



LARISSA ELIZABETH CORDEIRO DANTAS

CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DA PROTEÍNA SIVA1

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LARISSA ELIZABETH CORDEIRO DANTAS

CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES BIOFÍSICAS DA PROTEÍNA SIVA1

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

ORIENTADOR: SARA TERESINHA OLALLA SAAD

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
LARISSA ELIZABETH CORDEIRO DANTAS, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2015

III

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

D235c Dantas, Larissa Elizabeth Cordeiro, 1987-
Caracterização e propriedades biofísicas da proteína SIVA1 / Larissa Elizabeth Cordeiro Dantas. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Sara Teresinha Olalla Saad.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. SIVA1. 2. Proteínas - Isolamento e purificação. 3. Leucemia. 4. Bioquímica.
I. Olalla Saad, Sara Teresinha. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization and biophysical properties of the SIVA1 protein

Palavras-chave em inglês:

SIVA1

Proteins, Isolation and purification

Leukemia

Biochemistry

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador]

Ljubica Tasic

Ana Olívia Tiroli Cepeda

Data de defesa: 02-06-2015

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

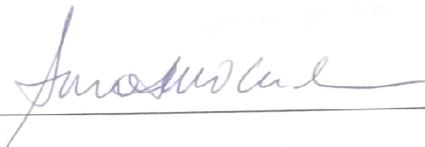
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LARISSA ELIZABETH CORDEIRO DANTAS

Orientador (a) PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD



2. PROF(A). DR(A). LJUBICA TASIC



3. PROF(A). DR(A). ANA OLÍVIA TIROLI CEPEDA



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 02 de junho de 2015

RESUMO

A sinalização celular é o mecanismo que as células possuem para se comunicar com suas vizinhas, tecidos distantes ou mesmo em processos internos. Portanto, entender como a sinalização está organizada em uma célula sadia é de extrema importância para o entendimento de processos vitais normais, e desta forma, ter suporte para avaliar as bases moleculares das doenças, uma vez que muitas delas originam-se de disfunções na transmissão de sinais celulares. A proteína Siva1, superexpressa em neoplasias de células do sangue, interage com a proteína p53, com membros da superfamília dos receptores de necrose tumoral, estatimina, dentre outros. Estas proteínas estão relacionadas com diversas vias de sinalização em câncer e, portanto, Siva1 faz-se um forte candidato para estudos de desenho racional de novos fármacos. O objetivo deste estudo foi caracterizar as propriedades biofísicas do domínio C-terminal de Siva1 a fim de contribuir futuramente com o descobrimento de novos alvos para drogas alvo-dirigidas. O domínio C-Terminal de Siva1 (resíduos de 84 a 175), fusionados à Glutathione-S-Transferase (GST) e expressos em um sistema de expressão heteróloga de *E.coli*, produziu um recombinante GST-Siva C-Terminal, que foi em seguida purificado por colunas de afinidade a proteínas fusionada à GST (GSH sefarose) e por filtração em fel. A capacidade biológica de ligar-se a outras proteínas, das famílias supramencionadas, foi testada em extrato de células da linhagem Jurkat. Ensaio bioquímico e biofísico mostraram que a proteína apresentava-se monodispersa em solução com um formato predominante não enovelado e alongado. No entanto, em altas concentrações, a proteína apresenta tendência de formar agregados solúveis. Espera-se que estes resultados possam levar a um melhor entendimento das propriedades de Siva1, possibilitando o desenho de compostos químicos alvo-específicos. As coletas de dados para o estudo foram feitas no Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Instituto de Química (IQ-Unicamp), no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio-LEC).

Palavras-chave: Expressão de Proteínas, Purificação de Proteínas, SIVA1, Leucemia Aguda

ABSTRACT

Siva1 protein interacts with tumor protein p53 and with the member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, stathmin, among others. These proteins are related to several pathways involved in cancer and are therefore, strong targets for drug design. Thus, the aim of this study was to characterize the biophysical properties of Siva 1 C-terminal domain in order to contribute to the discovery of new target directed drugs. The C-terminus Siva1 domain (residues 84-175) was fused to glutathione S-transferase (GST) and expressed in an E coli system and the recombinant GST-Siva C-terminus was purified using GST-Tagged Protein affinity and gel filtration chromatography. We tested the biological activity of the purified Siva C-terminus domain in an extract of the Jurkat cell line that contained natural SIVA binders. Biophysical and biochemical assays showed that the protein was monodisperse in solution with a predominant unfolded and elongated shape. However, at high concentrations, the protein showed a tendency to form soluble aggregates. These results are expected to lead to further progress in better understanding of SIVA1 properties and target-directed drug design. Experiments took place at “Laboratório de Bioquímica de Proteínas” at Institute of Chemistry (IQ-Unicamp), “Laboratório Nacional de Luz Síncrotron” (LNLS) and “Laboratório Nacional de Biociências” (LNBio-LEC).

Key-words: Protein Expression, Protein Purification, SIVA1, Acute Leukemia

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| AGRADECIMENTOS..... | XIII |
| LISTA DE FIGURAS..... | XV |
| LISTA DE TABELAS..... | XIX |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | XXI |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 9 |
| 3. MATERIAIS E METODOLOGIA..... | 11 |
| 3.1. ESTUDOS DE BIOINFORMÁTICA..... | 11 |
| 3.2. CONSTRUÇÕES DA PROTEÍNA SIVA UTILIZADAS NO PROJETO | 12 |
| 3.3. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS | 14 |
| 3.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SIVA1 E MUTANTES..... | 15 |
| 3.5. LISE DO PRECIPITADO DE CÉLULAS | 16 |
| 3.6. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA SIVA1 E SEUS MUTANTES | 16 |
| 3.7. TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS | 19 |
| 3.8. ENSAIO DE INTERAÇÃO DA PROTEÍNA EXPRESSA | 22 |
| 3.9. DICROÍSMO CIRCULAR DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS | 22 |
| 3.10. FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS..... | 24 |
| 3.11. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS | 25 |
| 3.12. ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS | 26 |
| 3.13. FILTRAÇÃO EM GEL ANALÍTICA DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS | 27 |
| 3.14. FILTRAÇÃO EM GEL ACOPLADA A ESPALHAMENTO DE LUZ EM MÚLTIPLOS ÂNGULOS (SEC-MALS) | 28 |
| 3.15. ABSORÇÃO DA SOLUÇÃO DE GST-SIVAΔD PURIFICADA..... | 28 |
| 3.16. SAXS DA SOLUÇÃO DE GST-SIVAΔD PURIFICADA..... | 29 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 4.1. ANÁLISE ESTRUTURAL “ <i>IN SILICO</i> ” DE SIVA1 E MUTANTES..... | 31 |
| 4.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO | 35 |
| 4.3. ENSAIOS ESPECTROSCÓPICOS | 51 |
| 4.4. ENSAIOS HIDRODINÂMICOS EM SIVAΔD..... | 56 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| 5. DISCUSSÃO | 65 |
| 6. CONCLUSÕES | 71 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 73 |
| ANEXO | 77 |

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à minha orientadora, que incentivou meu trabalho durante sua realização, possibilitando meu aperfeiçoamento no pensamento crítico da pesquisa. Ao colaborador deste projeto, Prof. Dr. Carlos Ramos do Instituto de Química da Unicamp, sem o qual este trabalho não teria sido possível. Ao Prof. Dr Leandro Barboza do Instituto de Física da USP, pela atenção nos experimentos de SAXS. Agradeço também a todos os colegas de trabalho pela disposição em me auxiliar na parte experimental. À todas as instituições em que realizei experimentos para o desenvolvimento deste projeto: Faculdade de Ciências Médicas, Hemocentro e Instituto de Química da Unicamp e ao LNBio e LNLS do CNPEM. Às agências financiadoras do projeto, CAPES e Fapesp. E à minha família que sempre me apoiou durante todo o tempo nos momentos felizes e nas adversidades, para os quais dedico este trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A) Planos formados pelas ligações peptídicas entre o C α e ângulos ϕ e ψ . B) Gráfico de Ramachandran mostrando regiões dos ângulos conformacionais phi (ϕ) e psi (ψ). A maioria das conformações produzem colisões ou impedimentos estéricos, sendo, portanto regiões não permitidas. As regiões coloridas (vermelha – folhas beta; azul e amarela – alfa hélices) representam os ângulos mais favoráveis para formação de estrutura secundária encontrados em cada um dos quadrantes..... 2
- Figura 2. A) Estrutura alfa hélice proposta por Linus Pauling, a seta indica o sentido N-terminal para o C-terminal. Em vermelho estão representadas as ligações de hidrogênio, note que as cadeias laterais ficam para fora da estrutura que é formada pela cadeia principal. [Ref 16, pág. 15] B) Estrutura folha β paralela, os resíduos das cadeias estão na mesma direção N-terminal a C-terminal. C) Estrutura folha β antiparalela, os resíduos das cadeias estão com N-terminal e C-terminal das cadeias em sentidos opostos..... 5
- Figura 3. Esquema dos domínios descritos de SIVA1 e SIVA2. SIVA1 apresenta três domínios, um conservado N-terminal (N), um domínio de morte celular (DDHR) e um C-terminal (Cys-rich) rico em cisteínas conservadas, que pode ser dividido em uma região B-box-like [122 a 150] e Zn-finger-like [150 a 175], conforme figura mostrada acima..... 8
- Figura 4. Construção dos clones utilizados neste trabalho. O clone pGEX-4T-2-SIVA1 expressa uma proteína com 45 kDa com coeficiente de extinção molar (ϵ) 58330, aqui chamada de GST-SIVA1; pGEX-4T-2-SIVA Δ C expressa proteína de 40,5 kDa e ϵ 51340, chamada GST- Δ C; pGEX-4T-2-SIVA Δ D expressa proteína de 35,8 kDa e ϵ 49850, chamada GST- Δ D; e pET-28a expressa proteína de 20,9 kDa e ϵ 15470, chamada His-SIVA. (Cálculo de massa molar e ϵ feito no ProtParam: <http://web.expasy.org/protparam/>)..... 13
- Figura 5. Fluxograma do processo de obtenção da proteína SIVA1 19
- Figura 6. Predição de estrutura terciária pelo programa I-Tasser (A, C, D, E). Em B a figura foi obtida do PDB. D e E foram tratadas pelo software JMOL. 32
- Figura 7. Predição de estrutura secundária para a proteína SIVA1 pelo programa PsiPred (disponível on line: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 33
- Figura 8. Gráfico de Ramachandran obtido para a sequência de aminoácidos da proteína SIVA1 (programa: <http://molprobit.biochem.duke.edu/>) 34
- Figura 9. Alinhamento múltiplo de algumas sequências de SIVA depositadas no NCBI de *Homo sapiens*, *Xenopus*, *Mus musculus*, *Ratus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Salmo salar* e *Ictalurus punctatus*. Alinhamento pelo Clustaw (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e do arquivo gerado foi feita análise de conservação de resíduos no programa GeneDoc. Observamos que a proteína SIVA apresenta resíduos altamente conservados entre as espécies em seu N-terminal e C-terminal. Sendo que no C-terminal os resíduos conservados são as cisteínas..... 34
- Figura 10. Teste de expressão da proteína His-SIVA. (SC= Colônia iniciadora, SI= antes da aplicação de IPTG, 1h, 2h, 3h ou 16 h após adição de IPTG). 36
- Figura 11. SDS-PAGE de indução da proteína GST-SIVA1 subclonada em vetor de expressão pGEX-4T-2 com cauda de glutathione em linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pRARE. A proteína foi expressa (44kDa) como pode ser visto nas primeiras três colunas (LisSi, Lis2h, Lis3h), as frações lisadas foram centrifugadas e separadas as porções solúvel e insolúvel, observa-se que a proteína induzida encontra-se completamente na porção insolúvel (pelete/corpo de inclusão). Lis=lisado, Si=sem indução, P=pelete, S=sobrenadante 38
- Figura 12. SDS-PAGE das lavagens feitas durante as etapas de solubilização. Primeira amostra lisado de *E. coli* e as etapas seguintes são as lavagens. As duas amostras finais são etapas após filtração e antes de purificar na coluna de afinidade. 1=lisado, 2=primeira lavagem (com

| | | |
|---------------|---|----|
| | triton-X), 3= segunda lavagem (Tp de lise), 4=pelete após lavagens, 5=proteína em ureia 4M (antes da diálise), 6= proteína após diálise, 7= proteína após centrifugação, 8= proteína filtrada em 0,45um, 9= proteína filtrada em 0,22um, 10= padrão de baixo peso..... | 40 |
| Figura 13. A) | SDS-PAGE de amostras incubadas com trombina para cisão de GST-SIVA1, coletadas nos tempos de 1 a 16 horas após a resolubilização (corado com azul brilhante de Comassie). Observa-se que a trombina cliva a SIVA em regiões inespecíficas (bandas de 6,5kDa e 14 kDa) que aumentam de intensidade conforme o tempo passa. B) Western blotting mostra, o mesmo experimento do item A, no entanto as membranas foram tratadas com anticorpo Anti-GST e Anti-SIVA(175), as setas indicam as bandas observadas..... | 41 |
| Figura 14. | Acompanhamento de estabilidade da amostra pós resolubilização feita na geladeira (D2G, D3G, D6G, D7G) e na bancada (D2B, D3B, D6B, D7B)..... | 42 |
| Figura 15. | Purificação por afinidade feita com lisado de <i>E.coli</i> pRARE expressando GST-SIVA1. Em azul leitura do ultravioleta 280nm, pontilhado marrom a condutância em vermelho estão indicadas as frações coletadas em cada tubo e em rosa a injeção da amostra na coluna..... | 42 |
| Figura 16. | Purificação por afinidade em coluna feita com amostra obtida após reenovelamento de GST-SIVA1 (45 kDa). Acima estão indicados os tubos coletados e a os tampões utilizados.. | 43 |
| Figura 17. | Filtração em gel após afinidade, à esquerda amostras do pico de corrida feita após incubação com trombina onde observamos um pico próximo a 31kDa correspondente à GST (26 kDa) e à direita amostras da proteína fusionada (45kDa)..... | 43 |
| Figura 18. | Purificação por troca aniônica (High Q) em coluna feita com amostra obtida após reenovelamento de GST-SIVA1. Em azul leitura do ultravioleta 280nm, em vermelho estão indicadas as frações coletadas em cada tubo, em rosa a injeção da amostra na coluna e as linhas verde e marrom paralelas que sobem a partir de 60 mL são respectivamente a porcentagem de tampão B com 500mmol/dm ³ de NaCl e a condutância..... | 44 |
| Figura 19. | Purificação por troca catiônica (High S) em coluna feita com amostra obtida após reenovelamento de GST-SIVA1. Em azul leitura do ultravioleta 280nm, em vermelho estão indicadas as frações coletadas em cada tubo, em rosa a injeção da amostra na coluna e as linhas verde e marrom paralelas que sobem a partir de 60 mL são respectivamente a porcentagem de tampão B com 500mmol/dm ³ de NaCl e a condutância. O SDS-PAGE mostra amostras coletadas dos picos do gráfico anterior, conforme indicado na numeração. | 44 |
| Figura 20. | Gel da expressão da proteína GST-SIVAΔC em linhagem pRARE (Lis=lisado, Si=sem indução, P=pelete, S=sobrenadante) | 45 |
| Figura 21. | SDS-PAGE de indução do mutante de deleção do N-terminal da proteína SIVA1 subclonada em vetor de expressão pGEX-4T-2 com cauda de glutathione (GST) em linhagem <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pRARE. A proteína foi expressa (36kDa) como pode ser visto nas primeiras três colunas, as frações lisadas foram centrifugadas e separadas as porções solúvel e insolúvel, observa-se que a proteína induzida encontra-se distribuída nas frações solúvel e insolúvel. Para a porção solúvel foi estabelecido protocolo de purificação. (Lis=lisado, Si=sem indução, P=pelete, S=sobrenadante) | 46 |
| Figura 22. | Purificação da proteína GST-SIVAΔD em coluna GSTrap específica para proteínas fusionadas a glutathione. Purificação single step pode ser feita, no entanto observam-se algumas proteínas contaminantes da amostra, sendo portanto necessária uma outra etapa de purificação. Nesta purificação a clivagem com trombina foi feito em solução, após a purificação por afinidade..... | 47 |
| Figura 23. | Purificação da proteína GST-SIVAΔD em coluna GSTrap após cisão com trombina na coluna GSTrap FF. FT =lavado do extrato de proteínas, E1 ao 6 eluições com tampão PBS da proteína ΔD (9,5kDa), EGST = eluição de GST com tampão contendo glutathione reduzida.... | 47 |
| Figura 24. | Segunda etapa de purificação. A) Cisão com trombina em solução por 3 horas logo antes da filtração em gel; B) SDS-PAGE 15% das frações coletadas no volume de eluição coletado dos picos,..... | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 25. Western blotting de SIVA Δ D. Membrana de nitrocelulose tratada com anticorpo anti-SIVA175 (FL-175 – Santa Cruz Biotechnology), controle feito com proteína sem SIVA..... | 48 |
| Figura 26. Ensaio de interação do domínio rico em cisteínas de SIVA1 foi com CD27, CD4, OP18, e GITR. A figura mostra o ensaio de pull-down realizado. Extrato do lisado de Jurkat foi incubado com a proteína heteróloga purificada, a imobilização foi feita com beads de GST-sefarose. Os ligantes foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por Western-blot..... | 50 |
| Figura 27. Espectro de dicroísmo circular da proteína GST-SIVA1 após resolubilização em tampão PBS, sem ação da trombina, uma vez que esta corta a proteína em sítios inespecíficos causando degradação (verificado por SDS-PAGE corado com azul brilhante de Comassie e Western Blotting). O espectro mostra a proteína com característica predominante de alfa-hélices (vales em 222 nm e 207 nm)..... | 51 |
| Figura 28. Dicroísmo circular da proteína GST após clivagem com trombina e purificação em duas etapas..... | 52 |
| Figura 29. Fluorescência, excitação em 295nm e emissão de 320 a 500nm. Em preto GST-SIVA Δ D em tampão fosfato e em vermelho em tampão fosfato com 8M de ureia. O centro de massa calculado para cada um dos picos foi de 340,3nm (GST-SIVA Δ D em tampão PBS) e 353,1nm (GST-SIVA Δ D em tampão com ureia)..... | 52 |
| Figura 30. Espectro de Absorção da amostra GST-SIVA1 mostrando um pico na região de 410nm correspondente à coloração alaranjada que a solução de proteína purificada apresenta..... | 53 |
| Figura 31. Dicroísmo circular da amostra mutante SIVA Δ D em tampão fosfato (PBS) da amostra purificada como acima descrito, em duas etapas. O espectro apresenta um vale na região entre 200 e 205 nm, o que indica a presença predominante de regiões de enovelamento randômico. A imagem à direita indica um espectro sobreposto da proteína SIVA Δ D purificada e SIVA Δ D fusionada à GST purificada..... | 54 |
| Figura 32. Teste de sinal de dicroísmo circular da amostra mutante SIVA Δ D em tampão fosfato (PBS) adicionado de concentrações de DTT variando de 0,5 a 2,0 mmol/dm ³ (mM) conforme mostrado na legenda. Os respectivos tampões foram descontados como branco. Neste experimento pode-se visualizar que a adição de um agente redutor não alterou significativamente a região próxima a de 220 nm do espectro de dicroísmo, mesmo a proteína apresentando região rica em cisteínas..... | 54 |
| Figura 33. Fluorescência, excitação em 295 nm e emissão de 320 a 500 nm. A) Em preto SIVA Δ D em tampão fosfato e em vermelho em tampão fosfato com 8M de ureia. O centro de massa calculado para cada um dos picos foi de 356,5nm (em PBS) e 355,0nm (em ureia). B) Emissão da proteína com adição de diferentes concentrações de DTT na solução de proteína purificada..... | 55 |
| Figura 34. A) Filtração em Gel Analítica em coluna de 24mL. Esta imagem mostra à esquerda a corrida dos padrões e à direita a corrida de SIVA Δ D. B) Cálculos feitos a partir do volume de eluição da proteína e de padrões. No gráfico são mostrados os parâmetros calculados para a reta e a partir do Kav e em vermelho o ponto em que se encontra o valor do raio de Stokes (R _{St}) calculado para o mutante SIVA Δ D com base nos padrões..... | 56 |
| Figura 35. Leituras a 280nm feitas na celas contendo proteína purificada SIVA Δ D com tempos e número de leituras conforme tabela 5. Em 0 linha de base feita com o tampão fosfato da proteína..... | 59 |
| Figura 36. Velocidade de sedimentação em Ultracentrifugação Analítica, realizado com a proteína SIVA Δ D em três concentrações: 0,2 mg/mL (quadrados), 0,4 mg/mL (triângulos), e 1,0 mg/mL (estrelas) em PBS. A figura apresenta a distribuição c(S). Em menores concentrações o perfil de sedimentação apresenta-se em apenas uma espécie, no entanto, em maiores concentrações um novo perfil entre 2,5 e 3,0 S surge, sugerindo a presença de outra espécie com maior massa molecular aparente, mas em concentrações muito inferiores. Gráfico superior: dependência do s _{20,w} como função da concentração de proteínas..... | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 37. Gráfico mostrando presença de apenas uma forma na solução (monodispersa) | 60 |
| Figura 38. Gráfico mostrando representa a curva da distribuição de vetores de distância $p(R)$ para a proteína SIVA Δ D. Observamos que o pico está deslocado à esquerda, no sentido de menores distâncias..... | 61 |
| Figura 39. Kratky Plot, demonstrando o estado conformacional, padrão sugestivo de proteína parcialmente desenovelada. | 61 |
| Figura 40. Resultados da curva do espalhamento e do modelo do pontos gerado pelo Dammin para as concentrações de 1,3; 2,1 e 3,0 mg/mL. A) 1,3 mg/mL B) 2,1 mg/mL e 3) 3,0 mg/mL | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das proteínas em estudo obtidas pelo ProtParam (expasy). 35 | 35 |
| Tabela 2. Teste de expressão de His-SIVA1 com aditivos adicionados ao meio de cultura 36 | 36 |
| Tabela 3. Teste de reenovelamento com faixa de pH para tampão fosfato e tris-HCl 37 | 37 |
| Tabela 4. Testes de expressão da proteína GST-SIVA1 39 | 39 |
| Tabela 5. Resultados obtidos após tratamento dos dados obtidos no SEC-MALS pelo programa ASTRA do próprio fabricante. Abaixo é mostrado o resultado de uma medida, mas outras já foram feitas e o resultado se mostrou reprodutível. 57 | 57 |
| Tabela 6. Velocidades de sedimentação feitas no experimento de ultracentrifugação analítica de equilíbrio..... 58 | 58 |
| Tabela 7. Dados obtidos da curva de Guinier a partir dos dados integrados da imagem do espalhamento de raios X 61 | 61 |
| Tabela 8. Resumo dos parâmetros hidrodinâmicos e espectroscópicos calculados e experimentais de SIVAΔD 63 | 63 |
| Tabela 9. Purificação e rendimento das proteínas fusionadas: 1 litro como volume total de cultura 77 | 77 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\langle\lambda\rangle$: centro de massa espectral de fluorescência;
 θ : elipticidade;
 $[\theta]$: elipticidade molar residual;
BSA: albumina de soro bovina (*Bovine Serum Albumin*);
C: concentração em mg/ml;
CD: dicroísmo circular;
D: coeficiente de difusão;
Deg.: grau (degree);
DLS: espalhamento dinâmico de luz (dynamic light scattering)
DMSO: dimetilsulfóxido;
DTT: ditioneitol;
EMR: elipticidade molar residual;
f: coeficiente friccional;
 f_0 : coeficiente friccional teórico esperado para uma partícula esférica rígida de volume igual à molécula em estudo;
 f/f_0 : razão friccional ou fator de Perrin;
IPTG: isopropiltiol- β -D-galactosídeo;
 $I(q)$: função da intensidade de espalhamento;
LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron;
l: comprimento do caminho óptico;
LB: Luria-Bertani;
MM: massa molecular;
n: número de resíduos de aminoácidos da proteína;
nm: nanômetro (10^{-9} metros);
 $p(r)$: função de distribuição de distâncias;
q: ângulo de espalhamento;
Rg: raio de giro;
Rh: raio hidrodinâmico;
SAXS: espalhamento de raios-X à baixos ângulos (*Small Angle X-ray Scattering*);
SDS: duodecil-sulfato de sódio (*sodium dodecyl-sulphate*);
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS;
U.A.: unidade arbitrária;
UAL: ultracentrifugação analítica;
v:v: volume: volume;
wt: wild type (selvagem);

1. INTRODUÇÃO

A cadeia polipeptídica é formada por unidades chamadas aminoácidos, que quando estão ligados são denominados resíduos. Os aminoácidos possuem um carbono central denominado $C\alpha$ (carbono α à carbonila) ao qual estão ligados: um átomo de hidrogênio, um grupo amina, uma carboxila e uma cadeia lateral. Existem 20 tipos diferentes de cadeias laterais que originam os 20 aminoácidos especificados pelo código genético. A ligação entre o grupo carboxil de um aminoácido com a amina do seguinte é chamada peptídica e durante sua formação ocorre liberação de uma molécula de água; esse processo ocorre dentro do ribossomo na etapa de alongação da proteína que está sendo formada. Com exceção da glicina, que possui um hidrogênio como cadeia lateral, o $C\alpha$ dos demais aminoácidos possui quatro ligantes diferentes, portanto, apresenta quiralidade. Os sistemas biológicos evoluíram de forma que há reconhecimento específico desses variantes moleculares, e por uma razão ainda desconhecida a conformação quiral escolhida para síntese de proteínas biológicas é apenas a forma estereoquímica L (*levogira*).

A cadeia principal de uma proteína é composta por unidades $NH-C\alpha H-C' = O$ combinadas por ligações peptídicas, ligações amida, que une os diferentes resíduos, a qual apresenta-se planar e portanto ausente de rotação. Ao redor do $C\alpha$, no entanto, existe liberdade rotacional que é chamada de phi (ϕ) entre $N-C\alpha$ e psi (ψ) entre $C\alpha-C'$. Desta forma, cada aminoácido está associado basicamente por dois ângulos de conformação, que quando definidos com alta exatidão podem confirmar a estrutura da cadeia principal. O par de ângulos ψ e ϕ são comumente indicados no diagrama de Ramachandran que determina regiões estericamente permitidas.

Conhecer a sequência de uma proteína é tão informativo quanto conhecer uma sequência de bases nitrogenadas que compõe o DNA, e o estudo da estrutura terciária de uma proteína é importante para o entendimento de sua engenharia e função. Evoluionalmente, as proteínas se desenvolveram de forma

que desempenham funções específicas de acordo com sua estrutura tridimensional e relações conformacionais, quando na presença de determinados ligantes. A estrutura espacial de uma proteína surge a partir das sequências particulares de aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica que se enovelam gerando, a partir de cadeias lineares, domínios compactos com estrutura definida até atingir o estado energeticamente mais favorável, conhecido como biologicamente nativo. O conjunto de estruturas compactas formadas pelas proteínas interage e forma, por exemplo, capsídios virais, fibras musculares, complexos enzimáticos, proteínas reguladoras, etc. Predizer a estrutura de uma proteína com precisão é hoje um caminho impossível, pois há inúmeras maneiras de se combinar os 20 diferentes aminoácidos, sendo necessária a complementação experimental para tal fim.

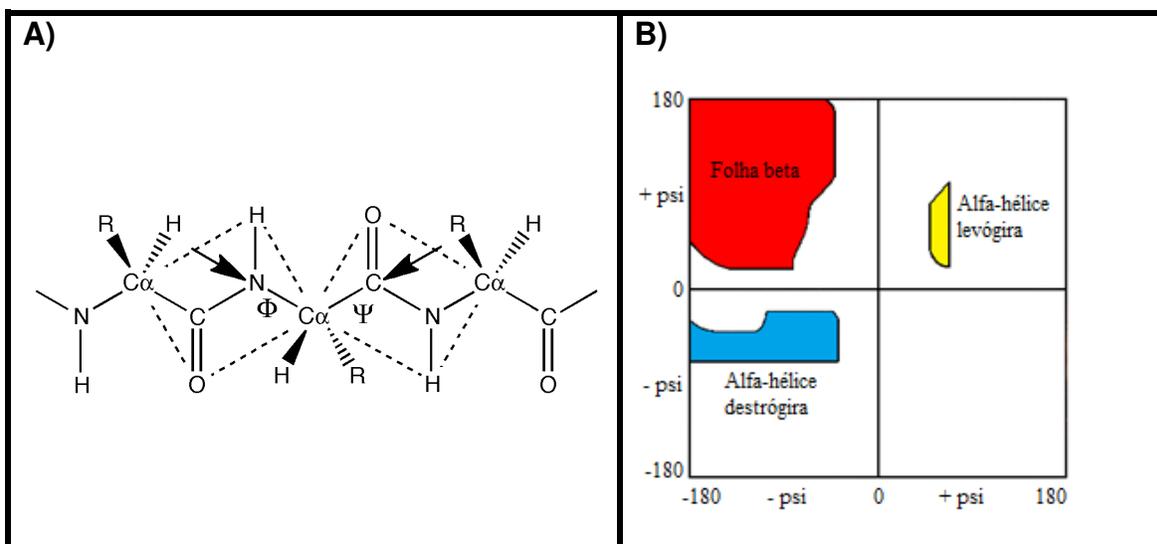


Figura 1. A) Planos formados pelas ligações peptídicas entre o C α e ângulos ϕ e ψ . B) Gráfico de Ramachandran mostrando regiões dos ângulos conformacionais phi (ϕ) e psi (ψ). A maioria das conformações produzem colisões ou impedimentos estéricos, sendo, portanto regiões não permitidas. As regiões coloridas (vermelha – folhas beta; azul e amarela – alfa hélices) representam os ângulos mais favoráveis para formação de estrutura secundária encontrados em cada um dos quadrantes.

O enovelamento de uma proteína pode ocorrer com o auxílio de proteínas chamadas chaperonas moleculares, que se ligam a porções da cadeia polipeptídica e previnem a formação de associações indevidas com outras proteínas enoveladas ou parcialmente enoveladas. Os maiores obstáculos para o

enovelamento adequado de uma proteína são: agregação de intermediários pela exposição de grupos hidrofóbicos, formação errada de pontes dissulfeto e isomerização de resíduos de prolina. Importante observar que o motivo pelo qual as proteínas se enovelam é que durante o processo ela procede de um estado de alta energia, quando desenovelada, para um estado nativo energeticamente menor, passando por estados intermediários de baixa energia e transitórios de alta energia. A estabilidade termodinâmica de uma proteína no seu estado nativo é menor e depende da diferença entre entropia e entalpia quando comparado com o estado desenovelado. Do ponto de vista biológico, no entanto, esta diferença de energia livre não pode ser demasiadamente grande, pois as células precisam ser capazes de degradar assim como de produzir proteínas, além disso, muitas proteínas necessitam de flexibilidade molecular para desempenhar determinada função biológica.

Dentro do contexto de enovelamento, pode-se ressaltar a importância de alguns ligantes. As cadeias laterais dos aminoácidos possuem propriedades químicas diferentes entre si e são exploradas em diversas funções biológicas. Uma dessas versatilidades diz respeito à ligação com metais que resíduos como histidina, cisteína, ácido aspártico e ácido glutâmico apresentam afinidade. Esta interação possibilita, por exemplo, uma maior eficiência em reações de transferência eletrônica, e por isso um grande número de proteínas recrutam metais como parte de sua estrutura intrínseca; os principais encontrados ligados às proteínas são: ferro, zinco, magnésio e cálcio.

Domínios de estrutura de proteínas

Os primeiros estudos cristalográficos determinaram que o interior das proteínas apresentassem predominantemente resíduos com radicais hidrofóbicos, e em sua superfície resíduos com cadeia lateral hidrofílica. Essas interações com o meio aquoso onde a proteína se encontra são extremamente importantes para seu enovelamento, uma vez que a principal contribuição energética se dá pelo chamado colapso hidrofóbico.

As alfa hélices são estruturas estáveis e energeticamente favoráveis e foram descritas pela primeira vez em 1951 por Linus Pauling. Em proteínas são encontradas, quando há trechos de resíduos consecutivos, ângulos ϕ e ψ de aproximadamente -60° e -50° , respectivamente, que correspondem ao quadrante inferior esquerdo do Gráfico de Ramachandran. Contém ainda, 3.6 resíduos por volta que correspondem a 5.4 \AA (1.5 \AA por resíduo) com ligações de hidrogênio entre a carbonila ($\text{C}'=\text{O}$) n e o nitrogênio (NH) do resíduo $n+4$. Embora as predições não sejam tão acuradas para determinar a estrutura secundária, aminoácidos favoráveis para formar alfa hélices são: alanina, glutamina, leucina e metionina; enquanto prolina, glicina, tirosina e serina são mais desfavoráveis.

As folhas beta (β) são a segunda forma estrutural mais encontrada em proteínas. Essa região é formada pela combinação de diversas regiões da cadeia polipeptídica com formação de ligações de hidrogênio entre o $\text{C}'=\text{O}$ de uma cadeia com o NH de uma cadeia adjacente, em contraste com a alfa hélice, que é construída por uma região contínua. No gráfico de Ramachandran os ângulos ϕ e ψ preferenciais estão localizados no quadrante superior esquerdo. Existem duas formas de interação para formar as cadeias β a paralela e a antiparalela, no entanto podem existir regiões com misturas das duas orientações, as chamadas regiões mistas.

Os laços (loops) de uma proteína são regiões bastante flexíveis e estão presentes normalmente em regiões hidrofílicas; os resíduos dessas regiões irregulares não interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio, mas com moléculas de água do meio. Os seus aminoácidos são geralmente polares e com carga. Evolutivamente são regiões menos conservadas entre as espécies, podendo ter até mesmo porções deletadas em proteínas homólogas. Em relação a sua função, os loops são regiões de conexão entre as estruturas secundárias do núcleo da proteína, e frequentemente participam da formação de sítios de ligação e sítios catalíticos. [1]

Proteínas homólogas, que apresentam alta similaridade na sequência de aminoácidos em sua constituição, apresentam também estrutura terciária

geralmente homóloga, podendo variar a estrutura secundária de forma a melhor acomodar seus diferentes resíduos.

Neste contexto, o estudo de proteínas objetiva entender de forma cada vez melhor as funções derivadas de modificações moleculares, cinética de interações e o estudo de regiões onde possíveis ligantes poderiam interagir com a proteína. A ciência hoje chamada de “*drug design*” ou desenho racional de novos fármacos possui ampla perspectiva no campo do estudo de estrutura de proteínas, uma vez que vivemos em uma época onde o estudo de doenças raras, polimorfismos genéticos e busca por novas moléculas candidatas a fármacos está em expansão e seu uso, dentro de um futuro próximo, é eminente e necessário.

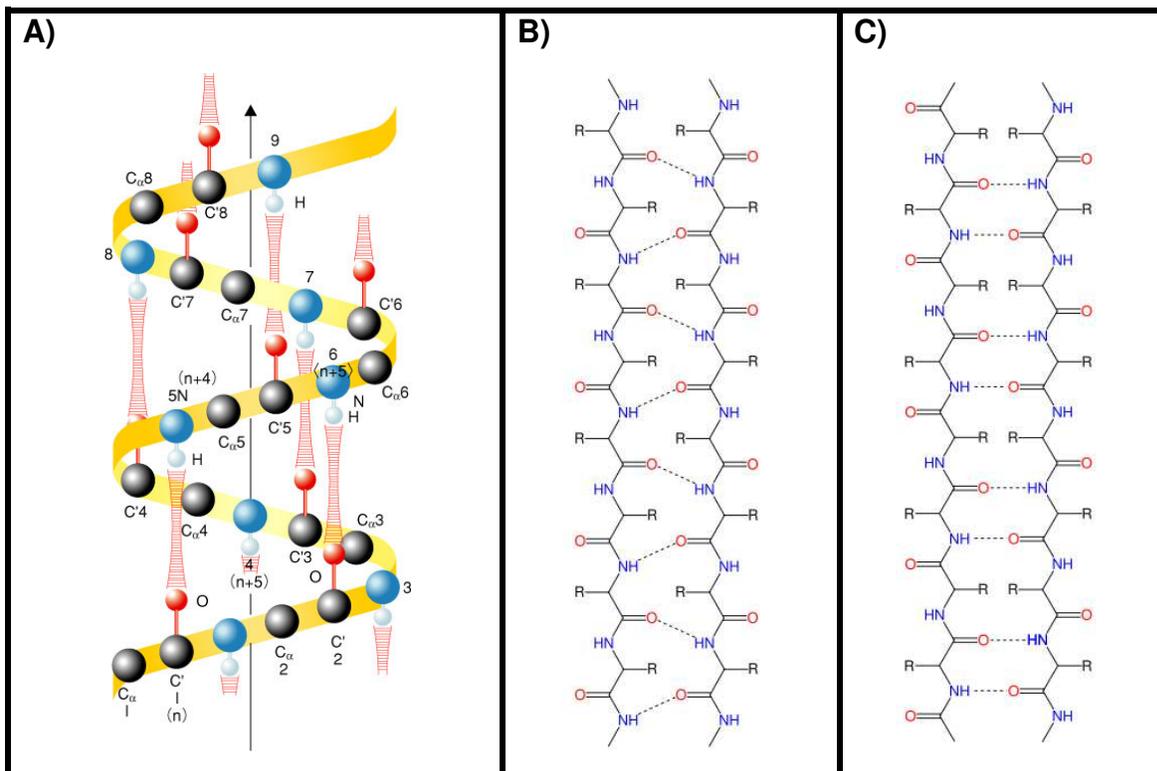


Figura 2. A) Estrutura alfa hélice proposta por Linus Pauling, a seta indica o sentido N-terminal para o C-terminal. Em vermelho estão representadas as ligações de hidrogênio, note que as cadeias laterais ficam para fora da estrutura que é formada pela cadeia principal. [Ref 16, pág. 15] B) Estrutura folha β paralela, os resíduos das cadeias estão na mesma direção N-terminal a C-terminal. C) Estrutura folha β antiparalela, os resíduos das cadeias estão com N-terminal e C-terminal das cadeias em sentidos opostos.

O gene humano que codifica a proteína SIVA1 está localizado no cromossomo 14 - 14q32.33 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10572>). Os alinhamentos sequenciais obtidos para SIVA1 (175 aa) na base de dados de proteínas (Protein Data Bank – PDB <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) não mostraram estruturas com regiões homólogas resolvidas. Sendo assim, faz-se necessário estudo mais amplo, a fim de validar uma estrutura próxima da real para SIVA1 a fim de dar seguimento com outros estudos desenvolvidos no laboratório de Biologia Molecular e Celular do Hemocentro da UNICAMP. Uma ampla busca por proteínas análogas com estrutura resolvida foi feita em bases de dados, porém nenhuma sequência, seja para a proteína completa, seja para seus domínios Figura 3 [8], foi encontrada considerando a relevância estatística (E Cut Off:1 ou menor).

A sinalização celular faz parte de um complexo sistema de comunicação que coordena as funções celulares. O conhecimento do modo como este conjunto de interações químicas se organiza é importante não somente para o entendimento dos processos vitais mantidos por células saudáveis, mas também para avaliar as bases moleculares das doenças, uma vez que muitas delas originam-se de disfunções na transdução de sinais celulares [1]. O ciclo celular é um processo intrincado que pode resultar na divisão celular, diferenciação, crescimento ou ainda contribuir para a morte programada da célula por apoptose. Patologicamente, o câncer pode ser considerado como a perda do equilíbrio entre a proliferação e a apoptose celular, por exemplo, pela inibição das vias de sinalização pró-apoptótica [2].

As leucemias constituem um conjunto heterogêneo de desordens clonais das células precursoras hematopoiéticas. A perda da habilidade normal de diferenciação ocasiona um acúmulo de células imaturas não funcionais denominadas blastos e a produção insuficiente de células maduras normais na medula óssea. Esta infiltração da medula frequentemente é acompanhada por neutropenia, anemia e/ou plaquetopenia no sangue periférico, podendo levar a infecções e sangramentos, complicações potencialmente fatais se não for

realizado tratamento adequado. Observam-se ainda, em alguns casos, infiltrações de outros órgãos [3,4].

As leucemias podem ser classificadas em mieloide e linfóide de acordo com a linhagem hematopoiética acometida. Disfunções em múltiplas vias de sinalização são frequentemente detectadas na leucemia. Chen e colaboradores destacam a necessidade do estudo dos efeitos conjuntos das vias de sinalização para o entendimento da patogênese de neoplasias hematológicas [5].

Neste contexto, a proteína SIVA, que apresenta duas isoformas (SIVA1 e SIVA2), foi identificada como um ligante do receptor CD27 em linfócitos [8] e de outros membros na superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFr) [6,7], além de outras funções que tem sido estudadas na última década [8]. SIVA está altamente expressa em leucemias agudas, onde exerce uma função pró-apoptótica, através da ativação da via das caspases [9]. Outra função importante da SIVA1, destacada recentemente [10], é sua participação na via de sinalização do supressor de tumor p53. O p53 (proteína com 53 kDa) promove processos antiproliferativos como resposta a uma ampla variedade de estresses celulares o que inclui danos no DNA e processos oncogênicos. Ele é ativado principalmente através da inibição da proteína MDM2, murine double minute (também conhecida como HDM2 para a proteína humana) [11]. A frequência de mutações do gene p53 em neoplasias de origem linfóide é de 12,5% [12]. No entanto, em certos tipos histológicos como a leucemia linfoma T do adulto e o linfoma de Burkitt, mutações em p53 ocorrem em até 40 % dos casos [13,14]. Destaca-se ainda que a indução terapêutica da via de sinalização do p53 deve ser particularmente adequada para o tratamento de desordens hematopoiéticas [15].

SIVA1 interage com ambos p53 e HDM2 e facilita a ubiquitinação e degradação de p53 mediada por HDM2. Esta função da SIVA1 parece requerer sua oligomerização e é interrompida por sinais de alteração do DNA. Interessante notar que a função supressora de p53 não é observada para SIVA2, o que foi relacionado por Du e colaboradores [12] ao fato desta isoforma da SIVA não formar oligômeros. Neste contexto, interessa saber quais as características

estruturais do oligômero formado por SIVA1 e em uma perspectiva mais ampla e futura, se a inibição deste processo poderia levar à ativação do supressor tumoral p53.

A compreensão dos complexos formados por biomoléculas exige o relacionamento das suas características estruturais às características termodinâmicas pertencentes à sua formação. O conhecimento desta relação ocupa um papel central em bioquímica uma vez que a determinação da estrutura de complexos moleculares presentes em organismos vivos fornece pouca informação sobre os componentes energéticos envolvidos na sua formação e dados termodinâmicos isolados são pouco proveitosos sem o conhecimento de informações estruturais.

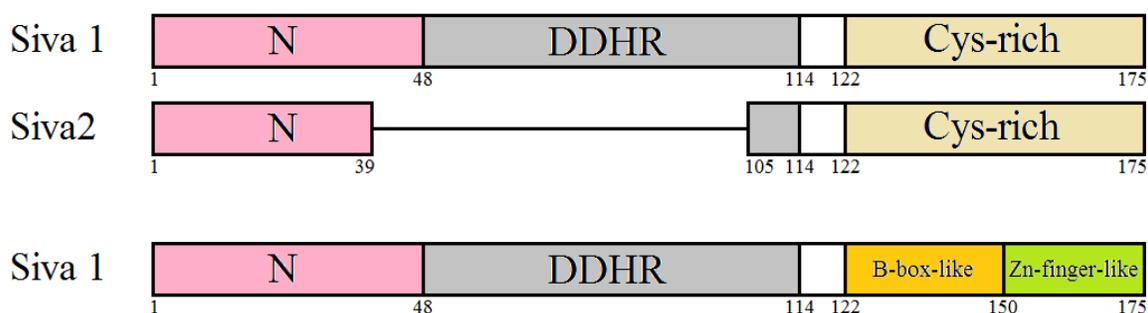


Figura 3. Esquema dos domínios descritos de SIVA1 e SIVA2. SIVA1 apresenta três domínios, um conservado N-terminal (N), um domínio de morte celular (DDHR) e um C-terminal (Cys-rich) rico em cisteínas conservadas, que pode ser dividido em uma região B-box-like [122 a 150] e Zn-finger-like [150 a 175], conforme figura mostrada acima.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as propriedades da proteína SIVA1 envolvida em vias de sinalização celular de neoplasias hematológicas, aferindo parâmetros bioquímicos e biofísicos. Desta forma, os objetivos específicos abrangem:

- Expressar a proteína SIVA1 em larga escala;
- Purificar com bom rendimento;
- Realizar ensaios espectroscópicos da proteína em solução;
- Realizar ensaios hidrodinâmicos da proteína em solução;
- Comparar os resultados experimentais com resultados esperados *in silico*.

3. MATERIAIS E METODOLOGIA

Genes clonados podem ser expressos em organismos heterólogos a fim de amplificar a produção de proteínas. A tecnologia do DNA recombinante tem possibilitado um amplo desenvolvimento na área do estudo de proteínas, onde esta ferramenta se tornou essencial. A superexpressão de uma proteína em hospedeiros como a *E. coli* ou leveduras torna sua purificação subsequente muito mais fácil. As proteínas purificadas podem ser utilizadas, dentro da bioquímica, para diversos fins, mas neste trabalho priorizamos o estudo da SIVA1 em solução. Há diversos sistemas especializados para expressar proteínas em bactérias, neste trabalho foi utilizado o vetor pGEX-4T-2, que possui sistema de expressão ativado por óperon lac. Um indutor eficaz e não metabolizável deste óperon é o isopropil-tiogalactosídeo (IPTG), permitindo, desta forma, a exploração da função fisiológica separadamente da regulação da expressão gênica. A proteína obtida por este vetor de expressão possui um marcador N-terminal que é uma enzima de 26 kDa, chamada Glutathione-S-transferase (GST) que se liga de maneira bastante específica ao seu substrato, a glutathione (GSH).

Os vetores clonados em pGEX-4T-2 foram adquiridos por doação à Dra Sara pelo Dr Serge Bénichou do Institut Cochin U1016 Inserm "Infection, Immunity and Inflammation" Department, Paris-France. A preparação dos vetores foi feita no laboratório da Profa. Sara Saad no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas. A produção e purificação das proteínas conjuntamente com sua caracterização biofísica e bioquímica foram realizadas em colaboração com o Prof. Carlos H. I. Ramos do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Unicamp..

3.1. ESTUDOS DE BIOINFORMÁTICA

Foi realizada busca em bases de dados por sequências homólogas a SIVA que apresentassem estrutura já resolvida. Foram utilizadas ferramentas de

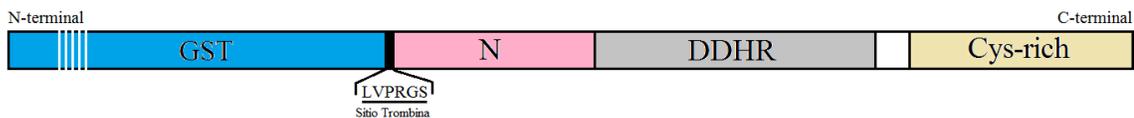
alinhamento de sequências BLAST com o algoritmo blastp e PSI-Blast do NCBI e também busca no site PDB de estruturas resolvidas já depositadas, porém nenhum alinhamento significativo (E-value próximo de 1) foi encontrado [24]. Na ausência de estruturas semelhantes resolvidas foi feita análise *in silico* por métodos computacionais de estrutura secundária no PsiPred e terciária no I-TASSER [25]. As análises gráficas foram feitas com o software PyMOL e Jmol applet. O gráfico de Ramachandran foi obtido no MolProbity Ramachandran analysis ([HTTP://kinemage.biochem.duke.edu](http://kinemage.biochem.duke.edu)). Parâmetros teóricos biofísicos da proteína foram obtidos pelo PROTPARAM (web.expasy.org/protparam/) programa que trás informações importantes como ponto isoelétrico, elipticidade molar e massa molecular esperada de acordo com a estrutura primária da proteína.

3.2. CONSTRUÇÕES DA PROTEÍNA SIVA UTILIZADAS NO PROJETO

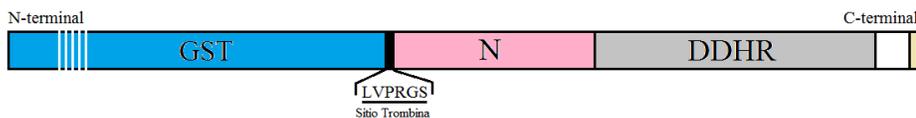
Foram utilizadas para este trabalho três construções de SIVA1 em vetor pGEX-4T-2: um clone com a proteína completa (pGEX-4T-2-SIVA1), um mutante de deleção do C-terminal (pGEX-4T-2-SIVA Δ C) da proteína e um mutante de deleção do N-terminal da proteína (pGEX-4T-2-SIVA Δ D); o vetor pET-28a foi comprado (Epoch Life Sciences) com a sequência de SIVA1 completa (pET-28a-SIVA1). Os plasmídios foram replicados no laboratório da Profa. Sara Saad no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas e sequenciados no LNBio.

A)

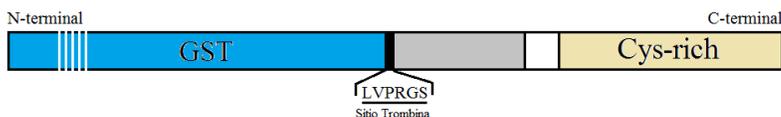
pGEX-4T-2-Siva1



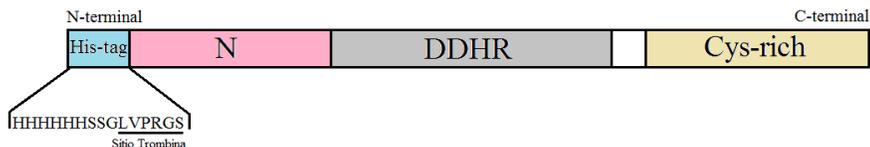
pGEX-4T-2-SivaΔC



pGEX-4T-2-SivaΔD



pET-28a-Siva1



B)

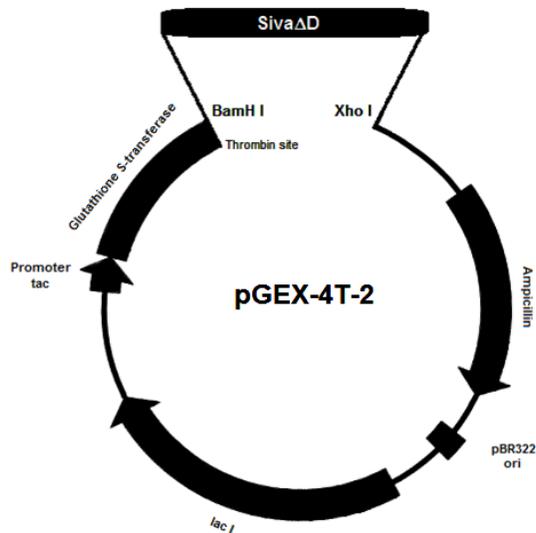


Figura 4. Construção dos clones utilizados neste trabalho. O clone pGEX-4T-2-SIVA1 expressa uma proteína com 45 kDa com coeficiente de extinção molar (ϵ) 58330, aqui chamada de GST-SIVA1; pGEX-4T-2-SIVAΔC expressa proteína de 40,5 kDa e ϵ 51340, chamada GST-ΔC; pGEX-4T-2-SIVAΔD expressa proteína de 35,8 kDa e ϵ 49850, chamada GST-ΔD; e pET-28a expressa proteína de 20,9 kDa e ϵ 15470, chamada His-SIVA. (Cálculo de massa molar e ϵ feito no ProtParam: <http://web.expasy.org/protparam/>)

Sequências de resíduos de aminoácidos das proteínas expressas a partir das construções utilizadas são as que seguem:

GST-SIVA1

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQ
SMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFED
RLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWP
LQGWAQTFGGGDHPPKSDLVPRGSMPCRSCPFADVAPLQLKVRVSQRELSRGVCAERYSQEVF
EKTKRLLFLGAQAYLDHVWDEGCAVVHLPESPKPGPTGAPRAARGQMLIGPDGRLIRSLGQASEA
DPSGVASIACSSCVRAVDGKAVCGQCERALCGQCVRTCWGCGSVACTLCGLVDCSDMYEVLCT
SCAMFET

GST-SIVAΔC

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQ
SMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFED
RLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWP
LQGWAQTFGGGDHPPKSDLVPRGSMPCRSCPFADVAPLQLKVRVSQRELSRGVCAERYSQEVF
EKTKRLLFLGAQAYLDHVWDEGCAVVHLPESPKPGPTGAPRAARGQMLIGPDGRLIRSLGQASEA
DPSGVASIACSSCVRAVDGKLERPHRD

GST-SIVAD

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQ
SMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFED
RLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWP
LQGWAQTFGGGDHPPKSDLVPRGSGQMLIGPDGRLIRSLGQASEADPSGVASIACSSCVRAVDG
KAVCGQCERALCGQCVRTCWGCGSVACTLCGLVDCSDMYEVLCTSCAMFET

HIS-SIVA1

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMPKRSCPFADVAPLQLKVRVSQRELSRGVCAERYSQEVFEKTKR
LLFLGAQAYLDHVWDEGCAVVHLPESPKPGPTGAPRAARGQMLIGPDGRLIRSLGQASEADPSGV
ASIACSSCVRAVDGKAVCGQCERALCGQCVRTCWGCGSVACTLCGLVDCSDMYEVLCTSCAMF
ET

3.3. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS

O método de transformação adotado foi por choque térmico tanto para replicação de vetores em *E. coli* DH5α como para expressão em *E. coli* BL21. Imediatamente antes da transformação, as células competentes previamente aliquotadas e conservadas em ultrafreezer à -80°C foram descongeladas em gelo. Em seguida adicionou-se cerca de 100ng de DNA plasmidial e seguiu-se à

incubação em gelo por 30 minutos. As células contendo o DNA foram então colocadas em banho Maria à 42°C por 90 segundos, adicionou-se 1mL de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% triptona, 10 mmol/dm³ NaCl, 2,5 mmol/dm³ KCl, 10 mmol/dm³ MgCl₂, 10 mmol/dm³ MgSO₄, 20 mmol/dm³ glicose) e procedeu-se a agitação de 200rpm à 37°C por 1 hora. Após o crescimento, as células foram centrifugadas por 30 segundos à 4000 rpm e cultivadas com alça de Drigalski 50 a 100µL em placa de Petri contendo meio LB (1% Peptona, 0,5% Extrato de levedura, 1% cloreto de sódio e 1,5% ágar) com os respectivos antibióticos para selecionar as colônias transformadas. As placas foram mantidas de 16 a 18 horas em estufa à 37°C.

3.4. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SIVA1 E MUTANTES

Para a expressão de SIVA1 (wt) utilizou-se bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) pRARE transformadas com as construções pGEX-4T-2 e pET-28a. As colônias isoladas foram então inoculadas em pré-cultura de 50 mL de meio de cultura LB (1% Peptona, 0,5% Extrato de levedura e 1% cloreto de sódio) contendo o antibiótico Cloranfenicol (34 µg/mL) para selecionar a linhagem pRARE, Ampicilina (50 µg/mL) para bactérias transformadas com pGEX-4T-2 e Kanamicina (50 µg/mL) para bactérias transformadas com pET-28a. As culturas foram mantidas por 16-18h a 37°C com agitação de 200 rpm. Os pré-inóculos foram então adicionados às porções de 1:10 em 500 mL de meio de cultura LB fresco contendo antibiótico. A expressão de SIVA1 foi induzida pela adição de isopropil tio-β-D-galactosídeo (IPTG) até a concentração final de 0,4 mmol/dm³, após a cultura alcançar densidade óptica entre 0,6 e 0,8 a 600 nm. Após a adição de IPTG, o crescimento da cultura foi realizado a 30°C por aproximadamente 3 horas. As células foram então separadas da fase líquida pela centrifugação do meio de cultura a 4000 rpm por 20 min a 4 °C e o precipitado foi armazenado a -20 °C para uso posterior.

3.5. LISE DO PRECIPITADO DE CÉLULAS

Cerca de 3,0 gramas de células obtidas após centrifugação de 500 mL de meio LB na expressão foram retiradas do freezer à -20°C e colocadas em Becker de plástico contendo 15 mL de tampão de lise (50mmol/dm³ Tris-HCl pH 7.9 + 1,0mmol/dm³ EDTA, 5% glicerol + 1,0mmol/dm³ DTT + 100 mmol/dm³ KCl) juntamente com 2mmol/dm³ de PmSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), 1mmol/dm³ EDTA (etilenodiamino tetra-ácido), ponta de espátula de lisozima e 5µL de DNase. A lise foi então feita por método mecânico em sonicador Misonix Ultrasonic Liquid Processors modelo S-4000 com amplitude de 30%, tempo de processamento de 180 segundos, pulsados de 5 em 5 segundos com intervalos de 1 minuto; antes de iniciar o processo o Becker foi posicionado de forma que a ponta do sonicador estivesse completamente imersa no tampão de lise. O procedimento foi realizado em gelo, em todas as etapas, a fim de evitar o aquecimento da amostra e degradação da proteína recombinante. Ao final do processo, transferiu-se a amostra para tubo Falcon e centrifugou-se à 14000 rpm e 4°C por 15 minutos. Amostra do precipitado foi coletada para SDS-PAGE e o restante descartado. O sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,45 micrômetros antes da aplicação em colunas de purificação para retirada de impurezas remanescentes (restos celulares).

3.6. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA SIVA1 E SEUS MUTANTES

A purificação foi realizada por meio de cromatografia de afinidade em coluna cromatográfica GSTrap FF de 5mL, e HisTrap FF de 5 mL da GE Healthcare protocolo de acordo com as especificações do fabricante. O método cromatográfico de filtração em gel em coluna Superdex 200 em colunas de 120 ou 315 mL foi utilizado como segunda etapa e para polimento das amostras purificadas a fim de obter SIVA1 com maior grau de pureza. A estimativa do grau de pureza foi feito por meio de SDS-PAGE (ImageJ <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e

DLS. A excisão da proteína de fusão de cada cauda foi efetuada por trombina, detalhes das etapas de purificação de cada uma das proteínas deste trabalho encontram-se abaixo. Todas as soluções estoque (10X) foram autoclavadas e as soluções usadas para purificação (1X) filtradas em filtro 22 μ m e deaeradas por 15 minutos. As concentrações de proteína total das amostras foram estimadas de acordo com o método de Bradford [17] ou absorção a 280 nm em espectrofotômetro.

- **GST-SIVA1:** purificação em duas etapas, sendo a primeira uma afinidade realizada em coluna GSTrap FF de 5 ml. A coluna previamente equilibrada com tampão PBS, aplicou-se a amostra filtrada com fluxo de 1 a 5 mL/min. Lavou-se a coluna com 5 a 10 volumes de coluna (25 a 50 mL) e em seguida a proteína que ligou-se à resina da coluna foi eluída com 15 mL do tampão de eluição. A amostra foi então levada para a segunda etapa de purificação em coluna de filtração em gel de 315 mL pré-equilibrada com tampão PBS (fluxo de 2,5 mL/min e pressão 0,5mPa). Aplicou-se a amostra e o perfil da corrida foi monitorado pela absorção no ultravioleta a 280 nm. As alíquotas de interesse foram coletadas e armazenadas na geladeira e de cada pico coletou-se também amostra para aplicação em SDS-PAGE.
- **GST-SIVA Δ C:** mesmo protocolo utilizado para GST-SIVA1.
- **GST-SIVA Δ D:** purificação em duas etapas, sendo a primeira uma afinidade realizada em coluna GSTrap FF de 5 ml. A coluna previamente equilibrada com tampão PBS, aplicou-se a amostra filtrada com fluxo de 1 a 5 mL/min. Lavou-se a coluna com 5 a 10 volumes de coluna (25 a 50 mL) e em seguida aplicou-se um volume de coluna de solução contendo trombina. A coluna deve ser então deixada verticalmente em temperatura ambiente por 3 a 4 horas enquanto ocorre a lise entre a proteína fusionada e a GST (glutathione-S-transferase). Decorrido o tempo de clivagem foi feita lavagem com 20 mL de tampão PBS (onde estará a proteína recombinante SIVA Δ D)

e em seguida lavagem com 15 mL de tampão de eluição (onde estará a recombinante GST). A amostra de SIVA Δ D foi então levada para a segunda etapa de purificação em coluna de filtração em gel de 315 mL pré-equilibrada com tampão PBS (fluxo de 2,5 mL/min e pressão 0,5mPa). Aplicou-se a amostra e o perfil da corrida foi monitorado pela absorção no ultravioleta a 280 nm. As alíquotas de interesse foram coletadas e armazenadas em geladeira e de cada pico coletou-se também amostra para aplicação em SDS-PAGE.

- **His-SIVA1:** purificação feita em coluna HisTrap FF de 5 ml. A coluna previamente equilibrada com tampão PBS aplicou-se a amostra filtrada com fluxo de 1 a 5 mL/min. Lavou-se a coluna com 5 a 10 volumes (25 a 50 mL) e em seguida foi feito um gradiente de eluição de 0 a 100% com um segundo tampão contendo imidazol 500 mmol/dm³. As alíquotas de interesse foram coletadas e armazenadas na geladeira e de cada pico coletou-se também amostra para aplicação em SDS-PAGE.

Tampão PBS: 140 mmol/dm³ NaCl, 2.7 mmol/dm³ KCl, 10 mmol/dm³ Na₂HPO₄, 1.8 mmol/dm³ KH₂PO₄, pH 7.3

Tampão de eluição: 50 mmol/dm³ Tris-HCl, 10 mmol/dm³ glutatona reduzida, pH 8.0

Solução de trombina: 40U de trombina em 5 mL de PBS

Tampão de eluição com imidazol: 20 mmol/dm³ fosfato de sódio, 500 mmol/dm³ de NaCl, 500 mmol/dm³ imidazol, pH 7.4

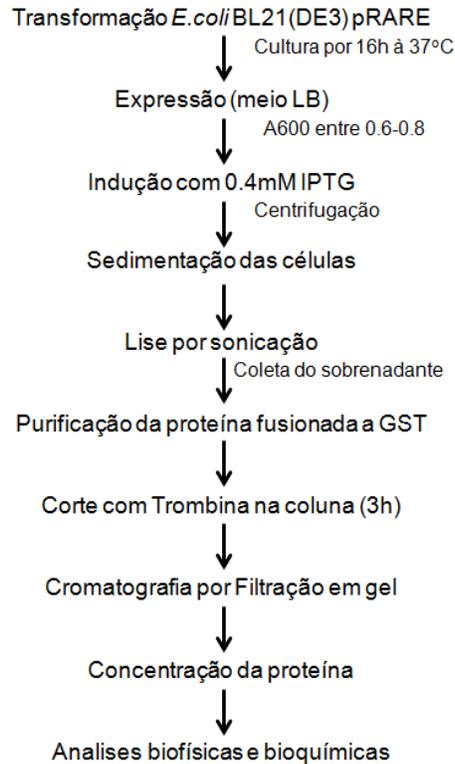


Figura 5. Fluxograma do processo de obtenção da proteína SIVA1

3.7. TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas SIVA1 e seus mutantes que se apresentaram insolúveis, provenientes da estratégia de clonagem pGEX-4T-2 e pET-28a, foram expressas conforme descrito e seus corpos de inclusão submetidos a protocolos de desenovelamento seguido por reenovelamento a fim de tentar obter a proteína solúvel. O enovelamento de uma proteína ocorre por meio de interações entre as cadeias peptídicas no sentido de estabilizar energeticamente sua conformação tridimensional (estrutura terciária e quaternária). A exposição da proteína a agentes caotrópicos como a Ureia e Cloridrato de Guanidina, pH extremos ou temperaturas elevadas faz com que ela apresente modificações físicas na sua conformação e função fisiológica.

Os passos para o experimento de reenovelamento foram:

- 1) Pesar e anotar precipitado de células (para cálculo do rendimento em massa);
- 2) Descongelar pelete de células de 500 mL de indução em Becker contendo 15 mL de tampão de lise + lisozima + DNase (0,01mg/mL);
- 3) Lisar células com sonicador (Amplitude 30%, Process time 1:30 min, ON time 5 seg, OFF time 1:00 min), deixar o lisado na geladeira por 5-10 min antes de centrifugar (12.000 rpm por 10 min) e descartar o sobrenadante (coletar amostra para SDS-PAGE);
- 4) LAVAGEM do corpo de inclusão:
 - a. Ressuspender o pelete do lisado com 15 mL de tampão de lise acrescido de 1% Triton X-100 gelado + DNase, deixar na geladeira por 10 min, sonicar 3x10seg, amplitude 20%, centrifugar (15.000 rpm por 10 min) e descartar o sobrenadante (coletar amostra para SDS-PAGE);
 - b. Ressuspendeu-se o pelete em 15 mL de tampão de lise para remover o Triton X-100, sonicar 3x10seg amplitude 20%, centrifugar (15.000 rpm por 10 min) e descartar o sobrenadante (coletar amostra para SDS-PAGE);
 - c. Pesou-se a massa após lavagem;
- 5) SOLUBILIZAÇÃO do corpo de inclusão:
 - a. Ressuspendeu-se os corpos de inclusão em Becker de vidro com 15 mL de GndCl 6M ou Ureia 8M preparados em tampão com 10 mmol/dm³ DTT (gelado);
 - b. Mantida sob agitação com peixinho constante em geladeira por 1-2h;
 - c. Centrifugou-se (15.000 rpm por 10 min) e descartar o precipitado (coletar amostra para SDS-PAGE);
 - d. Ajustou-se a concentração da proteína para aproximadamente 1 mg/mL;
- 6) REENOVELAMENTO:
 - a. **Por diluição:** diluição final de 15 a 60 vezes em tampão de proteína (PBS). Fazer diluição da proteína gota a gota (cerca de 1h) em temperatura ambiente em Becker com agitação vigorosa contendo o tampão (para 7,5 mL de proteína com 6M GndCl o volume final deve ser de 225 mL para 0,2 M de GndCl / para 7,5 mL de proteína com 8M ureia o volume final deve ser de 225 mL para 0,27 M de ureia). Após diluição deixar solução em descanso (temperatura ambiente) por 30-60 min para que agregados

sejam floculados. Centrifugar amostra (12.000 rpm por 10 min caso haja muito precipitado) e filtrar em membrana de 0,22 μm . Coletar uma amostra para SDS-PAGE e reservar em geladeira;

- b. **Por diálise:** no mínimo 2 mudanças de tampão com 50x o volume de amostra por 3h à 4°C. Imediatamente antes da diálise, diluir 2x amostra com tampão sem GndCl ou ureia. Dialisar em 1L de tampão por 4h, em seguida dialisar novamente ON (16h) em 2L de tampão, tudo em geladeira com agitação. Centrifugar amostra (12.000 rpm por 10 min caso haja muito precipitado) e filtrar em membrana de 0,22 μm . Coletar uma amostra para SDS-PAGE e reservar em geladeira;

7) Correr gel SDS-PAGE e purificar amostras – afinidade/troca iônica

Tampão de lise: 50mmol/dm³ Tris-HCl pH 7.9 + 0,1mmol/dm³ EDTA, 5% glicerol + 1,0mmol/dm³ DTT + 100 mmol/dm³ NaCl

Tampão de lavagem final: 50 mmol/dm³ Tris-HCl pH 8.0 + 100 mmol/dm³ NaCl + 5 mmol/dm³ EDTA

Tampão de desnaturação GndCl: 100 mmol/dm³ Tris-HCl + 6M GndCl

Tampão de desnaturação Ureia: 100 mmol/dm³ Tris-HCl + 8M Ureia

Tampão de diluição: 100 mmol/dm³ Tris-HCl pH 7.0 + 50 mmol/dm³ Glicina + 4 mmol/dm³ ZnCl, 10% glicerol

Tampão 1 de diálise: 100 mmol/dm³ Tris-HCl pH 7.0 + 50 mmol/dm³ Glicina + 4 mmol/dm³ ZnCl, 10% glicerol

Tampão 2 de diálise: 100 mmol/dm³ Tris-HCl pH 7.0 + 10% glicerol

Observação: Outros tampões com aditivos foram utilizados na etapa de diálise 6b. Os testes de reenovelamento e os tampões diferentes dos apresentados nesta metodologia não estão todos representados por não terem apresentado resultado satisfatório

3.8. ENSAIO DE INTERAÇÃO DA PROTEÍNA EXPRESSA

Foi utilizada cultura de células Jurkat, obtidas do American Type Culture Collection (Philadelphia, PA). As células foram crescidas em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL/Life technologies, Inc.) suplementadas com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina a 2mmol/dm³ de L-glutamina. Todas as colônias foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. O ensaio de interação foi feito entre o lisado total de Jurkat com SIVAΔD purificada. Os anticorpos usados para verificar o sucesso da precipitação foram os já descritos como ligantes naturais do C-terminal de SIVA1: CD27 [28], OP18 (Stathmin) [27], CD4 [28], and GITR [29]. O lisado foi deixado interagindo com a proteína purificada por 16 horas a 4°C sob agitação. Em seguida foram adicionadas 40 µL de pérolas ligadas a GST e deixou-se interagir por mais 1 hora nas mesmas condições. Após esta etapa o sobrenadante foi descartado e três lavagens com PBS e 0,02% de Tween. Os reagentes foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 g a 4°C, e então aquecidos a 94°C por 5 minutos a fim de degradar as beads antes de aplicar as amostras no SDS-PAGE 12%.

3.9. DICROÍSMO CIRCULAR DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) detecta a absorção diferencial dos componentes levogiro e destrogiro de uma radiação circularmente polarizada. Esse efeito ocorre quando a molécula possui um cromóforo quiral (opticamente ativo) ou quando está presente em meio quiral. Devido às interações específicas da luz com os cromóforos da proteína – ligação peptídica, resíduos aromáticos e ligações de dissulfeto – o CD fornece espectros característicos para cada tipo de estrutura secundária ou terciária.

As proteínas foram analisadas por meio de dicroísmo circular para verificação e estimativa da presença de estrutura secundária e terciária. Os

experimentos de CD foram realizados em espectropolarímetro JASCO 720 (Jasco ORD 306 do Instituto de Química/UNICAMP) com controle de temperatura (Peltier Type Control System PFD 4255, Jasco). As medidas tomadas em cubetas de quartzo com caminho ótico de 0,1 cm, foram feitas a temperatura constante de 20°C variando-se concentração proteica, pH e temperatura, para avaliar a estabilidade da proteína [18]. Mudanças conformacionais da proteína na presença de agentes caotrópicos também foram feitos e os resultados comparados na presença e ausência destes. Os programas usados para registro e tratamento dos dados foram o Spectra Manager® e Origin®.

Durante a operação sugere-se deixar um fluxo constante de 12L/min de N₂ a fim de proteger os elementos ópticos da radiação UV < 260 nm e estabilizar a corrente da lâmpada por 30 minutos antes de iniciar as leituras. O programa Spectra Manager checa todos os componentes do equipamento. As condições experimentais foram padronizadas e as leituras feitas, quando possível, de 260 a 190nm, de um em um nanômetro, em modo contínuo, três ou quatro acumulações (8 ou 16 leituras) em cada condição testada; a velocidade de escaneamento e o tempo de resposta foram feitos de acordo com o número de acumulações e observando-se a melhor condição de voltagem do equipamento para aquele experimento.

Procedimento:

- 1) Medir a concentração da proteína;
- 2) Fazer leitura da cubeta (1mmol/dm³, 2mmol/dm³, 5mmol/dm³ ou 10mmol/dm³ com duas faces polidas) vazia a fim de verificar se a mesma está limpa, caso haja sinal característico de proteína lavar com ácido nítrico concentrado e com Hellmanex®, retirar com água abundante;
- 3) Com o tampão na cubeta foram feitas leituras de 260nm até o menor comprimento de onda possível, sem que a voltagem do equipamento ultrapasse 700V;
- 4) Em seguida foram feitas as leituras das amostras contendo a proteína purificada nas concentrações desejadas, ou com aditivos caotrópicos. Ressalva-se que os dados devem ser coletados até 700 V, pois ultrapassado

este valor a leitura perde a confiabilidade do resultado, além de provocar possíveis danos elétricos no equipamento;

5) Dados em *.txt* a fim de processar resultados no Origin.

Fórmula do cálculo da elipticidade molar de uma proteína em meio aquoso no comprimento de onda 280nm.

$$[1] \quad \varepsilon_{280}[M^{-1}cm^{-1}] = n_{Trp} \times 5400 + n_{Try} \times 1280 + n_{SS} \times 120$$

Fórmula da normalização dos dados de Dicroísmo Circular em mdeg para Eliptidade molar residual.

$$[2] \quad [\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n}$$

3.10. FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

Proteínas apresentam aminoácidos que são naturalmente fluoróforos, os chamados fluoróforos intrínsecos cada qual com comprimentos de onda de excitação e emissão próprios, a saber, o triptofano, tirosina e fenilalanina. Na tabela abaixo [20] abaixo se verifica que o comprimento de onda de excitação do triptofano é maior que dos outros dois aminoácidos, e que o pico da emissão está deslocado no sentido de maiores comprimentos de onda; como consequência disto é possível isolar o sinal dos triptofanos presentes na proteína e desta forma inferir o ambiente químico ou exposição dos mesmos em relação ao solvente ou interior de estruturas da proteína. O princípio deste experimento é comparar o deslocamento do pico de emissão da proteína enovelada com o pico da proteína adicionada de agentes caotrópicos. As medidas foram feitas em espectrofluorímetro Carey Eclipse (Varian) com excitação em 295 nm a fim de

excluir o efeito das tirosinas e emissão foi coletada de 300 até 450 nm. A abertura de fenda utilizada foi de 5 ou 10 nm, a que apresentasse melhor resultado.

| Aminoácido | λ excitação (nm) | λ emissão (nm) |
|--------------|--------------------------|------------------------|
| Triptofano | 280 | 348 |
| Tirosina | 274 | 303 |
| Fenilalanina | 257 | 282 |

Procedimento:

- 1) Ligar lâmpada do equipamento pelo menos 15 minutos antes de iniciar leituras a fim de estabilizar a corrente elétrica
- 2) Fazer leitura da cubeta de quartzo (5mmol/dm³ ou 10mmol/dm³ com quatro faces polidas) vazia a fim de verificar se a mesma está limpa, caso haja sinal característico de proteína lavar com Hellmanex®;
- 3) Preparar amostras com concentração conhecida de proteína purificada e fazer leituras da amostra com e sem agente caotrópico (Ureia 8M ou Cloreto de Guanidina 6M), os parâmetros do equipamento devem ser feitos de forma a evitar o ruído nas leituras;
- 4) Fazer leituras de tampão para descontar o branco;

Cálculo do centro de massa:

$$[3] \quad \langle \lambda \rangle = (\sum \lambda_i F_i) / (\sum F_i)$$

3.11. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

A análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) permite avaliar o estado de polidispersidade da proteína, tamanho hidrodinâmico e os efeitos de agregação de proteínas [18-20]. O grau de homogeneidade da amostra pode ser avaliado em função de parâmetros como pH, concentração, temperatura, presença de ligantes, etc. As medidas de DLS foram feitas no equipamento DLS-Waite DynaPro-99 com

controle de temperatura por meio de propostas submetidas ao Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do LNBio. O feixe de laser do equipamento possui 781nm e é espalhado pela amostra em todas as direções; a luz espalhada é coletada em um detector contador de fótons que são então convertidos em pulsos elétricos. A medida direta do DLS é o coeficiente de difusão das moléculas da amostra determinado pelo decaimento da intensidade de luz em função da autocorrelação. As amostras de proteína purificada devem ser centrifugadas por pelo menos 30 minutos à 4°C antes das medidas.

Equação de Stokes-Einstein para obtenção do coeficiente de difusão (D_0) a partir do Raio de Stokes:

$$[4] \quad D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_S}$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta do sistema, e $(6\pi\eta R_S)$ pode ser substituído pelo coeficiente de fricção (f ou f_0). Todos os resultados foram analisados no software Origin (Microcal). Um coeficiente de difusão teórico de $12 \cdot 10^{-7}$ cm²/s foi calculado a partir do R_S medido experimentalmente. O cálculo do Raio de Stokes teórico foi feito pela fórmula:

$$[5] \quad R_S = \sqrt[3]{\frac{3MV_{bar}}{4\pi N}}$$

3.12. ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

A ultracentrifugação analítica (UCA) é uma ferramenta versátil no estudo de proteínas, por meio do monitoramento da sedimentação da macromolécula no campo centrífugo é possível determinar algumas características hidrodinâmicas da solução sem a interação com quaisquer matrizes ou superfícies. É bastante eficiente para entender o comportamento de moléculas em solução. Por meio da UCA é possível obter informações sobre a forma da partícula através da relação entre coeficiente de sedimentação (s), coeficiente de difusão (D) e coeficiente

friccional (f) [21]. Os experimentos foram feitos em uma ultracentrífuga analítica Beckman Coulter Optima XL-A, onde foram feitos experimentos de velocidade de sedimentação com concentração variando de 0,2 a 1,0 mg/mL de proteína em PBS à 4º C e 42.000 rpm. Os dados foram adquiridos com leituras à 280 nm. As análises foram feitas nos softwares Sednterp e SedFit (Versão 14.1) [31-32].

3.13. FILTRAÇÃO EM GEL ANALÍTICA DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

Esta técnica permite calcular o raio de Stokes da proteína por comparação com proteínas de raio conhecido. Em uma coluna de filtração em gel Superdex 200 GE HealthCare Life Sciences de tamanho (24 mL) padronizado e empacotamento industrial foram feitas corridas em equipamento de Cromatografia líquida de proteínas (FPLC – GE Healthcare life sciences).

Procedimento:

- 1) Equilibrar coluna com um volume e meio de tampão de corrida;
- 2) Aplicar amostra da proteína purificada e concentrada em cerca de 1mg/mL;
- 3) Aplicar amostra de proteínas padrão, cada uma na concentração de 1mg/mL;
- 4) Acompanhar volumes de eluição de cada proteína;
- 5) Aferir volume morto da coluna com Blue Dextran.

Fórmula para obtenção do Kav a partir dos volumes de eluição das proteínas padrão:

$$[6] \quad K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

3.14. FILTRAÇÃO EM GEL ACOPLADA A ESPALHAMENTO DE LUZ EM MÚLTIPLOS ÂNGULOS (SEC-MALS)

Este equipamento constituído por duas partes (DAWN-HELEOS II e miniDAWN-TREOS da Wyatt Technology) foi conectado na sequência da coluna analítica usada para a CEMA, o SEC-MALS faz a medida absoluta do peso molecular e do raio de giro de proteínas em solução. O termo múltiplos ângulos refere-se à detecção de luz espalhada por um detector móvel em diferentes ângulos dentro de uma faixa de alcance. Antes de iniciar as leituras de espalhamento o equipamento deve ser equilibrado com água Milli-Q filtrada e deaerada que deve passar pela coluna e em seguida pelos equipamentos a um baixo fluxo (até 0,5 ml/min). Em seguida o equipamento e a coluna devem ser equilibrados com o tampão de corrida da proteína.

3.15. ABSORÇÃO DA SOLUÇÃO DE GST-SIVA Δ D PURIFICADA

A espectrofotometria de absorção é uma técnica de análise óptica que permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma amostra em solução. A técnica está fundamentada na lei de Lambert-Beer pela equação $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, onde A é a absorvância, ϵ o coeficiente de extinção molar da amostra e l o comprimento da cubeta de quartzo usada para realizar as medidas [22-23]. Para leituras nos comprimentos de onda UV-Visível deixar a lâmpada de o equipamento estabilizar-se com a corrente por pelo menos 15 minutos, certificar-se de que a cubeta esteja devidamente limpa, utilizar amostras filtradas e preferencialmente centrifugadas a fim de evitar a presença de interferentes.

3.16. SAXS DA SOLUÇÃO DE GST-SIVAΔD PURIFICADA

Foram feitas coletas em espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS) para amostras de SIVAΔD purificadas a fim de obtermos um envelope proteico. Nas condições testadas, variamos concentração da proteína, temperatura do sistema e intensidade da fonte de raios X, bem como tempo de exposição da amostra. Os dados foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), nas linhas SAXS 1 e 2. A integração das imagens foi feita na linha, de acordo com a calibração do equipamento, e todo o processamento de dados foi realizado pelo software ATSAS versão 2.5. O equipamento estava montado a uma distância para proteínas de baixo peso molecular, os resultados aqui mostrados correspondem aos dados obtidos na linha SAXS1 que possui detector Pilatus da Dectris (300k, 84 mmol/dm³ x 107 mmol/dm³) que fornece coleta de dados 2D. Fórmulas utilizadas [30] abaixo.

Módulo do vetor de espalhamento:

$$[7] \quad s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$$

$$[8] \quad \lambda = 2d \sin(\theta)$$

Região de Guinier para solução monodispersa e globular

$$[9] \quad I(s) = I(0) \exp\left(-\frac{1}{3} R_g^2 s^2\right)$$

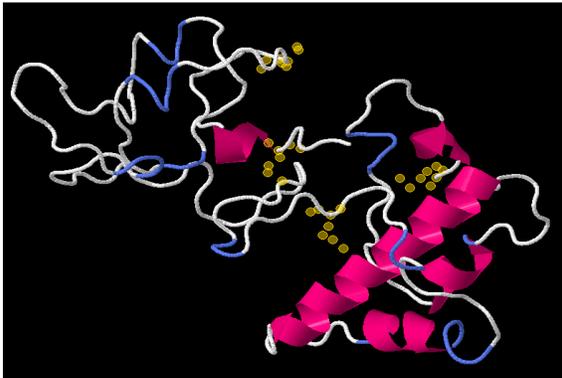
Transformada de Fourier da intensidade do espalhamento, que gera um gráfico de distribuição de distâncias $p(R)$

$$[10] \quad p(R) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin sr}{sr} ds$$

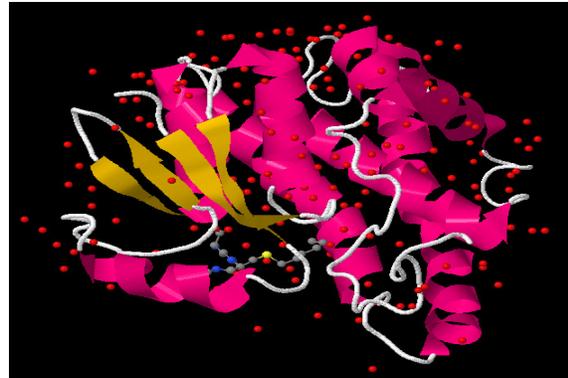
4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE ESTRUTURAL “*IN SILICO*” DE SIVA1 E MUTANTES

Os modelos obtidos para as proteínas em estudo estão mostrados na Figura 6, a predição de estrutura secundária na Figura 7, Gráfico de Ramachandram na Figura 8, análise de resíduos conservados na Figura 9 e na tabela 1 os parâmetros de cada proteína obtidos no site Protparam. O C-terminal de SIVA apresenta 13 aminoácidos em sua sequência primária, os mesmos estão ilustrados na imagem F da Figura 6. Uma análise comparativa da sequência de SIVA1 humana com a de outros organismos que estão depositadas no NCBI mostrou sítios de conservação de resíduos entre as espécies. Observamos que o N-terminal da proteína, as cisteínas do C-terminal e apenas porção do domínio de morte celular estão preservadas conforme visto na Figura 9.



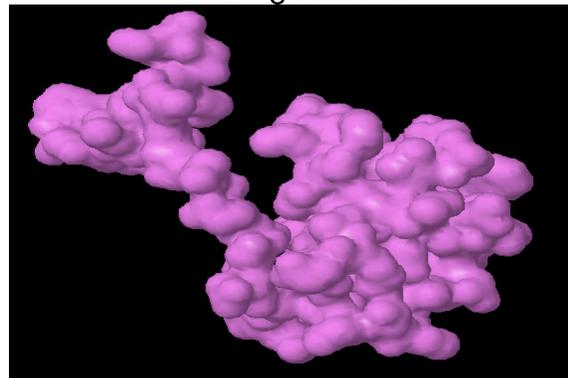
A) Predição de estrutura pelo programa I-Tasser para SIVA1 (sem cauda). Metioninas marcadas para identificação do N e C-terminal



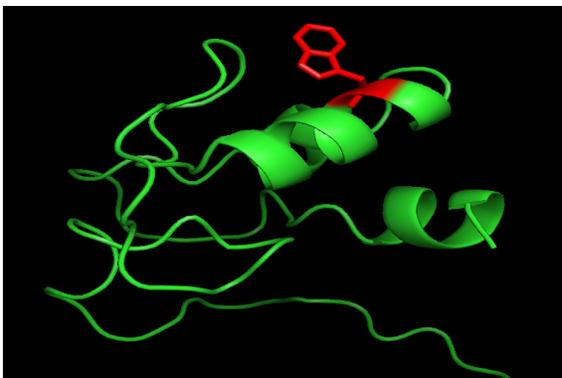
B) Estrutura da GST depositada no PDB, referência: 1M9A
Estrutura cristalográfica da glutathione S-transferase com 26 kDa de *Schistosoma japonicum* complexoado a S-hexilglutathione



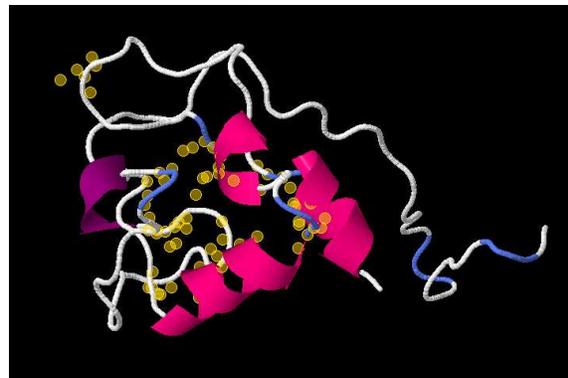
C) Predição de estrutura do mutante SIVA Δ D



D) Visão topográfica da predição de SIVA Δ D

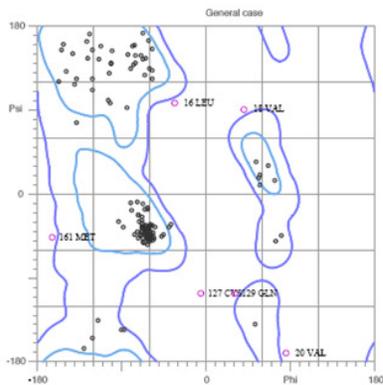


E) Evidenciação em vermelho do triptofano na estrutura de SIVA Δ D



F) Evidenciação em amarelo das cisteínas na estrutura de SIVA Δ D

Figura 6. Predição de estrutura terciária pelo programa I-Tasser (A, C, D, E). Em B a figura foi obtida do PDB. D e E foram tratadas pelo software JMOL.



MolProbity Ramachandran analysis

86.7% (150/173) of all residues were in favored (98%) regions.
 95.4% (165/173) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 8 outliers (phi, psi):

- 16 LEU (-34.1, 98.3)
- 18 VAL (40.5, 91.5)

<http://kinemage.biochem.duke.edu>

- 20 VAL (85.8, -170.8)
- 79 PRO (-32.5, 92.5)
- 127 CYS (-6.6, -106.5)
- 128 GLY (147.9, -80.1)
- 129 GLN (30.4, -106.1)
- 161 MET (-165.8, -46.2)

Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003)

Figura 8. Gráfico de Ramachandran obtido para a sequência de aminoácidos da proteína SIVA1 (programa: <http://molprobity.biochem.duke.edu/>)

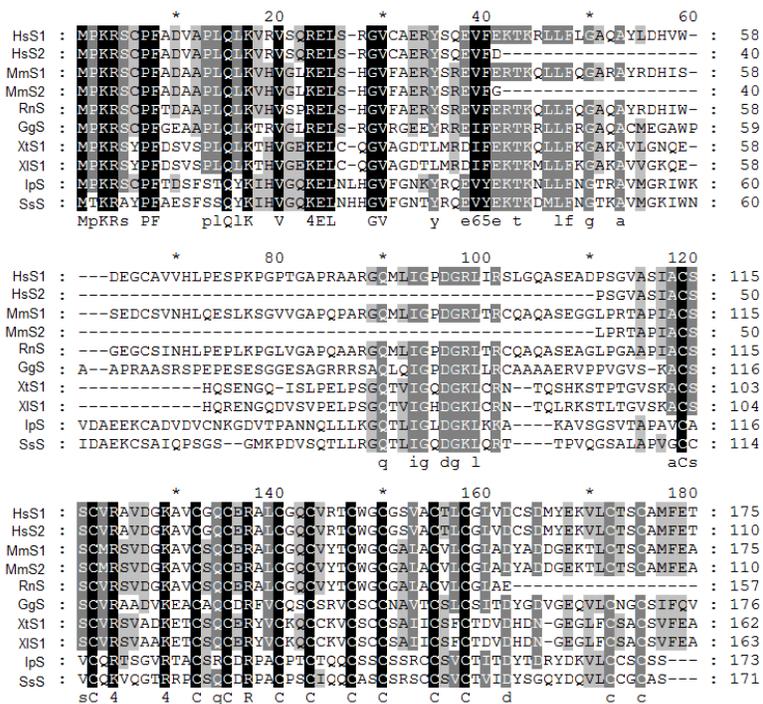


Figura 9. Alinhamento múltiplo de algumas sequências de SIVA depositadas no NCBI de *Homo sapiens*, *Xenopus*, *Mus musculus*, *Ratus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Salmo salar* e *Ictalurus punctatus*. Aalinhamento pelo Clustaw (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e do arquivo gerado foi feita análise de conservação de resíduos no programa GeneDoc. Observamos que a proteína SIVA apresenta resíduos altamente conservados entre as espécies em seu N-terminal e C-terminal. Sendo que no C-terminal os resíduos conservados são as cisteínas

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das proteínas em estudo obtidas pelo Protparam (expasy)

| Parâmetros | GST-SIVA1 | GST-ΔC | GST-ΔD | SIVA1 | ΔC | ΔD | His-SIVA1 |
|--------------------------|------------------|---------------|---------------|--------------|-----------|-----------|------------------|
| Nº de resíduos | 401 | 357 | 318 | 175 | 124 | 92 | 195 |
| Peso molecular (Da) | 44987.2 | 40499.8 | 35757.5 | 18694.6 | 13303.3 | 9464.9 | 20857.9 |
| pl | 6.71 | 7.56 | 5.77 | 7.86 | 8.95 | 4.81 | 8.15 |
| Coefficiente de extinção | 59580 | 51840 | 50850 | 16470 | 8730 | 7740 | 16470 |
| Índice de instabilidade | 40.56 | 41.13 | 36.54 | 46.39 | 51.28 | 37.74 | 44.80 |
| | instável | instável | estável | instável | instável | estável | instável |

4.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

❖ PROTEÍNA HIS-SIVA1

A) TESTES DE EXPRESSÃO

Foi possível expressar a proteína SIVA1 clonada em vetor pET-28a (20,9 kDa) fusionada com cauda de histidina em seu N-terminal em *E.coli* pRARE. No entanto a expressão possuiu rendimento menor, se comparada com a expressa no vetor pGEX-4T-2. A Figura 10 mostra o teste de expressão que foi realizado a 30 e 37°C: as amostras foram coletadas após adição de 0,4mmol/dm³ de IPTG nos períodos indicados (1h, 2h, 3h e ON).

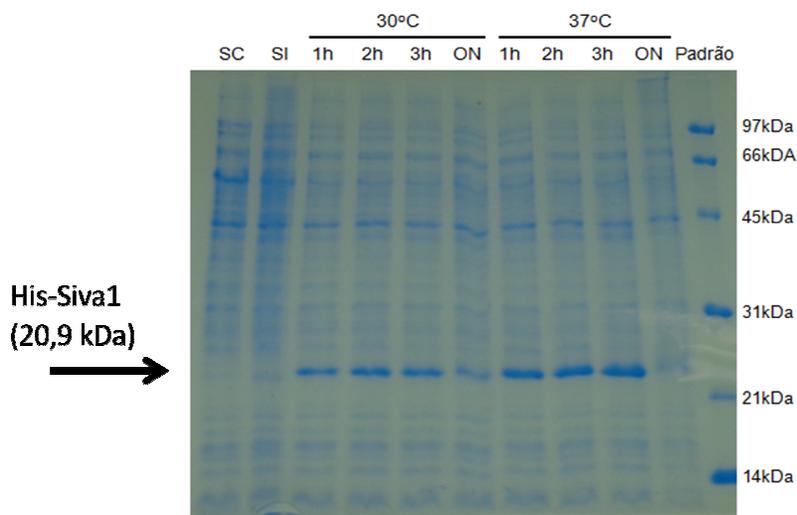


Figura 10. Teste de expressão da proteína His-SIVA. (SC= Colônia iniciadora, SI= antes da aplicação de IPTG, 1h, 2h, 3h ou 16 h após adição de IPTG).

Mini testes (5 ml de meio de cultura) de expressão com aditivos que poderiam auxiliar na solubilização da proteína ainda durante sua expressão foram usados. As condições utilizadas e os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Teste de expressão de His-SIVA1 com aditivos adicionados ao meio de cultura

| Condição | Complemento | Expressão | Solubilidade |
|--|--|-----------|--------------|
| E.coli BL21 (DE3) pLysS 20, 30 e 37°C* | SC | Baixa | Insolúvel |
| | Co-expressão pTgroE | Baixa | Insolúvel |
| | Co-expressão pTgroE com choque térmico | Baixa | Insolúvel |
| E. coli BL21 pRARE 20, 30 e 37°C* | SC | Boa | Insolúvel |
| | Sacarose (0,4M) | Boa | Insolúvel |
| | L-arginina (0,1M) | Boa | Insolúvel |
| | ZnSO ₄ (3mM) | Baixa | Insolúvel |
| | ZnCl (3mM) choque térmico | Baixa | Insolúvel |
| | | Boa | Insolúvel |

*Todas as condições tiveram amostras coletadas a 1, 3 e 16 horas após indução IPTG testado de 0.4 a 1.0 mM e Lactose 10mM

B) TESTES DE REENOVAMENTO

Protocolo de reenovelamento foi aplicado com grande dificuldade de padronização, pois a maior parte da proteína precipita durante o processo de retirada dos agentes caotrópicos. A Tabela 3 mostra um teste de diferentes pH para os melhores solventes encontrados na etapa de diálise/diluição.

Tabela 3. Teste de reenovelamento com faixa de pH para tampão fosfato e tris-HCl

| Tampão | pH | Turbidez |
|--|-----|----------|
| | 5,0 | + |
| | 6,0 | ++ |
| Tris-HCl 100 mmol/dm ³ , Glicina 50 mmol/dm ³ , and ZnCl ₂ 2 mmol/dm ³ | 7,0 | +++ |
| | 8,0 | + |
| | 9,0 | 0 |
| | 5,0 | ++ |
| PBS (140 mmol/dm ³ NaCl, 2.7 mmol/dm ³ KCl, 10 mmol/dm ³ Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mmol/dm ³ KH ₂ PO ₄), Glicina 50 mmol/dm ³ | 6,0 | ++ |
| | 7,0 | + |
| | 8,0 | + |
| | 9,0 | 0 |

C) PURIFICAÇÃO

Foi feita tentativa de purificação por coluna de afinidade a níquel e por troca iônica das amostras com baixa turbidez do teste de refolding, porém devido ao baixo rendimento de proteína obtido após a filtração das amostras, não visualizamos a proteína purificada em quantidade relevante da no SDS-PAGE.

❖ PROTEÍNA GST-SIVA1

A) TESTES DE EXPRESSÃO

A proteína GST-SIVA1 mostrou expressão em boa quantidade no vetor pEGX-4T-2 e *E.coli* pRARE e a melhor condição encontrada foi indução à 30°C com 0,4mmol/dm³ IPTG por 3h a 4h. A Figura 11 mostra o lisado do extrato proteico indicando o sucesso da expressão, no entanto quando as amostras foram centrifugadas, observamos que a proteína de interesse (45 kDa) não apresenta-se na fração solúvel.

Outros testes de expressão foram feitos para deixar a proteína solúvel. Por exemplo, foram testadas diferentes linhagens de *E.coli*, aditivos no meio de cultura, indução com lactose, diferentes temperaturas e tempos de incubação com IPTG, porém os resultados foram os mesmos, conforme visto na Tabela 4.

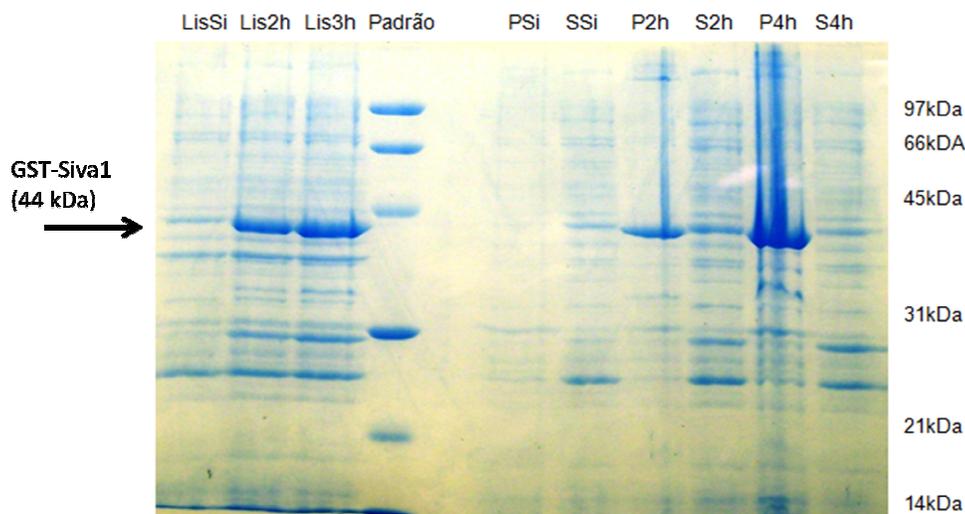


Figura 11. SDS-PAGE de indução da proteína GST-SIVA1 subclonada em vetor de expressão pGEX-4T-2 com cauda de glutationa em linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pRARE. A proteína foi expressa (44kDa) como pode ser visto nas primeiras três colunas (LisSi, Lis2h, Lis3h), as frações lisadas foram centrifugadas e separadas as porções solúvel e insolúvel, observa-se que a proteína induzida encontra-se completamente na porção insolúvel (pelete/corpo de inclusão). Lis=lisado, Si=sem indução, P=pelete, S=sobrenadante

Tabela 4. Testes de expressão da proteína GST-SIVA1

| Condição | Complemento | Indução | Solubilidade |
|---|--|---------|--------------|
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS 20°C | - | baixa | insolúvel |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS 30°C | - | baixa | insolúvel |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS 37°C | - | baixa | insolúvel |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta 20°C | - | baixa | insolúvel |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta 30°C | - | boa | insolúvel |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta 37°C | - | boa | insolúvel |
| <i>E. coli</i> BL21 pRARE 20, 30 and 37°C | - | boa | insolúvel |
| | Sacarose (0,4M) | boa | insolúvel |
| | L-arginina (0,1M) | boa | insolúvel |
| | ZnSO ₄ (3mmol/dm ³) | boa | insolúvel |
| | ZnCl (3mmol/dm ³) | boa | insolúvel |
| | Lactose (2 mmol/dm ³) | boa | insolúvel |

* Amostras de todas as condições foram coletadas a 1, 3 e 16 horas após indução com IPTG foi testado de 0.4 a 1.0 mmol/dm³

B) TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO

Em vista de a proteína apresentar-se na fração insolúvel, utilizamos o protocolo de solubilização (reenovelamento) a fim de recuperar proteínas em corpos de inclusão. A proteína GST-SIVA foi expressa em *E. coli* pRARE, à 30°C por 3 horas, e induzida por 0,4mmol/dm³ de IPTG. O método obteve sucesso, pois a proteína foi recuperada por diálise realizada em duas etapas (4 horas e 16 horas) em tampão fosfato com 140 mmol/dm³ de NaCl. No entanto, apenas pequena porção da proteína, em torno de 20 a 30% do que foi recuperado pôde ser purificado por afinidade, o restante ligou-se irreversivelmente na coluna de afinidade GSTrap FF [GE] quando adicionado o tampão de eluição, sendo necessária uma etapa de lavagem da coluna com ureia 8M ou guanidina 6M. A Figura 12 mostra as etapas do processo de reenovelamento conforme descrito

nos métodos 3.7. Imediatamente após a finalização do experimento foram observadas bandas de degradação abaixo da proteína (45 kDa); a amostra filtrada, mostrada na coluna 9, foi purificada em coluna de afinidade. Na afinidade a proteína foi purificada em baixo rendimento, uma grande parte ligou na coluna e só desligou após lavagem com ureia 8M. Provavelmente porque se formaram agregados solúveis com tamanho inferior a 22µm (tamanho do filtro).

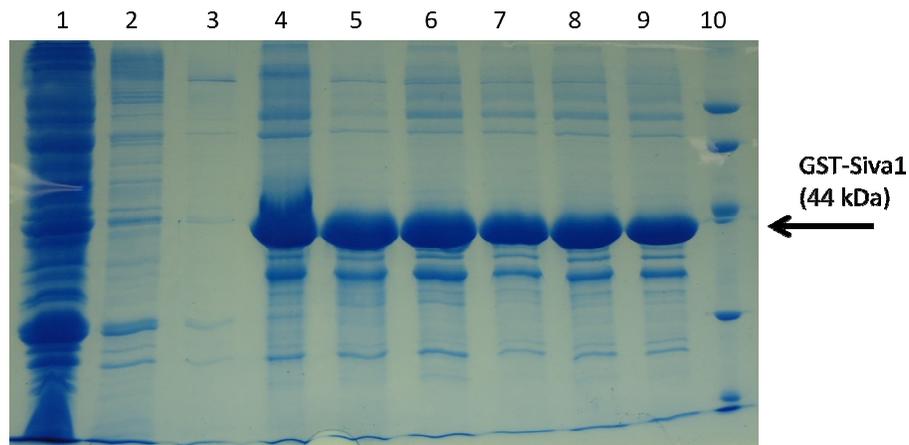


Figura 12. SDS-PAGE das lavagens feitas durante as etapas de solubilização. Primeira amostra lisado de *E. coli* e as etapas seguintes são as lavagens. As duas amostras finais são etapas após filtração e antes de purificar na coluna de afinidade. 1=lisado, 2=primeira lavagem (com triton-X), 3= segunda lavagem (Tp de lise), 4=pelete após lavagens, 5=proteína em ureia 4M (antes da diálise), 6= proteína após diálise, 7= proteína após centrifugação, 8= proteína filtrada em 0,45µm, 9= proteína filtrada em 0,22µm, 10= padrão de baixo peso

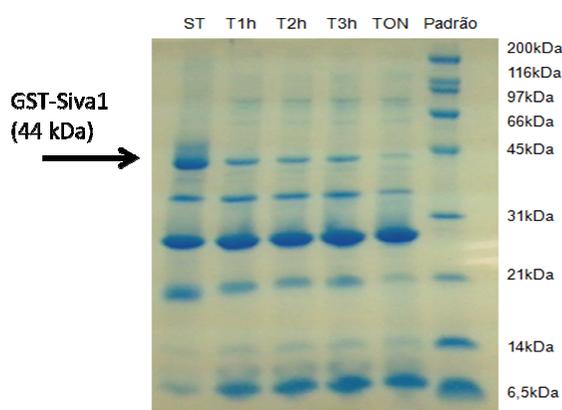
C) TESTES DE REAÇÃO COM TROMBINA

Após purificação, a proteína foi deixada por 1 a 16 horas na presença de trombina a fim de verificarmos a possibilidade de separar a porção GST da SIVA1. A digestão, no entanto, foi inespecífica e clivou a proteína SIVA (18,7 kDa), como pode ser visto na figura 13A, onde temos o surgimento progressivo de uma banda próximo ao padrão de 6,5 kDa. Simultaneamente ao SDS-PAGE corado com

Comassie foi feita outra corrida para Western Blotting, a interação com anticorpos anti-SIVA 175 e anti-GST é mostrada na Figura 13B.

Uma fração da proteína foi deixada em geladeira e em bancada a fim de acompanhar sua estabilidade. Em geladeira, conforme pode ser verificado na figura 14, não houve degradação até o sexto dia, mas na bancada (temperatura ambiente) a proteína degrada-se completamente a partir do sexto dia.

A)



B)

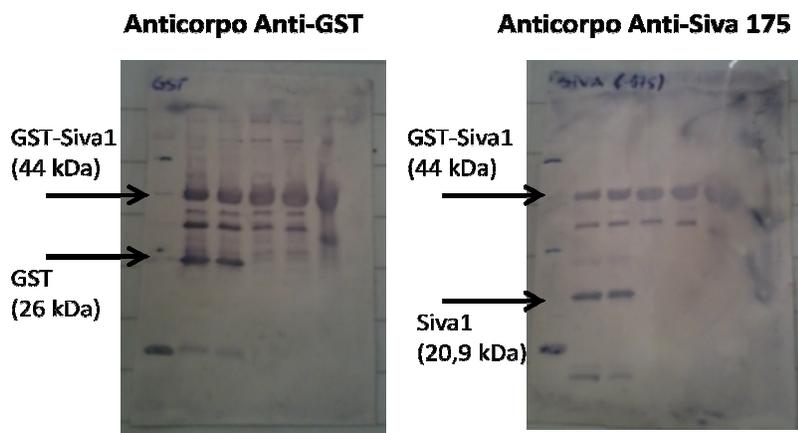


Figura 13. A) SDS-PAGE de amostras incubadas com trombina para cisão de GST-SIVA1, coletadas nos tempos de 1 a 16 horas após a resolubilização (corado com azul brilhante de Comassie). Observa-se que a trombina cliva a SIVA em regiões inespecíficas (bandas de 6,5kDa e 14 kDa) que aumentam de intensidade conforme o tempo passa. B) Western blotting mostra, o mesmo experimento do item A, no entanto as membranas foram tratadas com anticorpo Anti-GST e Anti-SIVA(175), as setas indicam as bandas

observadas.

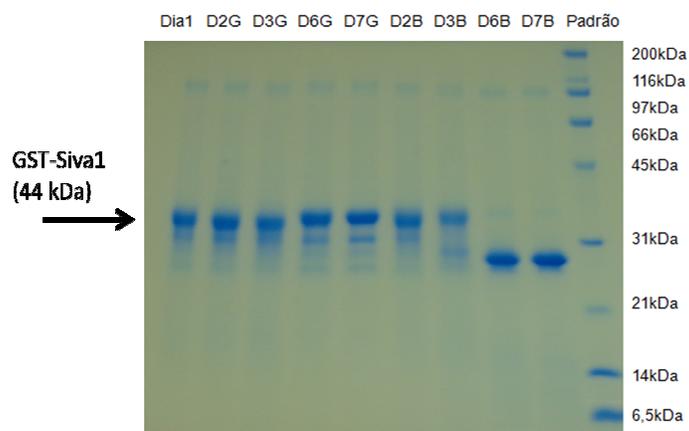


Figura 14. Acompanhamento de estabilidade da amostra pós resolubilização feita na geladeira (D2G, D3G, D6G, D7G) e na bancada (D2B, D3B, D6B, D7B).

D) PURIFICAÇÃO DE SIVA1

Os testes de purificação feitos com a proteína obtida após a expressão ou ao final das etapas de resolubilização estão apresentados nas Figuras de 15 a 19.

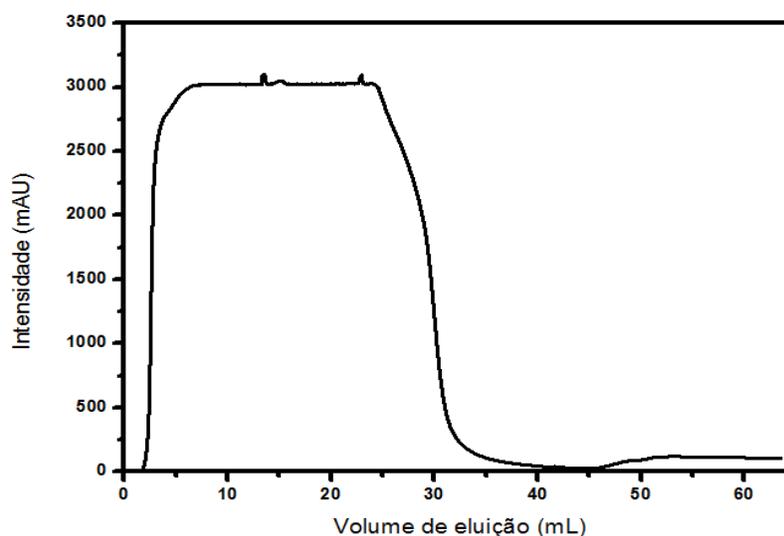


Figura 15. Purificação por afinidade feita com lisado de *E.coli* pRARE expressando GST-SIVA1. Em azul leitura do ultravioleta 280nm, pontilhado marrom a condutância em

vermelho estão indicadas as frações coletadas em cada tubo e em rosa a injeção da amostra na coluna.

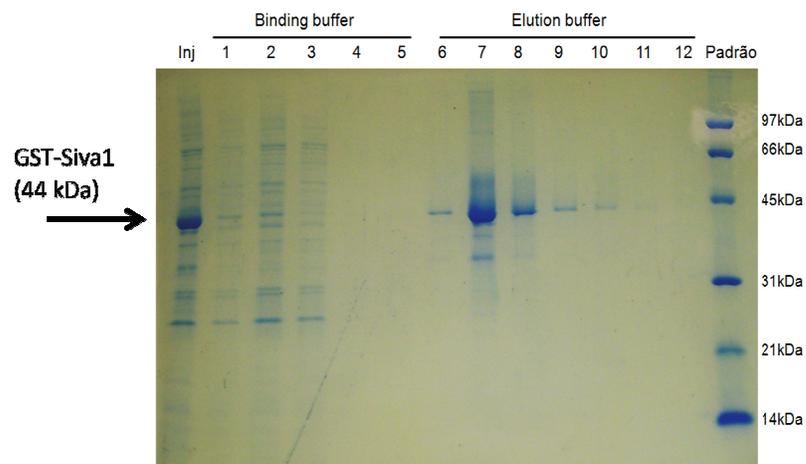


Figura 16. Purificação por afinidade em coluna feita com amostra obtida após reenovelamento de GST-SIVA1 (45 kDa). Acima estão indicados os tubos coletados e a os tampões utilizados.

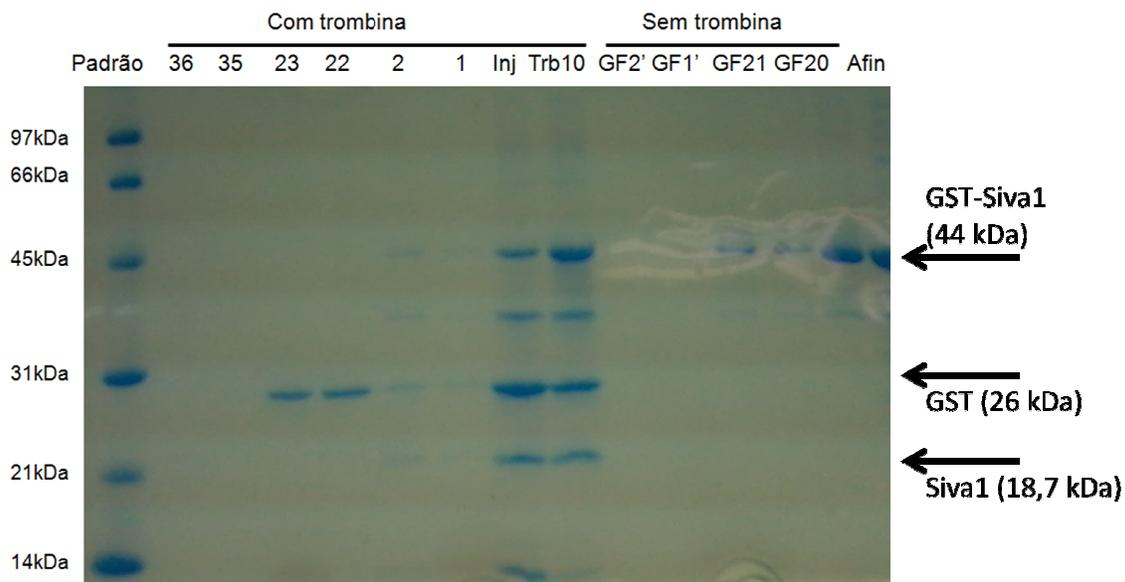


Figura 17. Filtração em gel após afinidade, à esquerda amostras do pico de corrida feita após incubação com trombina onde observamos um pico próximo a 31kDa correspondente à GST (26 kDa) e à direita amostras da proteína fusionada (45kDa).

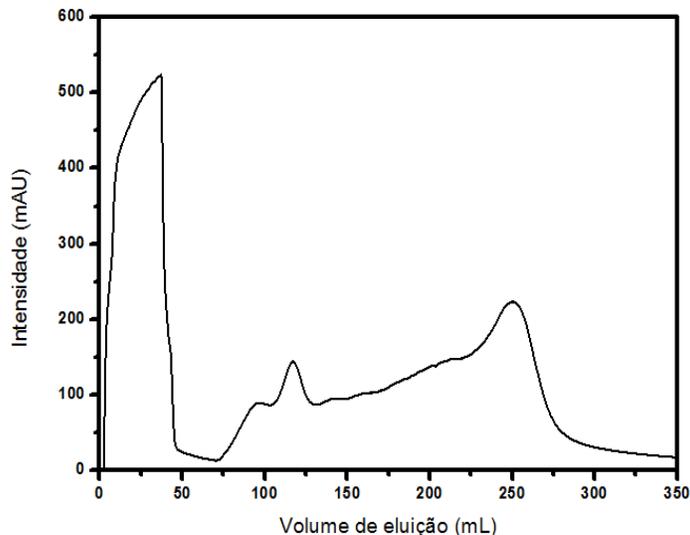


Figura 18. Purificação por troca aniônica (High Q) em coluna feita com amostra obtida após reenovelamento de GST-SIVA1. Em azul leitura do ultravioleta 280nm, em vermelho estão indicadas as frações coletadas em cada tubo, em rosa a injeção da amostra na coluna e as linhas verde e marrom paralelas que sobem a partir de 60 mL são respectivamente a porcentagem de tampão B com 500mmol/dm^3 de NaCl e a condutância.

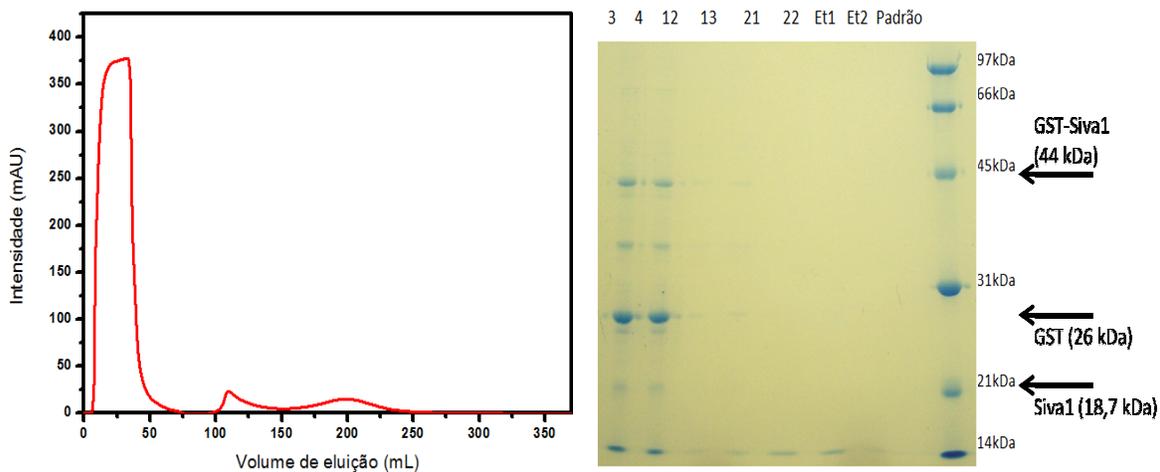


Figura 19. Purificação por troca catiônica (High S) em coluna feita com amostra obtida após reenovelamento de GST-SIVA1. Em azul leitura do ultravioleta 280nm, em vermelho estão indicadas as frações coletadas em cada tubo, em rosa a injeção da amostra na coluna e as linhas verde e marrom paralelas que sobem a partir de 60 mL são respectivamente a porcentagem de tampão B com 500mmol/dm^3 de NaCl e a condutância. O SDS-PAGE mostra amostras coletadas dos picos do gráfico anterior, conforme indicado na numeração.

❖ PROTEÍNA GST-SIVA Δ C

A) TESTES DE EXPRESSÃO

Proteína GST-SIVA Δ C expressa em boa quantidade no vetor pEGX-4T-2 e *E.coli* pRARE, a melhor condição encontrada para a expressão da proteína foi indução à 30°C com 0,4mmol/dm³ IPTG por 4h. A Figura 20 mostra o lisado do extrato proteico indicando o sucesso da expressão, no entanto quando centrifugadas as amostras observamos que a proteína de interesse (40,5 kDa) não apresenta-se na fração solúvel.

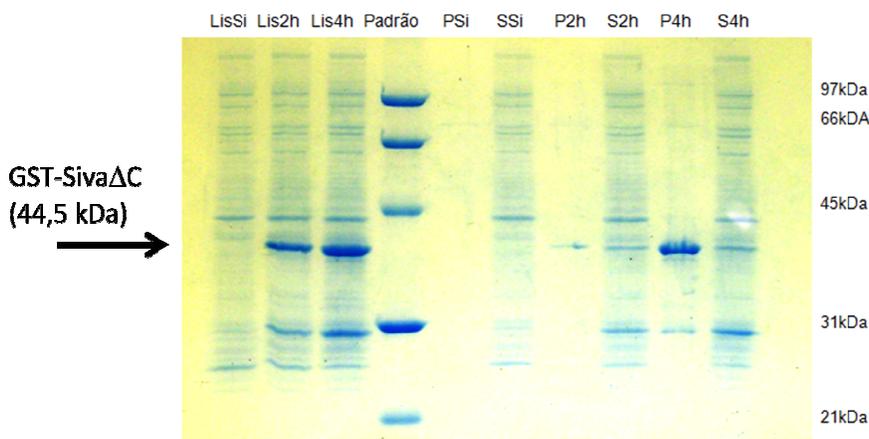


Figura 20. Gel da expressão da proteína GST-SIVA Δ C em linhagem pRARE (Lis=lisado, Si=sem indução, P=pelete, S=sobrenadante)

B) TESTES DE PURIFICAÇÃO

Foi realizado teste de purificação para confirmar solubilidade da proteína, no entanto ela se apresentou ainda insolúvel; o gráfico não é mostrado aqui, mas ele apresenta perfil idêntico ao exibido na Figura 15 referente à proteína insolúvel GST-SIVA1.

❖ PROTEÍNA GST-SIVA Δ D

A) TESTES DE EXPRESSÃO

A melhor condição encontrada para expressão da proteína GST-SIVA Δ D em vetor pEGX-4T-2 e *E.coli* pRARE, foi à 30°C com 0,4mmol/dm³ IPTG por 3h. A Figura 21 mostra o lisado do extrato proteico indicando o sucesso da expressão. Quando as amostras foram centrifugadas, observamos que a proteína de interesse (35,7 kDa) apresenta-se na fração solúvel e parcialmente na insolúvel.

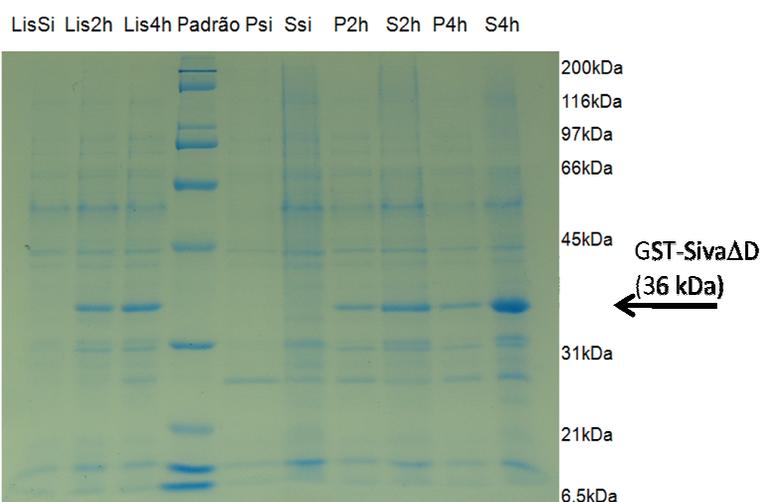


Figura 21. SDS-PAGE de indução do mutante de deleção do N-terminal da proteína SIVA1 subclonada em vetor de expressão pGEX-4T-2 com cauda de glutationa (GST) em linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pRARE. A proteína foi expressa (36kDa) como pode ser visto nas primeiras três colunas, as frações lisadas foram centrifugadas e separadas as porções solúvel e insolúvel, observa-se que a proteína induzida encontra-se distribuída nas frações solúvel e insolúvel. Para a porção solúvel foi estabelecido protocolo de purificação. (Lis=lisado, Si=sem indução, P=pelete, S=sobrenadante)

B) TESTES DE PURIFICAÇÃO

Os testes de purificação foram feitos em duas etapas conforme explicado nos métodos. As imagens apresentadas nas figuras 22 e 23 de afinidade e 24 de

filtração em gel, mostram o acompanhamento da purificação por leitura a 280 nm e SDS-PAGE, a fim de mesurar a pureza e o sucesso em cada etapa. A Figura 25 mostra um tratamento com anticorpo anti-SIVA1 de membrana de nitrocelulose, para o controle foi aplicado extrato de *E. coli* sem expressão de SIVA1.

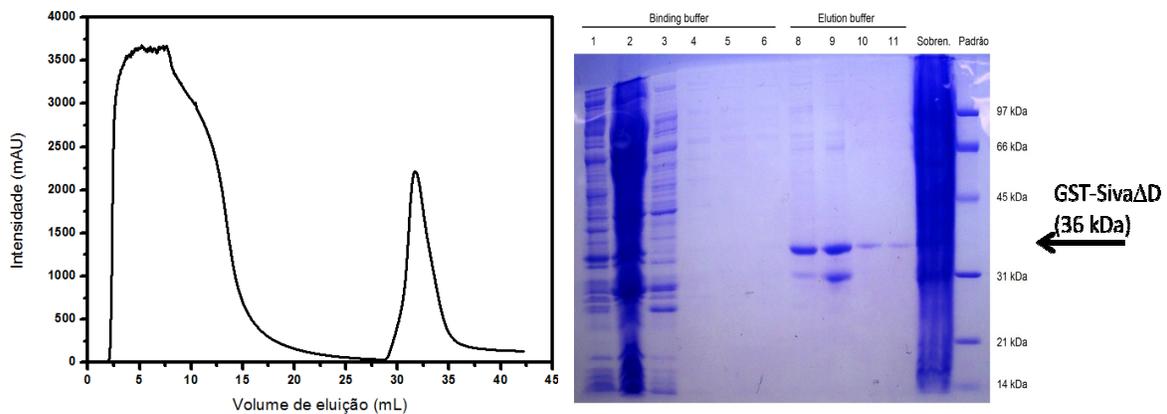


Figura 22. Purificação da proteína GST-SIVA Δ D em coluna GSTrap específica para proteínas fusionadas a glutationa. Purificação single step pode ser feita, no entanto observam-se algumas proteínas contaminantes da amostra, sendo portanto necessária uma outra etapa de purificação. Nesta purificação a clivagem com trombina foi feita em solução, após a purificação por afinidade.

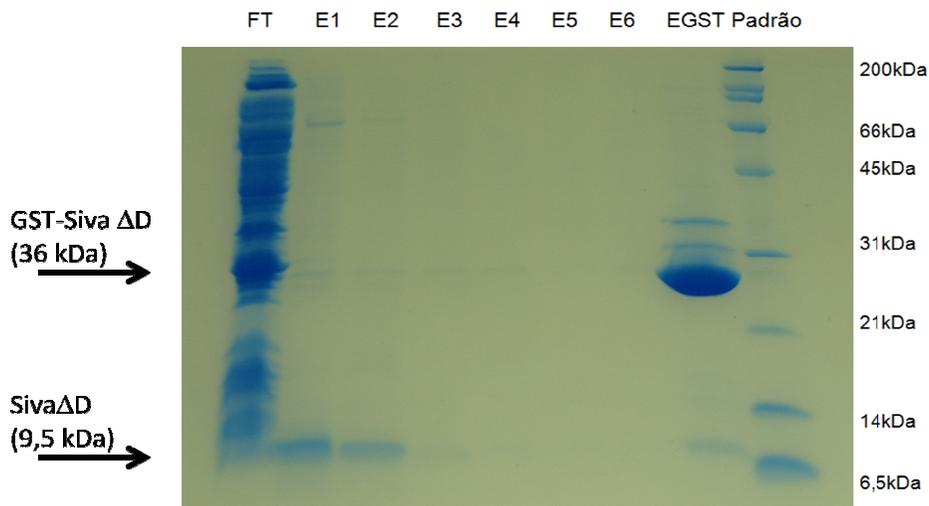
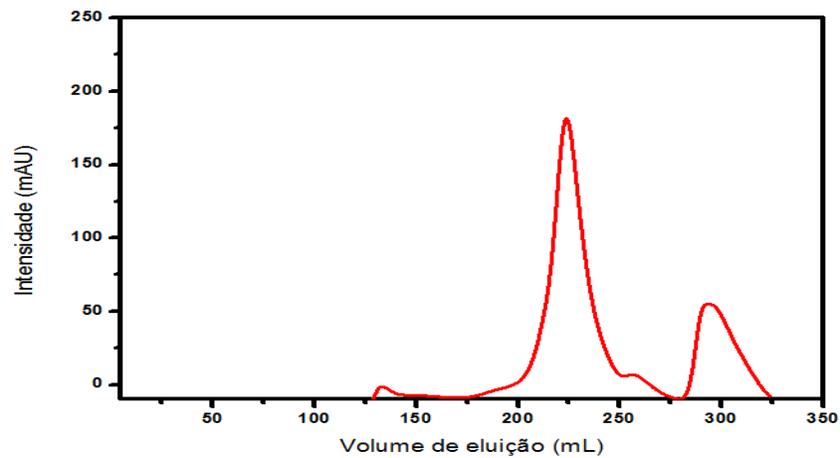


Figura 23. Purificação da proteína GST-SIVA Δ D em coluna GSTrap após cisão com trombina na coluna GSTrap FF. FT =lavado do extrato de proteínas, E1 a 6 eluições com tampão PBS da proteína Δ D (9,5kDa), EGST = eluição de GST com tampão contendo glutationa reduzida.

A)



B)

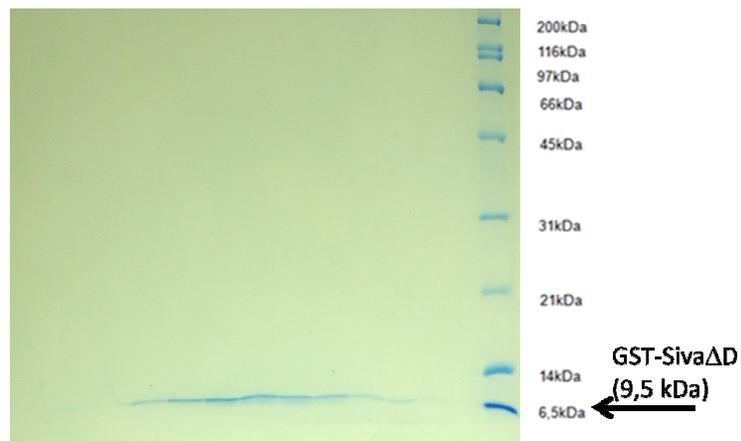


Figura 24. Segunda etapa de purificação. A) Cisão com trombina em solução por 3 horas logo antes da filtração em gel; B) SDS-PAGE 15% das frações coletadas no volume de eluição coletado dos picos,.

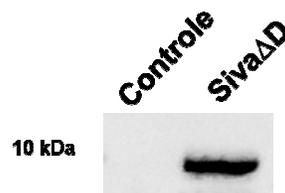


Figura 25. Western blotting de SIVAΔD. Membrana de nitrocelulose tratada com anticorpo anti-SIVA175 (FL-175 – Santa Cruz Biotechnology), controle feito com proteína sem SIVA.

C) TESTES DE CLIVAGEM DA PROTEÍNA GST-SIVAΔD COM TROMBINA

Foram feitos diversos testes para padronizar a clivagem com a trombina, tanto em solução como na coluna. No item purificação foram mostradas as melhores condições de cisão. Em solução utilizou-se a proporção de 3 unidades de trombina por mililitro e em coluna 8 unidades por mililitro.

D) ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNA (PULL-DOWN)

O ensaio de Pull-down é um método simples para testar interações físicas entre duas ou mais proteínas. SIVAΔD recombinante fusionada com GST foi purificada e verificou-se sua habilidade de ligar-se às proteínas naturalmente ligantes como CD27, CD4, OP18 e GITR a partir do lisado de Jurkat células-T. As proteínas ligantes foram analisadas por Western blot com o uso de anticorpos anti-CD4 anti-CD27, anti-OP18 e anti-GITR (Fig. 26). OP18 e GITR endógenos foram precipitados especificamente por GST-SIVAΔD, mas não pelo controle com GST, no entanto, o CD27 bem como o CD4 precipitaram de forma não específica. Mostrando, desta forma, que mesmo após expressão heteróloga a proteína mantém suas propriedades funcionais.

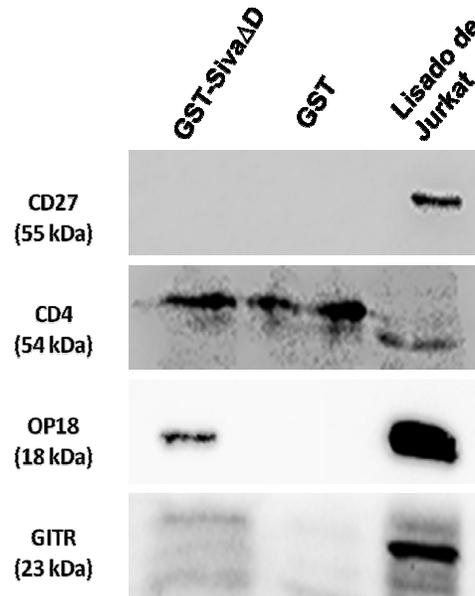


Figura 26. Ensaio de interação do domínio rico em cisteínas de SIVA1 foi com CD27, CD4, OP18, e GITR. A figura mostra o ensaio de pull-down realizado. Extrato do lisado de Jurkat foi incubado com a proteína heteróloga purificada, a imobilização foi feita com beads de GST- sefarose. Os ligantes foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por Western-blot

4.3. ENSAIOS ESPECTROSCÓPICOS

GST-SIVA1: Dicroísmo Circular e Fluorescência

A proteína obtida pós resolubilização e purificada em etapas de afinidade e filtração em gel foi submetida a espectro de dicroísmo circular e leitura de fluorescência do triptofano. As figuras 27 e 28 mostram o espectro das proteínas GST-SIVA1 e GST, respectivamente. A figura 29 mostra a proteína GST-SIVA1 recuperada (curva preta), e a mesma com adição do agente caotrópico ureia 8M (curva vermelha).

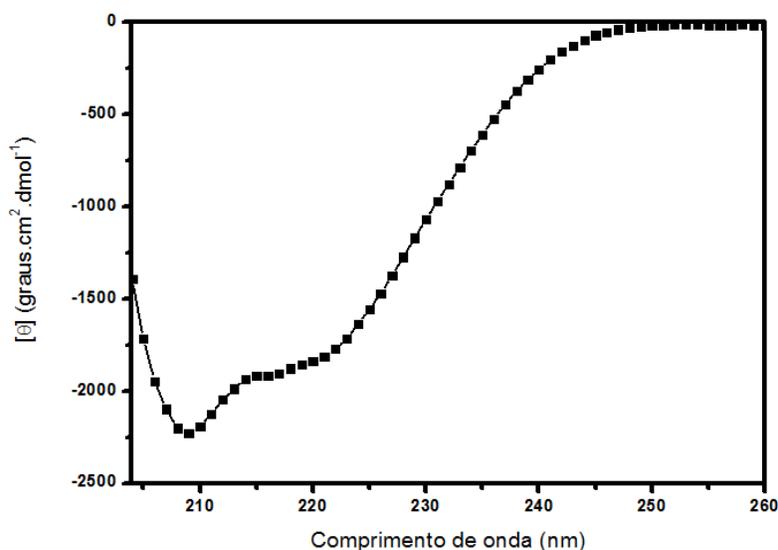


Figura 27. Espectro de dicroísmo circular da proteína GST-SIVA1 após resolubilização em tampão PBS, sem ação da trombina, uma vez que esta corta a proteína em sítios inespecíficos causando degradação (verificado por SDS-PAGE corado com azul brilhante de Comassie e Western Blotting). O espectro mostra a proteína com característica predominante de alfa-hélices (vales em 222 nm e 207 nm).

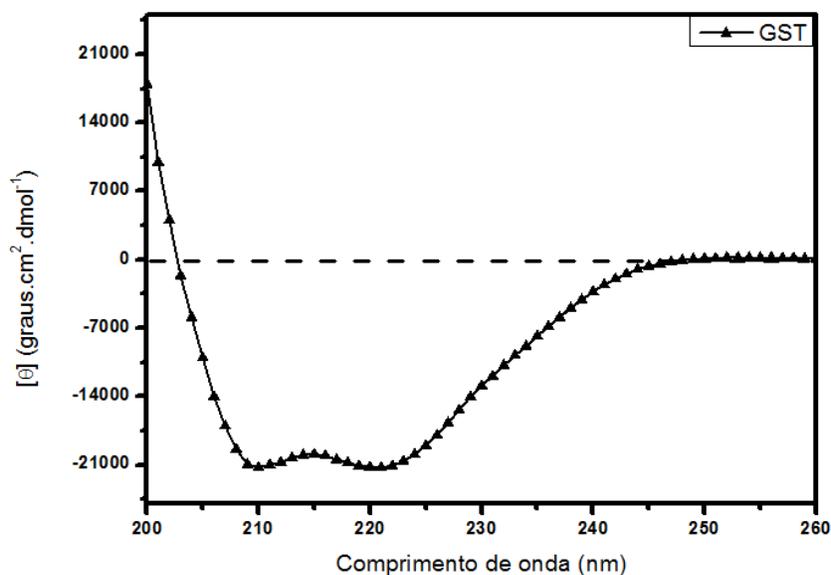


Figura 28. Dicroísmo circular da proteína GST após clivagem com trombina e purificação em duas etapas.

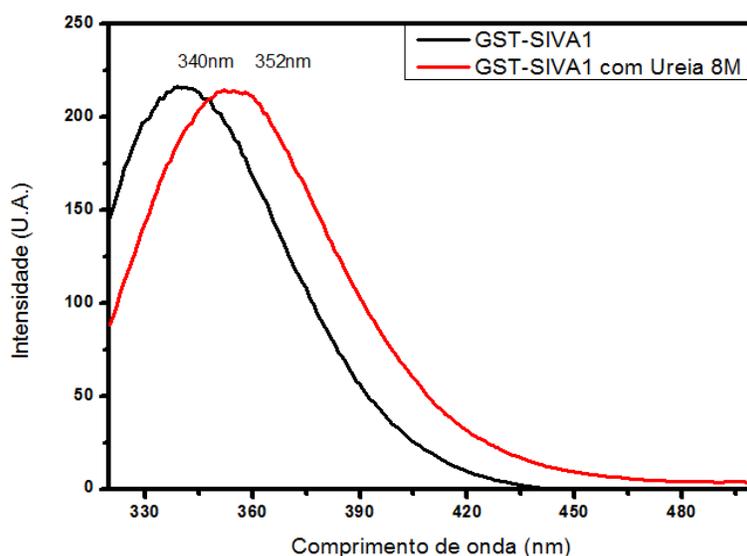


Figura 29. Fluorescência, excitação em 295nm e emissão de 320 a 500nm. Em preto GST-SIVA Δ D em tampão fosfato e em vermelho em tampão fosfato com 8M de ureia. O centro de massa calculado para cada um dos picos foi de 340,3nm (GST-SIVA Δ D em tampão PBS) e 353,1nm (GST-SIVA Δ D em tampão com ureia).

A solução de proteína purificada apresentava coloração alaranjada, com espectro de absorção com pico na região de 410 nm (Figura 30). Supõe-se que

referida solução possui tal coloração devido a grande quantidade de cisteínas presentes.

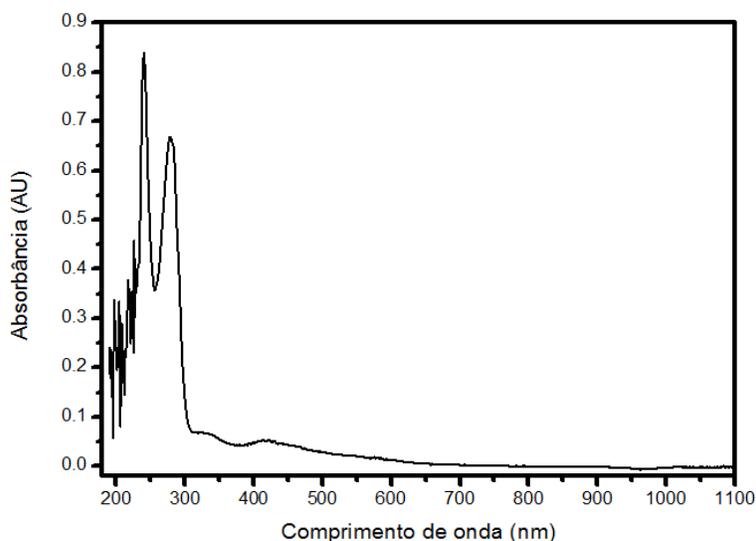


Figura 30. Espectro de Absorção da amostra GST-SIVA1 mostrando um pico na região de 410nm correspondente à coloração alaranjada que a solução de proteína purificada apresenta

SIVA Δ D purificada: Dicroísmo Circular e Fluorescência

A proteína obtida após purificação em etapas de afinidade e filtração em gel foi submetida a espectro de dicroísmo circular e leitura de fluorescência do triptofano. A Figura 31 mostra espectro com dados brutos da proteína SIVA Δ D. Como a proteína apresenta região rica em cisteínas, foi feito um teste adicionando-se DTT nas concentrações de 0,1 a 10 mmol/dm³ a fim de verificar se a adição de um agente redutor de ligações dissulfeto alteraria o espectro a proteína (figura 32). Espectros de fluorescência também estão demonstrados na figura 33A que mostra o perfil de emissão da proteína sem DTT e na figura 33B com adição de DTT na solução em que se encontrava a proteína.

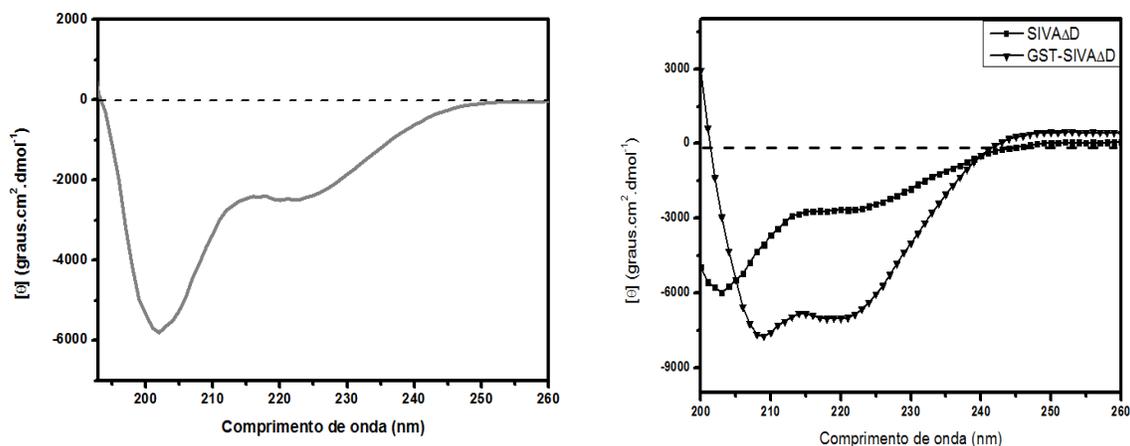


Figura 31. Dicroísmo circular da amostra mutante SIVA Δ D em tampão fosfato (PBS) da amostra purificada como acima descrito, em duas etapas. O espectro apresenta um vale na região entre 200 e 205 nm, o que indica a presença predominante de regiões de enovelamento randômico. A imagem à direita indica um espectro sobreposto da proteína SIVA Δ D purificada e SIVA Δ D fusionada à GST purificada.

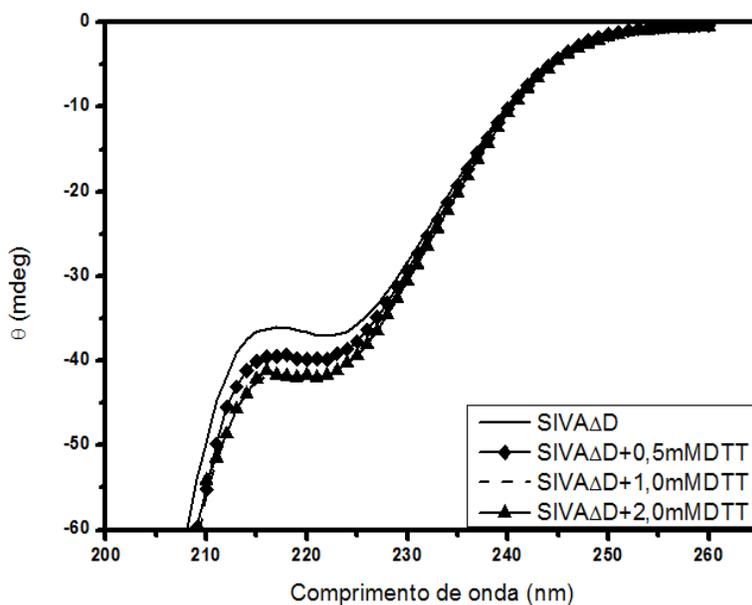
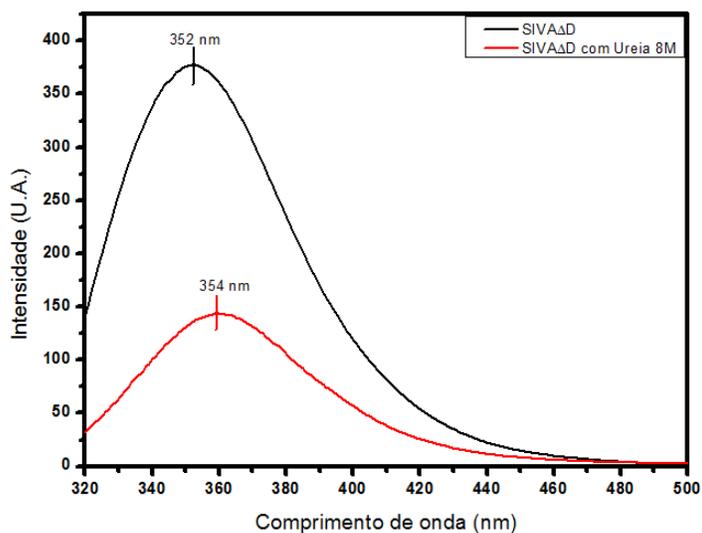


Figura 32. Teste de sinal de dicroísmo circular da amostra mutante SIVA Δ D em tampão fosfato (PBS) adicionado de concentrações de DTT variando de 0,5 a 2,0 mmol/dm³ (mM) conforme mostrado na legenda. Os respectivos tampões foram descontados como branco. Neste experimento pode-se visualizar que a adição de um agente redutor não alterou significativamente a região próxima a de 220 nm do espectro de dicroísmo, mesmo a proteína apresentando região rica em cisteínas.

A)



B)

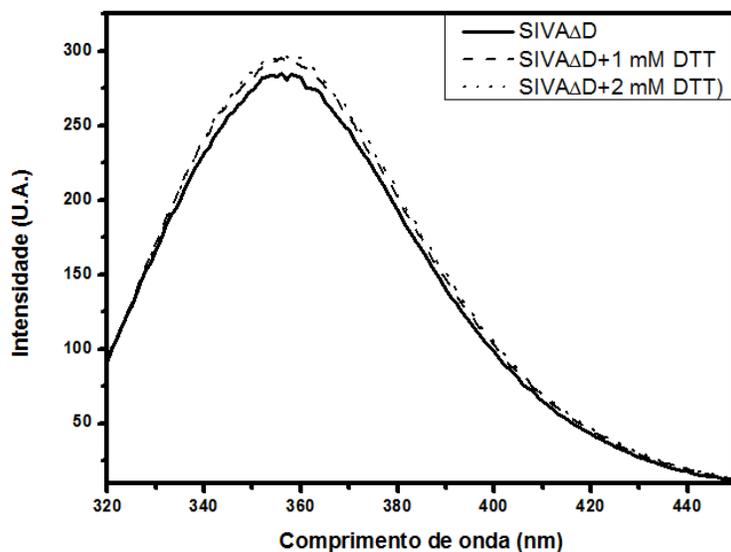


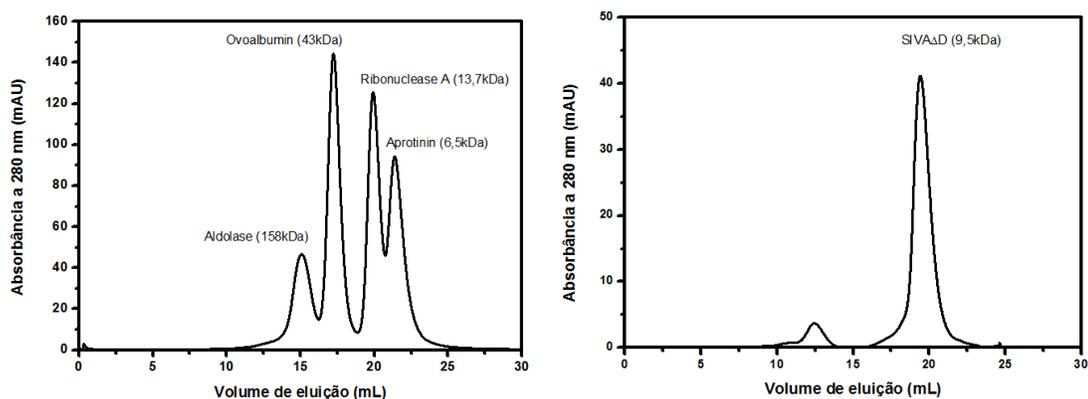
Figura 33. Fluorescência, excitação em 295 nm e emissão de 320 a 500 nm. A) Em preto SIVA Δ D em tampão fosfato e em vermelho em tampão fosfato com 8M de ureia. O centro de massa calculado para cada um dos picos foi de 356,5nm (em PBS) e 355,0nm (em ureia). B) Emissão da proteína com adição de diferentes concentrações de DTT na solução de proteína purificada.

4.4. ENSAIOS HIDRODINÂMICOS EM SIVAΔD

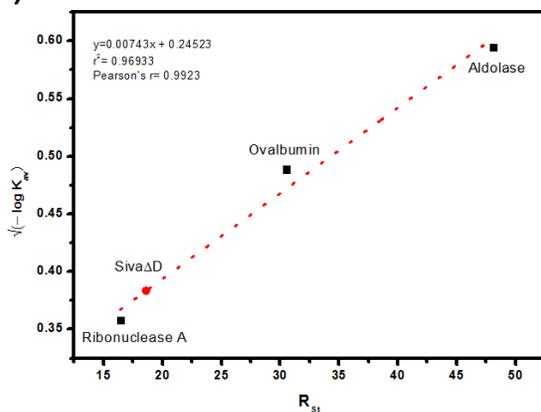
A) FILTRAÇÃO EM GEL ANALÍTICA

A proteína SIVAΔD foi coletada após filtração em gel e logo em seguida concentrada em tubos Amicon até que atingisse 1mg/mL. Utilizando coluna analítica de 24 mL, foram feitas três corridas a fim de calcular o Kav da proteína, Figura 34. Aldolase (48.1 Å), (b) Ovoalbumin (30.5 Å), (c) Ribonuclease A (16.4 Å).

A)



B)



| Proteína | PM (kDa) | Vel |
|----------------|----------|------------|
| Aprotinin | 6,5 | 21,29±0,14 |
| Ribonuclease A | 13,7 | 19,86±0,09 |
| Ovoalbumin | 43,0 | 17,26±0,04 |
| Aldolase | 158,0 | 15,12±0,06 |
| SIVAΔD | 9,5 | 19,50±0,13 |

Figura 34. A) Filtração em Gel Analítica em coluna de 24mL. Esta imagem mostra à esquerda a corrida dos padrões e à direita a corrida de SIVAΔD. B) Cálculos feitos a partir do volume de eluição da proteína e de padrões. No gráfico são mostrados os parâmetros calculados para a reta e a partir do Kav e em vermelho o ponto em que se encontra o valor do raio de Stokes (R_{St}) calculado para o mutante SIVAΔD com base nos padrões

B) SEC-MALS (Size Exclusion Chromatography with inline Multi-Angle Light Scattering)

Este equipamento tem por medida direta o peso molecular da proteína. A medida feita em espalhamento de luz por três ângulos distintos faz a leitura e calcula o peso de acordo com o parâmetro matemático desejado, levando-se em consideração um modelo globular, cilíndrico, etc. A concentração necessária de proteína é a mesma ou maior que a da CEMA do item anterior, uma vez que os equipamentos do SEC-MALS está conectado com o FPLC pela coluna analítica. Resultado obtido no SEC-MALS para amostra com concentração próxima de 3 mg/mL mostra um perfil de espalhamento típico de agregados (em baixo volume de eluição). Abaixo, a Tabela 5 mostra a massa calculada a partir dos cálculos do ASTRA, massa esperada de 9,5kDa para o mutante.

Tabela 5. Resultados obtidos após tratamento dos dados obtidos no SEC-MALS pelo programa ASTRA do próprio fabricante. Abaixo é mostrado o resultado de uma medida, mas outras já foram feitas e o resultado se mostrou reproduzível.

| | |
|----------------------------|---------------------------------|
| Massa calculada (ug) | 574,54 |
| Molar mass moments (g/mol) | |
| Mn | 9,700×10 ³ (±0,167%) |
| Mp | 9,953×10 ³ (±0,085%) |
| Mw | 9,961×10 ³ (±0,149%) |
| Mz | 1,025×10 ⁴ (±0,329%) |
| Mz+1 | 1,061×10 ⁴ (±0,514%) |
| M(avg) | 9,978×10 ³ (±0,004%) |
| Polydispersity | |
| Mw/Mn | 1,027 (±0,224%) |
| Mz/Mn | 1,057 (±0,369%) |

C) ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA

Abaixo é mostrado o gráfico e as condições aplicadas para o experimento de equilíbrio de sedimentação; foram eleitas quatro velocidades e a proteína foi deixada a vácuo centrifugando pelo número de horas relacionado na Tabela 6, as leituras a 280nm foram feitas em triplicata de cada uma das celas. A Figura 35 mostra o gráfico obtido nas leituras de amostra com concentração de 98,6 μ M (0,94mg/mL).

Tabela 6. Velocidades de sedimentação feitas no experimento de ultracentrifugação analítica de equilíbrio.

| Velocidade (rpm) | Tempo (h) | Leituras |
|------------------|-----------|----------|
| 7000 | 0 | 1 |
| | 9 | 3 |
| | 2 | 3 |
| | 2 | 3 |
| 9000 | 6 | 3 |
| | 2 | 3 |
| | 2 | 3 |
| 11000 | 6 | 3 |
| | 2 | 3 |
| | 2 | 3 |
| 13000 | 6 | 3 |
| | 2 | 3 |
| | 2 | 3 |

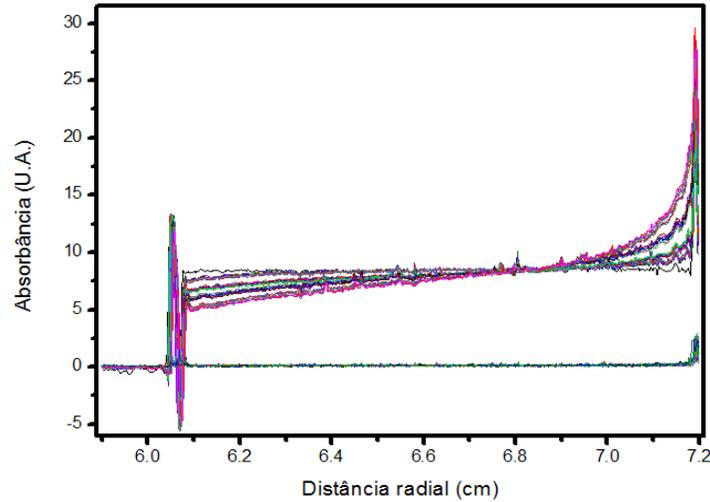


Figura 35. Leituras a 280nm feitas na celas contendo proteína purificada SIVA Δ D com tempos e número de leituras conforme tabela 5. Em 0 linha de base feita com o tampão fosfato da proteína

Um experimento de velocidade foi feito para encontrar o coeficiente de sedimentação da proteína analisada. Foram feitas repetições em três concentrações de proteína, e o resultado pode ser visto na Figura 36.

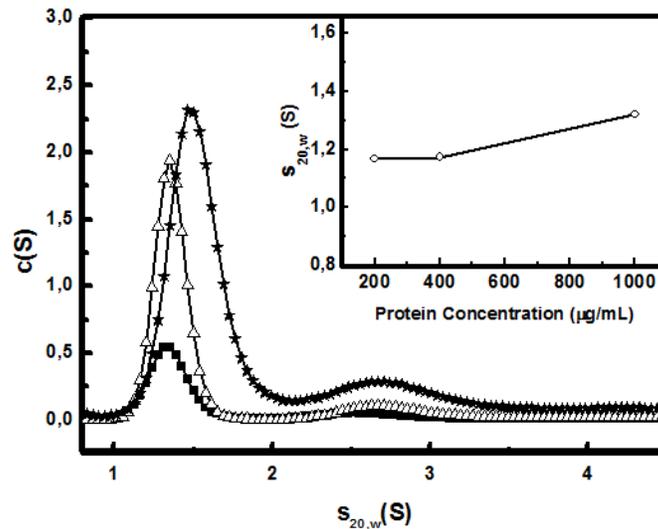


Figura 36. Velocidade de sedimentação em Ultracentrifugação Analítica, realizado com a proteína SIVA Δ D em três concentrações: 0,2 mg/mL (quadrados), 0,4 mg/mL (triângulos), e 1,0 mg/mL (estrelas) em PBS. A figura apresenta a distribuição $c(S)$. Em menores concentrações o perfil de sedimentação apresenta-se em apenas uma espécie, no entanto, em maiores concentrações um novo perfil entre 2,5 e 3,0 S surge, sugerindo a presença de outra espécie com maior massa molecular aparente, mas em concentrações muito inferiores. Gráfico superior: dependência do $s_{20,w}$ como função da concentração de proteínas

D) DLS (Dynamic Light Scattering)

A polidispersidade e o coeficiente de difusão da amostra foram medidos por espalhamento dinâmico de luz. A proteína, por ser de baixo peso molecular, apresentou problemas para a leitura, uma vez que espalha muito pouco a luz. A Figura 37, mostra o perfil obtido. Considerando a proteína globular pela fórmula abaixo calcula-se que o raio de Stokes teórico desta esfera seria de 1,4 nm. O valor do coeficiente de difusão medido foi de $9.7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, valor próximo do calculado teoricamente, de $1,23 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

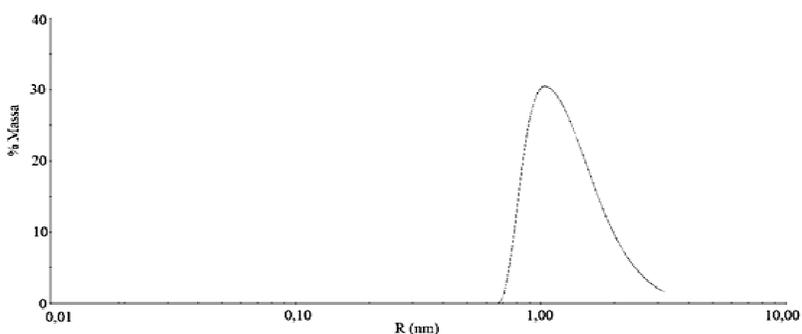


Figura 37. Gráfico mostrando presença de apenas uma forma na solução (monodispersa)

E) SAXS

Foram feitas coletas de concentrações variando de 1,0 a 3,0 mg/mL de proteína SIVA Δ D purificada. Abaixo são mostrados resultados de curvas recolhidas, Tabela 7, os dados, conforme mencionado, foram tratados no software ATSAS. A curva $p(R)$, que é um histograma da distribuição dos vetores de distância, Figura 38, encontra-se deslocada para a esquerda. Portanto, os vetores de comprimento menores apresentam maior número do que os vetores de comprimentos maiores desta forma; corroborando os resultados de que a proteína apresenta perfil alongado.

Tabela 7. Dados obtidos da curva de Guinier a partir dos dados integrados da imagem do espalhamento de raios X

| Conc. Prot. | Auto Rg ^a | Auto I ₀ ^a | Dmáx ^a | Rg calculado ^b |
|-------------|----------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------------|
| 1,3 mg/mL | 4,1 ± 0,4 | 0,06 ± 0,01 | 11,8 ± 0,1 | 4,3 ± 0,1 |
| 2,1 mg/mL | 2,9 ± 0,2 | 0,04 ± 0,01 | 9,5 ± 0,8 | 3,0 ± 0,2 |
| 3,0 mg/mL | 3,5 ± 0,2 | 0,20 ± 0,01 | 12,3 ± 0,1 | 3,4 ± 0,1 |

^a Dados calculados automaticamente pelo software ATSAS

^b Dados calculados a partir do software ATSAS, variando manualmente os pontos de corte, preservando a correlação $s \cdot R_g < 1,3$

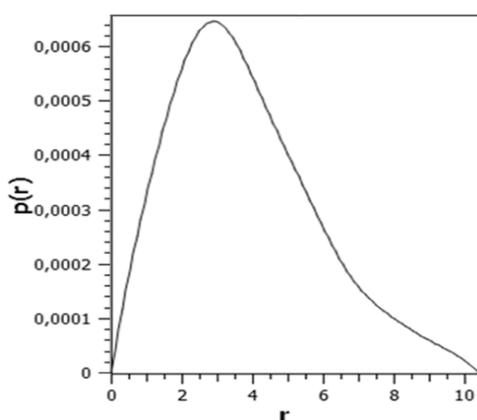


Figura 38. Gráfico mostrando representa a curva da distribuição de vetores de distância $p(R)$ para a proteína SIVA Δ D. Observamos que o pico está deslocado à esquerda, no sentido de menores distâncias.

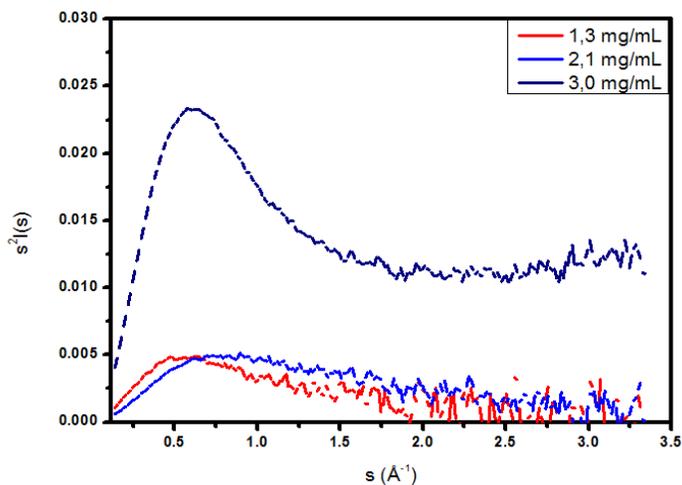


Figura 39. Kratky Plot, demonstrando o estado conformacional, padrão sugestivo de proteína parcialmente desenovelada.

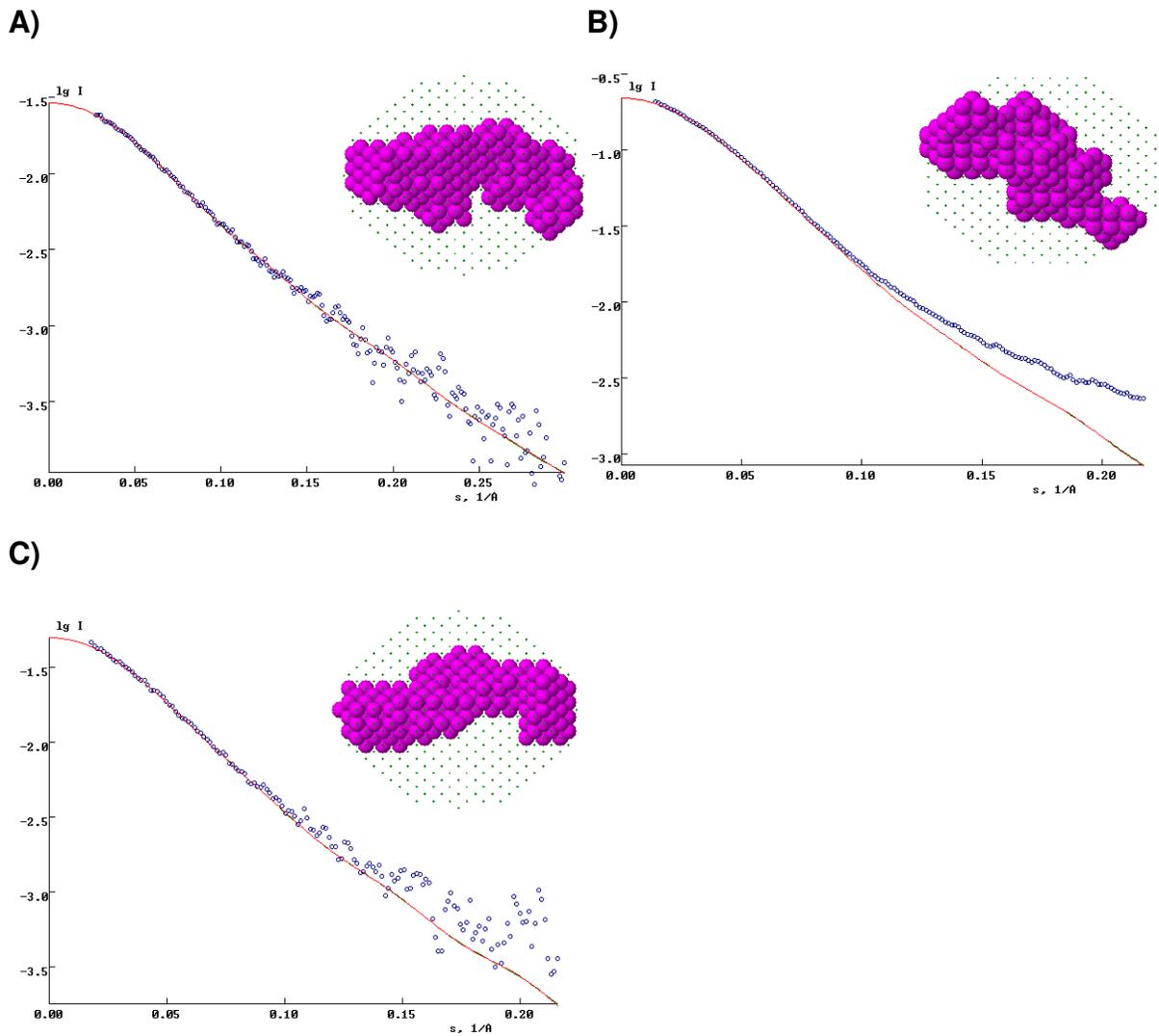


Figura 40. Resultados da curva do espalhamento e do modelo do pontos gerado pelo Dammin para as concentrações de 1,3; 2,1 e 3,0 mg/mL. A) 1,3 mg/mL B) 2,1 mg/mL e 3) 3,0 mg/mL

Tabela 8. Resumo dos parâmetros hidrodinâmicos e espectroscópicos calculados e experimentais de SIVAΔD

| Técnica | Propriedade | SIVAΔD |
|---------------|--|----------------------|
| Predição | Aminoácidos | 92 |
| | MM (kDa) | 9.5 |
| | Ext. coeff. ($M^{-1}cm^{-1}$) ^a | 7740 |
| | Ro (A) | 13.9 |
| | Vbar (mL/g) | 0.718 |
| | D (cm^2/s) | $1.23 \cdot 10^{-6}$ |
| Fluorescência | y _{max} (nm) | 356 |
| | <y> (nm) | 359 |
| DLS | D (cm^2/s) | $9.7 \cdot 10^{-7}$ |
| CEMA | Rs (A) | 18.6 |
| | f/f _o | 1.33 |
| UCA | s _{20,w} (S) | 1.23 |
| | f/f _o ^b | 1.5 |
| | MM (kDa) | 11 |

^a Coeficiente de extinção a 280 nm, Protparam

^b Obtido por SedFit

5. DISCUSSÃO

O objetivo central deste projeto foi avaliar parâmetros bioquímicos e biofísicos da proteína SIVA1. Após vários ensaios observamos que o melhor método de expressão foi em *Escherichia coli*, principal organismo usado pelos laboratórios para obtenção de proteínas heterólogas. De fato, segundo o banco de dados de proteínas (PDB) aproximadamente 85% das proteínas com estrutura ali depositadas foram obtidas a partir do sistema de expressão em *E. coli* [26]. O estudo de proteínas ainda é um desafio, pois nem todas são solúveis nas condições laboratoriais ou aptas a estudos estruturais. Muitas apresentam problemas de expressão e não são expressas fora de seu ambiente natural, como por exemplo, proteínas que precisam passar por transformações pós-traducionais a fim de estabilizarem-se, ou ainda aquelas que somente adquirem conformação e estabilidade quando associadas a outras proteínas ou ligantes. Pode-se dizer, então, que no estudo de estrutura de proteínas há um funil e diversos candidatos potenciais podem ficar retidos em alguma etapa; poucas são as proteínas que conseguem satisfatoriamente ser resolvidas com técnicas como cristalografia ou ressonância magnética nuclear. No presente estudo avaliamos diversas condições de expressão para a proteína SIVA1, no entanto esta se apresentou insolúvel, ou seja, foi expressa em corpos de inclusão.

Em face deste resultado optamos por realizar estudos em mutantes de deleção desta proteína e em paralelo aplicar técnicas de reenovelamento na proteína insolúvel. Tínhamos disponíveis dois clones da variante selvagem: a His-SIVA1 e a GST-SIVA1, que foram expressas com sucesso, porém em corpos de inclusão (Figuras 10 e 11 e Tabelas 2 e 4). Em ambos os casos, foram aplicados testes com aditivos em meio de cultura a fim de tentar levar ao menos parte da proteína para a fração solúvel. No entanto, como isto não foi possível, optamos por realizar testes de solubilização com agentes caotrópicos e em seguida o reenovelamento (Figura 12 e Tabela 3). A técnica funcionou bem para a GST-SIVA1, sendo possível uma recuperação inicial de proteína, no entanto esta

proteína apresentou problemas de purificação, uma vez que a maior parte apresentou-se na forma de agregado solúvel e apenas uma pequena porção de proteína conseguiu ser usada para estudos posteriores. Nos estudos de clivagem com trombina observou-se que a enzima cinde a porção SIVA1 em regiões inespecíficas, levando à sua degradação, e, portanto, impossível a digestão da cauda de glutathione-S-transferase (GST). Com as proteínas fusionadas realizou-se a purificação em duas etapas (afinidade Figura 15-16 e filtração em gel Figura 17); nos testes de purificação por troca iônica a proteína não se ligava especificamente às sílicas (catiônica ou aniônica). Em seguida foram feitos estudos de dicroísmo circular e fluorescência (Figuras 27-29). O espectro de dicroísmo circular mostrou perfil de alfa-hélices, característico da glutathione-S-transferase e uma região pronunciada abaixo de 210 nm sugerindo que a ressolubilização da proteína após a aplicação de agentes caotrópicos poderia ter sido resultado do reenovelamento da GST e não necessariamente da SIVA1 fusionada. Como não foi possível cisar as proteínas com trombina não podemos concluir que o método foi eficaz para recuperar o enovelamento de SIVA1.

Iniciou-se também o trabalho com a proteína selvagem, SIVA1, clonada em vetor de expressão pET28-a que possui cauda de poli-histidina. A cauda de baixo peso molecular possibilitaria estudos sem sua remoção em um primeiro momento. No entanto, os protocolos testados de ressolubilização após a adição dos agentes caotrópicos não produziu proteína viável. Desta forma, prosseguiu-se aos estudos dos mutantes; tínhamos disponíveis duas variantes subclonadas em vetor pGEX4T-2, um com deleção da região C-terminal (GST-SIVA Δ C) e um com deleção da região N-terminal (GST-SIVA Δ D), Figura 4. Foram feitos os testes de expressão em GST-SIVA Δ C que se apresentou insolúvel, algumas condições de ressolubilização foram aplicadas sem sucesso, portanto seu estudo foi deixado para oportunidade futura.

Outra proteína mutante estudada foi a GST-SIVA Δ D. Este mutante apresentou-se solúvel (Figura 21), no qual, foram então feitos testes de purificação. Em um primeiro momento, foi realizada a afinidade em coluna

GSTrap, que apresentou rendimento muito bom (Figura 23), e à proteína purificada da primeira etapa foi feito tratamento com trombina, para cisão da cauda. A segunda etapa de purificação, a filtração em gel em coluna de 320 mL, (Figuras 22 e 24) não mostrou resolução eficaz para separação das frações SIVA Δ D (9,5 kDa) da GST (26 kDa). Desta forma, optou-se por realizar a cisão da cauda, após lavagens, em coluna de afinidade, com a cauda ligada à coluna. A purificação com clivagem na coluna gera perdas de rendimento e consome uma quantidade significativamente maior de trombina, no entanto funcionou bem para purificação, uma vez que obtivemos pureza acima de 95% (Tabela 9) depois de concluídas as duas etapas.

Os dados do ensaio de precipitação demonstram que SIVA Δ D pôde interagir quimicamente com ligantes naturais, mesmo após a expressão heteróloga e após os processos de purificação. A inabilidade de detecção de algumas interações pode decorrer de uma série de fatores, tais quais: obstrução do sítio por agentes inespecíficos, o rendimento das proteínas relevantes no extrato, ou a presença de modificações pós-traducionais que não estão presentes em proteínas recombinantes expressas em *E. Coli*.

Os estudos de dicroísmo circular mostram que a proteína apresenta porção randômica significativa. Os cálculos normatizados de deconvolução do espectro de dicroísmo circular, junto com a predição de estrutura secundária do I-Tasser, estimaram de 15-20% de estrutura em alfa-hélice, 17-30% de folhas beta e 45-60% de randômica. A fluorescência do triptofano não apresentou diferença significativa do pico ou do centro de massa quando coletados espectros de emissão da proteína em tampão PBS ou na presença de agentes caotrópicos, indicando que o único triptofano presente na estrutura esteja exposto. A predição computacional tem o potencial de guiar a interpretação dos resultados experimentais, portanto, observando as Figuras 6C e 6E, verificamos que a proteína apresenta uma grande região do tipo randômica e que o triptofano está exposto, portanto corroborando com os resultados observados experimentalmente. Foi feito ainda um teste com adição de DTT ao tampão PBS,

a fim de verificar possíveis alterações do perfil dos espectros de dicroísmo ou de emissão de fluorescência pela presença de pontes dissulfeto, uma vez que esta pequena proteína de 9,5 kDa apresenta 13 cisteínas, porém, nenhuma alteração significativa foi observada.

Outros estudos foram realizados com o mutante SIVA Δ D, a CEMA que mede indiretamente o Raio de Stokes da proteína por meio do volume de eluição da amostra quando comparado com padrões de proteínas globulares de R_{St} já conhecidos. A proteína SIVA Δ D apresentou raio de Stokes com valor próximo ao da Ribonuclease A (6,5 kDa), conforme visto na Figura 34. O coeficiente de Pearson da reta de correlação está indicado é de 0,9923 e o r^2 da reta é 0,969, validando o resultado de forma satisfatória. Acoplada à coluna temos o SEC-MALS, que mede diretamente o peso molecular da proteína. Após tratamento dos dados obtivemos a aproximação pelo modelo globular com massa estimada de 9,96 kDa; valor próximo ao teórico calculado pelo software online Protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>), Tabela 1.

No espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi possível medir o Raio hidrodinâmico da proteína a partir do coeficiente de difusão, Figura 37. Comparando com o raio teórico de uma esfera perfeita (1,4 nm), chegamos a um valor medido próximo de $1,9 \pm 0,3$ nm.

Experimentos hidrodinâmicos podem ser comparados com os resultados de cálculos teóricos, tal como a previsão de raio de Stokes, quando assumimos um formato globular para uma proteína de massa molecular semelhante, que representa o raio hipotético de uma esfera não hidratada que se difunde com a mesma velocidade [33]. O cálculo teórico do raio de Stokes para SIVA Δ D foi de 14 Å, valor menor do que o experimental (18,6Å), indicando que a proteína tenha uma forma não-globular; como esperado para uma proteína com estrutura predominante randômica. Além disso, o coeficiente de fricção teórico (f_0) pode ser calculado e comparado com o coeficiente de fricção f experimental, a fim de determinar o fator de Perrin (razão f/f_0) que é um dado informativo do formato aproximado da partícula [34]. O fator de Perrin para SIVA Δ D foi de

aproximadamente 1,33 (Tabela 8); um valor ligeiramente maior do que 1,0 indica que a proteína é uma esfera, uma vez que f_0 considera uma esfera não hidratada, o que não é o caso para as proteínas. O fator de Perrin encontrado , aproximadamente 1,3, indica que a proteína não segue o padrão clássico globular.

O experimento de velocidade de sedimentação foi usado para avaliar estado de oligomerização e o fator de Perrin de SIVA Δ D. O coeficiente de sedimentação (s) experimental foi retirado do valor máximo do pico da curva c(S). O V_{bar} utilizado para os cálculos (0,718 mL/g) foi obtido pelo Sednterp (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>) e os parâmetros $s_{20,w}$ pelo SedFit. O fator de Perrin calculado para este método foi de $1,5 \pm 0,1$, o qual está de acordo com os dados de DLS e CEMA.

Deste modo, os elementos coligidos mostraram que o mutante C-terminal da proteína humana SIVA1, que apresenta 92 resíduos, pôde ser expressa em organismo heterólogo e purificada em laboratório. Possui estrutura secundária predominante do tipo randômica, com seu triptofano exposto e em altas concentrações sua tendência é a formação de agregados solúveis. E em solução, apresenta comportamento monodisperso e seu envelope em formato alongado; não tendo sido encontradas evidências de que possa formar oligômeros na região estudada.

6. CONCLUSÕES

A proteína SIVA1 apresentou-se como agregados insolúveis nas condições testadas, após estudos de renovelamento foram escolhidos mutantes com perfil solúvel a fim de estudar propriedades seus domínios de forma independente. Desta forma, foram mostrados estudos bioquímicos e biofísicos de caracterização do C-terminal de SIVA1, uma proteína pró-apoptótica envolvida em diversas vias de sinalização relacionadas a leucemia e a outros tipos de câncer. A partir da investigação de sua estrutura esperamos entender melhor os mecanismos de ação e de interação de SIVA1 no ambiente intracelular.

Proteínas não são entidades rígidas, baseado no conhecimento prévio da gama de atuação da proteína SIVA1 no sistema biológico, já era esperado que os resultados encontrados indicassem uma região flexível e não estruturada (desordenada) para o seu C-terminal. Algumas interações de SIVA1 foram descritas na literatura [35] como resultado da formação de oligômeros; esta propriedade, no entanto, não foi observada nos estudos realizados com o seu C-terminal. A partir dos resultados hidrodinâmicos e espectroscópicos, podemos concluir que o C-terminal de SIVA1 apresenta, em solução, características de monodispersidade e semelhança à de proteínas globulares. Muito embora os dados de SAXS e fator de Perrin indiquem se tratar de uma proteína com perfil alongado.

Ressalva-se aqui a importância da aplicação de diversas técnicas, a fim de corroborar e validar os resultados estimados experimentalmente dos parâmetros biofísicos e propriedade das proteínas.

7. REFERÊNCIAS

- 1) Krauss, G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, 3rd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
- 2) Elsayed, Y. A; Sausville, E. A. Selected novel anticancer treatments targeting cell signalling proteins. *The Oncologist* 2001, 6, 517-537.
- 3) Zago, M. A., Falcão, R. P., Pasquini, R. Hematologia: Fundamentos e Prática. 1ª ed., São Paulo, 2005.
- 4) Estey, E.; Döhner, H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet* 2006, 368(9550): 1894-1907.
- 5) Chen, J.; McMillan, N. A. J. Multiple signal pathways in the leukemogenesis and therapeutic implications. *Leukemia Research* 2007, 31, 1759-1760.
- 6) Prasad KV, Ao Z, Yoon Y et al (1997) CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to SIVA, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6346–6351
- 7) Spinicelli S, Nocentini G, Ronchetti S, Krausz LT, Bianchini R, Riccardi C (2002) GITR interacts with the pro-apoptotic protein SIVA and induces apoptosis. *Cell Death Differ* 9:1382–1384
- 8) Yide, M.; Mian, W. Multifaceted functions of SIVA-1: more than an Indian God of Destruction. *Protein Cell* 2012, 3(2): 117–122. DOI 10.1007/s13238-012-2018-5
- 9) Py, B.; Slomianny, C.; Auberger, P.; Petit, P. X.; Benichou, S. SIVA-1 and an alternative splice form lacking the death domain, SIVA-2, similarly induce apoptosis in T lymphocytes via a caspase-dependent mitochondrial pathway. *J. Immunol.* 2004, 172, 4008-4017.
- 10) Du, W.; Jiang, P.; Li, N.; Mei, Y., Wang, X.; Wen, L.; Yang, X. e Wu, M. Suppression of p53 activity by SIVA1. *Cell Death Differ.* 2009, 16, 1493-1504.
- 11) Horn, H. F.; Vousden, K. H. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 2007, 26, 1306-1316.
- 12) Du, W.; Jiang, P.; Li, N.; Mei, Y., Wang, X.; Wen, L.; Yang, X. e Wu, M. Suppression of p53 activity by SIVA1. *Cell Death Differ.* 2009, 16, 1493-1504.
- 13) Sugito, S.; Yamato, K.; Sameshima, Y.; Yokota, J.; Yano, S.; Miyoshi, I. Adult T-cell leukemia: Structures and expression of p53 gene. *Int. J. Cancer* 1991, 49, 880-885.

- 14) Gaidano, G.; Ballerini, P.; Gong, J. Z.; Inghirami, G.; Neri, A.; Newcomb, E. W.; Magrath, I. T.; Knowles, D. M.; Dalla-Favera, R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991, 88, 5413-5417.
- 15) Saha, M. N.; Micallef, J.; Qiu, L.; Chang, H. Pharmacological activation of the p53 pathway in haematological malignancies. *J. Clin. Pathol.* 2010, 63, 204-209.
- 16) Introduction to Protein Structure, 2nd Ed. 1998. Carl-Ivar Branden & John Tooze. Published by Garland Publishing, Inc.
- 17) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- 18) Correa, D.H.A.; Ramos, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African J. Biochem. Res.* 2009, 3, 164-173.
- 19) Heyduk, E.; Baichoo, N.; Heyduk, T. Interaction of the alpha-subunit of Escherichia coli RNA polymerase with DNA: rigid body nature of the protein-DNA contact. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 44598-44603.
- 20) Principles of Fluorescence Spectroscopy, Joseph R. Lakowicz, 3rd ed. Page 65, 530
- 21) Borges, J.C.; Ramos, C.H.I. (2010). Analysis of molecular targets of Mycobacterium tuberculosis by analytical ultracentrifugation. *Current Medicinal Chemistry. Aceito para publicação.*
- 22) Fundamentos de Química Analítica - West, Donald M.; Holler, F. James; Skoog, Douglas A.
- 23) Pace, C. N.; Schmid, F. X. How to determine the molar absorbance coefficient of a protein. In: Protein structure, a practical approach. Creighton, T. E. 2nd edition. IRL Press. New York, 1997, p. 253-259.
- 24) Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 3389-3402.
- 25) (a) Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010, 5, 725-738. (b) Zang, Y. I-TASSER server for protein 3 D structure prediction. *BMC Bioinform.* 2008, 9, 40-47. (c) Zhang, Y. I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* 2009, 77, 100-113.

- 26) [http://www.rcsb.org/pdb/statistics/histogram.do?mdcat=entity_src_gen&mditem=pdbx_host_org_scientific_name&numOfbars=50&name=Expression%20Organism%20\(Gene%20Source\)](http://www.rcsb.org/pdb/statistics/histogram.do?mdcat=entity_src_gen&mditem=pdbx_host_org_scientific_name&numOfbars=50&name=Expression%20Organism%20(Gene%20Source))
- 27) Li, N., Jiang, P., Du, W., Wu, Z., Li, C., Qiao, M., Yang, X., and Wu, M. (2011). SIVA1 suppresses epithelial-mesenchymal transition and metastasis of tumor cells by inhibiting stathmin and stabilizing microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12851–12856.
- 28) Py B, Bouchet J, Jacquot G, Sol-Foulon N, Basmaciogullari S, Schwartz O, Biard-Piechaczyk M, Benichou S. (2007) The SIVA protein is a novel intracellular ligand of the CD4 receptor that promotes HIV-1 envelope-induced apoptosis in T-lymphoid cells. *Apoptosis*. 12:1879-92.
- 29) Spinicelli S, Nocentini G, Ronchetti S, Krausz LT, Bianchini R, Riccardi C (2002) GTR interacts with the pro-apoptotic protein SIVA and induces apoptosis. *Cell Death Differ* 9:1382–1384
- 30) Mertens HD1, Svergun DI (2010) Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol*. Oct;172(1):128-41. doi: 10.1016/j.jsb.2010.06.012.
- 31) Borges JC, Ramos CHI. Analysis of molecular targets of *Mycobacterium tuberculosis* by analytical ultracentrifugation. *Current Medicinal Chemistry* 18:1276-1285, 2011.
- 32) Schuck P, Perugini MA, Gonzales NR, Howlett GJ, Schubert D. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems, *Biophys. J.* 82 :1096–1111, 2002.
- 33) Eisenberg D, Crothers D. (1979). Bridging the macroscopic and microscopic. In M. Forkner (Ed.), *Physical chemistry with application to the life sciences* (pp. 700–745). Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- 34) Cantor, C. R., & Schimmel, P. R. (1980). Size and shape of macromolecules. In L. W. McCombs (Ed.), *Biophysical chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function*(pp. 539–590). New York: W.H. Freeman and Company.
- 35) Du W, Jiang P, Li N, et al. Suppression of p53 activity by SIVA1. *Cell Death Differ*. 16: 1493-1504, 2009.

ANEXO

Tabela 9. Purificação e rendimento das proteínas fusionadas: 1 litro como volume total de cultura

| | GST-SIVAΔD ^a | SIVAΔD | Rendimento (%) | Pureza(%) ^b |
|---------------------------|-------------------------|----------------|----------------|------------------------|
| Lisado total ^c | 77 ± 2 (mg) | - | 100 | 17 |
| Fração solúvel | 72 ± 1 (mg) | - | 94 | 30 |
| Proteína GST-tagged | 5,2 ± 0,4 (mg) | - | 6,8 | 80 |
| Após clivagem da coluna | - | 4,5 ± 0,4 (mg) | 5,8 | 85 |
| SEC Superdex-200 | - | 3,2 ± 0,5 (mg) | 4,2 | >95 |

^a Quantidade total de proteína medida pelo método de Bradford com Soro albumina bovina (BSA) como padrão

^b A pureza representa a relação entre a concentração de SIVAΔD em solução em relação ao total, comparado pela intensidade de bandas no SDS-PAGE

^c Proteína em 1,0 L de cultura de *E. coli* induzida com IPTG