

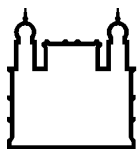
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO
DA PROTEÍNA ANTIOFÍDICA **DM43**

POR

MONIQUE RAMOS DE OLIVEIRA TRUGILHO

RIO DE JANEIRO
MARÇO DE 2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM **BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

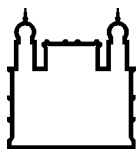
MONIQUE RAMOS DE OLIVEIRA TRUGILHO

ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO DA PROTEÍNA ANTIOFÍDICA DM43

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO OSWALDO CRUZ COMO PARTE
DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.

ORIENTADORES: DRA. ANA GISELE DA COSTA NEVES FERREIRA
DR. JONAS PERALES

RIO DE JANEIRO
MARÇO DE 2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MONIQUE RAMOS DE OLIVEIRA TRUGILHO

ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO DA PROTEÍNA ANTIOFÍDICA DM43

ORIENTADORES: **DRA. ANA GISELE DA COSTA NEVES FERREIRA**
 DR. JONAS PERALES

APROVADA EM: 09 / 03 / 2009

EXAMINADORES:

DRA. LEILA DE MENDONÇA LIMA – PRESIDENTE

(LABORATÓRIO DE GENÔMICA FUNCIONAL E BIOINFORMÁTICA - IOC, FIOCRUZ)

DRA. CONSUELO LATORRE FORTES DIAS

(CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO - FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS)

DR. ANTONIO JORGE TEMPONE

(LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE TRIPANOSOMATÍDEOS - IOC, FIOCRUZ)

DR. RICHARD HEMMI VALENTE – 1º SUPLENTE

(LABORATÓRIO DE TOXINOLOGIA - IOC, FIOCRUZ)

DR. MILTON OZÓRIO MORAES – 2º SUPLENTE

(LABORATÓRIO DE HANSENÍASE - IOC, FIOCRUZ)

RIO DE JANEIRO, 09 DE MARÇO DE 2009

OS AGRADECIMENTOS

Existem pessoas que tornaram este trabalho possível. A todas elas eu quero agradecer. São os meus amigos... Amigos de ontem, de hoje e de sempre.

Amigos do trabalho, amigos do café, amigos chefes, amigos de cursos, amigos de escola, amigos de caronas, amigos de infância, amigos do peito, amigos-irmãos....

Amados amigos!

Alguns estão presentes o tempo todo, convivendo comigo, com dedicação e entusiasmo; ensinando, ajudando e orientando... Estes fazem a diferença na minha vida.

Outros estão presentes em momentos cruciais, quando eu mais preciso, ouvindo, aconselhando, ou simplesmente segurando a minha mão. Estes são os que me ajudam a levantar.

Alguns me ajudaram por instantes, às vezes no que pode parecer trivial, mas foram tão importantes!

Outros desperdiçaram o seu tempo comigo, foram generosos.

Há ainda amigos que não estavam presentes, não o tempo todo, mas foram indispensáveis para mim. Destes sinto saudades.

Os "amados amigos" caminharam comigo, passo a passo, não só durante esta tese, mas na vida; incentivando, acolhendo, abraçando, amando... Fazem meu coração sorrir!

A todos vocês agradeço porque estiveram do meu lado, em tantos momentos... Foram marcantes e dão sentido à minha vida.

MUITO OBRIGADA!

- ♥ Dra. Ana Gisele; por ser orientadora e amiga. Sempre um exemplo para mim.
- ♥ Dr. Jonas Perales; chefe, conselheiro e amigo. Por acreditar e lutar por mim.
- ♥ Dr. Richard; amigo sempre à disposição para ajudar.
- ♥ Surzinha; amiga do peito em todos os momentos.
- ♥ Ileana e Diego; pessoas queridas que me ajudaram muito.
- ♥ Daniela, Giselle, Karina, André, Pink André, Carolina, Karen, Rodrigo e Henk; grupo maravilhoso de se conviver e trabalhar.
- ♥ Aline e Fernanda; amigas que sempre estiveram do meu lado.
- ♥ Rachel e Claudinha; amigas indispensáveis nos momentos de descontração.
- ♥ Dr. Gilberto; pela ajuda, pelas idéias que fazem toda diferença.
- ♥ Dr. Milton Ozório e todos do Laboratório de Hanseníase; por toda ajuda e aconselhamento que foi dado a este trabalho.
- ♥ Dr. Jorge Tempone e membros do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos; pela ajuda em vários experimentos.
- ♥ Dra. Leila de Mendonça e amigos do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática; pelos conselhos indispensáveis nesta tese.
- ♥ Dr. Celso Romero e todos do Laboratório Esquistossomose Experimental; por ser tão solícito e pela ajuda nos experimentos de CD.
- ♥ Amigos do eterno Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica e do Instituto Oswaldo Cruz; pessoas queridas e importantes para todos nós.

- ♥ Meus pais, Naldo e Neide; Lyrio e Celita; por serem a base de tudo.
- ♥ Meus irmãos, Elaine e Jeison; André e Adriel; Thayssa; pelo feliz convívio em família.
- ♥ Meu amor Adriano; por cuidar de mim.
- ♥ Minha vida, Giovanna; pelos momentos em que me ausentei e, mesmo assim, só recebi sorrisos e amor!
- ♥ Meu "AMIGO, mais chegado que um irmão" (Provérbios 18:24); "...porque Nele estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e da ciência" (Colossenses 2:3).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz, com o apoio do CNPq, FAPERJ e FIOCRUZ.

"A QUALIDADE DE UM PESQUISADOR SE RECONHECE PELOS CONTROLES QUE ELE REALIZA EM SEUS EXPERIMENTOS."

DR. HAITY MOUSSATCHÉ

"UM POUCO DE CIÊNCIA NOS AFASTA DE DEUS. MUITO, NOS APROXIMA."

LOUIS PASTEUR

	Página
Lista de tabelas e figuras.....	viii
Lista de abreviações	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	
1. Ofidismo.....	02
2. Terapêutica.....	03
3. Um breve histórico sobre a imunidade natural ao envenenamento ofídico.....	05
4. Classificação geral dos inibidores naturais.....	06
5. Fosfolipases A ₂ (PLA ₂) de venenos de serpentes.....	07
6. Inibidores de PLA ₂ de venenos de serpentes.....	08
7. Metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs).....	10
8. Inibidores de SVMPs.....	11
9. Justificativa do trabalho.....	13
10. Objetivos.....	14
CAPÍTULO II. MATERIAL E MÉTODOS	
FLUXOGRAMA DA ABORDAGEM DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	16
1. Vetores e cepas bacterianas.....	17
2. Desenho dos oligonucleotídeos e reação para amplificação dos genes.....	19
3. Ligação dos insertos aos vetores de expressão.....	21
4. Transformação de <i>E. coli</i> , linhagem TOP10.....	21
5. Sequenciamento de DNA.....	22
6. Análise das sequências.....	23
7. Transformação de <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) e expressão das proteínas recombinantes.....	23
8. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	24
9. Obtenção do soro policlonal contra DM43 nativa.....	25
10. Reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos anti-DM43 ou anti-cauda de histidina.....	25
11. Identificação das proteínas recombinantes por espectrometria de massas ...	26
12. Purificação e reenovelamento das proteínas recombinantes.....	27
13. Dosagem de proteínas.....	28
14. Ensaio de clivagem com enteroquinase	29
15. Dicroísmo Circular.....	29
16. Análise da oligomerização das proteínas recombinantes.....	31
17. Ensaio de inibição da atividade azocaseinolítica da jararagina.....	31

18. Ensaio de Inibição da atividade fibrinogenolítica da jararagina.....	32
FLUXOGRAMA DA ABORDAGEM DE BIOQUÍMICA CLÁSSICA.....	33
19. Hidrólise limitada de DM43.....	33
20. Hidrólise extensiva de DM43.....	34
CAPÍTULO III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
1. Abordagem de Biologia Molecular.....	37
2. Clonagem nos vetores de expressão e sequenciamento.....	44
3. Expressão das proteínas recombinantes.....	49
4. Identificação das proteínas recombinantes com anticorpos anti-DM43 ou anti-cauda de histidina.....	53
5. Identificação das proteínas recombinantes por MS/MS.....	54
6. Purificação das proteínas recombinantes.....	56
7. Reenovelamento e dosagem das proteínas recombinantes.....	59
8. Análise da integridade estrutural dos recombinantes por difracto circular....	60
9. Análise da oligomerização.....	63
10. Testes de atividade.....	69
11. Abordagem de Bioquímica Clássica: Hidrólise limitada de DM43 nativa.....	80
12. Hidrólise extensiva de DM43 nativa.....	82
CAPÍTULO IV. CONCLUSÕES.....	88
CAPÍTULO V. BIBLIOGRAFIA	90
CAPÍTULO VI. ANEXOS.....	100

Figura 1: Desenho esquemático dos vetores pET101 e pET102 D-TOPO.....	18
Figura 2: Espectro de CD de estruturas secundárias na região do UV distante.....	30
Figura 3: Alinhamento das sequências de aminoácidos DM43 e α_1 B-glicoproteína humana.....	38
Figura 4: Modelo tridimensional da estrutura de DM43.....	39
Figura 5: Alinhamento das sequências dos domínios de DM43.....	39
Figura 6: Sequências nucleotídica e protéica do cDNA de DM43.....	44
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação por PCR.....	46
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de mini-preparação de DNA.....	48
Figura 9: SDS-PAGE 12%, em condições redutoras, das proteínas expressas em <i>E. coli</i> BL21(DE3)..	50
Figura 10: SDS-PAGE 15%, em condições redutoras, das proteínas expressas em <i>E. coli</i> BL21(DE3)	51
Figura 11: <i>Western blotting</i> das proteínas recombinantes.....	54
Figura 12: Perfis cromatográficos das proteínas recombinantes em coluna <i>HisTrap FF crude</i>	57
Figura 13: Perfis cromatográficos das proteínas recombinantes em coluna <i>HisTrap FF crude</i>	58
Figura 14: Gráfico representativo dos espectros de dicroísmo circular.....	62
Figura 15: Análise da oligomerização dos domínios recombinantes de DM43.....	65
Figura 16: Análise da oligomerização dos domínios recombinantes de DM43 por cromatografia	66
Figura 17: MALDI-TOF MS no modo linear das proteínas recombinantes thioD1 e thioD2.....	67
Figura 18: MALDI-TOF MS no modo linear da proteína recombinante thioD3.....	68
Figura 19: Análise da inibição da atividade azocaseinólítica da jararagina pelos domínios de DM43....	70
Figura 20: Análise dos domínios recombinantes fusionados com a tiorredoxina.....	72
Figura 21: Análise da inibição da atividade azocaseinólítica da jararagina.....	72
Figura 22: Análise da inibição da atividade fibrinogenolítica da jararagina.....	74
Figura 23: Análise dos domínios recombinantes de DM43, fusionados com a tiorredoxina.....	76
Figura 24: Análise da inibição da atividade azocaseinólítica da jararagina pelo domínio D3 de DM43..	77
Figura 25: Análise da inibição da atividade fibrinogenolítica da jararagina pelo domínio D3 de DM43..	78
Figura 26: Análise do domínio recombinante D3, após incubação com a jararagina.....	78
Figura 27: Ensaio de hidrólise limitada de DM43 nativa por tripsina ou quimotripsina.....	81
Figura 28: Sequência de aminoácidos dos domínios de DM43.....	82
Figura 29: Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa Vydac C18.....	83
Figura 30: Perfil cromatográfico em coluna Superdex Peptide HR.....	85
Figura 31: Análise da inibição da atividade azocaseinólítica da jararagina pela DM43.....	86
Anexo 1, Figura 32: Eletroferogramas representativos dos sequenciamentos automáticos.....	100
Figura 33: Eletroferogramas representativos dos sequenciamentos automáticos	101
Figura 34: Resultado obtidos com o programa PSIPRED para predição de estrutura secundária.....	102
Figura 35: Resultado obtidos com o programa PSIPRED para predição de estrutura secundária.....	103
Figura 36: Resultado obtidos com o programa PSIPRED para predição de estrutura secundária.....	104
Figura 37: Resultado obtidos com o programa PSIPRED para predição de estrutura secundária.....	105
Figura 38: Sequenciamento por MS/MS do peptídeo do primeiro domínio de DM43.....	106

Figura 39: Sequenciamento por MS/MS do peptídeo do segundo domínio de DM43.....	107
Figura 40: Sequenciamento por MS/MS do peptídeo do terceiro domínio de DM43.....	108
Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos desenhados para clonagem.....	20
Tabela 2: Características das proteínas recombinantes, obtidas <i>in silico</i>	43
Tabela 3: Identificação por MS/MS dos recombinantes expressos.....	55
Tabela 4: Recuperação protéica total (em mg) das proteínas recombinantes.....	60
Anexo 2: Artigos gerados durante a tese de doutorado onde a doutoranda teve participação ativa.....	109

☞ LISTA DE ABREVIACÕES ☞

- ABS** - Absorvância
- APMSF** - (4-Amidinophenyl)-methanesulfonyl fluoride hydrochloride monohydrate
- BCA** - Ácido bicinchonínico
- BSA** - Albumina de soro bovino
- CD** - Dicroísmo circular (*Circular dichroism*)
- cDNA** - Ácido desoxirribonucléico complementar
- CFU** - Unidades formadoras de colônia
- CRISP** - Proteína secretada rica em cisteínas (*Cysteine Rich Secretory Protein*)
- D1, D2, D3** - Domínios 1, 2 ou 3 de DM43
- DM** - *Didelphis marsupialis*
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico
- DTT** - Ditioneitol
- E:S** - Enzima:substrato
- EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético
- EK** - Enteroquinase
- FAB** - Fração antibotrópica
- HEPES** - Ácido etano sulfônico de hidroxietil piperazina
- HPLC** - Cromatografia líquida de alto desempenho (*High Performance Liquid Chromatography*)
- i.v.** - Intra venoso
- ID** - Identidade
- Ig** - Imunoglobulina
- IMAC** - *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado)
- IPTG** - Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
- Jar** - Jararagina
- kDa** - Quilodalton
- LB** - Meio de cultura Luria Bertani
- LD** - Dose letal
- M** - Concentração molar
- m/z** - Relação massa/carga
- MALDI-TOF** - Ionização por dessorção a laser auxiliado por matriz - tempo de voo (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*)
- MM** - Massa molecular
- MMP** - Metaloproteases de matriz extracelular (*Matrix Metalloproteinases*)
- MS** - Espectrometria de massa (*Mass spectrometry*)

N - Concentração normal

NCBI - Centro Nacional para Informação Biotecnológica - EUA (*National Center for Biotechnology Information*)

ND - Não determinado

nm - Nanômetro

OGM - Organismo geneticamente modificado.

p/p - Relação peso/peso

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide gel electrophoresis*)

pb - Pares de bases

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pI - Ponto isoelétrico

PLA₂ - Fosfolipase A₂

PLIs - Inibidores de fosfolipase

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

q.s.p. - Quantidade suficiente para

RBS - Sítio de ligação ao ribossomo (*Ribosome Binding Site*)

SDS - Duodecil sulfato de sódio

SVMP - Metaloprotease de veneno de serpente (*Snake Venom Metalloproteinase*)

SVMPis - Inibidores de metaloproteases de veneno de serpente

TAE - Tampão Tris acetato + EDTA

TBS - Tampão Tris salino

TFA - Ácido trifluoroacético

Thio - Tiorredoxina

UV - Ultravioleta

v/v - Relação volume/volume

V₀ - Volume de exclusão

A proteína antiofídica DM43 isolada do soro do gambá *Didelphis aurita* inibe o efeito hemorrágico e a atividade proteolítica de metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs). Ao se ligar às SVMPs, o homodímero de DM43 se dissocia e cada monômero se liga a uma molécula de metaloprotease. O monômero é composto de três domínios tipo-imunoglobulina, dois dos quais são glicosilados. Para investigar a relação estrutura-função de DM43, os genes codificantes para esta proteína e para seus domínios foram clonados nos vetores pET101D/TOPO ou pET102D/TOPO; neste último, a proteína recombinante foi expressa em fusão com a tiorredoxina. Expressamos as construções obtidas em bactérias competentes da linhagem BL21 *Star* (DE3) de *E. coli*, na forma de corpúsculos de inclusão. Após purificação e reenovelamento por diálise, os espectros de dicroísmo circular (CD) na região do ultravioleta distante indicaram uma mistura de α -hélices e folhas β pregueadas para os domínios recombinantes expressos em fusão com a tiorredoxina. A identidade das proteínas recombinantes foi confirmada, tanto por *immunoblotting* com anticorpo policlonal contra DM43, quanto por espectrometria de massas (MS/MS). Entretanto, nenhum dos domínios recombinantes, isolados ou combinados, foi capaz de inibir a atividade proteolítica da jararagina, uma metaloprotease de *Bothrops jararaca*. Ao contrário, os domínios fusionados com a tiorredoxina foram degradados quando incubados com esta SVMP. Estes resultados podem indicar que a glicosilação é funcionalmente importante e/ou que a conformação nativa multidomínio é necessária para a atividade biológica deste inibidor. Para melhor entender seus requisitos estruturais, estudamos a DM43 nativa após degradação proteolítica. Sob condições nativas, a digestão limitada de DM43 com tripsina ou quimotripsina gerou vários fragmentos, mas nenhum peptídeo ativo contra a SVMP foi obtido. Sob condições desnaturantes, a digestão extensiva de DM43 pela endoproteínase Lys-C produziu peptídeos menores. Mesmo sem atividade biológica contra a jararagina, três destes peptídeos foram capazes de interagir com esta SVMP. Após sequenciamento por MS/MS, cada peptídeo foi localizado em um domínio diferente de DM43. Estes resultados parecem sugerir a participação conjunta dos três domínios na interação com as SVMPs.

The antiophidic protein DM43 isolated from *Didelphis aurita* serum inhibits the hemorrhagic effect and the proteolytic activity of snake venom metalloproteinases (SVMPs). Upon SVMP addition, DM43 homodimer dissociates and one subunit binds to one SVMP. The 43 kDa monomer is composed of three immunoglobulin-like domains, two of which are glycosylated. To investigate the structure-function relationship in this protein, the genes encoding DM43 and its domains were separately cloned into pET101D/TOPO or pET102D/TOPO vector, this last with the fusion partner thioredoxin. The obtained constructions were expressed in BL21 Star (DE3) competent *E. coli* cells as inclusion bodies. After purification and dialysis refolding, circular dichroism (CD) spectra in the far UV region of the recombinants domains with fusion partner indicated the presence of folded proteins with both alpha-helix and beta-sheet. The identities of the recombinant proteins were confirmed by immunoblotting with polyclonal antibodies against serum DM43 and by mass spectrometry (MS/MS). However, none of the domains either isolated or in combination, were able to inhibit the proteolytic activity of jararhagin. In contrast, thioredoxin-fused domains were readily digested by this SVMP. These results may indicate that glycosylation is functionally important for DM43 and/or that a multidomain native conformation is necessary for the biological activity of the inhibitor. To better understand its structural requirements, serum DM43 was studied after proteolytic degradation. Under native conditions, limited digestion of DM43 by trypsin or chymotrypsin generated various fragments, but no active peptide against SVMP was obtained. Extensive digestion of denatured DM43 by Lys-C endopeptidase produced smaller peptides. Even though not able to neutralize the proteolytic activity of jararhagin, three DM43 Lys-C peptides were able to bind to SVMP. After sequencing by MS/MS, each peptide was localized to one DM43 domain. Taken together, these results seem to reinforce the participation of all three domains of DM43 in the interaction with SVMPs.

CAPÍTULO I.
INTRODUÇÃO

1. OFIDISMO

O envenenamento por serpentes ainda representa um importante problema de saúde pública em diversos países tropicais em desenvolvimento, sendo recentemente considerado “uma das doenças mais negligenciadas do século 21” . Mundialmente, a real estimativa pode exceder 5 milhões de acidentes por ano, incluindo mais de cem mil mortes . No Brasil Colônia, o ofidismo foi considerado uma das grandes pragas existentes, sendo responsável por um número significativo de óbitos . Hoje, são cerca de 20 mil casos por ano no país, com letalidade de 0,45%. Apesar dos altos índices de morbi-mortalidade, os sistemas de saúde não têm dado a devida atenção ao problema . Os dados mais recentes do Ministério da Saúde mostram um total de 28.321 casos de envenenamento no ano de 2005, o que certamente está subestimado .

As espécies de serpentes venenosas são classificadas na infra-ordem Caenophidia, que compreende as famílias Elapidae, Viperidae, Atractaspididae e Colubridae . As serpentes do gênero *Bothrops*, família Viperidae, são consideradas as mais agressivas e respondem pela maior parte dos acidentes registrados no Brasil . Os venenos de serpentes são provavelmente os mais complexos de todos os venenos. Eles podem conter vinte ou mais diferentes classes de componentes peptídicos/protéicos, correspondendo a mais de 90 % do seu peso seco. De modo geral, as classes mais abundantes são: toxinas com estrutura de fosfolipases A_2 , como neurotoxinas e miotoxinas; metaloproteases com ou sem atividade hemorrágica; serino-proteases que interferem com o sistema hemostático; lectinas e peptídeos . Dentre os 10 % restantes, encontram-se carboidratos, lipídeos, nucleosídeos, aminas biogênicas e aminoácidos livres, além de íons e uma grande quantidade de agentes quelantes de metal, como o citrato .

A função básica dos venenos é matar ou imobilizar a presa, além de auxiliar na digestão, uma vez que o processo evolutivo que deu origem às glândulas de veneno ocorreu a partir do aparato digestivo, principalmente das glândulas salivares . As proteínas e peptídeos presentes nos venenos de serpente do gênero *Bothrops* têm ação rápida e são as principais responsáveis pelo aparecimento de grande parte das manifestações clínicas, interferindo em mecanismos fisiológicos e moleculares

específicos. Estes venenos geralmente induzem dor, edema, hemorragia e/ou necrose no local da picada. Sistemicamente, podem causar sangramentos espontâneos, choque persistente, hipotensão e falência renal, causa mais freqüente de óbito entre as vítimas destes ofídios .

2. TERAPÊUTICA

A soroterapia foi desenvolvida no século XIX, simultaneamente por pesquisadores de dois grandes centros franceses de pesquisa: de um lado, Césaire Auguste Phisalix e Gabriel Bertrand, do Museu Nacional de História Natural; do outro, Albert Calmette, do Instituto Pasteur. Phisalix e Bertrand tiveram motivações diferentes das de Calmette para iniciar seus estudos sobre venenos de serpentes. Os dois primeiros queriam compreender a bioquímica dos componentes do veneno. Já Calmette queria resolver problemas de saúde pública. Enquanto Calmette pensava em curar, Phisalix e Bertrand pensavam em observar para conhecer .

Ao contrário da teoria de Calmette, que acreditava que um soro preparado contra veneno de *Naja* fosse efetivo contra qualquer outro veneno, o cientista brasileiro Vital Brazil Mineiro da Campanha defendia a idéia da especificidade do soro. Em 1901, no Instituto Soroterápico do Estado de São Paulo, atual Instituto Butantan, Vital Brazil demonstrou pela primeira vez que os soros produzidos contra os venenos de cascavel e jararaca apresentavam propriedades distintas, comprovando que a especificidade estava relacionada ao gênero da serpente utilizada para imunização . A soroterapia é, até hoje, o único tratamento específico para envenenamentos ofídicos aceito pela comunidade médica .

Ainda que eficaz para neutralizar os efeitos sistêmicos quando administrada a tempo, a soroterapia é pouco eficiente contra os efeitos locais, tais como hemorragia e mionecrose, que se manifestam quase que imediatamente após os acidentes ofídicos. Em geral, a administração de largas doses de antivenenos tardiamente não parece surtir efeito sobre estas manifestações fisiopatológicas, além de causar reações anafiláticas em grande número dos casos tratados . Com a preocupação final de amenizar as respostas adversas e aumentar a eficácia dos soros antiofídicos, várias abordagens vêm sendo desenvolvidas por pesquisadores do mundo todo como: (a) emprego da técnica de ELISA para identificação da serpente

responsável pelo envenenamento; (b) quantificação do veneno inoculado e o monitoramento dos níveis de anticorpos circulantes ; (c) novas estratégias de imunização, purificação e redução do conteúdo proteico dos antivenenos; e (d) busca por novos inibidores naturais . No futuro, estas informações deverão contribuir para administração de menores quantidades de antivenenos específicos, indicando também quais técnicas de processamento do soro são mais eficazes, de modo a aumentar a meia-vida dos anticorpos circulantes.

Há diversos fatores que contribuem para a escassez de antisoros no mundo. Por exemplo, a grande diversidade imunoquímica dos venenos de serpentes explica porque a eficácia dos antivenenos é tão restrita e limitada biológica e geograficamente. Outro problema é que as políticas e tecnologias usadas para a produção e distribuição dos soros antiofídicos são muito diferentes nos países produtores. Em alguns países da África e da Ásia, onde a incidência de envenenamento é grande, a produção de antisoros é inexistente ou insuficiente. Além disso, o acesso aos antisoros produzidos mundialmente é bastante limitado, tornando esta doença ainda mais negligenciada. Portanto, é necessário um esforço global urgente para amenizar este problema .

O Brasil é um dos poucos países auto-suficientes na produção de soro antiofídico. Atualmente, o Ministério da Saúde financia a produção no Instituto Butantan (São Paulo), Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro) e Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais). Ele é distribuído gratuitamente para hospitais em todo o país e, eventualmente, utilizado para suprir a carência em outros países da América Latina .

3. UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A IMUNIDADE NATURAL AO ENVENENAMENTO OFÍDICO

Na antiguidade, era comum o uso de venenos como armas letais, o que fez da busca por um antídoto universal uma preocupação de vários séculos. Mithridates VI (132 - 63 A.C.), rei de Pontus (atual Turquia), atormentado pelo medo de ser envenenado, teria experimentado vários venenos e antídotos desenvolvidos por ele em seus prisioneiros de guerra. Misturando diversos “ingredientes”, buscava uma fórmula que neutralizasse qualquer veneno. Chamou esta panacéia de *Antidotum Mithridatium* e o considerou um antídoto para todos os venenos, incluindo os de serpentes. Séculos mais tarde, Andromachus, médico do imperador romano Nero, se interessou pelo *Mithridatium* e desenvolveu uma nova fórmula, removendo alguns ingredientes e adicionando outros, inclusive carne de víbora. Já nesta época, acreditava-se que as serpentes venenosas não sofriam a ação de seu próprio veneno. A esta nova panacéia foi dado o nome de *Galene*, também conhecida como *Teríaco de Andromachus*.

O dito popular “as serpentes não morrem pela ação de seu próprio veneno” prevaleceu e, no século XVIII, Felice Fontana descreveu a resistência natural que vários animais apresentavam frente a venenos de serpentes. Este trabalho pioneiro, considerado um marco no estudo da imunidade natural, inspirou outros cientistas. Em 1922, Marie Phisalix reportou experimentos que mostram a resistência de outros animais, como peixes, répteis, invertebrados e mamíferos ao envenenamento. Foi ela quem instituiu o uso de quantidades específicas de veneno para mensurar a resistência aos mesmos. Assim, foi possível estabelecer resistência de um animal pela inoculação de uma “dose letal mínima”, ou seja, a menor quantidade de veneno necessário para matar um animal, por uma determinada via de inoculação. Desde então, vários pesquisadores vêm estudando os mecanismos envolvidos na neutralização de venenos ofídicos em répteis, incluindo as próprias serpentes, e em mamíferos.

4. CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS INIBIDORES NATURAIS

A resistência natural de algumas espécies animais ao envenenamento por serpentes pode se dever a dois mecanismos principais: o primeiro, menos comum, explica a resistência a neurotoxinas com ação pós-sináptica. A subunidade alfa do receptor de acetilcolina dos animais resistentes apresenta mutações pontuais que impedem a ligação da neurotoxina sem, contudo, impedir a interação normal do agonista fisiológico acetilcolina com seu receptor. O segundo mecanismo envolve a presença de proteínas séricas responsáveis pela neutralização da atividade tóxica de importantes componentes dos venenos . O interesse pelas proteínas antiofídicas vem aumentando nos últimos anos, uma vez que estas moléculas podem auxiliar na compreensão do mecanismo de ação de toxinas de venenos, além de representarem potenciais alternativas terapêuticas na clínica dos acidentes ofídicos e/ou de patologias associadas à expressão desregulada de metaloproteases ou fosfolipases .

Os inibidores naturais de toxinas de venenos já isolados e caracterizados foram classificados em dois grandes grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e especificidades de inibição : inibidores de fosfolipases A_2 de veneno de serpentes, ou PLIs (*PLA₂ inhibitors*), e inibidores de metaloproteases de veneno de serpentes ou SVMPs (*snake venom metalloproteinase inhibitors*). A seguir, passaremos a descrever com mais detalhes os protagonistas do fenômeno de resistência natural, quais sejam, os inibidores e as toxinas que eles neutralizam.

5. FOSFOLIPASES A₂ DE VENENOS DE SERPENTES

Por definição, as fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas cálcio-dependentes que catalisam a hidrólise de fosfolipídeos, produzindo lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres. Ainda que bastantes similares seqüencialmente e estruturalmente, as PLA₂ de venenos de serpentes podem induzir uma variedade de efeitos farmacológicos, com ou sem toxicidade. As PLA₂ de elapídeos e viperídeos são classificadas nos grupos IA e IIA/B, respectivamente. Estas enzimas podem atuar como complexos (ex.: bungarotixina e crotoxina), ou serem farmacologicamente ativas sozinhas (ex.: miotoxinas PLA₂ Asp⁴⁹ e Lys⁴⁹).

As PLA₂ podem apresentar atividade miotóxica e/ou neurotóxica, entre outras. As PLA₂ neurotóxicas são formadas por uma ou mais cadeias e atuam na junção neuromuscular a nível pré-sináptico. Elas causam necrose da musculatura esquelética e possuem valores de dose letal (LD₅₀) extremamente baixos. As miotoxinas não-neurotóxicas geralmente possuem caráter básico e massas moleculares em torno de 15 kDa, sendo características dos venenos viperídeos. Elas podem ser subdivididas em dois grupos: (A) miotoxinas Asp⁴⁹ possuem um resíduo de ácido aspártico presente na posição 49 da região de ligação ao cálcio, conferindo atividade catalítica à PLA₂. Como exemplos, podemos citar as miotoxinas I e III de *Bothrops asper*; (B) miotoxinas Lys⁴⁹ possuem uma lisina na posição 49, impedindo a ligação do cálcio e, portanto, fazendo com que a toxina tenha pouca ou nenhuma atividade enzimática. Como exemplos, podemos citar as miotoxinas II e IV de *B. asper*. A presença do ácido aspártico na posição 49 parece ser crucial para a ligação com o cálcio e conseqüente atividade catalítica. Apesar disso, as PLA₂-Lys⁴⁹ mantêm sua capacidade de causar miotoxicidade por mecanismos não enzimáticos de dano na membrana. Além da neuro- e da miotoxicidade já citadas, as PLA₂ de veneno de serpentes também podem, por exemplo, provocar cardiotoxicidade, induzir efeitos anticoagulantes ou interferir com a agregação plaquetária.

6. INIBIDORES DE PLA₂ DE VENENOS DE SERPENTES

De um modo geral, os inibidores de PLA₂ (PLIs) são glicoproteínas oligoméricas ácidas, de 75 a 180 kDa, com 3-6 subunidades que variam de 20 a 50 kDa . Caracterizar estes PLIs de acordo com sua atividade biológica não é uma tarefa fácil, já que a maior parte foi descrita simplesmente como inibidores da atividade catalítica de PLA₂, sem especificar quais efeitos tóxicos destas enzimas são, de fato, inibidos . Baseados apenas em sua estrutura primária, Ohkura e colaboradores classificaram os PLIs isolados do plasma/soro de répteis em três tipos:

(A) PLI α : apresentam uma região homóloga aos domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) de lectinas cálcio-dependentes. Curiosamente, receptores de fosfolipase presentes no homem e em coelhos também possuem seqüências de reconhecimento de carboidratos, sugerindo uma evolução comum entre estes receptores e os PLI α . Como exemplo de PLI α , podemos citar o BaMIP (*Bothrops asper myotoxin inhibitor protein*). Trata-se de um oligômero ácido de 120 kDa, composto por 5 subunidades de 23-25 kDa ligadas não-covalentemente, capaz de inibir a atividade catalítica (fosfolipásica) e miotóxica das miotoxinas I e III isoladas do veneno de *Bothrops asper*. Inibidores homólogos ao BaMIP foram isolados dos plasmas das serpentes *Bothrops godmani* , *Bothrops moojeni* e *Antropoides nummifer* .

(B) PLI β : São glicoproteínas ácidas que possuem estrutura rica em leucina. Um exemplo é o inibidor isolado do plasma de *Agkistrodon blomhoffi sinitticus* , que apresenta 9 sítios de repetição de leucinas (seqüência LRRs). Esta seqüência LRR foi descrita pela primeira vez na α_2 -glicoproteína rica em leucina (LRG), proteína humana de função desconhecida .

(C) PLI γ : apresentam um padrão de resíduos de cisteína típico do *three-finger motif* presente no receptor do ativador de plasminogênio tipo-uroquinase e nos antígenos de superfície celular pertencentes à superfamília Ly-6. Estes inibidores são denominados tipo-neurotoxina, já que a superfamília Ly-6 parece estar evolutivamente relacionada com citotoxinas/neurotoxinas de veneno de serpentes

. Um PLI com atividade antineurotóxica bastante estudado é o inibidor da crotoxina isolado do soro de *Crotalus durissus terrificus* por dois grupos, trabalhando independentemente . CNF (*Crotalus neutralizing factor*) ou CICS (*Crotoxin inhibitor from Crotalus serum*) é uma glicoproteína ácida de 130 kDa, resultado da associação não-covalente de subunidades de 23-25 kDa. O mecanismo de inibição envolve a formação de um complexo estável e inativo entre o inibidor e a subunidade básica e cataliticamente ativa da crotoxina (CB). Esta interação promove a dissociação da crotoxina e a liberação da subunidade ácida (CA), responsável pelo direcionamento da toxina até seu alvo na junção neuromuscular.

Existe ainda uma quarta classe de PLIs, atualmente representada por uma única proteína ácida denominada DM64. Este inibidor homodimérico (subunidades de 64 kDa), isolado do soro do marsupial *Didelphis marsupialis* , atualmente *Didelphis aurita* , inibe a miotoxicidade e a citotoxicidade das miotoxinas I (Asp⁴⁹) e II (Lys⁴⁹) de *Bothrops asper*. Curiosamente, DM64 não interfere com a atividade catalítica da miotoxina I . Este resultado indica que a miotoxicidade induzida pela miotoxina I independe de sua atividade catalítica ou fosfolipásica. Após sequenciamento de seu cDNA, DM64 foi classificada como membro da superfamília gênica das imunoglobulinas. Este inibidor possui cinco domínios tipo-imunoglobulina e é homólogo à α 1B-glicoproteína humana (AAL07469) e à DM43, um inibidor de metaloprotease de venenos de serpentes .

7. METALOPROTEASES DE VENENOS DE SERPENTES

As metaloproteases de veneno de serpentes, comumente conhecidas como hemorraginas ou SVMs (*snake venom metalloproteinases*), são enzimas zinco-dependentes, de massas moleculares variadas (22-100 kDa), principais responsáveis pelos efeitos hemorrágicos característicos dos envenenamentos por serpentes da família Viperidae . Estas enzimas são inibidas por agentes quelantes, como EDTA e ortofenantrolina, que seqüestram o zinco, inibindo sua atividade proteolítica e hemorrágica . Elas pertencem ao grupo das reprotinas, juntamente com as ADAMs (*a desintegrin and metalloproteinase*), e são caracterizadas pela presença de um sítio catalítico que conserva o motivo HEXXHXXGXXH, responsável pela ligação do íon Zn^{2+} . Com base no sequenciamento do cDNA destas enzimas, sabe-se que elas são sintetizadas sob a forma de um precursor inativo ou zimogênio e, posteriormente, processadas até a forma ativa, após hidrólise do pró-domínio e do peptídeo sinal

A seguinte classificação das SVMs foi originalmente proposta por Bjarnason e Fox em 1994 e atualizada por Fox e Serrano em 2005 : PI (20-30 kDa) são muito abundantes nos venenos e apresentam o domínio catalítico; PII (35-50 kDa) são compostas pelo domínio catalítico e um domínio desintegrina. Frequentemente, esta enzima é processada, gerando uma PI e o peptídeo desintegrina. PIII (50-80 kDa) apresentam, além do domínio catalítico, os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteínas. Algumas PIII podem formar pontes dissulfeto com duas cadeias tipo-lectina. Este grupo, anteriormente classificado como PIV, atualmente constitui a subclasse PIII_d. Outras subclasses de SVMs, (PII a-e e PIII a-d) foram propostas baseando-se em dois critérios principais: susceptibilidade ao processamento proteolítico e capacidade de dimerização.

8. INIBIDORES DE METALOPROTEASES

Nos últimos anos, vários inibidores de metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) foram isolados e caracterizados por diferentes técnicas. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares mais íntimos envolvidos no fenômeno da resistência aos efeitos tóxicos dos venenos de serpente. Em geral, as SVMPs são glicoproteínas ácidas que exercem sua função biológica através da formação de complexos inativos não-covalentes com as SVMPs. Estes inibidores são estáveis e mantêm sua atividade mesmo depois de serem submetidos a altas temperaturas e grande variação de pH. Segundo sua estrutura primária, podem ser classificados na superfamília das cistatinas, superfamília gênica das imunoglobulinas ou na família das ficolinas/opsoninas P35. Esta última é constituída por um único inibidor (erinacina) isolado a partir do extrato de músculo esquelético do mamífero *Erinaceus europaeus*. Erinacina é uma proteína anti-hemorrágica complexa, de 1.070 kDa, constituída das subunidades α e β de 37 e 35 kDa, respectivamente. As outras duas famílias de inibidores de metaloproteases estão descritas com mais detalhes nos próximos parágrafos:

(A) Inibidores pertencentes à superfamília das cistatinas. HSF (*Habu serum factor*), o primeiro inibidor caracterizado, foi isolado do soro de *Trimeresurus flavoviridis*. Apresenta massas moleculares de 48 e 70 kDa, respectivamente por MALDI-TOF e exclusão molecular, indicando uma estrutura dimérica em condições nativas. Sua estrutura primária é composta por dois domínios cistatina contíguos na região N-terminal, além de um domínio rico em histidinas C-terminal. Esta proteína inibe a atividade hemorrágica das SVMPs HR1 (classe P-III) e HR2 (classe P-I) isoladas do veneno autólogo. Experimentos de análise da estequiometria indicam a interação de uma molécula de HSF com uma molécula de metaloprotease da classe P-III. Após modificações químicas em aminoácidos específicos, foi sugerido que resíduos de lisina e triptofano de HSF desempenham papel crucial no seu mecanismo de inibição. Outro exemplo bem caracterizado de inibidor da superfamília das cistatinas é a BJ46a, uma proteína de 46 kDa isolada do soro de *Bothrops jararaca*. BJ46a inibe SVMPs das classes P-I e P-III e compartilha 85 % de identidade sequencial com HSF. Diferentemente deste último, cada molécula de BJ46a interage com duas moléculas de metaloprotease, especificamente no domínio catalítico da enzima.

(B) Inibidores da superfamília gênica das imunoglobulinas. São inibidores isolados do soro de mamíferos resistentes ao envenenamento ofídico. A primeira molécula caracterizada desta família foi a oprina, um inibidor de metaloprotease de 52 kDa isolado do soro do gambá norte-americano *Didelphis virginiana*. Trata-se de uma glicoproteína ácida, de cadeia única, com 26 % de glicosilação, que inibe especificamente SVMPs, não interferindo com a atividade catalítica de serino-proteases de veneno ou de metaloproteases bacterianas . Outros três fatores estruturalmente homólogos à oprina foram isolados do soro do mangusto *Herpestes edwardsii*. AHF 1, 2 e 3 são glicoproteínas monoméricas, de aproximadamente 65 kDa, contendo 4,2 %, 13,6% e 6 % de carboidrato, respectivamente. AHF 2 e 3 tiveram apenas suas seqüências N-terminais determinadas, enquanto AHF 1 teve 79 % de sua seqüência primária determinada por degradação de Edman .

De todos os inibidores de SVMPs da superfamília gênica das imunoglobulinas, DM43 é o mais bem caracterizado. Esta proteína foi isolada do soro do gambá *Didelphis marsupialis* (reclassificado recentemente como *Didelphis aurita*) , inicialmente como uma fração protéica denominada FAB (fração antibotrópica). Posteriormente, verificou-se que FAB era composta por pelo menos três proteínas, duas das quais (DM40 e DM43) inibiam as atividades letal, hemorrágica, edematogênica e hiperalgésica dos venenos botrópicos . DM43 é uma proteína multidomínio que apresenta homologia com a α 1B-glicoproteína, proteína plasmática humana pertencente à superfamília gênica das imunoglobulinas. Até pouco tempo, a função da α 1B-glicoproteína não era conhecida. Mais recentemente, Udby e colaboradores mostraram que esta proteína forma complexo equimolar inativo com a CRISP-3 humana (*cysteine-rich secretory protein 3*), protegendo o organismo contra um possível efeito prejudicial provocado pela livre circulação desta proteína. Interessantemente, outras proteínas da família CRISP são encontradas em venenos de serpentes, onde são caracterizadas como tipo-neurotoxina; e as SVMPs tipo PIII também possuem um domínio rico em cisteínas.

DM43 inibe completamente as atividade proteolíticas da jararagina (SVMP-PIII) e da botrolisina (SVMP-PI), metaloproteases do veneno de *B. jararaca*, formando complexos estáveis, não-covalentes com estas toxinas . DM43 parece interagir com o domínio metaloprotease das SVMPs, uma vez que não forma complexo com jararagina-C, molécula derivada do processamento da jararagina, possuindo apenas seus domínios tipo desintegrina e rico em cisteína . Experimentos

de cromatografia por exclusão molecular indicam que DM43 é um homodímero em seu estado nativo. Quando da interação com a SVMP, o dímero se dissocia, e um monômero do inibidor se liga a uma molécula de metaloprotease, formando um complexo solúvel inativo .

Já foi mostrado também que DM43 inibe a atividade proteolítica de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs 2, 3 e 9) de sobrenadantes de linhagens de fibroblastos (3T3) e adenocarcinomas de mama (MCF7) e induz morte celular nestas linhagens por via ainda não elucidada. Estes resultados originaram a patente intitulada “Uso de DM43 e seus fragmentos como inibidor de metaloproteases de matriz” (código BRPI0400284-9, depósito nacional em 05/11/03, concessão em 18/03/2004; código WO/2005/087252, depósito internacional em 18/03/05, concessão em 22/09/2005).

9. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Ainda que alguns inibidores de metaloproteases, neurotoxinas e miotoxinas de venenos de serpentes tenham sido clonados e caracterizados, os mecanismos moleculares envolvidos no fenômeno da resistência de serpentes e mamíferos aos efeitos tóxicos dos venenos não estão completamente elucidados. O Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz vem estudando este assunto há quase duas décadas. Nos últimos anos, o grupo contribuiu significativamente para o entendimento do fenômeno em termos moleculares, publicando várias revisões internacionais sobre o assunto . Esforços foram concentrados particularmente no estudo do SVMPI DM43. Este inibidor pode ser utilizado para melhor compreendermos o mecanismo de ação de toxinas de venenos e deve ser encarado como potencial alternativa terapêutica na clínica dos acidentes ofídicos e/ou de patologias associadas à expressão desregulada de metaloproteases. Recentemente, um dos mais conceituados grupos de pesquisa em terapias antiveneno do mundo publicou um artigo sugerindo a administração *in situ* de inibidores naturais de toxinas de venenos como forma de minimizar os importantes danos locais provocados pelo envenenamento . De modo interessante, dados de nosso grupo mostram que o inibidor de metaloprotease DM43 é mais potente do que os soros antiofídicos comerciais em neutralizar o efeito hemorrágico local dos venenos botrópicos . Neste contexto, é fundamental a caracterização estrutural detalhada desta molécula, para

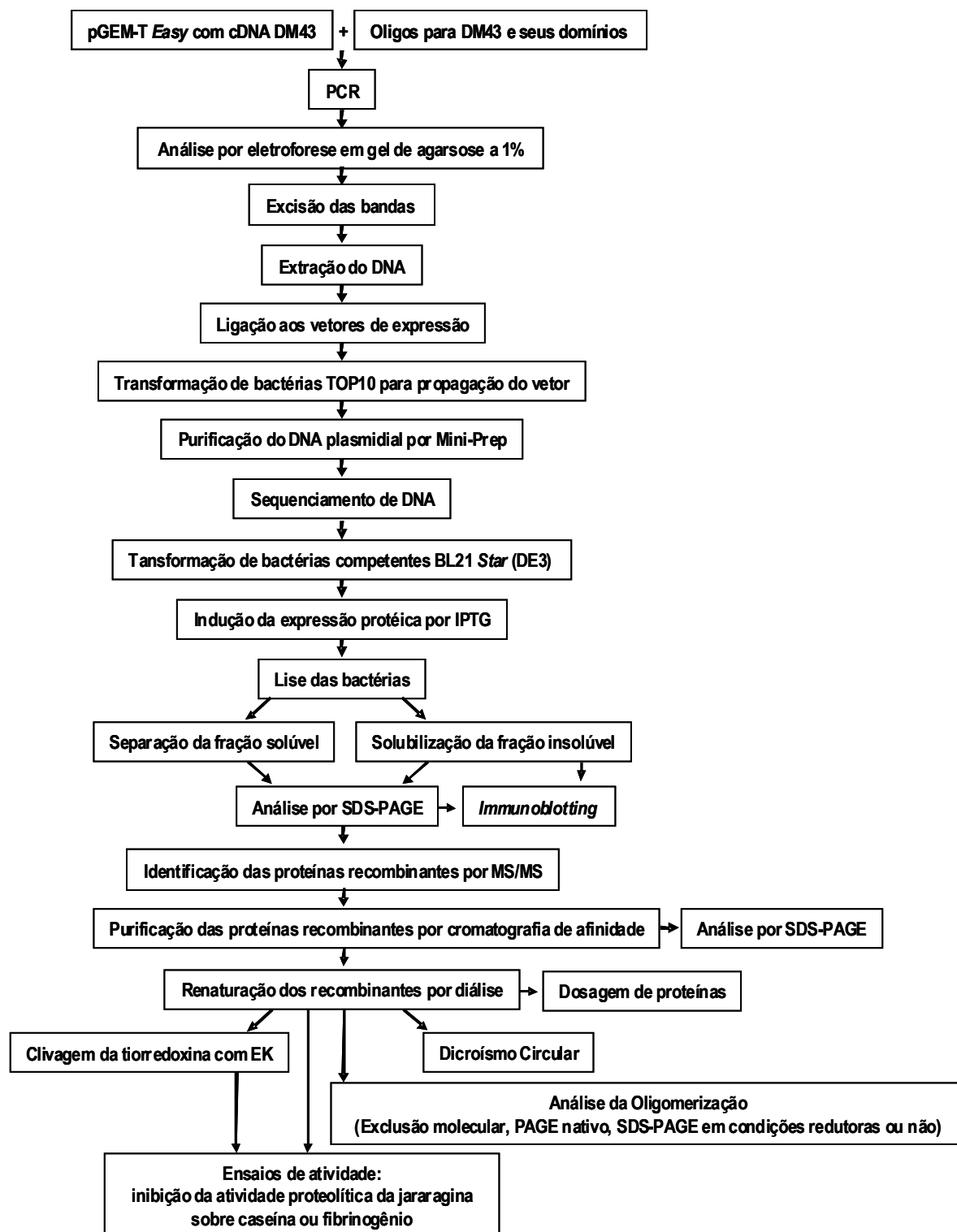
entendermos sua relação estrutura-função. Desta forma, poderíamos, no futuro, sintetizar/produzir fragmentos ativos mais eficientes e com menos efeitos colaterais do que os soros hiperimunes utilizados atualmente. Portanto, a proposta desta tese foi a caracterização dos requisitos estruturais mínimos necessários à atividade biológica da antitoxina DM43. Para alcançarmos o objetivo pretendido, utilizamos técnicas de biologia molecular e abordagens bioquímicas clássicas.

10. OBJETIVOS

Clonar e expressar em bactérias o inibidor DM43 e cada um de seus domínios isoladamente, mapeando as regiões da proteína responsáveis por sua atividade biológica. De modo complementar, submeter a proteína nativa a digestões limitadas ou extensivas, procurando caracterizar fragmentos capazes de interagir com metaloproteases de veneno e/ou inibir sua atividade enzimática.

CAPÍTULO II.
MATERIAL E MÉTODOS

FLUXOGRAMA DA ABORDAGEM DE BIOLOGIA MOLECULAR:



1. VETORES E CEPAS BACTERIANAS

Nesta tese, utilizamos o vetor pGEM-T *Easy* (Promega) portador do cDNA que codifica a proteína antiofídica DM43 como molde para amplificação das regiões codificantes de interesse.

Os vetores escolhidos para expressão heteróloga em *Escherichia coli* foram o pET101 e o pET102 D-TOPO (Invitrogen), representados esquematicamente na Figura 1. Dentre suas características mais importantes, podemos observar que são constituídos por:

- a) um promotor de transcrição T7/*lac*, que permite a expressão, induzível por IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo), de altos níveis de proteína recombinante em bactérias que expressam T7 RNA polimerase;
- b) um operador lactose (*lacO*), sítio de ligação do repressor lac (codificado pelo gene *lacI*), responsável pela reduzida expressão basal da proteína recombinante;
- c) um sítio de ligação ao ribossomo (*RBS*), que garante a tradução eficiente do RNAm;
- d) uma região para clonagem unidirecional dos produtos de PCR;
- e) uma região que codifica um epítopo de 14 aminoácidos (*V5 epitope*) e uma sequência que codifica 6 resíduos de histidina, ambas na região C-terminal da proteína heteróloga, permitindo, respectivamente, seu reconhecimento por anticorpo e sua purificação por cromatografia de afinidade ao níquel;
- f) um terminador de transcrição T7 (*T7 term*);
- g) um gene de resistência à ampicilina (codifica β -lactamase), para permitir a seleção das bactérias transformadas;
- h) apenas no pET102, uma região codificadora para tiorredoxina (*HP thioredoxin*; 11,7 kDa). Quando em fusão com a proteína heteróloga, esta proteína pode aumentar a eficiência de tradução e, em alguns casos, a solubilidade de proteínas eucarióticas expressas em *E. coli*;
- i) também apenas no pET102, um sítio de clivagem específico para enteroquinase (*EK*), localizado entre as sequências das duas proteínas fusionadas, permitindo a obtenção do recombinante livre de tiorredoxina.

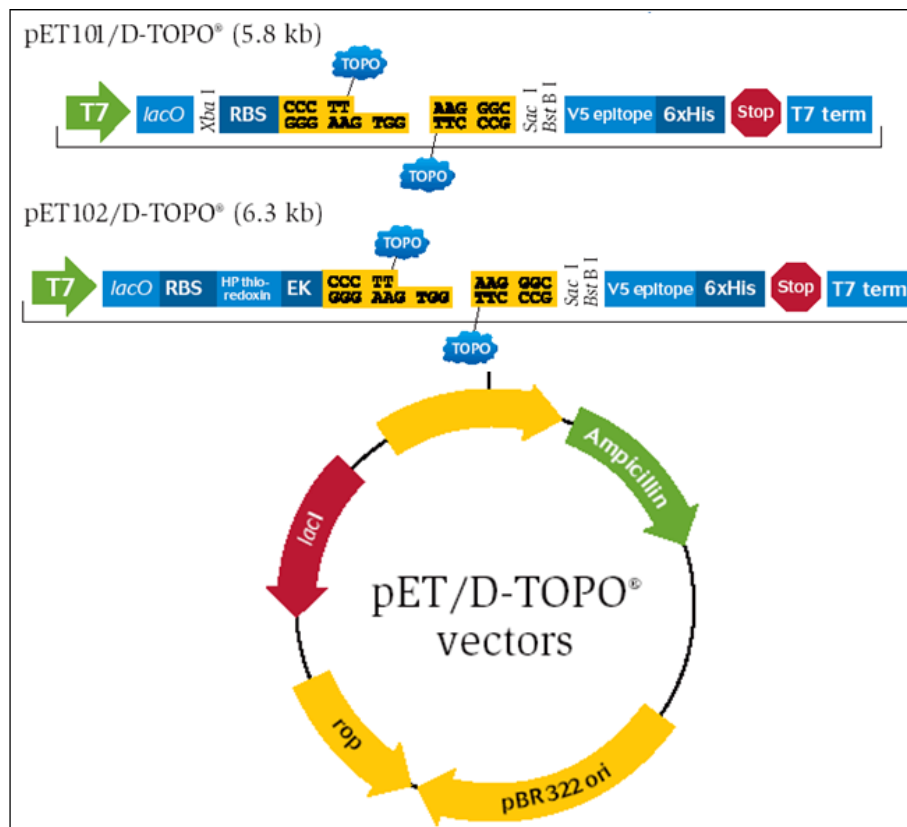


Figura 1: Desenho esquemático dos vetores pET101 e pET102 D-TOPO.

Para clonagem e propagação dos clones de interesse, utilizamos a linhagem One Shot® TOP10 de *E. coli*, genótipo [*F*⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*] (Invitrogen). Para expressão da proteína recombinante, que só ocorre na presença de T7 RNA polimerase induzível por IPTG, foi utilizada a linhagem BL21 Star™ (DE3) de *E. coli*, genótipo [*F*⁻ *ompT* *hsdS_B* (*r_B™m_B*) *gal* *dcm* *rne131* (DE3)] (Invitrogen).

As bactérias competentes foram preparadas em nosso laboratório da seguinte maneira: alíquotas de *E. coli* TOP10 e BL21 Star (DE3) provenientes do kit de clonagem (Invitrogen) foram estriadas em uma placa contendo meio de cultivo Luria Bertani sólido (LB Ágar, composição: 1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1 % cloreto de sódio, 15 g/L ágar) e incubadas, a 37°C, por aproximadamente 16 h. Uma única colônia foi isolada e cultivada, pelo mesmo período, em 5 mL de meio LB líquido sem antibiótico (composição: 1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1 % cloreto de sódio). No dia seguinte, 500 µL do meio cultivado foram transferidos para

um balão *Erlenmeyer* estéril contendo 100 mL de meio LB líquido sem antibiótico (diluição 1:200) e incubados a 37°C. O aumento da biomassa foi monitorado pela turbidez (densidade ótica ou OD) do meio a 600 nm. Após atingir OD₆₀₀ entre 0,2 e 0,4, o meio foi submetido à centrifugação, a 4.000 x *g*, por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento de bactérias, foram adicionados 40 mL de solução de CaCl₂ 100 mM, esterilizados através de filtração em membrana com tamanho de poro de 0,22 µm. Após incubação em gelo por 20 min, uma nova centrifugação foi feita nas mesmas condições anteriores e as células foram ressuspensas em 8 mL de solução de CaCl₂ 100 mM, contendo 10 % de glicerol. Este tratamento tornou as células competentes, isto é, com as paredes fragilizadas, facilitando a transformação com DNA plasmidial, após choque térmico. A suspensão bacteriana foi dividida em pequenas alíquotas (100 µL), estocadas a - 80 °C. A eficiência de transformação destas células foi medida com o plasmídeo controle (pUC19 - 10 pg/µL) fornecido pelo kit de clonagem, e expressa em CFU/µg, segundo o protocolo do fabricante (Invitrogen).

(Pesquisa com OGM autorizada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança CTNBio; CQB 105/99).

2. DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS E REAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES

Os oligonucleotídeos foram desenhados com o objetivo de amplificar as regiões codificadoras referentes a DM43 completa e a cada um de seus domínios isolados. Os oligonucleotídeos para as fitas senso possuíam um adaptador (5` CACC 3`), indicado em vermelho na tabela 1, essencial para permitir a clonagem direcional dos *amplicons* nos vetores pET. O códon de iniciação ATG, necessário para expressão proteica no vetor pET101, está sublinhado. No vetor pET102, já existe um códon de iniciação imediatamente anterior à sequência da tiorredoxina. As sequências de todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão descritas na tabela abaixo.

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos desenhados para clonagem das regiões de interesse de DM43.

Nome	Sequência (5' → 3')	FITA
DM43D1F	C ACC TTA AAG GCT ATG GAC CCA ACT	Senso
DM43D1R	AGG CTC TTT TCC TGT CAC CTC	Anti-senso
DM43D2F	C ACC CTC CCT GCC CCC TCT TTG	Senso
DM43D2R	GAA GTC TGG TAT CAC AAT GTG	Anti-senso
DM43D3F	C ACC CTG CCA AAG GCC AAC TTC TAT	Senso
DM43D3R	CTG GCC TGT ACT CAG GTC CAG	Anti-senso
DM43101D1F	C ACC <u>ATG</u> TTA AAG GCT ATG GAC CCA ACT	Senso
DM43101D2F	C ACC <u>ATG</u> CTC CCT GCC CCC TCT TTG	Senso
DM43101D3F	C ACC <u>ATG</u> CTG CCA AAG GCC AAC TTC TAT	Senso

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 50 µL. Utilizamos como molde 1 µL do vetor pGEM-T *easy* (~2 ng/µL), contendo o cDNA que codifica para DM43. Utilizamos também: 0,4 µL (2 unidades) de DNA polimerase de alta fidelidade (*Taq HiFi*, Invitrogen); 5 µL de solução tampão da polimerase fornecida pelo fabricante 10 x concentrada; 2 µL de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados: dATP, dCTP, dGTP, dTTP / 2,5 mM); 1 µL de MgSO₄ 1,5 mM; e 2 µL de cada oligonucleotídeo (senso e anti-senso / 25 mM). O programa utilizado no termociclador da marca Techne® foi:

- 94 °C, por 5 min;
- 35 ciclos de:
 - 94 °C, por 45 seg
 - 55-65 °C (dependendo do oligonucleotídeo), por 45 seg;
 - 68 °C, por 1 min e 30 seg;
- mais uma extensão de 68 °C, por 5 a 7 min.

Os produtos finais de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 %, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio . Como tampões do gel e de corrida, foi utilizado o TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM). Após migração no gel, a(s) banda(s) de interesse foram recortadas no transiluminador, usando baixa intensidade de UV. O DNA foi extraído e eluído utilizando-se o kit *Concert Rapid Gel Extraction System* (Invitrogen), segundo o protocolo do fabricante. Este DNA foi novamente analisado por eletroforese em gel de agarose para verificar a eficiência da extração.

3. LIGAÇÃO DOS INSERTOS AOS VETORES DE EXPRESSÃO

Os insertos purificados foram incubados, por 30 min, à temperatura ambiente, com os vetores de expressão pET101 ou pET102 D-TOPO, segundo as especificações do kit de clonagem do fabricante (Invitrogen), da seguinte forma:

- 0,1 a 4 μ L do produto de PCR
- 1 μ L de solução salina
- Água *q.s.p.* 5 μ L
- 1 μ L do vetor TOPO
- Volume final = 6 μ L

4. TRANSFORMAÇÃO DE *E. COLI*, LINHAGEM TOP10

O produto de ligação (6 μ L) foi adicionado a 100 μ L de bactérias cálcio-competentes TOP10, que estavam congeladas a - 80 °C em glicerol e que foram previamente descongeladas, em gelo, por 15 min. A solução foi incubada, por 30 min, no gelo e, a seguir, submetida a choque térmico, a 42 °C, por 2 min, e imediatamente resfriada no gelo, por 5 min.

As bactérias transformadas foram misturadas a 700 μ L de meio LB líquido e incubadas, a 37 °C, sob agitação, por 1 h. Toda amostra foi plaqueada em meio LB-Ágar suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) e incubada, por aproximadamente 18 h, a 37°C. Destes plaqueamentos, foram coletadas todas as colônias. Para amplificação dos clones, cada colônia foi inoculada em 2,5 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 μ g/mL, sendo incubada, a 37 °C, sob agitação, por 18 h. O DNA plasmidial de todas as amostras foi extraído usando o sistema de mini-preparação comercial *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. A eluição do DNA purificado pelas minicolunas Wizard® SV foi feita com 50 μ L de H₂O, a 65°C.

5. SEQUENCIAMENTO DE DNA

Alíquotas de aproximadamente 200 ng de DNA plasmidial foram submetidas a sequenciamento pelo método de terminação de cadeia por didesoxirribonucleotídeos, adaptado para o sequenciador capilar ABI 3730 (Applied Biosystems), alocado na Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA do PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde, Fundação Oswaldo Cruz). Este método consiste na polimerização de cadeias nucleotídicas, complementares ao DNA sendo sequenciado, que são interrompidas ao acaso sempre que um ddNTP (didesoxirribonucleotídeo trifosfatado) marcado com corante fluorescente específico é incorporado. Ao contrário dos dNTPs usuais, os ddNTPs não possuem OH na posição 3' da desoxirribose e, portanto, não podem formar uma ligação fosfodiéster com o próximo dNTP a ser incorporado. Ao final deste processo, fragmentos de diversos tamanhos são gerados, diferindo entre si por uma única base. Após separação por eletroforese, os ddNTPs de cada fragmento são detectados através de feixes de laser, permitindo diagnosticar qual a posição de cada base na fita de DNA. Para reação de sequenciamento, foi usado o kit *Big Dye 3.1 Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante.

Em alguns casos, amplificamos por PCR, com uma DNA polimerase comum (*Taq polimerase*, Invitrogen), as regiões de interesse dos plasmídeos clonados, antes do sequenciamento. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1 % e as bandas amplificadas foram recortadas do gel. Após extração e eluição do DNA, como descrito anteriormente, aproximadamente 20 ng foram submetidos ao sequenciamento. Os oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento em ambos os casos foram: T7F (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') e T7R (5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'). Apenas no caso do pET102, usamos também o TrxFus (5' TTC CTC GAC GCT AAC CTG GCC 3').

6. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Os arquivos referentes aos eletroferogramas das sequências foram exportados a partir do programa *Chromas*. As sequências de DNA obtidas foram comparadas com os bancos de dados de nucleotídeos e proteínas do GenBank, através do programa *BLAST*, usando os algoritmos BLASTx e BLASTn . Os resultados do sequenciamento também foram comparados diretamente com a sequência do cDNA de DM43 obtida durante o Mestrado , utilizando o programa *Multalin* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

7. TRANSFORMAÇÃO DE *E. COLI* BL21 STAR (DE3) E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Os clones positivos por sequenciamento, ou seja, vetores de expressão (pET 101 ou 102) que incorporaram os DNAs que codificam para cada um dos três domínios de DM43 isoladamente e para DM43 completa, foram usados para transformação de bactérias competentes BL21 *Star* (DE3) de forma análoga à transformação em TOP10. Após choque térmico, as bactérias transformadas foram misturadas a 500 µL de meio LB líquido e incubadas, a 37 °C, sob agitação, por 1 h. Cada amostra foi então diluída em meio LB/ampicilina 100 µg/mL (*q.s.p.* 10 mL) e incubada, na mesma temperatura, sob agitação, por aproximadamente 12 h.

Em seguida, os 10 mL do meio crescido de cultura foram diluídos 20 vezes. As novas culturas foram incubadas, a 37° C, sob agitação, com monitoramento de turbidez de hora em hora. No momento em que a OD₆₀₀ atingiu aproximadamente 0,6, alíquotas de 20 mL foram retiradas de cada cultura (controle não induzido). Ao restante do volume, foi adicionado IPTG, para uma concentração final de 1 mM (amostra induzida). As incubações prosseguiram, para ambas as amostras induzidas e não-induzidas, por mais 12 h, a 37 °C, sob agitação.

As bactérias foram coletadas por centrifugação (10.000 x g, por 10 min, a 4°C) e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos bacterianos da amostra não-induzida foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M e Triton X-100 0,1 %) e os da fração induzida, em 10 mL do mesmo tampão. A seguir, as bactérias foram lisadas por 20 ciclos de congelamento em banho de gelo

seco/acetona (1 min) e descongelamento, a 37 °C (2 min), e centrifugadas a 10.000 x g, por 15 min, a 4 °C. Os sobrenadantes (fração solúvel) foram coletados e mantidos a 4 °C. Os sedimentos (corpúsculos de inclusão – fração insolúvel) foram lavados duas vezes com tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, Triton X-100 0,1 %, β-mercaptoetanol 5 mM, Uréia 1 M, e solubilizados em 1 mL (no caso da fração não-induzida) ou 10 mL (fração induzida) de tampão Tris-HCl 200 mM, NaCl 0,5 M, β-mercaptoetanol 5 mM, Uréia 8 M, pH 8,0, por aproximadamente 12 h, sob agitação, à temperatura ambiente.

8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Amostras das frações solúveis e insolúveis foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), usando o sistema descontínuo de Tris-glicina descrito por Laemmli . O gel de empilhamento era composto de poliacrilamida a 4 %T e o gel de separação, de poliacrilamida a 12 ou 15 %T (todos os géis a 2,67 %C). Os géis foram submetidos a 200 volts constantes, por cerca de 40 min. Para análise dos peptídeos de baixa massa molecular gerados após clivagem dos recombinantes por enteroquinase (vide item 14), utilizamos eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, no sistema descontínuo de Tris-tricina descrito por Schägger & von Jagow . Neste caso, utilizaram-se um gel de separação preparado a 16,5 %T, um gel espaçador a 10 %T e um gel de empilhamento a 4 %T (todos os géis a 3 %C). As corridas foram feitas, a corrente constante de 10 mA, até a linha de frente atingir o gel espaçador, e a 20 mA até o final da corrida. Em ambos os sistemas, foi utilizado o equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad).

Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas nos géis através de incubação, por 30 min, em etanol 40 % (v/v) e ácido acético 10 % (v/v). Em seguida, os géis foram incubados, por 1 h, em azul de Coomassie R-250 0,2 %, dissolvido em solução fixadora fresca. A retirada do excesso de corante do gel foi feita por lavagem, também com solução fixadora fresca, por 1-2 horas, seguida de incubação em água, por cerca de 24 horas, para completa descoloração do *background*.

9. OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL CONTRA **DM43** NATIVA

A DM43 utilizada como antígeno para produção do soro policlonal foi purificada do soro do gambá *Didelphis aurita*, como anteriormente descrito . Alíquotas de 25 µg da proteína isolada foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β-mercaptoetanol . Após a corrida, os géis foram incubados com azul de Coomassie R-250 0,05%, por 10-20 min, e o excesso de corante lavado com água. As bandas coradas de DM43 (4 x 25 µg) foram cortadas e maceradas em tubos tipo *Eppendorf*, na presença de 100 µL de solução salina fisiológica. Ao macerado, foram adicionados mais solução salina (*q.s.p* 500 µL) e 500 µL de adjuvante incompleto de Freund, misturando-se vigorosamente no vórtex. A emulsão obtida foi imediatamente injetada, por via sub-cutânea (4 x 200 µL), em coelhos *New Zealand*. Foram feitos ainda dois reforços com igual quantidade de antígeno, em intervalos de ~30 dias. Passados 10 dias da última imunização, os coelhos foram anestesiados com pentobarbital 3 % em água (dose de 75 mg/kg, *i.v*) e sangrados através de punção cardíaca. Após coagulação, por 1 hora, a 37 °C, o sangue foi centrifugado a 1.000 x g, por 15 min, para obtenção do soro contendo os anticorpos policlonais.

(Procedimento autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais; CEUA-FIOCRUZ em 24/10/2005 - Licença P0176/03).

10. RECONHECIMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR ANTICORPOS ANTI-**DM43** OU ANTI-CAUDA DE HISTIDINA

As proteínas recombinantes (frações induzidas insolúveis) foram submetidas a SDS-PAGE, como descrito anteriormente, e transferidas para membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno), por 2 h, a 100 volts constantes, em sistema *Mini Trans-Blot* (BioRad), banhado em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,5, contendo 20% metanol). Após a transferência, as membranas foram incubadas, por aproximadamente 12 horas, em TBS (Tris-HCl 25 mM, NaCl 140 mM, KCl 2 mM, Tween 20 0,05 %) contendo 5 % de leite em pó desnatado, para bloquear seus sítios inespecíficos de ligação. Após lavagem em TBS (3 x 10 min), as

membranas foram incubadas, por 2 h, com: a) anticorpo purificado anti-cauda de 6 histidinas (anti-His, GE Healthcare) (diluição 1:3.000); ou b) soro policlonal anti-DM43 produzido em coelhos (diluição 1:100) (vide item 9). Após novas lavagens, as membranas foram incubadas, por 2 h, com anticorpos secundários policlonais anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho, respectivamente, ambos conjugados com peroxidase (diluição 1:5.000). As membranas foram lavadas novamente, como descrito acima, e as bandas reveladas com DAB (diaminobenzidina) Sigma Fast™ (Sigma). A reação foi interrompida por lavagem da membrana em água.

11. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Os recombinantes também foram analisados por SDS-PAGE, seguido de digestão tríplica *in gel* e identificação por MS/MS. O protocolo de tripsinização *in gel* seguiu a metodologia descrita por Shevchenko e colaboradores, com modificações. Em resumo, as bandas de interesse, coradas por azul de Coomassie, foram excisadas, descoradas totalmente em solução aquosa de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, em acetonitrila 50 % e desidratadas com 200 µL de acetonitrila. Após breve secagem por centrifugação a vácuo (*Speed Vac*), as proteínas no gel foram reduzidas, por 30 min, em solução de ditioneitol 10 mM, em bicarbonato de amônio 100 mM, seguido de alquilação, por mais 30 min, em solução de iodoacetamida 50 mM, em bicarbonato de amônio 100 mM. Após lavagens alternadas com bicarbonato de amônio 100 mM e acetonitrila 100 %, os pedaços de gel contendo as proteínas foram secos rapidamente no *Speed Vac* e reidratados, no gelo, por 10 min, com 10 µL de solução de tripsina (Promega) 20 ng/µL, em bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,0. Após adição de mais 20 µL de bicarbonato de amônio 50 mM em cada um dos tubos, todas as amostras foram incubadas, a 37 °C, por 16 h. Em seguida, parte dos peptídeos trípticos gerados foi recuperada recolhendo-se o excesso de líquido presente em cada um dos tubos. Os peptídeos trípticos retidos na malha do gel foram extraídos após sonicação com 30 µL de solução aquosa de acetonitrila 50 %, ácido fórmico 5 %. Este último procedimento foi repetido mais uma vez e as três alíquotas contendo os peptídeos trípticos de cada amostra (~80 µL) foram unidas, concentradas no *Speed Vac* até 10 µL e analisadas no espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (ABI 4700 Applied Biosystem). Pedaços de gel sem proteína e do

marcador de massa molecular BSA (albumina de soro bovino) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. As amostras foram misturadas v/v com a matrix (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, 10 mg/mL em acetonitrila 50 % e ácido trifluoroacético 0,3 %) e as misturas (0,6 μ L) aplicadas individualmente na placa de MALDI e secas à temperatura ambiente. A calibração externa no modo MS foi feita utilizando-se os seguintes peptídeos: des-Arg1-bradykinin ($m/z = 904,468$), angiotensin I ($m/z = 1.296,685$), Glu1-fibrinopeptide B ($m/z = 1.570,677$), ACTH-(1–17) ($m/z 2.093,08$), ACTH (18–39) ($m/z = 2.465,199$). A calibração externa no modo MS/MS foi feita usando as massas de íons fragmento conhecidos da angiotensina I. Os espectros MS foram adquiridos no modo positivo com *reflectron*, utilizando-se 1.250 pulsos de laser por amostra. Os dez íons-precusores mais abundantes foram selecionados para fragmentação e posterior análise por MS/MS. As massas dos fragmentos das amostras geradas foram submetidas à pesquisa contra o banco de dados não-redundante do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), com o auxílio do programa MASCOT (Matrix Science). Para cálculo dos percentuais de cobertura de sequência alcançados com os peptídeos identificados, foi construído um banco local contendo as sequências dos domínios isolados, com ou sem fusão com a tiorredoxina. Os parâmetros usados na busca foram: duas clivagens de tripsina perdidas, $\pm 0,8$ Da de erro no modo MS, $\pm 0,6$ Da de erro no modo MS/MS e as seguintes modificações variáveis: carbamidometilação de cisteína, oxidação de metionina, fosforilação de treonina, serina ou tirosina e pyro-Glu no N-terminal. A especificação do instrumento para a busca de dados através do programa MASCOT foi “MALDI-TOF/TOF”. Finalmente, os resultados foram conferidos manualmente.

12. PURIFICAÇÃO E RE-ENOVELAMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A clonagem nos vetores de expressão da linha pET-TOPO (Invitrogen) possibilitou a inserção de uma sequência de 6 histidinas nas proteínas recombinantes. Esta “cauda” de 6 histidinas se liga ao níquel acoplado à matriz da coluna *HisTrap FF crude* (5 mL, GE Healthcare), facilitando sua purificação, já que a maioria das proteínas indesejadas, ou contaminantes, não se liga à coluna. As proteínas contendo cauda de histidina são eluídas lavando-se a coluna com altas concentrações de compostos que também interagem com o níquel, como o imidazol.

Como o anel imidazólico é parte integrante da estrutura da histidina, o imidazol competirá com a histidina na ligação aos íons níquel imobilizados na matriz da coluna, permitindo o deslocamento e a eluição da proteína recombinante.

Para purificação das proteínas recombinantes, as frações induzidas solubilizadas em tampão contendo 8 M de Uréia foram diluídas v/v em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM. Após centrifugação, por 10 min, a $10.000 \times g$, o sobrenadante (5 mL) foi submetido à cromatografia em coluna *HisTrap FF crude*, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM e Uréia 4 M, em sistema cromatográfico de média pressão (*Äkta Purifier*, GE Healthcare). A eluição foi feita com gradiente crescente linear do mesmo tampão, contendo 500 mM de imidazol e fluxo de 2,0 mL/min. As frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE.

O re-enovelamento das proteínas recombinantes foi feito por diálise (MiniDialysis Kit, *cut off* 10 kDa, GE Healthcare) contra tampões contendo concentrações decrescentes de Uréia. As amostras purificadas por afinidade (2 mL) foram dialisadas, por 24 h, contra 2 x 400 mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Uréia 2 M, e logo por mais 24 h, contra 2 x 400 mL do mesmo tampão sem Uréia. Todos os testes de atividade foram feitos com estas preparações de proteínas recombinantes. Alternativamente, para a análise por dicroísmo circular (que sofre interferência do Tris) (vide item 15), os recombinantes em solução concentrada de Uréia também foram submetidos a diálises contra PBS pH 7,4 (com 2 M de Uréia e sem Uréia). Após cada passo de diálise, as amostras foram coletadas, centrifugadas, por 10 min, a $10.000 \times g$, e submetidas à dosagem de proteínas.

13. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração proteica das amostras contendo Uréia foi determinada utilizando-se o 2D-Quant kit (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante. Basicamente, as proteínas são precipitadas, deixando-se todos os interferentes (e.g agentes caotrópicos) no sobrenadante que será desprezado. As proteínas são então ressuspensas em uma solução alcalina contendo Cu^{+2} . Parte do íons cúpricos se liga às proteínas e os íons que permanecem livres em solução são quantificados através

de reação colorimétrica (480 nm), de modo que a intensidade de cor será inversamente proporcional à quantidade de proteína (relação linear entre 0-50 µg). Eventualmente, as amostras dialisadas que não continham Uréia também foram dosadas pelo método do ácido bicinchonínico (BCA) , que se baseia na redução do Cu^{2+} catalisada por proteínas. Em meio alcalino, o Cu^+ gerado forma um complexo com o BCA, absorvendo fortemente na região de 560 nm. Em ambos os casos, a soro albumina bovina foi usada como proteína padrão. A absorbância das amostras nos comprimentos de onda específicos de cada método foi determinada na leitora de placa *Versa Max Microplate Reader (Molecular Devices)*.

14. ENSAIO DE CLIVAGEM COM ENTEROQUINASE

A enteroquinase é uma serino-protease específica que reconhece a sequência $[\text{Asp}]_4\text{Lys}$ e cliva depois do resíduo de lisina . No vetor pET102, há um sítio de clivagem desta enzima, localizado entre a tiorredoxina e a proteína recombinante expressa, possibilitando a separação de ambas. Neste trabalho, usamos a EKmax (Invitrogen), uma enzima recombinante produzida em *Pichia pastoris* que, segundo o fabricante, é mais eficiente e mais específica do que as outras enteroquinases comerciais. Foram feitas reações onde incubamos 10 µg de proteína recombinante com 0,1 a 1,0 unidade de enzima EKmax no tampão da enzima fornecido pelo fabricante, por aproximadamente 12 h, a 37°C. Os resultados foram analisados por SDS-PAGE em gel de Tris-tricina, como descrito no item 8.

15. DICROÍSMO CIRCULAR

Para estimativa da composição de sua estrutura secundária, as proteínas recombinantes foram analisadas por dicroísmo circular (CD) , utilizando o espectropolarímetro *Jasco J-815 Circular Dichroism System*, do Laboratório de Esquistossomose Experimental, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Os dados foram coletados em cubetas de 1 mm de caminho ótico, a 0,5 nm/seg e *bandwidth* de 1 nm. As amostras purificadas em coluna de níquel e dialisadas contra Tris ou PBS

(0,1 – 0,3 mg ptn / mL) foram diluídas em água (4 x) antes da obtenção dos espectros, no intervalo de 190 a 260 nm, à temperatura ambiente, como uma média de quatro varreduras. Em todas as medidas, os espectros dos solventes foram subtraídos.

Os espectros de CD foram expressos em termos de elipticidade molar residual,

$$[\theta] = \theta \text{ (mdeg)} / 10 \times C \text{ (M)} \times l \text{ (cm)} \times aa, \text{ onde:}$$

θ : elipticidade em miligraus

C: concentração molar da proteína

l: caminho ótico

aa: número de resíduos de aminoácidos da proteína

Por análises comparativas, tendo como base espectros característicos das diferentes estruturas secundárias de proteínas em solução, obtidos na região do ultravioleta (UV) distante (240 nm a 180 nm) (Figura 2), foi possível avaliar a integridade estrutural dos recombinantes. As sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes também foram submetidas ao programa de predição de estrutura teórica PSIPRED, disponível em servidor público (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

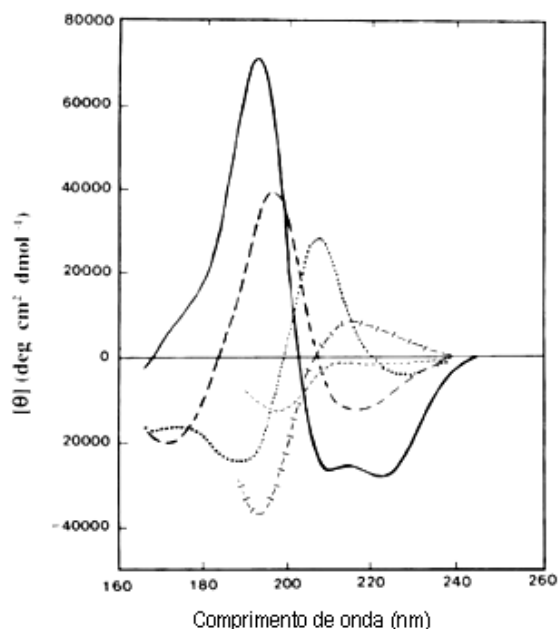


Figura 2: Espectro de CD na região do UV distante de vários tipos de estrutura secundária . a) curva contínua: alfa-hélice; b) curva de tracejado longo: folha beta antiparalela; c) curva pontilhada: *beta turn* tipo I; d) curva de tracejado cruzado: hélice estendida ou hélice de poli-prolinas; e) curva de tracejado curto: região randômica.

16. ANÁLISE DA OLIGOMERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As mesmas amostras utilizadas na análise de CD foram avaliadas quanto a seu grau de oligomerização, utilizando as seguintes técnicas:

- a) Eletroforeses em gel de poliacrilamida (vide item 8), tanto em condições nativas, quanto na presença de SDS, com e sem β -mercaptoetanol;
- b) Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare), equilibrada com PBS pH 7,4, a um fluxo de 0,5 mL/min. Para o cálculo das massas moleculares dos oligômeros, a coluna foi calibrada com os seguintes padrões de massas conhecidas (GE Healthcare): Blue dextran (~2.000 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumina (45 kDa) e quimotripsina (25 kDa). O pico de di-BSA (134 kDa) presente na padrão de BSA também foi considerado. A curva padrão utilizada para calcular as massas moleculares desconhecidas foi construída relacionando-se o logaritmo da massa molecular de cada proteína padrão e seu respectivo volume de eluição normalizado, estimado pelo parâmetro K_{av} , como descrito abaixo :

$K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, onde:

V_e : volume de eluição do soluto

V_0 : volume de exclusão da coluna (V_e Blue Dextran)

V_t : volume total da coluna

- c) MALDI-TOF no modo linear, no equipamento 4700 da Applied Biosystems, usando ácido sinapínico como matriz.

17. ENSAIO DE INIBIÇÃO DE ATIVIDADE AZOCASEINOLÍTICA DA JARARAGINA

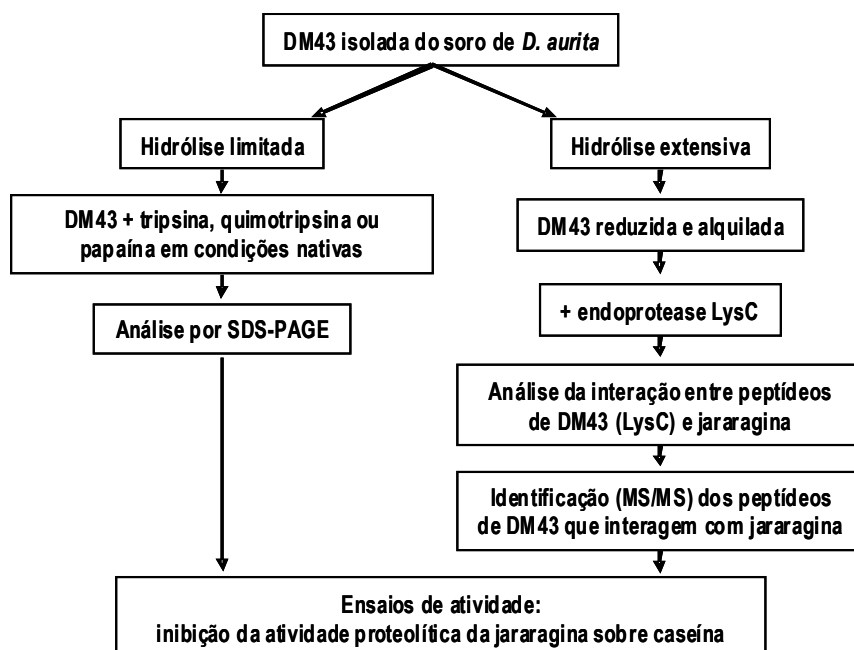
A jararagina, metaloprotease do veneno de *Bothrops jararaca*, foi isolada como previamente descrito . Esta enzima (1 μ g) foi incubada com as diferentes preparações de proteínas recombinantes (purificadas em coluna de níquel e dialisadas contra tampão Tris), nas relações molares de 1:2, 1:5 e 1:10, por 10 min, a 37°C. As misturas foram então testadas sobre azocaseína 0,5 % em Tris-HCl 10 mM pH 8,6, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, por 1 h, a 37°C. Após adição de ácido tricloroacético para parar a reação, os tubos foram centrifugados, desprezando-se o

precipitado. Os sobrenadantes foram misturados v/v com NaOH 0,5 N, antes da leitura a 380 nm em placas de ELISA . Como controle positivo de hidrólise, utilizamos a jararagina na ausência das proteínas recombinantes. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

18. ENSAIO DE INIBIÇÃO DE ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA DA JARARAGINA

A inibição da hidrólise da cadeia A α do fibrinogênio bovino pela jararagina foi analisada segundo metodologia descrita por Neves-Ferreira (2002) . Jararagina (1 μ g) foi incubada com os diferentes recombinantes, nas relações molares de 1:2, 1:5 e 1:10, por 10 min, a 37°C. Em seguida, a mistura foi testada sobre 10 μ g de fibrinogênio, incubando-se por mais 10 min, a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de tampão de amostra de eletroforese 2 x concentrado, contendo β -mercaptoethanol , e fervura por 5 min. Como controle positivo da hidrólise, foi utilizada jararagina na ausência de qualquer inibidor. Todas as amostras foram analisadas por SDS-PAGE corado por Coomassie R250.

FLUXOGRAMA DA ABORDAGEM DE BIOQUÍMICA CLÁSSICA:



Em todos os ensaios realizados, a DM43 utilizada foi isolada do soro do gambá *Didelphis aurita*, como anteriormente descrito .

19. HIDRÓLISE LIMITADA DE DM43

DM43 nativa foi dissolvida em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (0,5 mg/mL) e incubada, a 37°C, com tripsina (V511, Promega) ou quimotripsina (grau sequenciamento, Boehringer Mannheim). A relação enzima (E) / substrato (S) utilizada foi de 1:25 (p/p). Alternativamente, DM43 foi incubada com papaína (P4762, Sigma), na relação E:S de 1:10 (p/p). Alíquotas foram retiradas nos tempos de 1, 3, 6 e 24 h de incubação e a reação foi interrompida por adição de APMSF (Sigma) e E64 (Sigma), respectivamente para tripsina/quimotripsina e papaína. Após adição de tampão de amostra contendo SDS e β -mercaptoetanol , as amostras foram analisadas por SDS-PAGE, como já descrito. Adicionalmente, elas foram testadas quanto à capacidade de inibir a hidrólise de azocaseína induzida por jararagina (6 μ g), como descrito no item 17. A relação jararagina:DM43 utilizada foi de 1:4

(mol/mol). A proteína BSA foi utilizada como controle de hidrólise no ensaio com papaína.

20. HIDRÓLISE EXTENSIVA DE DM43

DM43 foi desnaturada e reduzida após incubação, por 3 h, a 37 °C, em bicarbonato de amônio 0,4 M, contendo Uréia 8 M, DTT 20 mM. Em seguida, adicionou-se iodoacetamida, para uma concentração final de 66 mM, incubando-se à temperatura ambiente, ao abrigo de luz, por mais 15 min. A amostra reduzida e alquilada foi dessalinizada em coluna de fase reversa C18 (4,4 x 25 cm) (Vydac®), ao fluxo de 0,5 mL/min. A absorvância foi monitorada a 280 nm. O sistema de solventes consistiu de TFA 0,1 % em água (solvente A) e TFA 0,1 % em acetonitrila (solvente B). O programa de eluição utilizado foi: 25 %B por 5 min, 25-75 %B em 30 min, 75 %B por 5 min. A amostra dessalinizada foi seca no *Speed Vac* e redissolvida em Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contendo EDTA 1 mM. Em seguida, adicionou-se endoprotease Lys-C (*sequencing grade*, Roche / 5 µg em 50 µL de HEPES 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, rafinose 5 mg/ml), numa relação E:S 1:66 (p/p), incubando-se, a 37 °C, por 24 horas. Esta endoprotease foi escolhida após análise da estrutura primária de DM43, sob clivagem de várias endoproteases, pelo programa *Peptidecutter* (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/>).

A eficiência de hidrólise de DM43 por Lys-C foi avaliada por: a) cromatografia de fase reversa em coluna C18 (2,1 x 15 cm) (Vydac®), ao fluxo de 0,2 mL/min. Como controle, a DM43 íntegra reduzida e alquilada foi submetida às mesmas condições cromatográficas. A absorvância foi monitorada a 215 nm. O sistema de solventes foi o mesmo já descrito, com o seguinte programa de eluição: 5 %B por 5 min, 5-45 %B em 50 min, 45-70 %B em 5 min, 70 %B por 5 min; b) MS, no modo positivo, com *reflectron*, no MALDI-TOF/TOF Ultraflex da Bruker Daltonics, usando o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz, conforme descrição anterior.

A possível interação entre a jararagina e os peptídeos de DM43 gerados após digestão por Lys-C foi testada na coluna de exclusão molecular Superdex Peptide HR 10/30 (GE Healthcare), que apresenta resolução ótima entre 0,1 e 7 kDa, com limite de exclusão de 20 kDa. Desta forma, qualquer peptídeo de DM43 que interaja com jararagina (52 kDa) será excluído da coluna, passando a eluir junto com a

jararagina, no volume de exclusão da coluna. As cromatografias foram realizadas no modo isocrático, a 0,5 mL/min, em Tris-HCl 25 mM pH 7,5, contendo 20 mM de CaCl₂. A identificação dos peptídeos de interesse foi feita por MS/MS, no modo positivo com *reflectron*, no MALDI-TOF/TOF Ultraflex da Bruker Daltonics, usando o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz.

Tanto a DM43 reduzida e alquilada, quanto os peptídeos da digestão por Lys-C, foram testados quanto à capacidade de inibir a hidrólise de azocaseína induzida por jararagina (6 μ g), como descrito no item 17. A relação jararagina:DM43 utilizada foi de 1:4 (mol/mol). A DM43 nativa foi utilizada como controle da inibição.

CAPÍTULO III.
RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ABORDAGEM DE BIOLOGIA MOLECULAR

DM43 é uma glicoproteína de 291 resíduos, apresentando 51 % de similaridade com a α 1B-glicoproteína (AAL07469) . Esta proteína humana pertence à superfamília gênica das imunoglobulinas e é composta por cinco domínios estruturais repetidos tipo-imunoglobulina (tipo-Ig) . O alinhamento entre as sequências primárias de DM43 e de α 1B-glicoproteína está mostrado na Figura 3. Estudos de modelagem molecular de DM43 , usando como molde a estrutura cristalina da porção extracelular da proteína KIR2DL1 (*natural killer cell inhibitory receptor*, *Protein Data Bank* código 1nkr) , corroboraram, *in silico*, a presença de fitas de folhas β características, constituindo cada um dos três domínios tipo-Ig do inibidor (Figura 4). Neste modelo, as regiões hipotéticas de interação com as metaloproteases (*loops* em vermelho) foram localizadas por analogia com receptores hematopoiéticos, para os quais existem estruturas cristalinas dos complexos ligante-receptor . Em cada um dos domínios, várias características típicas da superfamília das imunoglobulinas foram encontradas (Figura 3) : resíduos de cisteína conservados (em cinza), formando pontes dissulfeto centralizadas; resíduos de tirosina e fenilalanina em posições definidas (em verde); e seqüências WSXWS degeneradas perto do C-terminal (delimitadas por quadrados pretos).

Proteínas com domínios tipo-Ig são amplamente distribuídas na natureza, tanto em vertebrados como em invertebrados, assim como também em bactérias, vírus, fungos e plantas . Especula-se que elas tenham evoluído a partir de um ancestral comum. Estas proteínas homólogas teriam sofrido evolução com divergência de sequência, de modo a produzir diferentes proteínas funcionais, que compartilham um mesmo arcabouço conservado . No caso de DM43, seus três domínios tipo-Ig alinhados pelo programa MultAlin (matriz Blossum62) , mostraram as seguintes identidades: D1XD2 = 17 %; D2XD3 = 19 %; e D1XD3 = 23 % (Figura 5). Portanto, considerando a homologia existente, procuramos investigar se, isoladamente, os domínios de DM43 preservavam sua atividade biológica, ou seja, se eram capazes de inibir a atividade catalítica de SVMPS.

DM43a MAVPIVLLFLGLWMDPKAEVDA
 α 1BG MSMLVVFLLLWGVTVGVPVTE -- A

DM43a LKAMDPTPP LWIKTESPSTPWT NVTL LCVATNTEELS QVWKDGELLSTL PVVGLVGKFWIG PVTADNRGI IRCRI LTSENIDWTPLSAPVEVIGKEP
 α 1BG AIFYETQP SLWAES ELLKPIANVTL TCQA-HLETPDFQLFKNGVAQEPVHLDSPAI KHQF-LLTGD TQGRYRCRSGL-STGWTQLSKLLELTGPKS

DM43a LPAPSLHAE PGPWILPGLLETKIH CRGMLLGMIEDLYQEGEQE PVKSSQTP-SAEATFIVNSTGNYSCLYRAPASAPSVNSTPSETIHTVIPDFLPK
 α 1BG LPAPWLSMA PVSWI TPGLKTAVCRGVLRGVTFLLRREGDEHFLFVPEAQEDVEATFPVHQPGNYSCSYRTDGEALSEPSATVTIEELAAPP

DM43a LPKANFYILNDRDFRPGDIVTFS CWARFSEREYDLEFKLFKDGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKYSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLS TGO
 α 1BG PPVLMHHESSQVLHPGNKVTLCVAPLS---GVDFFQLRRGEKELLVPR-SSTSPDRIFFHNAVALGDGGHVTCRYRLHDNONGWSGDSAPVELILSDET

DM43a
 α 1BG LPAPEFSPEPES-----GRALRLRCLAPLEGARFALVREDRGRRVHRFQSPAGTEALFELHNI SVADSANYS CVYVDLKP PFGGSAPSERLEIHVDGP

DM43a
 α 1BG PPPQLRATWSGAVLAGRDAVLRCEGPIPDVTFELLREGETKAVKTVRTP--GAAANLELIFVGPQHAGNYRCRYRSWVPHTFESELSDPVELIVAES

Figura 3: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas DM43a e α 1B-glicoproteína humana (AAL07469). A seqüência de DM43a foi determinada por sequenciamento do cDNA clonado e apresenta uma única diferença em relação à DM43 originalmente sequenciada pela Química de Edman (P82957) (V \rightarrow I, destacado em azul claro). As principais diferenças entre as seqüências de DM43a e de α 1B-glicoproteína humana estão mostradas em vermelho. Destacadas em: cinza, as cisteínas; amarelo, os sítios de glicosilação; em verde, os resíduos aromáticos de fenilalanina e tirosina em posições conservadas. As caixas pretas representam as seqüências WSXWS degeneradas, características das proteínas da família das imunoglobulinas. Os colchetes em vermelho indicam a posição dos *loops* putativos de interação com as metaloproteases.

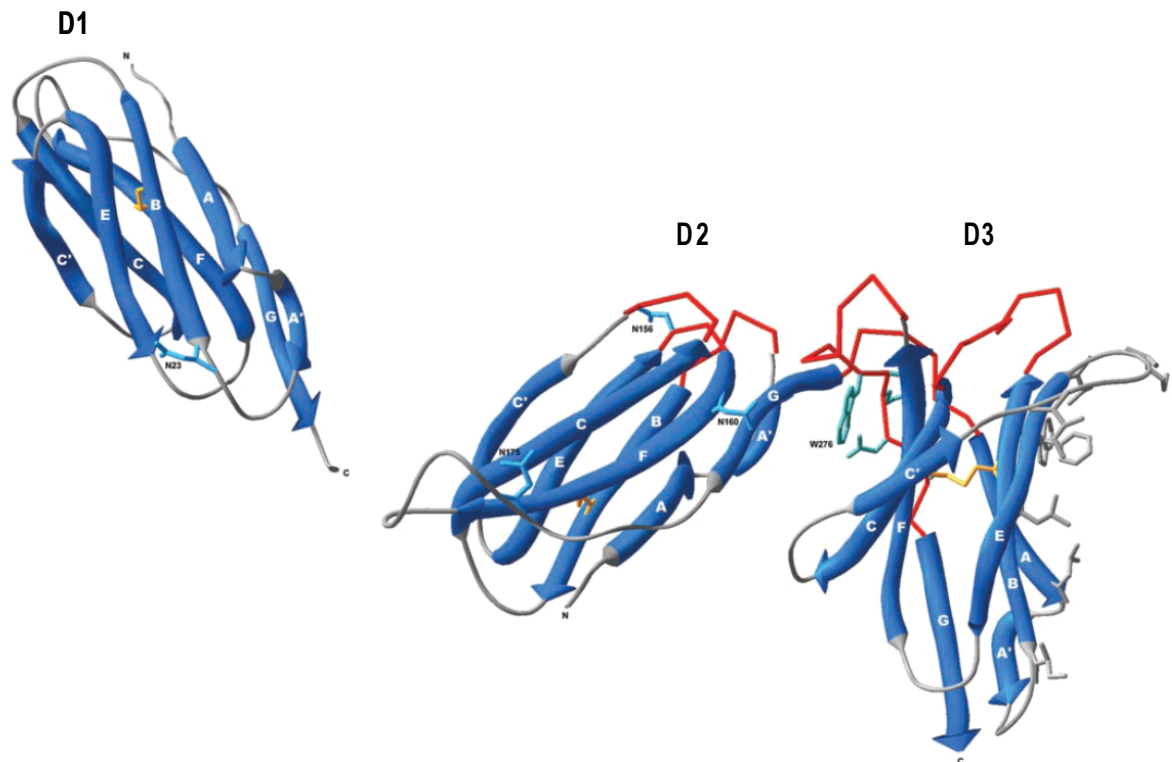


Figura 4: Modelo tridimensional da estrutura de DM43, construído pelo programa MODELLER (com ajustes manuais), usando como modelo a estrutura cristalina da proteína KIR2DL1 (*natural killer cell inhibitory receptor*, Protein Data Bank código 1nkr). D1, D2 e D3 indicam os domínios 1, 2 e 3 de DM43. As pontes dissulfeto de cada domínio estão mostradas em amarelo. As cadeias laterais das quatro asparaginas glicosiladas estão indicadas em azul claro. Em vermelho estão representadas as regiões hipotéticas de interação com as metaloproteases. Em cinza, as cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos.

```

1oDom LKAMDPTPPLWIKTESPSTPWTVNVTLLCVATNTE---ELSFQVKDGE L- -LSTLPVVGLVGKFW- LGPVTADNRGIYRCRILT-SEND--WTPLSAPVEVTGKEP
3oDom L----PKANFYILNDRDFRPGDI VTFSCWARFSEREYDLEFKLFKDGQET PV EVVPI SDPMKVFED LTAVGPKDGCKYSCRYRF-RNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQ
2oDom L----PAPSLHAEPGPWILPGL ETKLHCRGMLL----GMIFDLYQEGEQE PV KSSQTPSAEATFI-----VNSTGNYSCLYRAPASAPSVNS TPSETIHIVIPDF

```

Figura 5: Alinhamento das sequências dos domínios de DM43 pelo programa *Multialin* (matriz Blossum62). Em vermelho, resíduos idênticos nas três sequências; em azul, resíduos idênticos em apenas duas sequências.

Usando α 1B-glicoproteína como modelo, Ishioka e colaboradores tentaram, sem sucesso, obter domínios tipo-Ig separadamente, após hidrólise limitada da proteína nativa por diversas enzimas. A estabilidade da proteína ao ataque proteolítico foi atribuída à frequência de resíduos de prolina nas regiões interdomínios . Conhecendo a similaridade de sequência existente entre α 1B-glicoproteína e DM43, neste trabalho decidimos gerar os domínios isolados de DM43 após clonagem e expressão heteróloga em *E. coli*. Este sistema é o mais conhecido e utilizado, não só pela facilidade e baixo custo de obtenção das bactérias, mas também por sua reprodutibilidade e pela abundância da proteína produzida.

Recentemente, Okumura e colaboradores utilizaram o sistema de expressão em *E. coli* para mapear a relação estrutura-função do GbPLI α , um inibidor de PLA₂ isolado do soro da serpente venenosa *Gloydius brevicaudus*. A região crítica para a atividade inibitória foi localizada entre os resíduos 13 e 36 da estrutura primária do inibidor. Este resultado foi alcançado após expressão heteróloga de diversas quimeras (com deleções e mutações) do GbPLI α e de uma proteína tipo-PLI α isolada do soro da serpente não-venenosa *Elaphe quadrivirgata*, que não possui atividade inibitória contra PLA₂.

Diferentemente de outros sistemas, o produto da expressão em *E. coli* não sofre modificações pós-traducionais, como glicosilação , o que poderia representar uma importante limitação, já que DM43 é uma glicoproteína. Ainda que não envolvam inibidores de SVMPs, há na literatura alguns exemplos de proteínas antiofídicas glicosiladas cujas porções glicídicas não parecem interferir com a atividade inibitória . No caso do PLI- α de *Trimeresurus flavoviridis*, o inibidor não glicosilado (expresso em *E. coli*) foi capaz de interagir normalmente com sua toxina-alvo. Infelizmente, os autores não avaliaram se as atividades tóxicas da PLA₂ também foram inibidas pelo recombinante .

Recentemente, os quatro sítios de N-glicosilação em DM43 (sequências consenso em amarelo na Figura 3) foram determinados experimentalmente em nosso laboratório . Utilizando espectrometria de massas, um sítio foi localizado no primeiro domínio (Asn²³), além de três outros no segundo domínio (Asn¹⁵⁶, Asn¹⁶⁰ e Asn¹⁷⁵). No mesmo trabalho, mostrou-se que as cadeias oligossacarídicas presentes no inibidor são do tipo complexo ; após desglicosilação parcial (retirada de ácido

siálico e galactose), DM43 permaneceu igualmente ativa contra a SVMP jararagina. Entretanto, após desglicosilação enzimática com PNGase em condições nativas, a mistura das diferentes espécies de DM43 geradas teve sua capacidade inibitória reduzida em cerca de 50 %. Em um trabalho anterior, mostramos que DM43 perde solubilidade após completa desglicosilação química com ácido trifluorometanosulfônico (TFMS), inviabilizando sua atividade biológica .

Em conjunto, estes dados indicam que a glicosilação pode ter papel relevante para atividade biológica de DM43, possivelmente aumentando a solubilidade da proteína nativa. Portanto, escolhemos inicialmente, como vetor de expressão, o plasmídeo pET102 (6315 pb) (Invitrogen), onde o recombinante é expresso em fusão com a tiorredoxina, proteína bacteriana conhecida por aumentar a solubilidade de proteínas eucarióticas expressas em *E. coli* . A título de comparação, expressamos igualmente o recombinante em pET101 (5753 pb) (Invitrogen), sem a proteína de fusão. As características destes vetores estão detalhadas no Material e Métodos.

Selecionamos regiões do cDNA de DM43 específicas para clonagem e expressão dos três domínios de DM43 isolados. Também clonamos e expressamos DM43 completa. Assim, preliminarmente, chamamos os domínios 1, 2 e 3 de DM43, quando expressos pelo vetor pET102, de thioD1, thioD2 e thioD3, respectivamente, por estarem em fusão com a tiorredoxina na região N-terminal. DM43 completa, quando expressa no vetor pET102, foi chamada de thioFull. As proteínas expressas no vetor pET101, sem a fusão com a tiorredoxina, foram igualmente denominadas, mas sem o prefixo thio.

Num primeiro momento, foi importante estimar o tamanho de cada construção (proteína recombinante), em pares de bases (pb). Utilizamos o programa *Compute pI/MW tool* (http://expasy.org/tools/pi_tool.html) e também determinamos o pI e a massa molecular das proteínas recombinantes *in silico*. Outro dado importante é a probabilidade da proteína recombinante ser solúvel quando superexpressa no sistema bacteriano. Segundo Davis e colaboradores , a solubilidade de uma proteína está diretamente relacionada à sua seqüência de aminoácidos. Assim, usamos o programa *Recombinant Protein Solubility Prediction* (<http://biotech.ou.edu/>), que constitui uma versão modificada por Davis do modelo estatístico de Wilkinson e

Harrison , para predição da solubilidade de proteínas recombinantes. Os resultados estão mostrados na Tabela 2. Podemos observar que, como esperado, as melhores chances de obter proteínas solúveis são quando os recombinantes são expressos em fusão com a tiorredoxina.

Tabela 2: Características das proteínas recombinantes obtidas *in silico*. Em negrito estão as sequências correspondentes a cada domínio.

Nome	Vetor	Inserto+vetor (pb)	pl	MM (kDa)	Sequência proteica	Probabilidade solubilização
D1	pET101	6044	6,04	14,2	MLKAMDPTPLWIKTESPSTPWTNVTLLCVATNTEELSFQVWKDG ELLSTLPVVGLVGKFWLGPVTADNRGIYRCRILTSENDWTPLSAP VEVTGKEPKGELKLEGKPIPDPLLGLDSTRTGHHHHHH	30,9%
D2	pET101	6029	5,93	13,4	MLPAPSLHAEPGPWILPGLLETKLHCRGMLLGMIFDLYQEGEQEPV KSSQTPSAEATFIVNSTGNYSCLYRAPASAPSVNSTPSETIHVVI PDFKLEGKLEGKPIPDPLLGLDSTRTGHHHHHH	27,6%
D3	pET101	6059	6,05	15,5	MLPKANFYILNDRDRFRPGDIVTFSCWARFSEREYDLEFKLFKDGQ ETPVEVVPI SDPMKVFFDLTAVGPKDGGKYSCRYRFRNGPPIWSE DSNVLELDLSTGQK GELNSKLEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH	27,5%
Full	pET101	6626	5,32	36,1	MLKAMDPTPLWIKTESPSTPWTNVTLLCVATNTEELSFQVWKDG ELLSTLPVVGLVGKFWLGPVTADNRGIYRCRILTSENDWTPLSAP VEVTGKEPLPAPSLHAEPGPWILPGLLETKLHCRGMLLGMIFDLYQ EGEQEPVKSSQTPSAEATFIVNSTGNYSCLYRAPASAPSVNSTPS ETIHIVIPDFL PKANFYILNDRDRFRPGDIVTFSCWARFSEREYDL EFKLFKDGQETPVEVVPI SDPMKVFFDLTAVGPKDGGKYSCRYR RNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQK GELNSKLEGKPIPNPLLGLDST RTGHHHHHH	30,5%
thioD1	pET102	6606	5,21	27,6	MGSDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAHWCPCMKIAPILD EIADEYQGKLTVAKLNIDHNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAA TKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDDDDKLGIDPFT LKAMDPTP PLWIKTESPSTPWTNVTLLCVATNTEELSFQVWKDGELLSTLPVV GLVGKFWLGPVTADNRGIYRCRILTSENDWTPLSAPVEVTGKEPK GELKLEGKPIPDPLLGLDSTRTGHHHHHH	50,7%
thioD2	pET102	6591	5,26	26,8	MGSDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAHWCPCMKIAPILD EIADEYQGKLTVAKLNIDHNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAA TKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDDDDKLGIDPFT LPAPSLHA EPGPWILPGLLETKLHCRGMLLGMIFDLYQEGEQEPVKSSQTPSAE ATFIVNSTGNYSCLYRAPASAPSVNSTPSETIHVVI PDFKLEKLL EGKPIPDPLLGLDSTRTGHHHHHH	50,3%
thioD3	pET102	6621	5,16	28,7	MGSDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAHWCPCMKIAPILD EIADEYQGKLTVAKLNIDHNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAA TKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDDDDKLGIDPFT LPKANFYI LNDRDRFRPGDIVTFSCWARFSEREYDLEFKLFKDGQETPVEVVPI SDPMKVFFDLTAVGPKDGGKYSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDL STGQK GELKLEGKPIPDPLLGLDSTRTGHHHHHH	55%
thioFull	pET102	7188	5,01	49,3	MGSDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAHWCPCMKIAPILD EIADEYQGKLTVAKLNIDHNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAA TKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGDDDDKLGIDPFT LKAMDPTP PLWIKTESPSTPWTNVTLLCVATNTEELSFQVWKDGELLSTLPVV GLVGKFWLGPVTADNRGIYRCRILTSENDWTPLSAPVEVTGKEPL PAPSLHAEPGPWILPGLLETKLHCRGMLLGMIFDLYQEGEQEPVKS SQTPSAEATFIVNSTGNYSCLYRAPASAPSVNSTPSETIHIVIPD FLPKANFYILNDRDRFRPGDIVTFSCWARFSEREYDLEFKLFKDGQ ETPVEVVPI SDPMKVFFDLTAVGPKDGGKYSCRYRFRNGPPIWSE DSNVLELDLSTGQK GELKLEGKPIPDPLLGLDSTRTGHHHHHH	45,8%

2. CLONAGEM NOS VETORES DE EXPRESSÃO E SEQUENCIAMENTO

Desenhamos oligonucleotídeos senso e anti-senso de forma a clonar e expressar os domínios 1, 2 e 3 de DM43 separadamente, além da DM43 completa. Na Figura 6, podemos observar as sequências nucleotídica e proteica de DM43, com seus domínios em diferentes cores e as regiões onde desenhamos os oligonucleotídeos senso e anti-senso.

```

1   AAGCTTATGGCTGTCCCTCTTGTTCCTTCTGTTCCCTTCTAGGGCTTTGGATGGACCCCAAG
      M A V P L V L L F L L G L W M D P K
61  GCAGAGTGGATGCA TTAAAGGCTATGGACCCAAC CCTCCCCTGTGGATCAAGACTGAA
      A E V D A L K A M D P T P P L W I K T E
121 TCCCCATCCACTCCCTGGACCAATGTGACTCTCCTGTGTGTGGCAACCAATACCGAGGAG
      S P S T P W T N V T L L C V A T N T E E
181 CTGAGCTTCCAGGTGTGAAAGACGGGGAGCTCCTCTCCACTCTCCCTGTCTGTGGGCCCTT
      L S F Q V W K D G E L L S T L P V V G L
241 GTTGGCAAGTCTGGTTGGGGCCTGTGACAGCCGACAACAGGGGCATTTATCGTTGCCGG
      V G K F W L G P V T A D N R G I Y R C R
301 ATACTGACGTCAGAAAACGACTGGACCCCTGAGCGCCCCAGTG GAGGTGACAGGAAAA
      I L T S E N D W T P L S A P V E V T G K
361 GAGCCTCTCCCTGCCCCCTCTTTG CACGCTGAGCCTGGACCTGGATCCTCCCTGGCCTG
      E P L P A P S L H A E P G P W I L P G L
421 GAGACAAAGCTGCACTGCCGAGGATGCTGCTGGGCATGATCTTTGACCTGTACCAGGAA
      E T K L H C R G M L L G M I F D L Y Q E
481 GGAGAGCAGGAGCCCGTGAAGAGCTCCAGACACCATCAGCAGAAGCCACTTTCATCGTC
      G E Q E P V K S S Q T P S A E A T F I V
541 AACAGTACCGGGAACACTACAGCTGCCTCTACCGAGCACCTGCATCAGCTCCCAGTGTGAAT
      N S T G N Y S C L Y R A P A S A P S V N
601 TCAACGCCAGTGAGACCATA CACATTGTGATACCAGACTTCCTGCCAAAGGCCAACTTC
      S T P S E T I H I V I P D F L P K A N F
661 TATATTTTGAACGACCGAGACTTCAGGCCTGGAGACATTGTGACATTTAGCTGCTGGGCA
      Y I L N D R D F R P G D I V T F S C W A
721 AGATTCTCTGAGCGGGAATATGATCTGGAATTC AAGCTGTTCAAAGACGGACAGGAGACG
      R F S E R E Y D L E F K L F K D G Q E T
781 CCTGTAGAAGTGGTGCCATATCAGACCCCATGAAAGTATTCTTTGATCTGACAGCCGTT
      P V E V V P I S D P M K V F F D L T A V
841 GGCCCTAAGGATGGGGGCAAGTACAGCTGCAGGTACCGCTTTAGGAATGGGCCCGCCGATC
      G P K D G G K Y S C R Y R F R N G P P I
901 TGGTCAGAAGACAGTAACGTCCTGGAG CTGGACCTGAGTACAGGCCAG TGAGCCGAGCGC
      W S E D S N V L E L D L S T G Q *
961 CCTCCTTTCCACCAAGTCCTGCCGAAGCAGCGCGCTGCGCGGCGGCCCCCGAACAGCC
1021 CGCTGGGCTCCGGCTCCCCATAAAGCTCGCCGTGCCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1081 AAAAA

```

Figura 6: Sequências nucleotídica e proteica do cDNA de DM43. As letras em rosa, azul, vermelho e verde representam, respectivamente, o peptídeo sinal e os domínios 1, 2 e 3 de DM43. Destacadas em amarelo estão as regiões onde foram desenhados os oligonucleotídeos no sentido senso; destacadas em verde, estão as regiões onde desenhamos os oligonucleotídeos no sentido anti-senso.

Em todos os oligonucleotídeos senso, inserimos a sequência 5' CACC 3' antes da sequência inicial do domínio, como um adaptador para clonagem nos vetores pET101 e 102. Somente para o vetor pET101, inserimos também a sequência 5' ATG 3' após o adaptador, como um códon de iniciação para tradução correta da proteína recombinante. No vetor pET102, já existe um códon de iniciação imediatamente anterior à sequência da tioredoxina. Para amplificação das sequências, usamos como molde na reação de PCR o cDNA completo de DM43 clonado no vetor pGEM-T easy, obtido durante o Mestrado e retransformado, mais recentemente, em bactérias TOP10. O DNA deste vetor foi sequenciado novamente, confirmando sua integridade original.

Os produtos de PCR amplificados estão representados na Figura 7. Todos apresentaram tamanho de acordo com o esperado: D1, D2 e D3 com 291 pb, 276 pb e 306 pb, respectivamente, e DM43 completa, com 873 pb. As bandas foram cortadas do gel, o DNA purificado e, posteriormente, sequenciado com os mesmos oligonucleotídeos usados na reação de PCR, para confirmação da sequência.

A totalidade do produto de PCR foi pré-purificada em gel de agarose antes da purificação final usando o kit *Concert Rapid Gel Extraction System* (Invitrogen). Após este segundo passo de purificação, os produtos de PCR foram incubados, por 30 minutos, à temperatura ambiente, com os vetores de expressão pET101 ou 102. Foram feitas várias reações usando entre 0,1 e 4 μ L dos insertos, para cada 1 μ L dos vetores (20 ng). Estes valores correspondem a uma variação de aproximadamente 20 a 800 ng do DNA a ser inserido no vetor (quantidades estimadas por comparação com o padrão de massa molecular no gel de agarose). As reações mais eficientes foram aquelas em que usamos a maior quantidade do inserto e que, portanto, foram adotadas como padrão em todos os experimentos subsequentes.

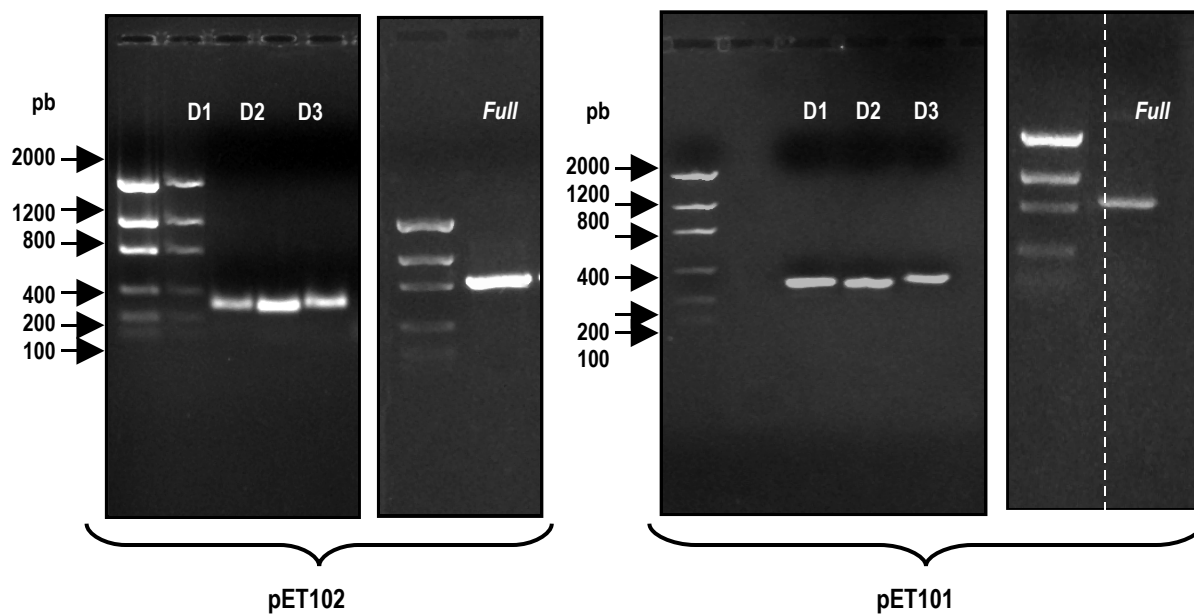


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de amplificação por PCR dos domínios isolados de DM43 e de DM43 completa. D1, D2 e D3 representam os domínios 1, 2 e 3 de DM43. *Full* se refere à sequência codificante completa para DM43. O padrão de tamanho molecular utilizado foi o *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Foram aplicados 5 μ L do padrão e 10 μ L de cada amostra. O tracejado indica que raias não contíguas de um mesmo gel foram aproximadas na imagem digital.

Os produtos de ligação foram, então, usados para transformar bactérias *E. coli* competentes da linhagem TOP10. A eficiência de transformação destas bactérias foi de 10^7 unidades formadoras de colônia por μg de plasmídeo controle introduzido. As colônias resistentes à ampicilina foram selecionadas, inoculadas para amplificação e o DNA plasmidial foi purificado por mini-preparação. Para cada transformação, mesmo usando a maior quantidade de DNA na ligação ao vetor, somente de 2 a 5 colônias cresceram nas placas. No caso da ligação de *Full* ao vetor pET101, não observamos o crescimento de nenhuma colônia após algumas tentativas de ligação e transformação. Estes dados podem indicar que a eficiência de ligação dos insertos aos vetores TOPO foi baixa e/ou que a transformação da bactéria foi pouco eficiente.

Todos os clones obtidos foram submetidos a sequenciamento de DNA com os oligonucleotídeos T7F, TrxFus e T7R (vide pág. 22). Entretanto, o sequenciamento dos plasmídeos recombinantes foi um problema durante toda a tese. A maioria dos eletroferogramas se mostrou ilegível. Tentamos várias abordagens diferentes, como mudar o kit de purificação dos plasmídeos, eluir os mesmos com tampão ou com água, variar a concentração do DNA, mas todos sem sucesso. Resolvemos, então, submeter estes plasmídeos a um PCR e depois sequenciar o produto de PCR com os mesmos oligonucleotídeos usados originalmente para o sequenciamento. Esta abordagem se mostrou eficiente, confirmando a entrada correta de fase de leitura de todos os insertos nos vetores de expressão. No anexo da tese, mostramos a imagem de alguns eletroferogramas representativos (Anexo 1, Figuras 32 e 33). Os produtos de PCR de todas as amostras (D1, D2, D3, *Full* no pET102 e D1, D2, D3 no pET101) foram submetidos a sequenciamento. Nas seqüências do pET101, podemos observar o códon de iniciação, o que não acontece em relação ao pET102, já que o códon de iniciação se encontra na região codificante para a tiorredoxina.

Na Figura 8, podemos observar, em gel de agarose a 1%, os produtos de mini-preparação de DNA dos plasmídeos sequenciados. Como estes plasmídeos não estão digeridos, ou seja, são circulares e, dependendo do grau de helicoidização que estas estruturas podem assumir, migram anormalmente e seu exato tamanho só pode ser estimado por eletroforese após uma digestão que linearize a estrutura. Portanto, nesta figura podemos observar apenas os diferentes graus de helicoidização dos plasmídeos obtidos.

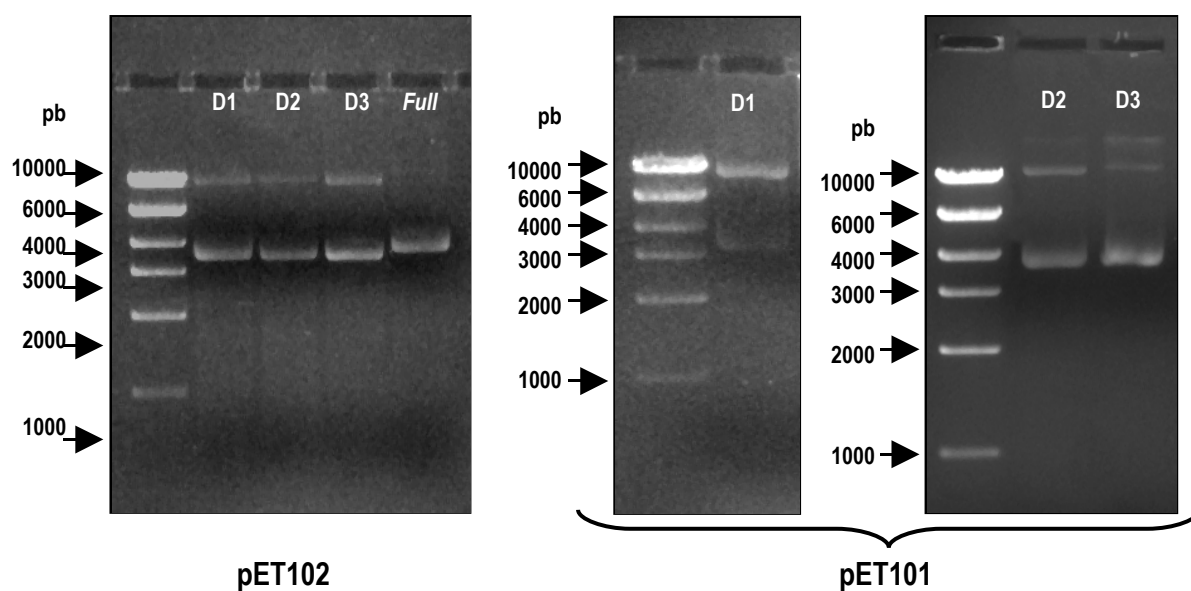


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos da mini-preparação de DNA plasmidial dos domínios isolados de DM43 e de DM43 completa (*Full*) clonados nos vetores pET102 ou pET101. O padrão de tamanho molecular utilizado foi *High Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Foram aplicados 5 μ L do padrão e 5 μ L de cada amostra.

3. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Após confirmação da clonagem por sequenciamento de DNA, utilizamos primeiramente os recombinantes no vetor pET102 para transformação de bactérias competentes, linhagem BL21 *Star* (DE3). Estas bactérias também foram preparadas em nosso laboratório e a eficiência de transformação foi de 10^6 unidades formadoras de colônia por μg de plasmídeo controle introduzido.

Após indução por IPTG, a análise das proteínas recombinantes expressas no pET102 foi feita por SDS-PAGE e está representada na Figura 9. As bandas assinaladas nesta figura representam as proteínas recombinantes. Desta forma, obtivemos quatro proteínas recombinantes com os tamanhos esperados para os domínios D1, 2 e 3, além de DM43 completa, todos expressos em fusão com a tiorredoxina. Foi observado que todas as proteínas recombinantes foram expressas na forma de corpúsculo de inclusão. Portanto, nestas condições, a fusão com a tiorredoxina não foi suficiente para produzir proteínas solúveis. Na verdade, o acúmulo de proteínas na forma de corpúsculo de inclusão pode ser encarado como uma característica positiva do sistema de expressão em *E. coli*. Entre as vantagens, podemos citar a facilidade de isolamento destas estruturas dos outros componentes celulares, a maior homogeneidade e quantidade da proteína de interesse e sua menor susceptibilidade à degradação proteolítica. Os fatores que contribuem para formação dos corpúsculos não são completamente entendidos. Evidências indiretas sugerem que altas concentrações de proteínas produzidas por promotores fortes, neste caso o promotor T7, levariam ao acúmulo de cadeias polipeptídicas nascentes parcialmente enoveladas, favorecendo a agregação e, portanto, a formação dos corpúsculos. A maior desvantagem, como constatamos nesta tese, é a dificuldade de solubilização dos agregados e o re-enovelamento das proteínas solubilizadas na sua conformação nativa.

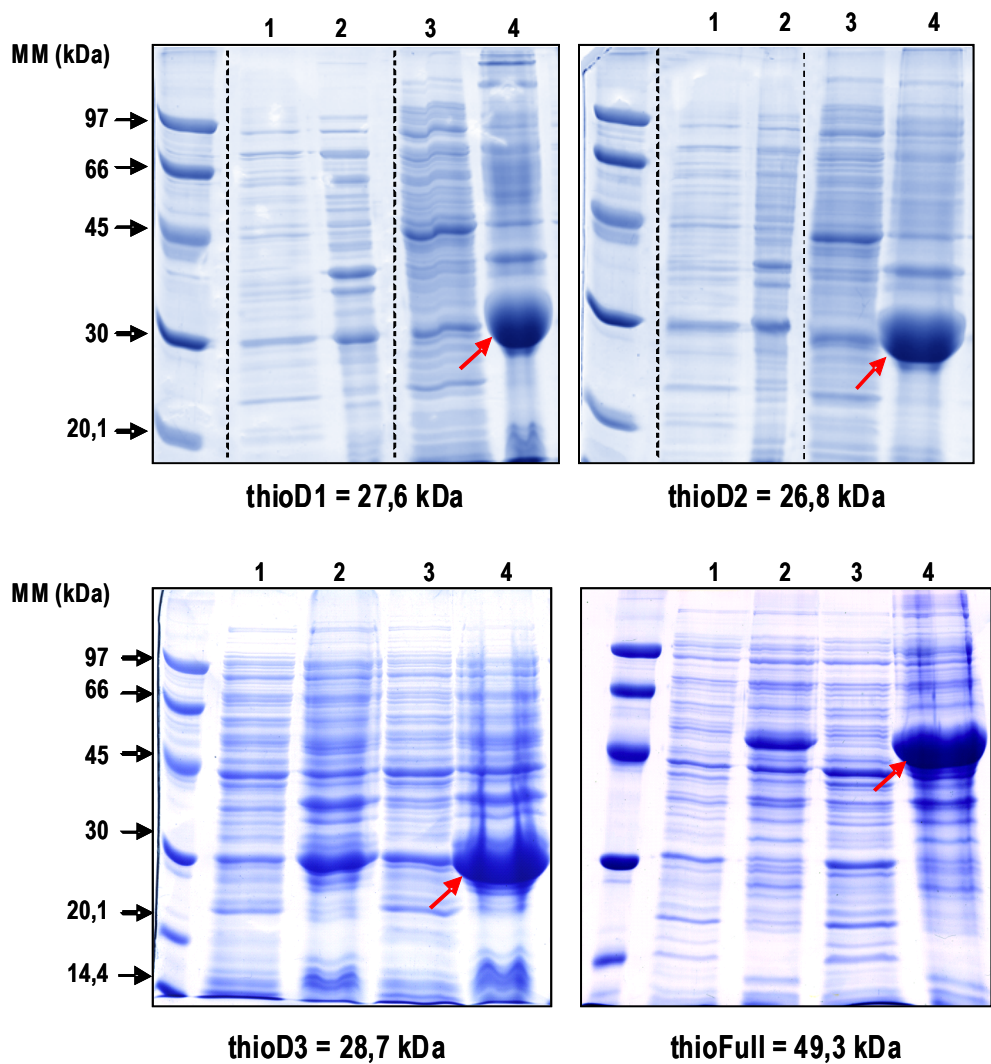


Figura 9: SDS-PAGE a 12 %, em condições redutoras, das proteínas expressas em *E.coli* BL21 (DE3) transformadas com as construções no vetor pET102, antes e após indução por IPTG. Na primeira raia de cada gel foi aplicado padrão de massa molecular. As quantidades de amostra aplicadas foram normalizadas pela OD das culturas a 600 nm. As setas vermelhas indicam a proteína recombinante. O tracejado indica que raias não contíguas de um mesmo gel foram aproximadas na imagem digital. 1= fração não-induzida solúvel; 2= fração não-induzida insolúvel; 3= fração induzida solúvel; 4= fração induzida insolúvel. Antes da análise por SDS-PAGE, as frações insolúveis foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 200 mM, NaCl 0,5 M, β -mercaptoetanol 5 mM, Uréia 8 M, pH 8,0, por 12 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. Géis corados com azul de Coomassie R-250.

A expressão dos domínios clonados no vetor pET101 foi feita nas mesmas condições do vetor anterior e analisada em SDS-PAGE a 15 %. Na Figura 10, podemos observar bandas dos tamanhos esperados para os domínios D1 e D3 (assinaladas pelas setas vermelhas).

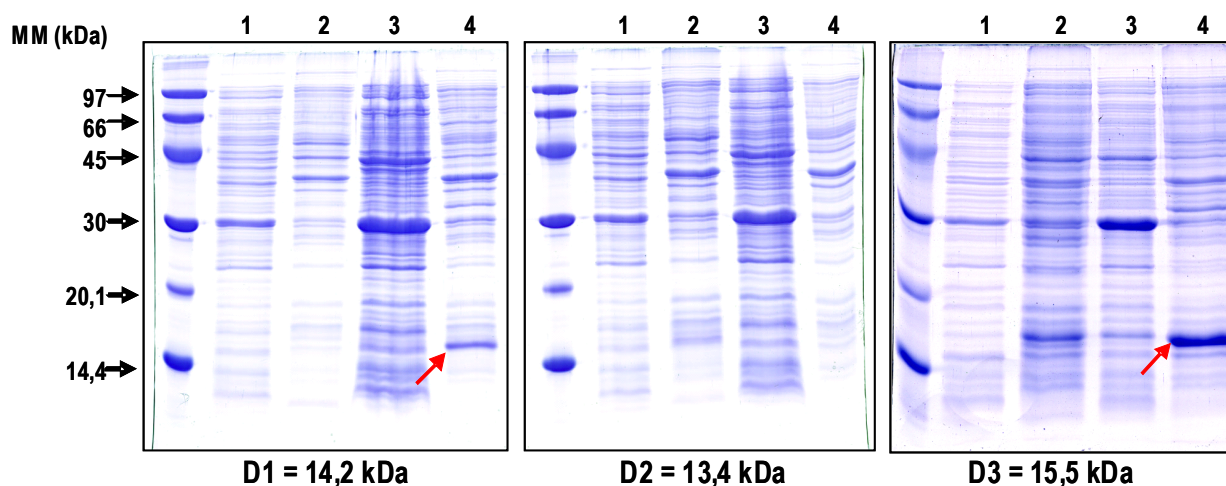


Figura 10: SDS-PAGE a 15 %, em condições redutoras, das proteínas expressas em *E.coli* BL21(DE3) transformadas com as construções no vetor pET101, antes e após indução por IPTG. Na primeira raia de cada gel foi aplicado padrão de massa molecular. As quantidades de amostra aplicadas foram normalizadas pela OD das culturas a 600nm. As setas vermelhas indicam as proteínas recombinantes. 1= fração não-induzida solúvel; 2= fração não-induzida insolúvel; 3= fração induzida solúvel; 4= fração induzida insolúvel. Antes da análise por SDS-PAGE, as frações insolúveis foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 200 mM, NaCl 0,5 M, β -mercaptoetanol 5 mM, Uréia 8 M, pH 8,0, por 12 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. Géis corados com azul de Coomassie R-250.

Neste caso, foram expressas proteínas em quantidades significativamente menores do que as proteínas recombinantes obtidas em fusão com a tiorredoxina. Além disso, D2 parece não ter sido expresso e/ou recuperado. De fato, a fusão com a tiorredoxina foi capaz de aumentar a eficiência de tradução dos recombinantes expressos no vetor pET102. Como tem sido descrito, proteínas bacterianas, como a tiorredoxina, são mais facilmente expressas em sistema bacteriano do que proteínas tipicamente de eucarioto, que são endereçadas para degradação com mais frequência. Outra possível explicação para o baixo nível de expressão de D1 e D3 seria o RNAm bacteriano, que codifica para estas proteínas, estar sendo rapidamente degradado durante a transcrição e/ou tradução. Além disso, sua

estabilidade é dependente do tamanho, sendo os mais curtos (sem fusão com a tiorredoxina), possivelmente menos estáveis. Naturalmente, quanto menor a estabilidade, menor a disponibilidade de molde para tradução e, conseqüentemente, menos eficiente a expressão proteica .

No caso de D2, os motivos para a não expressão podem ser os mesmos. Obtivemos pelo menos 2 clones positivos para D2 e ambos foram seqüenciados. Suas seqüências no vetor pET101 foram obtidas em ambos os sentidos com os oligonucleotídeos T7F e T7R e não apresentaram nenhuma discrepância em relação aos outros domínios, ou seja, o seqüenciamento confirmou a integridade do inserto, a junção do inserto-vetor, e descartou a existência de mutações. Entretanto, não detectamos por SDS-PAGE a presença da proteína recombinante D2 no tamanho esperado, de aproximadamente 13 kDa (Figura 10). Inicialmente, submetemos o primeiro plasmídeo clonado com D2 à expressão nas mesmas condições empregadas com sucesso para os demais domínios. Em seguida, variamos o clone de D2, empregando diferentes alíquotas da bactéria BL21 *Star* (DE3), preparadas em épocas diferentes. Experimentamos também variar a temperatura de expressão (dos 37°C padronizados, para 30° C) e a quantidade de IPTG (reduzindo à metade ou dobrando a quantidade utilizada originalmente). Todas as tentativas se mostraram sem sucesso.

A ausência ou níveis baixos de expressão podem ser justificados por: (1) toxicidade ou instabilidade da proteína alvo na célula hospedeira, causando a diminuição do crescimento bacteriano e inviabilizando a tradução; (2) perda do sistema de expressão durante o crescimento da bactéria; (3) associação de regiões hidrofóbicas das proteínas recombinantes à membrana da bactéria, causando efeito tóxico; (4) degradação da proteína alvo por proteases bacterianas. No nosso caso, esta hipótese é pouco provável, uma vez que usamos a linhagem BL21 (DE3), que não expressa as proteases *lon* e *ompT*; (5) excesso de códons raros na proteína alvo ou discrepância no uso dos códons dos sistemas eucarioto e procaríoto; e (6) mutações sem sentido .

Embora a clonagem dos DNAs heterólogos tenha sido relativamente fácil, a expressão dos genes clonados foi uma tarefa árdua. Não se sabe ao certo as razões pelas quais isto aconteceu neste trabalho, nem o porquê desta dificuldade ser bastante frequente em diversos estudos. Como já mencionado, proteínas recombinantes são expressas em sistema procaríoto, na sua grande maioria, como agregados insolúveis, chamados corpúsculos de inclusão. Elas também podem ser

prematuramente degradadas e/ou desnaturadas . Um levantamento feito pela *Southeast Collaboratory for Structural Genomics* (SECSG), em 2005, reporta que, de 6.386 proteínas expressas heterologicamente em *E. coli*, apenas 22,7% era solúvel .

Apesar de todas as limitações, a *E. coli* ainda é o organismo procarionte mais usado para expressão de proteínas heterólogas, pelos motivos já discutidos. Em contrapartida, os sistemas eucariontes também apresentam várias limitações para expressão de proteínas heterólogas. As células de mamífero, por exemplo, necessitam de maiores cuidados no ambiente estéril e condições de manipulação estritamente assépticas. São instáveis quando manipuladas geneticamente e produzem proteína com baixo rendimento quando comparadas aos microorganismos. Já a expressão heteróloga em fungos é de difícil controle de expressão, apresentando ainda um mecanismo de glicosilação significativamente diferente do de mamífero . Na literatura, há várias informações referentes à otimização das condições de expressão em *E. coli*. Contudo, como as proteínas apresentam propriedades físico-químicas muito diferentes, as condições ideais de expressão podem variar enormemente .

4. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR REAÇÃO COM ANTICORPOS ANTI-DM43 OU ANTI-CAUDA DE HISTIDINA

Para identificação indireta das proteínas recombinantes, as frações induzidas insolúveis foram submetidas a SDS-PAGE, seguido de transferência para membranas de PVDF (*Western blotting*). Uma das membranas foi revelada com soro policlonal produzido em coelhos contra DM43, enquanto a outra foi incubada com anticorpo anti-His. Na Figura 11, podemos observar que as proteínas recombinantes foram devidamente reconhecidas pelos dois anticorpos. A única exceção foi o domínio 2 no pET101, comprovando mais uma vez que este recombinante não foi expresso. Nas raias 1 e 4 da membrana anti-DM43 e nas raias 1 e 2 da membrana anti-His, mais de uma banda foi revelada. A reação cruzada inespecífica com proteínas da bactéria parece pouco provável, uma vez que o padrão de bandas não é constante para todas as amostras. É possível que as bandas de maior massa molecular sejam consequência da presença de oligômeros não desfeitos nas

condições da eletroforese. As bandas de menor massa molecular da raia 4 podem ser resultado da degradação parcial da proteína thioFull.

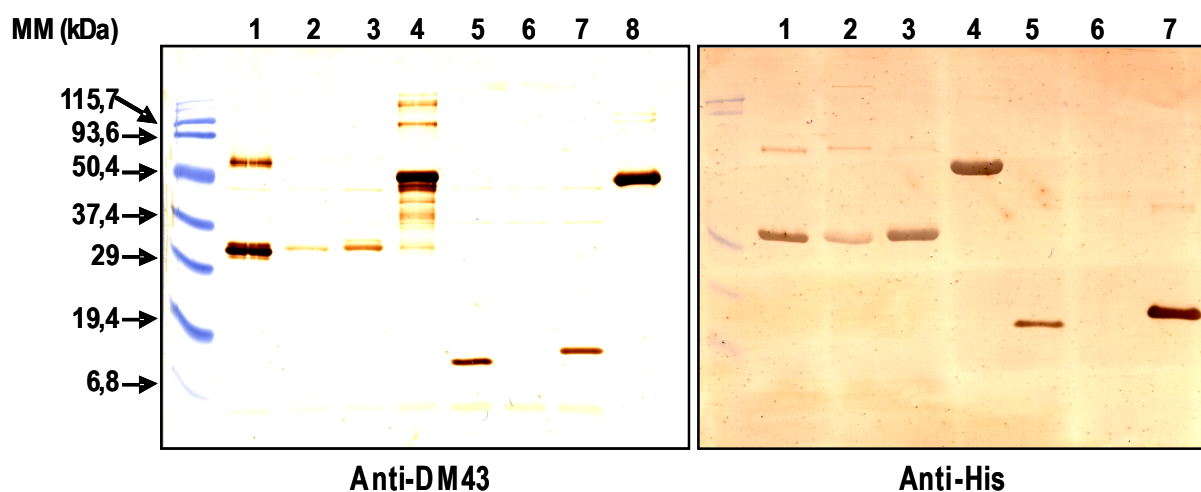


Figura 11: *Western blotting* das proteínas recombinantes reconhecidas por anti-soro policlonal contra DM43 ou anticorpo contra cauda de histidina e reveladas com o kit DAB *Sigma Fast*. Na primeira raia de cada gel foi aplicado o padrão de massa molecular pré-corado *Broad Range* (Bio Rad). Nas demais raias, os recombinantes (frações induzidas insolúveis) solubilizados em tampão Tris-HCl 200mM, NaCl 0,5 M, β -mercaptoetanol 5 mM, Uréia 8 M, pH 8,0. Foram aplicados aproximadamente 0,2 μ g de cada proteína. 1= thioD1; 2= thioD2; 3= thioD3; 4= thioFull; 5= D1; 6= D2; 7= D3; 8= DM43 nativa.

5. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR MS/MS

Para confirmação da identidade dos recombinantes, as bandas assinaladas pelas setas vermelhas nas Figuras 9 e 10 foram cortadas, tripsinizadas e identificadas no espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF, no modo MS/MS, utilizando o banco de dados não-redundante do NCBI. Como os domínios (com ou sem fusão com a tiorredoxina) não existem isoladamente neste banco de dados, criamos um banco local com estas sequências, de modo a calcular automaticamente os reais percentuais de cobertura obtidos com os peptídeos sequenciados. Na Tabela 3, podemos observar que foi possível identificar, com confiabilidade, todas as proteínas recombinantes usando ambos os bancos de dados.

Tabela 3: Identificação por MS/MS dos recombinantes expressos em *E.coli* BL21 *Star* (DE3) transformada por pET101 ou pET102.

Proteína	pI Teórico	MW (kDa)	Método	Banco	No. Peptídeos	Mascot Ion Score	Sequência dos peptídeos	Massa experimental precursor (Da)	Cobertura em relação à identificação	ID
thioD1	5,21	27,6	MS/MS	Local	6	127	IIHLTDDSFDTDLK	1730.7177	23%	thioD1
						24	AMDPTPPLWIK	1267.5485		
				NCBI	3	55	FWLGPVTADNR	1274.5254		
95	ILTSENDWTPLSAPVEVTGK	2155.9202								
					41	ILTSENDWTPLSAPVEVTGKEPK	2510.0965			
						56	FWLGPVTADNR	1274.5254	14%	gil21542401 Venom metalloproteínas e inibitor DM43
					100	ILTSENDWTPLSAPVEVTGK	2155.9202			
						127	IIHLTDDSFDTDLK	1730.7177	13%	gil148071 Thiorredoxin <i>E.coli</i>
thioD2	5,26	26,8	MS/MS	Local	3	109	IIHLTDDSFDTDLK	1730.7505	20%	thioD2
						34	LNIDHNPGTAPK	1275.5576		
						26	SSQTPSAEATFIVNSTGNYSCLYR	2652.0032		
				NCBI	1	109	IIHLTDDSFDTDLK	1730.7505	13%	gil148071 Thiorredoxin <i>E.coli</i>
thioD3	5,16	28,7	MS/MS	Local	4	52	IIHLTDDSFDTDLK	1731.7954	20%	thioD3
						31	ANFYILNDR	1125.5222		
				NCBI	5	63	VFFDLTAVGPK	1193.5990		
39	LEGKPIPPELLGLDSTR	1819.9457								
						44	ANFYILNDR	1124.5105	13%	gil21542401 Venom metalloproteínas e inibitor DM43
					60	FWLGPVTADNR	1274.5874			
						13	ILTSENDWTPLSAPVEVTGK	2155.9915		
						52	IIHLTDDSFDTDLK	1730.7881	13%	gil148071 Thiorredoxin <i>E.coli</i>
thioFull	5,01	49,3	MS/MS	Local	8	69	IIHLTDDSFDTDLK	1730.8294	25%	thioFull
						20	AMDPTPPLWIK	1267.6332		
						51	FWLGPVTADNR	1274.6232		
						16	ILTSENDWTPLSAPVEVTGK	2156.0481		
						68	ANFYILNDR	1124.5431		
						8	DGQETPVEVPISDPMK	1839.8402		
						58	VFFDLTAVGPK	1192.6187		
						14	LEGKPIPPELLGLDSTR	1818.9823		
				NCBI	5	68	ANFYILNDR	1124.5431	17%	gil21542401 Venom metalloproteínas e inibitor DM43
						58	VFFDLTAVGPK	1192.6187		
						51	FWLGPVTADNR	1274.6232		
						16	ILTSENDWTPLSAPVEVTGK	2156.0481		
						69	IIHLTDDSFDTDLK	1730.8294	13%	gil148071 Thiorredoxin <i>E.coli</i>
D1	6,04	14,2	MS/MS	Local	3	15	AMDPTPPLWIK	1267.7024	32%	D1
						71	FWLGPVTADNR	1274.7051		
						117	ILTSENDWTPLSAPVEVTGK	2156.1787		
				NCBI	2	71	FWLGPVTADNR	1274.7051	10%	gil21542401 Venom metalloproteínas e inibitor DM43
						117	ILTSENDWTPLSAPVEVTGK	2156.1787		
D3	6,05	15,5	MS/MS	Local	6	66	ANFYILNDR	1124.5038	62%	D3
						28	FSEREYDLEFK	1461.6059		
						16	DGQETPVEVPISDPMK	1839.8106		
						133	NGPPIWSEDSNVLELDLSTGQK	2398.0781		
						116	LEGKPIPPELLGLDSTR	1818.9411		
						29	TGHHHHHH	998.3807		
				NCBI	3	66	ANFYILNDR	1124.5038	12%	gil21542401 Venom metalloproteínas e inibitor DM43
							28	FSEREYDLEFK		
						16	DGQETPVEVPISDPMK	1839.8106		

6. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Como mostrado anteriormente, as proteínas recombinantes foram obtidas na forma de corpúsculos de inclusão. Estas partículas insolúveis são resultado do acúmulo intracelular de proteínas superexpressas e parcialmente enoveladas, que se agregam através de interações hidrofóbicas e/ou iônicas. Na tentativa de solubilização das proteínas recombinantes, os corpúsculos foram incubados à temperatura ambiente, por 12 h, sob agitação constante, em tampão Tris-HCl 200 mM, NaCl 0,5 M, β -mercaptoetanol 5 mM, Uréia 8 M, pH 8,0. Nestas condições, há desnaturação total das proteínas e quebra das pontes dissulfeto que possivelmente se formam nas condições não-nativas dos agregados. Mesmo no tampão fortemente desnaturante, não conseguimos solubilizar completamente os agregados dos corpúsculos, restando sempre um sedimento após a centrifugação final.

No sistema pET utilizado, há adição da cauda de histidina às proteínas recombinantes, possibilitando a rápida obtenção de proteínas através da purificação pela técnica de cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado (IMAC), com grau de pureza suficiente para os ensaios de atividade biológica. Desta forma, as proteínas solubilizadas em 8 M de Uréia foram misturadas v/v com tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 7,4 e purificadas na coluna de afinidade carregada com níquel, *HisTrap FF crude*. Os cromatogramas obtidos estão representados nas Figuras 12 e 13, assim como os perfis eletroforéticos dos recombinantes, eluídos com gradiente crescente linear de fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, Uréia 4 M, pH 7,4.

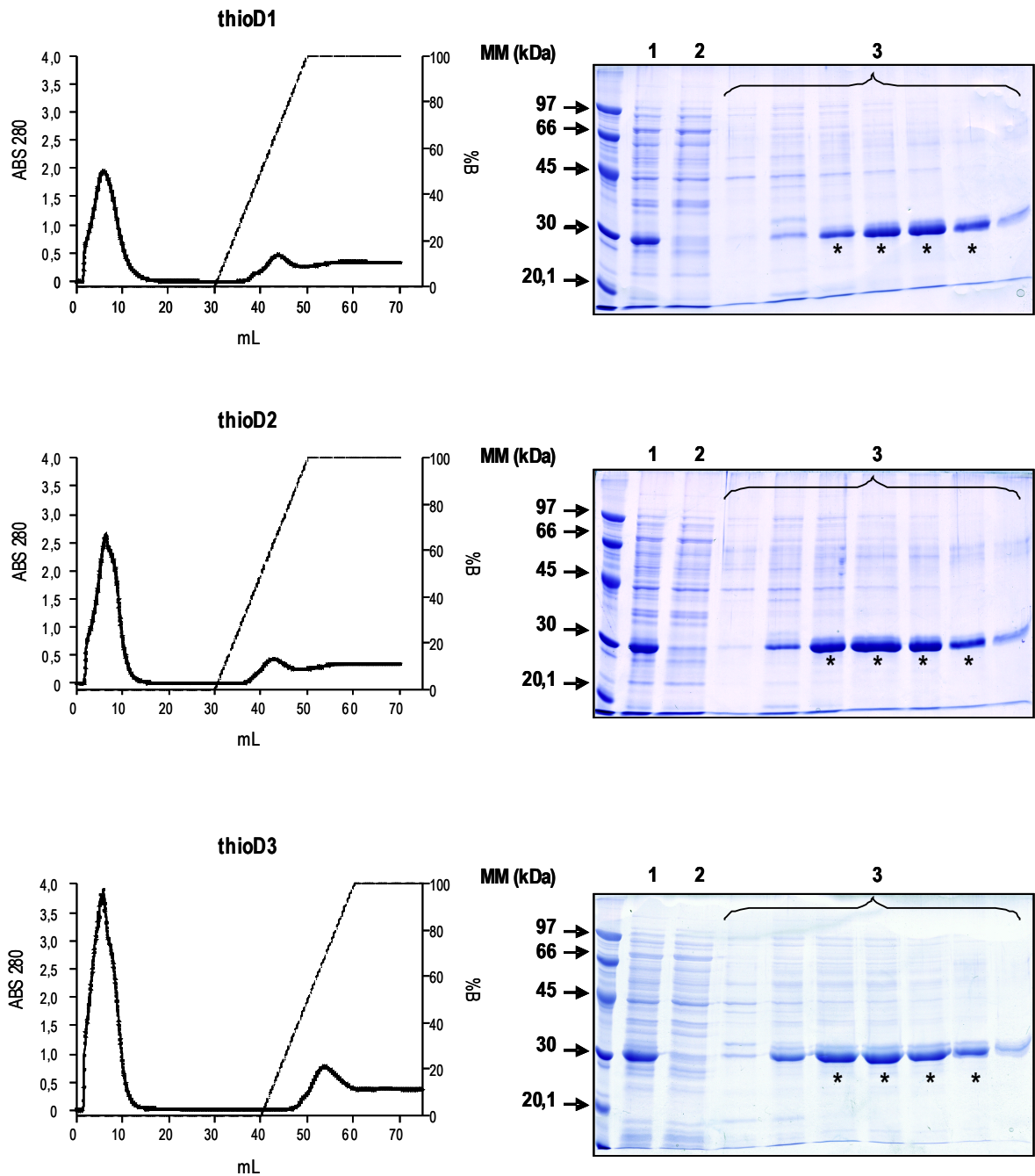


Figura 12: Perfis cromatográficos das proteínas recombinantes em coluna *HisTrap FF crude*. A coluna foi equilibrada com tampão A (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, Uréia 4 M, pH 7,4) e a fração ligada à coluna foi eluída com gradiente crescente linear do tampão B (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, Uréia 4 M, pH 7,4) a um fluxo de 2,0 mL/min. Ao lado, SDS-PAGE a 12%, em condições redutoras, das frações purificadas de thioD1, thioD2 e thioD3. Os asterísticos indicam as frações utilizadas para preparar o *pool* de proteína recombinante. Na primeira raia de cada gel foi aplicado o padrão de massa molecular. 1= amostra de recombinante solubilizado aplicada na coluna; 2= *pool* das frações não-ligadas à coluna; 3= frações individuais eluídas da coluna (fração ligada). Géis corados com azul de Coomassie R-250.

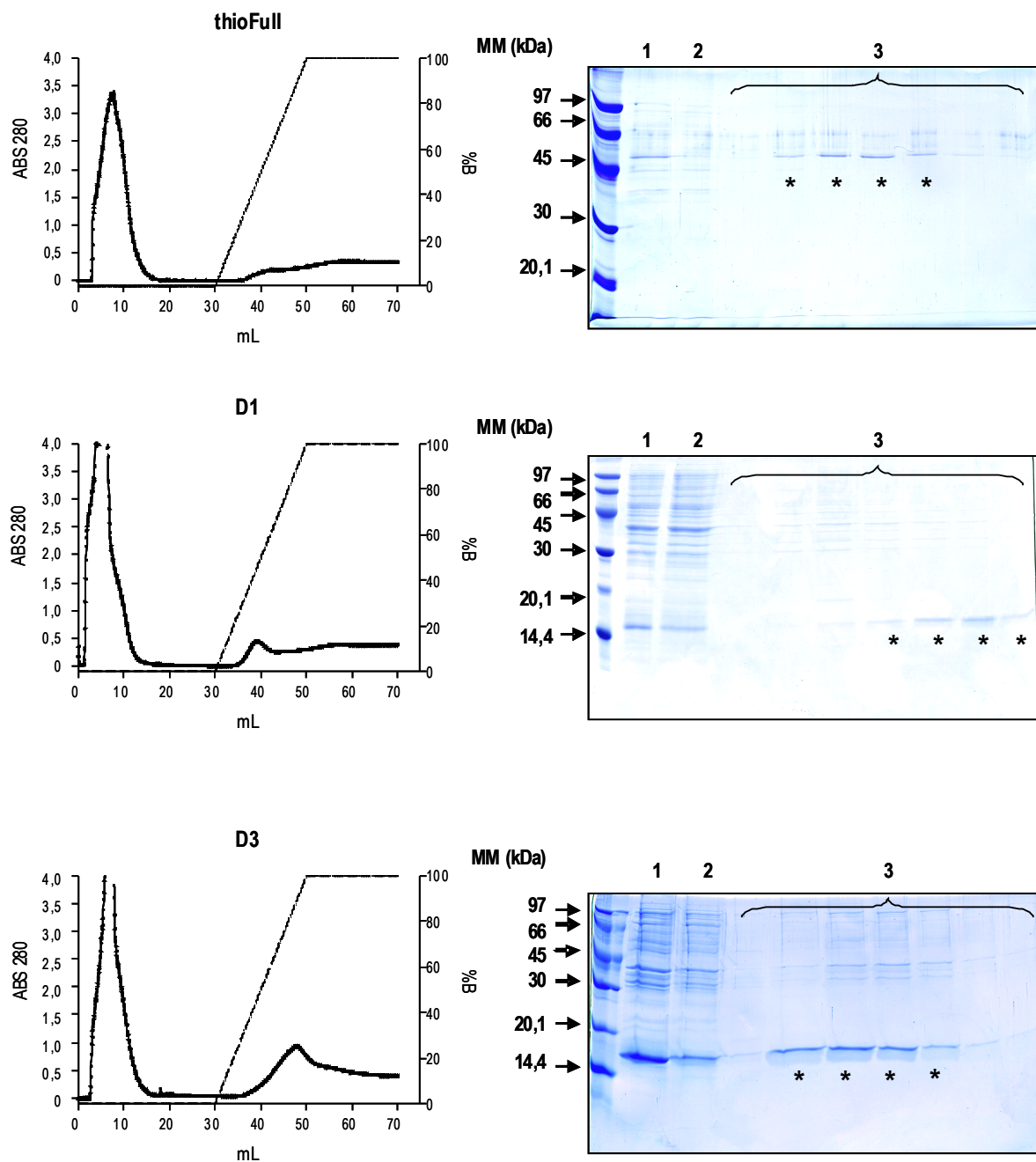


Figura 13: Perfis cromatográficos das proteínas recombinantes em coluna *HisTrap FF crude*, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM e Uréia 4 M. A eluição foi feita com gradiente crescente linear do mesmo tampão, contendo 500 mM de imidazol e fluxo de 2,0 mL/min. Ao lado, SDS-PAGE 15%, em condições redutoras, das frações purificadas de thioFull, D1 e D3. Os asterísticos indicam as frações utilizadas para preparar o *pool* de proteína recombinante. Na primeira raia de cada gel foi aplicado o padrão de massa molecular. 1= amostra de recombinante solubilizado aplicada na coluna; 2= *pool* das frações não-ligadas à coluna; 3= frações individuais eluídas da coluna (fração ligada). Géis corados com azul de Coomassie R-250.

7. RE-ENOVELAMENTO E DOSAGEM DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para recuperar a conformação nativa de proteínas recombinantes são descritos vários protocolos, utilizando condições e técnicas diversas. Infelizmente, não há uma fórmula padrão para todas as proteínas, e sim soluções diferentes para cada situação. No nosso caso, optamos por submeter as proteínas recombinantes solubilizadas, após purificação por afinidade em coluna de níquel, a diálises contra Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 ou PBS pH 7,4. Num primeiro momento, utilizamos estes tampões acrescidos de 2 M de Uréia e, finalmente, fizemos diálises contra os tampões sem Uréia.

As recuperações proteicas das frações obtidas durante todo processo de purificação estão mostradas na Tabela 4. Apesar do baixo rendimento, foi possível recuperar proteína solúvel nos casos de thioD1, thioD2 e thioD3. No caso de D1, D3 e thioFull muito pouca quantidade foi recuperada após purificação e re-enovelamento. Para D1 e D3, estes dados indicam que a presença da tiorredoxina foi importante para aumentar e manter a solubilidade dos recombinantes expressos na forma de corpúsculos de inclusão. De fato, sabe-se que, mesmo nos casos onde a fusão com a tiorredoxina não produz proteínas recombinantes solúveis, ela é capaz de aumentar a recuperação da proteína solúvel depois do re-enovelamento. No caso de thioFull, um dos motivos que pode ter contribuído para a insolubilidade é a presença de quatro pontes dissulfeto: uma em cada domínio de DM43 e mais uma da tiorredoxina. Proteínas com várias pontes dissulfeto, quando em estado reduzido, são muito instáveis e altamente susceptíveis à agregação, principalmente nos primeiros estágios do re-enovelamento.

Tabela 4: Recuperação proteica total (em mg) das proteínas recombinantes obtidas nas diversas etapas de processamento. Em azul, quantidades determinadas usando o 2D *Quant Kit*; em vermelho, usando o método do BCA.

Recombinante (fração induzida insolúvel)	Em 8 M Uréia	Em 4 M Uréia (Pré-coluna)	Em 4 M Uréia (Pós-coluna)	Em PBS pH 7,4	Em Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5
thioD1	4,6 (100%)	3,2 (70%)	0,88 (19%)	0,64 (14%)	1,1 (24%)
thioD2	5,2 (100%)	3,8 (73%)	2,15 (48%)	1,21 (23%)	1,83 (35%)
thioD3	5,6 (100%)	4,7 (84%)	2,25 (40%)	1,40 (25%)	1,18 (21%)
thioFull	5,2 (100%)	0,44 (8,5%)	0	0,05 (1%)	0,12 (2,3%)
D1	4,2 (100%)	ND	0	0	0,07 (1,7%)
D3	4,6 (100%)	ND	0,14 (3%)	0,03 (0,7%)	0,5 (11%)

8. ANÁLISE DA INTEGRIDADE ESTRUTURAL DOS RECOMBINANTES POR DICROÍSMO CIRCULAR

Antes de prosseguir com os ensaios de atividade biológica dos recombinantes, precisamos nos certificar de sua integridade estrutural. Devido à baixa recuperação proteica, e em virtude das quantidades mínimas necessárias, só foi possível realizar esta análise com as proteínas recombinantes thioD1, thioD2 e thioD3.

O dicróismo circular (CD) é uma técnica relativamente simples e poderosa para o estudo dos elementos de estrutura secundária das proteínas em solução (α -hélices, folhas β pregueadas e estruturas randômicas), as quais contribuem para a formação da estrutura terciária das proteínas. Esta técnica se baseia no fato de que moléculas com centros assimétricos (quirais) absorvem a luz circularmente polarizada para a direita diferentemente da luz circularmente polarizada para a esquerda, provocando um desvio no ângulo da polarização da luz incidente para a direita ou esquerda (elipticidade), que é medido pelo polarímetro. Os cromóforos que originam os espectros de CD em peptídeos e proteínas são as ligações amida, os resíduos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) e as pontes dissulfeto.

Após a quantificação, as proteínas recombinantes thioD1, thioD2 e thioD3 foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do experimento de CD. Foram feitos quatro espectros de cada proteína nos dois diferentes tampões usados para re-novelamento: Tris-HCl 20 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5; e PBS pH 7,4. As médias

resultantes estão representadas na Figura 14 A e B. Sob o tampão Tris foi possível obter espectros de 200 nm a 260 nm; abaixo desta faixa, o sal do tampão interferiu na leitura. Com o tampão PBS, o espectro de CD pode ser ampliado para a faixa de 190 nm a 260 nm.

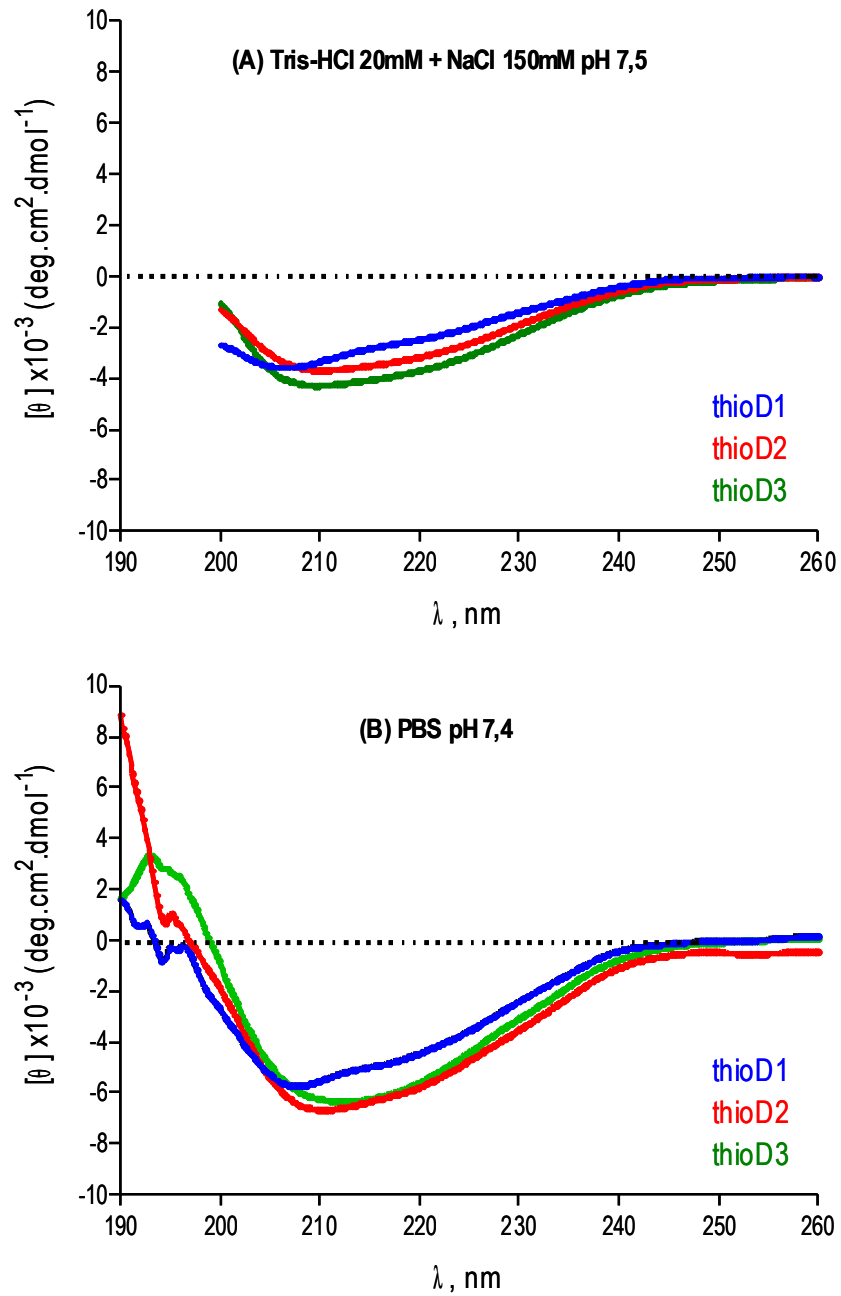


Figura 14: Gráfico representativo dos espectros de dicroísmo circular das proteínas recombinantes thioD1, thioD2 e thioD3. (A) Espectros obtidos com as proteínas solubilizadas em tampão Tris-HCl 20 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5; (B) Espectros obtidos com as proteínas solubilizadas em PBS, pH 7,4.

De acordo com os espectros obtidos, em ambos os tampões as proteínas recombinantes estão estruturadas, apresentando um espectro típico de estruturas α e β misturadas, mas com conteúdos relativos diferentes. Podemos avaliar que thioD1 apresentou um maior conteúdo de estruturas α , devido à presença de dois picos negativos a 208 nm e 222 nm, característicos desta estrutura. ThioD2 apresentou um único pico negativo a 210 nm, o que, entretanto, não caracteriza uma estrutura somente tipo β , já que o pico típico da estrutura β se localiza em 216 nm. Por sua vez, thioD3 possui um único pico negativo mais próximo de 216 nm, indicando que, das três proteínas recombinantes, deve ser a que apresenta maior conteúdo de estruturas β .

Usamos o software PSIPRED, disponível em servidor público (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), para prever a estrutura secundária das proteínas recombinantes thioD1, thioD2 e thioD3. Os resultados são apresentados no anexo 1, figuras 34, 35 e 36. De acordo com a análise *in silico*, as três proteínas recombinantes devem apresentar uma mistura de estruturas α e β , confirmando os dados obtidos experimentalmente. Se os domínios tivessem sido expressos sem a fusão com a tiorredoxina, deveriam apresentar basicamente estruturas de folhas β pregueadas, características das proteínas tipo-Ig. A mistura de estruturas $\alpha + \beta$ observada experimentalmente se assemelha à estrutura da tiorredoxina, que possui um único domínio com quatro folhas β pregueadas centrais e três α -hélices externas.

9. ANÁLISE DA OLIGOMERIZAÇÃO

Durante o processo de renaturação das proteínas recombinantes *in vitro*, frequentemente há formação de oligômeros, resultado da interação inespecífica (hidrofóbica) entre cadeias polipeptídicas totalmente desnaturadas ou de associações incorretas entre intermediários parcialmente enovelados. A existência de resíduos de cisteína formando diversas combinações de pontes dissulfeto também pode contribuir para a oligomerização. Para verificar o grau de oligomerização das proteínas recombinantes obtidas neste trabalho, as submetemos a eletroforeses em gel de poliacrilamida, tanto em condições nativas, quanto na presença de SDS, com e sem β -mercaptoetanol (Figura 15). As proteínas também

foram analisadas por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 (Figuras 16) e MALDI-TOF MS no modo linear (Figuras 17 e 18). Para os recombinantes thioFull e D3, não recuperamos quantidade suficiente de proteína solúvel para realizar estas análises de forma satisfatória.

Nos géis sob condições nativas (Figura 15 A), podemos observar as diversas formas oligoméricas das proteínas recombinantes thioD1, thioD2 e thioD3 (raias 2-4), tanto na amostra dialisada contra tampão Tris-HCl, quanto na dialisada contra PBS. Na raia 1, aplicamos DM43 isolada do plasma de gambá, sabidamente dimérica em condições nativas. As mesmas amostras, submetidas à análise por SDS-PAGE sob condições redutoras e não-redutoras (Figuras 15 B e C), mostraram perfis eletroforéticos bastante similares. Entretanto, a aparição de bandas fracas na região de 66 kDa ou acima desta região, nos géis sem β -mercaptoetanol, parece indicar que uma fração minoritária dos recombinantes se liga covalentemente, muito provavelmente formando estruturas com mais de uma cadeia.

Após análise das mesmas amostras por cromatografia de exclusão molecular (Figura 16), detectamos a presença das seguintes espécies em cada um dos recombinantes: thioD1= 82,4 kDa, 59,6 kDa e 38,8 kDa; thioD2= >134 kDa, 93,2 kDa, 64,3 kDa e 37,4 kDa; thioD3= >134 kDa, 87,5 kDa, 65,4 kDa, 40,4 kDa, além de um pico eluído no volume de exclusão da coluna (V_o). As massas em torno de 40 kDa provavelmente são referentes aos monômeros das proteínas recombinantes, seguidas de massas referentes a dímeros, trímeros e oligômeros maiores. Por MS, detectamos apenas as seguintes massas moleculares referentes aos monômeros: thioD1 = 27.654 Da; thioD2 = 26.831 Da; e thioD3 = 28.769 Da (Figuras 17 e 18).. Estes dados indicam que a oligomerização ocorre fundamentalmente devido a interações não-covalentes. Estas ligações não são preservadas no processo de ionização por MALDI, onde podemos observar, nos espectros de thioD1, thioD2 e thioD3, dois sinais majoritários; o primeiro refere-se ao íon de m/z com carga dupla, e o segundo refere-se ao íon monocarregado

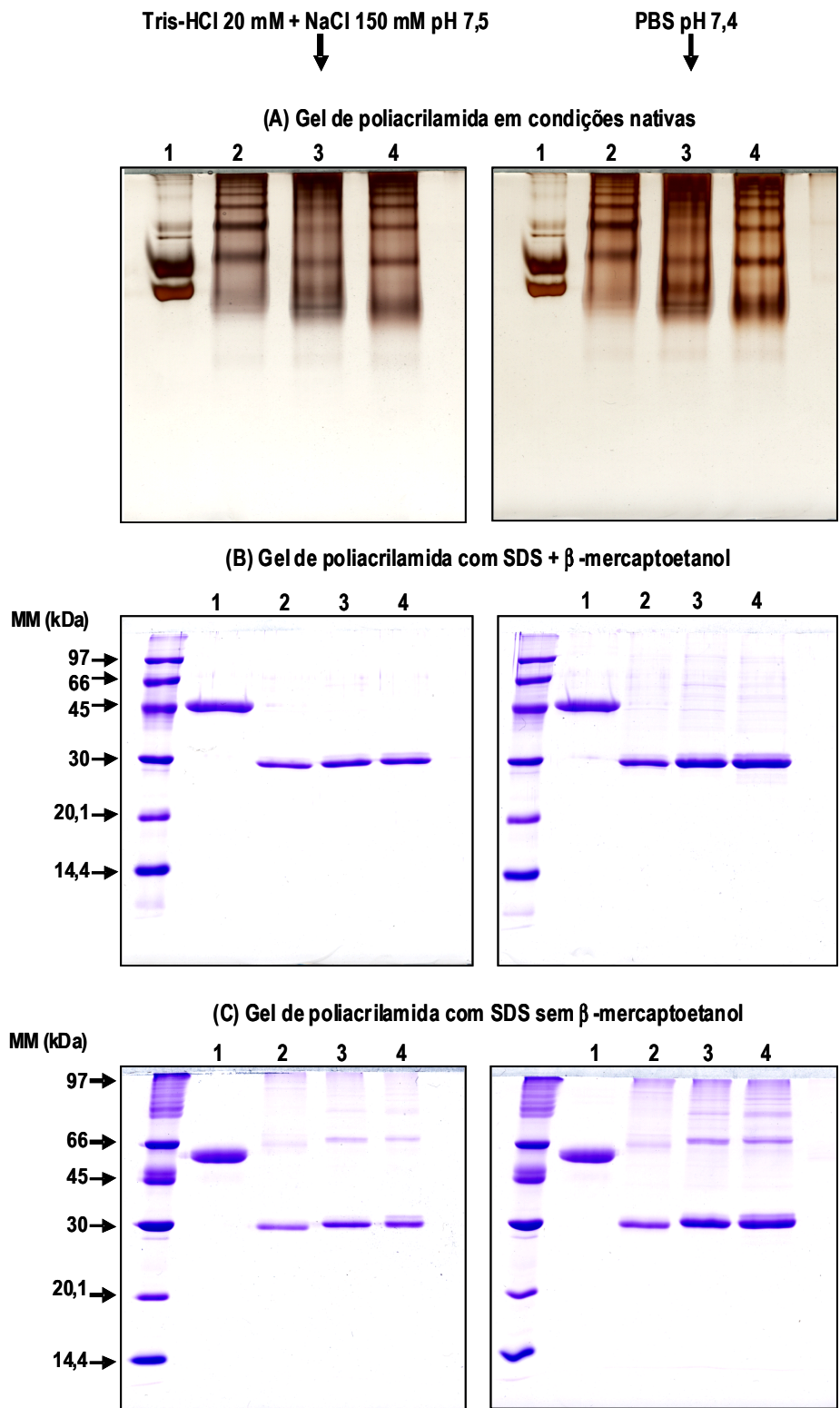


Figura 15: Análise da oligomerização dos domínios recombinantes de DM43, fusionados com tiorredoxina, por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os géis da esquerda correspondem às proteínas recombinantes re-enoveladas após diálise em tampão Tris-HCl; os géis da direita correspondem às proteínas recombinantes re-enoveladas em tampão PBS. 1= DM43 nativa; 2= thioD1; 3= thioD2; 4= thioD3. Nos géis de SDS-PAGE, aplicamos padrão de massa molecular na primeira raia. Géis revelados pela prata (A) ou azul de Coomassie (B e C).

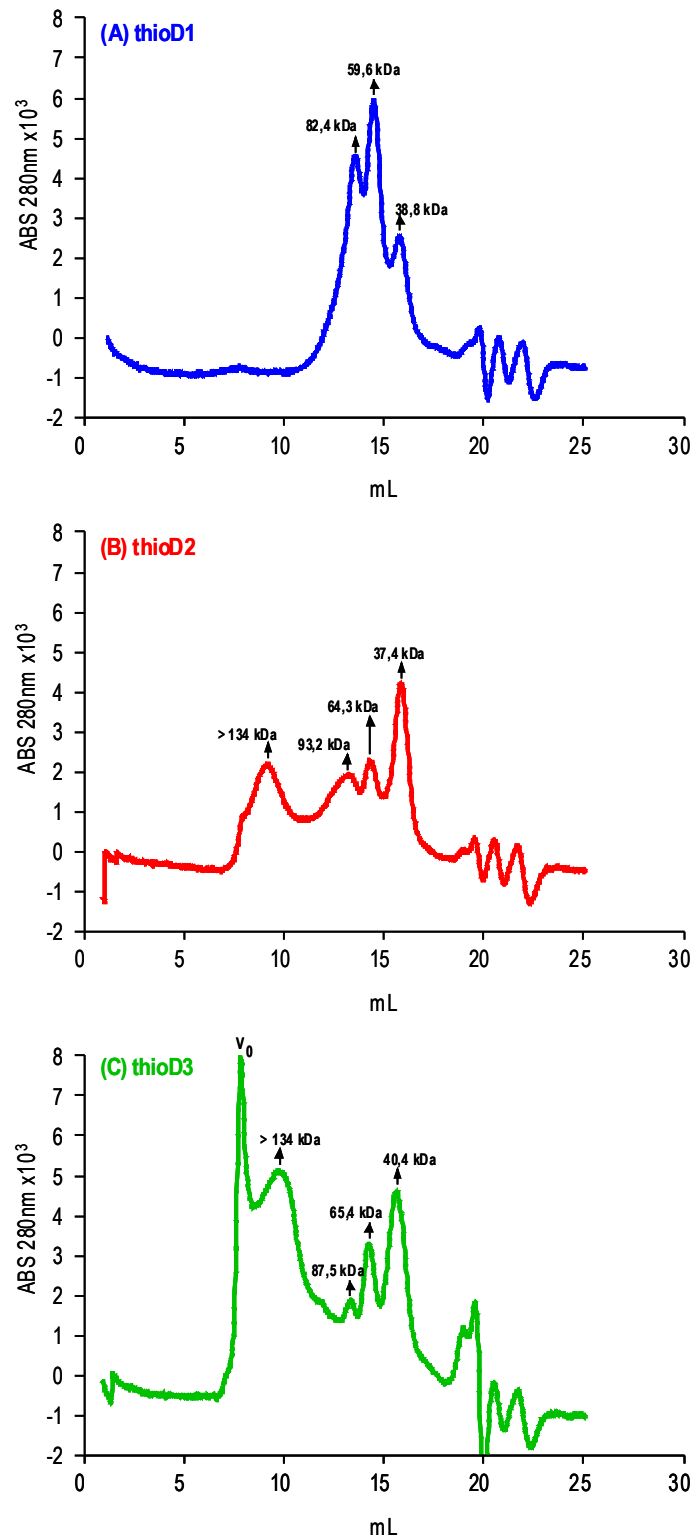


Figura 16: Análise da oligomerização dos domínios recombinantes de DM43, fusionados com tiorredoxina, por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare), equilibrada com PBS pH 7,4, a um fluxo de 0,5 mL/min. (A) thioD1; (B) thioD2; e (C) thioD3. As setas indicam as massas moleculares correspondentes a cada pico, calculadas após calibração da coluna com proteínas de massas moleculares conhecidas.

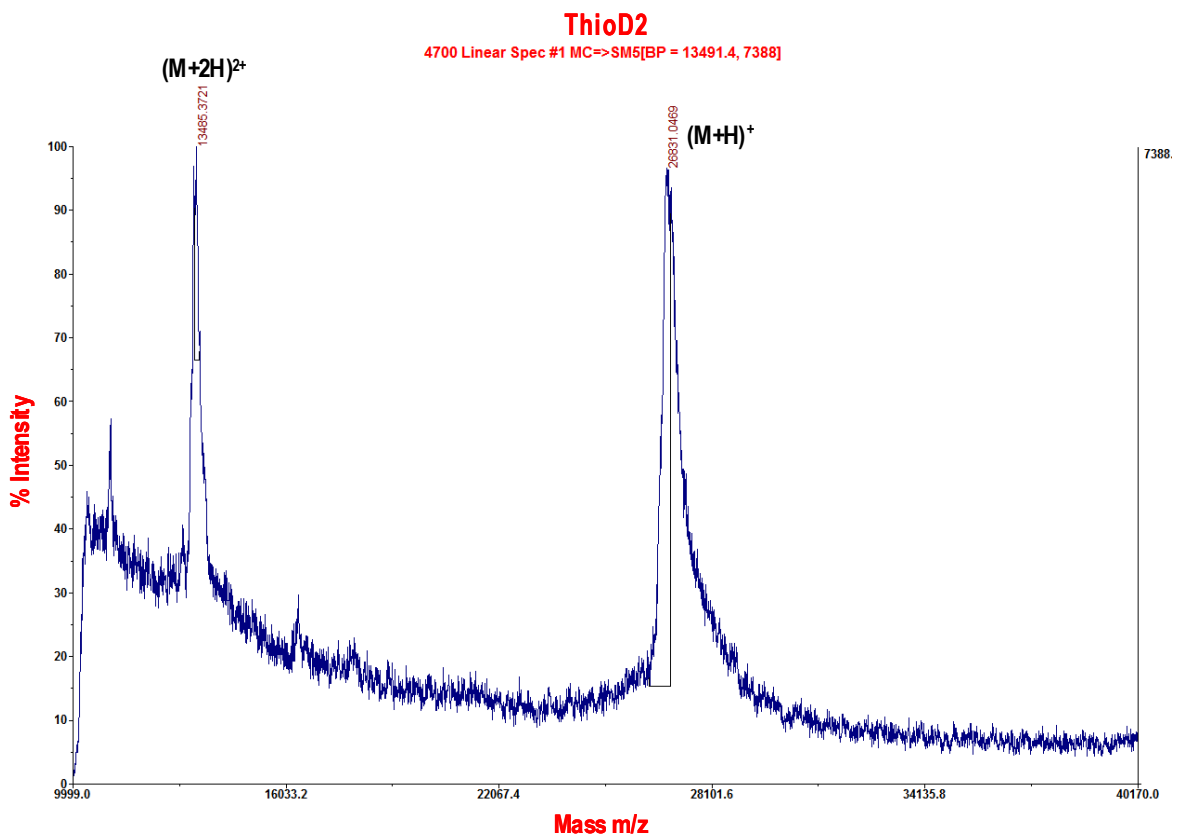
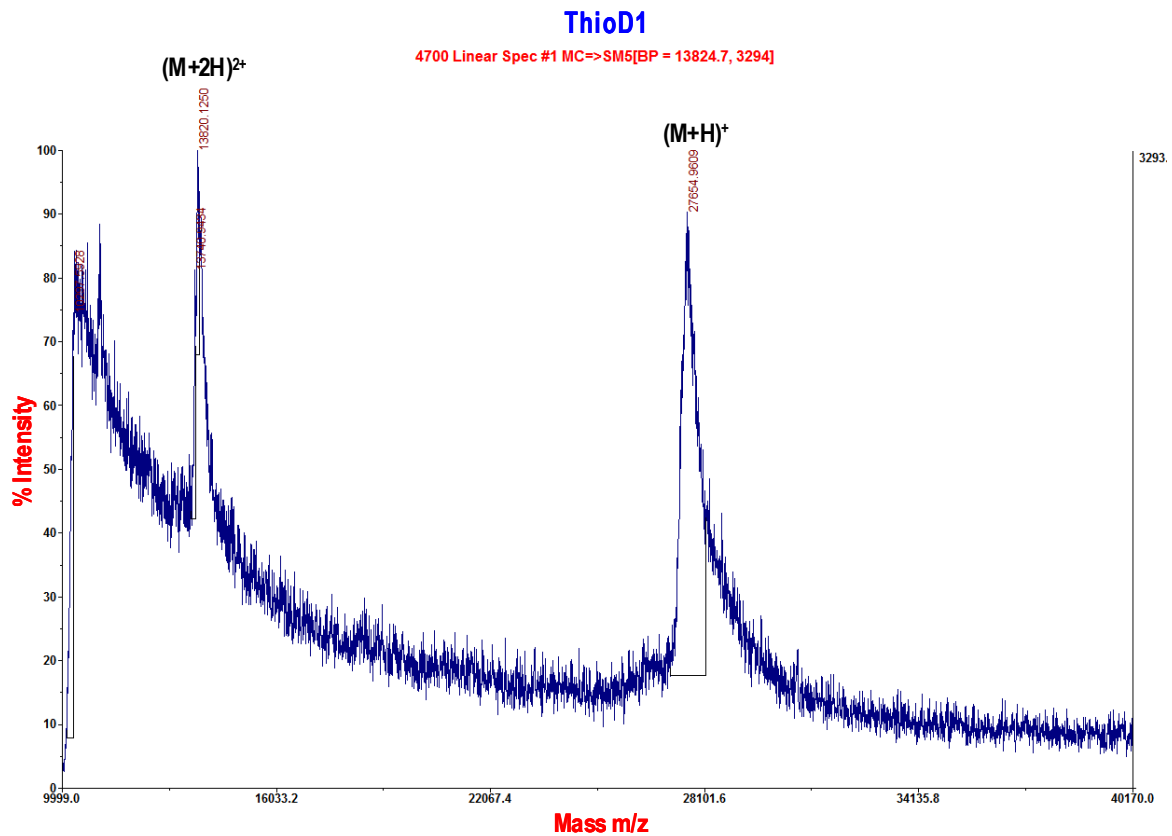


Figura 17: MALDI-TOF MS no modo linear das proteínas recombinantes thioD1 e thioD2. Em ambos os espectros são observados dois sinais majoritários correspondentes à proteína recombinante nas formas mono- e diprotonada.

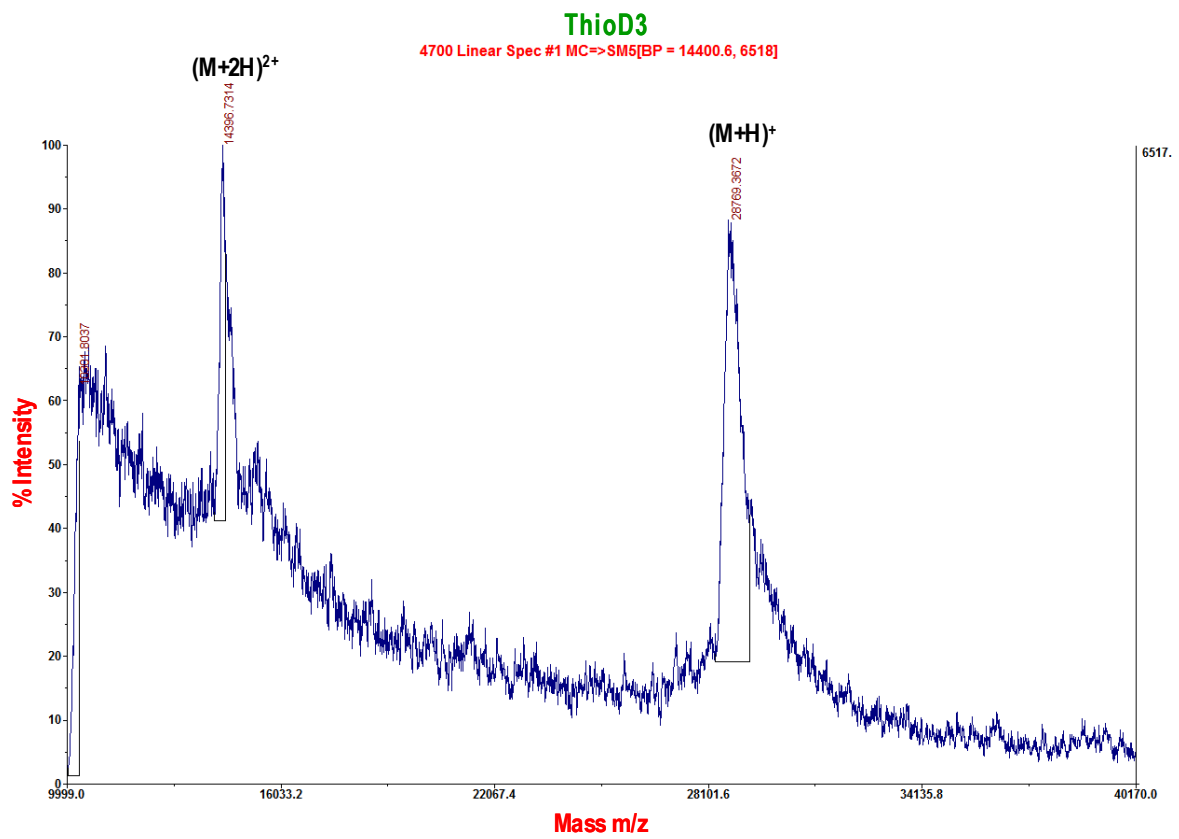


Figura 18: MALDI-TOF MS no modo linear da proteína recombinante thioD3. No espectro observamos dois sinais majoritários correspondentes à proteína recombinante nas formas mono- e diprotonada.

TESTES DE ATIVIDADE

Para testar a atividade biológica dos recombinantes, avaliamos sua capacidade de inibir a atividade proteolítica da SVMP jararagina sobre azocaseína. O método para determinação da atividade proteolítica de enzimas utilizando azocaseína foi inicialmente desenvolvido por Charney & Tomarelli . A azocaseína utilizada como substrato é um derivado da caseína ao qual foi adicionado um grupo sulfanilamida, de coloração alaranjada. A digestão de azocaseína por enzimas proteolíticas (ex.: jararagina) libera corante solúvel no meio, cuja quantidade pode ser facilmente estimada espectrofotometricamente, a 380 nm, após precipitação da proteína, pouco ou não digerida, por ácido tricloroacético. Desta forma, a intensidade de cor percebida no sobrenadante é função da atividade proteolítica da enzima em solução.

Em todos os ensaios, utilizamos os recombinantes dialisados contra tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, que foram recuperados em quantidade suficiente. A Figura 19 mostra que, como esperado, a atividade proteolítica da jararagina sobre azocaseína (barra 1) foi inibida pelo quelante de metais EDTA (barra 2) e por DM43 nativa (barra 19). Como controles, utilizamos os tampões de eluição da coluna de afinidade (fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, contendo NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, Uréia 4 M) e também o tampão empregado na diálise. Ainda que o primeiro tenha interferido fortemente com a leitura a 380 nm (barra 16), as preparações dos recombinantes (barras 6, 10 e 14) não se mostraram diferentes do controle do tampão de diálise (barra 18). Estes dados indicam que a diálise foi eficaz em retirar todos os contaminantes do tampão utilizado para eluir os recombinantes da coluna de afinidade. As proteínas recombinantes usadas, thioD1, thioD2 e thioD3, não foram capazes de inibir a atividade azocaseinolítica da jararagina em nenhuma relação molar testada (barras 3-5, 7-9 e 11-13).

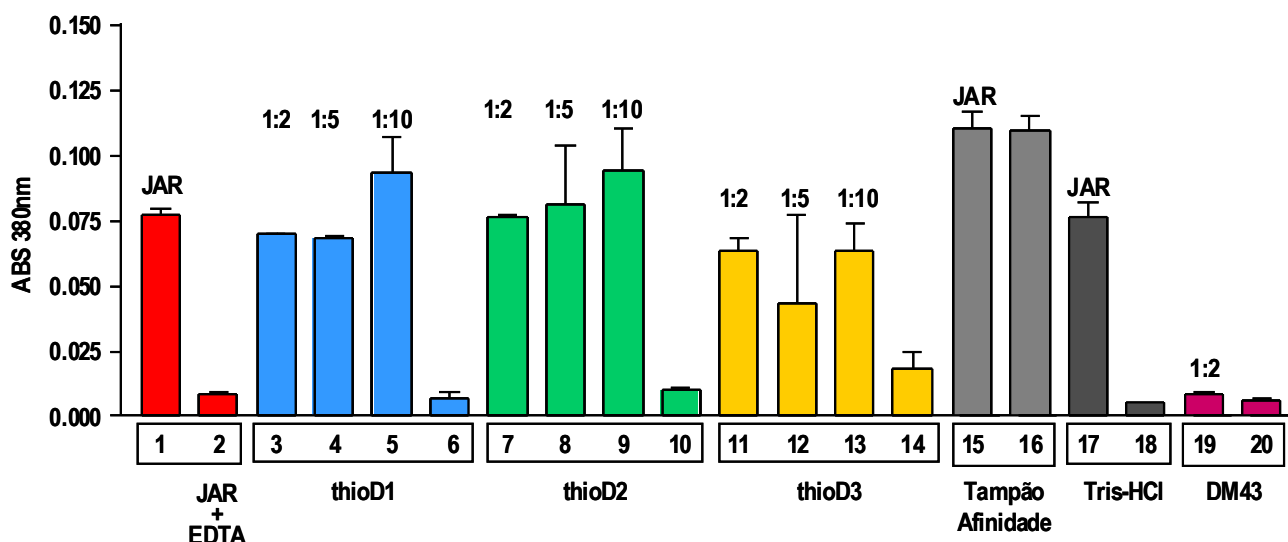


Figura 19: Análise da inibição da atividade azocaseinolítica da jararagina pelos domínios de DM43 fusionados com tioredoxina. Em todos os tubos, adicionamos a mesma quantidade de azocaseína como substrato e: 1= jararagina; 2= jararagina + EDTA; 3 a 5= jararagina + thioD1, nas relações molares indicadas; 6= thioD1; 7 a 9= jararagina + thioD2, nas relações molares indicadas; 10= thioD2; 11 a 13= jararagina + thioD3, nas relações molares indicadas; 14= thioD3; 15= jararagina + tampão de eluição da coluna de afinidade; 16= tampão eluição da coluna de afinidade; 17= jararagina + tampão Tris-HCl usado na diálise; 18= tampão Tris-HCl usado na diálise; 19= jararagina + DM43/ 1:2 mol/mol; 20= DM43.

Como as proteínas recombinantes thioD1, thioD2 e thioD3 não apresentaram atividade biológica no experimento de azocaseína, é possível que esteja havendo interferência da tioredoxina. De fato, em sistemas heterólogos, a fusão de uma proteína de interesse com outras proteínas pode influenciar, tanto em sua estrutura nativa, quanto em sua atividade biológica. Para comprovar esta hipótese, submetemos as proteínas recombinantes fusionadas à hidrólise com enteroquinase, que possui seu sítio de ação ([Asp]₄Lys) entre a tioredoxina e os domínios recombinantes, como já descrito. Entretanto, após vários ensaios variando condições, constatamos que a reação de hidrólise não era muito específica, gerando, invariavelmente, mais de duas bandas com diferentes massas moleculares, algumas imunoreativas ao anticorpo anti-DM43 (Figuras 20 A e B).

De fato, separar a proteína-alvo de sua proteína de fusão não costuma ser uma tarefa fácil. Vários problemas podem ser encontrados com frequência, tais como: baixo rendimento da clivagem, precipitação das proteínas de interesse, difícil otimização das condições de clivagem, alto custo das proteases e sua inespecificidade. Portanto, ainda que não tenhamos conseguido otimizar as

condições para uma clivagem 100 % eficaz, decidimos testar a atividade do conjunto de espécies geradas pela ação da enteroquinase. De novo, analisamos a inibição da atividade azocaseinolítica da jararagina. Observamos que, assim como os domínios recombinantes em fusão com a tiorredoxina, o conjunto de espécies obtidas após incubação com a enteroquinase não inibiu a ação azocaseinolítica da jararagina (Figura 21). Infelizmente, existem poucas alternativas para expressão de proteínas em sistemas heterólogos usando moléculas de fusão que aumentam a solubilidade, sem interferir na estrutura e/ou na atividade dos recombinantes .

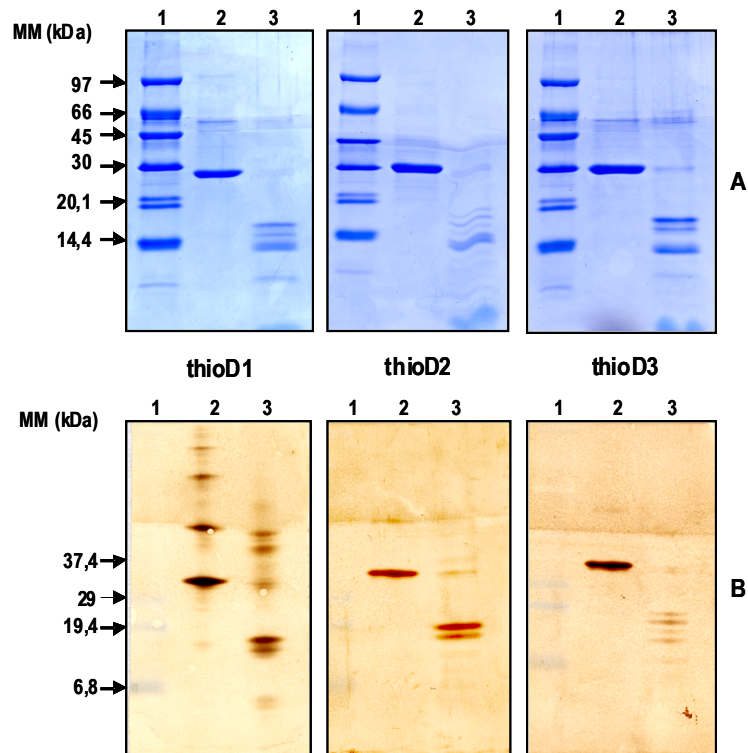


Figura 20: Análise dos domínios recombinantes de DM43 fusionados com tiorredoxina, após incubação com enteroquinase. (A) Todas as amostras foram analisadas por SDS-PAGE tricina e os géis, em condições redutoras, foram revelados com azul de Coomassie R250. (B) Duplicatas dos géis de cima, após transferência das bandas para membranas de PVDF e revelação com anti-soro anti-DM43. 1= padrão de massa molecular. 2= recombinante íntegro; 3= recombinante + enteroquinase.

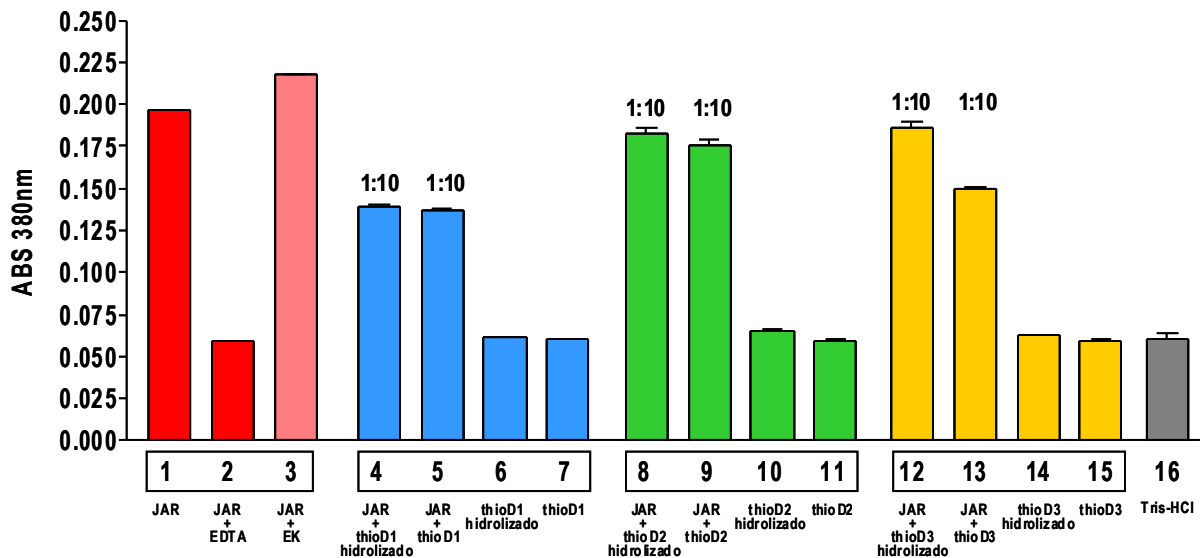


Figura 21: Análise da inibição da atividade azocaseinolítica da jararagina pelos domínios recombinantes de DM43, após clivagem com enteroquinase. Em todos os tubos, adicionamos a mesma quantidade de azocaseína como substrato e: 1= jararagina; 2= jararagina + EDTA; 3= jararagina + enteroquinase (EK); 4, 8 e 12= jararagina + (thioD + EK); 5, 9 e 13= jararagina + thioD; 6, 10 e 14= thioD + EK; 7, 11 e 15= thioD; 16= tampão Tris-HCl usado na diálise.

Também fizemos testes de inibição da atividade proteolítica da jararagina usando fibrinogênio bovino como substrato. Esta metaloprotease cliva preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio, liberando um polipeptídeo de 23 kDa, atividade totalmente inibida pela DM43 nativa. Portanto, testamos se os domínios de DM43 recombinantes fusionados, isolados ou em conjunto, também apresentavam a mesma atividade inibitória. A Figura 22 mostra que thioD1, thioD2, thioD3, ou combinação destas três proteínas, não foram capazes de inibir a hidrólise do fibrinogênio pela jararagina (produtos de hidrólise indicados pelas setas vermelhas). Muito pelo contrário, estes recombinantes pareceram funcionar como substratos, sendo também hidrolisados pela jararagina (setas verdes). Como controle positivo da inibição, utilizamos DM43 nativa, EDTA ou ortofenantrolina.

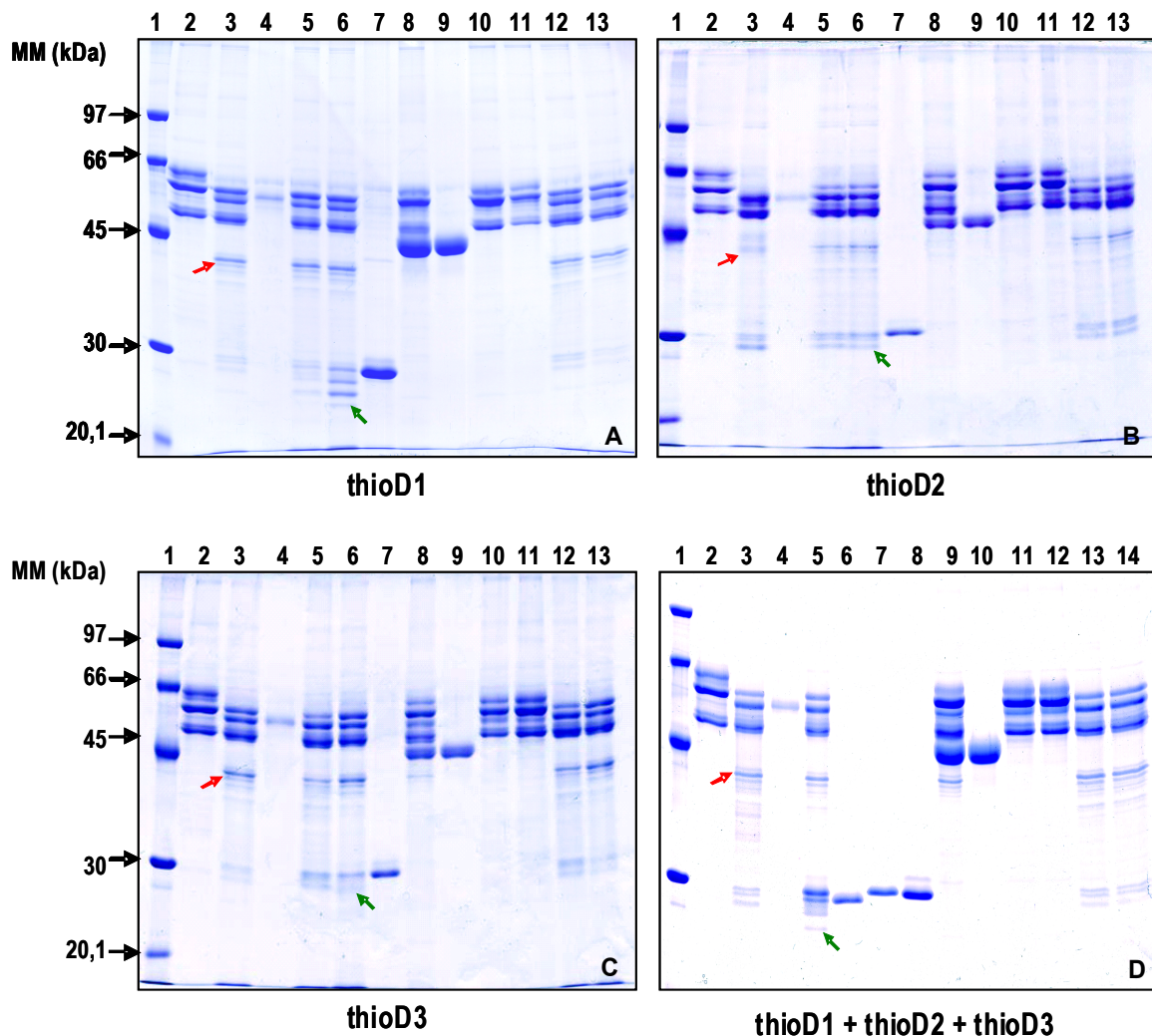


Figura 22: Análise da inibição da atividade fibrinogenolítica da jararagina pelos domínios recombinantes de DM43. Todas as amostras foram analisadas por SDS-PAGE a 12 % e os géis, em condições redutoras, foram corados por azul de Coomassie R250. As seguintes amostras foram testadas em cada raia dos géis A (thioD1), B (thioD2) e C (thioD3): 1= padrão de massa molecular; 2= fibrinogênio controle; 3= fibrinogênio + jararagina; 4= jararagina controle; 5= fibrinogênio + (jararagina + recombinante/ 1:2 mol/mol); 6= fibrinogênio + (jararagina + recombinante/ 1:10 mol/mol); 7= recombinante controle; 8= fibrinogênio + (jararagina + DM43 nativa/ 1:2 mol/mol); 9= DM43 nativa controle; 10= fibrinogênio + (jararagina + EDTA); 11= fibrinogênio + (jararagina + ortofenantrolina); 12= tampão Tris-HCl usado na diálise; 13= mesmo tampão + 20 % de metanol usado como veículo da ortofenantrolina.

No gel D, testamos os três domínios recombinantes concomitantemente. 1= padrão de massa molecular; 2= fibrinogênio controle; 3= fibrinogênio + jararagina; 4= jararagina controle; 5= fibrinogênio + (jararagina + recombinantes/ 1:10 mol/mol); 6= thioD1 controle ; 7= thioD2 controle; 8= thioD3 controle; 9= fibrinogênio + (jararagina + DM43 nativa/ 1:2 mol/mol); 10= DM43 nativa controle; 11= fibrinogênio + (jararagina + EDTA); 12= fibrinogênio + (jararagina + ortofenantrolina); 13= tampão Tris-HCl usado na diálise; 14= mesmo tampão + 20 % de metanol usado como veículo da ortofenantrolina. As setas vermelhas indicam os principais produtos de hidrólise do fibrinogênio e as setas verdes indicam os produtos de hidrólise das proteínas recombinantes

Para confirmar a hidrólise dos recombinantes, os domínios em fusão com a tioredoxina foram incubados, por diversos intervalos de tempo, com a jararagina. A Figura 23 mostra os perfis eletroforéticos destas amostras por SDS-PAGE em condições redutoras e após *western blotting* e revelação com anti-soro anti-DM43. Constatamos, então, a degradação destas proteínas recombinantes em todos os tempos analisados.

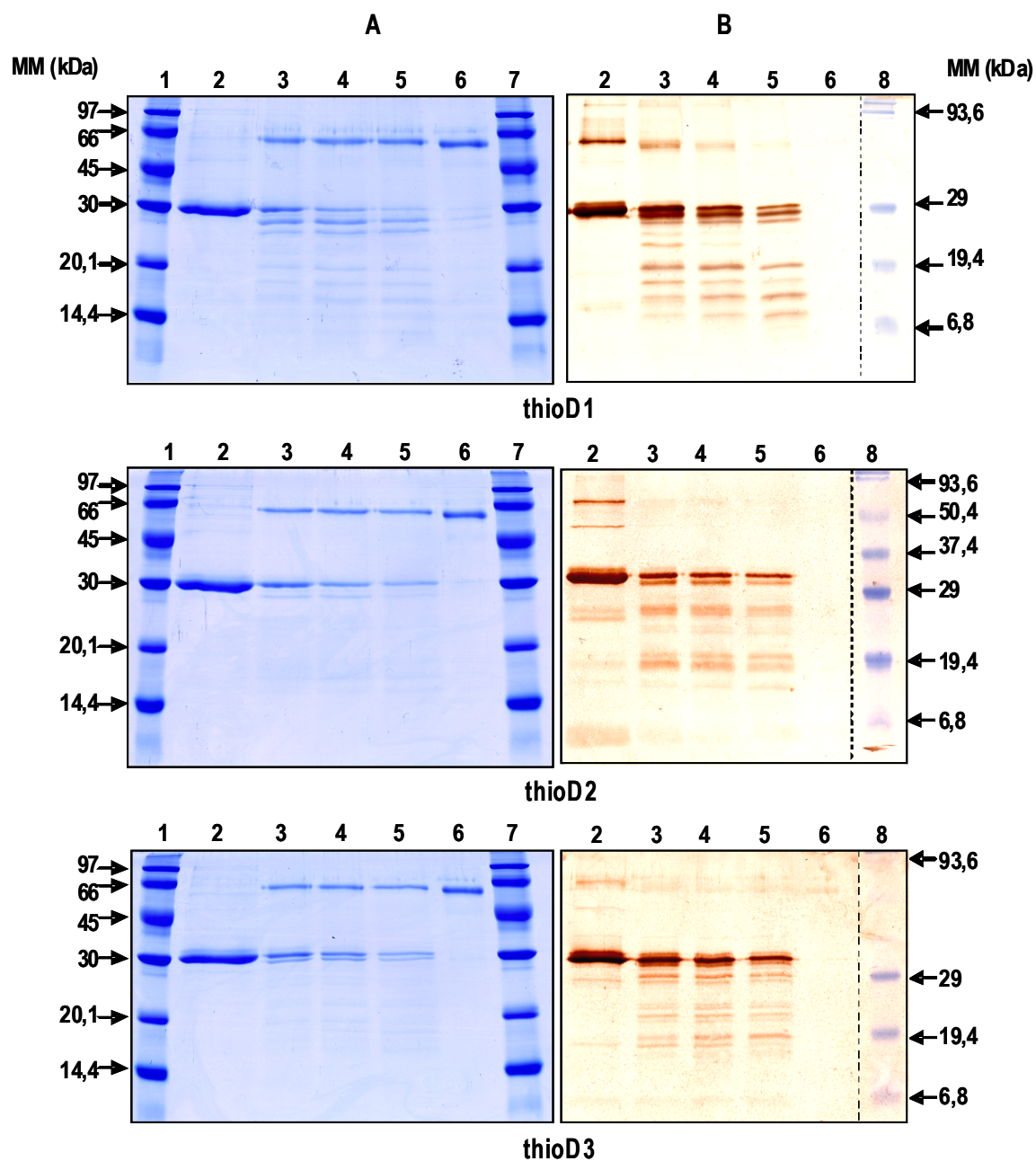


Figura 23: Análise dos domínios recombinantes de DM43 fusionados com tiorredoxina, após incubação com jararagina. (A) SDS-PAGE 15% das amostras em condições redutoras. Géis revelados com azul de Coomassie R250. (B) duplicatas dos géis à esquerda, após transferência das bandas para membranas de PVDF e revelação com anti-soro anti-DM43. 1 e 7= padrão de massa molecular. 2= domínio íntegro controle; 3= domínio + jararagina, incubados por 5 min; 4= domínio + jararagina, incubados por 10 min; 5= domínio + jararagina, incubados por 30 min; 6= jararagina controle; 8= padrão de massa molecular pré-corado. Todas as incubações foram feitas na relação enzima:recombinante 1:10 (mol/mol). O tracejado indica que raias não contíguas de um mesmo gel foram aproximadas na imagem digital.

Apesar de termos recuperado somente 0,5 mg de proteína solúvel no caso do recombinante D3 (sem fusão com a tiorredoxina) (Tabela 4), conseguimos testar sua atividade fazendo apenas um ensaio de inibição das atividades azocaseinolítica e fibrinogenolítica da jararagina. O domínio não-fusionado também foi incubado com jararagina para testar sua susceptibilidade à hidrólise. A Figura 24 mostra uma pequena redução da atividade azocaseinolítica da jararagina na presença de D3. Entretanto, frente à atividade fibrinogenolítica da jararagina, a proteína recombinante D3 não mostrou qualquer atividade (Figura 25). Interessantemente, quando incubamos D3 com a jararagina (Figura 26), o domínio se mostrou resistente à degradação, diferentemente dos demais domínios testados, que estão em fusão com a tiorredoxina.

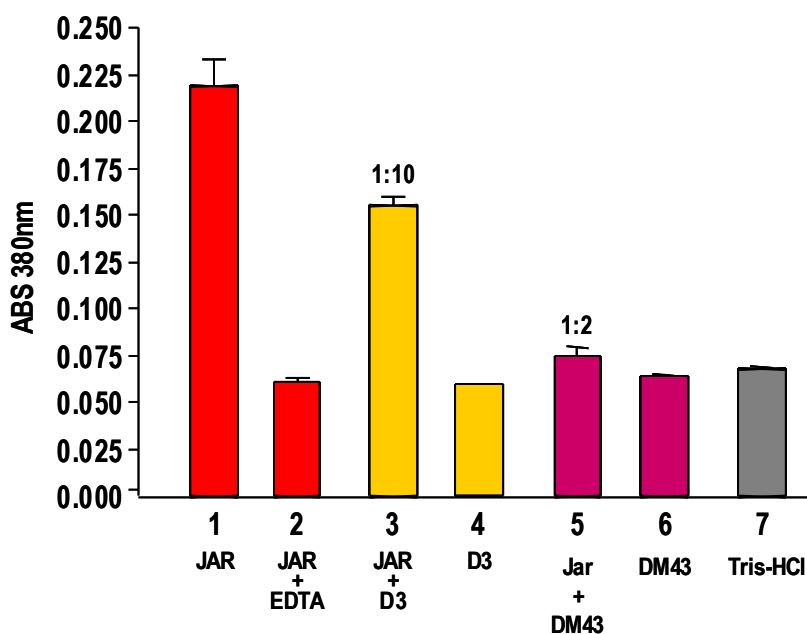


Figura 24: Análise da inibição da atividade azocaseinolítica da jararagina pelo domínio D3 de DM43. Em todos os tubos, adicionamos a mesma quantidade de azocaseína como substrato e: 1= jararagina; 2= jararagina + EDTA; 3= jararagina + D3/ 1:10 mol/mol; 4= D3; 5= jararagina + DM43 nativa; 6= DM43 nativa; 7= tampão Tris-HCl usado na diálise.

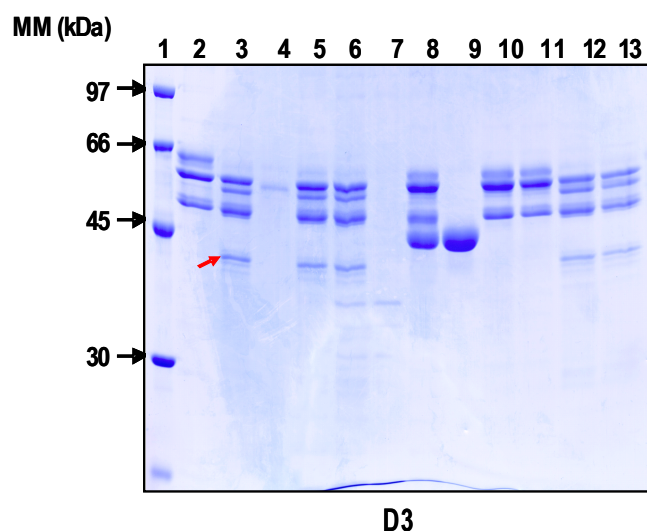


Figura 25: Análise da inibição da atividade fibrinogênolítica da jararagina pelo domínio D3 de DM43. Todas as amostras foram analisadas por SDS-PAGE 12 % e os géis, em condições redutoras, foram corados por azul de Coomassie R250. 1= padrão de massa molecular; 2= fibrinogênio controle; 3= fibrinogênio + jararagina; 4= jararagina controle; 5= fibrinogênio + (jararagina + D3/ 1:2 mol/mol); 6= fibrinogênio + (jararagina + recombinante/ 1:10 mol/mol); 7= recombinante controle; 8= fibrinogênio + (jararagina + DM43 nativa/ 1:2 mol/mol); 9= DM43 nativa controle; 10= fibrinogênio + (jararagina + EDTA); 11= fibrinogênio + (jararagina + ortofenantrolina); 12= fibrinogênio + jararagina + tampão Tris-HCl usado na diálise; 13= fibrinogênio + jararagina + tampão Tris-HCl usado na diálise + 20 % de metanol usado como veículo da ortofenantrolina. A seta vermelha indica o principal produto de hidrólise do fibrinogênio.

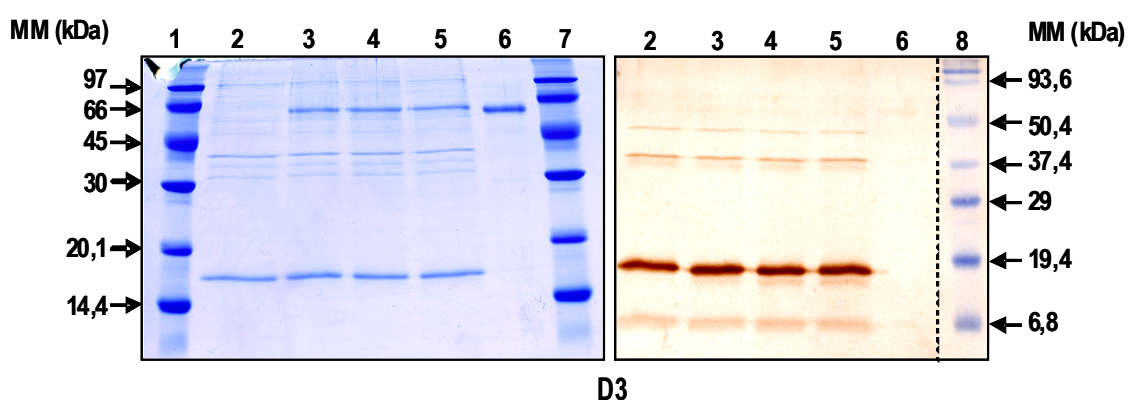


Figura 26: Análise do domínio recombinante D3 de DM43, após incubação com jararagina. (A): SDS-PAGE 15% das amostras em condições redutoras. Géis revelados com azul de Coomassie R250. (B) Duplicatas dos géis à esquerda, após transferência das bandas para membranas de PVDF e revelação com anti-soro anti-DM43. 1 e 7= padrão de massa molecular. 2= domínio íntegro controle; 3= domínio + jararagina, incubados por 5 min; 4= domínio + jararagina, incubados por 10 min; 5= domínio + jararagina, incubados por 30 min; 6= jararagina controle; 8= padrão de massa molecular pré-corado. Todas as incubações foram feitas na relação enzima:recombinante 1:10 (mol/mol). O tracejado indica que raias não contíguas de um mesmo gel foram aproximadas na imagem digital.

Em resumo, os domínios recombinantes, quando em fusão com a tiorredoxina, foram expressos e solubilizados com menos dificuldade. Entretanto, não só não inibiram a atividade proteolítica da jararagina, como também se transformaram em substratos desta metaloprotease tóxica. Já o domínio D3, sem a fusão com a tiorredoxina, se mostrou resistente à hidrólise pela jararagina e parece reduzir a atividade azocaseinolítica desta metaloprotease, entretanto, não apresentou atividade de inibição no ensaio com o fibrinogênio. Infelizmente, não conseguimos recuperar proteína solúvel em quantidade suficiente para observar o D3 por dicroísmo circular e caracterizar sua estrutura secundária. Segundo a análise teórica pelo software PSIPRED, a estrutura esperada para D3 é constituída exclusivamente de folhas β pregueadas (Anexo 1, Figura 37), diferentemente deste mesmo domínio em fusão com a tiorredoxina, que apresenta espectro característico de uma mistura de α -hélices e folhas β pregueadas. Sabe-se que a glicosilação é um dos fatores que contribuem para aumentar a resistência de proteínas à degradação proteolítica. No caso das proteínas recombinantes de DM43, os dados sugerem que a resistência à proteólise pode estar associada à conformação estrutural destas moléculas, já que nenhum dos recombinantes, resistentes ou não à degradação, era glicosilado.

Em relação à atividade biológica, é possível que a glicosilação tenha participação importante e/ou que a presença de mais de um domínio com conformação nativa seja fundamental. Na DM43, o terceiro domínio não é glicosilado. Como o D3 recombinante se mostrou pouco solúvel, é provável que, na proteína nativa, a presença dos outros dois domínios glicosilados seja importante para sua solubilidade. Segundo os dados teóricos de modelagem molecular, os dois maiores *loops* de interação entre DM43 e a metaloprotease estão localizados no terceiro domínio. Assumindo o enovelamento correto do D3 recombinante, nossos resultados indicam que apenas estes dois *loops* não são suficientes para garantir a atividade biológica do inibidor. Outra possibilidade é que, de fato, estes *loops* não correspondam à região de interação entre os dois ligantes.

10. ABORDAGEM DE BIOQUÍMICA CLÁSSICA: HIDRÓLISE LIMITADA DE DM43 NATIVA

Para avançarmos no estudo da relação estrutura-função, utilizamos também a abordagem bioquímica de proteólise da DM43 nativa isolada do soro do gambá . Sabe-se que as regiões inter-domínios das proteínas são geralmente mais flexíveis e susceptíveis à degradação proteolítica do que as localizadas internamente. Esta característica vem sendo classicamente explorada em diversos trabalhos de mapeamento da relação estrutura-função de proteínas . Pelo menos um inibidor natural de veneno de serpente foi estudado desta forma. HSF, uma proteína anti-hemorrágica isolada do soro de *Trimeresurus favoviridis*, foi digerida por quantidades catalíticas de papaína, sem que houvesse perda expressiva de sua atividade inibitória. Após clivagem adicional do fragmento ativo por brometo de cianogênio, uma estrutura ativa ainda menor foi localizada na porção N-terminal do primeiro dos três domínios do inibidor. A caracterização estrutural deste fragmento mostrou que a atividade inibitória era consequência da presença de duas cadeias polipeptídicas unidas por uma ponte dissulfeto .

Inicialmente, submetemos a DM43 nativa a hidrólises limitadas com tripsina ou quimotripsina (relação E:S 1:25 p/p), retirando-se alíquotas em diversos intervalos de tempo, como descrito no Material e Métodos. Os perfis eletroforéticos destas digestões podem ser observados na Figura 27 A. Os hidrolisados produzidos também foram testados quanto à capacidade de inibir a atividade azocaseinolítica da jararagina. DM43 se mostrou bastante susceptível à tripsina utilizada, gerando fragmentos de baixa massa molecular, porém sem qualquer atividade inibitória (Figuras 27 B e C). Por outro lado, o hidrolisado de quimotripsina se mostrou parcialmente ativo nos diversos tempos, provavelmente como consequência da presença de DM43 ainda íntegra, inclusive após 24 h de hidrólise. DM43 também foi incubada com papaína, mostrando-se resistente à hidrólise por esta enzima, mesmo depois de 24 h na relação E:S 1:10 p/p. Nas mesmas condições experimentais, o controle de albumina bovina foi prontamente digerido pela papaína (não mostrado).

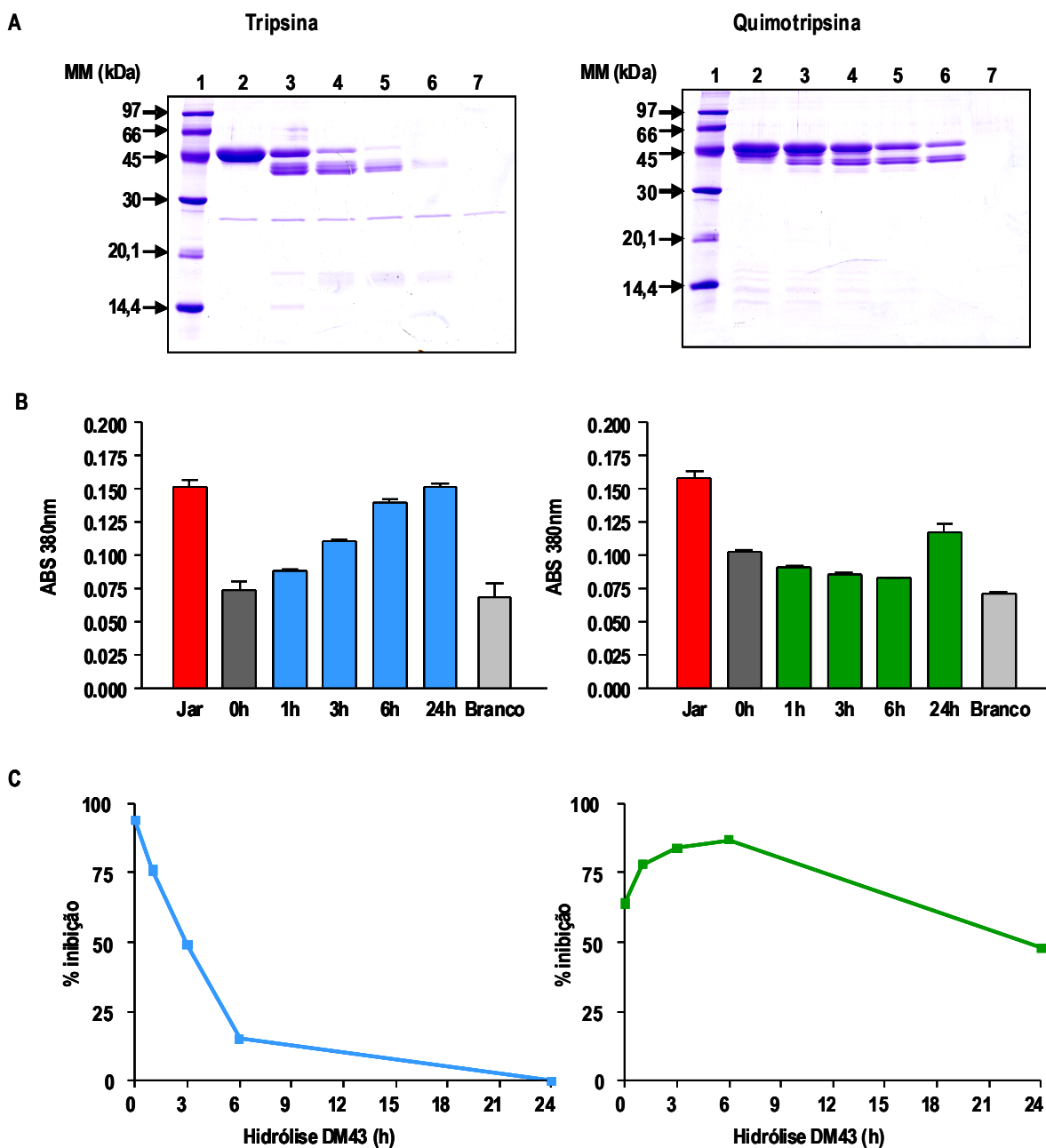


Figura 27: Ensaio de hidrólise limitada de DM43 nativa por tripsina ou quimotripsina (E:S 1:25 p/p). (A) SDS-PAGE 15 % em condições redutoras. Géis revelados com azul de Coomassie R250: 1= padrão de massa molecular; 2= DM43 + enzima, tempo zero incubação; 3= DM43 + enzima, 1 h incubação; 4= DM43 + enzima, 3 h incubação; 5= DM43 + enzima, 6h incubação; 6= DM43 + enzima, 24 h incubação; 7= controle tampão + enzima. (B) Ensaio de inibição da atividade azocaseinolítica da jararagina. Em todos os tubos, adicionamos a mesma quantidade de caseína como substrato e: Jar= jararagina; 0 h= jararagina + DM43 (tempo zero de incubação com tripsina ou quimotripsina); 1 h= jararagina + DM43 (1 h de incubação); 3 h= jararagina + DM43 (3 h de incubação); 6 h= jararagina + DM43 (6 h de incubação); 24 h= jararagina + DM43 (24 h de incubação); Branco= controle tampão + tripsina ou quimotripsina. (C) Mesmo experimento de inibição da atividade caseinolítica mostrado em (B), com resultados calculados em termos de percentual de inibição.

11. HIDRÓLISE EXTENSIVA DE DM43 NATIVA

Diante dos resultados de DM43 nativa no ensaio de proteólise limitada, passamos a submetê-la à desnaturação, redução e alquilação, antes da hidrólise enzimática. Para hidrolisar extensivamente esta preparação de DM43 e tentar localizar possíveis peptídeos ativos, analisamos sua estrutura primária com o programa *Peptidecutter* (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter/>), procurando definir *in silico* qual enzima seria mais apropriada. A idéia foi produzir uma mistura de peptídeos de tamanho médio, preservando íntegras as regiões de *loops* que, pelo modelo teórico, seriam candidatas à interação com a metaloprotease. A enzima que melhor preencheu estes requisitos foi a endoprotease Lys-C (Roche), que cliva especificamente a ligação peptídica no C-terminal de resíduos de lisina. Desta forma, foram gerados aproximadamente 14 peptídeos de DM43 (Figura 28). Uma alíquota do hidrolisado foi analisada por cromatografia de fase reversa em coluna de C18. A comparação dos cromatogramas do hidrolisado (Figura 29 A) e da DM43 íntegra (Figura 29 B) comprova a eficiência da hidrólise, já que não recuperamos qualquer fração de DM43 íntegra após 24 h de incubação com Lys-C. As massas moleculares dos peptídeos gerados após hidrólise de DM43 por Lys-C, determinadas experimentalmente por MALDI-TOF no modo linear, estão mostradas na Figura 29 C.

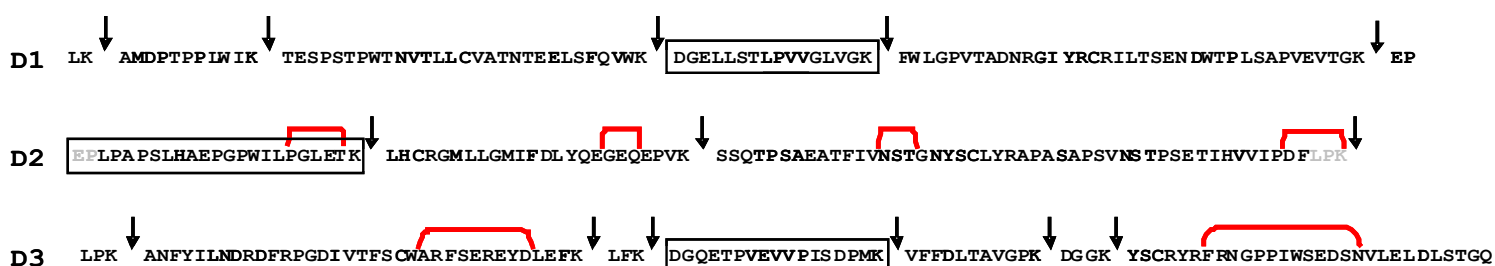


Figura 28: Sequência de aminoácidos dos domínios de DM43. Os sítios de hidrólise de Lys-C estão indicados pelas setas. Os colchetes em vermelho indicam as posições dos *loops* de possível interação com as SVMPs. As caixas indicam os peptídeos de DM43 que interagiram com a jararagina.

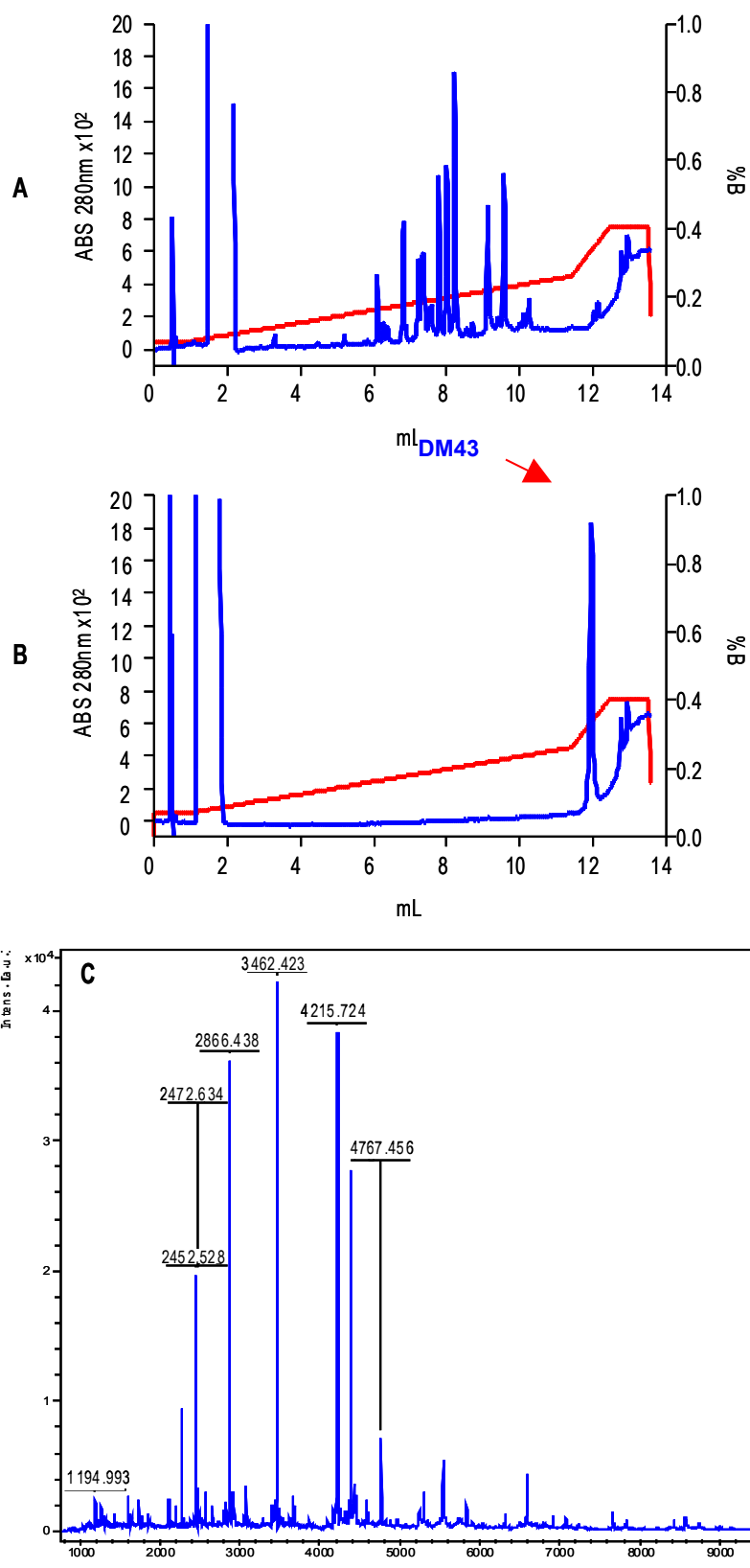


Figura 29: Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa Vydac C18 (4,4 x 25 cm), ao fluxo de 0,5 mL/min. O sistema de solventes consistiu de TFA 0,1 % em água (solvente A) e TFA 0,1 % em acetonitrila (solvente B). O programa de eluição utilizado foi: 25 %B por 5 min, 25-75 %B em 30 min, 75 %B por 5 min. (A) Produto de hidrólise de DM43 pela Lys-C, e (B) DM43 íntegra; (C) MALDI-TOF no modo linear dos peptídeos da hidrólise de DM43.

Para mapear a região de interação entre DM43 e jararagina, submetemos o hidrolisado, antes e após incubação com a metaloprotease, à cromatografia em Superdex Peptide. Esta coluna de exclusão molecular tem resolução ótima entre 0,1 e 7 kDa e limite de exclusão de 20 kDa. Assim, em caso de interação com a jararagina (52 kDa), os peptídeos deverão ser eluídos, não mais nos seus volumes de eluição característicos, mas no volume de exclusão da coluna. Na Figura 30 B, mostramos o cromatograma do hidrolisado de DM43 por Lys-C na Superdex Peptide. Após incubação com jararagina, o perfil cromatográfico foi modificado, percebendo-se nitidamente o desaparecimento de dois picos peptídicos originalmente eluídos entre 10-13 mL (Figura 30 C). Na mesma figura, fica nítido o aumento da área do pico referente ao volume de exclusão da coluna (7-9 mL), resultado da eluição da jararagina em associação com peptídeos de DM43. Apesar deste resultado, onde observamos o deslocamento de picos em virtude da interação com a jararagina, o hidrolisado total gerado após incubação de DM43 com Lys-C não mostrou atividade inibitória contra a proteólise induzida por esta SVMP. Igualmente, DM43 desnaturada, reduzida e alquilada também foi incapaz de neutralizar a atividade enzimática desta metaloprotease (Figura 31).

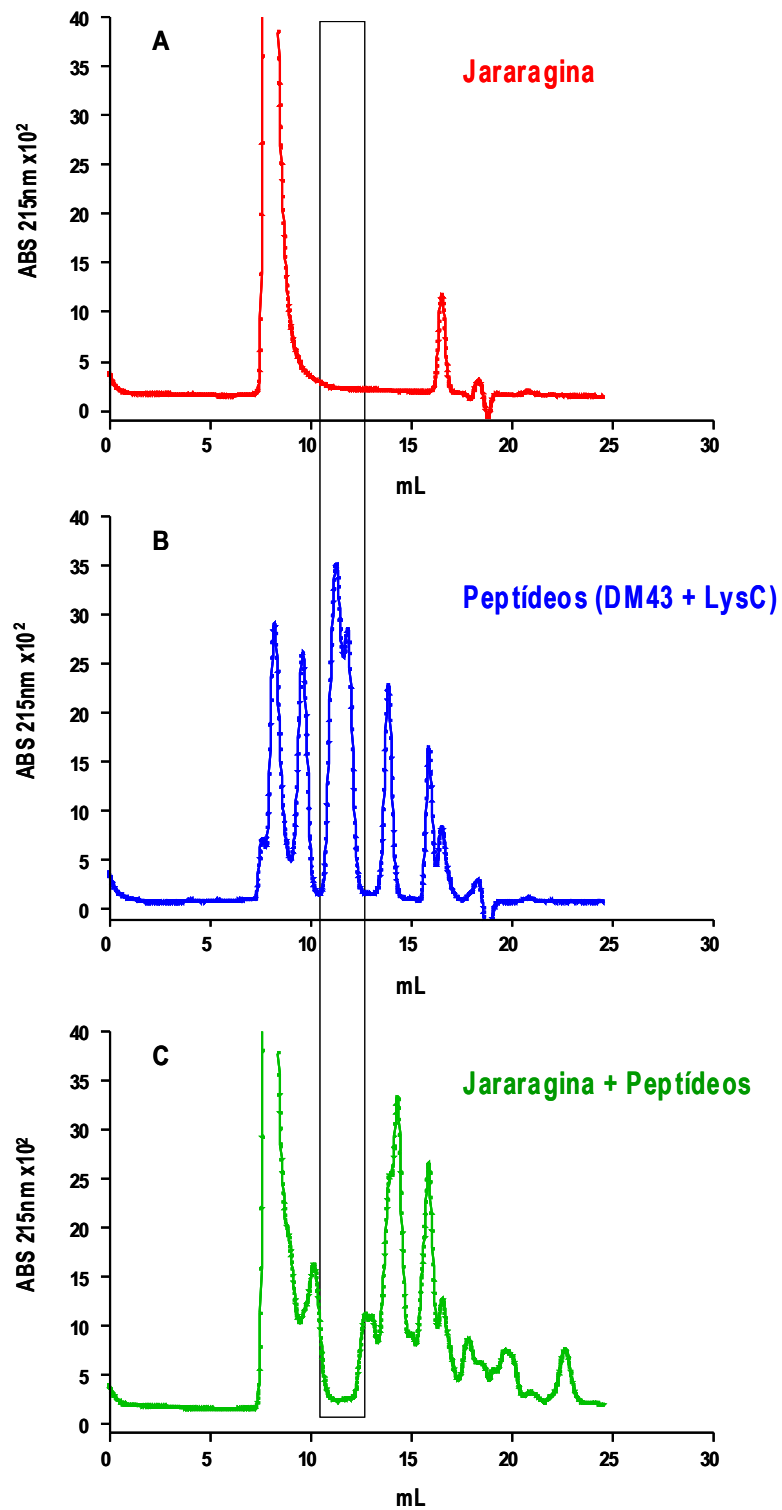


Figura 30: Perfil cromatográfico em coluna Superdex Peptide HR 10/30 (GE Healthcare). As cromatografias foram realizadas no modo isocrático, a 0,5 mL/min, em Tris-HCl 25 mM pH 7,5, contendo 20 mM de CaCl₂. (A) da jararagina; (B) dos peptídeos, produtos da hidrólise de DM43 pela Lys-C; e (C) dos peptídeos após incubação com a jararagina.

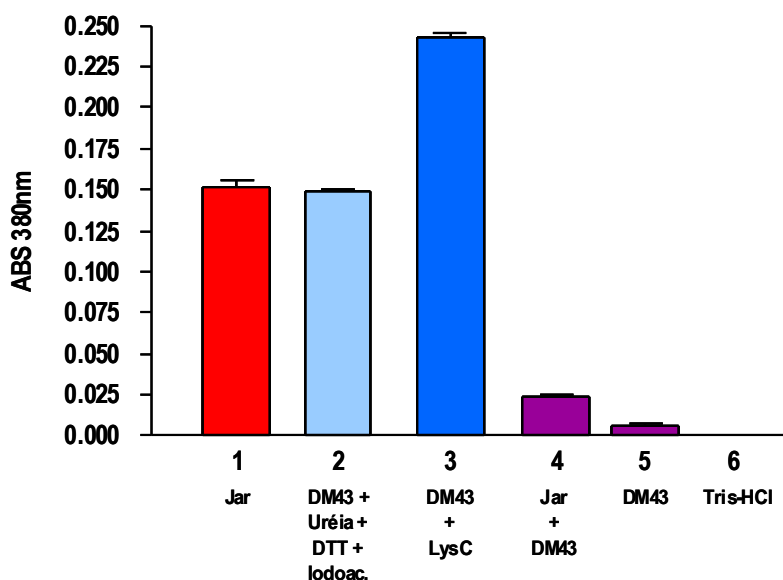


Figura 31: Análise da inibição da atividade azocaseinolítica da jararagina pela DM43. Em todos os tubos, adicionamos a mesma quantidade de azocaseína como substrato e: 1= jararagina; 2= jararagina + DM43 desnaturada, reduzida e alquilada; 3= jararagina + produto de hidrólise de DM43 pela Lys-C; 4= jararagina + DM43 nativa; 5= DM43 nativa; 6= tampão Tris-HCl usado na diálise.

Os picos do hidrolisado de DM43 por Lys-C, deslocados no cromatograma da Superdex Peptide em função da interação com jararagina, foram coletados e analisados por MS. O resultado mostrou que são constituídos por três peptídeos. Após sequenciamento por MS/MS (Anexo 1, Figuras 38, 39 e 40), cada um deles foi localizado em um domínio de DM43 (Figura 28, seqüências destacadas por caixas), sugerindo, mais uma vez, a participação dos três domínios na atividade biológica do inibidor. Interessantemente, apenas um dos peptídeos corresponde a uma seqüência de *loop* (⁹⁶EPLPAPSLHAEPGPWILPGLTK¹¹⁸); os outros dois estão em posições conservadas e possuem seqüências homólogas (⁴³DGELLSTLPVVGLVGK⁵⁸ e ²⁴¹DGQETPVEVVPISDPMK²⁵⁷); nenhum dos três possui sítio de glicosilação previsto. Em concordância com este resultado, dados da literatura mostram que os sítios de interação das proteínas tipo-Ig com seus ligantes pode se localizar tanto nos *loops* (regiões mais variáveis) quanto em regiões das fitas de folhas β pregueadas. Em alguns casos, sabe-se que a região de interação com o ligante também é formada por mais de um domínio tipo-imunoglobulina em seqüência; como parece ser o caso de DM43.

CAPÍTULO IV.
CONCLUSÕES

- Nesta tese, expressamos heterologicamente DM43 completa e cada um dos três domínios de DM43, em fusão com a tiorredoxina. O primeiro e o terceiro domínios também foram expressos sem a fusão com a tiorredoxina. Não foi possível obter o segundo domínio sem esta fusão. Após solubilização dos corpúsculos de inclusão, purificação e re-enovelamento dos recombinantes, recuperamos de forma solúvel apenas as proteínas recombinantes thioD1, thioD2, thioD3 e D3.
- A análise por CD foi possível nos casos de thioD1, thioD2 e thioD3, e mostrou a presença de proteínas estruturadas por uma mistura de α -hélices e folhas β pregueadas, em concordância com as análises *in silico*, mas diferente do modelo tridimensional dos domínios da DM43 nativa.
- Os domínios fusionados com a tiorredoxina não só não inibiram a atividade proteolítica da jararagina, como também se transformaram em substratos desta metaloprotease tóxica. O D3 não fusionado também parece não ter atividade, porém apresentou resistência à proteólise. Estes dados sugerem que a resistência à proteólise está mais associada à conformação da molécula do que à sua glicosilação, uma vez que nenhum dos recombinantes, resistentes ou não à degradação, era glicosilado. Por outro lado, a glicosilação da DM43 parece ser importante para sua solubilidade, já que os domínios originalmente glicosilados só foram recuperados na forma solúvel quando fusionados à tiorredoxina.
- Os dois maiores *loops* teóricos de interação entre DM43 e a metaloprotease, localizados no terceiro domínio, não foram suficientes para garantir a atividade inibitória de D3. Este resultado parece indicar que: a) a participação dos outros domínios é importante para a funcionalidade do inibidor e/ou; b) estes *loops* não correspondem à região de interação entre os dois ligantes.
- Sob condições desnaturantes, a digestão extensiva de DM43 nativa pela endoproteínase Lys-C produziu diversos peptídeos. Mesmo que estes peptídeos em conjunto não tenham mostrado atividade biológica contra a jararagina, três deles foram capazes de se ligar a esta SVMP. Após sequenciamento por MS/MS, cada peptídeo foi localizado em um domínio diferente de DM43 e nenhum deles apresentou sítio de glicosilação.
- Em conjunto, nossos dados sugerem que a glicosilação é importante para a solubilidade de DM43. Além disso, a participação conjunta dos três domínios de DM43 parece ser importante para sua interação com as SVMPs e, conseqüentemente, para a inibição da atividade enzimática destas toxinas.

CAPÍTULO V.
BIBLIOGRAFIA

- ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS E D. J. LIPMAN. 1990. BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. *J. MOL. BIOL.* 215:403-410.
- ANDERSON, L. E., K. A. WALSH E H. NEURATH. 1977. BOVINE ENTEROKINASE. PURIFICATION, SPECIFICITY, AND SOME MOLECULAR PROPERTIES. *BIOCHEMISTRY* 16:3354-3360.
- AOKI, N., M. DESHIMARU E S. TERADA. 2007. ACTIVE FRAGMENTS OF THE ANTIHEMORRHAGIC PROTEIN HSF FROM SERUM OF HABU (*TRIMERESURUS FLAVOVIRIDIS*). *TOXICON* 49:653-662.
- ARNAU, J., C. LAURITZEN, G. E. PETERSEN E J. PEDERSEN. 2006. CURRENT STRATEGIES FOR THE USE OF AFFINITY TAGS AND TAG REMOVAL FOR THE PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEINS. *PROTEIN EXPR PURIF* 48:1-13.
- BANEYX, F. 1999. RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*. *CURR OPIN BIOTECHNOL* 10:411-421.
- BAZAN, J.F. 1990. STRUCTURAL DESIGN AND MOLECULAR EVOLUTION OF A CYTOKINE RECEPTOR SUPERFAMILY. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A* 87:6934-6938.
- BERNDT, C., C. H. LILLIG E A. HOLMGREN. 2008. THIOREDOXINS AND GLUTAREDOXINS AS FACILITATORS OF PROTEIN FOLDING. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 1783:641-650.
- BJARNASON, J.B. E J.W. FOX. 1994. HEMORRHAGIC METALLOPROTEINASES FROM SNAKE VENOMS. *PHARMAC. THER.* 62:325-372.
- BJARNASON, J.B. E J.W. FOX. 1995. SNAKE VENOM METALLOENDOPEPTIDASES: REPROLYSINS. *METHODS ENZYMOL.* 248:345-368.
- BOCHNER, R. E C.J. STRUCHINER. 2003. EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS NOS ÚLTIMOS 100 ANOS NO BRASIL: UMA REVISÃO. *CAD. SAÚDE PÚBLICA* 19:7-16.
- BORK, P., L. HOLM E C. SANDER. 1994. THE IMMUNOGLOBULIN FOLD. STRUCTURAL CLASSIFICATION, SEQUENCE PATTERNS AND COMMON CORE. *J MOL BIOL* 242:309-320.
- BRAUN, P., Y. HU, B. SHEN, A. HALLECK, M. KOUNDINYA, E. HARLOW E J. LABAER. 2002. PROTEOME-SCALE PURIFICATION OF HUMAN PROTEINS FROM BACTERIA. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 99:2654-2659.
- BUTT, T. R., S. C. EDAVETAL, J. P. HALL E M. R. MATTERN. 2005. SUMO FUSION TECHNOLOGY FOR DIFFICULT-TO-EXPRESS PROTEINS. *PROTEIN EXPR PURIF* 43:1-9.
- CALMETTE, A. 1894. CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VENIN DES SERPENTS. IMMUNISATION DES ANIMAUX ET TRAITEMENT DE L'ENVENIMANTION. *ANN. INST. PASTEUR* 275-291.
- CARDOSO, J.L.C., H.W. FAN, F.O.S. FRANÇA, M.T. JORGE, R.P. LEITE, S.A. NISHIOKA, A. AVILA, I.S. SANO-MARTINS, S.C. TOMY, M.L. SANTORO, A.M. CHUDZINSKI, S.C.B. CASTRO, A.S. KAMIGUTI, E.M.A. KELEN, M.H. HIRATA, R.M.S. MIRANDOLA, R.D.G. THEAKSTON E D. A. WARRELL. 1993. RANDOMIZED COMPARATIVE TRIAL OF THREE ANTIVENOMS IN THE TREATMENT OF ENVENOMING BY LANCE-HEADED VIPERS (*BOTHROPS JARARACA*) IN SÃO PAULO, BRAZIL. *BRAZIL. Q. J. MED.* 86:315-325.
- CATANESE, J.J. E L.F. KRESS. 1992. ISOLATION FROM OPOSSUM SERUM OF A METALLOPROTEINASE INHIBITOR HOMOLOGOUS TO HUMAN ALPHA 1B-GLYCOPROTEIN. *BIOCHEMISTRY* 31:410-418.
- CERQUEIRA, R. E B. LEMOS. 2000. MORPHOMETRIC DIFFERENTIATION BETWEEN NEOTROPICAL BLACK-EARED OPOSSUMS, *DIDELPHIS MARSUPIALIS* AND *D. AURITA* (*DIDELPHIMORPHIA*, *DIDELPHIDAE*). *MAMMALIA* 64:319-327.

- CHA, H. J., C. F. WU, J. J. VALDES, G. RAO E W. E. BENTLEY. 2000. OBSERVATIONS OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN AS A FUSION PARTNER IN GENETICALLY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI*: MONITORING PROTEIN EXPRESSION AND SOLUBILITY. *BIOTECHNOL BIOENG* 67:565-574.
- CHIPPAUX, J. P. E M. GOYFFON. 1998. VENOMS, ANTIVENOMS AND IMMUNOTHERAPY. *TOXICON* 36:823-846.
- CHIPPAUX, J.P. 1998. SNAKE-BITES: APPRAISAL OF THE GLOBAL SITUATION. *BULL. WORLD HEALTH ORGAN.* 76:515-524.
- COMINETTI, M.R. 2007. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE TOXINAS E USO DE INIBIDORES. IN *MÉTODOS EM TOXINOLOGIA: TOXINAS DE SERPENTES* ED. H. SELISTRE-DE-ARAÚJO AND D.H.F. SOUZA, 45-51. SÃO CARLOS: EDUFSCAR
- CORPET, F. 1988. MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT WITH HIERARCHICAL CLUSTERING. *NUCLEIC ACIDS RES.* 16:10881-10890.
- DAVIS, G. D., C. ELISEE, D. M. NEWHAM E R. G. HARRISON. 1999. NEW FUSION PROTEIN SYSTEMS DESIGNED TO GIVE SOLUBLE EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*. *BIOTECHNOL BIOENG* 65:382-388.
- DE VOS, A.M., M. ULTSCH E A.A. KOSSIAKOFF. 1992. HUMAN GROWTH HORMONE AND EXTRACELLULAR DOMAIN OF ITS RECEPTOR: CRYSTAL STRUCTURE OF THE COMPLEX. *SCIENCE* 255:306-312.
- DESHIMARU, M., C. TANAKA, A. TOKUNAGA, M. GOTO E S. TERADA. 2003. EFFICIENT METHOD FOR PURIFICATION OF ANTIHEMORRHAGIC FACTOR (HSF) IN THE SERUM OF JAPANESE HABU (*TRIMERESURUS FLAVOVIRIDIS*). *FUKUOKA UNIV. SCI. REP.* 33:45-53.
- DESHIMARU, M., C. TANAKA, K. FUJINO, N. AOKI, S. TERADA, S. HATTORI E M. OHNO. 2005. PROPERTIES AND cDNA CLONING OF AN ANTIHEMORRHAGIC FACTOR (HSF) PURIFIED FROM THE SERUM OF *TRIMERESURUS FLAVOVIRIDIS*. *TOXICON* 46:937-945.
- DOMONT, G.B., J. PERALES E H. MOUSSATCHÉ. 1991. NATURAL ANTI-SNAKE VENOM PROTEINS. *TOXICON* 29:1183-1194.
- FAURE, G. 2000. NATURAL INHIBITORS OF TOXIC PHOSPHOLIPASES A_2 . *BIOCHIMIE* 82:833-840.
- FONTANA, F. 1781. TRAITÉ SUR LE VENIN DE LA VIPÈRE. FLORENCE, P. 23 - APUD PHISALIX, M. (1922): P.
- FORTES-DIAS, C.L. 2002. ENDOGENOUS INHIBITORS OF SNAKE VENOM PHOSPHOLIPASES $A(2)$ IN THE BLOOD PLASMA OF SNAKES. *TOXICON* 40:481-484.
- FORTES-DIAS, C.L., Y. LIN, J. EWELL, C.R. DINIZ E T.Y. LIU. 1994. A PHOSPHOLIPASE A_2 INHIBITOR FROM THE PLASMA OF THE SOUTH AMERICAN RATTLESNAKE (*CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*). PROTEIN STRUCTURE, GENOMIC STRUCTURE, AND MECHANISM OF ACTION. *J. BIOL. CHEM.* 269:15646-15651.
- FORTES-DIAS, C.L., B.C. FONSECA, E. KOCHVA E C.R. DINIZ. 1991. PURIFICATION AND PROPERTIES OF AN ANTIVENOM FACTOR FROM THE PLASMA OF THE SOUTH AMERICAN RATTLESNAKE (*CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*). *TOXICON* 29:997-1008.
- FOX, J. W. E S. M. SERRANO. 2008. INSIGHTS INTO AND SPECULATIONS ABOUT SNAKE VENOM METALLOPROTEINASE (SVMP) SYNTHESIS, FOLDING AND DISULFIDE BOND FORMATION AND THEIR CONTRIBUTION TO VENOM COMPLEXITY. *FEBS J.* 275:3016-3030.
- FOX, J.W. E S.M. SERRANO. 2005. STRUCTURAL CONSIDERATIONS OF THE SNAKE VENOM METALLOPROTEINASES, KEY MEMBERS OF THE M12 REPROLYSIN FAMILY OF METALLOPROTEINASES. *TOXICON* 45:969-985.
- FRANÇA, F.O.S. E C.M.S. MÁLAQUE. 2003. ACIDENTE BOTRÓPICO. IN *ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL* ED. J. L.C CARDOSO, F.O.S. FRANÇA, F.H. WEN, C.M.S. MÁLAQUE AND V. HADDAD JR., 72-86. SÃO PAULO: SARVIER

- FRANCO, F.L. 2003. ORIGEM E DIVERSIDADE DAS SERPENTES. IN *ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL* ED. J. L.C CARDOSO, F.O.S. FRANÇA, F.H. WEN, C.M.S. MÁLAQUEAND V. HADDAD JR., 13-32. SÃO PAULO: SARVIER
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2001. MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. BRASÍLIA: P.
- GRIFFIN, J. P. 2004. VENETIAN TREATMENT AND THE FOUNDATION OF MEDICINES REGULATION. *BR J CLIN PHARMACOL* 58:317-325.
- GUTIÉRREZ, J. M., H. GONDO HIGASHI, F. HUI WEN E T. BURNOUF. 2007A. STRENGTHENING ANTIVENOM PRODUCTION IN CENTRAL AND SOUTH AMERICAN PUBLIC LABORATORIES: REPORT OF A WORKSHOP. *TOXICON* 49:30-35.
- GUTIÉRREZ, J. M., B. LOMONTE, G. LEON, A. RUCAVADO, F. CHAVES E Y. ANGULO. 2007B. TRENDS IN SNAKEBITE ENVENOMATION THERAPY: SCIENTIFIC, TECHNOLOGICAL AND PUBLIC HEALTH CONSIDERATIONS. *CURR PHARM DES* 13:2935-2950.
- GUTIÉRREZ, J. M. E B. LOMONTE. 1989. LOCAL TISSUE DAMAGE INDUCED BY BOTHROPS SNAKE VENOMS. A REVIEW. *MEM. INST. BUTANTAN* 51:211-223.
- GUTIÉRREZ, J.M., A. RUCAVADO, T. ESCALANTE E C. DIAZ. 2005. HEMORRHAGE INDUCED BY SNAKE VENOM METALLOPROTEINASES: BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL MECHANISMS INVOLVED IN MICROVESSEL DAMAGE. *TOXICON* 45:997-1011.
- GUTIÉRREZ, J.M., R.D. THEAKSTON E D.A. WARRELL. 2006. CONFRONTING THE NEGLECTED PROBLEM OF SNAKE BITE ENVENOMING: THE NEED FOR A GLOBAL PARTNERSHIP. *PLoS Med.* 3:727-731.
- GUTIÉRREZ, J.M. E B. LOMONTE. 1995. PHOSPHOLIPASE A₂ MYOTOXINS FROM *BOTHROPS* SNAKE VENOMS. *TOXICON* 33:1405-1424.
- HALABY, D. M. E J. P. MORNON. 1998. THE IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY: AN INSIGHT ON ITS TISSULAR, SPECIES, AND FUNCTIONAL DIVERSITY. *J MOL EVOL* 46:389-400.
- HARRIS, J. B. 1998. PHOSPHOLIPASE A₂ THAT SHOW NEUROTOXIC ACTIVITY. IN *ENZYMES FROM SNAKE VENOM* ED. GRAHAM S. BAILEY, 425-447. FORT COLLINS: ALAKEN, INC.
- HAWGOOD, B. J. 1992. PIONEERS OF ANTI-VENOMOUS SEROTHERAPY: DR VITAL BRAZIL (1865-1950). *TOXICON* 30:573-579.
- HOLMGREN, A. 1985. THIOREDOXIN. *ANNU REV BIOCHEM* 54:237-271.
- HOOD, L., M. KRONENBERG E T. HUNKAPILLER. 1985. T CELL ANTIGEN RECEPTORS AND THE IMMUNOGLOBULIN SUPERGENE FAMILY. *CELL* 40:225-229.
- ISHIOKA, N., N. TAKAHASHI E F.W. PUTNAM. 1986. AMINO ACID SEQUENCE OF HUMAN PLASMA ALPHA 1B-GLYCOPROTEIN: HOMOLGY TO THE IMMUNOGLOBULIN SUPERGENE FAMILY. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A* 83:2363-2367.
- JANA, S. E J. K. DEB. 2005. STRATEGIES FOR EFFICIENT PRODUCTION OF HETEROLOGOUS PROTEINS IN *ESCHERICHIA COLI*. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL* 67:289-298.
- KAMIGUTI, A. S., H. P. DESMOND, R. D. THEAKSTON, C. R. HAY E M. ZUZEL. 1994. INEFFECTIVENESS OF THE INHIBITION OF THE MAIN HAEMORRHAGIC METALLOPROTEINASE FROM *BOTHROPS JARARACA* VENOM BY ITS ONLY PLASMA INHIBITOR, ALPHA 2-MACROGLOBULIN. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 1200:307-314.
- KELLY, S. M., T. J. JESS E N. C. PRICE. 2005. HOW TO STUDY PROTEINS BY CIRCULAR DICHROISM. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 1751:119-139.

- KINI, R.M. e H.J. EVANS. 1989. A MODEL TO EXPLAIN THE PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF SNAKE VENOM PHOSPHOLIPASES A_2 . *TOXICON* 27:613-635.
- KINI, R.M. 2003. EXCITEMENT AHEAD: STRUCTURE, FUNCTION AND MECHANISM OF SNAKE VENOM PHOSPHOLIPASE A_2 ENZYMES. *TOXICON* 42:827-840.
- KOCHVA, E., O. NAKAR e M. OVADIA. 1983. VENOM TOXINS: PLAUSIBLE EVOLUTION FROM DIGESTIVE ENZYMES. *AMER. ZOOLOG* 23:427-430.
- LAEMMLI, U. K. 1970. CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING THE ASSEMBLY OF THE HEAD OF BACTERIOPHAGE T4. *NATURE* 227:680-685.
- LEÓN, I. R. 2008. CARACTERIZAÇÃO DA N-GLICOSILAÇÃO DE DM43 e DM64 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ANÁLISE DA SUA CONTRIBUIÇÃO PARA A TIVIDADE ANTIOFÍDICA DESTAS PROTEÍNAS. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, IOC - FIOCRUZ.
- LIZANO, S., G.B. DOMONT e J. PERALES. 2003. NATURAL PHOSPHOLIPASE A(2) MYOTOXIN INHIBITOR PROTEINS FROM SNAKES, MAMMALS AND PLANTS. *TOXICON* 42:963-977.
- LIZANO, S., Y. ANGULO, B. LOMONTE, J.W. FOX, G. LAMBEAU, M. LAZDUNSKI e J.M. GUTIÉRREZ. 2000. TWO PHOSPHOLIPASE A_2 INHIBITORS FROM THE PLASMA OF *CERROPHIDION (BOTHROPS) GODMANI* WHICH SELECTIVELY INHIBIT TWO DIFFERENT GROUP-II PHOSPHOLIPASE A_2 MYOTOXINS FROM ITS OWN VENOM: ISOLATION, MOLECULAR CLONING AND BIOLOGICAL PROPERTIES. *BIOCHEM. J.* 346:631-639.
- LIZANO, S., B. LOMONTE, J.W. FOX e J.M. GUTIÉRREZ. 1997. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF A PHOSPHOLIPASE A_2 MYOTOXIN INHIBITOR FROM THE PLASMA OF THE SNAKE *BOTHROPS ASPER*. *BIOCHEM. J.* 326:853-859.
- LOMONTE, B., Y. ANGULO e L. CALDERON. 2003. AN OVERVIEW OF LYSINE-49 PHOSPHOLIPASE A_2 MYOTOXINS FROM CROTALID SNAKE VENOMS AND THEIR STRUCTURAL DETERMINANTS OF MYOTOXIC ACTION. *TOXICON* 42:885-901.
- LOMONTE, B., J.M. GUTIÉRREZ, M. RAMÍREZ e C. DÍAZ. 1992. NEUTRALIZATION OF MYOTOXIC PHOSPHOLIPASES A_2 FROM THE VENOM OF THE SNAKE *BOTHROPS ASPER* BY MONOCLONAL ANTIBODIES. *TOXICON* 30:239-245.
- MARKLAND, F. S. 1998. SNAKE VENOMS AND THE HEMOSTATIC SYSTEM. *TOXICON* 36:1749-1800.
- MARSH, N. 1994. INVENTORY OF HAEMORRHAGIC FACTORS FROM SNAKE VENOMS. REGISTRY OF EXOGENOUS HEMOSTATIC FACTORS. SCIENTIFIC AND STANDARDISATION COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS. *THROMB HAEMOST* 71:793-797.
- MARSTON, F.A.O. 1986. THE PURIFICATION OF EUKARYOTIC POLYPEPTIDES SYNTHESIZED IN *ESCHERICHIA COLI*. *BIOCHEM. J.* 240:1-12.
- MARTIN, J. L. 1995. THIOREDOXIN--A FOLD FOR ALL REASONS. *STRUCTURE* 3:245-250.
- McGUFFIN, L. J., K. BRYSON e D. T. JONES. 2000. THE PSIPRED PROTEIN STRUCTURE PREDICTION SERVER. *BIOINFORMATICS* 16:404-405.

- MEBS, D., T. OMORI-SATOH, Y. YAMAKAWA E Y. NAGAOKA. 1996. ERINACIN, AN ANTIHAEMORRHAGIC FACTOR FROM THE EUROPEAN HEDGEHOG, *ERINACEUS EUROPAEUS*. *TOXICON* 34:1313-1316.
- MORELLE, W., K. CANIS, F. CHIRAT, V. FAID E J. C. MICHALSKI. 2006. THE USE OF MASS SPECTROMETRY FOR THE PROTEOMIC ANALYSIS OF GLYCOSYLATION. *PROTEOMICS* 6:3993-4015.
- NAKAGAWA, N., R. MASUI, R. KATO E S. KURAMITSU. 1997. DOMAIN STRUCTURE OF THERMUS THERMOPHILUS UvrB PROTEIN. SIMILARITY IN DOMAIN STRUCTURE TO A HELICASE. *J BIOL CHEM* 272:22703-22713.
- NEVES-FERREIRA, A.G.C., N. CARDINALE, S.L.G. ROCHA, J. PERALES E G.B. DOMONT. 2000. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DM40 AND DM43, TWO SNAKE VENOM METALLOPROTEINASE INHIBITORS FROM *DIDELPHIS MARSUPIALIS* SERUM. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 1474:309-320.
- NEVES-FERREIRA, A.G.C., J. PERALES, J.W. FOX, J.D. SHANNON, D.L. MAKINO, R.C. GARRATT E G.B. DOMONT. 2002. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSES OF DM43, A SNAKE VENOM METALLOPROTEINASE INHIBITOR FROM *DIDELPHIS MARSUPIALIS* SERUM. *J. BIOL. CHEM.* 277:13129-13137.
- NEVES-FERREIRA, A.G.C., R.H. VALENTE, J. PERALES E G.B. DOMONT. 2008. NATURAL INHIBITORS: INNATE IMMUNITY TO SNAKE VENOMS. IN *REPTILE VENOMS AND TOXINS* ED. S.P. MACKESSY, *IN PRESS*. NEW YORK: TAYLOR & FRANCIS / CRC PRESS
- NEVES-FERREIRA, A.G.C., J. PERALES, M. OVADIA, H. MOUSSATCHÉ E G.B. DOMONT. 1997. INHIBITORY PROPERTIES OF THE ANTIBIOTIC COMPLEX FROM THE SOUTH AMERICAN OPOSSUM (*DIDELPHIS MARSUPIALIS*) SERUM. *TOXICON* 35:849-863.
- NOBUHISA, I., T. CHIWATA, Y. FUKUMAKI, S. HATTORI, Y. SHIMOHIGASHI E M. OHNO. 1998. STRUCTURAL ELEMENTS OF *TRIMERESURUS FLAVOVIDIS* SERUM INHIBITORS FOR RECOGNITION OF ITS VENOM PHOSPHOLIPASE A₂ ISOZYMES. *FEBS LETT.* 429:385-389.
- ODELL, G. V., P. C. FERRY, L. M. VICK, A. W. FENTON, L. S. DECKER, R. L. COWELL, C. L. OWNBY E J. M. GUTIERREZ. 1998. CITRATE INHIBITION OF SNAKE VENOM PROTEASES. *TOXICON* 36:1801-1806.
- OHKURA, N., S. INOUE, K. IKEDA E K. HAYASHI. 1994. THE TWO SUBUNITS OF A PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITOR FROM THE PLASMA OF THAILAND COBRA HAVING STRUCTURAL SIMILARITY TO UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR RECEPTOR AND LY-6 RELATED PROTEINS. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN* 204:1212-1218.
- OHKURA, N., Y. KITAHARA, S. INOUE, K. IKEDA E K. HAYASHI. 1999. ISOLATION AND AMINO ACID SEQUENCE OF A PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITOR FROM THE BLOOD PLASMA OF THE SEA KRAIT, *LATICAUDA SEMIFASCIATA*. *J. BIOCHEM. (TOKYO)* 125:375-382.
- OHKURA, N., H. OKUHARA, S. INOUE, K. IKEDA E K. HAYASHI. 1997. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THREE DISTINCT TYPES OF PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITORS FROM THE BLOOD PLASMA OF THE CHINESE MAMUSHI, *AGKISTRODON BLOMHOFFII SINITICUS*. *BIOCHEM. J.* 325:527-531.
- OKUMURA, K., A. OHNO, M. NISHIDA, K. HAYASHI, K. IKEDA E S. INOUE. 2005. MAPPING THE REGION OF THE ALPHA-TYPE PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITOR RESPONSIBLE FOR ITS INHIBITORY ACTIVITY. *J. BIOL. CHEM.* 280:37651-37659.

- OKUMURA, K., S. INOUE, K. IKEDA E K. HAYASHI. 1999. cDNA CLONING AND BACTERIAL EXPRESSION OF PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITOR PLI α FROM THE SERUM OF THE CHINESE MAMUSHI, *AGKISTRODON BLOMHOFFII SINITICUS*. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 1441:51-60.
- OMORI-SATO, T., S. SADAHIRO, A. OHSAKA E R. MURATA. 1972. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIHEMORRHAGIC FACTOR IN THE SERUM OF *TRIMERESURUS FLAVOVIRIDIS*, A CROTALID. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 285:414-426.
- OMORI-SATO, T., Y. YAMAKAWA E D. MEBS. 2000. THE ANTIHEMORRHAGIC FACTOR, ERINACIN, FROM THE EUROPEAN HEDGEHOG (*ERINACEUS EUROPAEUS*), A METALLOPROTEASE INHIBITOR OF LARGE MOLECULAR SIZE POSSESSING FICOLIN/OPSONIN P35 LECTIN DOMAINS. *TOXICON* 38:1561-1580.
- OWNBY, C. L., H. S. SELISTRE DE ARAUJO, S. P. WHITE E J. E. FLETCHER. 1999. LYSINE 49 PHOSPHOLIPASE A₂ PROTEINS. *TOXICON* 37:411-445.
- PAINE, M. J., H. P. DESMOND, R. D. THEAKSTON E J. M. CRAMPTON. 1992. PURIFICATION, CLONING, AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A HIGH MOLECULAR WEIGHT HEMORRHAGIC METALLOPROTEASE, JARARHAGIN, FROM *BOTHROPS JARARACA* VENOM. INSIGHTS INTO THE DISINTEGRIN GENE FAMILY. *J. BIOL. CHEM.* 267:22869-22876.
- PERALES, J., R. MUNOS, S. GRATEROL, O. OVIEDO E H. MOUSSATCHE. 1989. NEW FINDINGS ON THE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTI- BOTHROPIC FACTOR FROM *DIDELPHIS MARSUPIALIS* (OPOSSUM) SERUM. *BRAZ J MED BIOL RES* 22:25-28.
- PERALES, J., A.G.C. NEVES-FERREIRA, R.H. VALENTE E G.B. DOMONT. 2005. NATURAL INHIBITORS OF SNAKE VENOM HEMORRHAGIC METALLOPROTEINASES. *TOXICON* 45:1013-1020.
- PERALES, J. E G.B. DOMONT. 2002. ARE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES, PHOSPHOLIPASES A₂ AND MYOTOXINS MEMBERS OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM ? IN *PERSPECTIVES IN MOLECULAR TOXINOLOGY* ED. A. MÉNEZ, 435-456. CHICHESTER: JOHN WILEY & SONS, LTD.
- PERALES, J., C. VILLELA, G.B. DOMONT, V. CHOUMET, B. SALIOU, H. MOUSSATCHE, C. BON E G. FAURE. 1995. MOLECULAR STRUCTURE AND MECHANISM OF ACTION OF THE CROTOXIN INHIBITOR FROM *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* SERUM. *EUR. J. BIOCHEM.* 227:19-26.
- PERALES, J., C.Z. AMORIM, S.L. ROCHA, G.B. DOMONT E H. MOUSSATCHE. 1992. NEUTRALIZATION OF THE OEDEMATOGENIC ACTIVITY OF *BOTHROPS JARARACA* VENOM ON THE MOUSE PAW BY AN ANTIBOTHROPIC FRACTION ISOLATED FROM OPOSSUM (*DIDELPHIS MARSUPIALIS*) SERUM. *AGENTS ACTIONS* 37:250-259.
- PHISALIX, M. 1922. IMMUNITÉ CONTRE LE VENIN. IN *ANIMAUX VENIMEUX ET VENINS* ED. MASSON, 744-759
- PHISALIX, M. E G. BERTRAND. 1894. SUR LA PROPRIÉTÉ ANTITOXIQUE DU SANG DES ANIMAUX VACCINÉS CONTRE LE VENIN DE VIPÈRE. *C.R. Soc. Biol.* 111-115.
- QI, Z.Q., K. YONAH, Y. TOMIHARA E S. TOYAMA. 1995. ISOLATION OF PEPTIDES HOMOLOGOUS TO DOMAINS OF HUMAN ALPHA 1B-GLYCOPROTEIN FROM A MONGOOSE ANTIHEMORRHAGIC FACTOR. *TOXICON* 33:241-245.
- QI, Z.Q., K. YONAH, Y. TOMIHARA E S. TOYAMA. 1994. CHARACTERIZATION OF THE ANTIHEMORRHAGIC FACTORS OF MONGOOSE (*HERPESTES EDWARDSII*). *TOXICON* 32:1459-1469.

- QUIROS, S., A. ALAPE-GIRON, Y. ANGULO E B. LOMONTE. 2007. ISOLATION, CHARACTERIZATION AND MOLECULAR CLONING OF AnMIP, A NEW ALPHA-TYPE PHOSPHOLIPASE A₂ MYOTOXIN INHIBITOR FROM THE PLASMA OF THE SNAKE ATROPOIDES NUMMIFER (VIPERIDAE: CROTALINAE). *COMP BIOCHEM PHYSIOL B BIOCHEM MOL BIOL* 146:60-68.
- RIVIERE, G., V. CHOUMET, F. AUDEBERT, A. SABOURAUD, M. DEBRAY, J. M. SCHERRMANN E C. BON. 1997. EFFECT OF ANTIVENOM ON VENOM PHARMACOKINETICS IN EXPERIMENTALLY ENVENOMED RABBITS: TOWARD AN OPTIMIZATION OF ANTIVENOM THERAPY. *J PHARMACOL EXP THER* 281:1-8.
- ROCHA, S. L., V. S. FRUTUOSO, G. B. DOMONT, M. A. MARTINS, H. MOUSSATCHÉ E J. PERALES. 2000. INHIBITION OF THE HYPERALGESIC ACTIVITY OF *BOTHROPS JARARACA* VENOM BY AN ANTIBOTHROPIC FRACTION ISOLATED FROM OPOSSUM (*DIDELPHIS MARSUPIALIS*) SERUM. *TOXICON* 38:875-880.
- ROCHA, S.L., B. LOMONTE, A.G.C. NEVES-FERREIRA, M.R.O. TRUGILHO, I.L. JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, P.L. HO, G.B. DOMONT, J.M. GUTIÉRREZ E J. PERALES. 2002. FUNCTIONAL ANALYSIS OF DM64, AN ANTIMYOTOXIC PROTEIN WITH IMMUNOGLOBULIN-LIKE STRUCTURE FROM *DIDELPHIS MARSUPIALIS* SERUM. *EUR. J. BIOCHEM.* 269:6052-6062.
- ROSENBERG, P. 1992. EFFECTS OF PHOSPHOLIPASE A₂ NEUROTOXINS AND ENZYMES ON STRUCTURE AND FUNCTION OF RAT BRAIN SYNAPTOSOMES. *RECENT ADVANCES IN TOXINOLOGY RESEARCH* 1:71-102.
- RUDOLPH, R. E H. LILIE. 1996. IN VITRO FOLDING OF INCLUSION BODY PROTEINS. *FASEB J* 10:49-56.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH E T. MANIATIS 1989. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. NEW YORK: COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, P.
- SANGER, F., S. NICKLEN E A. R. COULSON. 1977. DNA SEQUENCING WITH CHAIN-TERMINATING INHIBITORS. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 74:5463-5467.
- SCHÄGGER, H. E G. VON JAGOW. 1987. TRICINE-SODIUM DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS FOR THE SEPARATION OF PROTEINS IN THE RANGE FROM 1 TO 100 kDa. *ANAL. BIOCHEM.* 166:368-379.
- SCHALOSKE, R.H. E E.A. DENNIS. 2006. THE PHOSPHOLIPASE A₂ SUPERFAMILY AND ITS GROUP NUMBERING SYSTEM. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 1761:1246-1259.
- SCHWARTZ, T., K. LOWENHAUPT, Y. G. KIM, L. LI, B. A. BROWN, 2ND, A. HERBERT E A. RICH. 1999. PROTEOLYTIC DISSECTION OF ZAB, THE Z-DNA-BINDING DOMAIN OF HUMAN ADAR1. *J BIOL CHEM* 274:2899-2906.
- SELISTRE DE ARAUJO, H. S., D. H. DE SOUZA E C. L. OWNBY. 1997. ANALYSIS OF A cDNA SEQUENCE ENCODING A NOVEL MEMBER OF THE SNAKE VENOM METALLOPROTEINASE, DISINTEGRIN-LIKE, CYSTEINE-RICH (MDC) PROTEIN FAMILY FROM *AGKISTRODON CONTORTRIX* LATICINCTUS. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 1342:109-115.
- SELVANAYAGAM, Z. E. E P. GOPALAKRISHNAKONE. 1999. TESTS FOR DETECTION OF SNAKE VENOMS, TOXINS AND VENOM ANTIBODIES: REVIEW ON RECENT TRENDS (1987-1997). *TOXICON* 37:565-586.
- SHEVCHENKO, A., M. WILM, O. VORM E M. MANN. 1996. MASS SPECTROMETRIC SEQUENCING OF PROTEINS SILVER-STAINED POLYACRYLAMIDE GELS. *ANAL. CHEM.* 68:850-858.
- SILVA-JÚNIOR, JOSÉ GODINHO DA 2004. CROMATOGRAFIA DE PROTEÍNAS: GUIA TEÓRICO E PRÁTICO. RIO DE JANEIRO: EDITORA INTERCIÊNCIA, P.

- SINGH, S. M. E A. K. PANDA. 2005. SOLUBILIZATION AND REFOLDING OF BACTERIAL INCLUSION BODY PROTEINS. *J BIOSCI BIOENG* 99:303-310.
- SIX, D.A. E E.A. DENNIS. 2000. THE EXPANDING SUPERFAMILY OF PHOSPHOLIPASE A_2 ENZYMES: CLASSIFICATION AND CHARACTERIZATION. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 1488:1-19.
- SMITH, P. K., R. I. KROHN, G. T. HERMANSON, A. K. MALLIA, F. H. GARTNER, M. D. PROVENZANO, E. K. FUJIMOTO, N. M. GROEKE, B. J. OLSON E D. C. KLENK. 1985. MEASUREMENT OF PROTEIN USING BICINCHONINIC ACID. *ANAL. BIOCHEM.* 150:76-85.
- SOARES, A.M., S. MARCUSSI, R.G. STÁBELI, S.C. FRANÇA, J.R. GIGLIO, R.J. WARD E E.C. ARANTES. 2003. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF BmjMIP, A PHOSPHOLIPASE A_2 MYOTOXIN INHIBITOR PROTEIN FROM *BOTHROPS MOOJENI* SNAKE PLASMA. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* 302:193-200.
- SOMERS, W., M. ULTSCH, A.M. DE VOS E A.A. KOSSIAKOFF. 1994. THE X-RAY STRUCTURE OF A GROWTH HORMONE-PROLACTIN RECEPTOR COMPLEX. *NATURE* 372:478-481.
- THWIN, M.M. E P. GOPALAKRISHNAKONE. 1998. SNAKE ENVENOMATION AND PROTECTIVE NATURAL ENDOGENOUS PROTEINS: A MINI REVIEW OF THE RECENT DEVELOPMENTS (1991-1997). *TOXICON* 36:1471-1482.
- TOMARELLI, R. M., J. CHARNEY E M. L. HARDING. 1949. THE USE OF AZOALBUMIN AS A SUBSTRATE IN THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PEPTIC AND TRYPTIC ACTIVITY. *J LAB CLIN MED* 34:428-433.
- TRUGILHO, M. R. O. 2004. CLONAGEM MOLECULAR DE PROTEÍNAS COM ATIVIDADE ANTIOFÓDICA DO GAMBÁ *DIDELPHIS MARSUPIALIS*. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, IOC - FIOCRUZ.
- TU, A. T. 1996. OVERVIEW OF SNAKE VENOM CHEMISTRY. IN *NATURAL TOXINS II* ED. B. R. SINGH AND A. T. TU, NEW YORK: PLENUM PRESS
- UDBY, L., O.E. SORENSEN, J. PASS, A.H. JOHNSEN, N. BEHRENDT, N. BORREGAARD E L. KJELDEN. 2004. CYSTEINE-RICH SECRETORY PROTEIN 3 IS A LIGAND OF ALPHA1B-GLYCOPROTEIN IN HUMAN PLASMA. *BIOCHEMISTRY* 43:12877-12886.
- USAMI, Y., Y. FUJIMURA, S. MIURA, H. SHIMA, E. YOSHIDA, A. YOSHIOKA, K. HIRANO, M. SUZUKI E K. TITANI. 1994. A 28 kDa-PROTEIN WITH DISINTEGRIN-LIKE STRUCTURE (JARARHAGIN-C) PURIFIED FROM *BOTHROPS JARARACA* VENOM INHIBITS COLLAGEN- AND ADP-INDUCED PLATELET AGGREGATION. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* 201:331-339.
- VALENTE, R.H., B. DRAGULEV, J. PERALES, J.W. FOX E G.B. DOMONT. 2001. BJ46A, A SNAKE VENOM METALLOPROTEINASE INHIBITOR. ISOLATION, CHARACTERIZATION, CLONING AND INSIGHTS INTO ITS MECHANISM OF ACTION. *EUR. J. BIOCHEM.* 268:3042-3052.
- VALENTE, R.H., A.G.C. NEVES-FERREIRA, E.R. CAFFARENA, G.B. DOMONT E J. PERALES. 2008. SNAKE VENOM METALLOPROTEINASE INHIBITORS (SVMPIs): AN OVERVIEW AND FUTURE PERSPECTIVES. IN *ANIMAL TOXINS: STATE OF THE ART. PERSPECTIVES ON HEALTH AND BIOTECHNOLOGY* ED. M.E. LIMA, A.M.C. PIMENTA, M.F. MARTIN-EAUCCLAIRE AND R. ZINGALI, NO PRELO. BELO HORIZONTE: EDITORA UFMG
- VALIANTE, N.M., K. LIENERT, H.G. SHILLING, B.J. SMITS E P. PARHAM. 1997. KILLER CELL RECEPTORS: KEEPING PACE WITH MHC CLASS I EVOLUTION. *IMMUNOL. REV.* 155:155-164.
- VALLEJO, L. F. E U. RINAS. 2004. STRATEGIES FOR THE RECOVERY OF ACTIVE PROTEINS THROUGH REFOLDING OF BACTERIAL INCLUSION BODY PROTEINS. *MICROB CELL FACT* 3:11.

- VARKI, A. 1993. BIOLOGICAL ROLES OF OLIGOSACCHARIDES: ALL OF THE THEORIES ARE CORRECT. *GLYCOBIOLOGY* 3:97-130.
- WARRELL, D. A. E P.J. FENNER. 1993. VENOMOUS BITES AND STINGS. IN *BRITISH MEDICAL BULLET* ED. 423-439.
- WHITMORE, L. E B. A. WALLACE. 2008. PROTEIN SECONDARY STRUCTURE ANALYSES FROM CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY: METHODS AND REFERENCE DATABASES. *BIOPOLYMERS* 89:392-400.
- WILKINSON, D. L. E R. G. HARRISON. 1991. PREDICTING THE SOLUBILITY OF RECOMBINANT PROTEINS IN *ESCHERICHIA COLI*. *BIOTECHNOLOGY (N Y)* 9:443-448.
- YAMAKAWA, Y. E T. OMORI-SATOH. 1992. PRIMARY STRUCTURE OF THE ANTIHEMORRHAGIC FACTOR IN SERUM OF THE JAPANESE HABU: A SNAKE VENOM METALLOPROTEINASE INHIBITOR WITH A DOUBLE- HEADED CYSTATIN DOMAIN. *J. BIOCHEM.* 112:583-589.
- YASUKAWA, T., C. KANEI-ISHII, T. MAEKAWA, J. FUJIMOTO, T. YAMAMOTO E S. ISHII. 1995. INCREASE OF SOLUBILITY OF FOREIGN PROTEINS IN *ESCHERICHIA COLI* BY COPRODUCTION OF THE BACTERIAL THIOREDIXIN. *J BIOL CHEM* 270:25328-25331.

CAPÍTULO VI.
ANEXOS

Anexo 1, Figura 32: Eletroferogramas representativos do sequenciamento automático dos clones obtidos no vetor pET101. A = seqüência complementar reversa da região codificante para o domínio 1 de DM43 no pET101 obtida com iniciador T7R; B= seqüência da região codificante para o domínio 2 de DM43 no pET101 obtida com iniciador T7F; C= seqüência da região codificante para o domínio 3 de DM43 no pET101 obtida com iniciador T7F. Nas seqüências correspondentes à região do vetor pET101, o códon de iniciação está sublinhado.

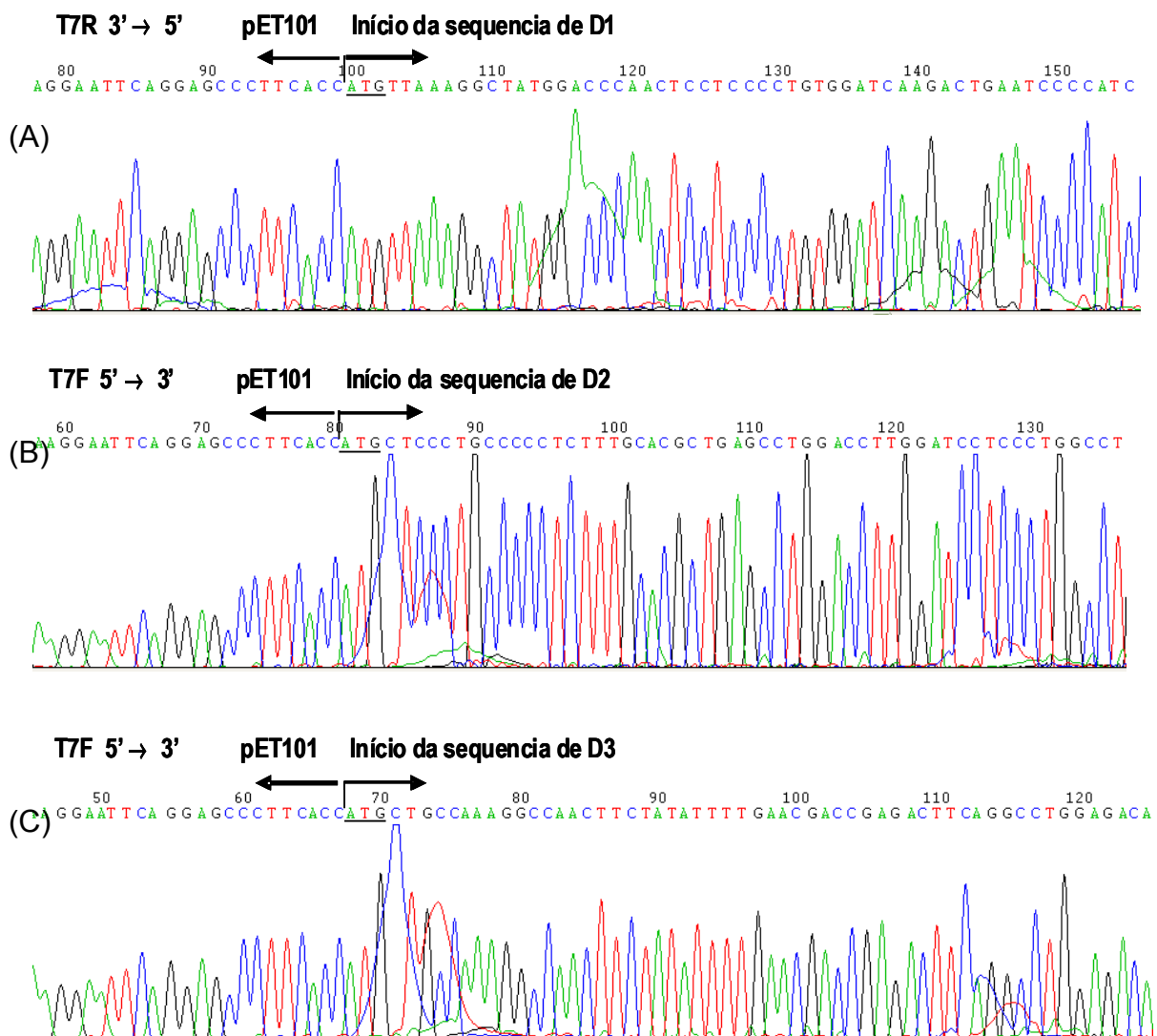


Figura 33: Eletroferogramas representativos do sequenciamento automático dos clones obtidos no vetor pET102. D= seqüência da região codificante para o domínio 1 de DM43 no pET102 obtida com o iniciador T7F; E=; seqüência da região codificante para o domínio 2 de DM43 no pET102 obtida com o iniciador T7F; F= seqüência complementar reversa da região codificante para o domínio 3 de DM43 no pET102 obtida com o iniciador T7R; G= seqüência da região codificante para DM43 completa (*Full*) no pET102 obtida com o iniciador T7F.

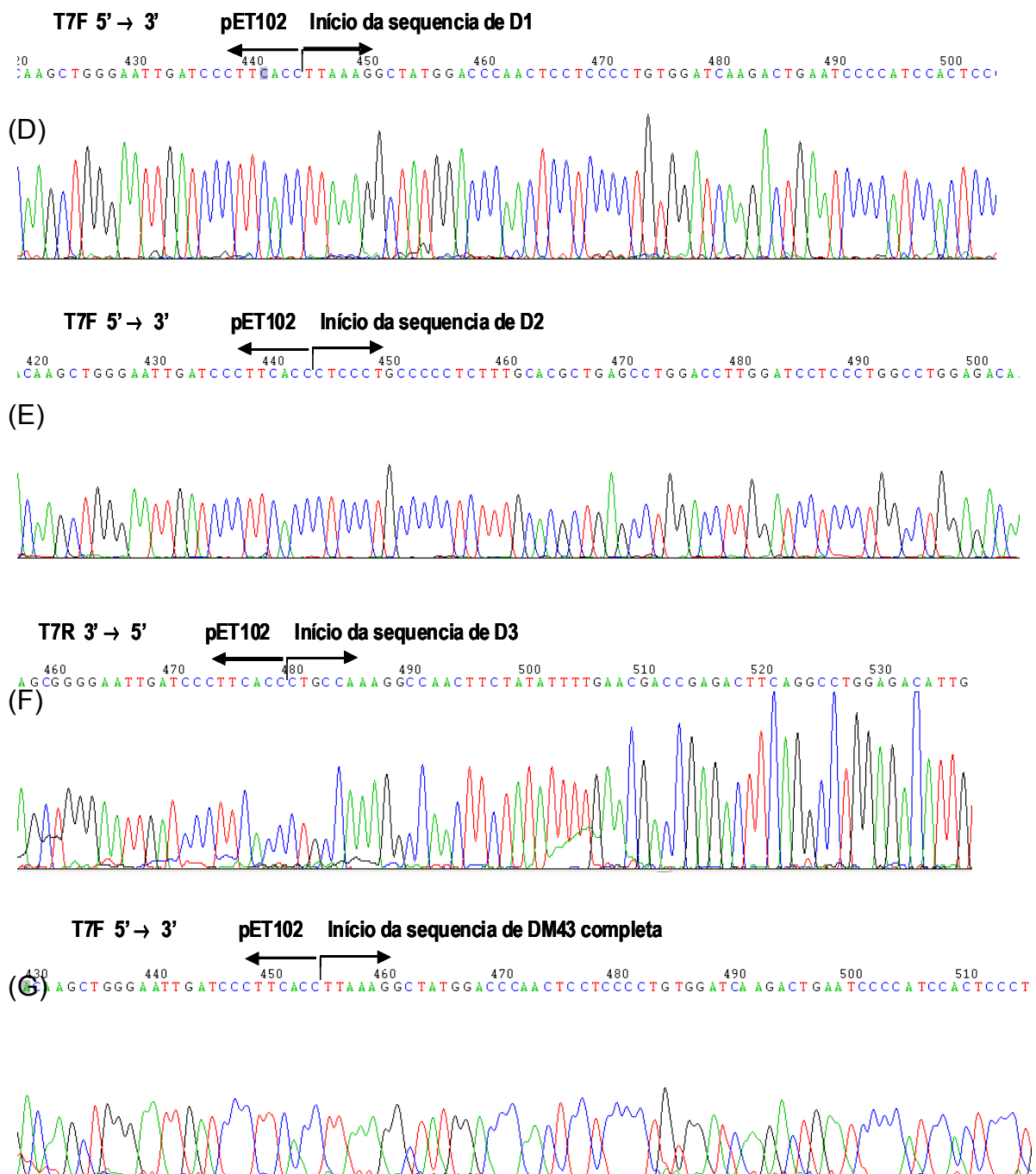


Figura 35: Resultados obtidos com o programa PSIPRED para a predição de estrutura secundária da proteína recombinante thioD2. A seta vermelha indica o início da sequência de D2.

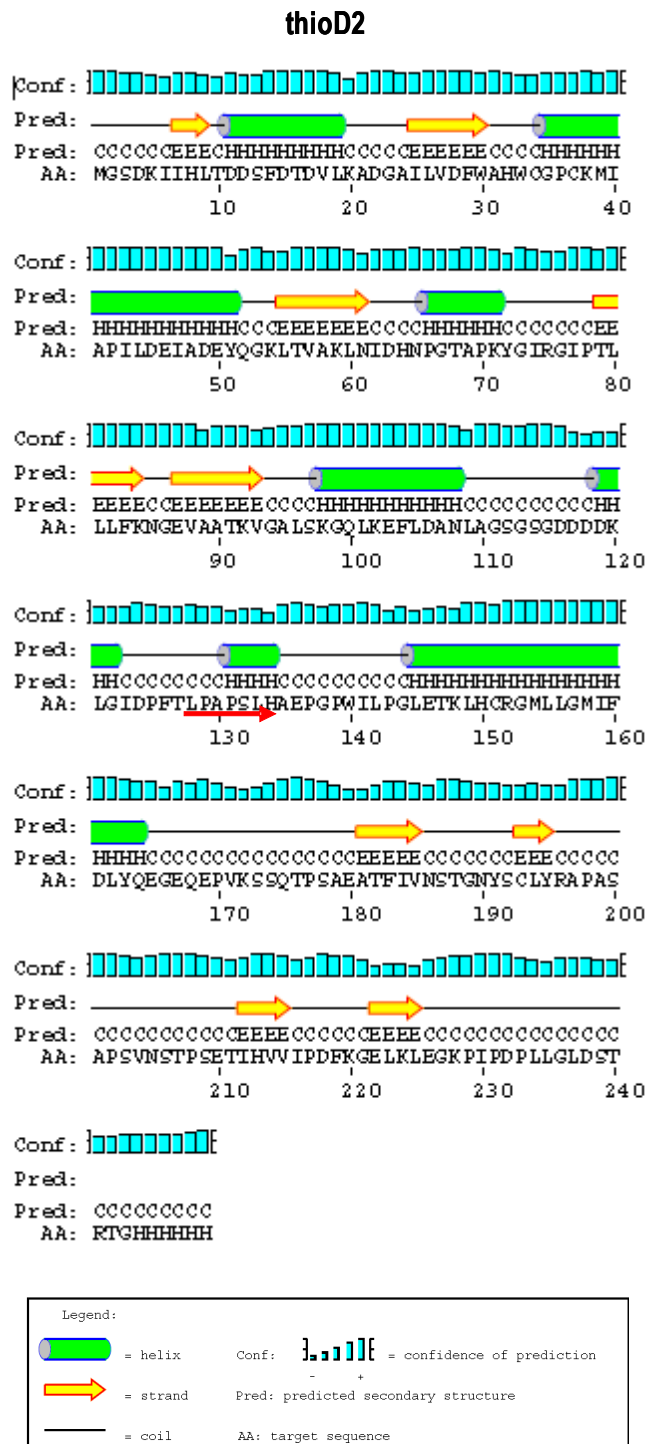


Figura 36: Resultados obtidos com o programa PSIPRED para a predição de estrutura secundária da proteína recombinante thioD3. A seta vermelha indica o início da sequência de D3.

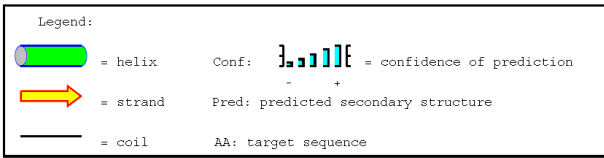
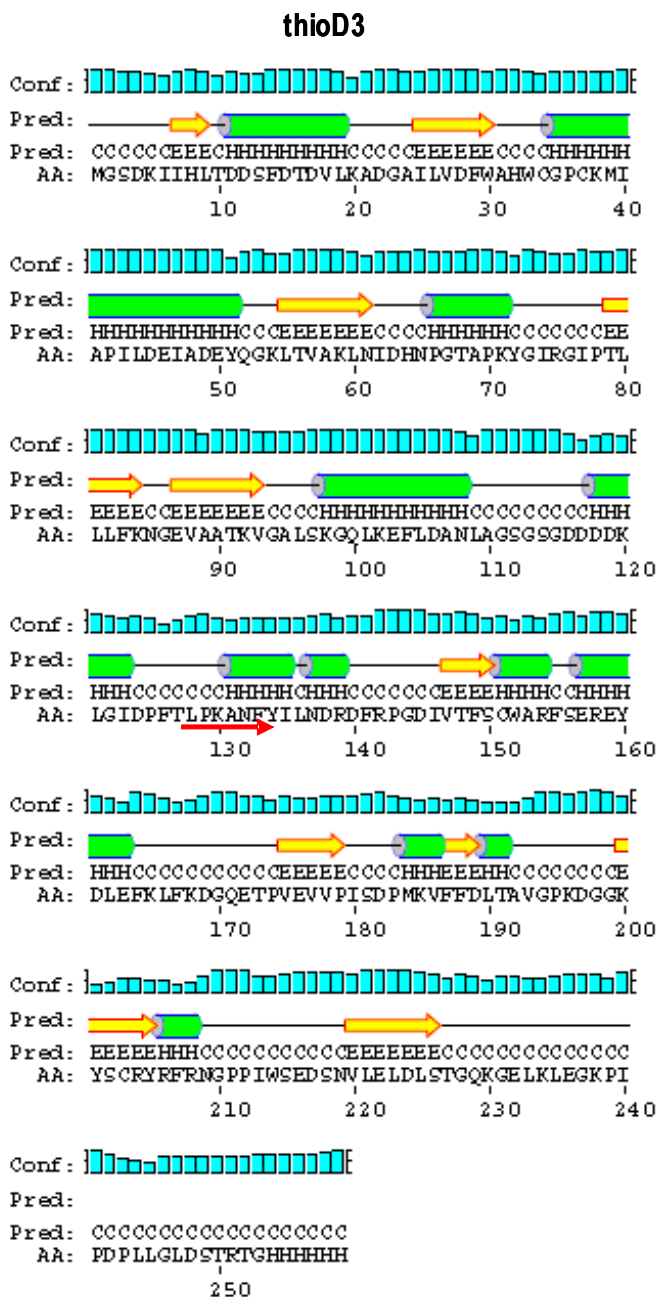


Figura 37: Resultados obtidos com o programa PSIPRED para a predição de estrutura secundária da proteína recombinante D3.

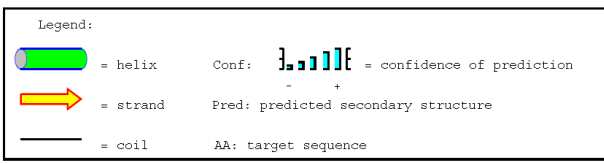


Figura 38: Sequenciamento por MS/MS do peptídeo do primeiro domínio de DM43 que interagiu com a jararagina por cromatografia em coluna *Superdex Peptide*.

Sequência: ⁴³DGELLSTLPVGLVGK⁵⁸

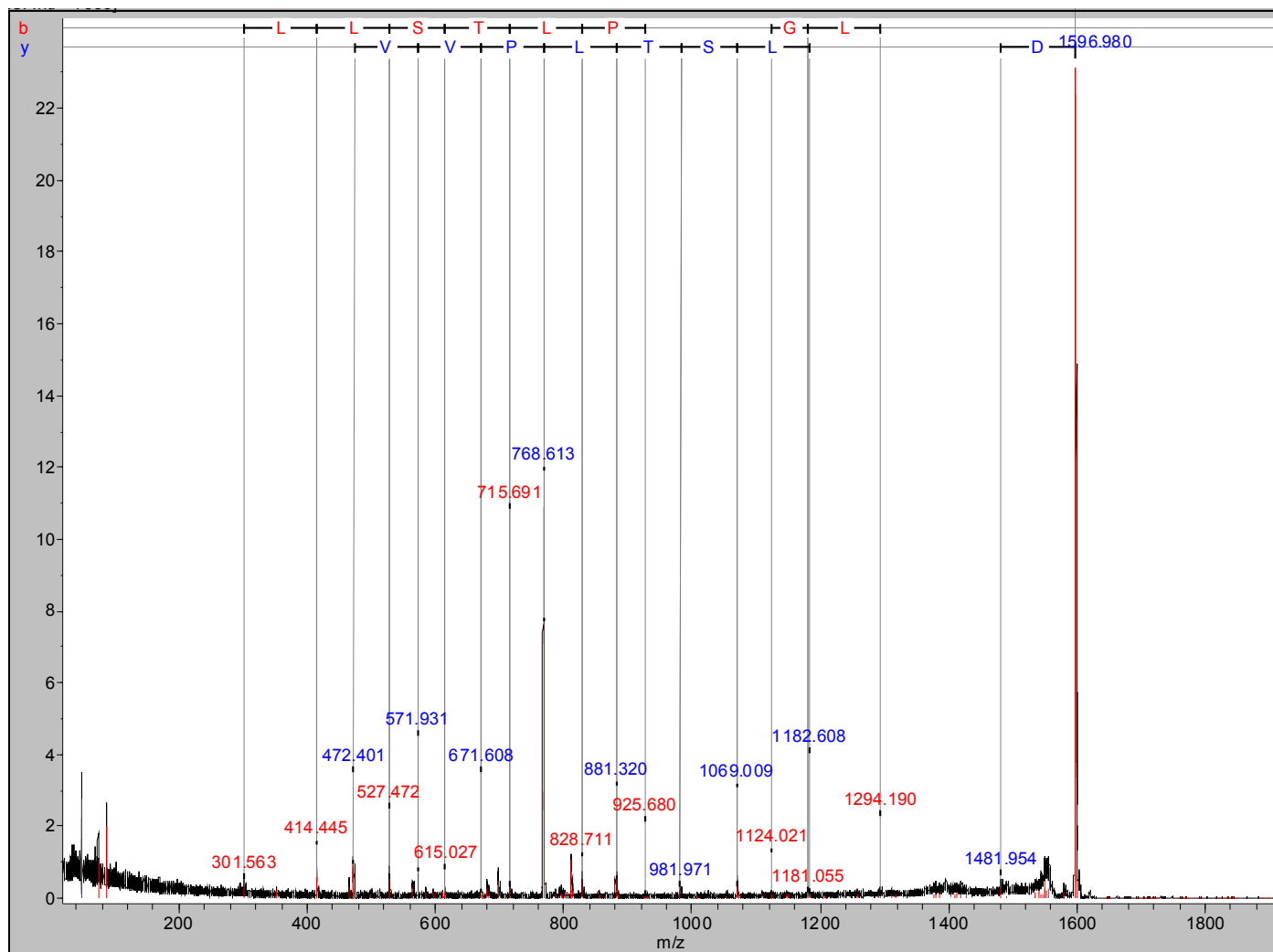


Figura 39: Sequenciamento por MS/MS do peptídeo do segundo domínio de DM43 que interagiu com a jararagina por cromatografia em coluna *Superdex Peptide*.

Sequência: ⁹⁶EPLPAPSLHAEPGPWILPGL¹¹⁸

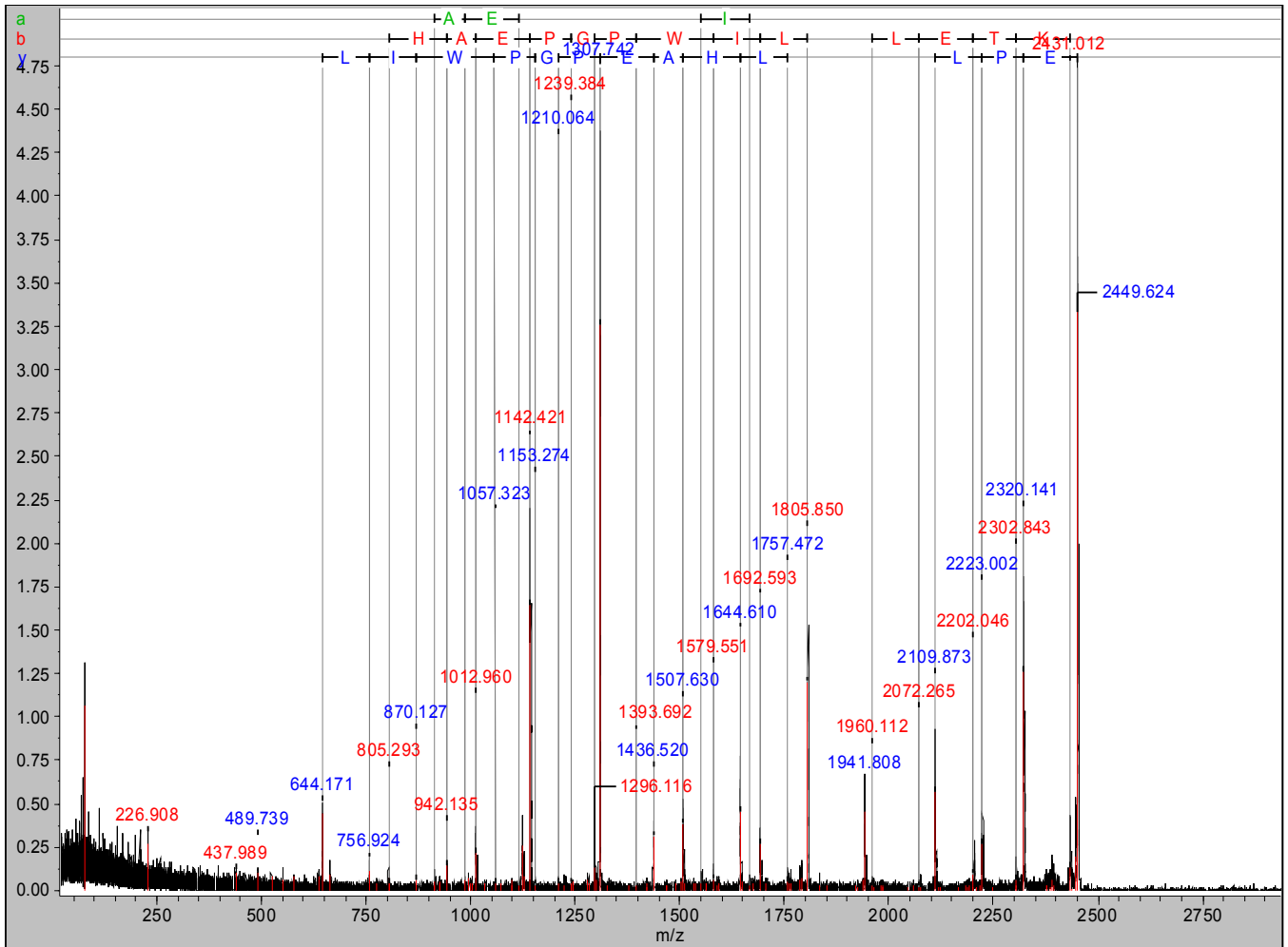
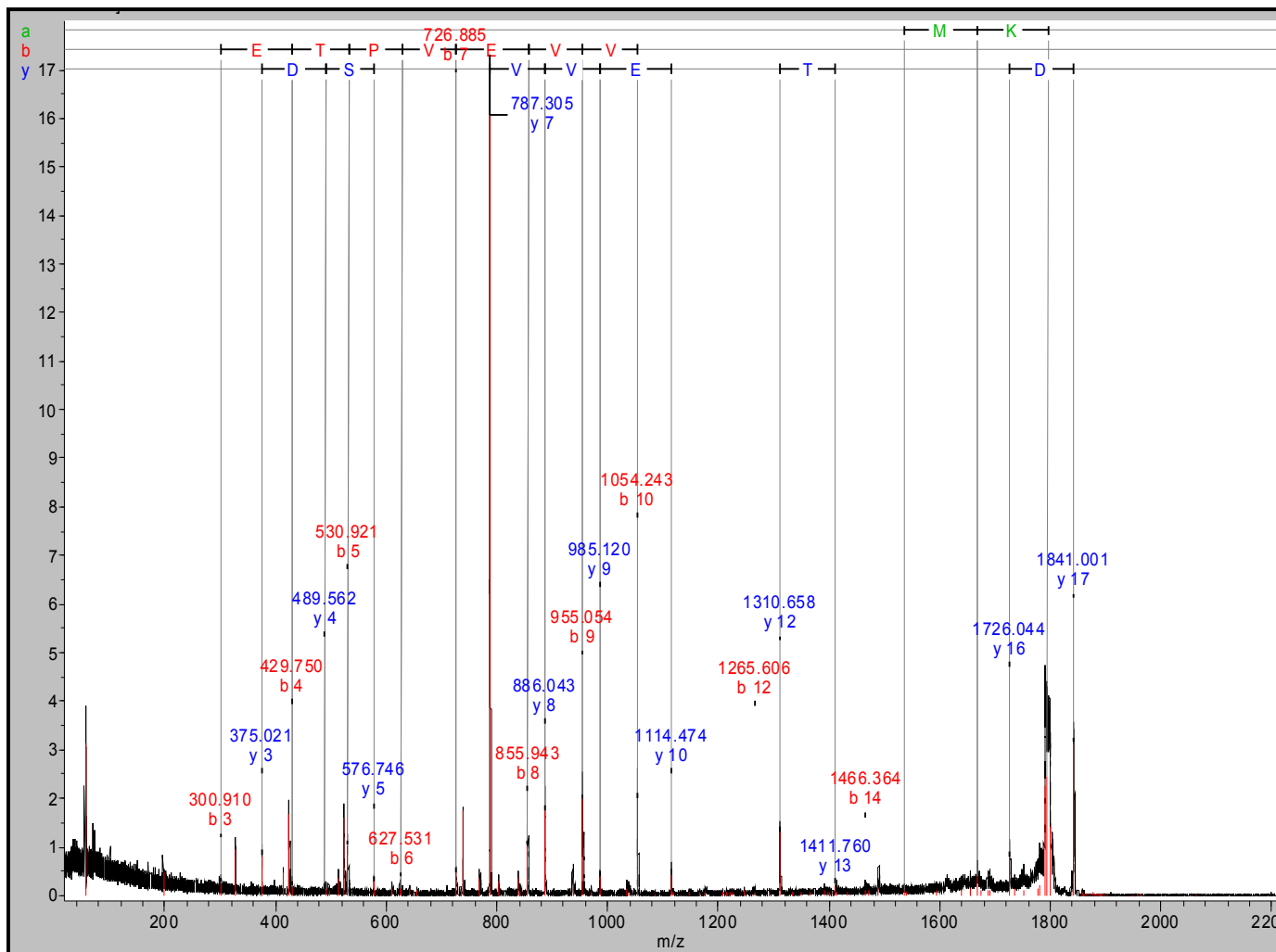


Figura 40: Sequenciamento por MS/MS do peptídeo do terceiro domínio de DM43 que interagiu com a jararagina por cromatografia em coluna *Superdex Peptide*.

Sequência: $^{241}\text{DGQETPVEVVPISDPMK}^{257}$



Anexo 2: Artigos gerados durante a tese onde a doutoranda teve participação ativa como responsável pela Bioinformática.

Submetido à revista *Journal of Proteome Research*:

**Two-dimensional difference gel electrophoresis (DiGE)
analysis of plasmas from severe dengue fever patients**

Lidiane M. Albuquerque,^{†,#} Monique R. O. Trugilho,^{†,#} Alex Chapeaurouge,^{†,#} Patrícia B. Jurgilas,^{†,#} Patrícia T. Bozza,[‡] Fernando A. Bozza,[§] Jonas Perales,^{†,#} and Ana G.C. Neves-Ferreira,^{*,†,#}

Lab. Toxinologia and Lab. Imunofarmacologia, Pavilhão Ozório de Almeida, Instituto Oswaldo Cruz and Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil; Rede Proteômica do Rio de Janeiro.

*TO WHOM CORRESPONDENCE SHOULD BE ADDRESSED. PHONE: +55-21-2598-4393 EXT. 233. FAX: +55-21-2590-9490. EMAIL: ANAG@IOC.FIOCRUZ.BR.

[†]LAB. TOXINOLOGIA, FIOCRUZ.

[‡]LAB. IMUNOFARMACOLOGIA, FIOCRUZ.

[§]Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz.

[#]Rede Proteômica do Rio de Janeiro.

Running title: Proteomic analysis of plasmas from dengue fever patients

Abstract

Dengue fever is the world's most important arthropod-borne viral disease affecting humans. In order to contribute to a better understanding of its pathogenesis, this study aims to identify proteins differentially expressed in plasmas from severe dengue patients relative to healthy donors. Analysis of albumin/IgG-depleted plasmas by conventional bidimensional electrophoresis and colloidal Coomassie staining revealed only one statistically significant difference (n=7, p<0.01): the expression of apolipoprotein A-I was decreased in plasmas from all dengue patients analyzed. On the other hand, the use of 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis to analyze plasmas depleted of six high-abundance proteins (albumin, IgG, antitrypsin, IgA, transferrin and haptoglobin) allowed for the detection of 73 differentially expressed polypeptide chains (n=13, p<0.01), of which only 37 could be identified by MALDI-TOF/TOF MS, most likely because of the lower sensitivity of this technique. These 37 spots comprised a total of 13 proteins, as follows: 7 had increased expression in plasmas from dengue patients (C1 inhibitor, α 1-antichymotrypsin, vitamin D-binding protein, fibrinogen γ -chain, α 1-acid glycoprotein, apolipoprotein J and complement component C3b), while 6 others had decreased expression in the same samples (α -2 macroglobulin, prothrombin, histidine-rich glycoprotein, apolipoproteins A-IV and A-I and transthyretin). The possible involvement of these proteins in the inflammatory process triggered by dengue virus infection and in the repair mechanisms of vascular damage occurring in this pathology is discussed in this study.

Keywords: dengue, plasma, proteome, DIGE.

Crotalid Snake Venom Subproteomes Unraveled by the Antiophidic Protein DM43

Surza L. G. Rocha,^{†,‡,§,#} Ana G. C. Neves-Ferreira,^{†,§,#} Monique R. O. Trugilho,^{†,§}
Alex Chapeaurouge,^{†,§} Ileana R. León,^{†,§} Richard H. Valente,^{†,§} Gilberto B. Domont,^{‡,§} and
Jonas Perales^{*,†,§}

Laboratório de Toxinologia, Pavilhão Ozório de Almeida, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil, 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Laboratório de Química de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Rede Proteômica do Rio de Janeiro

Received November 10, 2008

Snake venoms are mixtures of proteins and peptides with different biological activities, many of which are very toxic. Several animals, including the opossum *Didelphis aurita*, are resistant to snake venoms due to the presence of neutralizing factors in their blood. An antihemorrhagic protein named DM43 was isolated from opossum serum. It inhibits snake venom metalloproteinases through noncovalent complex formation with these enzymes. In this study, we have used DM43 and proteomic techniques to explore snake venom subproteomes. Four crotalid venoms were chromatographed through an affinity column containing immobilized DM43. Bound fractions were analyzed by one- and two-dimensional gel electrophoresis, followed by identification by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. With this approach, we could easily visualize and compare the metalloproteinase compositions of *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis*, and *Crotalus atrox* snake venoms. The important contribution of proteolytic processing to the complexity of this particular subproteome was demonstrated. Fractions not bound to DM43 column were similarly analyzed and were composed mainly of serine proteinases, C-type lectins, C-type lectin-like proteins, L-amino acid oxidases, nerve growth factor, cysteine-rich secretory protein, a few metalloproteinases (and their fragments), and some unidentified spots. Although very few toxin families were represented in the crotalid venoms analyzed, the number of protein spots detected was in the hundreds, indicating an important protein variability in these natural secretions. DM43 affinity chromatography and associated proteomic techniques proved to be useful tools to separate and identify proteins from snake venoms, contributing to a better comprehension of venom heterogeneity.

Keywords: Snake • venom • toxin • metalloproteinase • inhibitor • proteomics • mass spectrometry



Bothrops insularis venomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data

Richard H. Valente^{a,e,*}, Patrícia R. Guimarães^{c,e}, Magno Junqueira^{a,e}, Ana Gisele C. Neves-Ferreira^{a,e}, Márcia R. Soares^{b,f}, Alex Chapeaurouge^{a,e}, Monique R.O. Trugilho^{a,e}, Ileana R. León^{a,e}, Surza L.G. Rocha^{a,b,e}, Ana Lucia Oliveira-Carvalho^{c,e}, Luciana S. Wermelinger^{c,e}, Denis L.S. Dutra^{c,e}, Luciana I. Leão^{d,g}, Inácio L.M. Junqueira-de-Azevedo^{d,g}, Paulo L. Ho^d, Russolina B. Zingali^{c,e}, Jonas Perales^{a,e}, Gilberto B. Domont^{b,e,*}

^aOswaldo Cruz Foundation, IOC, Laboratory of Toxinology, Rio de Janeiro, Brazil

^bFederal University of Rio de Janeiro, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cFederal University of Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^dButantan Institute, São Paulo, SP, Brazil

^eRio de Janeiro Proteomics Network, Brazil

^fNational Laboratory of Synchrotron Light, Campinas, SP, Brazil

^gUniversity of São Paulo, Bioscience Institute, SP, Brazil

ARTICLE DATA

Keywords:

Bothrops insularis
Proteomics
Transcriptomics
Snake venom

ABSTRACT

A joint transcriptomic and proteomic approach employing two-dimensional electrophoresis, liquid chromatography and mass spectrometry was carried out to identify peptides and proteins expressed by the venom gland of the snake *Bothrops insularis*, an endemic species of Queimada Grande Island, Brazil. Four protein families were mainly represented in processed spots, namely metalloproteinase, serine proteinase, phospholipase A₂ and lectin. Other represented families were growth factors, the developmental protein G10, a disintegrin and putative novel bradykinin-potentiating peptides. The enzymes were present in several isoforms. Most of the experimental data agreed with predicted values for isoelectric point and M_r of proteins found in the transcriptome of the venom gland. The results also support the existence of posttranslational modifications and of proteolytic processing of precursor molecules which could lead to diverse multifunctional proteins. This study provides a preliminary reference map for proteins and peptides present in *Bothrops insularis* whole venom establishing the basis for comparative studies of other venom proteomes which could help the search for new drugs and the improvement of venom therapeutics. Altogether, our data point to the influence of transcriptional and post-translational events on the final venom composition and stress the need for a multivariate approach to snake venomics studies.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Chronic dynamic exercise increases apolipoprotein A-I expression in rabbit renal cortex as determined by proteomic technology

R de Moraes,¹ R H Valente,¹ I R León,¹ M R O Trugilho,¹ A C L Nóbrega,² J Perales,¹ E Tibiriçá¹

¹ Physiology and Pharmacodynamics Department, Oswaldo Cruz Institute, RORUZ, Brazil; ² Physiology and Pharmacology Department, Fluminense Federal University, Brazil

Correspondence to: E Tibiriçá, Laboratório de Farmacologia Neuro-Cardiovascular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365 - Mangunhos, C.P. 926, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; etibi@ioc.fiocruz.br

Accepted 9 August 2007
Published Online First
23 August 2007

ABSTRACT

Objective: We have shown previously that exercise training enhances endothelium-dependent and endothelium-independent vascular relaxation in rabbit kidney. This study aimed to investigate protein expression changes in the rabbit renal cortex induced by chronic dynamic exercise.

Design: Kidneys were obtained from New Zealand rabbits either confined to pens ($n = 8$) or trained on a treadmill (0% grade) for 5 days/week at a speed of 18 m/min for 60-min periods over 12 weeks ($n = 8$). Expression of proteins in the renal cortex was determined by colloidal Coomassie blue staining after two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Differential protein spots were excised and digested with trypsin, and peptides were sequenced by electrospray ionization-ion trap mass spectrometry.

Results: Two pairs of matching differentially stained spots displayed an approximate threefold increase in trained compared with sedentary animals. These four spots presented a molecular mass of 23 kDa but different pI values. Mass spectrometric analyses revealed the pairs of matching spots as being rabbit apolipoprotein A-I.

Conclusion: Chronic dynamic exercise increases apolipoprotein A-I expression in the rabbit renal cortex. This fact could be involved in the alterations observed in the renal circulation after exercise training.

It is well known that chronic dynamic exercise of moderate intensity induces structural and functional vascular adaptations that enhance vasodilatation mechanisms.^{1–3} Thus, it is considered to have beneficial effects in cardiometabolic diseases related to endothelial dysfunction.^{2–4}

Although the effects of chronic dynamic exercise have been well characterised in coronary,⁵ pulmonary⁶ and skeletal muscle vascular beds,⁷ few studies have focused on the chronic effects of exercise on the visceral circulation, such as the kidney, where blood flow is known to be reduced during acute exercise.^{8–9}

We recently showed, using the isolated perfused rabbit kidney, that chronic dynamic exercise alters the rabbit kidney vascular reactivity, potentiating endothelium-dependent and endothelium-independent renal vasodilatation, thus suggesting not only increased bioavailability of nitric oxide (NO) but also enhanced responsiveness of the renal vascular smooth muscle to NO.¹⁰ We also found that chronic dynamic exercise leads to a protective effect on endothelial dysfunction of the rabbit kidney circulation observed after acute exposure to

high levels of glucose, which correspond to postprandial plasma glucose levels in patients with type 2 diabetes.¹¹

The purpose of the present study was to investigate the protein expression changes in the rabbit renal cortex induced by chronic dynamic exercise by use of two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and electrospray ionisation (ESI)-ion trap mass spectrometry.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

All procedures were approved by the Oswaldo Cruz Foundation's Animal Welfare Committee (protocol number P-0214-04) and are consistent with the USA National Institutes of Health *Guide for the care and use of laboratory animals* (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). New Zealand white rabbits of both sexes (from the Oswaldo Cruz Foundation breeding farm) weighing 2.0–2.5 kg, were housed (one per cage) under controlled conditions of light (12:12 h light/dark cycle) and a mean temperature of 22 (SD 1)°C with free access to water and standard rabbit chow.

Training protocol

The rabbits were randomly allocated to two groups: (1) exercised rabbits (T) assigned to a chronic dynamic training programme and (2) sedentary rabbits (S) confined to their cages during the same time period. Exercise training was performed on a low-speed motorised treadmill (São Carlos University, São Paulo, Brazil) and consisted of 12-week periods of running at a speed of 18 m/min during 60 min at no incline (0%). After 12 weeks of the training programme, T and S animals were submitted to a maximum treadmill-running test. The standard exercise test consisted of starting the treadmill at 10 m/min (0% grade) for 1 min, followed by 3 m/min increases each minute up to exhaustion.

Rabbit kidney protein extraction

Kidneys from S ($n = 8$) and T ($n = 8$) animals were isolated and both the renal arteries and veins were cannulated and flushed immediately with Krebs-Hanseleit solution (50 ml) to remove blood. After kidney dissection and capsule removal, the renal cortex, which contains about 90% of the renal vasculature, was separated from the medulla and proteins extracted as described previously¹² with the following modification: before trichloroacetic