AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA
DO SÍTIO C-CATALÍTICO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I -
REGIÃO ALA⁹⁵⁹ ATÉ SER¹⁰⁶⁶**

Caroline Cristina Elias

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

Orientadora:

Profa. Dra. Regina Affonso

São Paulo

2015

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DO SÍTIO C-CATALÍTICO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA I - REGIÃO ALA⁹⁵⁹ ATÉ SER¹⁰⁶⁶**

Caroline Cristina Elias

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

Orientadora:
Profa. Dra. Regina Affonso

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

Dedico este trabalho a minha família inteira em especial meu marido Marcos, meu pai Elias, minha mãe Maria Aparecida, minha irmã Isabela e a minha meio irmã Julia.

Amo todos vocês, cada um significa algo pra mim, meu pai meu herói, minha mãe a paz, minha irmã alegria e a Juju vida.

Muito obrigado por tudo, minha gratidão será eterna.

E a pessoa principal deste momento meu marido Marcos, só você pra me ajudar tanto, muito obrigado por tudo.

Eu te amo mais que tudo nesta e em outras vidas.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Regina Affonso pela oportunidade e confiança, serei eternamente grata por tudo.

Aos companheiros de longa data que para sempre vou guardar em meu coração, Flavio, Roberto e meu Amor Marcos.

A todos os pesquisadores, alunos e funcionários do Centro de Biotecnologia, que em vários momentos me ajudaram e me propiciaram bons momentos.

Aos meus colegas de grupo Larissa, Fagner e Suelen, muito obrigado por cada momento.

A minha melhor amiga, irmã de alma, Natalia, muito obrigado por tudo o que já passamos juntas, te amo pra sempre.

A minha amiga de almoço, conversas e sonhos Eliza Higuti, obrigado por tudo.

A todos os participantes da comissão julgadora, Dra. Cibele Nunes Peroni, Dra. Maria Claudina Camargo de Andrade, Dr. Patrick Spencer, Dra. Maria Helena Bellini Marumo e Dr. Daniel Carvalho Pimenta.

A Dra. Dulce Elena Cesarine e Daniele Aragão do laboratório de nefrologia da UNIFESP.

A CNPQ pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e ao programa de pós-graduação da Universidade de São Paulo.

“Habituai-vos a não julgar aquilo que não podeis compreender que Deus é justo em todas as coisas. Muitas vezes o que vos parece um mal é um bem; mas vossas capacidades são tão limitadas que o conjunto do grande todo escapa aos vossos rudes sentidos. Esforçai-vos para deixar, pelo pensamento, vossa mesquinha visão, e, à medida que vos elevardes, a importância da vida material diminuirá aos vossos olhos e apenas vos parecerá um incidente, na duração infinita de vossa existência espiritual, a única existência verdadeira”
(O Evangelho Segundo o Espiritismo)

Obrigada meu Eterno Amigo Espiritual que diariamente está ao meu lado.

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DO SÍTIO C-CATALÍTICO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA I - REGIÃO ALA⁹⁵⁹ ATÉ SER¹⁰⁶⁶**

Caroline Cristina Elias

RESUMO

A enzima conversora de angiotensina (ECA) catalisa a conversão de angiotensina I (Ang I) no vasoconstritor angiotensina II (Ang II) e hidrolisa a bradicinina (BK). ECA somática (sECA) possui dois domínios homólogos (N e C) que têm 60% de identidade. Embora estas duas regiões tenham homologia grande, o sítio catalítico C-domínio exibe uma atividade três vezes maior do que o N-domínio na hidrólise de Ang I *in vivo*. Este fato torna interessante o desenvolvimento de novos estudos de inibidores ou a melhoria dos já existentes. O objetivo deste estudo foi obter a região Ala⁹⁵⁹ até Ser¹⁰⁶⁶ do C-domínio da sECA (c-sECA), em uma estrutura conformacional semelhante à estrutura nativa. Nós amplificamos a sequência correspondente ao sítio catalítico da c-sECA com 324pb e clonamos esta sequência no vetor pET 28a(+). O segmento (nomeado de pET28_c-sECA) foi expresso em sistema bacteriano. A proteína foi expressa na forma solúvel e a purificação foi feita em uma única etapa utilizando a coluna de afinidade His-tag, a qual produziu a proteína pura. Análises estruturais por dicroísmo circular e fluorescência confirmaram que a proteína recombinante estava na conformação correta, e os ensaios de atividade mostraram que a c-sECA possui atividade enzimática e é inibida por lisinopril.

**OBTAINING, STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND ENZYMATIC
ACTIVITY OF THE C CATALYTIC SITE OF ANGIOTENSIN CONVERTIN
ENZYME I ALA⁹⁵⁹ TO SER¹⁰⁶⁶ REGION**

Caroline Cristina Elias

ABSTRACT

The angiotensin-converting enzyme (ACE) catalyzes the conversion of angiotensin I (Ang I) to the vasoconstrictor angiotensin II (Ang II) and the hydrolysis of bradykinin (BK). Human somatic ACE (sACE) has two homologous domains (N and C) that show 60% identity. Although these two regions have high homology, the catalytic site of the C-domain exhibits three times more activity than that of the N-domain in the hydrolysis of Ang I *in vivo*. This fact necessitates the development of new inhibitors or the improvement of existing ones. This study aimed to obtain the Ala⁹⁵⁹ to Ser¹⁰⁶⁶ catalytic region of C-domain of sACE (c-sACE) in a structural conformation that resembles the native structure. We amplified the 324-bp sequence corresponding to the catalytic site of c-sACE and cloned this sequence into a pET28a(+) vector. The segment (named pET28_c-sACE) was expressed in a bacterial system. The expressed protein segment was soluble, and its purification was performed in one step using a His-tag affinity column. Structural analysis by circular dichroism and fluorescence confirmed that the purified protein is correctly folded, and an activity assay showed that c-sACE possesses enzymatic activity and is inhibited by lisinopril.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aas	aminoácidos
D.O	Densidade Óptica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
cDNA	DNA complementar
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio <i>Luria-Bertani</i>
MM	Massa molecular
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de base
PBS	Tampão Fosfato Salino
PMSF	Fluoreto fenil metano sulfonil
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PI	Ponto isoelétrico
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio
sECA	Enzima Conversora de Angiotensina Somática
SOC	Meio super ótimo com repressão de Metabólitos
tECA	Enzima Conversora de Angiotensina Testicular
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
μ g	Microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Hipertensão Arterial	10
1.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA)	13
1.3 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)	16
1.4 C-domínio da sECA	17
1.5 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA)	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Geral:	21
2.2 Específicos:	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Materiais	22
3.1.1 Equipamentos e acessórios principais	22
3.1.2 Reagentes para biologia molecular	23
3.1.3 Meios de cultura	23
3.1.4 Soluções	23
3.1.5 Coluna Cromatografia	24
3.2 Métodos	25
3.2.1 Obtenção do cDNA	25
3.2.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose	25
3.2.3 Vetor de expressão bacteriano	26
3.2.4 Minipreparação de DNA plasmidial	27
3.2.5 Purificação do cDNA	27
3.2.6 Sequenciamento	27
3.2.7 Preparação do Inserto (cDNA) e do Vetor (Plasmideo)	27
3.2.8 Desfosforilação do vetor	27
3.2.9 Ligação do inserto ao vetor	28
3.2.10 Obtenção de células competente <i>E. coli</i>	28
3.2.11 Transformação de bactérias <i>E. coli</i>	28
3.2.12 Teste para clones positivos ao cDNA para a região C-catalítica	29
3.2.13 Expressão da proteína recombinante	29

3.2.14	Extração da proteína recombinante	29
3.2.15	Purificação	30
3.2.16	Análises da proteína recombinante	30
3.2.17	Caracterização estrutural	31
3.2.18	Atividade enzimática	32
3.2.19	Cinética Enzimática	32
4	RESULTADOS	34
4.1	Obtenção do cDNA	34
4.1.2	Construção do vetor de expressão	35
4.1.3	Expressão da proteína recombinante	38
4.1.4	Caracterização imunológica	40
4.1.5	Purificação	40
4.1.6	Quantificação da proteína	44
4.1.7	Dicroísmo Circular	44
4.1.8	Fluorescência	48
4.1.9	Atividade enzimática	52
4.1.10	Cinética Enzimática	53
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial é um importante fator de risco para doenças decorrentes de aterosclerose e trombose, que se exteriorizam, predominantemente, por acometimento cardíaco, cerebral, renal e vascular periférico, esta doença é responsável por 25 e 40% da etiologia multifatorial da cardiopatia isquêmica e dos acidentes vasculares cerebrais, respectivamente. Essa multiplicidade de consequências coloca a hipertensão arterial na origem das doenças cardiovasculares e, portanto, caracteriza-a como uma das causas de maior redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos (Passos; Assis; Barreto, 2006).

A pressão arterial (PA) depende de fatores físicos como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação, sendo resultante da combinação instantânea entre o volume minuto cardíaco, a resistência periférica e a capacitância venosa, e da distribuição de fluído dentro e fora dos vasos. A manutenção e a variação momento a momento da PA dependem de mecanismos complexos e redundantes que determinam ajustes apropriados nesses componentes, de maneira a manter a PA o mais estável possível. Assim, os mecanismos que promovem desequilíbrio entre os fatores pressores e depressores e induzem alterações no calibre das arteríolas merecem especial atenção (Rigatto; Böhlke; Irigoyen, 2004).

Fatores de risco ambientais e genéticos, em conjunto, produzem fenótipos intermediários, como a resistência à insulina e a obesidade. Assim, a hipertensão arterial severa pode ser entendida como um fenótipo final, como um resultado de diversos fenótipos intermediários. À luz da biologia molecular, poderíamos conceituar a hipertensão arterial severa como uma doença complexa, poligênica, multifatorial, na qual cada paciente pode apresentar diferentes fatores causais (ambientais e/ou genéticos) para o traço (Lima; Hatagima; Silva, 2007).

Quase um quarto dos brasileiros adultos tem de enfrentar a hipertensão, mas o maior controle da doença tem diminuído fortemente o número de complicações ligadas à doença, que chegaram em 2012 ao menor patamar dos

últimos 10 anos¹.

Esta doença é mais comum entre as mulheres (26,9%) que entre os homens (21,3%), também varia de acordo com a faixa etária e a escolaridade. Entre os brasileiros com mais de 65 anos de idade, 59,2% se declaram hipertensos, contra apenas 3,8% na faixa de 18 a 24 anos e 8,8% de 25 a 34 anos. O tempo médio de ensino é inversamente proporcional à hipertensão, quanto maior a escolaridade, menor a taxa de indivíduos afetados. Entre aqueles com até oito anos de educação formal, 37,8% são hipertensos; enquanto que com 12 anos ou mais de ensino, o percentual fica em 14,2%¹.

No Brasil, a principal etiologia da insuficiência cardíaca é a cardiopatia isquêmica crônica associada à hipertensão arterial. Algumas regiões geográficas do país e em áreas de baixas condições sócio-econômicas, ainda existem formas de insuficiência cardíaca associadas à doença de Chagas, à endomiocardiopatia e a cardiopatia valvular reumática crônica (Bocchi et al.,2009).

Nos casos de pressão sanguínea alta, não controlada, multiplica-se o risco de AVC em mais de 4 vezes, assim o risco de hemorragia cerebral em hipertensos é 3,9 vezes maior do que em um indivíduo não hipertenso (Arboix; 2015).

A doença cardíaca isquêmica tem se mantido entre as principais causas de morte desde a última década. Números da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que 7,4 milhões de pessoas morreram da doença, em 2012² (Fig.1). Outro fator menos evidente que interfere no desenvolvimento desta doença é a escolaridade do indivíduo.

¹ <http://www.brasil.gov.br/saude>

² <http://www.who.int>

Figura 1: Distribuição das principais causas de morte no mundo em 2012.²

O principal objetivo do tratamento anti-hipertensivo é reduzir a morbidade e mortalidade cardiovasculares. Apesar da sua efetividade, a hipertensão arterial é pouco controlada. Estudos mostraram que, aproximadamente, um terço dos pacientes que fazem uso de medicamentos anti-hipertensivos estava com a pressão arterial controlada. Assim, a falta de controle da pressão arterial é um desafio para os profissionais de saúde. Vários fatores interferem na adesão ao tratamento. Dentre eles destacam-se o conhecimento do paciente sobre a doença e o seu comportamento frente à tomada dos remédios (Strelec; Pierin; Mion Jr., 2003).

O tratamento correto pode proporcionar benefícios a curto prazo (redução da pressão arterial), também a médio prazo, como aqueles benefícios relacionados com comprometimento de órgãos-alvo (massa ventricular esquerda, alterações vasculares, proteinúria) e benefícios principalmente a longo prazo, incluindo o real benefício da terapia anti-hipertensiva, como a prevenção do AVC, eventos coronarianos e outras seqüelas da hipertensão arterial (Ribeiro, 2003).

² <http://www.who.int>

O sistema renina angiotensina (SRA) na hipertensão arterial clínica desempenha algumas ações de destaque por meio de suas propriedades vasoconstritoras, que se relacionam diretamente com a pressão arterial, e por suas ações no músculo liso vascular, tecido conjuntivo e integridade endotelial, que interferem no prognóstico cardiovascular (Ribeiro, 2003).

Uma das principais funções do SRA é manter a pressão sanguínea, já que funciona como um sistema endócrino que tem seu papel chave na fisiologia cardiovascular e renal. Sua super ativação implica na indução e progressão da hipertensão, aterosclerose, hipertrofia cardíaca e outras ocorrências maiores (Balakumar; Jagadeesh, 2014).

1.2 Sistema Renina Angiotensina (SRA)

Historicamente em 1898, Tigerstedt e Bergman do Instituto Karolinska relataram um efeito pressor no extrato de tecido renal de coelhos e a substância foi nomeada como renina, por que foi extraído dos rins. Em 1934, Harry Goldblatt induziu hipertensão em cachorros pelo uso de grampo na artéria renal. Depois de algum tempo cientistas da Escola Medica da Universidade de Buenos Aires, Argentina, e o Laboratório Eli-Lilly de Indianapolis, EUA, trabalharam com as técnicas de Goldblatt e demonstraram uma secreção renal com agente pressor similar á renina. Ambos os grupos descreveram a presença de um novo componente no sangue da veia renal que tinha um efeito pressor menor. Os pesquisadores de Buenos Aires chamaram o composto de ‘hypertensin’, entretanto o Laboratório Eli-Lilly chamou de ‘angiotonin’. Em 1958 Page e Braun-Menéndez combinaram ambos os termos (angiotonin e hypertensin) e concordaram em usar metade de cada nome para o nome original de ‘angiotensin’. Desde então os vários componentes do SRA têm sido identificados no desenvolvimento de um papel fisiopatológico, cardiovascular e renal (Balakumar; Jagadeesh, 2014).

Classicamente este sistema é uma cascata coordenada de processos enzimáticos. O precursor proteico necessário para o início dessa cascata é o angiotensinogênio produzido pelo fígado, que é então clivado pela renina, produzida pelas células justaglomerulares no rim, gerando a angiotensina I (Ang I),

que é sequencialmente convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina II (Ang II), peptídeo vasoconstritor chave do SRA. Apesar da descrição de outras vias para a formação de Ang II, por enzimas tais como tonina, catepsinas e quinases, a ECA é a enzima chave e responsável pela regulação da produção desse peptídeo no rim (Fig. 2) (Aragão, 2013).

Além da ação no SRA, a angiotensina II (Ang II) pode desencadear outras ações diretas na função, estrutura do coração e vasculatura renal, promovendo eventos clínicos, como isquemia miocárdica, hipertrofia ventricular esquerda, arritmias cardíacas, alterações no equilíbrio coagulação-fibrinólise e aumento do estresse oxidativo (Ribeiro, 2003).

Ang II exerce os seus efeitos por ligação a seus receptores AT1 e AT2 em tecidos-alvo ou órgãos, que foram identificados como ligantes seletivos e posteriormente caracterizados como receptores acoplados à proteína G. A ativação do receptor AT1 pela Ang II leva ao aumento da pressão sanguínea, hipertrofia e fibrose, já a ativação do receptor AT2 tem a função de contrabalancear as ações de AT1 (Fig. 2) (Gwathmey et al., 2012; Deshotels et al., 2014, Balakumar; Jagadeesh, 2014).

Figura 2: Representação esquemática do Sistema Renina Angiotensina Clássico e a ação da ECA neste sistema. Modificado de Maarten e Brenner, 2000.

Com o reconhecimento da atividade biológica de outros peptídeos do SRA com importante repercussão fisiológica, tais como o efeito vasodilatador da Ang 1-7, e o potencial envolvimento da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) tanto na degradação da Ang II para formar Ang 1-7, quanto seu efeito na clivagem da Ang I para formar Ang 1-9, aumentou a complexidade do SRA. (Fig 3) (Rigatto; Böhlke; Irigoyen, 2004).

Figura 3: Representação esquemática do SRA não-clássico, com a formação dos peptídeos e seus respectivos receptores. Modificado de Balakumar e Jagadeesh, 2014.

O SRA tem dois componentes. O primeiro componente, é o eixo ECA-Ang II- AT1R, um caminho bem caracterizado, mediando ações de vasocronstrição, proliferação e inflamação. O segundo componente, o eixo ECA2-Ang (1-7)- MasR, vem contrabalanceando os efeitos de Ang II através da Ang (1-7) que tem ações natriúretica, protetor endotelial, cardioprotetor, vasodilatador e propriedades anti-proliferativas. Baseado nessas propriedades, o eixo clássico

ECA- Ang II- AT1R tem sido descrito com o “malvado” e o eixo ECA2- Ang (1-7)- Mas R como o “anjo” da cascata deste sistema (Balakumar; Jagadeesh, 2014).

Como resultado do aumento do número de trabalhos sobre o funcionamento integrado dos componentes do SRA, veio a necessidade de abordá-lo de um novo ponto de vista, onde este sistema deixa de ser interpretado como apenas uma cascata proteolítica linear, e passa a ser entendido como um complexo sistema humoral, onde vários agonistas, além da tradicional Ang II, podem se ligar a múltiplos receptores, contrabalanceando os efeitos um do outro no controle da ativação e inativação de diferentes vias intracelulares (Ribeiro-Oliveira et al., 2008).

1.3 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A ECA é uma zinco metalopeptidase, que são enzimas que fazem o ataque nucleofílico à ligação peptídica através de uma molécula de água. Estas metalopeptidases apresentam um cátion divalente, geralmente um íon Zn^{+2} , que é responsável pela ativação da molécula de água catalítica. Este íon metálico, na maioria dos casos, está coordenado no centro ativo com três resíduos de aminoácidos (His, Glu, Asp ou Lys). Além destes, pelo menos um outro aminoácido é requerido para a catálise, que pode ser geralmente um resíduo de ácido glutâmico (Glu). A maioria das zinco metalopeptidases contém apenas um único cátion em seu sítio ativo, apesar de existirem algumas famílias de enzimas nas quais dois íons Zn^{+2} são co-catalíticos (Rocha, 2008).

O seu impacto não é focado somente na geração de Ang II, mas também na inativação do peptídeo vasodilatador Bradicinina. Entre os substratos que a ECA é capaz de hidrolisar estão o N-acetil-serilaspartil-lisil-prolina (Ac-SDKP), que é um fator regulador da hematopoiese, o hormônio luteinizante (LH) e a angiotensina 1-7 (Rocha, 2008).

Existem duas isoformas da ECA, uma somática (sECA) e outra testicular (tECA), a tECA possui alta identidade com a região C-domínio da sECA. A sECA é uma proteína transmembrânica de 1.306 aminoácidos (aas), após ser processada na forma madura passa a ter 1277 aas e estar altamente glicosilada. Em sua sequência a região C-terminal possui 22 aas hidrofóbicos que a ancora à

membrana plasmática das células epiteliais (Hopper; Karra; Turner, 1997; Spyroulias et al., 2004; Corradi et al., 2006).

A ECA é uma ectoenzima ligada à membrana das células endoteliais vasculares e também são expressos em vários outros tipos de células, incluindo células epiteliais absortivas, e célula germinal masculina. Em tecidos somáticos a ECA é uma glicoproteína constituída por uma única cadeia polipeptídica grande de 140-170 kDa. Em células germinativas a ECA é sintetizada em uma pequena forma de massa molecular de 100-110kDa (Wei et al., 1991).

1.4 C-domínio da sECA

Os domínios N e C possuem 60% de identidade, porém possuem distintas funções fisiológicas. A região N-domínio é termicamente mais estável, mais resistente a proteólise sob condições desnaturantes e depende menos de íons Cloro. Ambos os domínios são fortemente glicosilados, o domínio N contém 10 potenciais locais de N-glicosilação e o domínio C contém 7, também possuem uma região de ligação com íons Zinco, semelhante ao HEXXH, que se encontra no sítio catalítico de cada um dos domínios da sECA, (Fig. 4) (Anthony et al.,2010; De Andrade et al.,2010; Anthony et al.,2012).

Figura 4: Esquema da sECA e tECA com detalhes das regiões N- e C-domínios, região de ligação com íons zinco HEXXH e região de ligação com a membrana em preto. Modificado de Andrade et al., 2010.

Estudos *in vitro* tem mostrado a afinidade pelo substrato Ang I igual para ambos os domínios da ECA. Entretanto a eficiência catalítica para hidrólise de Ang I pelo C-domínio é três vezes maior do que pelo N-domínio. Em estudo feito

por Fuchs et al., 2008 foi confirmado que o C-domínio da ECA é o sítio predominante de clivagem da Ang I *in vivo*. A inativação da região C-domínio em camundongo mutante reduz a hidrólise de Ang I em Ang II quando comparado com tipo selvagem. Já a concentração de peptídeos de bradicinina não mostrou uma diferença significativa entre o camundongo mutante e o selvagem. Por isso, o C-domínio deve desempenhar um papel importante na regulação da pressão sanguínea (Fuchs et al., 2008, Lunow et al., 2014).

Em estudos do grupo de Vamvakas et al., 2007, 2009 foi feita a clonagem dos sítios catalíticos dos domínios N e C, expressaram em sistema bacteriano e análise da estrutura secundária por Dicroísmo Circular. Neste trabalho não foi explorado a atividade destes sítios quanto a sua ligação com íons zinco ou com compostos inibitórios. O sítio catalítico da região C-terminal estudado por este mesmo grupo está representada na Figura 5. Nesta figura pode ser observada a sequência HEXXH, ligação com zinco, em azul. Dados da literatura mostram que esta região é predominantemente alfa-hélice (Spyroulias et al., 2004; Vamvakas et al., 2007; Vamvakas et al., 2009; Watermeyer et al., 2010).

Figura 5: Sequência de aminoácidos que compõe o sítio catalítico da região C-domínio da sECA (107 aa). Em preto, sequência da região C-catalítica iniciando em Ala⁹⁵⁹ até Ser¹⁰⁶⁶; e em azul, o sítio de ligação com íons zinco HEXXH. Modificado de Vamvakas et al., 2007.

1.5 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA)

As ações que mais imediatamente se associam aos efeitos cardiovasculares dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) resultam da diminuição da formação de angiotensina II e do acúmulo de bradicinina. As consequências diretas da diminuição da angiotensina II incluem a redução do efeito vasoconstritor, do efeito retentor de sódio (via aldosterona), e do efeito trófico na musculatura lisa dos vasos, nas células miocárdicas e fibroblastos. Outros efeitos potencialmente benéficos resultam da diminuição da

ativação simpática, restauração de barorreflexos pela ativação parassimpática, normalização da função do endotélio, redução do inibidor do ativador do plasminogênio, diminuição da endotelina e da arginina-vasopressina. O acúmulo de bradicininas, possivelmente, se relaciona à síntese de prostaglandinas vasodilatadoras e à maior geração de óxido nítrico (Bocchi et al., 2009).

Os fármacos mais utilizados para a inibição da ECA são o Captopril, Enalapril e Lisinopril. O Captopril, primeiro IECA oralmente ativo, apresenta alguns efeitos adversos atribuídos à presença de grupamento sulfidrílico na molécula (além das altas doses empregadas). Inicialmente o captopril era administrado três vezes ao dia devido a sua curta meia-vida de eliminação (aproximadamente 2 horas), contudo a ação anti-hipertensiva é bastante longa. O Enalapril foi o primeiro IECA não-sulfidrílico oralmente ativo, as indicações terapêuticas para o Enalapril são semelhantes as do Captopril e o Lisinopril é um composto que age nos sítios catalíticos, N e C, da sECA e vem sendo fonte de intensas pesquisas de síntese de compostos semelhantes que possam ter melhor atuação na contenção da hipertensão (Ribeiro; Muscará, 2001; Spyroulias et al., 2004; De Andrade et al., 2010).

Os IECA foram as primeiras drogas mais amplamente prescritas para o tratamento de doenças cardiovasculares, o uso destes inibidores podem não ser tolerado entre 10-20% dos pacientes que podem desenvolver uma tosse seca persistente, efeitos mais sérios, como angioedema é observado em 0,3% dos pacientes. Os efeitos adversos são provavelmente causados pela elevação dos níveis de bradicinina. Tem sido mostrado que um tratamento com inibidor seletivo C-domínio pode reduzir a pressão sanguínea inibindo a clivagem de Ang I e diminuir os efeitos adversos causados pela bradicinina, que pode ainda ser degradada pelo N-domínio. Essas ideias possibilitam o *design* de um inibidor seletivo para os domínios da ECA (Denti et al., 2014; Lunow et al., 2014).

Estudos de ligação do sítio HEXXH com o composto Lisinopril e seu derivado foram feitos utilizando a técnica de cristalização. Neste trabalho foi identificado que o Lisinopril possui 3 posições de ligação com o sítio HEXXH. Na Figura 6 está representado um esquema da ligação dos inibidores ao local ativo da ECA (Watermeyer et al., 2010).

Figura 6: Esquema da região de ligação do sítio catalítico da ECA e os resíduos de inibição P₁, P'₁ e P'₂ dos fármacos Captopril, Lisinopril e Enalapril, modificado de Michaud et al., 1997.

Em pesquisas já foram descobertos novos tipos de inibidores, principalmente seletivos C-domínio da ECA somática como Keto-ACE e o RXPA380, este último é o inibidor seletivo de maior desenvolvimento em sua função, porém nenhum desses compostos ainda podem ser comercializados, pois se encontram em fase de testes (Anthony et al., 2012).

Com o conhecimento de sítio de ligação de íons Zinco da nossa região de interesse, sabendo-se da estrutura do composto Lisinopril, a expressão em sistema bacteriano deste sítio catalítico, viabilizaram um estudo mais aprofundado desta região. A obtenção da proteína de forma rápida, econômica e na conformação mais próxima da nativa possibilitou estudos de estrutura e atividade.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Obter a região do sítio C-catalítico da sECA, sequência da proteína do aminoácido 959 ao 1066.

2.2 Específicos:

- Amplificar por PCR o cDNA para a região C-catalítica da sECA (324pb) humana obtido do vetor pcDNA 3.1 Zeo - sECA;
- Clonar no vetor de expressão pET 28a-c(+);
- Expressar esta região em sistema bacteriano – *E. coli* BL21 (DH3);
- Isolar a proteína por técnica de cromatografia e caracterizá-la;
- Avaliar a estrutura por Dicroísmo Circular e Fluorescência;
- Avaliar a atividade e inibição utilizando o fármaco Lisinopril;
- Cinética enzimática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos e acessórios principais

- Aparelho Mili-Q-plus, purificador de água- MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- Autoclave, modelo SS-245E - TOMY DIGITAL BIOLOGY (Tokyo, Japão);
- Balança analítica, modelo AW 220 - SHIMADZU (Quioto, KYT, Japão);
- Balança de precisão, modelo P1200 – METTER (Columbus, Ohio, EUA);
- Banho-maria, modelo 100 – FANEM (São Paulo, Brasil);
- Banho-maria, modelo Type 16500 Dri-Bath – THERMO SCIENTIFIC (Waltham, EUA);
- Centricon Filter Devices 3KDa – MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- Centrífuga refrigerada automática, modelo Sorvall STI6R –THERMO SCIENTIFIC (Waltham, EUA);
- Estufa bacteriológica – QUIMIS (São Paulo, Brasil);
- Filmes radiográficos – KODAK (Rochester, NY, EUA);
- Fluxo laminar modelo 2256 – TROX (São Paulo, Brasil);
- Freezer –80°C, modelo 939 – THERMO SCIENTIFIC (Waltham, EUA);
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421 – TECNAL (São Paulo, Brasil);
- Integrated Speed Vack System – SAVANT Instruments Farmingdale (NY, EUA);
- NanoDrop, modelo N 2000 (West Virginia, DE, EUA);
- Sistema de eletroforese vertical, Mini-Protean – BIO-RAD (Hercules, CA, EUA);
- Sistema de purificação de proteínas Akta-Purifier – GE HEALTHCARE (Fairfield, CT, EUA)
- Sonicador – SONICS & MATERIAS (Danbury, Connecticut, EUA);
- Termociclador geneamp PCR system – PERKIN ELMER (Waltham, EUA);
- Transiluminador de luz ultravioleta T26M – BIOAGENCY (São Paulo, Brasil).

3.1.2 Reagentes para biologia molecular

- Agarose, Grau Biologia Molecular – BIO-RAD (Hercules, CA, EUA);
- Antibiótico Canamicina – INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- Corante EZ-Vision DNA Dye – AMRESCO (Solon, OH, EUA);
- Enzimas de restrição – FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá);
- IPTG – LUDWIG BIOTEC (Rio Grande do Sul, Brasil);
- Marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII – PROMEGA (Madison, WI, EUA);
- Marcador de peso molecular PCR Markers - PROMEGA (Madison, WI, EUA);
- Sistema de purificação de DNA plasmidial, WizardPlus S. V. - PROMEGA (Madison, WI, EUA);
- Sistema para extração de DNA PureYiel Plasmid Miniprep - PROMEGA (Madison, WI, EUA);
- Sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-up System - PROMEGA (Madison, WI, EUA);
- T4 Ligase - PROMEGA (Madison, WI, EUA);
- TAE (0,04M Tris-acetato, 0,002M EDTA pH8,0);
- Taq DNA Polimerase – BIOTOOLS (Madrid, Espanha);
- Vetor de expressão pET 28a-c(+) – NOVAGEN (Bedford, MA, EUA).

3.1.3 Meios de cultura

- LB – Triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, cloreto de sódio 10g para 1 litro de água destilada;
- LB-ágar – 15 g de *Agar bacteriológico* para 1 litro de meio de cultura líquido (LB),
- SOC - Triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, 2,5 mM de KCl , esterilizado e suplementado com 0,01M de MgCl₂ e 0,02M de glicose;

3.1.4 Soluções

- Anticorpo policlonal ECA (C-20): sc- 12187 – SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY (Santa Cruz, CA, EUA);
- Anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anti-IgG de cabra);

- Glicerol 0,1%, β -mercaptoetanol 10%, SDS 0,1M, tris-HCL 0,05M, pH6,8;
- Leite desnatado em pó Molico – NESTLÉ (Vevey, Vaud, Suíça);
- PBS – Cloreto de potássio 0,0027M, cloreto de sódio 0,137M, fosfato dibásico de sódio 0,0081M, fosfato monobásico de potássio 0,0015M pH7,4;
- Sistema de detecção de proteína por ECL – GE HEALTHCARE (Fairfield, CT, EUA);
- Solução alcalina I – 0,05M de Glicose, 0,025M de tris-HCL (pH 8,0) e 0,01M de EDTA (pH 8,0);
- Solução alcalina II – 0,2N de NaOH e 1% de SDS;
- Solução alcalina III – 5M de acetato de potássio, 3M de ácido acético glacial, q.s.p 50ml;
- Solução de acrilamida 30% - acrilamida 29%, N, N'-metilenobisacrilamida 1% em água deionizada;
- Solução de azul de Comassie – ácido acético glacial 10%, azul de Comassie R250 0,25%, etanol 45%;
- Solução descorante – ácido acético glacial 10%, metanol 30%;
- Solução fixadora – água destilada 45%, metanol 45%, ácido acético 10%;
- Tampão de amostra 5x para SDS-PAGE – azul de bromofenol;
- Tampão de corrida para SDS-PAGE – glicina 0,1M, SDS 0,1%, tris 0,1M;
- Tampão para purificação da c-sECA I – tris-HCL 0,02M e NaCl 0,1M;
- Tampão para purificação da c-sECA II – tris-HCL 0,02M, NaCl 0,1M e 0,5M Imidazol;
- Tampão de transferência – glicina 0,192M, metanol 20%, SDS 0,01%, tris 0,025M, pH 8,3.

3.1.5 Coluna Cromatografia

- His Trap FF 1ml – GE HEALTHCARE (Fairfield, CT, EUA).

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção do cDNA

Para a obtenção do cDNA para o sítio C-catalítico da sECA foi utilizado como molde o vetor pcDNA 3.1 Zeo - sECA, que contém o cDNA para a proteína ECA humana (pECA), gentilmente cedido pelo Dr. Pierre Corvol (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, College de France, Paris, France).

Para a reação de amplificação da sequência de interesse foi utilizado o primer Sense NC5', incluindo na extremidade 5' um sítio para a enzima NcoI, e o Anti-sense C3' com um sítio para a enzima EcoRI na extremidade 3'.

Sense NC5' NcoI 5' CATGCCATGGCCTCGGCCTGGGAC3'
 Anti-sense C3' EcoRI 5' GGAATTCGCTGAAGGGGATAAAGG3'

Para cada reação de PCR foram utilizados 5µL de tampão na reação (*Reaction Buffer* 10x 0,750M Tris HCL pH 9.0, 0,5M KCL, 0,2M (NH₄)₂SO₄ e 0,02M MgCl₂), 1µL de dNTPs a 0,01M, 5µL de cada primer, 0,25µL de cDNA da amostra e 1,25µL da enzima *Taq DNA Polimerase* e água ultra pura estéril q.s.p 50µL.

As reações de PCR foram feitas nas seguintes condições no termociclador: um ciclo de 94°C por 3min. para que todas as fitas de DNA se separem (incluindo também os primers); 30 ciclos com 3 etapas: 94°C por 30 seg. para a separação das fitas de DNA, 55°C por 30 seg. para a hibridação dos primers com a sequência específica e 72°C por 1min. para a síntese da fita complementar de DNA, finalizando a reação com uma temperatura de 72°C durante 7 min.

3.2.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, em tampão de corrida TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0). A eletroforese foi realizada a 100 w e a 60 mA durante 30 min. Para a determinação dos produtos amplificados foram utilizados os marcadores de peso molecular de 23Kpb a 500pb (Lambda DNA/HindIII e EcoRI) e 1000 pb (PCR Markers). Nas amostras DNAs foram adicionado corante Ez-Vision, que

possibilita a visualização do DNA. Os resultados foram visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.3 Vetor de expressão bacteriano

O vetor utilizado foi o pET28a(+) que permite a expressão da proteína fusionada a 6 resíduos de histidina, tanto na extremidade amino-Terminal (N-terminal) quanto na extremidade carboxi-Terminal (C-terminal), o que facilita a purificação da proteína (Fig. 7) (Silva, 2014).

Figura 7: Esquema do pET 28a(+) (Novagen) vetor utilizado para expressão.

3.2.4 Minipreparação de DNA plasmidial

Para o plasmídeo pET28a(+) foram feitos a extração e a purificação utilizando o sistema *PureYiel Plasmid Miniprep System* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante.

3.2.5 Purificação do cDNA

Depois da etapa de PCR foi feita uma eletroforese em gel de agarose e após visualização da banda correspondente ao cDNA, esta foi recortada do gel com auxílio de um bisturi estéril e purificada com o sistema *Wizard SV Gel PCR Clean-up System*, seguindo protocolo do fabricante.

3.2.6 Sequenciamento

Os sequenciamentos foram realizados no Centro de Genoma Humano (USP-SP-Brasil), onde foram utilizados 15ng a 25ng de produtos de PCR para as reações.

Para análises comparativas dos resultados foi utilizado o banco de dados de sequências genéticas GenBank, mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) com a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), utilizando o programa Biological Sequence Alignment Editor (Bioedit), um editor de alinhamento de sequência biológica.

3.2.7 Preparação do Inserto (cDNA) e do Vetor (Plasmídeo)

Para a reação com o vetor pET28a(+) e o cDNA para a região C-catalítica da sEca 324pb ambos foram clivados com as enzimas NcoI e EcoRI.

Depois desta reação o vetor foi desfosforilado.

3.2.8 Desfosforilação do vetor

A reação de desfosforilação do vetor consiste na retirada do grupo fosfato da região 5' da dupla fita de DNA. Desta forma, a probabilidade das extremidades do vetor se unirem, tornando-o circular novamente, é quase nula. Esta reação de desfosforilação foi feita com 1 unidade de enzima fosfatase alcalina, com incubação de 1h30min a 37°C. A inativação da enzima foi feita com incubação a 60°C por 10 min.

3.2.9 Ligação do inserto ao vetor

A ligação do fragmento de DNA de interesse ao vetor foi feita em uma reação contendo uma mistura do vetor com o inserto na proporção de 1:5; e foram utilizados 5U da enzima *T4 DNA Ligase*, 2µL do tampão 10x *T4 DNA ligase* e água estéril para o volume final de 20 µL. A reação de ligação foi incubada por 16 horas a 8°C.

3.2.10 Obtenção de células competente *E. coli*

As cepas de bactéria *E. coli* foram estriadas em placas LB-ágar, e foram incubadas por 16 horas a 37° C. Depois da incubação uma colônia isolada foi inoculada em 2mL de meio LB líquido, e mantido sob agitação por 16 horas. O inóculo foi diluído em 100mL de meio LB e deixado sob agitação até atingir a densidade óptica ($DO_{600} \sim 0,4-0,5$) e a cultura foi transferida para o gelo por 10 min.

O inóculo foi dividido em 2 tubos (50ml) e centrifugados, o pelete foi ressuspensão com solução de $CaCl_2$ gelada. Após ficar 15 min. em gelo a suspensão foi novamente centrifugado e em seguida foi retirado o sobrenadante. Este pelete foi novamente ressuspensão com solução de $CaCl_2$ alicotado em tubos de 1,5 mL estéreis e armazenado em freezer a -80 °C (Carvalho; Ricci; Affonso,2010).

3.2.11 Transformação de bactérias *E. coli*

Para transformação das células bacterianas o método utilizado foi o choque térmico. Para a reação foram adicionados 20µL do produto de ligação em 200µL de células competentes e mantida em gelo por 10 min. O choque térmico foi realizado mantendo os micro tubos em banho-maria a 42°C por 1 minuto e em seguida colocado no gelo por mais 5 min. Em seguida foram adicionados 200µL de meio SOC (Carvalho; Ricci; Affonso, 2010) e as células foram incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação. Após esse período as bactérias foram espalhadas em meio LB - ágar com antibiótico canamicina.

Após incubação a 37°C por 16 horas, as colônias de bactérias foram transferidas para tubos de 15ml, contendo 3ml de meio líquido LB e 50µg/mL de canamicina e incubadas a 37°C por 16 horas.

3.2.12 Teste para clones positivos ao cDNA para a região C-catalítica

A detecção quanto a ligação do inserto ao vetor pET28a(+) se deu através de PCR utilizando primers desenhados a partir da sequência do próprio vetor denominados T7 promotor e terminador, utilizando as mesmas condições descritas no item 3.2.1.

T7 promotor : TTTTGTTTAACTTTAAGAAGG

T7 terminador: TAGTTATTGCTCAGCGG

3.2.13 Expressão da proteína recombinante

Para expressão da proteína recombinante 2 ou 3 colônias das cepas bacterianas contendo o plasmídeo com o inserto, foram inoculadas em meio LB líquido com canamicina (50 µg/mL), e este inóculo foi mantido sob agitação de 180 a 200 rpm à temperatura de 37°C por 16 horas.

Ao final deste período a cultura foi diluída na proporção 1:20 em meio LB com canamicina e mantida nas mesmas condições de crescimento até a cultura bacteriana atingir uma densidade óptica ($Do_{600} \sim 0,4-0,8$) (Affonso, 2000). Nesta etapa se fez a ativação para a produção da proteína recombinante com a adição do reagente IPTG (*isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) em uma concentração final de 0,5M, por 5h a 37°C; 16h a 18°C, 25°C, 30°C e 37°C com agitação de 150 rpm (Pereira, 2014).

3.2.14 Extração da proteína recombinante

Após o período de expressão a cultura foi centrifugada a 4.500 rpm por 10 min a 4°C. O pelete de bactérias formado foi ressuspenso em solução de tris-HCL 0,02M e NaCl 0,1M e submetido à lise celular com um sonicador de células, por sete vezes com intervalo de 30 seg. entre as sonicações, sempre em gelo. Essa suspensão foi centrifugada a 9.500 rpm por 10 min a 4°C, e coletado o sobrenadante contendo as proteínas solúveis (Pereira, 2014).

3.2.15 Purificação

A partir dos extratos bacterianos as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia. A metodologia utilizada foi a cromatografia por afinidade a íons metálicos, esta etapa foi realizada no equipamento ÄKTA PURIFIER.

O sobrenadante obtido após lise celular foi aplicado a uma coluna de cromatografia de afinidade a íons metálicos, HisTrap FF crude (GE Healthcare), para purificação da proteína recombinante. A escolha do método de purificação foi baseada na expressão da proteína recombinante ligada a 6 histidinas no vetor pET 28_c-sEca.

A coluna foi equilibrada com uma solução de Tris-HCL 0,02M e NaCl 0,1M, após a passagem do extrato, a proteína foi eluída com concentrações de Imidazol de 0 a 0,5 M. A eluição da proteína de interesse foi feita com dois tipos de gradiente de Imidazol: linear e *steps*.

3.2.16 Análises da proteína recombinante

3.2.16.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise da região C-catalítica da sEca foi realizada por eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), com gel de separação a 15 % e o de empilhamento a 4% (Laemmli,1970). Foram analisadas as amostras de cultura bacteriana com e sem ativação por IPTG, lise por sonicação e amostras purificadas na coluna de afinidade. As amostras foram preparadas por mistura com o tampão de amostra, homogeneizadas e aquecidas por 10 min a 95°C.

A migração das amostras foi feita em tampão de corrida Tris-Glicina, a 20 mA por 90 min.

Após a eletroforese, os géis foram transferidos para uma cuba contendo solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 e deixados sob baixa agitação por até 30 min. A descoloração dos géis foi realizada com solução descorante por 30 min.

3.2.16.2 Dot Blotting

Para análise por Dot Blotting uma membrana de nitrocelulose foi recortada e depois aplicados 20µL da amostra e incubada com PBS acrescido de 5% de leite em pó desnatado, por 10min. Após esta etapa, a membrana foi incubada com soro contendo anticorpo primário ECA (C-20, anticorpo de cabra) com diluição de 1:5000, em PBS e 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora a 8°C, depois deste período a membrana foi submetida a 2 lavagens consecutivas com PBS e 5% de leite em pó desnatado por 15 min cada. Em seguida foi incubada com anticorpo secundário (anti-cabra) com diluição de 1:4000, em PBS e 5% de leite em pó desnatado, por 30 min, para detecção da proteína foi utilizado o sistema de detecção de proteínas por ECL.

3.2.17 Caracterização estrutural

3.2.17.1 Dicroísmo Circular (CD)

Para verificar se as proteínas recombinantes possuem a estrutura secundária correta, foram feitas análises de dicroísmo circular. Esta metodologia foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron-LNLS (Campinas, SP, Brasil).

Esta é uma técnica que permite obter dados da composição de estrutura secundária de proteínas (α -helice, β -folha e β -Turn). As análises foram feitas em concentrações de proteína pura entre 1,5 - 2 µM em tampão Tris/HCL 0,02M e NaCl 0,1M. Os espectros foram coletados entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm, em intervalos de 0,5 nm, com 4 leituras acumuladas para se obter uma média entre os espectros. O caminho óptico utilizado foi de 1 mm. As análises dos resultados do CD foram feitas com o programa CDNN (Bohm; Muhr, Jaenicke,.1992).

Análises da perda da conformação foram feitas utilizando o sistema de controle de temperatura Peltier, com variação de temperatura de 5°C, indo de 20°C – 100°C.

3.2.17.2 Fluorescência

Foram feitos ensaios de Fluorescência para que fosse possível estudar a conformação terciária da proteína, por emissão de fluorescência do triptofano.

Com esta técnica foi estudada a incorporação de íons Zinco, que sabidamente estão ligados à região HEXXH. A sequência estudada da região C-catalítica da sEca possui um triptofano o que tornou esta análise possível. Esta metodologia foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron-LNLS (Campinas, SP, Brasil) e também no Centro de Química e Meio Ambiente – CQMA, que faz parte do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (São Paulo, SP, Brasil).

As amostras de proteína pura em concentrações variando entre 1,5 a 2 μ M em solução de Tris/HCL 0,02M e NaCl 0,1M foram submetidas a análises de Fluorescência. O comprimento de onda de excitação foi 280 nm e os espectros de fluorescência foram coletados entre os comprimentos de onda de 300 a 400 nm.

3.2.18 Atividade enzimática

Para a c-sECA foi utilizado o substrato Hippuril-His-Leu (HHL). A amostra que continha a proteína purificada (40 μ l) foi incubada a 37°C com 200 μ l do substrato, 18h, em seguida a reação foi interrompida com adição de 1,5ml de NaOH 0,28N. O dipeptídeo His-Leu liberado foi acoplado ao marcador fluorescente ortoftaldialdeído (Sigma,EUA), 20mg/ml em metanol, esta reação é interrompida depois de 10 min pela adição de 200 μ L de HCL 3N (Aragão, 2013).

A atividade foi determinada espectrofluorimetricamente (excitação: 380nm e emissão: 500nm). Os resultados foram expressos em nmol/min/ml.

Para o ensaio de inibição foi utilizado 40 μ l do fármaco lisinopril na concentração de 10 μ M, seguindo o mesmo protocolo do ensaio de atividade e também foi determinado espectrofluorimetricamente.

3.2.19 Cinética Enzimática

Este ensaio foi feito para medir a velocidade de reações enzimáticas, o qual foi realizado com mudanças de concentração do substrato Hippuril-His-Leu (HHL) para medir a taxa de reação, também foi determinada a atividade espectrofluorimetricamente.

A partir deste ensaio foi calculado o K_M (K_M - constante de Michaelis Menten) que é uma constante de extrema importância no estudo das reações

enzimáticas, permite entender a função de enzimas que catalisam uma reação específica. O K_m também indica a afinidade do substrato pela enzima, quanto menor o seu valor, maior é a afinidade da enzima pelo substrato (Siqueira et al., 2011).

Foi utilizado para a determinação deste ensaio a cinética de Michaelis-Menten.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção do cDNA

A primeira etapa para a construção do vetor contendo a sequência para a região C-catalítica da sECA foi constituída com a amplificação do cDNA utilizando como molde o vetor pcDNA 3.1 Zeo - sECA, que contém o cDNA com o gene da ECA humana (pECA).

Para a reação de PCR foram utilizados os primers e condições descritas em Materiais e Métodos item 3.2.1.

Para análise do resultado da amplificação foi utilizado gel de agarose (Fig.8). Pode ser observado nesta figura o resultado da reação de PCR positiva para a região C-catalítica da sECA, depois este cDNA foi clivado com as enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI*, purificado e quantificado.

Figura 8: Gel de agarose 1% contendo a amostra da reação de PCR para a amplificação do cDNA da região C-catalítica da sECA: (M), marcador de peso molecular Lambda EcoRI/HindIII; (1), amplificação da região C-catalítica da sECA.

4.1.2 Construção do vetor de expressão

Para a construção do vetor de expressão da proteína recombinante, foi utilizado o pET28a(+). O vetor foi clivado com as mesmas enzimas utilizadas para a clivagem do cDNA, *NcoI* e *EcoRI*, e em seguida foi desfosforilado.

Na Figura 9 é possível observar o vetor e o cDNA clivados e purificados.

Figura 9: Análise em gel de agarose 1% do vetor utilizado na construção para a expressão da proteína c-sECA e cDNA da região C-catalítico da sECA, ambos clivados e purificados. (M) marcador de peso molecular Lambda *EcoRI*/*HindIII*, (1) pET28a(+), (2) cDNA da região C-catalítico da sECA, clivados com *NcoI* e *EcoRI*.

Após esta etapa de preparação do vetor e cDNA foi possível iniciar as reações de ligação do inserto ao vetor de expressão e clonagem em cepa bacteriana. Para as colônias resultantes da clonagem utilizamos a técnica de extração plasmidial, e com este plasmídeo foi feita reação de PCR para o vetor pET28_c-sECA.

Na Figura 10 é possível visualizar os clones obtidos depois da extração plasmidial.

Figura 10: Análise em gel de agarose 1% de clones depois da extração plasmidial. (M) marcador de peso molecular Lambda *EcoRI/HindIII*, (1), (2), (3) e (4) clones a partir da ligação de inserto com vetor.

O vetor pET28a(+) agora denominado pET28_c-sECA, foi analisado por reações de PCR utilizando os primers Sense N5' e Anti-sense C3'. Na Figura 11 é possível observar o produto das reações de PCR com 5 colônias obtidas de ligação e também o controle positivo na linha 6.

Figura 11: Análise em gel de agarose 1% de clones positivos após reação de PCR utilizando os primers Sense N5' e Anti-sense C3': (M) marcador de peso molecular Lambda *EcoRI/HindIII*, (1), (2), (3), (4), (5), amplificação a partir do vetor pET28_c-sECA e (6) controle positivo.

Para a análise do gel de agarose utilizamos como controle positivo o vetor molde que continha a ECA somática humana. Em um dos clones positivos foi feita a reação de PCR com os primers T7 promotor e T7 terminador (que hibridizam com o vetor), cujo resultado é possível analisar na Figura 12.

Figura 12: Análise em gel de agarose 1% de clone positivo após reação de PCR utilizando primer T7 promotor e T7 terminador: (M) marcador de peso molecular Lambda *EcoRI/HindIII*, (1) amplificação a partir do vetor pET28_c-sECA.

Os produtos de PCR dos clones positivos foram sequenciados e analisados pelo programa *Bioedit*. As análises dos sequenciamentos foram realizadas pelo programa *GenBank* do NCBI *Blast*, e confirmada uma homologia de 88% para a enzima conversora de angiotensina (Fig. 13).

Figura 13: Eletroferograma parcial obtido pelo sequenciamento do cDNA para a região C-catalítica da sECA, utilizando o vetor pET28_c-sECA.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	PREDICTED: Homo sapiens angiotensin I converting enzyme (ACE), transcript variant X2, mRNA	364	364	36%	2e-97	88%	XM_006721737.2
☐	PREDICTED: Pan paniscus angiotensin-converting enzyme (LOC100980711), mRNA	364	364	36%	2e-97	88%	XM_008963751.1
☐	PREDICTED: Homo sapiens angiotensin I converting enzyme (ACE), transcript variant X1, mRNA	364	469	36%	2e-97	88%	XM_005257110.1
☐	Homo sapiens angiotensin I converting enzyme (ACE), transcript variant 2, mRNA	364	364	36%	2e-97	88%	NM_152830.2
☒	Homo sapiens angiotensin I converting enzyme (ACE), transcript variant 1, mRNA	364	469	36%	2e-97	88%	NM_000789.3

Homo sapiens angiotensin I converting enzyme (ACE), transcript variant 1, mRNA

Sequence ID: [ref|NM_000789.3|](#) Length: 4969 Number of Matches: 2Range 1: 2973 to 3233 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
364 bits(197)	2e-97	229/261(88%)	0/261(0%)	Plus/Plus
Query 40	TGGAGRACCTGKYGSWGGSCCACCACGAAATGGGCGACATCCAGTATTTTCATGCAGTACA	99		
Sbjct 2973	TGGAGGACCTGGTGGTGGCCACCACGAAATGGGCGACATCCAGTATTTTCATGCAGTACA	3032		
Query 100	AAGACTTRCCTGTGKCCCTTGAGGGAGGGKGCCAACCCCGGCTTCCATGAGGCCATTGGGG	159		
Sbjct 3033	AAGACTTACCTGTGGCCTTGAGGGAGGGTGCCAACCCCGGCTTCCATGAGGCCATTGGGG	3092		
Query 160	ACGTGCTRGCCCTCTCRGTGTCTACKCCYRAGCACCTGCACAGWCTCAACCTGCTGAGCM	219		
Sbjct 3093	ACGTGCTAGCCCTCTCAGTGTCTACGCCCAAGCACCTGCACAGTCTCAACCTGCTGAGCA	3152		
Query 220	GTGAGRSYGRYRGCRACGAGMATGACATCAACTTTTGMTGAAGATGGCMCTKGAMAARA	279		
Sbjct 3153	GTGAGGGTGGCAGCGACGACATGACATCAACTTTCTGATGAAGATGGCCCTTGACAAGA	3212		
Query 280	TYGCCTTTATCCCCTTCAGCT	300		
Sbjct 3213	TCGCCTTTATCCCCTTCAGCT	3233		

Figura 14: Análise do sequenciamento do cDNA para a região C-catalítica da sECA clonada, em comparação com *GenBank* NCBI.

4.1.3 Expressão da proteína recombinante

Depois da confirmação da construção do vetor pET-28_c-sECA foi avaliada sua expressão. Foram realizadas ativações de 5h e 16h a 37°C e ativações de 5 horas a 18°C, 25°C e 30°C, apenas nas ativações de 37°C em 5h e 16h que obtivemos melhores resultados.

O vetor pET-28a(+) possui duas sequências de histidina na região do sítio de policlonagem, uma na extremidade N-terminal e outra na C-terminal. O cDNA para a sequência do sítio catalítico estudado neste trabalho tem a sequência para as histidinas na região 3', esta construção permite a expressão da proteína de interesse ligada a 6 histidinas na região C-terminal.

As amostras de ativação foram centrifugadas e os peletes foram estocados a -20°C, ou ressuspensos em Tris-HCL 0,02M e NaCl 0,1M, sonificado 7

vezes por 30 seg com intervalo de 30 seg, centrifugada novamente, coletados os sobrenadantes aos quais foi adicionado PMSF 0,1M.

Na Figura 15 é possível analisar pelo gel de poliacrilamida as amostras correspondentes a cada etapa, o extrato crú, sonicado e o pelete resultante da amostra sonicada e centrifugada.

Figura 15: Gel de poliacrilamida 15% com amostras de expressão com vetor pET-28_c-sECA: (M) Marcador de massa molecular, (1) amostra clone ativado de 5h à 37°C extrato crú, (2) amostra sonicada e (3) pelete resultante da amostra sonicada e centrifugada.

É possível identificar a partir deste gel (Fig.15) que a solubilidade da proteína foi encontrada quando ativada por 5h em 37°C, na amostra do sobrenadante depois de sonicar.

4.1.4 Caracterização imunológica

A confirmação da identidade da proteína expressa foi feita por dot blotting, foi utilizado o anticorpo policlonal ECA (C-20 anticorpo de cabra) (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e na mesma membrana foi realizada a coloração pelo método de Ponceau 10%, que confirmou a localização das proteínas (Fig. 16).

Figura 16: A) Dot blotting contendo amostras da expressão com vetor pET-28_c-sECA e B) Coloração com Ponceau 10%. (1) amostra clone ativado de 5h a 37°C extrato cru, (2) amostra sonicada, (3) pelete resultante da amostra sonicada e centrifugada e (4) controle positivo.

Para a análise de Dot blotting foi utilizado como controle positivo extrato de rim de camundongo.

4.1.5 Purificação

Após a confirmação da expressão da proteína c-sECA na forma solúvel pelo vetor pET-28a(+), foi iniciada a etapa de purificação. A proteína obtida no sobrenadante de culturas ativadas (depois da sonicação e centrifugação) foi aplicada em uma coluna de afinidade a íons metálicos. Com esta metodologia a proteína foi eluída de 0% a 100% de imidazol, em gradiente linear. A proteína de

interesse foi eluída com 180mM de imidazol, porém contendo muitos contaminantes (dados não mostrados).

Outra estratégia utilizada foi a eluição da amostra por gradiente em “steps”. Na Figura 17 está representado o seu perfil cromatográfico de 0%,20%,40%,60% e 100% de imidazol, foi utilizado para a eluição da proteína o tampão Tris-HCL 0,02M, NaCl 0,1M e 0,5M Imidazol.

Figura 17: Perfil cromatográfico da amostra expressa em 5h à 37°C a partir do vetor pET-28_c-sECA em coluna de afinidade a íons metálicos, utilizando as concentrações de 0%=0mM, 20%=100mM, 40%=200mM, 60%=300mM e 100%=500mM de imidazol para eluição da proteína. Leitura em 280nm representada em azul e em verde as concentrações de imidazol.

Para esta purificação foi utilizada uma amostra de ativação de 5h a 37°C, e foi possível analisar a partir do gel de poliacrilamida (Fig.18) os tubos correspondentes ao pico.

Figura 18: Gel de poliacrilamida 15% com amostras correspondentes ao pico da etapa de purificação da proteína c-sECA em coluna por afinidade de íons metálicos. (M) marcador de massa molecular, (1) amostra tubo 6, (2) amostra tubo 7 e (3) amostra tubos 8 e 9.

Como foi possível identificar a amostra correspondente à proteína c-sECA pura (Fig. 18), então fizemos os mesmos procedimentos com a amostra de expressão em 16h à 37°C para sabermos se a proteína sairia em maior quantidade (Fig. 19).

Figura 19: Perfil cromatográfico da amostra expressa em 16h à 37°C a partir do vetor pET-28_c-sECA em coluna de afinidade a íons metálicos utilizando as concentrações de 0%=0mM, 20%=100mM, 40%=200mM, 60%=300mM e 100%=500mM de imidazol para eluição da proteína. Leitura em 280nm representada em azul e em verde as concentrações de imidazol.

Foi feito um gel de poliacrilamida com as amostras correspondentes ao pico do perfil cromatográfico (Fig.20).

Figura 20: Gel de poliacrilamida 15% com amostras correspondentes ao pico da etapa de purificação da proteína c-sECA em coluna por afinidade de íons metálicos. (M) marcador de massa molecular, (1) amostra tubo 6, (2) amostra tubo 7, (3) amostra tubo 8, (4) amostra tubo 9, (5) amostra tubo 10 e (6) amostra tubos 11 e 12.

Foi possível identificar que em ambas as purificações os picos surgiram na concentração de 0,1M de imidazol, e também observamos uma maior quantidade de contaminantes na amostra de 16h, por este motivo para as próximas etapas utilizamos a ativação de 5h.

Para seguir com as próximas análises foi realizado um dot blotting contendo uma amostra purificada (concentrada e dialisada), amostra sonicada (antes da purificação) e um controle positivo (Fig. 21).

Figura 21: Dot blotting contendo amostras da expressão e purificação com o vetor pET-28_c-sECA (1) Amostra purificada (concentrada e dialisada), (2) amostra sonicada (antes da purificação) e (3) controle positivo.

Para a análise de Dot blotting foi utilizado como controle positivo extrato de rim de camundongo. Depois destas etapas de purificação e confirmação pelo método imunológica seguimos para a quantificação e caracterização estrutural.

4.1.6 Quantificação da proteína

A concentração da proteína foi determinada usando a absorbância em 280 nm nas amostras de c-sECA purificada contendo 6,0 M de Hidroclorato de guanidina (Sigma–Aldrich). Neste método é obtido o valor da absorbância em 280 nm da proteína de interesse e este valor é aplicado na equação: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$

Onde: A é a absorbância obtida; ϵ é o coeficiente de absorção molar (na proteína c-sECA $\epsilon = 0,777$); l é a medida do percurso da luz na amostra; e c é a concentração molar, de acordo com a fórmula de Beer-Lambert Law (Calloway, 1997).

As amostras da proteína c-sECA purificada foram quantificadas por absorbância em 280 nm, e os resultados mostraram que a proteína obtida na forma pura foi 0,583mg/mL.

4.1.7 Dicroísmo Circular

A integridade estrutural da proteína foi analisada por dicroísmo circular. Depois da etapa de purificação a amostra foi concentrada e dialisada para a retirada do imidazol.

Para melhor ilustração está representado na Figura 22 o alinhamento das sequências de aminoácidos, com destaque nas regiões α -hélice e folhas β .

		$\beta 4$	$\beta 5$	$\alpha 15$	$h 16$	
tACE	354	ASAWDFYNGKDFRIQCTTVNLEDLVVAHHEM	GH	IQYFMQYKDLFVALREGANPGF		
c-sACE	959	ASAWDFYNGKDFRIQCTTVNLEDLVVAHHEM	GH	IQYFMQYKDLFVALREGANPGF		
		$\alpha 17$	$\alpha 18$	$\alpha 19$		
tACE	410	HEAIGDVLALS	VSTPKHLHSLNLLSSEGG	SDEHDINFLMFMALDKIAFIPFS	461	
c-sACE	1015	HEAIGDVLALS	VSTPKHLHSLNLLSSEGG	SDEHDINFLMFMALDKIAFIPFS	1066	

Figura 22: Alinhamento das sequências de aminoácidos da região correspondente ao sítio catalítico da região c-domínio da sECA (c-sECA) e tECA. As regiões de α -hélices estão sombreadas em amarelo e as folhas β em azul. O sítio de ligação com o íon zinco está em vermelho. Modificado de Corradi et al., 2006.

As análises obtidas pelo dicroísmo circular foram realizadas com o programa CDNN. Na Figura 23 está representada a molécula da proteína c-sECA da amostra de ativação em 5h à 37°C, apresentando um perfil predominantemente de estrutura α -hélice.

Figura 23: Perfil de dicroísmo circular da proteína c-sECA gerado a partir do programa CDNN.

A partir dos dados obtidos da análise do perfil de dicroísmo circular foi elaborada uma tabela (Tab. 1) com a porcentagem de α -hélice, β -sheet, β -Turn e Random coil em temperatura de 20°C.

Tabela 1: Análise do perfil de dicroísmo circular com dados obtidos a partir do programa CDNN.

c-sECA	α -Helice (%)	β - folha (%)	β -Turn (%)	Random coil (%)
20°C	76,7	2,1	10,8	9,2

Com estes resultados é possível observar que a proteína tem o perfil de dicroísmo circular esperado, já que possui mais α -hélice e também uma pequena porção de β .

Após este ensaio de identificação do perfil de dicroísmo circular foi realizado um ensaio com variações de temperatura.

Na Figura 24 é possível identificar a mudança de comportamento estrutural da proteína quando exposto a alta temperatura.

Figura 24: Perfil da estrutura secundária da proteína c-sECA com variação de temperatura.

Para que fosse possível uma melhor visualização do que ocorre com o aumento de temperatura na Figura 25 está representado o perfil de dicroísmo circular da amostra a 20°C e 90°C.

Figura 25: Perfil da estrutura secundária da proteína c-sECA entre 20°C e 90°C.

É clara a diferença do comportamento da estrutura secundária com a variação de temperatura e para melhor visualização os dados obtidos nas temperaturas intermediárias estão em uma tabela (Tab. 2).

Tabela 2: Análises por CD da c-sACE (12KDa) sob a ação de diferentes temperaturas.

c-sECA	α -Helice (%)	β -folha (%)	β -Turn (%)	Random coil (%)
30°C	78,1	3,8	10,4	9,3
40°C	76,1	4,3	10,8	9,7
45°C	75,3	4,3	11,0	9,1
50°C	74,7	4,4	11,2	9,8
60°C	65,9	6,3	12,1	14,6
70°C	65,2	6,8	12,5	16,0
80°C	56,9	8,8	13,3	20,4
90°C	45,8	11,9	14,8	25,7

Foi feita uma análise do perfil das curvas obtidas com a temperatura variando de 20°C para 45°C, na região que é detectada a perda de conformação da proteína (200-206nm). Na Figura 26 pode-se observar a mudança no perfil quando a temperatura atinge 45°C.

Figura 26: Perfil da estrutura secundária da proteína c-sECA com variação de temperatura, em destaque a mudança a partir de 45°C.

É possível observar a mudança do perfil a 45°C, o qual intercepta as curvas em outro ponto, seta preta na figura.

4.1.8 Fluorescência

A estrutura terciária da proteína foi analisada por emissão de fluorescência do aminoácido triptofano (Fig. 27).

Figura 27: Representação da molécula da região c-sECA, em rosa está a região do aminoácido triptofano³.

Na Figura 28 está representada a análise de fluorescência da proteína c-sECA.

Figura 28: Curva de emissão de fluorescência do triptofano da amostra de c-sECA ativada a 37°C.

Fizemos análises com adição de 0,05mM de ZnCl_2 e 0,05mM de EDTA (Fig. 29).

³ <http://www.openrasmol.org>

A)

B)

Figura 29: Curva de emissão de fluorescência do triptofano da amostra c-sECA ativada a 37°C. A) Amostra com adição de 0,05mM de ZnCl₂ ao tampão e B) amostra contendo 0,05mM ZnCl₂ com adição de 0,05mM de EDTA e tampão.

Para melhor comparação foi feito um gráfico com a amostra de c-sECA, a mesma amostra com adição de ZnCl_2 e também adição de 0,05mM de EDTA (Fig.30).

Figura 30: Curva de emissão de fluorescência do triptofano da amostra c-sECA com adição de 0,05mM ZnCl_2 e 0,05mM de EDTA, para melhor efeito comparativo.

Foi possível observar a partir dos dados obtidos sem adição e com adição de ZnCl_2 e EDTA o perfil da molécula, onde ocorre a maior emissão de fluorescência do triptofano. A amostra com proteína c-sECA teve a maior emissão em 335,4nm, com a adição de ZnCl_2 foi para 336,4nm e quando adicionado EDTA voltou para 335nm.

4.1.9 Atividade enzimática

Foram realizados ensaios de atividade enzimática e inibição, utilizando como substrato Hippuril-His-Leu (HHL) que é específico para a região C-domínio da sECA.

Na Figura 31 está representada a atividade de c-sECA sem qualquer tipo de inibição e em verde a atividade de c-sECA utilizando o fármaco lisinopril.

Figura 31: Ensaio de atividade enzimática e inibição utilizando o fármaco lisinopril. Em azul a atividade enzimática de c-sECA e em verde a atividade enzimática utilizando o inibidor lisinopril.

Neste experimento foi possível observar que utilizando o inibidor lisinopril houve uma inibição da atividade de 59%.

4.1.10 Cinética Enzimática

Foi feito o ensaio utilizando a cinética de Michaelis-Menten, como está representado na Figura 32.

Figura 32: Cinética de Michaelis-Menten para a determinação de K_m utilizando c-sECA e o substrato Hippuril-His-Leu (HHL).

A partir deste ensaio conseguimos obter o valor de K_m que foi de 2,425 mM.

5 DISCUSSÃO

A hipertensão arterial contribui para o desenvolvimento de muitas doenças circulatórias de impacto na população mundial. Segundo a OMS há um alto índice de doenças cardiovasculares, como isquemia e AVC, as quais estão relacionadas com a elevação da pressão arterial. Estudos epidemiológicos demonstraram claramente que a hipertensão é um "assassino silencioso", sem sinais de alerta. (Chockalingam, 2008).

A ECA é um componente essencial do SRA, mediando numerosos efeitos sistêmicos e locais no sistema cardiovascular, por isso o seu bloqueio com os IECAs tem demonstrado atuação não somente na redução da pressão arterial, mas também na redução da progressão de doenças renais e cardíacas. O contínuo desenvolvimento e a procura de outras indicações para os agentes que bloqueiam o SRA têm permitido seu uso em outras condições, estão em desenvolvimento novas pesquisas envolvendo regiões de ligação de inibidores com a ECA, com os sítios catalíticos, estão sendo desenvolvidas visando à obtenção de inibidores mais eficientes e/ou a síntese de novos inibidores (Donoghue et al., 2000; Ribeiro, 2003; Redelinghuys, Nchinda, Sturrock, 2005; Akif et al., 2010).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma estratégia para a obtenção do sítio catalítico da região C-domínio da sECA, a qual liga-se com inibidores que impedem sua atividade enzimática, na forma pura, com sua conformação natural e principalmente com atividade enzimática.

A clonagem em vetor da linha pET já havia sido feita por Vanvakas et al., 2007, que utilizaram o vetor pET-3a e a proteína foi expressa na forma agregada e solubilizada com o auxílio de agentes desnaturantes. Neste processo o *refolding*, ou seja, a obtenção da estrutura natural desta região foi por meio de um reagente que induz a formação de estruturas α -hélices, o TFA (ácido trifluoroacético). Como observado na Figura 22, esta sequência possui além das α -hélices, duas folhas β que compõe o sítio de ligação de íons zinco e ligação com os inibidores.

Em nosso trabalho a expressão no vetor pET-28a(+) produziu uma proteína solúvel, embora em baixas quantidades. Uma possível explicação para a solubilidade da proteína seria a sequência de histidinas ligadas a ela. Cabrita et al., 2006, relacionaram sequências *tag* (sequências fusionadas à proteína de

interesse), que auxiliam na purificação e que em alguns casos facilitaram a produção de proteínas na forma solúvel. A proteína c-sECA produzida em nosso laboratório estava solúvel e as seis histidinas a ela ligadas facilitaram a sua purificação.

A purificação da c-sECA com eluição em *steps* foi a que possibilitou a obtenção da proteína pura. Nas Figuras 17 e 18, na purificação e na caracterização por SDS-PAGE das amostras desta purificação, observa-se que a proteína foi eluída já na parte de declínio do pico de eluição. Foram feitas purificações com eluições com *steps* variando de 5 unidades, sem obtenção da proteína pura como o obtido na Figura 17.

Na comparação das expressões de c-sECA de 5h e 16h, as purificações mostraram que a produção em 16h aumentou a quantidade de contaminantes bacterianos, sendo estes encontrados inclusive na região final do pico de eluição. Esta região de eluição era prevista conter a proteína já pura, além disso, o pico de eluição foi mais largo (contendo 5 frações, enquanto a purificação de 5h continha 3 frações). Acreditamos que pela maior quantidade de contaminantes, devido ao maior tempo de expressão de proteínas dentro da cultura, houve uma não separação adequada das proteínas durante a eluição, ocasionando a contaminação.

Os problemas de baixa produção e baixa absorbância foram contornados com um maior volume de cultura ativada. Esse procedimento possibilitou a obtenção de 0,583mg/mL, após diálise e concentração da amostra. Essa quantidade de proteína foi o suficiente para as análises estruturais.

Os perfis da proteína c-sECA obtidos por dicroísmo circular comprovaram sua conformação secundária esperada. Os picos mínimos foram de 208 e 222 nm, os quais são os comprimentos de onda para a estrutura de α -hélice. Quando estes dados foram analisados pelo programa CDNN, a porcentagem de α -hélice não é próxima de 100%, é na realidade 76,7%, enquanto que as estruturas β contribuem com 12,9%. Alguns trabalhos estudaram os sítios catalíticos dos domínios N e C, os quais eram sintetizados e enovelados com o uso TFA ou TFE (ácido trifluoroetanol) que promove a formação de estruturas em alfa hélice. Entretanto, a estrutura da c-sECA consiste da sequência entre o aminoácido 956 a 1066, a qual é estruturada em 4 α -hélices (α 15, α 17, α 18 e α 19), uma pequena

α -hélice denominada de H16 e 2 folhas β ($\beta 4$ e $\beta 5$), Fig. 22. Durante o enovelamento algumas proteínas podem ter uma formação estrutural transiente de α -hélice, denominada de hélice não-nativa. Esta formação foi descrita por Ikeguchi, 2014 em um estudo de enovelamento da β -globulina, que tem predominantemente a estrutura de folha β , com TFE e encontrou formação de hélice não-nativa. O uso de TFA ou TFE no enovelamento de c-sECA poderia causar esse tipo de formação - de hélice não-nativa (Spyroulias et al., 2004; Redelinguys, Nchinda, Sturrock, 2005; Vamvakas et al., 2007; Vamvakas et al., 2009; Spyranti et al., 2010; Akif et al., 2010; Ikeguchi, 2014).

O fato da região C-dominio conter 6 folhas β e destas 2 estarem muito próximas ao sítio de ligação com íons zinco, leva a crer que estas podem ser importantes tanto na ligação com zinco como na sua atividade catalítica (Corradi et al., 2006). A obtenção da proteína com sua conformação mais próxima da nativa possibilita o não comprometimento das análises de fluorescência.

As análises de estabilidade por temperatura indicaram que entre as temperaturas de 40°C e 50°C ocorreu uma alteração no perfil das curvas de dicroísmo circular, como o observado por De Andrade et al., 2010, em estudo semelhante com as três isoformas de sECA de rato (130, 90 e 65kDa). Embora, quando os resultados foram analisados pelo programa CDNN, observou-se uma diminuição gradual nas porcentagens de α -hélices. Entretanto, análises dos perfis de dicroísmo circular entre 200 e 206 nm sugerem que há uma alteração no enovelamento na temperatura de 45°C; o perfil correspondente à temperatura de 45°C, Fig. 26, foi o primeiro a sofrer alteração; isso indica que ocorreu uma perda de conformação (Corrêa; Ramos, 2009; De Andrade et al., 2010).

A técnica de fluorescência é amplamente utilizada em estudos de estrutura de proteínas e nas propriedades dinâmicas que estão diretamente relacionadas com as funções biológicas, bem como com as ligações específicas com íons ou peptídeos. A estrutura terciária da proteína c-sECA foi avaliada com esta técnica.

A proteína c-sECA contém um resíduo de triptofano (W) e seis resíduos de tirosinas (Y) e esta mostrou alterações significativas nas medidas de sua fluorescência máxima do resíduo de triptofano com a adição de íons zinco. A mesma amostra quando retirado os íons zinco, pela adição de EDTA, teve sua

medida de emissão do triptofano com valores semelhantes ao estado original, isto é, sem íons zinco.

O sítio ativo da região C-domínio é composto pelo sítio HEXXH que liga-se a dois íons de zinco e um terceiro íon se liga no resíduo de ácido glutâmico que está a 23 resíduos, no sítio EAXGD. A sequência analisada neste trabalho, c-sECA, contém três resíduos de ligação com zinco, His 988, His 992 e Glu 1016. Spyroulias et al., 2004 analisaram esta mesma região da sECA composta de apenas 39 resíduos, que contém o sítio catalítico para o íon zinco, e observaram uma pequena mudança conformacional entre a forma livre e a com zinco. A observação destes autores corrobora com as nossas análises de fluorescência (Spyroulias et al., 2004).

Com a confirmação da incorporação de íons zinco na molécula analisada neste trabalho, nós avaliamos a atividade enzimática. As análises mostraram que esta proteína possui atividade (Fig. 31) e esta atividade diminuiu significativamente quando pré-incubada com o inibidor lisinopril. O lisinopril é referenciado na literatura como sendo um inibidor que possui maior ação de inibição na região C-domínio e este inibiu a atividade da c-sECA em 59%, o que mostra que proteína é adequada a estudos de ligação com inibidores (Michaud et al., 1997; Anthony et al., 2012).

Nos ensaios de Km foi possível identificar que ocorreu afinidade entre a proteína e seu substrato específico (HHL), quando comparado com outros trabalhos nosso resultado de 2,425mM foi satisfatório.

Inibidores de ECA foram as primeiras drogas prescritas de forma ampla na população para tratamento de doenças cardiovasculares, porém uma parte (10 a 20%) podem desenvolver tosse seca ou em uma situação pior o angiodema. Estes efeitos são causados provavelmente pelo aumento dos níveis de bradicinina. O C-domínio de sECA. Quando é inativo em camundongos mutantes há a redução da hidrólise de Ang I a II; enquanto que os níveis dos peptídeos derivados da bradicinina não têm alterações significativas. Estes estudos mostram que inibidores específicos para a região C-domínio podem manter os níveis dos produtos da hidrólise de bradicinina e ter um mínimo de efeitos colaterais (Denti et al., 2014).

6 CONCLUSÕES

- A estratégia de clonagem, expressão e ativação possibilitou a produção da proteína c-sECA na forma solúvel;
- Com um passo de purificação foi possível obter a proteína pura;
- A proteína c-sECA pura possui as estruturas primária e secundária corretas;
- A c-sECA possui atividade enzimática;
- O ensaio de inibição com Lisinopril mostrou que este tem ação inibitória na c-sECA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, R. **Estudos da expressão citoplasmática bacteriana de uma forma de prolactina humana e de sua solubilização e renaturação a partir de corpos de inclusão.** 2000. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo.

AKIF, M.; GEORGIADIS, D.; MAHAJAN, A.; DIVE, V.; STURROCK, E. D.; ISAAC, R. R.; ACHARYA, K. R. High-Resolution crystal structures of drosophila melanogaster angiotensin-converting enzyme in complex with novel inhibitors and antihypertensive drugs. **J. Mol. Biol.** v. 400, p. 502–517, 2010.

ANTHONY, C. S.; CORRADI, H. R.; SCHWAGER, S. L.; REDELINGHUYS, P.; GEORGIADIS, D.; DIVE, V.; ACHARYA, K. R.; STURROCK, E. D. The N domain of human angiotensin-I-converting enzyme: the role of N-glycosylation and the crystal structure in complex with an N domain-specific phosphinic inhibitor, RXP407. **J. Biol. Chem.** v. 285, p. 35685–35693, 2010.

ANTHONY, C. S.; MASUYER, G.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, K. R. Structure based drug design of angiotensin-I converting enzyme inhibitors. **Curr. Top. Med. Chem.** v. 19, p. 845-855, 2012.

ARAGÃO, D.S. **Processamento e solubilização das isoformas com 65 e 90 KDa da enzima conversora de angiotensina I nas células mesangiais.** 2013. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista Medicina, São Paulo.

ARBOIX, A. Cardiovascular risk factors for acute stroke: Risk profiles in the different subtypes of ischemic stroke. **World J. Clin. Cases.** v.3, p. 418-429, 2015.

BALAKUMAR, P.; JAGADEESH, G.; A century old renin–angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. **Cell. Signal.** v. 26, p. 2147-2160, 2014.

BOCCHI, E. A.; MARCONDES-BRAGA, F. G.; AYUB-FERREIRA, S. M.; ROHDE, L. E.; OLIVEIRA, W. A.; ALMEIDA, D. R.; et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 93, p. 3-70, 2009.

BOHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far uv circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Eng.** v. 5, p. 191-195, 1992.

CABRITA, L. D.; DAI, W.; BOTTOMLEY, S. P. A family of E. coli expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. **BMC Biotechnol.** v. 6, p. 1-8, 2006.

CALLOWAY, D. Beer-Lambert Law. **J. Chem. Educ.** v. 74, p. 744, 1997.

CARVALHO, C. V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. **Guia de práticas em biologia molecular**. 1. Ed. São Paulo, S.P.: Yendis. 2010.

CHOCKALINGAM, A. World hypertension day and global awareness. **Can. J. Cardiol.** v. 24, p. 441-444, 2008.

CORRADI, H. R.; SCHWAGER, S.; NCHINDA, A. T.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, K. R. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. **J. Mol. Biol.** v.10, p. 964–974, 2006.

CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **Afr. J. Biochem. Res.** v. 3, p.164-173, 2009.

DE ANDRADE; M. C.; AFFONSO, R.; FERNANDES, F. B.; FEBBA, A. C.; DA SILVA, I. D.; STELLA, R. C.; MARSON, O.; JUBILUT, G. N.; HIRATA, I. Y.; CARMONA, A. K.; CORRADI, H.; ACHARYA, K. R.; STURROCK, E. D.; CASARINI, D. E. Spectroscopic and structural analysis of somatic and N-domain angiotensin I-converting enzyme isoforms from mesangial cells from Wistar and spontaneously hypertensive rats. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 2, p. 238-243, 2010.

DENTI, P.; SHRP, S. K.; KRÖGER, W. L.; SCHWAGER, S. L.; MAHAJAN, A.; NJOROGÉ, M.; GIBHARD, L.; SMIT, I.; CHIBALE, K.; WIESTNER, L.; STURROCK, E. D.; DAVIES, N. H. Pharmacokinetic evaluation of lisinopril-tryptophan, a novel C-domain ACE inhibitor. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 56, p. 113-119, 2014.

DESHOTELS, M. R.; XIA, H.; SRIRAMULA, S.; LAZARTIGUES, E.; FILIPEANU, C. M. Angiotensin II mediates angiotensin converting enzyme type 2 internalization and degradation through an angiotensin II type I receptor–dependent mechanism. **Hypertension.** v.64, p.1368-1375, 2014.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ. Res.** v. 87, p. e1-e9, 2000.

FUCHS, S.; XIAO, H. D.; HUBERT, C.; MICHAUD, A.; CAMPBELL, D. J.; ADAMS, J. W.; CAPECCHI, M. R.; CORVOL, P.; BERNSTEIN, K. E. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. **Hypertension**. v. 51, p. 267-274, 2008.

GWATHWEY, T. M.; ALZAYADNEH, E. M.; PENDERGRASS, K. D.; CHAPPELL, M. C. Novel roles of nuclear angiotensin receptors and signaling mechanisms. **Am. J. Physiol. Regul. Integ. Comp. Physiol.** v. 302 p.518–530, 2012.

HOOPER, N. M.; KARRAN, E. H.; TURNER, A. J. Membrane protein secretases. **Biochem. J.** v. 2, p. 265-279, 1997.

IKEGUCHI, M. Transient non-native helix formation during the folding of β -lactoglobulin. **Biomolecules**. v. 4, p. 202-216, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LIMA, S. G.; HATAGIMA, A.; SILVA, N. L. C. L. Sistema renina-angiotensina: é possível identificar genes de suscetibilidade à hipertensão?. **Arq. Bras. Cardiol.** v.89, p. 427-433, 2007.

LUNOW, D.; KAISER, S.; RÜCKRIEMEN, J.; POHL, C.; HENLE, T. Tryptophan-containing dipeptides are C-domain selective inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Food Chem.** v. 166, p. 596-602, 2014

MAARTEN, W. T.; BRENNER, B. M. Renoprotective benefits of RAS inhibition: From ACEI to angiotensin II antagonists. **Kidney Int.** v. 57, p. 1803–1817, 2000.

MICHAUD, A.; WILLIAMS, T. A.; CHAUVET, M. T.; CORVOL, P. Substrate dependence of angiotensin I-converting enzyme inhibition: captopril displays a partial selectivity for inhibition of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline hydrolysis compared with that of angiotensin I. **Mol. Pharmacol.** v. 51, p. 1070-1076, 1997.

PASSOS, V. M. A.; ASSIS, T. D.; BARRETO, S. M. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiol. Serv. Saúde**. v.15, p. 35-45, 2006.

PEREIRA, L. M.; SILVA, L. R.; ALVES, J. F.; MARIN, N.; SILVA, F. S.; MORGANTI, L.; SILVA, I. D. C. G.; AFFONSO, R. A simple strategy for the purification of native recombinant full-length human RPL10 protein from inclusion bodies. **Protein. Expr. Purif.** v. 101, p. 115-120, 2014.

REDELINGHUYS, P.; NCHINDA, A. T.; STURROCK, E. D. Development of domain-selective angiotensin I-converting enzyme inhibitors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1056, p. 160–175, 2005.

RIBEIRO, W.; MUSCARÁ, M. N. Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. **Rev. Bras. Hipertens.** v. 8, p. 114-124, 2001.

RIBEIRO, J. M. Inibidores da enzima conversora da angiotensina e bloqueadores de receptores da angiotensina II no tratamento da hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.** v.5, p. 69-72, 2003.

RIBEIRO-OLIVEIRA, A.; NOGUEIRA, A. I.; PEREIRA, R. M.; BOAS, W. W. V.; DOS SANTOS, R. A. S.; SILVA, A. C. S. The renin–angiotensin system and diabetes: An update. **Vasc. Health. Risk. Manag.** v. 4, p.787–803, 2008.

RIGATTO, K. V.; BÖHLKE, M.; IRIGOYEN, M. C. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: da Fisiologia ao Tratamento. **Rev. Soc. Cardiol. Rio Grande do Sul** v.3, p. 1-5, 2004.

ROCHA, M. L. P. **Purificação e caracterização de uma isoforma c-domínio de enzima conversora de angiotensina do fluido ileal humano.** 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais.

SILVA, F. S. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da região AP-1 da oncoproteína Jun.** 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo.

SIQUEIRA, A. J. S.; AZEVEDO, A. M. P.; MATTOS-DUTRA, A.; FIN, C. A.; LANDO, C. A.; ROTA, L. N.; WINK, M. R.; BJERK, R. L.; FERRACINI, M. S. Determinação do Km e V Max: revisão e uma nova proposta. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento.** v. 27, p. 47-52, 2011.

SPYRANTI, Z.; GALANIS, A. S.; PAIRAS, G.; SPYROULIAS, G. A.; MANESSI-ZOUPA, E.; CORDOPATIS, P. Synthetic peptides as structural maquettes of angiotensin-I converting enzyme catalytic sites. **Bioinorg. Chem. Appl.** v. 10, p. 1-13, 2010.

SPYROULIAS, G. A.; GALANIS, A. S.; PAIRAS, G.; MANESSI-ZOUPA, E.; CORDOPATIS, P. Structural features of angiotensin-I converting enzyme catalytic sites: conformational studies in solution, homology models and comparison with other zincmetallopeptidases. **Curr. Top. Med. Chem.** v.4, p. 403–429, 2004.

STRELEC, M. A. A. M.; PIERIN, A. M. G.; MION JR., D. The influence of patient's consciousness regarding high blood pressure and patient's attitude in face of disease controlling medicine intake. **Arq. Bras. Cardiol.** v.81, p. 349-354, 2003.

VAMVAKAS, S. S.; LEONDIADIS, M. L.; PAIRAS, G.; MANES, E.; CORDOPATI, P. Expression, purification, and physicochemical characterization of the N-terminal active site of human angiotensin-I converting enzyme. **J. Pept. Sci.** v. 13, p. 31–36, 2007.

VAMVAKAS, S. S.; LEONDIADIS, M. L.; PAIRAS, G.; MANES, E. E.; CORDOPATIS, P. Folding in solution of the C-catalytic protein fragment of angiotensin-converting enzyme. **J. Pept. Sci.** v.15, p.504–510, 2009.

WATERMEYER, J. M.; KRÖGER, W. L.; O'NEILL, H. G.; SEWELL, B. T.; STURROCK, E. D. Characterization of domain-selective inhibitor binding in angiotensin-converting enzyme using a novel derivative of lisinopril. **Biochem. J.** v. 428, p. 67–74, 2010.

WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P.; CLAUSER, E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 9002-9008, 1991.