

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

“Estudo da Estabilidade Estrutural de uma proteína recombinante
ligante de zinco e cálcio – Calgranulina C (S100A12) porcina”

Assuero Faria Garcia

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de mestre em Ciências, área de concentração Física Aplicada: opção Física Biomolecular.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

São Carlos

◆ 2007 ◆

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Garcia, Assuero Faria

“Estudo da Estabilidade Estrutural de uma proteína recombinante ligante de zinco e cálcio – Calgranulina C (S100A12) porcina”.

Assuero Faria Garcia – São Carlos, 2007

Dissertação (Mestrado) – Área de Física Aplicada – opção Física Biomolecular do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.- 2007 - Páginas: 76

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo
1- Estabilidade estrutural, 2- Ligante de zinco e cálcio.

I. Título

*"Viva como se fosse morrer amanhã.
Aprenda como se fosse viver para
sempre."*

Mahatma Gandhi.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Natanael e Sara; que sempre me apoiaram e incentivaram em meus estudos, aos amigos que sempre estiveram presentes me dando um refúgio em tempos de angústia e a minha querida orientadora Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, agradeço pelo seu precioso tempo dedicado a minha formação e pelas oportunidades de aprendizado.

Agradecimentos

As minhas grandes amigas Andressa (Drê) e Susana, que sempre estiveram do meu lado prontas para ajudar a escolher o melhor caminho, não só no campo profissional, mas também nas decisões mais importantes que tomei na minha vida.

A minha querida amiga Priscila (Prilinda, Prisola...) que foi minha “mãezinha” científica...responsável por grande parte da minha formação científica.....E sem falar nos momentos de farra...das bebedeiras da vida.....obrigado.

Falando de pessoas especiais, não poderia deixar de falar da minha mais nova amiga de infância...a Ana ou seria Bel ou também conhecida por Ana Isabel...outro anjo da guarda...companheira para tudo...Te adoro Bel!

À Bel (meu amorzinho), que é mais uma mamãe sempre disposta a ajudar seus filhinhos... e que muito me ensina, sempre com muito carinho....mas ai ai se pisar na bola o puxão de orelha é certeza.... Obrigado por ser mais uma mamãezinha.

Ao Wânius (figurinha esse garoto), pela valiosa contribuição nos experimentos de espectroscopia, por todos os ensinamentos. Obrigada por sempre estar disposto a ensinar.

Ao casal mais bonito da biofísica, Sheila e Júlio, meus amados amigos por todas as palavras de conforto e por todo apoio.

Não posso de deixar de agradecer a todos os amigos integrantes do grupo de biofísica, Ana Paula, Lia, José Fernando, Célia, Regiane, Júlio, Débora, Leandro, Ceará, Jocy, Daniel, Luiz, Militar, José Luiz, Fernanda, Fernando Melo, Melissa, Patrícia, Elizandra, Carol, Dani, Ricardo, Natalia, Possato, Beto, Alessandra, Marli, Aparecido, e também ao corpo docente deste grupo, Profs. Nelam, Otaciro, Jabah, pois são tantos que não dá para fazer um agradecimento personalizado para cada um, pois todos exerceram um papel muito importante tanto para o meu crescimento profissional como pessoal. À secretária Éster, pela atenção e amizade.

À toda minha família e amigos que sempre confiaram que eu poderia percorrer um caminho diferente.

À prof.^a Leila, responsável pela minha ida para a Biofísica e pela minha iniciação no meio acadêmico.

Ao pessoal da secretaria da pós-graduação por toda atenção e disponibilidade em ajudar.

Agradeço também a colaboração da Prof.^a Dr. Maria Cristina Nonato para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ainda, à Universidade de São Paulo, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, área de concentração Física Aplicada: opção Física Biomolecular do Instituto de Física de São Carlos.

Sumário

<i>Lista de Figuras</i>	<i>iii</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>vi</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>vi</i>
<i>Lista de Abreviações</i>	<i>vii</i>
<i>Resumo</i>	<i>ix</i>
<i>Abstract</i>	<i>x</i>
1. Introdução	1
1.1 Proteínas ligantes de cálcio (CaBP – “calcium binding protein”)	1
1.2 Proteínas da família S100	4
1.3 A produção heteróloga	10
2. Objetivos	12
3. Metodologia	14
3.1 - Construção do gene sintético	14
3.2 - Clonagem do gene sintético s100a12	16
3.3 - Subclonagem nos diversos vetores de expressão	18
3.4 - Expressão heteróloga	21
3.4.1 <i>Análise da solubilidade da proteína recombinante</i>	21
3.5 - Purificação das proteínas recombinantes	22
3.5.1 <i>rS100A12-inteína: cromatografia de afinidade</i>	22
3.5.2 <i>rS100A12-HisN e rS100A12-HisC: cromatografia de afinidade por metal quelado</i>	22
3.5.3 <i>rS100A12</i>	25
3.5.4 <i>Eletroforese em gel desnaturante</i>	26
3.5.5 <i>Determinação da concentração protéica</i>	26
3.6 - Determinação do estado de oligomerização da rS100A12	27
3.7 - Desnaturação e renaturação	28
3.7.1 <i>Tampões e soluções</i>	28
3.7.2 <i>Reação de desnaturação química com uréia</i>	28
3.7.3 <i>Renaturação químico com uréia</i>	29
3.8 - Medidas espectroscópicas	29
3.8.1 <i>Dicroísmo Circular (CD)</i>	29
3.8.2 <i>Dicroísmo circular (Far-UV CD)</i>	32
3.8.3 <i>Espectroscopia de Fluorescência</i>	32
3.8.4 <i>Fluorescência estática</i>	34
3.9 - Cálculos de parâmetros termodinâmicos dos processos de desnaturação	35
3.9.1 <i>Energia da estabilidade conformacional da rS100A12-HisN</i>	35
4. Resultados	39

4.1 – Obtenção do gene sintético que codifica a S100A12	39
4.2 – Subclonagem e sequenciamento	40
4.3 – Expressão heteróloga	41
4.4– Purificação	42
4.4.1 <i>Purificação da rS100A12-inteína</i>	42
4.4.2 <i>Purificação da rS100A12-HisN e rS100A12-HisC</i>	44
4.4.3 <i>Purificação da rS100A12 por exclusão molecular</i>	44
4.4.4 <i>Cromatografia de troca iônica da rS100A12</i>	45
4.5 - Determinação do estado de oligomerização da rS100A12	46
4.6 – Estudos espectroscópicos da rS100A12	48
4.6.1 <i>Influência do pH na estabilidade da rS100A12</i>	48
4.6.2 <i>Estudos da estabilidade química</i>	49
4.6.3 <i>Estudos da estabilidade térmica da apo-rS100A12-HisN</i>	51
4.6.4 <i>Influência de metais na estabilidade térmica da apo-rS100A12</i>	54
4.6.5 <i>Influência do pH na estabilidade térmica da apo-rS100A12-HisN</i>	56
4.6.6 <i>Espectroscopia de Fluorescência extrínseca</i>	57
6. Conclusões	69
7. Referências	72

Lista de Figuras

- Figura 1. 1** Motivo “EF-hand”. A) Representação esquemática do motivo. Quando o Ca^{2+} liga, a hélice F se move de uma conformação “fechada” (cinza claro) para uma conformação aberta (cinza escuro). B e C) Geometria da ligação, o íon ligado fica no centro da figura. Nas posições X e Y, encontram-se normalmente cadeias laterais de ácido aspártico ou asparagina; as cadeias laterais de ácido aspártico, asparagina ou serina são encontradas na posição Z e o oxigênio da carbonila do peptídeo encontra-se em -Y. -X normalmente é uma molécula de H_2O e -Z é um ligante bidentado, ácido glutâmico ou ácido aspártico. Modificada a partir de Lewit-Bentley & Réty, (2000).2
- Figura 1. 2** Interações Ca^{2+} -dependente e independente na família S100. Proteínas S100 gerando diversas respostas fisiológicas por meio da interação com moléculas alvo (rosa e amarelo). Em baixas concentrações de cálcio, a proteínas S100 (laranja) permanecem na forma livre de cálcio (forma apo). Com a entrada de cálcio por canais de “voltage-gated” ou mediada por receptor, às proteínas S100 ligam cálcio e sofrem uma mudança conformacional que altera as propriedades de suas superfícies hidrofóbicas. Esta mudança permite a interação da proteína com uma ampla variedade de proteínas (amarelo), o que pode estimular uma resposta fisiológica. A liberação de cálcio pela ATPase- Ca^{2+} resulta na dissociação do cálcio e da proteína alvo da proteína S100, que retorna a seu estado apo. Apesar da maioria das interações das proteínas alvo com as proteínas S100 serem cálcio dependente, alguns membros têm mostrado que a interação com proteínas alvo (rosa) é cálcio independente. Modificada a partir de Kisiel, 2006.5
- Figura 1. 3** Unidades estrutural e funcional básica das proteínas “EF-hand”. Um domínio composto por um par de motivos “EF-hand” unidos por uma região (“linker”) de tamanho variável. As α -hélices estão numeradas do N-terminal para o C-terminal do domínio. Fonte: Caposi, 2006.6
- Figura 1. 4** Estrutura da S100A12 humana resolvida por Moroz e colaboradores. Visualização entre monômeros, com dois átomos de cálcio por monômero (cinza).7
- Figura 3. 1** Esquema geral da montagem do gene sintético. Os números remetem à posição do nucleotídeo correspondente na seqüência do gene sintético e os “primers” aparecem em itálico.16
- Figura 3. 2** A) Vetor pET-28a(+), seqüência primária da rS100A12-HisN; fl, origem fl; Kan, gene que confere resistência à kanamicina; ori, origem; e LAC, operador lac.; B) Vetor pET-29a(+), seqüência primária da rS100A12; fl, origem fl; Kan, gene que confere resistência à kanamicina; ori, origem; e LAC, operador lac.; Figura modificada do manual de instruções pET-vectors, Novagem.20
- Figura 3. 3** Cromatografia em resina de níquel. Purificação de proteínas recombinantes expressas em *E.coli* por cromatografia de afinidade por metal quelado (Figura adaptada do manual QIAexpressionist).24
- Figura 3. 4** Origem do efeito de Dicroísmo Circular. Decomposição do feixe plano polarizado em duas componentes circulares à esquerda (L) e à direita (R), antes (A.) e depois (B.) de passar pela amostra. Modificado a partir de Kelly & Price, 1997.30
- Figura 3. 5** Espectro de CD no UV distante, de vários tipos de estrutura secundária: curva sólida, α -hélice; tracejada longo, folha- β antiparalela; pontos, β -turn; e tracejado curto, estrutura irregular. Modificado a partir de Kelly & Price, 1997.31
- Figura 3. 6** Diagrama de Jablonski para a absorção de fótons do estado fundamental S_0 para os estados excitados S_133
- Figura 4. 1** Produção do fragmento sintético codificando a S100A12. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, TAE, corado com brometo de etídeo, mostrando: Coluna 1, marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Coluna 2, produto da reação de extensão dos “primers”; Coluna 3, banda de amplificação resultante da reação de PCR, correspondente ao fragmento de DNA que codifica a S100A12.39

- Figura 4. 2** Análise de restrição dos clones recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, TAE [1x], corado com brometo de etídeo e transiluminado sob luz UV, mostrando: Coluna 1, marcador de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Colunas 2 e 3, DNA plasmidial dos clones positivos submetidos à análise de restrição usando as endonucleases de restrição *Nde* I e *Xho* I.40
- Figura 4. 3** Sequência de DNA produzida codificando a rS100A12 e sequência primária correspondente – Em vermelho estão destacada os motivos “EF-hands”; em roxo, os sítios ligantes de zinco; em azul, resíduo não pertencente a S100A12 nativa.41
- Figura 4. 4** A. e B.) Expressão da rS100A12-inteína, rS100A12-HisC, rS100A12-HisN e rS100A12 em *E. coli* BL21(DE3). A. SDS-PAGE 15% e B. SDS-PAGE 16% em tampão tricina. Géis corados com *Coomassie blue*. A. e B. mostrando: Padrão de massa molecular em kDa (1); Proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3) provenientes de cultura não induzida (2 e 4); Cultura induzida com 0,1mM de IPTG “overnight” a 22°C (3 e 5). C. e D.) Análise de solubilidade da rS100A12-inteína, rS100A12-HisC, rS100A12-HisN e rS100A12. C. Análise de solubilidade para as proteínas recombinantes: rS100A12-HisN (2 e 3); rS100A12 (4 e 5); rS100A12-HisC (6 e 7). Padrão de massa molecular em kDa (1); Precipitado insolúvel da lise celular após centrifugação (2, 4 e 6); Fração solúvel da lise celular após centrifugação (3, 5 e 7). D. Análise de solubilidade para a rS100A12-inteína: Padrão de massa molecular em kDa (1); Precipitado insolúvel da lise celular após centrifugação (2); Fração solúvel da lise celular após centrifugação (3). As setas indicam as diferentes proteínas recombinantes obtidas.43
- Figura 4. 5** Purificação da rS100A12-HisN e HisC em coluna de Ni-NTA – A. e B. SDS-PAGE 16% em tampão tricina. Coluna 1, padrão de massa molecular em kDa; Coluna 2, eluato das proteínas totais aplicadas a coluna (material não ligado); Coluna 3, proteínas totais da lavagem com 40mM de imidazol; Coluna 4, proteínas totais eluídas com 250mM de imidazol. As setas indicam bandas correspondentes às proteínas de interesse.44
- Figura 4. 6** Purificação da rS100A12 por SEC A. Cromatografia por exclusão molecular do extrato bruto da rS100A12 em Superdex 75, sendo que a seta indica o volume de retenção referente ao pico de eluição da proteína de interesse. B. Análise das amostras eluídas da Superdex 75. SDS-PAGE 16% em tampão tricina, mostrando: Coluna 1, padrão de massa molecular em kDa; Coluna 2, proteínas totais eluídas na fração 15; Coluna 3, proteínas totais eluídas na fração 16. A seta indica a banda da proteína recombinante.46
- Figura 4. 7** Purificação da rS100A12 por cromatografia de troca iônica. A. Cromatografia das frações 16 provenientes da SEC. B. Análise da amostra eluída da Mono-Q. SDS-PAGE 16% em tampão tricina, corado com *Coomassie blue* - Coluna 1, padrão de massa molecular em kDa e Coluna 2, 2° pico eluído da Mono-Q, correspondente a rS100A12.46
- Figura 4. 8** Estado de oligomerização da rS100A12. Perfil cromatográfico de exclusão molecular da apo-rS100A12. O maior pico observado na SEC corresponde à uma proteína de massa molecular aparente de 26 kDa. A direita acima está inserida a curva de calibração da coluna utilizada. A esquerda está inserido o resultado do *cross-linking* (SDS-PAGE 16% em tricina). Coluna 1, padrão de massa molecular em kDa; Coluna 2, Proteína apo-rS100A12 (10µM); Coluna 3, Proteína apo-rS100A12 com DSS (10µM).47
- Figura 4. 9** Influência do pH na estrutura secundária da rS100A12-HisN – Espectro de CD a 25µM, nos pHs: 4,0 (—), 8,0 (—) e 10,5 (—).48
- Figura 4. 10** Desnaturação química da rS100A12-HisN. Espectro de CD a 25µM, em presença de concentrações crescentes de uréia.49
- Figura 4. 11** Desnaturação e renaturação químico da rS100A1-HisN - Curva de desnaturação e renaturação, monitorada em 222nm, expressa em termos da fração de proteínas desnaturada, em função da concentração de agente desnaturante.50
- Figura 4. 12** Desnaturação química da rS100A12-HisN. Curva de desnaturação para três concentrações distintas de rS100A12-HisN, monitorada em 222nm, expressa em termos da fração de proteínas desnaturadas, em função da concentração de agente desnaturante.51
- Figura 4. 13** Desnaturação térmica da apo-rS100A12-HisN. A desnaturação induzida termicamente mostra a presença do ponto isodicroico em 204nm.52
- Figura 4. 14** Desnaturação térmica da rS100A12. Curva de desnaturação, monitorada em 222nm, expressa em termos da fração de proteína desnaturada, em função da variação térmica.53

Figura 4. 15 Reversibilidade térmica da apo-rS100A1-HisN – Espectros de CD da proteína apo-rS100A12-HisN antes da desnaturação (—) e após a renaturação térmica (—).....	53
Figura 4. 16 Desnaturação térmica na presença de íons. Curvas de desnaturação monitoradas em 222nm, expressas em termos da fração de proteína desnaturada, em função da variação de temperatura.	55
Figura 4. 17 Desnaturação química da rS100A12 na presença de íons. Espectros de CD da rS100A12 na presença de 1mM de Zn^{2+} , em diferentes concentrações do agente desnaturante.	56
Figura 4. 18 Estabilidade térmica como função da variação de pH. Valor de T_m como função da variação do pH. A figura interna representa as isotermas de desnaturação monitoradas em 222nm, expressas em termos da fração de proteína desnaturada, em função da variação de temperatura para os pHs 4,0; 8,5 e 10,5.	57
Figura 4. 19 Fluorescência extrínseca. A) Espectros de emissão de fluorescência do ANS na presença e ausência de íons metálicos. A concentração protéica foi 10 μ M e 200 μ M de ANS em tampão Tris-HCl, pH8,0, contendo 10mM NaCl. B) Espectros de emissão de fluorescência do ANS para 25 μ M de apo-rS100A12 renaturada termicamente. Em preto espectro correspondente a apo-rS100A12 e em azul o espectro referente a $Zn^{2+}Ca^{2+}$ -rS100A12	58

Lista de Tabelas

Tabela 1. 1 Funções pro-inflamatórias e diagnósticos associados a fagócito-específico para S100A12.9	
Tabela 3. 1 Reação da mistura de ligação do inserto no vetor de clonagem pGEMT-Easy (<i>*Invitrogen</i>).	17
Tabela 3. 2 Reação da mistura de ligação do inserto nos vetor de propagação (<i>*Invitrogen</i>).	19
Tabela 4. 1 Vetores utilizados para cada produção protéica com os respectivos pesos moleculares esperados para cada produção e o rendimento protéico para cada litro de cultura. (-) valores não cauculados.	43
Tabela 4. 2 Comparação da estabilidade estrutural para diferentes concentrações de apo-rS100A12-HisN.....	51

Lista de Abreviações

ANS – “1-anilino-8-naphthalenesulfonic acid”

ACB – Anidrase Carbônica Bovina

BSA – Albumina sérica bovina (bovine serum albumine)

CaBP - proteína ligante de cálcio (calcium binding protein)

CD - Dicroísmo Circular (circular dichroism)

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA - ácido etileno-diamino tetracético (ethylenediaminetetraacetic acid)

EGTA- ácido etileno-glicol-bis(β-aminoetil-éter)-n, n, n', n'-tetracético

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTT – Ditioneitol

DSS – “Disuccinimidyl suberate”

f_D - fração de proteína desnaturada

HEPES – “4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”

IPTG - "Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside"

ITS – Inibidor de tripsina de soja

LB - Luria-Bertani

MES – "2-(N-morpholine)-ethane sulphonic acid"

OVA – Ovalbumina

pb – pares de bases

PCR – Reação da polimerase em cadeia

P_t - concentração monomérica de proteínas presente na amostra

RAGE - Receptor para produtos de glicosilação

SEC- cromatografia de exclusão molecular (size exclusion chromatography)

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida (Sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis)

T_m - temperatura de transição

TAE - Tris - Ácido Acético - EDTA

UV - ultravioleta

ΔA - diferença na absorbância

θ_D – valor de elipticidade do estado desnaturado

θ_n - valor de elipticidade do estado naturado

θ_{obs} - elipticidade da amostra em uma determinada condição

ΔG_U - energia livre de desnaturação

Resumo

S100A12 porcina é um membro da família das proteínas S100, um grupo de pequenas proteínas ligantes de cálcio caracterizado pela presença de dois motivos “EF-hand”. Estas proteínas estão envolvidas em diversos eventos celulares, como a regulação da fosforilação protéica, atividade enzimática, tamponamento de Ca^{2+} , processos inflamatórios e a polimerização de filamentos intermediários. Adicionalmente, algumas dessas proteínas podem ligar Zn^{2+} , o qual pode afetar a ligação do íon Ca^{2+} , particularmente para as proteínas S100. Neste trabalho, a seqüência gênica que codifica a proteína S100A12 porcina foi obtida por meio da construção de um gene sintético usando códons preferenciais para *E.coli*, permitindo a produção recombinante de grandes quantidades da proteína. Um estudo termodinâmico da estabilidade estrutural foi realizado, assim como a interação da proteína recombinante com íons divalentes usando técnicas de dicroísmo circular (CD) e fluorescência extrínseca. A desnaturação e renaturação induzidas por uréia ou temperatura indicam que se trata de um processo reversível e que a ligação dos íons Zn^{2+} e ou Ca^{2+} à rS100A12 aumenta sua estabilidade. A interação da sonda ANS com a proteína na presença de seus ligantes expõe superfícies hidrofóbicas podendo assim facilitar sua interação com macromoléculas alvo. Analisados em conjunto, os resultados obtidos indicam que S100A12 porcina é capaz de assumir diferentes conformações as quais podem estar correlacionadas com sua função fisiológica.

Abstract

Porcine S100A12 is a member of S100 family, a small acidic calcium-binding proteins group characterized by the presence of two EF-hand motifs. These proteins are involved in many cellular events as the regulation of protein phosphorylation, enzymatic activity, Ca²⁺ homeostasis, inflammatory processes and intermediate filament polymerization. In addition, some of these proteins can bind Zn²⁺, which can affect the binding of Ca²⁺ particularly to S100 proteins. In this study, the gene sequence encoding S100A12 was obtained by the synthetic gene approach using *E. coli* codon bias allowing the recombinant production of large amounts of the protein. We report here a thermodynamic study on the structural stability of this recombinant protein and its interaction with divalent ions using circular dichroism and extrinsic fluorescence. The folding/unfolding induced by urea or temperature indicated a reversible process and the binding of Zn²⁺ or Zn²⁺ and Ca²⁺ to S100A12 increasing its stability. The interaction of the ANS probe with the protein in the ligand presence can lead to exposition of hydrophobic regions allowing its interaction with target macromolecules. Taken together, the results indicated that porcine S100A12 may assume different conformations that could be correlated to its physiological function.

Introdução

1. Introdução

1.1 Proteínas ligantes de cálcio (CaBP – “calcium binding protein”)

O cálcio intracelular pode atuar como um sinalizador nas proteínas pertencentes à superfamília de proteínas ligantes de cálcio “EF-hand”, dependendo de sua afinidade, especificidade, cooperatividade e cinética. Essas proteínas ligantes de cálcio podem assim se envolver em diversas atividades celulares, tais como excitose, contração muscular, metabolismo, transcrição, fertilização e proliferação celular, tamponamento de cálcio ou magnésio e homeostase [Bhattacharya, 2004]. Proteínas sensores de cálcio do tipo “EF-hand”, como são conhecidas as proteínas pertencentes à família das S100 e calmodulinas, traduzem mudanças fisiológicas mediadas por cálcio dentro de respostas celulares específicas por uma grande mudança conformacional expondo regiões de reconhecimento de moléculas alvo.

O termo “EF-hand” foi criado por R. H. Kretsinger há cerca de 30 anos para designar um motivo do tipo hélice-“loop”-hélice que apresentava afinidade pelo íon cálcio, descoberto na estrutura da parvalbumina, uma pequena proteína ligante de cálcio isolada do músculo de carpa [Kretsinger, 1973]. O clássico motivo “EF-hand” é geralmente formado por uma alça de 12 resíduos, ladeada por duas α -hélices, em uma região contínua da proteína figura 1.1. Este sítio pode ser representado como: X•Y•Z•–Y•–X••–Z, onde X, Y, Z, –X, –Y e –Z são os ligantes que participam na coordenação do metal e os pontos (•) representam os resíduos entre eles [Lewit-Bentley e Réty, 2000], figura 1.1.B. A seqüência dos resíduos que compõem o “EF-hand” forma um “loop” que pode acomodar os ligantes cálcio ou magnésio, diferindo

apenas na formação geométrica, que é dependente do íon presente. O magnésio normalmente é compelido por seis ligantes em um octaedro, enquanto sete ligantes nos vértices de uma pirâmide pentagonal coordenam o cálcio figura 1.1.B e C.

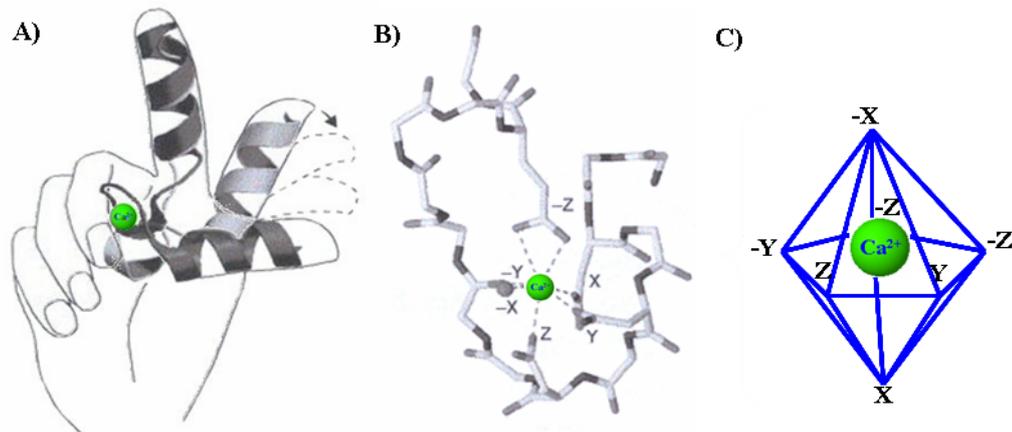


Figura 1. 1 Motivo “EF-hand”. A) Representação esquemática do motivo. Quando o Ca^{2+} liga, a hélice F se move de uma conformação “fechada” (cinza claro) para uma conformação aberta (cinza escuro). B e C) Geometria da ligação, o íon ligado fica no centro da figura. Nas posições X e Y, encontram-se normalmente cadeias laterais de ácido aspártico ou asparagina; as cadeias laterais de ácido aspártico, asparagina ou serina são encontradas na posição Z e o oxigênio da carbonila do peptídeo encontra-se em $-Y$. $-X$ normalmente é uma molécula de H_2O e $-Z$ é um ligante bidentado, ácido glutâmico ou ácido aspártico. Modificada a partir de Lewit-Bentley & Réty, (2000).

Os motivos “EF-hand” normalmente ocorrem em pares [Kretsinger, 1973] formando um domínio de quatro hélices (figura 1.1). O pareamento dos motivos “EF-hand” ativa cooperativamente a ligação de íons Ca^{2+} , que é essencial para geração de uma resposta clara mesmo sob uma pequena variação na concentração de cálcio durante a sinalização [Linse, 1995]. Estudos mostraram que todo domínio “EF-hand” deve ser tratado como uma unidade global e cooperativa [Nelson, 1998]. Para entender a transdução do sinal de cálcio pelas proteínas “EF-hand” é também importante reconhecer se a afinidade por Ca^{2+} , respostas conformacionais devido à ligação de íons e interação com moléculas alvo são energeticamente favoráveis [Brokx, 2001].

Como já comentado, usualmente os motivos “EF-hand” de muitas proteínas ocorrem em pares, intimamente associados na forma de domínio, com as alças dos dois sítios interagindo em uma pequena folha- β antiparalela. Esses motivos são caracterizados por uma região com 29 aminoácidos [Kawasaki e Kretsinger, 1994], formada por duas hélices unidas por um “loop”, região onde estão localizados os aminoácidos responsáveis pela coordenação do íon [Marsden, 1990]. As α -hélices são anfifílicas, pois possuem 4 aminoácidos hidrofóbicos conservados, e atuam como âncoras sobre o “loop”, mantendo-o na conformação correta. Isso transmite as mudanças conformacionais geradas por meio da ligação dos íons para as demais regiões da proteína. Assim, a α -hélice é de fundamental importância para a estabilização da proteína ou ainda para a interação com moléculas alvo [Falke, 1994].

Proteínas “EF-hand” podem apresentar de dois a oito motivos potenciais [Nakayama, 1992], embora nem todos os sítios sejam funcionais [Kawasaki e Kretsinger, 1994]. As proteínas “EF-hand” podem ser divididas em aproximadamente 66 subfamílias [Nakayama, 2000]. As funções das proteínas que contêm tais motivos são tão diversas que incluem desde o tamponamento do cálcio no citosol, à transmissão de sinal entre os compartimentos celulares e à contração muscular.

Estudos estruturais têm revelado diferenças substanciais nas mudanças conformacionais induzidas por Ca^{2+} entre os domínios “EF-hand”. Duas proteínas são exemplos clássicos em relação a essas diferenças: calmodulina e calbindina $\text{D}_{9\text{K}}$. Tanto o domínio carboxi como amino terminal da calmodulina sofrem grandes rearranjos estruturais induzidos pela ligação de Ca^{2+} . Passam de uma conformação “fechada”, na qual as duas hélices de cada “EF-hand” são quase antiparalelas, para uma conformação “aberta”, onde as duas hélices estão mais perpendiculares [Zhang, 1995]. Por contraste, calbindina $\text{D}_{9\text{K}}$ mantém sua conformação “fechada” mesmo após a ligação de Ca^{2+} . Claramente, alguns domínios “EF-hand” mostram grandes mudanças conformacionais e outros não.

Em proteínas pertencentes à superfamília “EF-hand” os motivos “EF-hand” podem ser Ca^{2+} -específicos ou ligar Ca^{2+} e Mg^{2+} . Os sítios estruturais e de tamponamento ligam tanto Ca^{2+} quanto Mg^{2+} , já as proteínas que apresentam os sítios Ca^{2+} -específicos são proteínas regulatórias [Falke, 1994, Linse e Forsén, 1995 e Hapak, 1989]. Geralmente, grandes mudanças conformacionais nos domínios induzidas por íons cálcio, passando da conformação “fechada” para “aberta”, ocorrem em proteínas “EF-hand” regulatórias que atuam na ativação de outras proteínas, por meio da interação com suas superfícies hidrofóbicas expostas devido à ação do íon cálcio. Os domínios amino-, e carboxi-terminal de calmodulina, assim como o domínio amino-terminal da troponina C e recoverina, são classificados como tal. O único domínio de calbindina $\text{D}_{9\text{K}}$ exibe pequenas mudanças conformacionais em resposta à ligação de Ca^{2+} , que deve ser responsável pela estabilidade estrutural e agir no “tamponamento” do Ca^{2+} intracelular. Esse domínio pode ser classificado como estrutural e outros exemplos desse tipo incluem os domínios carboxi-terminal de Troponina C e recoverina [Ikura, 1996].

Variações estruturais na forma de organização dos domínios “EF-hand” contribuem significativamente para a seletividade de moléculas alvo e para diversidade da função protéica das proteínas ligantes de cálcio. Assim, para entender a regulação dos caminhos de sinalização dependentes de Ca^{2+} pelas proteínas “EF-hand” é necessário um conhecimento do nível atômico das estruturas do complexo formado com moléculas alvo.

1.2 Proteínas da família S100

Proteínas pertencentes à família S100 foram isoladas primeiramente de cérebro bovino em 1965, por B.W. Moore, e receberam esse nome por se apresentarem na forma solúvel em solução de sulfato de amônia 100% saturada. Até o momento, aproximadamente 25 membros das proteínas S100 foram identificados em humanos formando a maior família de proteínas

ligantes de cálcio pertencentes à superfamília “EF-hand” [Kisiel, 2006]. As proteínas S100 compreendem um grupo complexo de sensores de cálcio “EF-hand” associados a múltiplas respostas fisiológicas, através de moléculas alvos, podendo promover o crescimento e diferenciação celular, regulação do ciclo celular, transcrição e atividade de receptores de superfície celular (figura 1.2) [Donato, 2001 e Heizmann, 2002]. Adicionalmente, o interesse em proteínas S100 também se deve ao seu envolvimento em diversas doenças humanas, como Alzheimer, câncer e artrite reumatóide, usualmente causadas devido a uma modificação nos níveis de expressão de membros de proteínas S100 [Heizmann, 2002].

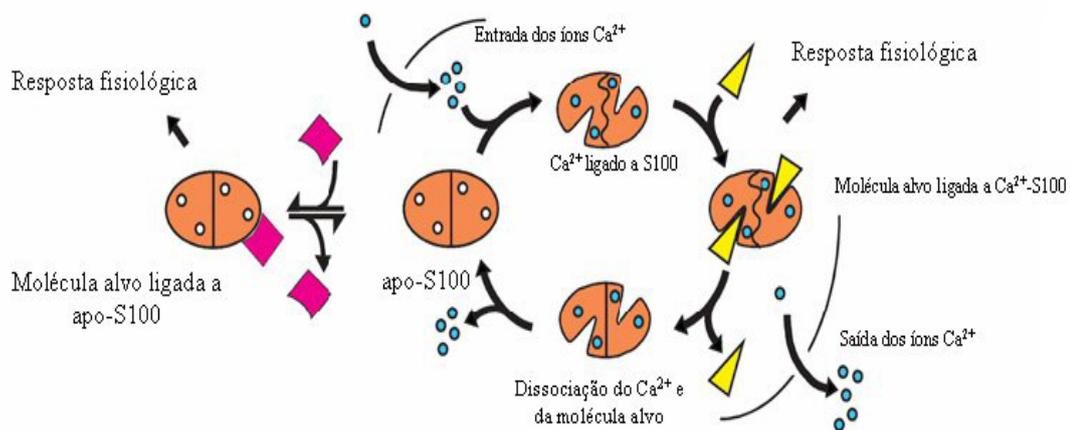


Figura 1. 2 Interações Ca^{2+} -dependente e independente na família S100. Proteínas S100 gerando diversas respostas fisiológicas por meio da interação com moléculas alvo (rosa e amarelo). Em baixas concentrações de cálcio, as proteínas S100 (laranja) permanecem na forma livre de cálcio (forma apo). Com a entrada de cálcio por canais de “voltage-gated” ou mediada por receptor, as proteínas S100 ligam cálcio e sofrem uma mudança conformacional que altera as propriedades de suas superfícies hidrofóbicas. Esta mudança permite a interação da proteína com uma ampla variedade de proteínas (amarelo), o que pode estimular uma resposta fisiológica. A liberação de cálcio pela ATPase- Ca^{2+} resulta na dissociação do cálcio e da proteína alvo da proteína S100, que retorna a seu estado apo. Apesar da maioria das interações das proteínas alvo com as proteínas S100 serem cálcio dependente, alguns membros têm mostrado que a interação com proteínas alvo (rosa) é cálcio independente. Modificada a partir de Kisiel, 2006.

As proteínas S100 são caracterizadas pela presença de dois motivos ligantes de Ca^{2+} do tipo “EF-hand”, divididos por regiões hidrofóbicas e interconectados por uma região intermediária denominada “linker”. Cada motivo ligante é um “loop” ligante de Ca^{2+} dividido por uma α -hélice [Kretsinger, 1991], resultando em um arranjo do tipo hélice-“loop”-hélice,

ou seja, hélice I e II divididas pelo “loop” 1 e hélice III e IV divididas pelo “loop” 2, as hélices II e III são unidas pelo “linker” (figura 1.3). Na região C-terminal está presente um dos motivos “EF-hand”, contendo um “loop” canônico ligante de Ca^{2+} composto por 12 aminoácidos, comuns para todas as proteínas ligantes de Ca^{2+} . Na região N-terminal, rica em aminoácidos básicos, está localizado o outro motivo “EF-hand”, composto por 14 aminoácidos e específico para proteínas da família S100. Assim, os sítios ligantes de Ca^{2+} das proteínas S100 apresentam diferentes afinidades por Ca^{2+} , sugerindo que as proteínas S100 são heterobifuncionais [Hilt, 1991 e Krebs, 1995].

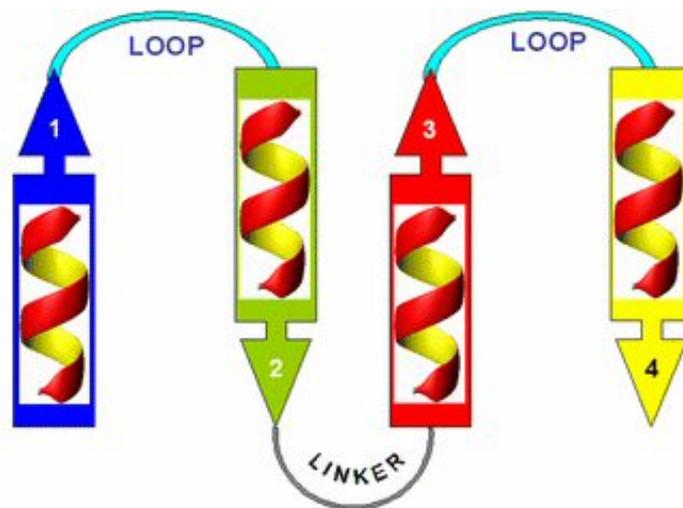


Figura 1.3 Unidades estrutural e funcional básica das proteínas “EF-hand”. Um domínio composto por um par de motivos “EF-hand” unidos por uma região (“linker”) de tamanho variável. As α -hélices estão numeradas do N-terminal para o C-terminal do domínio. Fonte: Caposi, 2006.

Uma característica adicional apresentada pelas proteínas S100 é a afinidade que elas podem apresentar para outros metais divalentes como os íons Zn^{2+} e Cu^{2+} , sendo que os sítios de ligação para estes são distintos dos sítios ligantes de Ca^{2+} . A ligação com alta afinidade destes íons divalentes pode desempenhar um papel importante na quimiotaxia e homeostase de íons metálicos tóxicos para células [Bhattacharya, 2004]. Algumas proteínas da família S100 influenciadas pelo íon Zn^{2+} , apresentando sua afinidade pelo Ca^{2+} afetada, essa

afinidade por diferentes cátions divalentes certamente contribui para grande diversidade funcional observada para proteínas S100. [Heizmann, 1998].

Níveis intracelulares de cálcio modulam muitas funções de fagócitos incluindo quimiotaxia, fagocitose, degranulação e geração de espécies de oxigênio reativas. Adicionalmente à calgranulina C (S100A12), vários mediadores putativos do sinal de cálcio em granulócitos foram identificados como a calmodulina, anexina, grancalcina e o heterocomplexo calgranulina A/B. As calgranulinas, em particular, são liberadas durante respostas inflamatórias e têm atividade antimicrobiana.

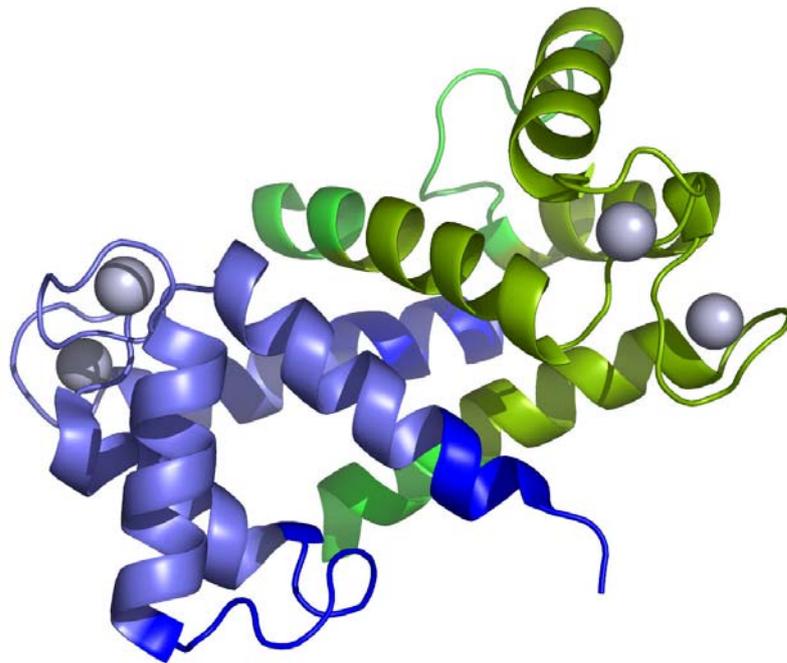


Figura 1. 4 Estrutura da S100A12 humana resolvida por Moroz e colaboradores. Visualização entre monômeros, com dois átomos de cálcio por monômero (cinza).

Dell'Angelica e colaboradores (1994) demonstraram que a S100A12 porcina nativa sofre mudanças conformacionais pela ligação de cálcio dando suporte a um potencial envolvimento em eventos de transdução de sinal dependentes de Ca^{2+} . A S100A12 possui um sítio adicional ligante de Zn^{2+} , comum para a maioria das proteínas S100, e a ligação deste

induz uma profunda variação nas propriedades da proteína se ligar ao Ca^{2+} . Na ausência de Zn^{2+} , S100A12 porcina se liga a um íon Ca^{2+} por monômero, enquanto na presença de Zn^{2+} a S100A12 se liga a dois íons por monômero, sendo consistente com a presença de dois motivos “EF-hands” preditos na sua seqüência primária [DellAngelica, 1994]. Os motivos ligantes de zinco para S100A12 foram definidos como HxxxH [Dell'Angelica, 1994].

Como a maioria das proteínas S100, a S100A12 é um dímero em solução, com a interface entre duas subunidades unidas por interações hidrofóbicas. O enovelamento da S100A12 humana (figura 1.4) é semelhante a outras estruturas conhecidas para proteínas S100 pela união entre os dois motivos “EF-hand”. A comparação da seqüência primária e estrutura entre membros da família sugerem que a região de ligação na S100A12 é formada por uma região de interface entre os monômeros entre resíduos do C-terminal de uma subunidade e os resíduos do N-terminal da outra subunidade do dímero. O motivo “EF-hand” do N-terminal inclui dois glutamatos que são conservados na maioria das seqüências S100. [Moroz, 2001].

A função das proteínas ligantes de cálcio (CaBPs) do tipo S100 ainda não está clara, sendo algumas delas associadas ao desenvolvimento de tumores e a indução de metástase quando sua expressão está desregulada. Além disso, um receptor de superfície celular já foi identificado para S100A12 (RAGE, receptor para produtos de glicosilação), sendo também indicado como um receptor putativo para outras proteínas S100. A interação com esse receptor parece representar uma função crucial em inflamações relacionadas à S100A12. [Hofmann, 1999 e Hsieh, 2003]. Sabe-se também que a S100A12 bem como a S100A13 ligam-se a drogas antialérgicos, sugerindo o envolvimento desta em reações alérgicas [Shishibori, 1999].

Algumas proteínas S100 têm afinidade pelos cátions zinco ou cobre, sendo o sítio ligante o mesmo para ambos. Estes cátions podem regular importantes funções homeostáticas

intracelulares e também funções extracelulares como atividade antiparasitária e antifúngica da S100A12 e S100A9 [Ravasi, 2004]. Juntas, as calgranulinas S100A8, S100A9 e S100A12 compõem aproximadamente 50% das proteínas do citosol de neutrófilos [Edgeworth, 1991; Dell'Angellica, 1994; Guignard, 1995]. Neutrófilos promovem a primeira linha de defesa contra infecção. As calgranulinas têm mostrado, ainda, possuírem atividade antimicrobiana [Steinbakk, 1990; Brandtzaeg, 1995; Santhanagopalan, 1995]. Para as proteínas S100A8 e S100A9 a atividade antimicrobiana está relacionada com a ligação de zinco, provavelmente privando os microrganismos de zinco [Clohessy & Golden, 1995; Sohnle, 1997; Hunter, 2002]. Atividade antimicrobiana foi encontrada para um peptídeo consistindo de 15 resíduos de aminoácidos do C-terminal da S100A12, atuando primariamente contra bactéria gram-negativa na presença de zinco, que é encontrada em altas concentrações em fluido nasal de pacientes com fibrose cística [Cole, 2001]. Alguns processos inflamatórios associados à S100A12 em níveis extracelulares estão relacionados na tabela 1.1

Tabela 1. 1 Funções pro-inflamatórias e diagnósticos associados a fagócito-específico para S100A12.

Funções biológicas extracelulares	Doenças associadas
Super regulação da adesão de moléculas em células endoteliais	Infecções
Ativação de células inflamatórias	Artrite psoriática e reumatóide
Propriedades quimiotáticas	Fibrose cística
Atividade antimicrobiana	Inflamação intestinal Doença de Kawasaki

Cristais de S100A12 porcina nativa foram obtidos [Nonato, 1997], visando à determinação da estrutura cristalográfica e o melhor entendimento do mecanismo de atuação das CaBPs em função da presença de cálcio. Porém, a estrutura cristalográfica não pode ser resolvida, mesmo a S100A12 humana já tendo sua estrutura 3D resolvida, o que a princípio permitiria a determinação da estrutura por substituição molecular. Pode-se especular que a

liberdade conformacional dessas proteínas, dirigida pela ligação de cálcio e zinco, pode ter sido principal problema enfrentado. Assim, este projeto teve a motivação inicial de prover proteína de forma ilimitada através da expressão heteróloga da S100A12 em *Escherichia coli*, permitindo estudos sobre sua estabilidade estrutural e a influência de seus ligantes.

1.3 A produção heteróloga

A escolha de um sistema de expressão recombinante adequado depende dos objetivos com relação ao produto e suas utilizações. *Escherichia coli* tem se mostrado um hospedeiro ideal para as manipulações requeridas na produção heteróloga de proteínas e um grande número de vetores comerciais já foram e continuam sendo desenvolvidos especificamente para a expressão neste organismo. Sua facilidade de crescimento permite também que um grande número de experimentos seja realizado rapidamente durante o processo de otimização da expressão. *E. coli* ainda tem outras vantagens que lhe torna um hospedeiro de expressão preferencial, como altos rendimentos e manutenção barata, se comparada a hospedeiros eucariotos [Carey, 1996]. Neste trabalho a estratégia para a produção da proteína alvo como uma proteína de fusão a ser expressa em *E. coli* foi abordada e diversos vetores para expressão foram construídos, visando o estabelecimento de um sistema de expressão adequado, bem como uma alta produção heteróloga.

Objetivos

2. *Objetivos*

O presente trabalho teve como objetivo geral a obtenção do gene sintético que codifica a S100A12 porcina para viabilizar a produção desta proteína de forma heteróloga e posteriores estudos estruturais.

Para isso, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- ✓ Construir um fragmento gênico sintético codificando a S100A12;
- ✓ Clonar o referido fragmento em vetor de propagação e realizar seu sequenciamento;
- ✓ Montar vetores adequados à expressão heteróloga da S100A12 em *E. coli*;
- ✓ Produzir e purificar a proteína recombinante;
- ✓ Analisar a estabilidade estrutural da proteína recombinante, bem como a influência da ligação de íons cálcio e zinco, utilizando espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência.

Metodologia

3. Metodologia

3.1 - Construção do gene sintético

A motivação inicial deste trabalho foi à obtenção de quantidades ilimitadas de proteína para a realização de ensaios cristalográficos visando a determinação da estrutura protéica, realização de estudos da estabilidade estrutural e investigação da influência de seus ligantes na estrutura protéica. A metodologia empregada para obtenção de material biológico de forma ilimitada foi por meio da expressão heteróloga, entretanto esta técnica exige que se tenha uma seqüência gênica que codifique a proteína desejada, como o gene da S100A12 porcina ainda não foi clonado e se trata de uma seqüência pequena a estratégia empregada para a obtenção do gene foi a construção de um gene sintético via PCR com códons otimizados para expressão em *E. coli*, o que independe do material biológico.

A seqüência de DNA para a construção do gene sintético foi obtida utilizando o programa *DNA Star* (módulo *EditSeq*), através da tradução reversa da seqüência primária da S100A12 porcina (número de acesso no *GenBank* - P80310), utilizando códons preferenciais para *E. coli*. Foram construídos 6 pares de oligonucleotídeos (cerca de 64pb cada) que hibridizam na extremidade 3' (sobreposição de 17 pares de bases). Nos “primers” cagS1 e cagR3 foram inseridos sítios de restrição *NdeI* e *XhoI*, respectivamente, para facilitar e direcionar a subclonagem nos vetores pET29b e pTYB2.

As seqüências dos oligonucleotídeos (“primers”) estão descritas abaixo:

Primer - cagS1(1-66):

5'GGAATTCCATATGACCAAGCTGGAGGACCACCTGGAAGGTATTATCAACATCTTCCACCAGTACTC3'

Primer - cagR1(113-49):

5'GCTTCAGTTCACGTTTGATCAGGGTGTCTAGTGACCCAGACGAACAGAGTACTGGTGGAAGATG3'

Primer – cagS2(97-161):

5'CAAACGTGAAGCAGCTGATCACCAAAGAAGTCCGAACACCCTGAAGAACACCAAAGACC3'

Primer – cagR2(209-145):

5'CATCTTGGTTAGCGTCCAGGTTCTGGAAGATTTTGTGCGATGGTACCCTGGTCTTTGGTGTTC3'

Primer – cagS3(193-256):

5'GGACGCTAACCAAGATGAACAGGTTTCTTTCAAAGAATTCGTAGTTCTGGTTACTGACGTACTG3'

Primer – cagR3(296-239):

5'GCCGCTCGAGTTCTTTGTGGATGTTGTCGTGAGCGGTGATCAGTACGTCAGTAACCAG3'

A construção do gene sintético foi realizada em duas etapas. A primeira etapa constituiu-se numa reação de extensão, na qual foram usados: 10 picomols dos “primers” cagR1, cagS2, cagR2 e cagS3; 0,2 mM de dNTPs; 0,5 U de *Taq DNA* polimerase (*Invitrogen*); tampão da enzima com 2,5 mM de sulfato de magnésio e água MilliQ. O volume total da reação foi de 25 µl. Esta reação foi realizada com incubação inicial 2 min a 94°C, seguidos por 10 ciclos consecutivos a 94°, por 30 seg., 45°, por 20 seg. e extensão por 15 seg. a 68°C. Uma incubação final a 68°C por 5 min completou o processo de extensão para a montagem de uma seqüência codificante dupla fita da S100A12 (molde). Na Figura 3.1 estão representadas as regiões de sobreposição dos “primers” em suas extremidades 3' para a obtenção deste molde.

Uma segunda etapa consistiu na reação de amplificação (PCR), utilizando o molde anterior resultante da reação de extensão. A reação foi montada utilizando 2µl da reação de extensão; 100 picomols dos “primers” S1 e R3 e o restante dos reagentes utilizados na reação de extensão em igual concentração, sendo o volume final de 25µl. A reação foi realizada num termociclador (PTC-100, MJ Reseach, Inc.) com incubação inicial de 2 min a 94°C, seguidos por 5 ciclos consecutivos a 94°, por 30 seg., 45°, por 20 seg. e extensão por 20 seg. a 68°C, seguidos por mais 20 ciclos alterando apenas a temperatura de hibridização dos “primers” de

45° para 55°C. A reação foi finalizada com uma extensão a 68°C por 5 min. O produto de PCR referente a um fragmento de DNA codificando a S100A12 (representado pela figura 3.1), foi submetido à análise em gel de agarose 0,8% em tampão TAE [1X].

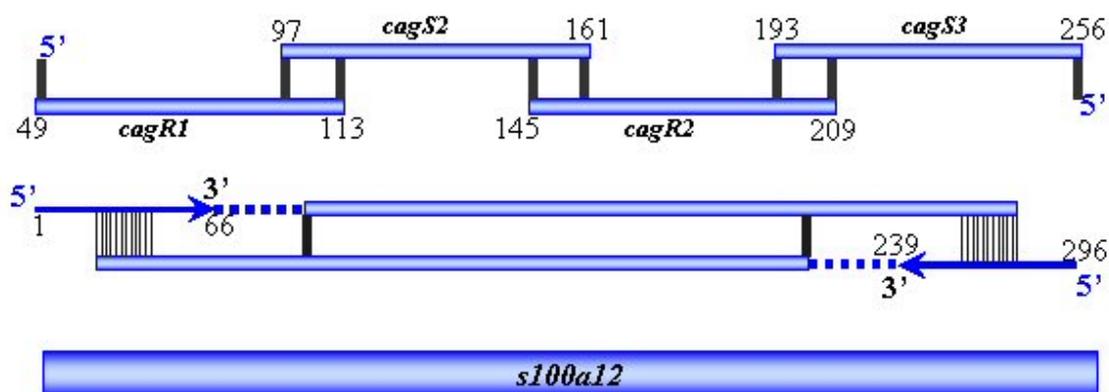


Figura 3. 1 Esquema geral da montagem do gene sintético. Os números remetem à posição do nucleotídeo correspondente na seqüência do gene sintético e os “primers” aparecem em itálico.

3.2 - Clonagem do gene sintético *s100a12*

O produto final de PCR foi então clonado no vetor de propagação *pGEMT-Easy* (Promega) sob as condições recomendadas no manual do fabricante. Sucintamente, com o produto de PCR foi preparada uma mistura de ligação utilizando uma proporção de 3:1 de inserto (o produto de PCR adenilado) e vetor, ou seja, 150ng de inserto para 50ng de vetor, nas condições listadas na tabela 3.1, formando o vetor de propagação denominado *pGEMTs100a12*. Este vetor, após seqüenciado foi utilizado na subclonagem para os vetores de expressão pTYB2 e pET29b.

Tabela 3. 1 Reação da mistura de ligação do inserto no vetor de clonagem pGEMT-Easy (**Invitrogen*).

Reagentes	Quantidade Final
Vetor <i>pGEMT-Easy</i>	50 ng
Inserto	150 ng
Tampão T4 DNA Ligase* [2x]	5 µL
T4 DNA Ligase* [3 U/µL]	3 U
Água MilliQ	1,5 µL
Volume Final	10 µL

Dada a necessidade de uma construção gênica que codificasse a proteína de sem qualquer fusão (pET29a) ou apenas com um hexapeptídeo de histidinas fusionado e que pudesse ser removido facilmente, novos “primers” foram sintetizados. Assim, para proporcionar a subclonagem nos vetores de expressão pET28a(+) e pET29a um novo “primer” acrescido de um códon de parada e um sítio de clivagem reconhecido pela *Bam*HI (representado abaixo), foi utilizado.

Primer – CagcRev-Bam:

5'CGG GAT CCT CAT TAT TCT TTG TGG ATG TTG TCG3'

A reação de amplificação foi montada utilizando como molde 50ng do vetor *pGEMTs100a12*; 100 picomols dos “primers” S1 e CagcRev-Bam, 0,2 mM de dNTPs; 0,5 U de *Taq DNA* polimerase (*Invitrogen*); tampão da enzima com 2,5 mM de sulfato de magnésio e água MilliQ. O volume total da reação foi de 50 µl. A amplificação foi realizada num termociclador (PTC-100, Mj Reseach, Inc.) sob incubação inicial de 2 min a 94°C, seguidos por 5 ciclos consecutivos de 94°, por 30 seg., 55°, por 20 seg. e 68°C por 20 seg.; seguidos por mais 20 ciclos alterando apenas a temperatura de hibridização de 55° para 60°C. O produto de PCR referente ao gene *s100a12*, após análise em gel de agarose 0,8% em tampão TAE [1X], foi inserido no vetor *pGEMT-Easy*, por meio da preparação de uma mistura de ligação nas

mesmas condições listadas na tabela 3.1, formando o vetor de propagação denominado *pGEMTs100a12Bam*.

As misturas de ligação foram incubadas “overnight”, a 8°C. A seguir, 2 µL da mistura foram utilizados para transformar, por choque térmico, células de *E. coli* da linhagem DH5-α competentes por CaCl₂ (Ausubel,1995). As colônias transformantes foram cultivadas em meio LB-ágar contendo 0,5mM de IPTG; 0,1mg/mL de X-gal; 0,1mg/mL de ampicilina, a 37°C, “overnight”. Das colônias selecionadas, identificadas visualmente pela cor branca, o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina e submetido à análise de restrição com as enzimas *Nde* I (2,5U) e *Xho* I para o *pGEMTs100A12* ou *Nde*I e *Bam*HI para *pGEMTs100a12Bam*, os resultados foram visualizados em gel de agarose 0,8% em tampão TAE [1X].

Os clones positivos foram seqüenciados pelo método do didesoxinucleotídeo marcado [Sanger, 1977] em um seqüenciador automático ABI-Prism 377 (Perkin Elmer), segundo instruções do fabricante, realizado no laboratório do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos.

3.3 - Subclonagem nos diversos vetores de expressão

A partir de um clone com a seqüência correta, o fragmento de DNA codificando a S100A12 foi extraído e subclonado em diversos vetores de expressão bacterianos. O vetor de propagação contendo o gene em questão (*pGEMTs100a12*) e os vetores de expressão pTYB2 (*New England*) e pET29b (*Novagen*) foram digeridos com as endonucleases de restrição *Nde* I e *Xho* I, incubadas por quatro horas, a 37°C. Outras reações de digestão com as endonucleases de restrição *Nde* I e *Bam*HI foram realizadas com vetor *pGEMTs100a12Bam* e os vetores de expressão pET28a(+) e pET29a (*Novagen*), figura 3.2, sob incubação por quatro horas, a

37°C. Vetores e insertos digeridos foram purificados utilizando o kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e quantificados em gel de agarose 0,8%.

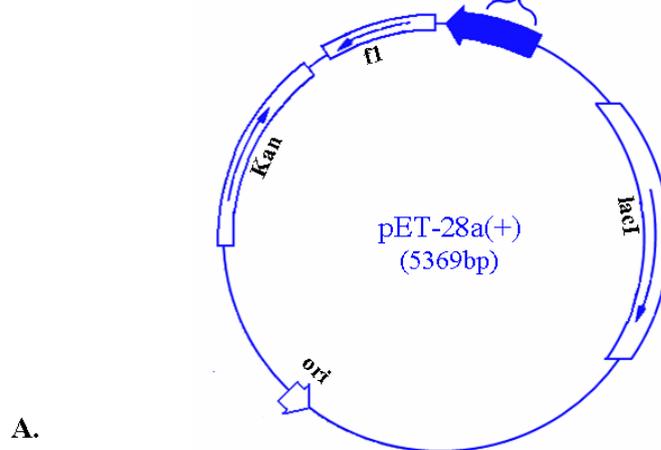
Com os vetores de expressão clivados e purificados, o próximo passo consistiu na ligação dos insertos aos vetores já linearizados, sendo a razão molar de vetor e inserto 1:10 para pTYB2 e pET29b e 1:8 para pET28a e pET29a. As misturas de ligação foram incubadas “overnight” a 8°C, e estão descritas na tabela 3.2.

Tabela 3. 2 Reação da mistura de ligação do inserto nos vetor de propagação (**Invitrogen*).

<i>Reagentes</i>	<i>pTYB2</i>	<i>pET28a</i>	<i>pET29a</i>	<i>pET29b</i>
Inserto	42ng	45ng	45ng	60ng
Vetor	100ng	100ng	100ng	100ng
Tampão da T4 DNA ligase* [5X]	[1X]	[1X]	[1X]	[1X]
T4 DNA ligase* [3U/ µL]	1U	1U	1U	1U
Volume Final	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Após a incubação, a mistura de ligação foi utilizada na transformação de células de *E.coli* DH5α, competentes por tratamento com cloreto de cálcio (protocolo descrito em Ausubel,1995). As colônias transformantes foram selecionadas pela resistência ao antibiótico específico (30 µg/mL canamicina para o pTYB2 ou 50 µg/mL ampicilina para pET28a ou pET29a ou b). De cada construção, quatro colônias tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos e submetidos à análise de restrição com as enzimas adequadas [*Nde*I (2,5U) e *Xho*I (5U) ou *Bam*HI (10U)], analisados em gel de agarose 0,8% com tampão TAE [1X].

His-Tag
 MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTKLEDHLEGIINIFHQYSVRLGHYDTLIKRELKQL
 ITKELPNTLKN TKDQG TIDKIFQNL DANQDEQVSFKEFVVLVTDVLT AHDNIHKE



MTKLEDHLEGIINIFHQYSVRLGHYDTLIKRELKQLITKELPNTLKN
 TKDQG TIDKIFQNL DANQDEQVSFKEFVVLVTDVLT AHDNIHKE

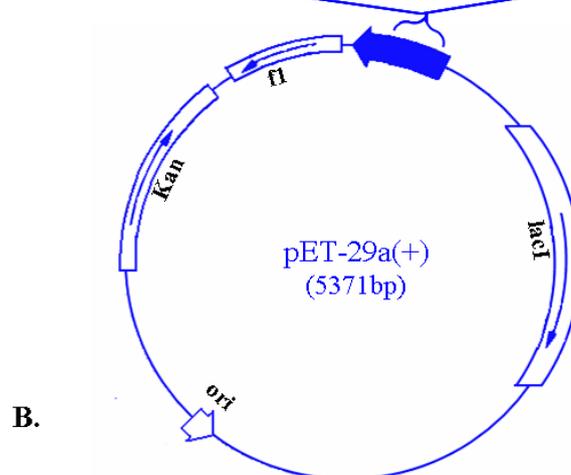


Figura 3. 2 A) Vetor pET-28a(+), seqüência primária da rS100A12-HisN; f1, origem f1; Kan, gene que confere resistência à kanamicina; ori, origem; e LAC, operador lac.; **B) Vetor pET-29a(+)**, seqüência primária da rS100A12; f1, origem f1; Kan, gene que confere resistência à kanamicina; ori, origem; e LAC, operador lac.; Figura modificada do manual de instruções pET-vectors, Novagem.

3.4 - Expressão heteróloga

Os plasmídeos recombinantes produzidos nos vetores de expressão pTYB2, pET28a, pET29a e pET29b foram denominados pS100A12-inteína, pS100A12-HisN, pS100A12 e pS100A12-HisC, respectivamente. Estes foram utilizados na transformação de células de *E. coli* BL21(DE3), competentes por cloreto de cálcio [Ausubel, 1995], para expressão.

As colônias transformantes foram inoculadas em meio LB, contendo o antibiótico adequado de seleção, e crescidas a 37°C, sob agitação até a cultura atingir uma densidade óptica (D.O.) de 0.6-0.8 em 600nm. Em seguida testes de expressão da proteína recombinante foram realizados em diferentes concentrações (0,01, 0,1 e 0,4mM) do indutor (IPTG), por quatro horas à 37°C e “overnight” a 22°C. A produção da proteína recombinante foi monitorada pela retirada de alíquotas da cultura a cada hora, submetidas à análise em SDS-PAGE 15% [Laemmli, 1970] e SDS-PAGE 16% em tampão tricina (tricina 0,1M em Tris 0,1M e SDS 0,1%) [Schägger & Jagow 1987]. Ao final da indução, a cultura foi centrifugada a 5000xg durante 10 minutos, a 4°C, sendo o precipitado (células) estocado a -20°C.

3.4.1 Análise da solubilidade da proteína recombinante

As células foram descongeladas e ressuspensas nos tampões: para rS100A12-inteína um tampão contendo 10mM de fosfato de sódio pH7,0; 150mM de KCl; 0,1mM de EDTA, adequado para a purificação em resina de quitina (*New England*); para a rS100A12-HisN e rS100A12-HisC, tampão contendo Tris 20mM pH8,0 e NaCl 500mM, adequado para a purificação em resina de *Ni-NTA Superflow* (Quiagen); e a rS100A12 em tampão contendo Tris 20mM pH8,0 e NaCl 300mM. A lise celular foi realizada em alíquotas de 5mL com auxílio de um sonicador operando em sua potência máxima, por sete ciclos com intervalos

regulares de 30 segundos de repouso em gelo entre cada pulso. O extrato resultante foi centrifugado a 20000xg a 4 °C, por 30 minutos, dos quais alíquotas do precipitado e do sobrenadante foram retiradas e submetidas à SDS-PAGE 15% e SDS-PAGE 16% em tampão tricina.

3.5 - Purificação das proteínas recombinantes

3.5.1 rS100A12-inteína: cromatografia de afinidade

A purificação da proteína recombinante em fusão com a inteína foi realizada em resina de quitina (1mL), previamente equilibrada com o tampão de ressuspensão (10mM de fosfato de sódio pH 7,0; 150mM de KCl; 0,1mM de EDTA). O sobrenadante do extrato bruto foi aplicado à coluna sob um fluxo de 0,5mL/min e a resina foi lavada em seguida com 10 volumes de tampão de ressuspensão. Então foram aplicados 3 volumes do tampão de clivagem (tampão de ressuspensão acrescido com 30mM de DTT), sob o fluxo de 1mL/min, para que os grupos tiol do DTT ficassem espalhados pela resina induzindo a clivagem da proteína de fusão. A coluna foi incubada “overnight” a 8°C, para garantir o máximo de eficiência na clivagem. Finalmente, a proteína foi eluída com 3 volumes de tampão de ressuspensão. Em todos os passos, amostras foram recolhidas e submetidas à SDS-PAGE 15% para análise.

3.5.2 rS100A12-HisN e rS100A12-HisC: cromatografia de afinidade por metal quelado

A purificação de ambas as proteínas seguiu o mesmo protocolo, já que as construções diferiram apenas na posição da cauda de histidinas, a rS100A12-HisN com a cauda localizada na porção N-terminal e a rS100A12-HisC com a cauda de histidinas na porção C-terminal. A técnica utilizada foi a cromatografia de afinidade por metal quelado, na qual o níquel

covalentemente ligado à matriz possui alta especificidade pelos resíduos de histidina presentes na proteína (QIAexpressionist). As purificações foram realizadas em 4mL de resina de Ni-NTA-Agarose, como esquematizado na Figura 3.3, pré-equilibrada com o tampão utilizado para ressuspensão das células. O extrato bruto foi aplicado à resina e incubado por cerca de 30 minutos sob 30rpm de agitação a 22°C. Em seguida a resina foi empacotada numa coluna e lavada com 10 volumes de tampão de ressuspensão. Para eluição, foi realizado um gradiente de concentração de imidazol de 10 a 500mM. Amostras ao longo do gradiente foram retiradas e analisadas em SDS-PAGE 16% em tampão tricina. As proteínas eluídas foram dialisadas, em saco de diálise de 3kDa de poro, contra tampão Tris 20mM pH 8 contendo 10mM de NaCl, para retirada do imidazol.

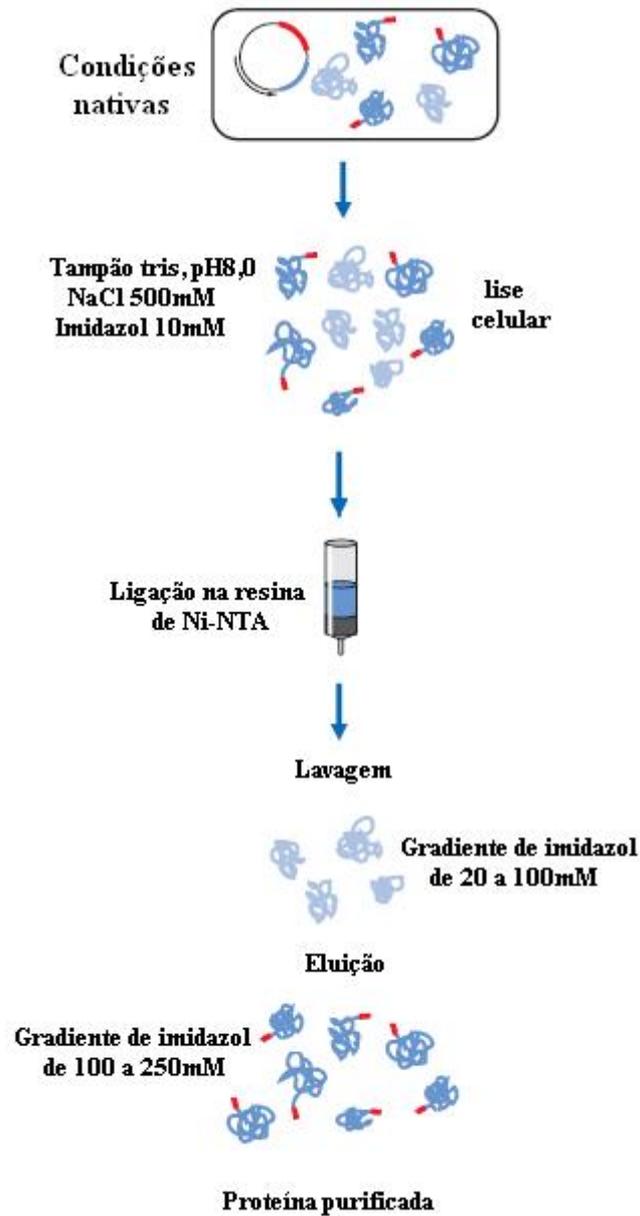


Figura 3. 3 Cromatografia em resina de níquel. Purificação de proteínas recombinantes expressas em *E.coli* por cromatografia de afinidade por metal quelado (Figura adaptada do manual QIAexpressionist).

3.5.3 *rS100A12*

a) Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia por exclusão molecular foi utilizada na primeira etapa da purificação da construção da rS100A12 sem fusão. Esta técnica tem como fundamento a separação de proteínas, em uma dada mistura, devido a seu tamanho, forma e suas propriedades hidrodinâmicas. O sobrenadante (extrato bruto) contendo a rS100A12 foi aplicado em coluna Superdex 75 (10/30, GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão tris 20mM pH8,0 contendo 300mM de NaCl, sob um fluxo de 0,5mL/min, acoplada a um sistema Äkta Explorer 10 (Amersham Pharmacia Biotech). A proteína foi eluída com o tampão de equilíbrio, monitorada em 280nm com coleta de frações de 1mL. As frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 16% em tampão tricina e as frações correspondentes a rS100A12 foram dialisadas contra tampão Tris 20mM pH8,0.

b) Cromatografia de troca iônica

Após a diálise das frações eluídas da Superdex 75, estas foram aplicadas numa coluna Mono Q HR 5/5 (GE Healthcare), previamente equilibrada com Tris 20mM pH 8,0 (tampão A). A purificação foi realizada utilizando o sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare) sob um gradiente linear de NaCl, de 0,1M a 1M em 20 min. A velocidade do fluxo foi de 0,5mL/min, monitorada pela a absorvância em 280nm, e o eluato coletado em frações de 1mL. As frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 16%, tampão tricina.

3.5.4 *Eletroforese em gel desnaturante*

As amostras de rS100A12 obtidas em todas as etapas de suas produção foram submetidas a SDS-PAGE, segundo método proposto por Schängger & von Jagow em 1987, que utiliza géis de poliacrilamida a 16% e tampão de tricina 0,1M em Tris 0,1M e SDS 0,1%, obtendo assim melhor resolução para proteínas pequenas (5 a 20 kDa). O sistema utilizado para a corrida eletroforética foi um sistema vertical da Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia. Os marcadores de massa molecular (MM) utilizados foram: albumina de soro bovino, BSA (66kDa), ovalbumina, OVA (45kDa), anidrase carbônica bovina, ACB (30kDa), inibidor de tripsina de soja, ITS (20,1kDa) e citocromo C, CIT-C (12,4kDa). Os marcadores de baixa massa molecular foram fragmentos de mioglobina (1533 aminoácidos): fragmentos de 1 a 131 (16,9kDa), 56 a 153 (14,4kDa), 56 a 131 (10,7kDa), 1 a 55 (8,1kDa) a 132 a 153 (6,2kDa).

3.5.5 *Determinação da concentração protéica*

O cálculo da concentração de proteínas foi determinado pela absorvância em 280nm, medido em um espectrofotometro U-2001 Hitachi, utilizando o coeficiente de extinção teórico, baseado na composição de aminoácidos [Gill e Hippel, 1989]. O coeficiente de extinção teórico calculado para rS100A12 e rS100A12-HisN, teve o mesmo valor para ambas, foi $\epsilon_{280} = 2980 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, obtido através de um conjunto de programas encontrados no ExPASy (Expert Protein Analysis System, <http://ca.expasy.org>).

3.6 - Determinação do estado de oligomerização da rS100A12

A reação de *cross-linking* química foi usada para verificar o estado de oligomerização da proteína apo-rS100A12. A proteína (10 μ M) foi incubada em tampão HEPES 20mM, pH8,0, contendo 10mM de NaCl e 50mM de DSS, num volume final de reação de 100 μ L, a 22°C por uma hora. A reação foi interrompida adicionando tampão Tris-HCl 50mM, pH7,5 e analisada em SDS-PAGE 15%.

Outra forma para determinar e confirmar a oligomerização da rS100A12 utilizada foi à cromatografia de exclusão molecular da proteína pura, realizada em uma coluna Superdex-75 (10/30, GE Healthcare) acoplada ao sistema automatizado ÄKTA Purifier (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,0, contendo 10mM de NaCl e a proteína eluída com tampão de equilíbrio. Uma amostra contendo 25 μ M de rS100A12 foi aplicada à coluna e seu volume de eluição foi comparado ao volume de eluição dos padrões de massa molecular. O volume de eluição relativo foi calculado como: $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_c - V_0)$, onde V_e é o volume de eluição, V_0 é o volume do *void* e V_c é o volume geométrico da coluna. A curva de calibração foi construída K_{av} versus $\log(\mathbf{M})$. A massa molecular da apo-rS100A12 foi estimada por meio da curva de calibração. Os padrões de massa molecular utilizados foram albumina de soro bovino, BSA (66kDa), ovalbumina, OVA (45kDa), quimotripsinogênio A (25,0kDa), Ribonuclease A (13,7kDa).

3.7 - Desnaturação e renaturação

3.7.1 Tampões e soluções

Todos os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram do mais alto grau de pureza. Para cobrir a faixa de pH entre 3 a 11 foram utilizados os seguintes tampões: glicina – HCl (pH 3,0), acetato de sódio - HCl (pH 4,0), MES-HCl (pH 6,0), Tris-HCl (pH 7,5-8,0), bicina-NaOH (pH 8,5), glicina-NaOH (pH 10-10,5), todos preparados numa concentração final de 20mM, contendo 10mM de NaCl. A solução estoque de uréia foi preparada em tampão Tris-HCl pH 8,0, contendo 10mM de NaCl, numa concentração final de uréia de 8M.

3.7.2 Reação de desnaturação química com uréia

As reações de desnaturação foram realizadas com três concentrações diferentes de rS100A12-HisN: 15 μ M, 25 μ M e 50 μ M. As soluções foram incubadas “overnight” em tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,0, contendo 10mM de NaCl e 1mM de EGTA, à 22°C, contendo uréia. A concentração de uréia variou de 0 a 7,0M (0M; 0,25M; 0,5M; 0,75M; 1M; 1,25M; 1,5M; 1,75M; 2M; 2,25M; 2,5M; 2,75M; 3M; 3,25M; 3,5M; 3,75M; 4M; 4,25M; 4,5M; 4,75M; 5M; 5,25M; 5,5M; 5,75M; 6M; 7M). A reação de desnaturação foi realizada com a diluição cuidadosa da proteína (1:50 vezes) em tampão com concentração crescente de uréia sob agitação suave [Price, 1997]. Todos os experimentos foram executados em triplicata.

3.7.3 Renaturação químico com uréia

Soluções contendo 768 μ M de rS100A12-HisN em tampão Tris-HCl 20mM, pH 8.0, contendo 10mM de NaCl, 1mM de EGTA e 5M de uréia, foram incubadas “overnight”, à temperatura ambiente, 22°C, para que ocorresse a desnaturação. As amostras assim desnaturadas foram diluídas cuidadosamente, para uma concentração final de proteína de 25 μ M, em tampão Tris-HCl 20mM, pH 8.0, contendo 10mM de NaCl e 1mM de EGTA, de modo que as soluções finais obtidas tinham concentrações de uréia iguais a: 0M; 0,25M; 0,5M; 0,75M; 1M; 1,25M; 1,5M; 1,75M; 2M; 2,25M; 2,5M; 2,75M; 3M; 3,25M; 3,5M; 3,75M; 4M; 4,25M; 4,5M; 4,75M; 5M; 5,25M; 5,5M; 5,75M; 6M; 7M [Price, 1997]. Todos os experimentos foram executados em triplicata.

3.8 - *Medidas espectroscópicas*

3.8.1 Dicroísmo Circular (CD)

Dicroísmo circular (CD) é uma espectroscopia quiróptica, ou seja, é uma técnica espectroscópica que utiliza a interação diferencial de moléculas com a luz circularmente polarizada. O fenômeno de CD consiste na absorção diferencial da luz circularmente polarizada a esquerda e a direita por uma molécula quiral, ou seja, uma molécula opticamente ativa (proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos). Como as proteínas estão repletas de centros quirais (carbonos α e carbono β da treonina e isoleucina) distribuídos e arranjados ao longo da cadeia principal em hélices alfa, folhas beta, estruturas desordenadas e outras, a estrutura secundária dessas macromoléculas podem ser caracterizadas e quantificadas por espectroscopia de CD [Cantor, 1980].

Na aplicação dessa técnica, o feixe plano polarizado é decomposto através de um modulador, em duas componentes: luz circularmente polarizada à direita, r, e luz circularmente polarizada à esquerda, l, (figura 3.4 A). Se, após a passagem através da amostra, as componentes l e r são absorvidas igualmente haverá uma regeneração da radiação polarizada no plano original. Entretanto, se uma das componentes é absorvida pela amostra numa intensidade maior que a outra, a radiação resultante combinada estará elipticamente polarizada, traçando uma elipse (figura 3.4 B) [Kelly, 1997].

Na prática, o espectropolarímetro não recombina as componentes, mas detecta as duas componentes, separadamente. Ele então mostrará o dicroísmo a um dado comprimento de onda expresso tanto como a diferença na absorbância das duas componentes ($\Delta A = \Delta_L - \Delta_R$) ou como a elipticidade em graus (θ), dado por

$$\theta = \tan^{-1} b/a,$$

onde b e a são os eixos menores e maiores da elipse resultante, como mostrado na figura .

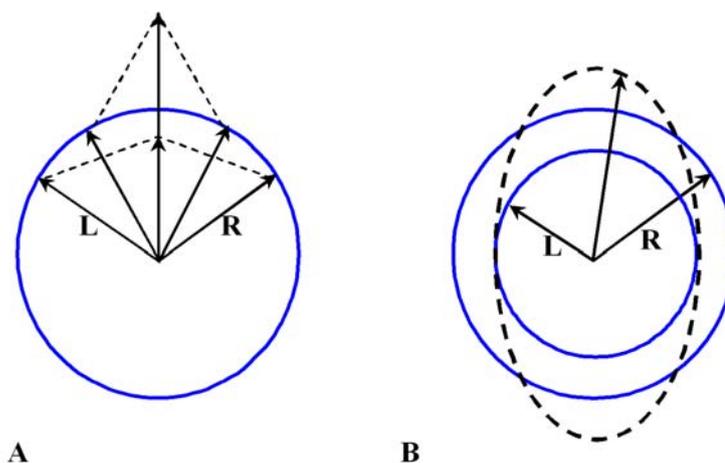


Figura 3. 4 Origem do efeito de Dicroísmo Circular. Decomposição do feixe plano polarizado em duas componentes circulares à esquerda (L) e à direita (R), antes (A.) e depois (B.) de passar pela amostra. Modificado a partir de Kelly & Price, 1997.

Existe uma relação numérica simples entre ΔA e θ (θ em graus), isto é, $\theta = 32,98 \Delta A$.

Uma das vantagens é que vários aspectos da estrutura protéica em solução podem ser medidos. Estudos na região do ultravioleta distante (tipicamente 240nm a 190-180nm) podem ser utilizados para avaliar, quantitativamente, o conteúdo total de estrutura secundária de proteínas (figura 3.5). Nesta região, o grupo que absorve é a ligação peptídica. Existe uma fraca, mas larga transição $n \rightarrow \pi^*$ centrada a cerca de 210 nm e uma intensa transição $\pi \rightarrow \pi^*$ em torno de 190nm [Robert, 1994].

Como quase todas as moléculas biológicas são opticamente ativas e a atividade óptica está intimamente relacionada com a conformação de uma molécula, a técnica de CD é amplamente utilizada em estudos de mudanças conformacionais, vizinhanças locais, interações de ligantes com proteínas, desnaturação e renaturação de proteínas, bem como estimativa do conteúdo das frações de estruturas secundárias [Kelly, 1997].

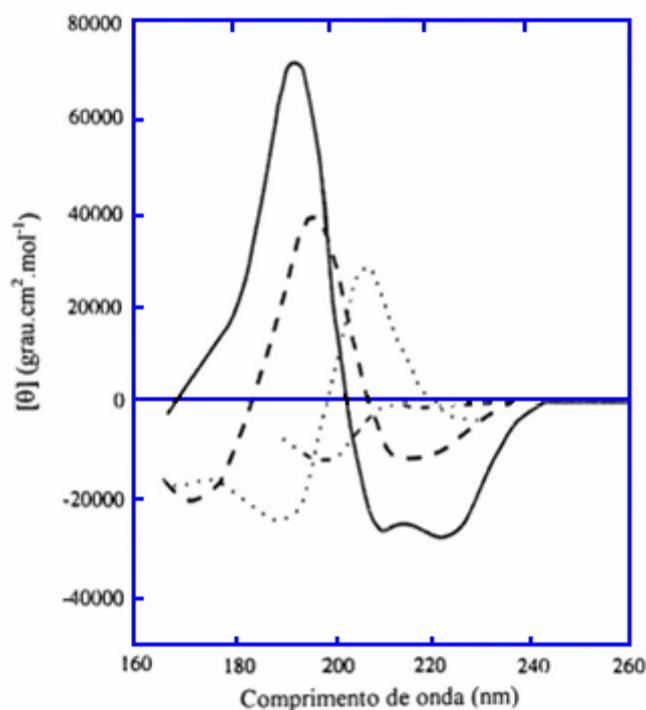


Figura 3. 5 Espectro de CD no UV distante, de vários tipos de estrutura secundária: curva sólida, α -hélice; tracejada longo, folha- β antiparalela; pontos, β -turn; e tracejado curto, estrutura irregular. Modificado a partir de Kelly & Price, 1997

3.8.2 *Dicroísmo circular (Far-UV CD)*

As medidas de desnaturação química e térmica foram monitoradas por *far-UV CD* realizadas em um espectropolarímetro JASCO J715 (JASCO Corporation, Japão), equipado com um sistema de controle de temperatura (Peltier) de temperatura. As soluções protéicas em concentrações de 5, 15, 25 e 50 μ M foram adicionadas em uma cubeta de quartzo, retangular, de 0,1cm de caminho óptico. Os espectros foram gravados num intervalo de 195 a 240 nm, à 22°C, em média de 16 acumulações, com uma velocidade de varredura de 100nm.min⁻¹, com largura de banda de 1nm e um tempo de resposta de 0,5s. Para os espectros contendo uréia, o intervalo monitorado foi de 212 a 250nm, devido à alta absorção do solvente em comprimentos de onda menores.

A desnaturação e a reversibilidade da rS100A12-HisN foi analisada tanto química como termicamente. As análises foram caracterizadas pela mudança nas medidas de elipticidade em 220nm induzidas pelo aumento ou diminuição da concentração do agente desnaturante ou pelo aumento da temperatura, variando de 20°C até 94°C sob um fluxo de 10°C por hora.

A reversibilidade térmica da rS100A12-HisN desnaturada foi analisada adquirindo o espectro de CD, nas mesmas condições iniciais, ou seja, após o aquecimento até 94°C a solução de proteína foi submetida a um “resfriamento” de 94°C para 20°C, variando 10°C por hora.

3.8.3 *Espectroscopia de Fluorescência*

Espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas no estudo e caracterização macromoléculas biológicas, sendo possível verificar mudanças

conformacionais discretas no microambiente dos grupos fluorescentes, denominados fluoróforos. [Eftink, 1991 e Lakowicz, 1983]. O princípio da técnica é a relação absorção/emissão de fótons por uma dada substância, como é ilustrado no diagrama de Jablonski (figura 3.6). A absorção de luz por um determinado grupo cromóforo excita seus elétrons do estado fundamental S_0 para um estado excitado S_1 . A partir deste estado, o excesso de energia é dissipado de várias formas, como reações fotoquímicas, decaimento radioativo (produzindo fluorescência) e decaimento não radioativo induzido por vários mecanismos de supressão [Eftink, 1991]. As duas últimas formas é que nos fornecem informações sobre alterações estruturais nas macromoléculas biológicas.

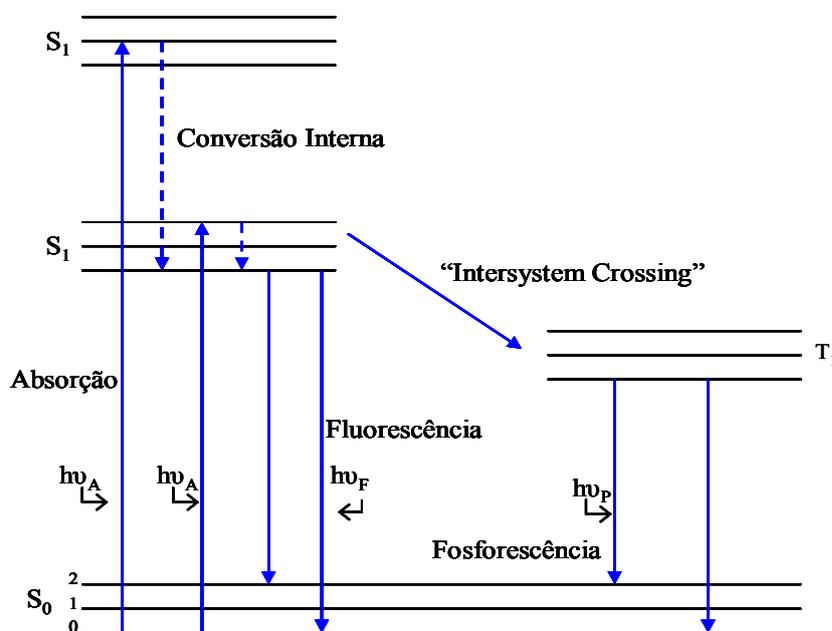


Figura 3. 6 Diagrama de Jablonski para a absorção de fótons do estado fundamental S_0 para os estados excitados S_1 .

Fluoróforos podem ser divididos em duas classes principais, conhecidas como fluoróforos intrínsecos ou extrínsecos. Fluoróforos intrínsecos são os que ocorrem naturalmente, tais como os aminoácidos aromáticos, NADH, flavinas e derivados de clorofila.

Já os fluoróforos extrínsecos são adicionados à amostra para promover a fluorescência onde não existe ou para mudar as propriedades espectrais da amostra [Campbel, 1984].

Há muitos exemplos em que a molécula de interesse não é fluorescente, ou o fluoróforo intrínseco não é adequado para o experimento desejado. Por exemplo, DNA e lipídios são totalmente destituídos de fluorescência. Neste caso, a fluorescência é obtida com a marcação da molécula com um fluoróforo extrínseco. Em proteínas, freqüentemente é desejado que sua marcação seja com fluoróforos que tenham maior comprimento de onda de excitação e emissão que seus aminoácidos aromáticos. Permitindo assim que a proteína marcada seja estudada na presença de outras proteínas não marcadas [Lakowicz, 1983].

Inúmeros fluoróforos estão disponíveis, apresentando diferentes formas de interação com a molécula de interesse, podendo esta ser uma ligação covalente ou não covalente. Os fluoróforos covalentes podem ter uma variedade de grupos reativos, para ligação com amina, grupo sulfidril, ou histidina das cadeias laterais de proteínas. Há um grande número de fluoróforos que podem ser usadas para marcar proteína de forma não covalente, tais como “naphthylamine sulfonic acids”, “1-anilino-8-naphthalenesulfonic acid” (ANS) e 6-(p-toluidinyl)naphthalene-2-sulfonic acid (TNS), mais utilizados. Fluoróforos desta classe freqüentemente possuem uma pequena emissão de fluorescência ou não apresentam fluorescência em água, entretanto quando ligado à proteína ou membrana apresentam grande intensidade de fluorescência [Campbel, 1984 e Lakowicz, 1983].

3.8.4 Fluorescência estática

As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, IL, USA), modo estático, equipado com um sistema circulador refrigerado (Neslab RTE-210). A largura das fendas utilizadas para os monocromadores de excitação e emissão foram 2 e 1, respectivamente. Os experimentos de fluorescência foram realizados utilizando

uma sonda fluorescente extrínseca, o ANS, monitorando a exposição de regiões hidrofóbicas da proteína por meio da ligação do ANS a essas regiões [Semisotnov, 1991]. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho ótico, à 22°C, com comprimento de onda de excitação de 360nm e a emissão monitorada de 400nm a 650nm. Em cada ensaio foi utilizado 250µM de ANS e 10µM de rS100A12, em tampão Tris-HCl 20mM pH 8.0 contendo NaCl 10mM, na ausência ou presença de Ca²⁺ e/ou Zn²⁺.

3.9 - Cálculos de parâmetros termodinâmicos dos processos de desnaturação

3.9.1 Energia da estabilidade conformacional da rS100A12-HisN

A partir dos resultados de desnaturação química obtidos por FarUV-CD foram construídas as isotermas de desnaturação, onde a elipticidade, expressa em termos da fração de proteína desnaturada, f_D , foi colocada no eixo das ordenadas e a variação da concentração do agente desnaturante no eixo das abscissas. A fração de proteína desnaturada foi calculada pela relação:

$$f_D = \frac{\theta_n - \theta_{obs}}{\theta_n - \theta_D} \quad \text{e} \quad f_n + f_D = 1 \quad (1)$$

em que θ_{obs} é a elipticidade da amostra em uma determinada condição, θ_D e θ_n são os valores de elipticidade para os estados desnaturado e nativo.

A análise das isotermas foi feita assumindo que a proteína é um homodímero e que a desnaturação ocorre como um processo reversível de dois estágios, sem a formação de intermediários passíveis de serem detectados. Assim, o ajuste das curvas foi realizado como descrito por Mallam e colaboradores 2005, aplicando o modelo homodimérico de dois estados, em que duas populações de proteína existem em equilíbrio, denominadas

homodímeros enovelados (D) e monômeros desenovelados (M). Esse modelo é descrito pela equação 2 e 3:



$$K_U = \frac{[M]^2}{[D]} \quad (3)$$

A concentração monomérica de proteínas presente na amostra, P_t , para qualquer concentração de uréia pode ser descrito em termos da fração de proteína desnaturada como descrito pela equação 4 [Gittleman & Matthews, 1990]:

$$P_t = 2[D] + [M] = (1 - f_D)P_t + f_D P_t \quad (4)$$

A partir das equações 3 e 4, K_U pode ser expresso em termos de P_t e f_D :

$$K_U = \frac{2P_t(f_D)^2}{(1 - f_D)} \quad (5)$$

Decorrente das equações anteriores, a energia livre de desnaturação (ΔG_U) para o modelo de dois estágios é uma função linear da concentração de uréia, onde $\Delta G_U^{H_2O}$ é a:

$$\Delta G_U = \Delta G_U^{H_2O} + m[U] = -RT \ln(K_U) \quad (6)$$

extrapolando a energia livre do desnaturação na ausência de uréia, m é a inclinação do gráfico ΔG_U versus a concentração de uréia $[U]$, ou seja, onde principia o desnaturação, e R e T são a constante dos gases e a temperatura absoluta, respectivamente. Combinando as equações 5 e 6 e rearranjando os valores de $\Delta G_U^{H_2O}$ em termos da fração de proteínas desenoveladas, a concentração de uréia pode ser obtida diretamente das curvas de desnaturação ajustando-as com a equação 7:

$$f_U = \frac{\sqrt{K_U^2 + 8K_U P_t} - K_U}{4P_t} \quad (7)$$

$$K_U = e^{\frac{-\left(\Delta G_U^{H_2O} + m[\text{denaturant}]\right)}{RT}} \quad (8)$$

A equação 7 pode ser rearranjada e resolvida para determinar $U_{1/2}$:

$$U_{1/2} = \frac{-\left[RT \ln(P_t) + \Delta G_U^{H_2O}\right]}{m} \quad (9)$$

As curvas de desnaturação foram ajustadas pela equação 7, utilizando para isso o programa Origin 7.0.

Resultados

4. Resultados

4.1 – Obtenção do gene sintético que codifica a S100A12

A seqüência gênica codificando os 91 aminoácidos da proteína S100A12 porcina foi desenhada baseada na seqüência de aminoácidos já publicada [Dell'Angelica, 1994], utilizando códons preferenciais para a expressão em *E. coli*. Seis “primers”, com tamanhos variando de 58 a 66 nucleotídeos, foram sintetizados e utilizados para construção do gene sintético (Figura 3.1). O gene sintético *s100a12* foi obtido com sucesso apresentando o tamanho esperado (~ 300 pb), tal como ilustra a figura 4.1.

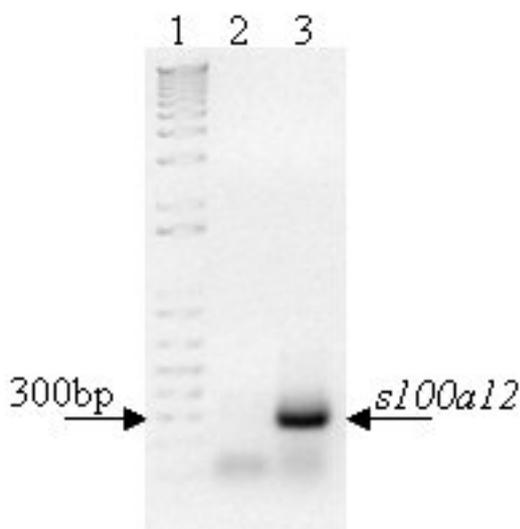


Figura 4. 1 Produção do fragmento sintético codificando a S100A12. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, TAE, corado com brometo de etídeo, mostrando: Coluna 1, marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Coluna 2, produto da reação de extensão dos “primers”; Coluna 3, banda de amplificação resultante da reação de PCR, correspondente ao fragmento de DNA que codifica a S100A12.

4.2 – Subclonagem e sequenciamento

O gene sintético foi inserido no vetor *pGEMT-Easy* (Promega), o qual carrega a resistência ao antibiótico ampicilina como marca de seleção, e propagado em células de *E. coli* DH5- α . A confirmação dos clones positivos, ou seja, que continham o inserto, foi realizada por análise de restrição do DNA plasmidial, visualizada em eletroforese em gel de agarose 0,8%. A análise mostrou duas bandas de tamanhos distintos correspondendo ao vetor *pGEMT-Easy* (3015pb) e ao inserto (300pb) em todas as colônias transformantes (figura 4.2).

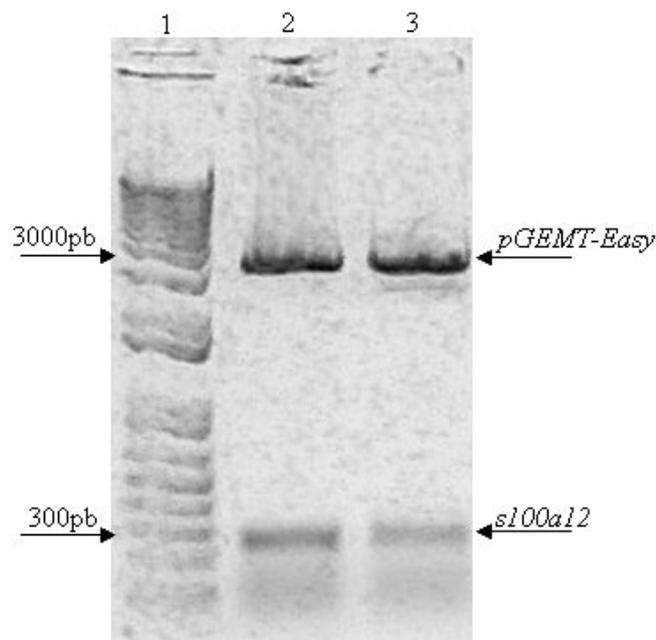


Figura 4. 2 Análise de restrição dos clones recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, TAE [1x], corado com brometo de etídeo e transiluminado sob luz UV, mostrando: Coluna 1, marcador de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Colunas 2 e 3, DNA plasmidial dos clones positivos submetidos à análise de restrição usando as endonucleases de restrição *Nde* I e *Xho* I.

Os clones transformantes que apresentaram o inserto de 300pb foram seqüenciados pelo método do didesoxinucleotídeo marcado, confirmando a presença do gene sintético inserido no vetor. A seqüência primária deduzida codifica uma cadeia polipeptídica de 91

resíduos de aminoácidos com 100% de identidade com a seqüência da S100A12 porcina, acrescida de um códon de iniciação (metionina) N-terminal. (figura 4.3).

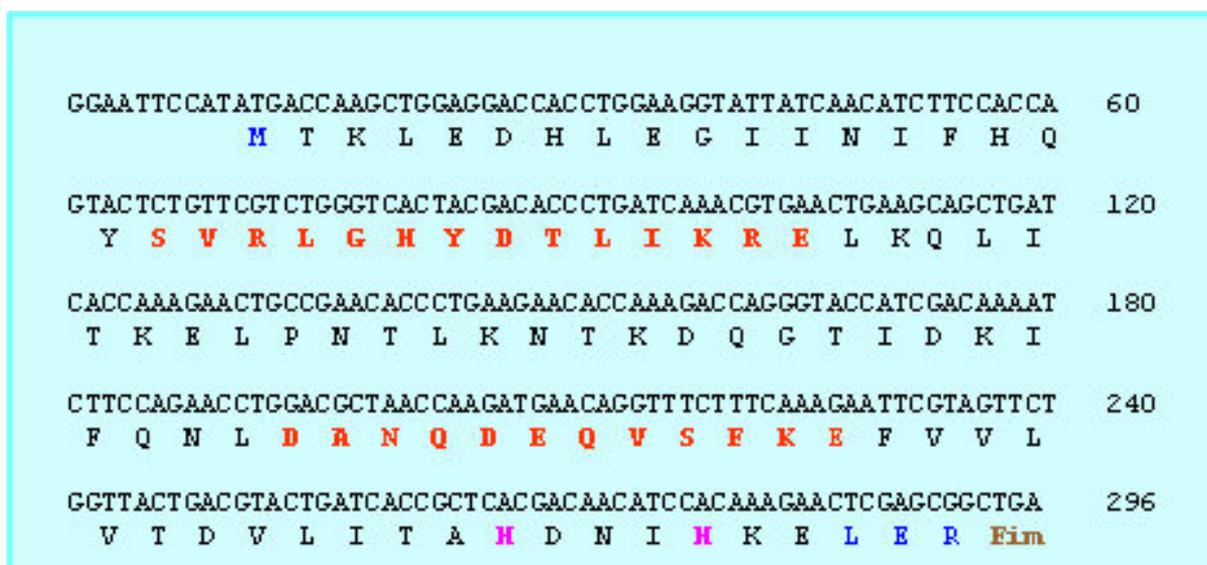


Figura 4.3 Seqüência de DNA produzida codificando a rS100A12 e seqüência primária correspondente – Em vermelho estão destacada os motivos “EF-hands”; em roxo, os sítios ligantes de zinco; em azul, resíduo não pertencente a S100A12 nativa.

A subclonagem do gene de interesse foi realizada com sucesso em diversos vetores de expressão bacterianos: pTYB2, pET28a, pET29a e pET29b. Estes vetores foram escolhidos por codificarem proteínas ou peptídeos carreadores que facilitam a purificação.

4.3 – Expressão heteróloga

A análise da expressão protéica foi realizada em SDS-PAGE, mostrada na figura 4.4, na qual é possível observar bandas de expressão adicionais frente ao conteúdo de proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3). A figura 4.4.A. exhibe a produção das proteínas, rS100A12-inteína e rS100A12-HisC, após a indução com IPTG (coluna 3 e 5, respectivamente). Na figura 4.4.A, coluna 3, pode ser observada uma banda de aproximadamente 66kDa, que corresponde a inteína (55kDa) fusionada a proteína de interesse de 10kDa. Na coluna 5, pode-

se observar uma banda intensa de aproximadamente 10kDa, relativa a produção da proteína rS100A12-HisC.

Os vetores pS100A12-HisN e pS100A12 também foram capazes de expressar com sucesso o gene sintético, produzindo as proteínas rS100A12-HisN (12kDa) e rS100A12 (10kDa), respectivamente (figura 4.4.B). A Figura 4.4.C. mostra a análise da solubilidade para todas as construções.

4.4– Purificação

4.4.1 Purificação da rS100A12-inteína

A purificação da proteína rS100A12 fusionada à inteína não foi bem sucedida, pois após o tempo de incubação da proteína de fusão na resina de afinidade e indução da autoclivagem com DTT, observou-se pela análise em SDS-PAGE que a proteína de fusão, rS100A12-inteína, não havia se ligado a resina de afinidade, toda a proteína de fusão solúvel saiu nas frações de lavagem da coluna. Desta forma, os experimentos com esta proteína de fusão não foram continuados.

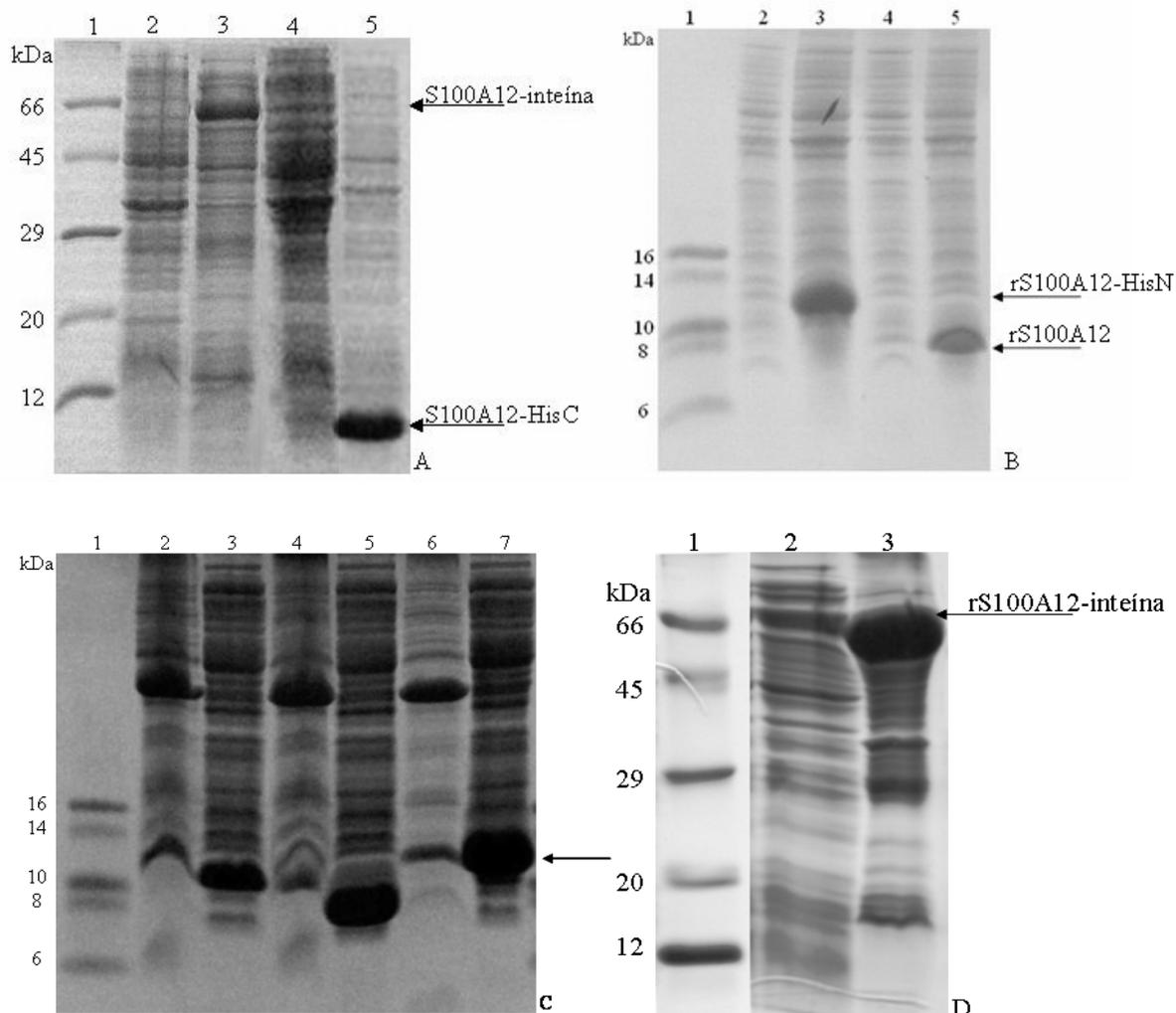


Figura 4. A e B.) Expressão da rS100A12-inteína, rS100A12-HisC, rS100A12-HisN e rS100A12 em *E. coli* BL21(DE3). A. SDS-PAGE 15% e B. SDS-PAGE 16% em tampão tricina. Géis corados com *Coomassie blue*. A. e B. mostrando: Padrão de massa molecular em kDa (1); Proteínas totais de *E. coli* BL21(DE3) provenientes de cultura não induzida (2 e 4); Cultura induzida com 0,1mM de IPTG “overnight” a 22°C (3 e 5). C. e D.) Análise de solubilidade da rS100A12-inteína, rS100A12-HisC, rS100A12-HisN e rS100A12. C. Análise de solubilidade para as proteínas recombinantes: rS100A12-HisN (2 e 3); rS100A12 (4 e 5); rS100A12-HisC (6 e 7). Padrão de massa molecular em kDa (1); Precipitado insolúvel da lise celular após centrifugação (2, 4 e 6); Fração solúvel da lise celular após centrifugação (3, 5 e 7). D. Análise de solubilidade para a rS100A12-inteína: Padrão de massa molecular em kDa (1); Precipitado insolúvel da lise celular após centrifugação (2); Fração solúvel da lise celular após centrifugação (3). As setas indicam as diferentes proteínas recombinantes obtidas.

Tabela 4. 1 Vetores utilizados para cada produção protéica com os respectivos pesos moleculares esperados para cada produção e o rendimento protéico para cada litro de cultura. (-) valores não cauculados.

Proteína	Vetor	Peso Molecular (kDa)	Rendimento (mg/L)
rS100A12	pET29a (+)	10,74	60
rS100A12-HisN	pET28a (+)	12,70	160
rS100A12-HisC	pET29b (+)	12,77	-
rS100A12-inteína	pTYB2	65,00	-

4.4.2 Purificação da rS100A12-HisN e rS100A12-HisC

A cromatografia de afinidade por metal quelado foi utilizada na purificação das proteínas recombinantes contendo cauda de histidina, rS100A12-HisN (6xHis no N-terminal) e rS100A12-HisC (6xHis no C-terminal). Ambas foram purificadas com sucesso, como mostrado na figura 4.5., com massa molecular aparente de aproximadamente 12kDa em SDS-PAGE, sendo a rS100A12-HisN ligeiramente maior.

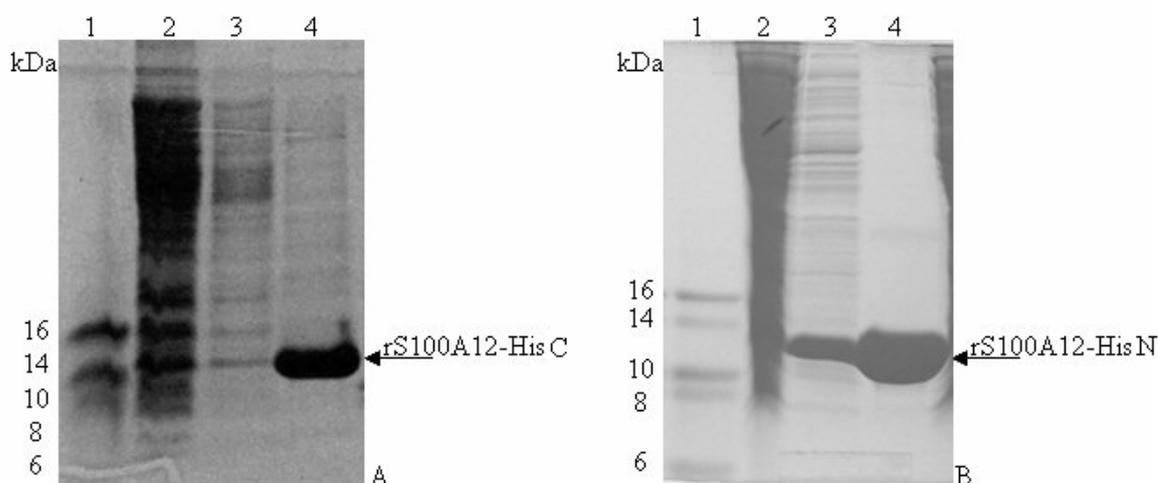


Figura 4. 5 Purificação da rS100A12-HisN e HisC em coluna de Ni-NTA – A. e B. SDS-PAGE 16% em tampão tricina. Coluna 1, padrão de massa molecular em kDa; Coluna 2, eluato das proteínas totais aplicadas a coluna (material não ligado); Coluna 3, proteínas totais da lavagem com 40mM de imidazol; Coluna 4, proteínas totais eluídas com 250mM de imidazol . As setas indicam bandas correspondentes às proteínas de interesse.

4.4.3 Purificação da rS100A12 por exclusão molecular

A purificação inicial do lisado de células contendo a rS100A12 foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (SEC), cujos picos eluídos foram analisados em gel SDS-PAGE 16% (tampão tricina). A análise permitiu localizar as frações contendo a rS100A12, correspondentes aos picos 15, 16 e 17, indicados na figura 4.6.

4.4.4 Cromatografia de troca iônica da rS100A12

Como pode ser observado na figura 4.6, as frações contendo a proteína recombinante ainda continham certa quantidade de contaminantes, exigindo desta forma um segundo passo cromatográfico para purificação. A figura 4.7 A mostra o perfil da cromatografia de troca iônica da rS100A12, eluída sob um gradiente de NaCl. Na figura 4.7.B. é possível visualizar a proteína o grau de pureza da proteína eluída em SDS-PAGE. O 1º pico observado na cromatografia refere-se ao material não ligado.

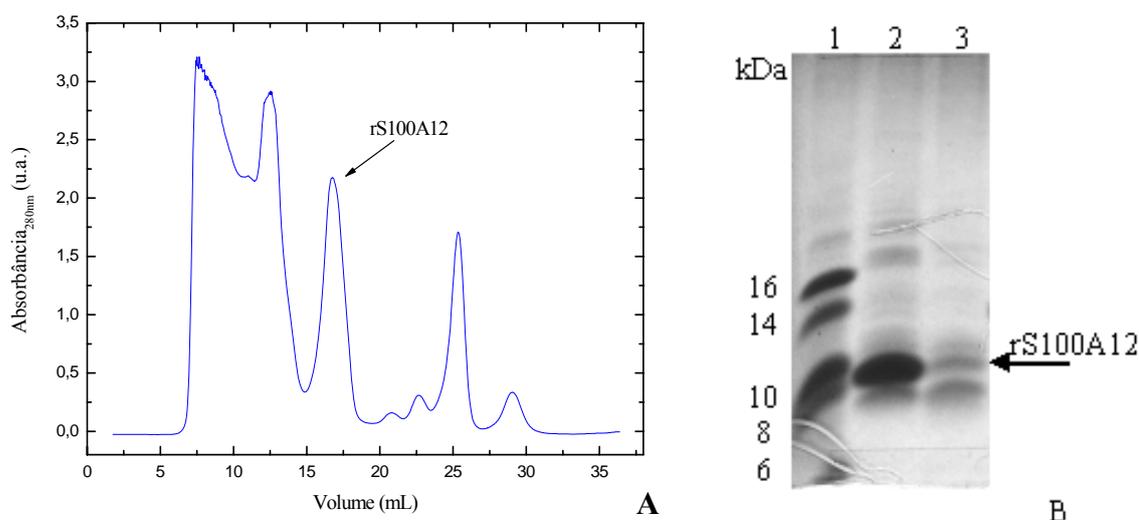


Figura 4. 6 Purificação da rS100A12 por SEC A. Cromatografia por exclusão molecular do extrato bruto da rS100A12 em Superdex 75, sendo que a seta indica o volume de retenção referente ao pico de eluição da proteína de interesse. B. Análise das amostras eluídas da Superdex 75. SDS-PAGE 16% em tampão tricina, mostrando: Coluna 1, padrão de massa molecular em kDa; Coluna 2, proteínas totais eluídas na fração 15; Coluna 3, proteínas totais eluídas na fração 16. A seta indica a banda da proteína recombinante.

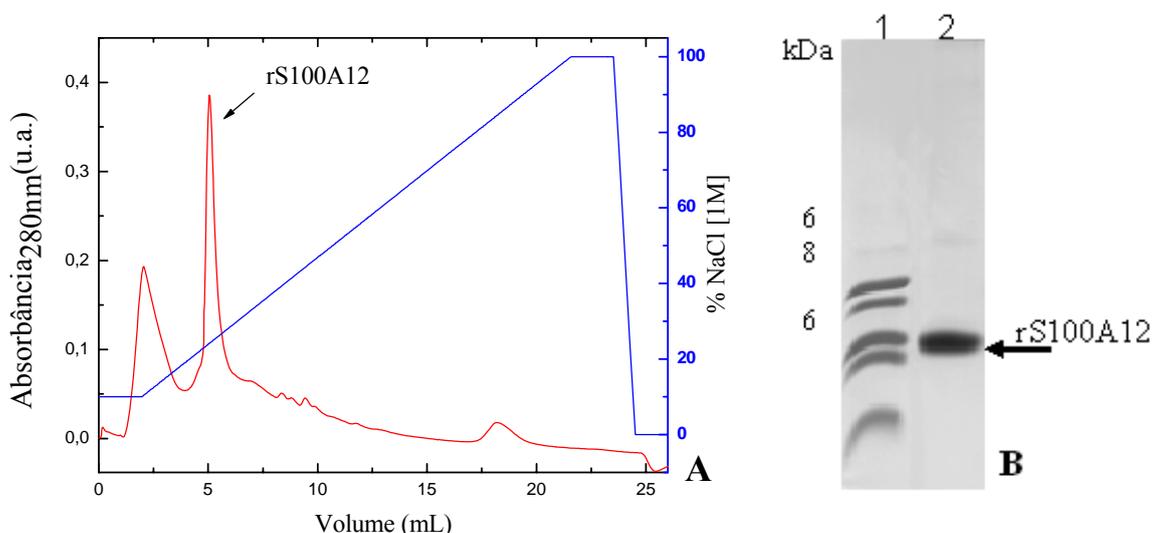


Figura 4. 7 Purificação da rS100A12 por cromatografia de troca iônica. A. Cromatografia das frações 16 provenientes da SEC. B. Análise da amostra eluída da Mono-Q. SDS-PAGE 16% em tampão tricina, corado com *Coomassie blue* - Coluna 1, padrão de massa molecular em kDa e Coluna 2, 2º pico eluído da Mono-Q, correspondente a rS100A12

4.5 - Determinação do estado de oligomerização da rS100A12

O estado oligomérico da proteína rS100A12 foi analisado por duas técnicas distintas, cromatografia de exclusão molecular (SEC) e “cross-linking”. O perfil de eluição da proteína

apo-rS100A12, ilustrado na figura 4.8, mostrou um único pico simétrico, correspondente a massa molecular aparente de 26 kDa. Este valor obtido equivale a aproximadamente o dobro do esperado para o monômero (~11 kDa), indicando assim que a proteína apo-rS100A12 é homodimérica em solução, nas condições analisadas. Este estado homodimérico foi também verificado no ensaio de “cross-linking” usando DSS, como pode ser visto na figura 4.8. A adição de íons divalentes (Ca^{2+} e Zn^{2+}) não alterou o estado de oligomerização da proteína (dados não apresentados).

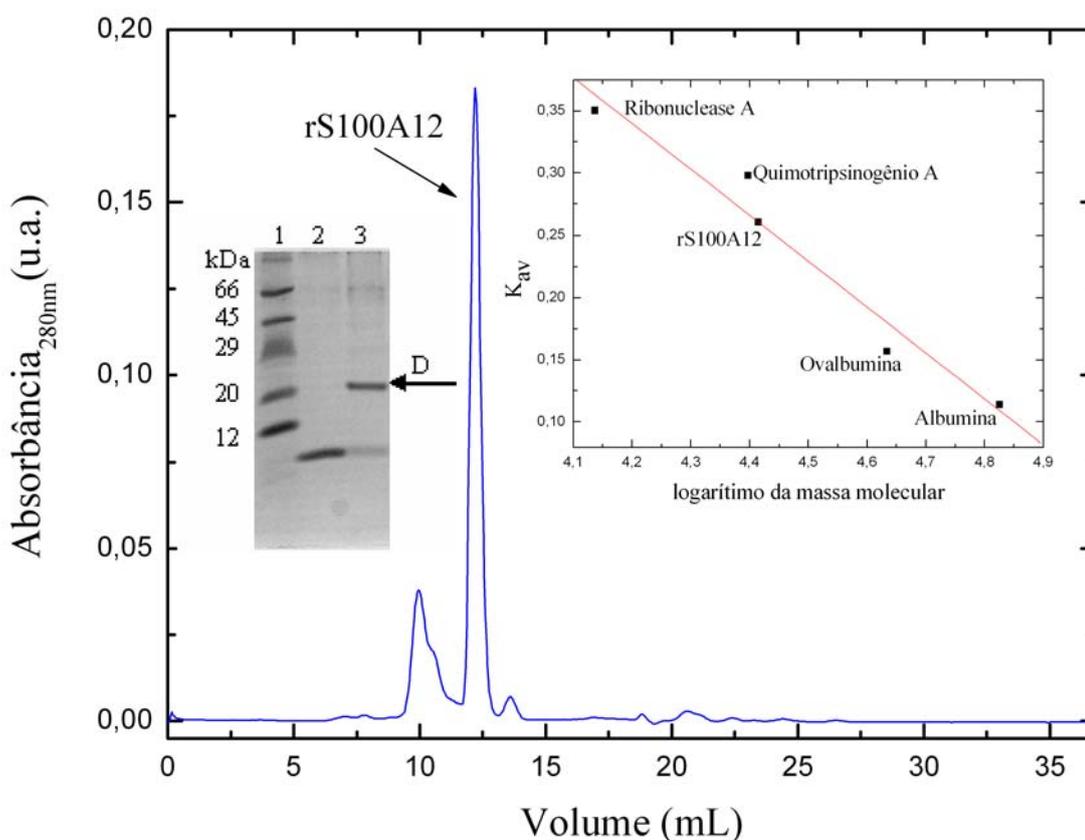


Figura 4. 8 Estado de oligomerização da rS100A12. Perfil cromatográfico de exclusão molecular da apo-rS100A12. O maior pico observado na SEC corresponde a uma proteína de massa molecular aparente de 26 kDa. A direita acima está inserida a curva de calibração da coluna utilizada. A esquerda está inserido o resultado do *cross-linking* (SDS-PAGE 16% em tricina). Coluna 1, padrão de massa molecular em kDa; Coluna 2, Proteína apo-rS100A12 (10μM); Coluna 3, Proteína apo-rS100A12 com DSS (10μM).

4.6 – Estudos espectroscópicos da rS100A12

4.6.1 Influência do pH na estabilidade da rS100A12

A influência do pH na estrutura secundária da rS100A12 foi estudada utilizando espectroscopia de dicroísmo circular (CD). A Figura 4.9 mostra o espectro de CD para apo-rS100A12-HisN em pH 8,0 a 20°C, caracterizado por duas bandas negativas em 222nm e 208nm. Estas bandas são características de proteínas contendo elementos de α -hélice em sua estrutura secundária. Os espectros de CD da proteína, a temperatura de 22°C, em diferentes pHs 4,0; 5,0; 7,5; 8,5; 9,5 e 10,5 não apresentaram alteração significativa em seus mínimos quando comparados com o espectro obtido em pH 8,0 (Fig. 4.9). O conjunto de resultados obtidos demonstra que o pH não causa modificações apreciáveis na estrutura secundária da proteína, à 22°C, detectáveis através da técnica de CD.

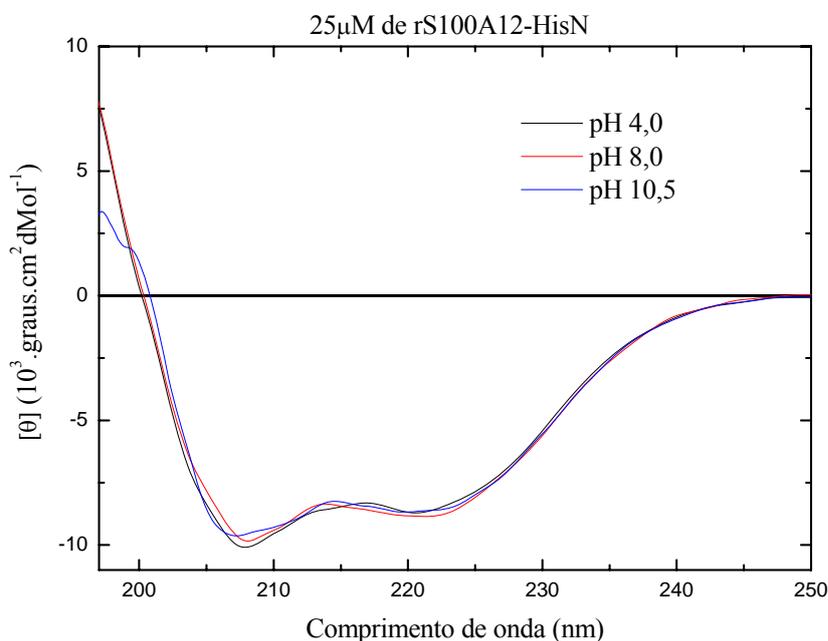


Figura 4. 9 Influência do pH na estrutura secundária da rS100A12-HisN – Espectro de CD a 25µM, nos pHs: 4,0 (—), 8,0 (—) e 10,5 (—).

4.6.2 *Estudos da estabilidade química*

Estudos de estabilidade estrutural mediante desestabilização por um agente químico foram realizados com a apo-rS100A12-HisN. A concentração do agente caotrópico, uréia, variou de 0 a 7M em pH8,0, a 22°C, em três concentrações distintas de proteína (15, 20 e 50 μM). Com o aumento na concentração de uréia na solução protéica pode ser observada uma diminuição concomitante do valor da elipticidade em 222nm, sugerindo uma perda cooperativa no conteúdo de α -hélice da estrutura secundária, mostradas nas figuras 4.10 e 4.11. A completa desnaturação ocorreu em 7,0M de uréia, uma vez que o espectro de CD corresponde ao de uma proteína que perdeu sua estrutura secundária ordenada.

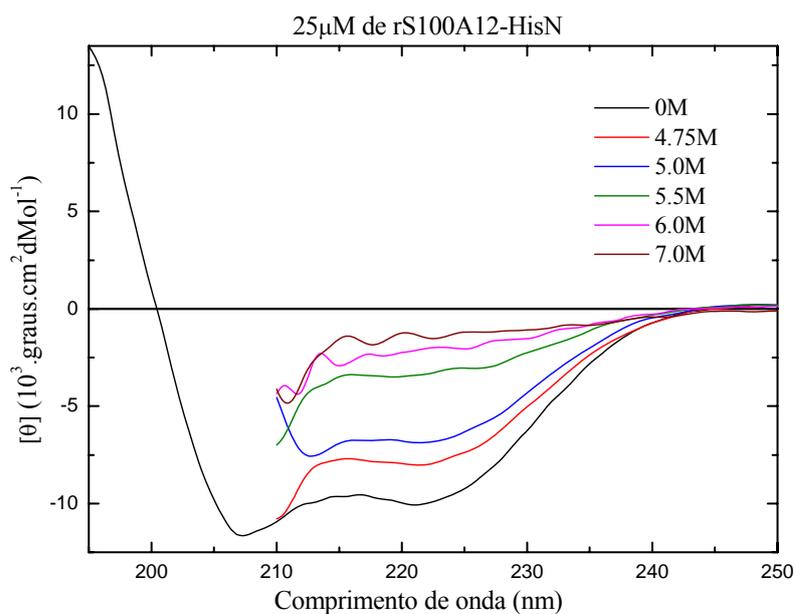


Figura 4. 10 Desnaturação química da rS100A12-HisN. Espectro de CD a 25 μM , em presença de concentrações crescentes de uréia.

A renaturação, utilizando como ponto de partida a proteína apo-rS100A12-HisN desnaturada em 7M de uréia, revelou que a desnaturação química é um processo reversível

(figura 4.11). A reversibilidade foi de aproximadamente 90%, ou seja, 90% da intensidade do sinal de CD do espectro inicial foi recuperado nas condições descritas.

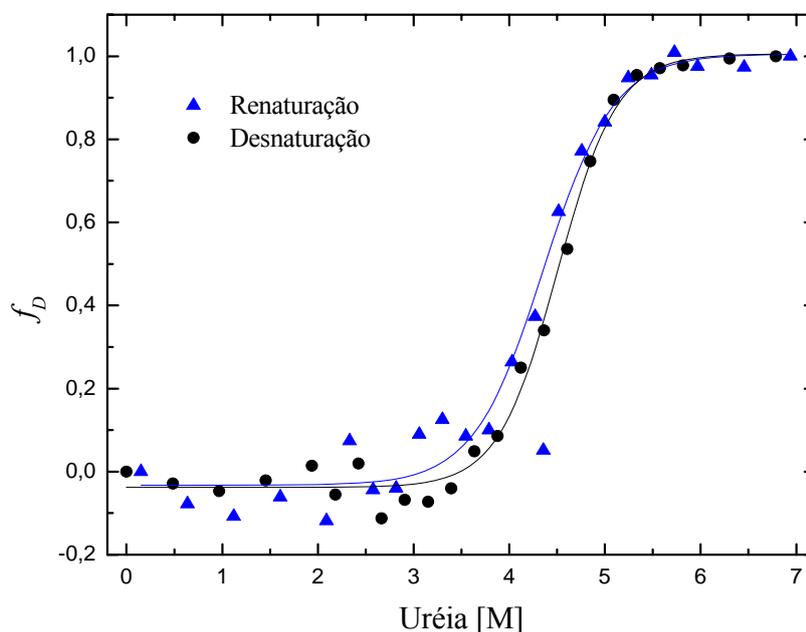


Figura 4. 11 Desnaturation e renaturação químico da rS100A1-HisN - Curva de desnaturation e renaturação, monitorada em 222nm, expressa em termos da fração de proteínas desnaturada, em função da concentração de agente desnaturante.

O modelo de dois estágios para homodímeros, em que o homodímero (D) está em equilíbrio com o monômero (M), foi aplicado neste estudo. Os dados de CD foram tratados e as curvas para cada concentração de proteína foram ajustados individualmente com a equação 7 (vide metodologia). A figura 4.12 mostra os ajustes obtidos, com os parâmetros termodinâmicos associados calculados. Na tabela 4.2 pode-se observar para os dados de CD, que $m_{N_2 \leftrightarrow 2D}$ e $\Delta G_{H_2O}^{N_2 \leftrightarrow 2D}$ permaneceram constantes para todas as concentrações de proteínas usadas. $\Delta G_{H_2O}^{N_2 \leftrightarrow 2D}$ é a diferença da energia livre entre 1 mol de dímero e 2 mols de monômero desenovelado na ausência do desnaturante.

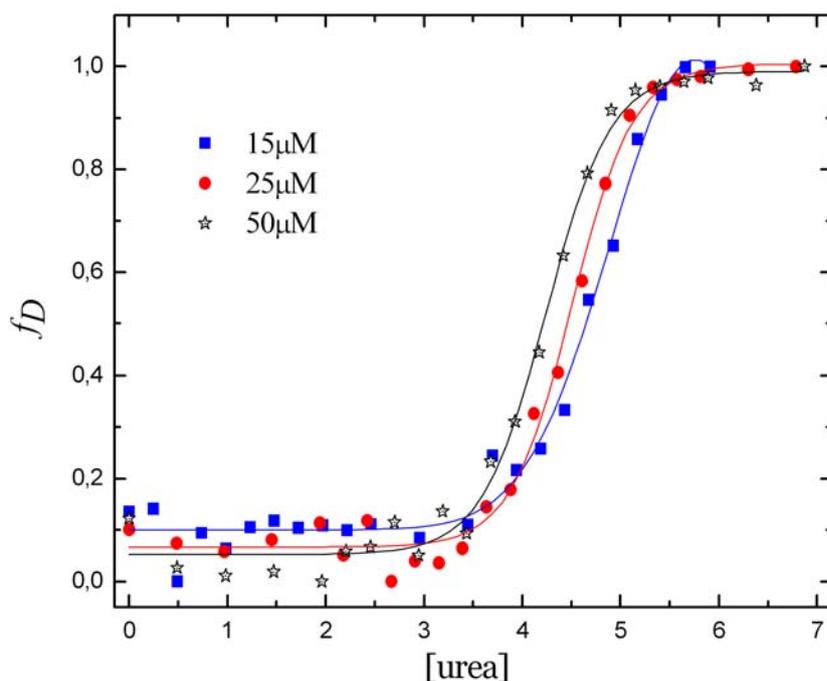


Figura 4. 12 Desnaturalização química da rS100A12-HisN. Curva de desnaturalização para três concentrações distintas de rS100A12-HisN, monitorada em 222nm, expressa em termos da fração de proteínas desnaturadas, em função da concentração de agente desnaturante.

Tabela 4. 2 Comparação da estabilidade estrutural para diferentes concentrações de apo-rS100A12-HisN.

P_t (μM)	$\Delta G_{H_2O}^{N_2 \leftrightarrow 2D}$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	$m_{N_2 \leftrightarrow 2D}$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)	$D_{1/2}$ (M)	K_U (M)
15	93.8 ± 4.6	9.9 ± 0.9	4,7	0,95
25	89.2 ± 4.3	9.6 ± 0.9	4,5	0,96
50	83.3 ± 3.0	9.2 ± 0.7	4,2	0,96

4.6.3 Estudos da estabilidade térmica da apo-rS100A12-HisN

A natureza da transição de desnaturalização e renaturalização térmica foram estudadas por espectroscopia de dicroísmo circular, para diferentes concentrações de proteína. A figura 4.13 mostra a família de curvas de temperatura obtidas para 25 μM de proteína, pH 8,0. No comprimento de onda de 204nm pode ser observado com clareza um ponto de intersecção de todas as curvas, conhecido como ponto isodicroico. Este ponto é um forte indício de que a transição térmica pode ocorrer segundo o modelo de dois estados.

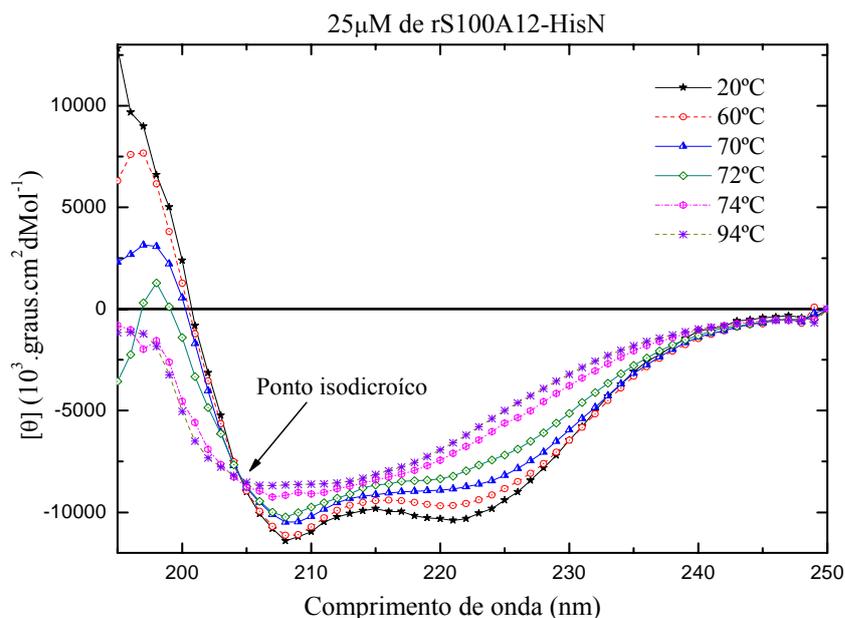


Figura 4. 13 Desnaturação térmica da apo-rS100A12-HisN. A desnaturação induzida termicamente mostra a presença do ponto isodicroico em 204nm

A desnaturação e a renaturação térmica foram monitoradas pela mudança de elipticidade em 222nm em função da temperatura, exibindo uma curva com comportamento sigmóide, sugerindo mais uma vez a ausência de intermediários detectáveis pela técnica de CD (figura 4.14). Com o aumento da temperatura pode-se observar uma diminuição no valor da elipticidade.

A desnaturação térmica e subsequente renaturação, através da variação térmica de 94°C para 20°C da apo-rS100A12-HisN se mostrou uma transição reversível com restauração de aproximadamente 80% do valor da elipticidade inicial (figura 4.15).

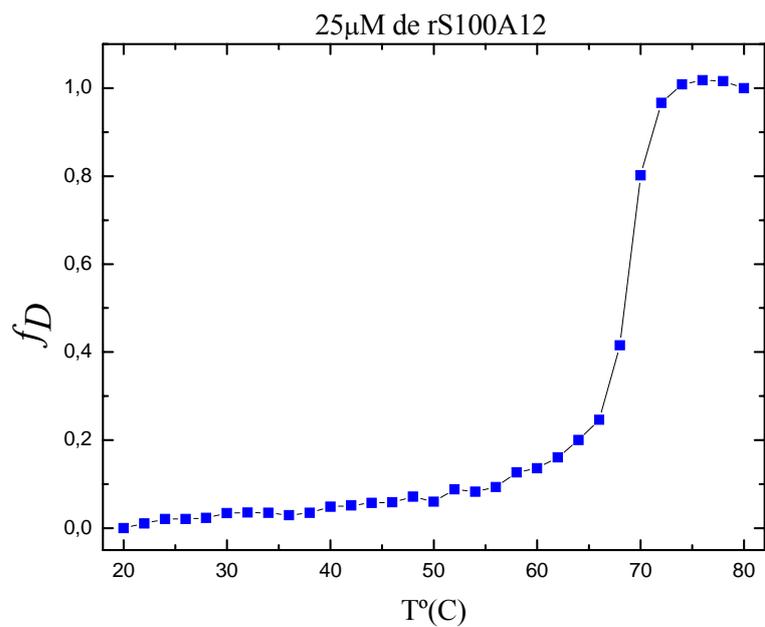


Figura 4. 14 Desnaturação térmica da rS100A12. Curva de desnaturação, monitorada em 222nm, expressa em termos da fração de proteína desnaturada, em função da variação térmica.

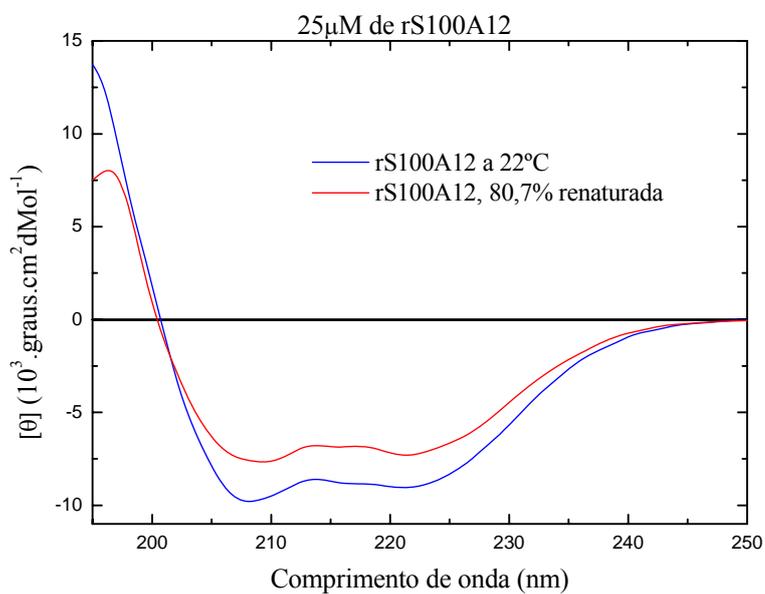


Figura 4. 15 Reversibilidade térmica da apo-rS100A1-HisN – Espectros de CD da proteína apo-rS100A12-HisN antes da desnaturação (—) e após a renaturação térmica (—).

4.6.4 Influência de metais na estabilidade térmica da apo-rS100A12

A influência de metais, Zn^{2+} e Ca^{2+} , na estabilidade térmica da rS100A12 também foram estudadas por dicroísmo circular. Para eliminar possíveis interações destes metais com a cauda de histidinas, a proteína utilizada em todos os experimentos com os íons foi proveniente da construção sem cauda, denominada apo-rS100A12. A estabilidade conformacional na presença de Zn^{2+} e/ou Ca^{2+} foram avaliadas com a variação da temperatura (20-94°C), monitorada por CD. A temperatura de transição, T_m , para rS100A12, na qual 50% da população encontram-se no estado desnaturado, foi de aproximadamente 68°C. Com adição de 1mM de Ca^{2+} , houve um aumento significativo em sua estabilidade, com um aumento na temperatura de transição para 79°C. Efeito semelhante foi constatado para a desnaturação na presença de 1mM de Zn^{2+} , apresentando uma temperatura de transição de 84°C. O aumento na estabilidade da rS100A12 foi drasticamente aumentado na presença de ambos os íons, impossibilitando a completa desnaturação da proteína, como se pode verificar na figura 4.16.

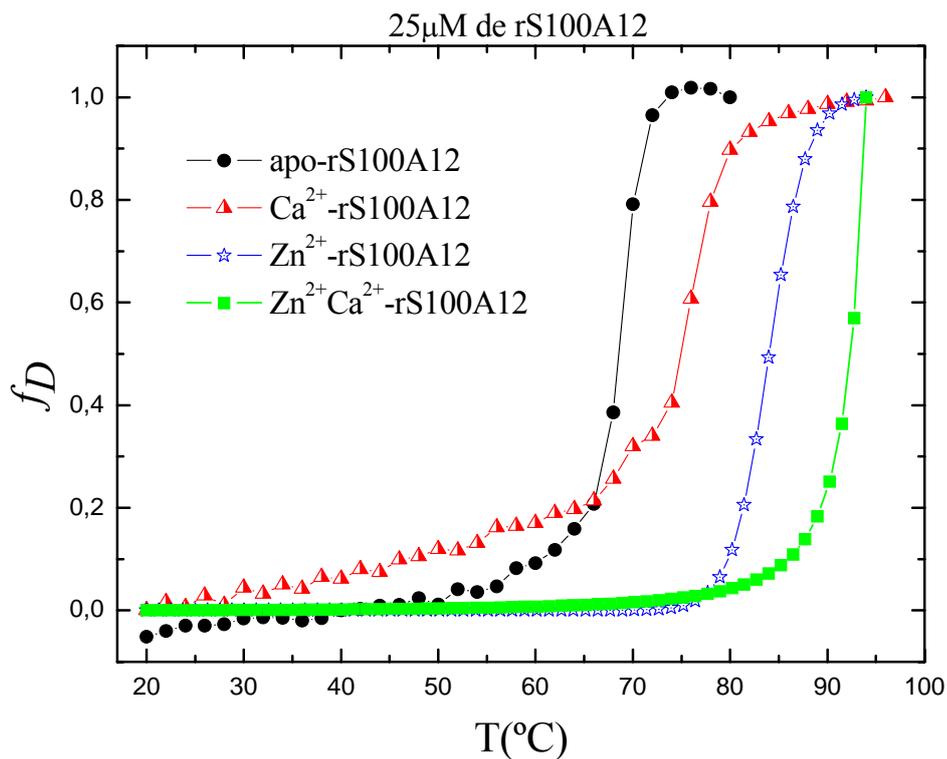


Figura 4. 16 Desnaturalização térmica na presença de íons. Curvas de desnaturalização monitoradas em 222nm, expressas em termos da fração de proteína desnaturada, em função da variação de temperatura.

A estabilidade estrutural da rS100A12 na presença de íons Zn²⁺ e/ou Ca²⁺, também foi estudada em concentrações crescentes de uréia. Similarmente aos resultados de desnaturalização térmica, os espectros obtidos sob diferentes concentrações do agente caotrópico (0 a 7,0M de uréia) mostraram um aumento significativo na estabilidade estrutural quando os íons estavam presentes na solução (figura 4.17).

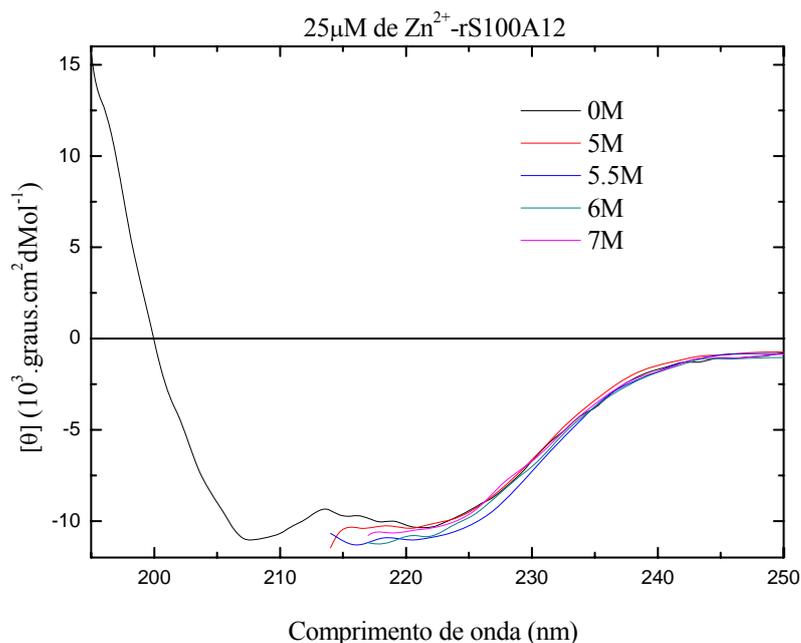


Figura 4. 17 Desnaturação química da rS100A12 na presença de íons. Espectros de CD da rS100A12 na presença de 1mM de Zn^{2+} , em diferentes concentrações do agente desnaturante.

4.6.5 *Influência do pH na estabilidade térmica da apo-rS100A12-HisN*

A desnaturação térmica da apo-rS100A12-HisN também foi caracterizada para diferentes valores de pH (4,0 até 10,5). Como já relatado acima, a estrutura secundária da apo-rS100A12-HisN não apresentou alterações em diferentes valores de pH quando analisada a 22°C. Porém, mostrou-se relativamente sensível a alteração de sua estrutura secundária em pHs ácidos ou básicos, como função do aumento da temperatura (figura 4.18). A temperatura de transição apresentou pequena variação para os valores de pHs entre 7,0 e 9,0. Contudo, para valores inferiores e ou superiores a este intervalo, o valor de T_m foi relativamente reduzido.

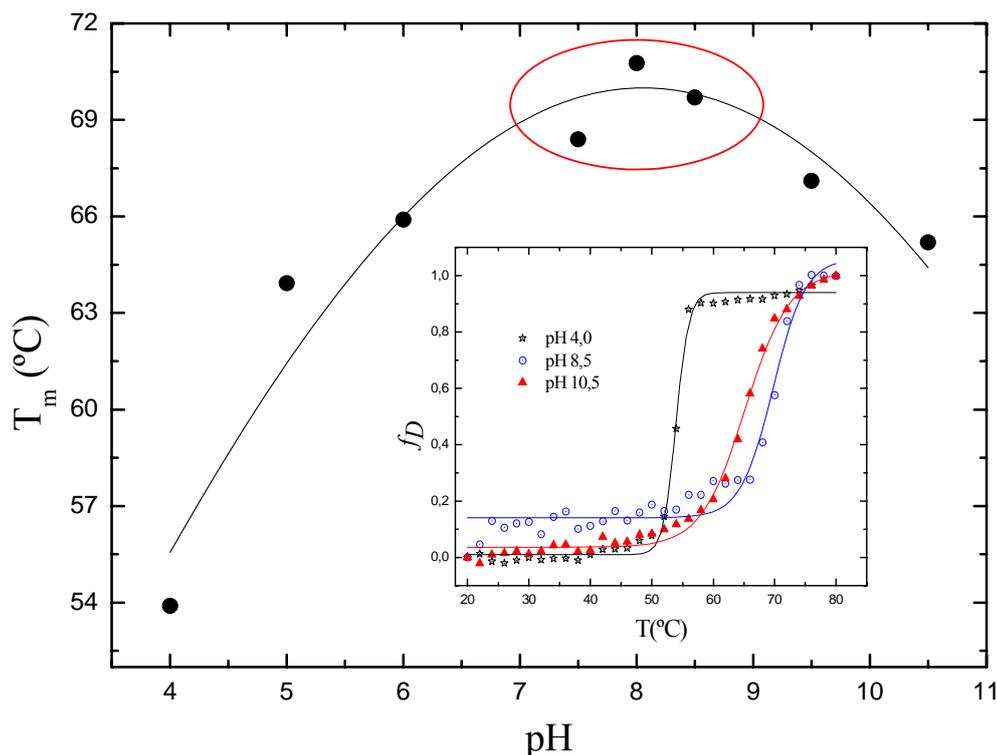


Figura 4. 18 Estabilidade térmica como função da variação de pH. Valor de T_m como função da variação do pH. A figura interna representa as isotermas de desnaturação monitoradas em 222nm, expressas em termos da fração de proteína desnaturada, em função da variação de temperatura para os pHs 4,0; 8,5 e 10,5.

4.6.6 *Espectroscopia de Fluorescência extrínseca*

Os estudos de fluorescência estática foram realizados utilizando uma sonda fluorescente extrínseca, o ANS, para detectar a acessibilidade do solvente às superfícies hidrofóbicas da proteína na presença de seus ligantes [Semisotnov, 1991]. A emissão da fluorescência do ANS foi monitorada na ausência e presença de Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Zn^{2+} e Ca^{2+} , como mostra a figura 4.19.A. Os espectros de emissão do ANS para Ca^{2+} -rS100A12 e $Zn^{2+}Ca^{2+}$ -rS100A12 mostram um aumento na intensidade e um deslocamento para o azul nos máximos de emissão, quando comparados com o espectro de emissão do ANS para a forma apo da proteína. Resultados semelhantes, porém mais intensos, foram observados na presença de Zn^{2+} somente. Estes resultados indicam que a proteína expõe regiões hidrofóbicas na

presença de seus ligantes. Resultados semelhantes foram obtidos com a proteína renaturada termicamente indicando que esta proteína ainda apresenta afinidade pelos íons ligantes (figura 4.19.B).

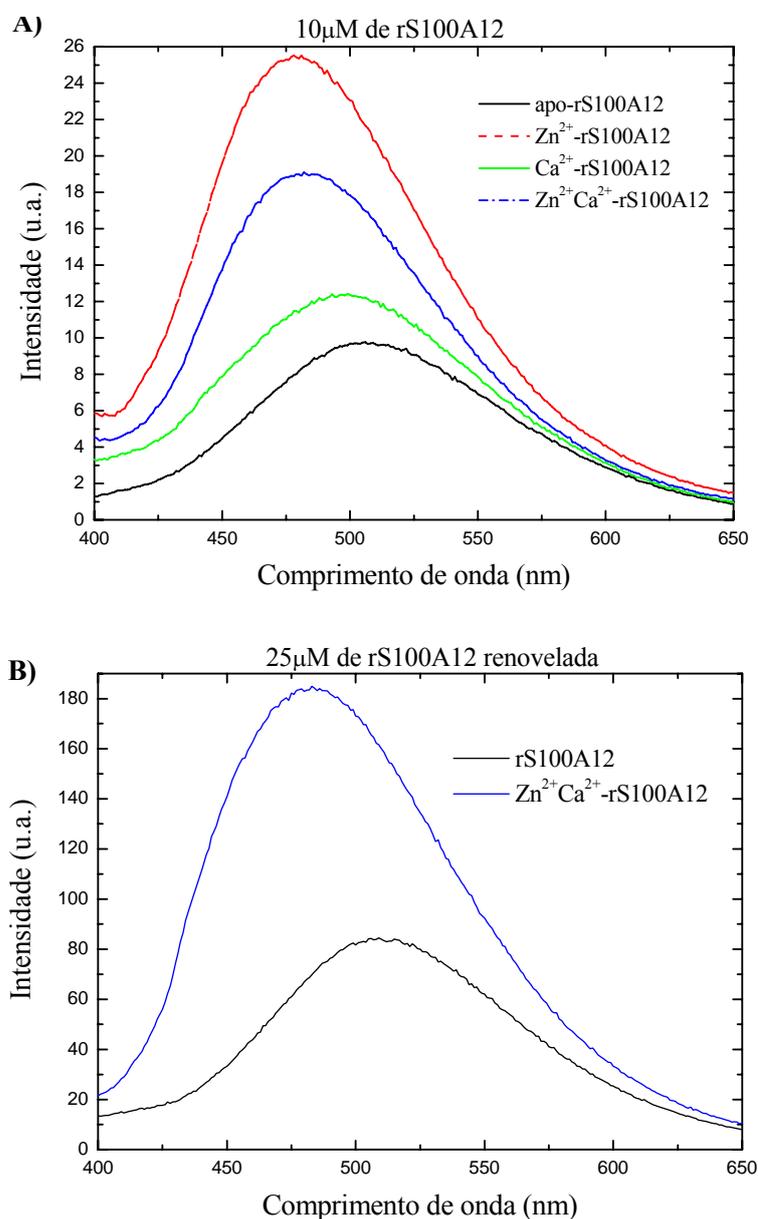


Figura 4. 19 Fluorescência extrínseca. **A)** Espectros de emissão de fluorescência do ANS na presença e ausência de íons metálicos. A concentração protéica foi 10 μ M e 200 μ M de ANS em tampão Tris-HCl, pH8,0, contendo 10mM NaCl. **B)** Espectros de emissão de fluorescência do ANS para 25 μ M de apo-rS100A12 renaturada termicamente. Em preto espectro correspondente a apo-rS100A12 e em azul o espectro referente a Zn²⁺Ca²⁺-rS100A12

Discussão

5. Discussão

A S100A12 porcina, proteína pertencente à subfamília das proteínas S100, é expressa em granulócitos de porco, compreendendo cerca de 8% do total das proteínas citosólicas [Dell'Angelica, 1994]. A purificação desta proteína nativa é trabalhosa e necessita de grandes quantidades de plasma sanguíneo. Estudos envolvendo expressão heteróloga de proteínas em *E. coli* têm mostrado que quando a proteína a ser expressa é relativamente pequena, o rendimento final é substancialmente melhorado [Pessen, 1985]. Dessa forma, como se trata de uma proteína relativamente pequena, sem necessidade de modificações pós-traducionais ou outro processamento, a produção heteróloga em *E. coli* é uma atraente alternativa para obtenção de grandes quantidades de material, maior controle, pureza e facilidade na purificação. A produção da seqüência de DNA codificando a proteína S100A12 foi obtida por meio da construção de um gene sintético através da técnica de PCR [Lo-Chun, 1998; Castilho, 2005]. Ainda, deve-se ressaltar que os genes sintéticos em geral são muito úteis na engenharia genética e de proteínas no caso do clone de DNA não estar disponível [Au, 1998], como é o caso da S100A12, cujo cDNA ainda não foi clonado. Assim, a obtenção do gene sintético codificando a rS100A12, de aproximadamente 300pb, foi obtida de forma rápida e eficiente através da técnica utilizada.

A clonagem do gene sintético no vetor de propagação e posterior subclonagem em diversos vetores de expressão, pTYB2, pET28a, pET29a e pET29b foram também realizadas com sucesso, e tiveram o objetivo de gerar proteínas de fusão alternativas que facilitasse o processo de purificação e aumentasse seu rendimento. Nesse sentido, o melhor rendimento na expressão foi obtido quando as células foram induzidas com 0,01mM de IPTG, “overnight” (de 12 a 15 horas), a 22°C (vide figura 4.4 A e B). As construções em todos os vetores

apresentaram bom rendimento sob essas condições e os testes de solubilidade respectivos mostraram que as proteínas recombinantes estavam presentes em todas as frações solúveis, como ilustrado na figura 4.4 C e D. Este fato mostrou ótimas perspectivas para a obtenção da proteína de interesse em sua forma enovelada e ativa.

Assim, diferentes procedimentos de purificação para a rS100A12 foram empregados visando otimizar esse processo, obter maior rendimento e um alto grau de pureza. Exceto pela rS100A12, todas as demais proteínas recombinantes foram produzidas sob a forma de proteínas de fusão. A primeira tentativa de purificação, com a fusão rS100A12-inteína, não foi alcançada, uma vez que a proteína de fusão, embora solúvel, não se ligou a resina de afinidade. A ligação da inteína à resina é mediada por um domínio de ligação em quitina, permitindo sua ligação na resina de quitina [IMPACT manual]. Esta ligação, porém, depende da conformação e exposição do domínio de ligação em quitina. Desta forma, uma explicação aceitável para o resultado obtido com a rS100A12-inteína é que a conformação assumida pela proteína de fusão causou algum impedimento estérico para a ligação do domínio de ligação em quitina ou, mesmo, impediu/perturbou seu correto enovelamento. Na verdade, as alternativas não são excludentes, podendo ter ocorrido ambas.

Nas purificações das proteínas rS100A12-HisN e rS100A12-HisC, contendo cauda de histidina no N e C-terminal, respectivamente, os resultados foram satisfatórios (vide figura 4.5). Entretanto, deu-se preferência por utilizar a construção contendo a cauda de histidinas na extremidade N-terminal, uma vez que sua presença na região C-terminal, apesar de conter um menor número de resíduos não pertencentes a rS100A12, poderia prejudicar a dimerização da proteína. Na região C-terminal há a presença de resíduos contidos na hélice I, região que precede um “loop” ligante de cálcio, e as regiões C-terminais das subunidades individualmente contribuem para a interface de dimerização, ocorrendo por meio de contatos hidrofóbicos [Donato, 1999]. O rendimento protéico total, estimado apenas para rS100A12-

HisN, ao final da purificação foi cerca de 160 mg de proteína para cada litro de meio de cultura.

A rS100A12, proteína produzida sem fusão alguma, foi purificada utilizando duas etapas cromatográficas: a exclusão molecular e a cromatografia de troca iônica. A fração solúvel, obtida após a centrifugação do lisado celular, foi purificada inicialmente através de uma cromatografia em Superdex 75 (figura 4.6) e em seguida dialisada e aplicada na coluna Mono Q. Neste último passo (figura 4.7) a proteína foi eluída no principal pico, alto grau de pureza e bom rendimento (60 mg para cada litro de meio de cultura).

Os altos rendimentos obtidos para rS100A12 e rS100A12-HisN provavelmente estão relacionados ao pequeno tamanho da proteína, associado à presença da região promotora do T7 (promotor forte) e a utilização dos códons preferenciais para *E. coli*. Assim, a produção da proteína S100A12 utilizando a estratégia de expressão heteróloga de um gene sintético foi uma abordagem interessante, resultando em grandes quantidades de proteína solúvel e com um alto grau de pureza. Os resíduos de aminoácidos adicionais (na região N-terminal) não modificaram as características da proteína, como o ponto isoelétrico e a afinidade por seus ligantes (Zn^{2+} e ou Ca^{2+}).

Sabe-se que a proteína S100A12 nativa comporta-se como um dímero em solução [Del'Angellica, 1994] e, assim, para verificar o estado de oligomerização da apo-rS100A12-HisN em solução foram utilizadas as técnicas de cromatografia de exclusão molecular associada com a reação de "cross-linking". Os resultados obtidos em ambos os casos (figura 4.8), foram consistentes, indicando que a proteína recombinante apresenta-se como um homodímero estável, com uma massa molecular aparente de cerca de 26 kDa. A presença dos ligantes, Zn^{2+} e ou Ca^{2+} , não afetaram seu estado oligomérico.

A espectroscopia de dicroísmo circular foi empregada nos estudos da estabilidade estrutural da rS100A12-HisN, para diversos valores de pH, variação de temperatura e

presença de agente caotrópico. Os espectros de CD obtidos em diferentes pHs a 22°C (figura 4.9) mostraram que a proteína é estável tanto em pH ácido como em pH básico, não apresentando mudanças significativas em sua estrutura secundária observáveis.

Estudos de estabilidade estrutural da rS100A12-HisN, realizados por desnaturação química (figuras 4.10 e 4.12) indicaram que não há formação de intermediários detectáveis presentes durante a transição do desnaturação, independente das concentrações protéicas utilizadas (15µM, 25µM e 50µM). A desnaturação ocorreu como um processo reversível (Figura 4.11), no qual cerca de 90% do sinal da elipticidade inicial foi restaurada. A curva de desnaturação apresentada foi ajustada pelo modelo de dois estágios para homodímero, no qual duas populações de proteína existem em equilíbrio, como homodímeros enovelados e monômeros desenovelados.

A dependência da concentração protéica para o equilíbrio das curvas de desnaturação em um sistema homodimérico é esperada, e pode ser explicado em termos da constante de equilíbrio K_U , definida como $K_U = [M]^2 / [D]$. Para uma dada concentração de agente desnaturante, K_U e ΔG permanecem constantes para todas as concentrações protéicas e somente a fração de cada espécie presente no equilíbrio muda com P_t . Um sistema homodimérico, $[U]_{1/2}$ é definido como a concentração de desnaturante onde a fração de monômeros desenovelados é igual à fração de monômeros presentes como dímeros. Isto é $K_U = P_t$, em que a concentração de $[U]_{1/2}$ ocorrerá dependente de P_t , assim uma mudança na concentração de agente desnaturante com a concentração total de proteína pode ser esperada, mas a variação de energia livre, $\Delta G_{H_2O}^{N_2 \leftrightarrow 2D}$, permanece constante independentemente da mudança no valor de P_t e $[U]_{1/2}$. O valor de m é uma constante para cada proteína e não deverá ser afetado pela concentração protéica. Os espectros de CD da apo-rS100A12-HisN, analisados de acordo com o modelo de dois estágios, apresentaram valores para $m_{N_2 \leftrightarrow 2D}$ e

$\Delta G_{H_2O}^{N_2 \leftrightarrow 2D}$ praticamente constantes o que confirma a independência destes mediante diferentes valores de concentração protéica, como pode ser analisado na tabela 4.1. Deste modo, o modelo de dois estágios homodimérico descreve adequadamente os resultados experimentais. Entretanto, existe a possibilidade que a forma dimérica da apo-rS100A12-HisN possa dissociar-se produzindo monômeros antes de atingir a transição. Contudo, deve-se destacar que estas possíveis formas não puderam ser detectadas pelo método de análise empregado.

A estabilidade térmica da apo-rS100A12-HisN estudada por CD, submetendo a proteína a uma rampa de aquecimento de 20°C a 94°C, revelou uma diminuição na elipticidade e o aparecimento de um ponto isodicroico em aproximadamente 204 nm (figura 4.13). Este ponto indica uma perda cooperativa de estrutura α -hélice da apo-rS100A12-HisN sugerindo uma transição de dois estágios homodimérica, como esperado para um sistema em que somente duas conformações estão presentes. O conteúdo de α -hélice é máximo em temperaturas abaixo da temperatura de transição e decresce para zero acima da temperatura de transição. Assim, similar aos resultados obtidos para desnaturação química a desnaturação térmica também é um processo reversível, no qual cerca de 80% do valor da elipticidade original foi restaurado. A isoterma obtida pela desnaturação térmica foram ajustadas, utilizando uma equação sigmoideal indicando um T_m de aproximadamente 70°C.

Os resultados de CD em diversos ambientes, levemente ácidos ou básicos, indicaram que não há alteração estrutural na faixa de pH 4 até 10,5 a 22°C, entretanto sob um rampa de aquecimento de 20 a 94°C foi observado uma dependência térmica em função do valor do pH para a apo-rS100A12-HisN (Figura 4.18). A estabilidade térmica da apo-rS100A12-HisN decresceu para valores de pH inferiores a 6.0 e superiores a 9.0, permanecendo constante entre valores de pH de 7.0 a 9.0. A cinética de desnaturação em diversos pHs permitiu a obtenção dos valores da temperatura de transição para cada curva, na qual pode-se constatar que a estabilidade máxima da apo-rS100A12-HisN está na faixa do pH fisiológico.

Diversos membros pertencentes à família S100 são descritos como proteínas ligantes de Ca^{2+} e apresentam ainda uma afinidade adicional por outros metais de transição como Cu^{2+} e Zn^{2+} [Heizmann, 1998]. Pouco é conhecido sobre o mecanismo e função induzida pela ligação destes metais para algumas proteínas S100 no meio intracelular. Neste sentido, estudos de dicroísmo circular e fluorescência estática foram realizados para demonstrar a influência de seus ligantes (Zn^{2+} e Ca^{2+}) na estabilidade estrutural da rS100A12.

Estudos espectroscópicos de desnaturação térmica e química envolvendo a rS100A12 na presença de seus ligantes, os íons Ca^{2+} e Zn^{2+} , indicaram que estes metais aumentam a estabilidade da rS100A12 (figura 4.16 e 4.17). Na figura 4.16 as isotermas de desnaturação térmica, mostram que a proteína na forma apo apresenta uma temperatura de transição, T_m , de aproximadamente 68°C , este valor da temperatura é aumentado na presença dos íons Ca^{2+} e Zn^{2+} ($T_m = 79^\circ\text{C}$ e 84°C , respectivamente), mostrando um aumento na estabilidade estrutural da proteína. Um fato interessante observado é que a ligação de zinco à forma Ca^{2+} -rS100A12 aumenta drasticamente sua estabilidade estrutural, impossibilitando a completa desnaturação protéica. Conseqüentemente, não foi possível a obtenção de um platô na isoterma de desnaturação. Pode-se acreditar que o grande aumento da estabilidade térmica na presença dos metais é devido à alta afinidade que os íons Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Zn^{2+} e Ca^{2+} tem pelo estado enovelado da proteína, o que pode proporcionar um aumento do número de interações internas. A ligação destes metais a apo-rS100A12 induz uma mudança conformacional que expõe sítios hidrofóbicos, tornado fácil a interação destas com suas próprias regiões hidrofóbicas ou com regiões da estrutura secundária de outras proteínas alvo [Heizmann, 2002 e Wilder,2005].

A interação dos íons Ca^{2+} e Zn^{2+} com a apo-rS100A12 e a influência destes na sua conformação também foram estudados por espectroscopia de fluorescência extrínseca usando ANS. Os resultados sugerem que a forma apo da proteína na presença do ANS tem uma

pequena exposição de superfícies hidrofóbica. Contudo, com a adição de Ca^{2+} há um aumento na intensidade de emissão do ANS sugerindo uma mudança conformacional. Este resultado é consistente ao observado para outras proteínas S100, em que a ligação de Ca^{2+} proporciona maior acessibilidade a resíduos não polares [Wilder, 2005]. A interação de íons como Ca^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} com a maioria das proteínas S100, é de fundamental importância para o reconhecimento e interação com outras proteínas alvos por meio de superfícies hidrofóbicas [Wilder, 2005 e Hatakeyama1, 2004]. Os dados obtidos nos ensaios com ANS sugerem que o mecanismo de ativação e reconhecimento de moléculas alvo pela rS100A12 é semelhante ao encontrado para muitas proteínas da família S100. O ANS se liga mais fortemente a forma Zn^{2+} -rS100A12 ocasionando uma grande mudança conformacional, (figura 4.19. A). Esse aumento na intensidade de emissão acompanhado por um deslocamento no máximo de emissão de 508nm para 478nm, indica que provavelmente ocorreu maior acessibilidade do solvente a superfícies hidrofóbicas do que quando comparado com os espectros de emissão do ANS para as formas Ca^{2+} -rS100A12 ou com $\text{Ca}^{2+}\text{Zn}^{2+}$ -rS100A12, figura 4.19A. Os resultados obtidos são indicativos de que as mudanças estruturais influenciadas por Ca^{2+} e Zn^{2+} podem ter um papel fundamental na função protéica.

Num trabalho recente Hatakeyama e col. (2004) sugerem que a S100A12 humana possa ter um papel chaperona/anti-chaperona “like”, agindo via Ca^{2+} -dependente na formação de oligômeros. Nesse sentido, pode-se especular novamente que tais regiões hidrofóbicas expostas teriam assim a chance de se ligar à proteínas alvo na célula.

Em muitas situações, a estabilidade estrutural correlacionada à atividade biológica pode ser usada para estabelecer a eficiência do renaturação, entretanto não há um ensaio disponível para testar tal atividade biológica da S100A12. Dessa forma, experimentos com ANS foram realizados com a proteína termicamente desnaturada e renaturada na ausência ou presença dos íons, com intuito de analisar se após o processo de renaturação, a proteína exibia

afinidade por seus íons ligantes. Os resultados obtidos mostraram que a proteína renaturada era capaz de se ligar aos íons, sugerindo que os motivos “EF-hand” estavam funcionais após o processo de desnaturação térmica e renaturação, figura 4.19B. Pode-se assim, considerá-los como resultados indiretos da atividade da proteína renaturada, confirmando a reversibilidade do processo de desnaturação térmica.

Conclusões

6. Conclusões

O gene sintético codificante para S100A12, com códons otimizados para a maquinaria celular da *E. coli*, foi obtido com sucesso. A subclonagem do gene em diversos vetores de expressão foi bem sucedida, resultando em diversas construções com ou sem proteína ou peptídeo carreador, sendo que todas as construções protéicas foram obtidas na forma solúvel. Testes de purificação foram realizados para todas as construções, entretanto somente a purificação da fusão rS100A12-inteína não foi bem sucedida. As construções escolhidas para todos os experimentos foram a rS100A12 e a rS100A12-HisN, que tiveram um rendimento após a purificação de 60 e 160mg para cada litro de cultura.

Os resultados obtidos pelas análises espectroscópicas mostraram que o equilíbrio de desnaturação e renaturação da S100A12 recombinante induzido por uréia ou temperatura ocorre como um mecanismo homodimérico clássico reversível de dois estágios sem a formação de intermediários. Os experimentos com ANS sugerem que a proteína renaturada apresenta afinidade pelos íons Zn^{2+} e Ca^{2+} . Estes resultados permitem inferir que a proteína renaturada ainda mantém sua atividade biológica. A máxima estabilidade térmica para a apo-rS100A12-His está entre a faixa de pH 7 e 9, ou seja, permaneceu próxima ao pH fisiológico. Para a rS100A12 constatou-se que a estabilidade estrutural tem um aumento significativo na presença de seus ligantes, Zn^{2+} e Ca^{2+} , e que a interação com estes metais, analisada pela ligação do ANS a superfícies hidrofóbicas, provoca uma grande mudança conformacional.

A exata função da proteína S100A12 ainda não foi definida, [Donato, 2001], dessa forma os resultados obtidos fornecem uma direção para o entendimento da relação entre a dependência da estabilidade estrutural e a função biológica da proteína S100A12. A influência dos metais poderá ser de fundamental importância para função fisiológica da rS100A12, pois

podem permitir, devido à mudança conformacional e conseqüente exposição de superfícies hidrofóbicas, a interação com outras moléculas alvo, ou seja, os metais atuariam como moduladores das propriedades funcionais da S100A12 *in vivo*.

Referências

7. Referências

- Au, L.C., Yang, F.Y., Yang, W.J., Lo, S.H. and Kao, C.F. (1998) Gene Synthesis by a LCR-Based Approach: High-Level Production of Leptin-L54 Using Synthetic Gene in *Escherichia coli*. *Biochem Bioph Res Com.* 248: 200-203.
- Ausubel, F. et al. (1995) Introduction of Plasmid DNA into Cells. *In: Short Protocols in Molecular Biology*. 3a ed. USA, Ed. John Wiley & Sons, Inc. pp. 1.21-1.22.
- Bhattacharya, S.; Christopher, G.; Bunick, W. e Chazin J. (2004) Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1742: 69 – 79.
- Brandtzaeg, P.; Gabrielsen, T.O.; Dale, L.; Muller, F. Steinbakk, M. e Fagerhol, M.K. (1995). The leucocyte protein Li (calprotectin): a putative nonspecific defense factor at epithelial surfaces. *Adv Exp Med Biol* 371A:201–206.
- Brokx, R.D.; Lopez, M.M.; Vogel, H.J. e Makhatadze, G.I. (2001) Energetics of target peptide binding by calmodulin reveals different modes of binding, *J. Biol. Chem.* 276: 14083–14091.
- Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. (1980). *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function: spectroscopic analysis of biopolymers*. New York, W. H. Freeman and Company.
- Cole, A.M.; Kim, Y.-H.; Tahk, S.; Hong, T.; Weis, P.; Waring, J.A. e Ganz, T. (2001). Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions. *FEBS Lett* 504:5–10.
- Capozzi, F.; Casadei, F. e Luchinat, C. (2006). EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view. *J Biol Inorg Chem* 11: 949–962.
- Carey, P.R.. (1996) *Protein Engineering and design*. Academic Press. 75-90
- Castilho, P. V.; Campana, P. T., Garcia, A. F.; Beltramini, L. M., Araujo, A. P. U. (2005) Heterologous expression, characterization and structural studies of a hydrophobic peptide from the HIV-1 p24 protein. *Peptides.* 26: 243–249.
- Campbel, I. D. & Dwek, R. A.; (1984) *Biological Spectroscopy*, Benjamin Cummings Publish Co.
- Dell'Angelica, E. C.; Schleicher, C. H. e Santome, J. A. (1994). Primary structure and binding proteins of cargranulin C, a novel S100-like calcium-binding protein from pig granulocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 28929–28936.
- Donato R. (2001). S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33: 637–668.

- Donato, R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1450: 191-231.
- Edgeworth, J., Gorman, M., Bennett, R., Freemont, P. and Hogg, N. J. (1991). Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *Biol. Chem.* 266: 7706-7713.
- Eftink, M. R. (1991) Methods of biochemical analysis: fluorescence techniques for studying proteins structure. Edited by Clarence H. Suelter, John Wiley & Sons.
- Falke, J. J.; Drake, S. K.; Hazard, A. L.; e Peersen, O. B. (1994). Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 27, 219-290.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182: 319-326.
- Gittleman, M. S., and Matthews, C. R. (1990) Folding and stability of trp aporepressor from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 29:7011-7020.
- Golden, B.E. e Clohessy, P.A. (1995) Calprotectin-mediated zinc chelation as a biostatic mechanism in host defence. *Scand J Immunol.* 42(5):551–556.
- Guignard, F., Mael, J. & Markert, M. (1995). Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family. *Biochem. J.* 309: 395- 401.
- Hapak, R. C.; Lammers, P. J.; Palmisano, W. A.; Birnbaum, E. R.; e Henzl, M. T. (1989). Site-specific substitution of glutamate for aspartate at position 59 of rat oncomodulin. *Journal of Biological Chemistry* 264, 18751-18760.
- Hatakeyama, T.; Okada, M.; Shimamoto, S.; Kubota, Y.; and Kobayashi, R. (2004) Identification of intracellular target proteins of the calcium-signaling protein S100A12. *Eur. J. Biochem.* 271: 3765–3775.
- Heizmann C.W., Fritz G., Schafer B.W. (2002). S100 proteins: structure, function and pathology. *Front. Biosci.* 7: 1356–1368.
- Heizmann, C.W. and J.A., Cox. (1998) New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(II)-, Zn(II)- and Cu(II)-binding protein family. *Biometals*, 11: 383-397.
- Hilt DC, Kligman D. (1991). The S-100 protein family: a biochemical and functional overview. In: Heizmann CW, ed. *Novel Ca²⁺-binding Proteins. Fundamentals and Clinical Implications*. Berlin: 65–103.
- Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P. et al. (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97: 889–901.

- Hsieh, H.L.; Schafer, B. W.; Sasaki, N. e Heizmann, C.W. (2003). Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. *Biochem Biophys Res Commun.* 307: 375– 81.
- Hunter, M.J.; Chazin, W.J.; Yamazaki, M.; Yui, S. e Nakatani, Y. (2002) Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity. *Mediators Inflamm.*11(3):165–172.
- Ikura M. (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *TIBS* 21: 14-17.
- Kawasaki, H. e Kretsinger, R. H. (1994). Calcium-binding proteins 1: EF-hands. *Protein Profiles* 1: 343-517.
- Kelly, S. M. & Price, N. C. (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta.* 1338: 161-185.
- Kisiel L. S. (2006). Rintala-Dempsey A. C. and Shaw G. S., Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem. J.* 396: 201–214.
- Krebs, J.; Quadroni, M. e Van Eldik, L.J. (1995). Dance of the dimers. *Nature Struct Biol.* 2: 711–714.
- Kretsinger, R.H.; Tolbert, D.; Nakayama, S.; Pearson, W. (1991). The EF-hand, homologs and analogs, in: C.W. Heizmann (Ed.), *Novel Calcium Binding Proteins. Fundamentals and Clinical Applications*, Springer-Verlag, New York.
- Kretsinger, R.H. e Nockolds, C.E.; (1973). Carp muscle calcium-binding protein: II. Structure determination and general description, *J. Biol. Chem.* 248: 3313– 3326.
- Laemmli, K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lakowicz, J. R. (1983). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York.
- Lewit-Bentley, A. e Réty, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 10: 637-643.
- Linse, S. e Forsen, S. (1995). Determinants that govern high-affinity calcium binding, *Adv. Second Messenger Phosphoprot. Res.* 30: 89–151.
- Lo-Chun, A.; Feng-Yuan, Y.; Wan-Jung, Y.; Sue-Hwa, L. e Charng-Feng, K. (1998) Gene Synthesis by a LCR-Based Approach: High-Level Production of Leptin-L54 Using Synthetic Gene in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 248, 200–203.
- Mallam, A. L.; e Jackson, S. E. (2005). Folding Studies on a Knotted Protein *J. Mol. Biol.* 346, 1409–1421.

- Marsden, B. J.; Shaw, G. S. e Sykes, B. D. (1990) Calcium binding proteins: elucidating the contributions to calcium affinity from analysis of species variants and peptide fragments. *Biochem. Cell Biol.* 68, 587–601
- Moroz, O. V.; Antson, A. A.; Murshudov, G. N.; Maitland, N. J.; Dodson, G. G.; Wilson, K. S.; Skibshoj, I.; Lukanidin, E. M. e Bronstein, I. B. (2001) The three-dimensional structure of human S100A12. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 57:20–29.
- Moore BW. (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 739–744.
- Nakayama, N.; Kawasaki, H.; Kretsinger, R. (2000). Evolution of “EF hand” proteins. *Topics Biol. Inor. Chem.* 3: 29-58.
- Nakayama, S.; Moncrief, N. D.; e Kretsinger, R. H. (1992). Evolution of EF-hand calcium modulated proteins. II. Domains of several subfamilies have diverse evolutionary histories. *Journal of Molecular Evolution* 34, 416-448.
- Nelson, M.R. e Chazin, W.J. (1998). Structures of EF-hand Ca^{2+} -binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca^{2+} binding. *BioMetals* 11: 297–318.
- Nonato, M. C., (1997) Estudos Cristalográficos em Macromoléculas biológicas: Aplicações em Calgranulina C de granulócitos porcos, Tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi* e Fosfolipase A₂ extraída do veneno da serpente *Bothrops moojeni*. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos.
- Pessen, H., and Kumosinski, T. F. (1985) Measurements of protein hydration by various techniques, *Methods Enzymol.* 117: 219-255.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson R. (1977) DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–7.
- Santhanagopalan, V.; Hahn, B.L. e Sohnle, P.G. (1995) Resistance of zincsupplemented *Candida albicans* cells to the growth inhibitory effect of calprotectin. *J Infect Dis* 171:1289–1294.
- Schägger, H.; von Jagow, G.; (1987) Tricene-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa; *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Sharon, M.; Kelly, N.; Price, C. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta* 1338: 161 -185.
- Shishibori, T., Oyama, Y., Matsushita, O., Yamashita, K., Furuichi, H., Okabe, A., Maeta, H., Hata, Y. & Kobayashi, R. (1999). Three distinct anti-allergic drugs, amlexanox,

- cromolyn and tranilast, bind to S100A12 and S100A13 of the S100 protein family. *Biochem. J.* 338: 583-589.
- Semisotnov, G. V.; Rodionova, N. A.; Razgulyaev, O. I.; Uversky, V. N.; Gripas, A. F. and Gilmanshin, R. I. (1991) Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers.* 31: 119–128.
- Sohnle, P.G. (1997). Antimicrobial defense through competition for zinc. *Rev Med Microbiol* 8:217–224.
- Steinbakk M, Naessandresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. (1990). Antimicrobial actions of calcium-binding leukocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 336:763–765.
- Ravasi, T.; Hsu, K.; Goyette, J.; Schroder, K.; Yang, Z. e Rahimi, F. (2004) Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. *Genomics.* 84(1):10–22.
- Robert, R.W.; Berova, N. e Nakanishi, K. (1994) Circular Dichroism: Principles and Applications, VCH Publishers, NY, USA.
- Wilder, P.T.; Varney, K.M.; Weiss, M.B.; Gitti R.K. e Weber, D.J. (2005) Solution structure of zinc- and calcium-bound rat S100B as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 44: 5690-5702.
- Zhang, M.; Tanaka, T. e Ikura, M. (1995). Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nat. Struct.Biol.* 2:758-767.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)