n. 24, p. 3144, 1997.

- MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochemical et Biophysica Acta**. v. 1477, p. 146-156. 2000.
- MATSUI,T., SAKURAI,Y., FUJIMURA,Y., HAYASHI,I. OH-ISHI,S., SUZUKI,M., HAMAKO,J., YAMAMOTO,Y., YAMAZAKI,J., KINOSHITA,M., TITANI,K. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. **Eur.J.Biochem.**, v.252, p.569-575, 1998.
- MATTISON,C. **The Encyclopedia of Snakes**. Facts On File, Inc. New York, 1995.
- MCMULLEN B.A., FUJIKAWA K., KISIEL W. Primary structure of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **Biochemistry** v. 28, p.674-679, 1989.
- MEMARI,N, GRASS,L, NAKAMURA,T, KARAKUCUK,I, DIAMANDIS,E.P. Human tissue kallikrein 9: production of recombinant proteins and specific antibodies. **Biol. Chem.** V.387, p.733-740, 2006.
- MOREIRA, V.M.T.S. **Efeitos da injeção intrahipocampal de crotoxina, crotamina e giroxina em ratos**. 1993. Tese (Doutorado), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
- MURAYAMA, N., SAGUCHI, K.I., MENTELE, R., ASSAKURA, M. T., OHI, H., FUJITA, Y., CAMARGO, A.C.M., HIGUCHI, S., SERRANO, S.M.T. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1652, p. 1-6, 2003.
- NIKAI T. OHARA A., KOMORI Y., FOX J.W., SUGIHARA H. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 318, p.89-96, 1995.
- NISHIDA S., FUJIMURA Y., MIURA S., OZAKI Y., USAMI Y., SUZUKI M., TITANI K., YOSHIDA E., SUGIMOTO M., YOSHIOKA A., FUKUI H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, p.1843-1849,1994.
- NOLAN, C., HALL, L.S., BARLOW, G.H. Ancrod, the coagulating enzyme of Malayan pitviper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. **Methods in Enzimology**, v. 45, p. 205-213. 1976.

- OYAMA, E & TAKAHASHI H. Amino acid sequence of a thrombin like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon** v. 40, p.959-970, 2002.
- PAN, H, DU, X, YANG, G, ZHOU, Y, WU, X. cDNA cloning and expression of acutin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 255, nº 2, p. 412-415, 1999.
- PARK, D., KIM,H., CHUNG,K.,KIM,D.S. YUN,Y. Expression and characterization of a novel plasminogen activator from *Agkistrodon Halys* venom. **Toxicon** v.36, p.1807-1819, 1998.
- PERONI,C.N., SOARES,C.R.J., GIMBO,E., MORGANTI,L., RIBELA,M.T.C.P., BARTOLINI,P. High-level expression of human thyroid-stimulating hormone in CHO cells by co-transfection of dicistronic expression vectors followed by a dual-marker amplification strategy. **Biotechnol.Appl. Biochem.**,v.35, p.19-26, 2002.
- PRADO-FRANCESCHI, J & VITAL BRAZIL,O. Convulxin, a new toxin from the venom of South America Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v.19, p.875-887, 1981.
- RÁDIS-BAPTISTA,G, OGUIURA,N, HAYASHI,M.A,CAMARGO,M.E, GREGO,K.F, OLIVEIRA,E.B, YAMANE,T. Nucleotide sequence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v.37, n.7, p.973-984, 1999.
- RUIZ DE TORRENT, R.M., BONGIOVANNI,B., LEIVA,L.C., DE DUFFARD, A.M.E., RODRÍGUEZ,J.P., DE PÉREZ,O.C.A., DUFFARD,R. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study). **Toxicon**, v. 50, p. 144-152, 2007.
- RAW, I., ROCHA, M.C., ESTEVES, M.I., KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 19, p. 333-338, 1986.
- RAWLINGS,N.D & BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Bioche. J.**, v. 290, p.205-218, 1993.
- RAWLINGS, N.D. & BARRET, A.J. Families of serine peptidases. **Meth. Enzymol.** v.244, p. 19-61, 1994.
- SAMBROOK, S & RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning . A laboratory manual**. v. 3, 3 ed. New, York: Cold Spring Harbor, 2001.

- SANCHEZ E.F., SANTOS C.I., MAGALHAES A., DINIZ C.R., FIGUEIREDO S., GILROY J., RICHARDSON M. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v.378, p.131-141,2000.
- SAKAI, J., ZHANG,S., CHEN,H., ATSUMI,F.,MATSUI,T., SHIONO,H., SANADA,S., OKADA,T. Primary structure of a thrombin-like serine protease, kangshuanmei, from the venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger*. **Toxicon.**, v. 48, p. 313-322, 2006.
- SCHULER,D.G., ALTSCHUL,S.F., LIPMAN,D.J. A Workbench for Multiple Alignment Construction and Analysis. **Proteins: Structure, Function and Genetics.** v.9, p. 180-190, 1993.
- SEKI, C., VIDAL, J.C., BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**, v.18, p. 235-247, 1980.
- SERRANO,S.M., HAGIWARA,Y., MURAYAMA,N., HIGUCHI,S., MENTELE, R., SAMPAIO, C.A , CAMARGO, A C., FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-Bj) from the venom of *Bothrops jararaca* and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur.J.Biochem.**, v. 251, p.845-853, 1998.
- SERRANO,S & MAURON,R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v.45,p.1115-1132, 2005.
- SERRANO S.M.T., MENTELE R., SAMPAIO C.A.M., FINK E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, p.7186-7193, 1995.
- SHIMOKAWA, K & TAKAHASHI, H. Capillary permeability-increasing enzyme-2 from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (kankoku-mamushi):activity resulting from the release of peptides from fibrinogen. **Toxicon.**, v.35, p.597-605, 1997.
- SIIGUR, E., AASPOLLU, A., SIIGUR, J. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA for factor V activating enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**v. 262, p.328-332, 1999.
- SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, H. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. **Mems Inst. Butantan**, v.12, p.505, 1938-1939.

- SOARES,C.R.J., MORGANTI,L., MILOUX,B., LUPKER,J.H., FERRARA,P., BARTOLINI,P. High-level synthesis of human prolactin in CHO cells. **Biotechnol.Appl.Biochem.**,v.32, p.127-135, 2000.
- STOCKER, K., FISCHER, H., MEIER,J., BROGLI, M., SVENDSEN, L. Characterization of protein C activator protac from venom of the southern copperhead (*Agkistrodon contortrix*) snake. **Toxicon.**, v. 23, p. 239-252,1987.
- THOMAZINI-SANTOS, I.A , BARRAVIERA, S.R.C.S., MENDES-GIANNINI, M.J.S., BARRAVIERA, B. Surgical adhesives. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v.7, n.2, p.159-171,2001.
- TOKUNAGA F., NAGASAWA K., TAMURA S., MIYATA T., IWANAGA S., KISIEL W. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. **J. Biol. Chem.** v. 263, p.17471-17481, 1988.
- VITAL-BRAZIL, O. Veneno ofídico neurotóxico. **Rev. Ass. Med. Brasil**, 26, v.6, p.212-218, junho 1980.
- VON HEIJE, G. Signal Sequences. The Limits of Variation. **J.Mol. Biol**, v.184, p.99-105, 1985.
- WANG, Y.M., WANG, S.R., TSAI, I.H. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. **Biochem.J.**,v.354, p.161-168, 2001.
- WARKENTIN, T.E. Limitations of conventional treatment options for heparin-induced thrombocytopenia. **Semin. Hematol.**, v. 35, p.17-25, 1998.
- WATSON, J.D., BAKER,T.A., BELL, S.P., GANN, A., LEVINE, M., LOSICK, R. **Molecular Biology of the Gene**, 5 ed, San Franscisco, CA, 2004, p. 383.
- WEISEL J.W. Fibrinogen and fibrin. **Adv. Protein Chem.** v. 70, p. 247-299, 2005.
- WILLCOX, B.J., POULIN, P., VEALE, W.L., PITTMANN Q.J. Vasopressin-induced motor effects: localization of a sensitive site in the amygdala. **Brain Res.**, v.596, n. 1-2, p. 58-64, 1992.
- WURPEL,J.D., DUNDORE,R.L., BARBELLA,Y.R., BALABAN,C.D., KEIL,L.C. & SEVERS,W.B. Barrel rotation evoked by intracerebroventricular vasopressin injections in conscious rats. I. Description and general pharmacology. **Brain Res.**, v.365, p.21-29, 1986a.

- WURPEL,J.D., DUNDORE,R.L., BARBELLA,Y.R., BALABAN,C.D., KEIL,L.C. & SEVERS,W.B. Barrel rotation evoked by intracerebroventricular vasopressin injections in conscious rats. II. Visual/ vestibular interactions and efficacy of antiseizure drugs. **Brain Res.**, v.365, p. 30-41, 1986b.
- YANG, Q, HU, X.J, XU, X.M, AN, L.J, YUAN, X.D, SU, Z.G. Cloning, expression and purification of gussurobin, a thrombin-like enzyme from the snake venom of *Gloydius ussuriensis*. **Acta Biochim.Biophys.Sinica**, v. 34, n.1, p.6-10, 2002.
- YANG, Q, LI,M., XU,J., BAO,Y., LEI,X, NA,L. Expression of glosedobin, a thrombin like enzyme from the venom of *Gloydius shedaoensis*, in *Escherichia coli*. **Biotechn.Letters**, v.25, p.101-104, 2003.
- YOU,W.K, CHOI,W.S., KOH,Y.S, SHIN,H.C, JANG,Y, CHUNG,K.H. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS letters**, v.571, p.63-73,2004.
- YUAN, S., DUAN, H., LIU, C., LIU, X., LIU, T., TAO, H., ZHANG,.Z. The role of thioredoxin and disulfide isomerase in the expression of the snake venom thrombin-like enzyme calobin in *Escherichia coli* BL 21 (DE3). **Protein expression and purification** v.38, p. 51-60, 2004.
- YUK, I.H., WILDT, S., JOLICOEUR, M., WANG, D.I. A GFP-based screen for growth-arrested, recombinant protein-producing cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 79, n. 1, p. 74-82, 2002.
- ZHA, X.D, REN, B, LIU, J, XU, K.S. cDNA cloning and high-level expression of a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. **Methods Find Exp Clin Pharmacol** v.4, p. 253-257, 2003.
- ZHANG Y., WISNER A., XIONG Y.L., BON C. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. **J. Biol. Chem.** v.270, p.10246-10255, 1995.
- ZHANG Y, GAO R, LEE WH, ZHU SW, XIONG YL, WANG WY. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases. **Toxicon**, v.36, n.1, p.131-142, 1998.
- ZHU, Z, LIANG, Z, ZHANG,T, ZHU,Z, XU,W, TENG,M, NIU,L.Crystal structure and amidolytic activities of two glycosylated Snake Venom Serine Proteinases. **The journal of Biological Chemistry**, v. 280, n.11, p.10524-10529, 2005.

Gyroxin-like B2.1.txt

LOCUS AY954040 895 bp mRNA linear VRT 02-JAN-2008
 DEFINITION *Crotalus durissus terrificus* gyroxin-like B2.1 precursor, mRNA, partial cds.
 ACCESSION AY954040
 VERSION AY954040.1 GI:61741493
 KEYWORDS
 SOURCE *
 ORGANISM *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake)
Crotalus durissus terrificus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Lepidosauria; Squamata; Scleroglossa; Serpentes; Colubroidea;
 Viperidae; Crotalinae; *Crotalus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 895)
 AUTHORS Yonamine,C.M., Yassaka,R.T., Radis-Baptista,G., Prieto da
 Silva,A.R.B., Yamane,T. and Camillo,M.A.P.
 TITLE Cloning of gyroxin-like from venom gland of *Crotalus durissus*
terrificus and expression in mammalian COS-7 cells
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 895)
 AUTHORS Yonamine,C.M., Yassaka,R.T., Radis-Baptista,G., Prieto da
 Silva,A.R.B., Yamane,T. and Camillo,M.A.P.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-MAR-2005) Centro de Biologia Molecular - CBM,
 Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares - IPEN, Av Professor
 Lineu Prestes 2242, Sao Paulo, SP 05508-000, Brazil
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..895
 /organism="Crotalus durissus terrificus"
 /mol_type="mRNA"
 /sub_species="terrificus"
 /db_xref="taxon:8732"
 CDS
 <1..717
 /codon_start=1
 /product="gyroxin-like B2.1 precursor"
 /protein_id="AAX54679.1"
 /db_xref="GI:61741494"
 /translation="VIGGDECNINERNFLVALYEYWSQSFLCGGTLLINGEWLTAHC
 DRKHILIIYGVHDSVQFDKEQRRFPKEKYFFNCRNFTKWDKDIMLIRLNKPVSYSE
 HIAPLSLPSSPPIVGSVCVRVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYGVCRTAHPQFR
 LPATSRILCAGVLEGGIDTCHRDSSGGLICNGEFQGIVSWGDSQAQPKPALYSKVF
 DHLDWIQNIIAGSETVNCPS"
 mat_peptide 1..714
 /product="gyroxin-like B2.1"
 misc_feature order(19..21,421..423)
 /note="disulfide bond"
 misc_feature order(82..84,130..132)
 /note="disulfide bond"
 misc_feature order(127..129,262..264,550..552)
 /note="charge relay system; active site"
 misc_feature order(232..234,706..708)
 /note="disulfide bond"
 misc_feature 241..243
 /note="glycosylation site"
 misc_feature order(358..360,568..570)
 /note="disulfide bond"
 misc_feature order(454..456,505..507)
 /note="disulfide bond"
 misc_feature order(538..540,613..615)
 /note="disulfide bond"
 3'UTR 718..895
 polyA_signal 857..862
 ORIGIN
 1 gtcattggag gtgatgaatg taacataaat gaacgtaatt tccttgtagc cttgtatgaa
 61 tattggtctc agagttttct ctgcggtggg actttgatca acggggaatg ggtgctcact
 121 gctgcacact gcgacaggaa acatatctta atatacgttg gtgtgcatga ccgaagtgtg
 181 caatttgaca aggagcagag aagattccca aaagagaagt acttttttaa ctgtagaagt
 241 aactttacca aatgggacaa ggacatcatg ttgatcaggc tgaacaaacc tgttagttac
 301 agtgaacaca tcgcacctct cagcttgctt tccagccctc ccattgtggg atcagtttgc
 361 cgtgttatgg gatggggtac aatcaaactc cctcaagaga ctttgcttga tgtccctcat
 421 tgtgctaaca ttaacctact tgattatgga gtgtgtcgaa cagctcacc acaatttcgg
 481 ttgccagcga caagcagaat attgtgtgca ggtgtccttg aaggaggcat agatacatgt
 541 catcgtgact ctgggggacc cctcatctgt aatggagaat tccagggcat tgtatcttgg
 601 ggagacgggt cttgtgcccc accggataag cctgccctct acagcaaggc cttcgatcat
 661 cttgactgga tccagaacat tattgcagga agtgaaactg tgaattgccc ctcgtgaaaa
 721 cttttgaaaa agttaagagg agaaaatgta acatattagt acatctcttc tatatcccta
 781 accatatcca actacattgg aatatatccc caggcagtaa gcttttttta gactcaaata
 841 ggactgcctt tggagtaata aatactcaaa atagtgtctg aaaaaaaaaa aaaaa

Gyroxin-like B2.1.txt

LOCUS AAX54679 238 aa linear VRT 02-JAN-2008
 DEFINITION gyroxin-like B2.1 precursor [Crotalus durissus terrificus].
 ACCESSION AAX54679
 VERSION AAX54679.1 GI:61741494
 DBSOURCE accession AY954040.1
 KEYWORDS
 SOURCE Crotalus durissus terrificus (tropical rattlesnake)
 ORGANISM Crotalus durissus terrificus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Lepidosauria; Squamata; Scleroglossa; Serpentes; Colubroidea;
 Viperidae; Crotalinae; Crotalus.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 238)
 AUTHORS Yonamine,C.M., Yassaka,R.T., Radis-Baptista,G., Prieto da
 Silva,A.R.B., Yamane,T. and Camillo,M.A.P.
 TITLE Cloning of gyroxin-like from venom gland of Crotalus durissus
 terrificus and expression in mammalian COS-7 cells
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (residues 1 to 238)
 AUTHORS Yonamine,C.M., Yassaka,R.T., Radis-Baptista,G., Prieto da
 Silva,A.R.B., Yamane,T. and Camillo,M.A.P.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (04-MAR-2005) Centro de Biologia Molecular - CBM,
 Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares - IPEN, Av Professor
 Lineu Prestes 2242, Sao Paulo, SP 05508-000, Brazil
 COMMENT Method: conceptual translation supplied by author.
 FEATURES
 source 1..238
 /organism="Crotalus durissus terrificus"
 /sub_species="terrificus"
 /db_xref="taxon:8732"
 Protein <1..238
 /product="gyroxin-like B2.1 precursor"
 mat_peptide 1..238
 /product="gyroxin-like B2.1"
 Region 1..227
 /region_name="Tryp_SpC"
 /note="Trypsin-like serine protease; Many of these are
 synthesized as inactive precursor zymogens that are
 cleaved during limited proteolysis to generate their
 active forms; cd00190"
 /db_xref="CDD:29152"
 Site 1
 /site_type="cleavage"
 /db_xref="CDD:29152"
 Bond bond(7,141)
 /bond_type="disulfide"
 Bond bond(28,44)
 /bond_type="disulfide"
 site order(43,88,184)
 /site_type="active"
 /note="charge relay system"
 site order(43,88,184)
 /site_type="active"
 /db_xref="CDD:29152"
 Bond bond(78,236)
 /bond_type="disulfide"
 Site 81
 /site_type="glycosylation"
 Bond bond(120,190)
 /bond_type="disulfide"
 Bond bond(152,169)
 /bond_type="disulfide"
 Site order(178,199,201)
 /site_type="other"
 /note="substrate binding sites"
 /db_xref="CDD:29152"
 Bond bond(180,205)
 /bond_type="disulfide"
 CDS 1..238
 /coded_by="AY954040.1:<1..717"
 ORIGIN
 1 viggdecnin ernflvalye ywsqsfllcg tlingewlt aahcdrkhl iyvgvhdrsv
 61 qfdkeqrrfp kekyffncrn nftkwdkdm lirlnkpsy sehlapls spspivgsvc
 121 rvmgwg tiksp qetlpdvph caninldyg vcrtahpqfr lpatsrilca gvleggidtc
 181 hrdsggplic ngefqqivsw gdgscaqpd palyskvfdh ldwiqniag setvncps
 //