



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANA CRISTINA PUHL

OBTENÇÃO DE UM BIOCATALISADOR DA PROTEASE TEV PARA A

REMOÇÃO DE CAUDAS DE HISTIDINAS DE PROTEÍNAS

RECOMBINANTES

Florianópolis

2008

ANA CRISTINA PUHL

**OBTENÇÃO DE UM BIOCATALISADOR DA PROTEASE TEV
PARA A REMOÇÃO DE CAUDAS DE HISTIDINAS DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Biotecnologia.

Orientadores : Prof. Dr. Hernán Terenzi

Dra. Andrea Villarino

Florianópolis

2008

*Às pessoas mais importantes da
minha vida: meus pais e meu irmão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo imenso apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida, por sempre estarem perto mesmo distantes e por não me deixarem desanimar nunca.

Ao Prof. Hernán Terenzi pela orientação, apoio, amizade e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A Andrea Villarino, pela orientação, pela enorme paciência e dedicação, amizade e por me ensinar muitas coisas além do conhecimento científico. Obrigada pelo seu enorme otimismo, confiança e estímulo na execução deste trabalho.

Ao meu querido namorado Evandro por fazer parte de minha vida de uma maneira muito especial... obrigada por todo amor, apoio e compreensão.

Aos meus amigos Catarina, Débora, Ênio, Gisele, Sérgio, Marcelo, Eduarda, Marcela pela amizade, por compartilharem momentos ruins e alegres e pelas divertidas visitas ao bar do IEGA.

Aos amigos Viviane Serpa e Javier Vernal pelo apoio, pelas risadas no laboratório e por todo carinho e amizade. Vivi, obrigada por dividir ou multiplicar dúvidas comigo. Javier, obrigada por toda a sua ajuda durante o mestrado.

Aos colegas do laboratório Gabriela, Camila, Priscila, Carol, Franciele, Luciano, Claus, Manuel, Patrícia, Letícia, Júlio, Paulo pelos momentos alegres no laboratório.

As professoras Dra. Cecilia Giacomini e Dra. Gabriela Irazoqui pela hospitalidade com que me receberam no Uruguai, pelo imenso apoio nesse trabalho, pelos conhecimentos que me ensinaram e pela amizade. As amigas Virginia, Paola, Maria Jose e Juliana pelo carinho, amizade e pelos bons momentos que passamos juntas no Uruguai.

As amigas Fernanda, Elaine e Julyana que são a minha família em Florianópolis. Obrigada por todos os instantes que passamos juntas, pelas tristezas, alegrias, festas, choradeiras, por estarem sempre ao meu lado e serem tão especiais pra mim.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A Deus pela vida.

“ É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

“ Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Luis Fernando Veríssimo

RESUMO

O uso de caudas de afinidade tem facilitado a purificação de proteínas recombinantes para aplicações bioquímicas, terapêuticas e estudos estruturais. A cauda mais comum é a cauda contendo seis-histidinas (*His-tag*) porque permite a purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade. Em alguns casos, as caudas de tamanhos maiores podem aumentar a solubilidade da proteína de interesse. Em outros, a presença da cauda pode alterar a conformação estrutural da proteína, a atividade, interações proteína-proteína e a formação de cristais com um bom padrão de difração, necessário para elucidar a estrutura tridimensional. Todos esses efeitos negativos reforçam a importância de realizar uma caracterização funcional das proteínas expressas com caudas e que a clivagem das mesmas é de grande utilidade antes de realizar estudos funcionais e estruturais. A protease TEV é uma das mais utilizadas para clivar a cauda de proteínas recombinantes porque ela reconhece uma seqüência de aminoácidos muito específica (EXXYXQ*S/G) (onde X pode ser qualquer resíduo) e é ativa a baixas temperaturas e na presença de inibidores de protease adicionados durante o processo de purificação. A protease TEV é disponível comercialmente na forma solúvel, porém é muito cara. Quando a TEV é utilizada na forma solúvel, ela deve ser separada da proteína de interesse. Esta separação é normalmente realizada por uma etapa de cromatografia de exclusão molecular, que permite a separação da cauda, da proteína clivada e não clivada. Nos casos em que a proteína de interesse possua uma massa molecular semelhante a protease TEV, são necessárias etapas adicionais de purificação diferentes da gel filtração. Quando um grande número de proteínas é estudada, como nos projetos de genômica estrutural para a cristalização de proteínas, a produção da TEV deve ser contínua nos laboratórios, aumentando o custo do processo de purificação. Neste trabalho, a protease TEV foi produzida e imobilizada em diferentes suportes visando obter um biocatalisador ativo, estável e que possa ser reutilizado em vários processos de clivagem de caudas de histidina de proteínas recombinantes. Para isso, foram utilizadas três estratégias: a primeira pela imobilização no suporte glutaraldeído-agarose (G-agarose) que permite a ligação da TEV pelos grupos ϵ -amino das lisinas. A segunda pela imobilização em tiolsulfonato-agarose (TSI-agarose) pela união da proteína pelos grupos tiol das cisteínas e a última pela imobilização pelos grupos tiol e por outros nucleófilos da superfície da TEV. O rendimento da purificação das proteínas a partir de 1 litro de cultivo foi de 20 mg para a TEV e 5 mg para o substrato da TEV. A protease TEV imobilizada em TSI-agarose clivou 100% do substrato em 24 h a temperatura ambiente e a imobilizada em G-agarose clivou 50% do substrato nas mesmas condições. A TEV imobilizada em TSI-agarose foi mais estável que a enzima solúvel durante um período de armazenamento de 16 dias a 4°C e pode ser reutilizada em pelo menos cinco ciclos de clivagem.

Palavras chave: protease TEV, imobilização, clivagem de caudas

ABSTRACT

The use of affinity tags has facilitated purification of high amounts of proteins for application in biochemical, therapeutic and structural studies. The most common affinity tag is the hexahistidine (His-tag) because it facilitates the purification of recombinant proteins by affinity chromatography. In some cases the addition of large tags can increase the solubility of the target protein. However, the presence of the tag may disturb the protein conformation, the protein activity, the protein-protein interactions, and the formation of crystals with a good pattern of diffraction, necessary to elucidate protein structure. All these negative effects emphasize the importance of functional characterization of recombinant proteins expressed with tags and how its cleavage could be useful before biochemical and structural studies. TEV protease is the more frequently used protease to cleave recombinant proteins tags because it is a very specific protease that recognizes an extended seven amino acid consensus sequence (EXXYXQ*S/G) (where X is any residue) and is catalytically active at low temperatures and in the presence of protease inhibitors added during the purification process. TEV protease is commercially available in soluble form and it's very expensive. When the TEV is used in soluble form it should be separated from target protein. This separation is normally achieved by one step of size exclusion chromatography, which allows also the separation from the tag and from the cleaved and non-cleaved protein. However, when the molecular weight of the cleaved protein is similar to that of the TEV-protease, additional purification steps are needed, increasing the steps of the total process. Moreover, when a great number of proteins are studied as in genomic structural projects for protein crystallization the production of the soluble TEV should be performed continuously in the laboratory increasing the total cost of the purification process. In this work, TEV was produced and was covalently immobilized in different supports in order to obtain an active and stable biocatalyst which can be reused in several process of cleavage of histidine tags of recombinant proteins. Three strategies were used: the first by the use of glutaraldehyde-agarose (G-agarose) for binding the protein by the ϵ -amino groups of lysines. The second strategy is based on the immobilization onto thiosulfinate-agarose (TSI-agarose) by the thiol groups of exposed cysteines of TEV. The last one is based on the immobilization onto epoxy-thiol agarose (ET-agarose) by the thiol groups and other nucleophiles of the protein. The yield of purified protein from 1 liter of culture was 20 mg for TEV and 5mg for a 20 kDa TEV-substrate. TEV-protease immobilized onto TSI-agarose cleaved 100% of the substrate in 24 h at room temperature and TEV immobilized onto G-agarose cleaved 50% of the substrate. TEV immobilized onto TSI-agarose is more stable than the soluble enzyme stored at 4°C during 16 days and can be reused, at least, in five cycles of reactions.

Key words: TEV protease, immobilization, tags cleavage

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Purificação por cromatografia de afinidade (IMAC).....	15
FIGURA 1.2 - Modelo estrutural da protease TEV.....	19
FIGURA 1.3 - Diagrama esquemático do processamento da poliproteína do <i>Tobacco etch virus</i> resultando na liberação da protease de 27 kDa.....	21
FIGURA 1.4 - Métodos de imobilização de enzimas.....	23
FIGURA 4.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% desnaturante (SDS-PAGE) das frações solúvel (S) e insolúvel (I) do extrato celular de <i>E. coli</i> BL21(DE3) expressando a protease TEV _{WT}	43
FIGURA 4.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% desnaturante (SDS-PAGE) da purificação por afinidade da protease TEV _{WT}	44
FIGURA 4.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% desnaturante (SDS-PAGE) da purificação por afinidade da protease TEV _{SH} e da proteína PTP	45
FIGURA 4.4 - Purificação das proteínas recombinantes por gel filtração.....	46
FIGURA 4.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % desnaturante (SDS-PAGE) da atividade da protease TEV _{WT} e TEV _{SH}	47
FIGURA 4.6 - Ilustração esquemática da síntese dos suportes.....	48
FIGURA 4.7 - Análise da sequência e da estrutura da protease TEV.....	49
FIGURA 4.8 - Imobilização da protease TEV nos suportes.....	50
FIGURA 4.9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% desnaturante (SDS-PAGE) da imobilização da protease TEV em TSI-agarose e G-agarose.....	52
FIGURA 4.10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% desnaturante (SDS-PAGE) da imobilização da protease TEV em ET-agarose.....	53
FIGURA 4.11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% desnaturante (SDS-PAGE) das frações da atividade da TEV imobilizada em TSI-agarose e G15-agarose.....	54

FIGURA 4.12 -Imobilização de proteínas por um ou múltiplos pontos de união ao suporte..	55
FIGURA 4.13 - Cinética da atividade da TEV solúvel e imobilizada.....	58
FIGURA 4.14 - Estabilidade de armazenamento a 4°C da TEV solúvel e da TEV imobilizada em TSI-agarose	59
FIGURA 4.15 - Capacidade de reutilização do biocatalisador da TEV.....	61
FIGURA 5.1 - Purificação de proteínas recombinantes.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Proteases comumente utilizadas para remover a cauda de proteínas fusão.....	18
TABELA 1.2 - Métodos de imobilização de proteínas por ligações covalentes.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-PDS	2,2'-dipiridildissulfeto
DTT	ditiotreitól
EDA	etilenodiamina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GSH	glutathiona reduzida
GST	glutathiona-S-transferase
GuHCl	cloreto de guanidina
IMAC	<i>“Immobilized Metal Affinity Chromatography”</i> – Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactosídeo
MBD	domínio de ligação à maltose
MMPP	monoperóxiftalato de magnésio
PTP	fosfotirosina fosfatase de <i>T. cruzi</i>
RMN	ressonância magnética nuclear
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>“Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”</i> – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TNF	fator de necrose tumoral
Tris	tris(hidroximetil) aminometano
TRX	tio-redoxina
VC	volume de coluna
ϵ	coeficiente de extinção molar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. METODOLOGIA.....	28
3.1. Transformação das bactérias <i>E. coli</i>	28
3.1.1 <i>Obtenção de células competentes para transformação.....</i>	28
3.1.2 <i>Transformação das bactérias E. coli</i>	28
3.2 Expressão das proteínas recombinantes	30
3.2.1 <i>Expressão da protease TEV_{WT}.....</i>	30
3.2.2 <i>Expressão da protease TEV_{SH} e da proteína PTP de T. cruzi.....</i>	30
3.3 Purificação das proteínas recombinantes.....	31
3.3.1 <i>Purificação da protease TEV_{WT} a partir da fração solúvel.....</i>	31
3.3.2 <i>Purificação da protease TEV_{WT} a partir da fração insolúvel.....</i>	31
3.3.3 <i>Purificação da TEV_{SH} e da PTP de T. cruzi a partir da fração solúvel.....</i>	32
3.4 Obtenção e caracterização do biocatalisador de TEV imobilizada.....	33
3.4.1 <i>Síntese do suporte tiolsulfinato –agarose.....</i>	34
3.4.2 <i>Síntese do suporte glutaraldeído-agarose.....</i>	34
3.4.3 <i>Síntese do suporte epóxi-piridil-dissulfeto agarose.....</i>	35
3.4.4 <i>Imobilização da protease TEV em TSI-agarose.....</i>	36
3.4.5 <i>Imobilização da protease TEV em G-agarose.....</i>	37
3.4.6 <i>Imobilização da protease TEV em ET-agarose.....</i>	38
3.4.7 <i>Determinação do rendimento da imobilização nos suportes.....</i>	38

3.5 Teste de atividade da protease TEV solúvel e imobilizada.....	39
3.6 Comparação da atividade da protease TEV solúvel e imobilizada.....	40
3.7 Teste de estabilidade da protease TEV solúvel e imobilizada.....	40
3.8 Capacidade de reutilização do biocatalisador da protease TEV.....	41
3.9 Ensaio funcional com a PTP de <i>T. cruzi</i>	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Obtenção das proteínas recombinantes.....	42
4.1.1 Otimização das condições de expressão da protease TEV _{WT}	42
4.1.2 Purificação das proteínas recombinantes.....	43
4.1.3 Teste de atividade da protease TEV solúvel.....	46
4.2 Síntese dos suportes utilizados na imobilização da TEV.....	47
4.3 Imobilização da protease TEV.....	49
4.4 Atividade da protease TEV imobilizada.....	54
4.5 Comparação da atividade da protease TEV _{SH} solúvel e imobilizada.....	57
4.6 Estabilidade a 4°C da protease TEV solúvel e imobilizada.....	59
4.7 Capacidade de reutilização do biocatalisador da TEV.....	60
4.8 Ensaio funcional com a PTP de <i>T. cruzi</i>	62
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
APÊNDICE A.....	76
APÊNDICE B.....	77
APÊNDICE C.....	78
APÊNDICE D.....	79
APÊNDICE E.....	80
APÊNDICE F.....	81

1. INTRODUÇÃO

Proteínas de fusão ou quiméricas são utilizadas há vários anos para aplicações diversas como, por exemplo: purificação, cristalização, imunodeteção, terapia baseada em proteínas, desenvolvimento de novas vacinas e estudos funcionais (BECKWITH, 2000; TERPE, 2003; SMYTH et al., 2003). Os avanços na tecnologia de obtenção de proteínas recombinantes têm levado ao uso rotineiro de diferentes tipos de “caudas” (*tags*) (TERPE, 2003). As caudas são adicionadas na porção amino ou carbóxi terminal durante o processo de subclonagem em plasmídeos e expressas como parte da proteína de interesse. As mais comuns incluem a cauda contendo seis histidinas (*His-tag*) (BORNHORST e FALKE, 2000), glutationa-S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum* (SMITH, 2000), tioredoxina (TRX) de *Escherichia coli* (LA VALLIE et al., 2000) e a proteína de ligação à maltose (MBP) de *E. coli* (SACHDEV e CHIRGWIN, 1998).

Embora a bactéria *E. coli* continue sendo o hospedeiro de expressão escolhido devido às vantagens de fácil manipulação, crescimento e taxas de produção elevadas, ela apresenta desvantagens em relação à expressão de genes eucarióticos porque não faz modificações pós-traducionais e as proteínas são geralmente expressas na forma insolúvel em corpos de inclusão (BANEYX, 1999). Alguns estudos indicam que 1/3 a 1/2 das proteínas procarióticas não podem ser expressas em bactéria na forma solúvel utilizando caudas de histidinas (EDWARDS et al., 2000; STEVENS, 2000) e esse número é maior para proteínas eucarióticas (BRAUN et al., 2002; HAMMARSTROM et al., 2002; SHIH et al., 2002). Como os processos de renaturação das proteínas dos corpos de inclusão são difíceis, uma estratégia utilizada para aumentar a solubilidade é a adição de caudas maiores de solubilidade conhecida. Na literatura estão descritas muitas caudas que aumentam a solubilidade de proteínas como MBP, TRX e GST (SACHDEV e CHIRGWIN, 1998; HAMMARSTROM et

al., 2002; ESPOSITO e CHATTERJEE, 2006). A GST e a MBP também podem atuar como caudas de afinidade e facilitar a purificação da proteína recombinante, pois a MBP se une à resinas de amilose (DI GUAN et al., 1998) e a GST se une à resinas de glutationa (SMITH e JOHNSON, 1988).

A cauda de histidinas é a cauda de uso mais freqüente por adicionar apenas um peptídeo da ordem de 2 kDa (20 aa) à proteína de interesse e não uma proteína de 26 kDa como no caso da GST e de 40 kDa como a MBP. A presença do *His-tag* na proteína permite sua purificação em uma única etapa diretamente do lisado celular por cromatografia de afinidade a metal (IMAC, *Immobilized metal ion affinity chromatography*) (PORATH et al., 1975). A purificação é baseada na interação dos resíduos de histidinas da cauda com o íon metálico imobilizado (Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Ni^{2+}) ao grupo ácido iminodiacético do suporte de sepharose (Figura 1.1 A). As histidinas são os aminoácidos que interagem mais fortemente com esse tipo de complexo metálico porque o grupo imidazol é doador de elétrons e forma ligações de coordenação com o metal de transição imobilizado (Figura 1.1 B). Uma vez que a proteína com o *His-tag* é imobilizada no suporte e separada do extrato protéico total, o suporte pode ser lavado e ela pode ser eluída da matriz rompendo-se esta interação por afinidade com um competidor (imidazol) ou por diminuição do pH (Figura 1.1 C).

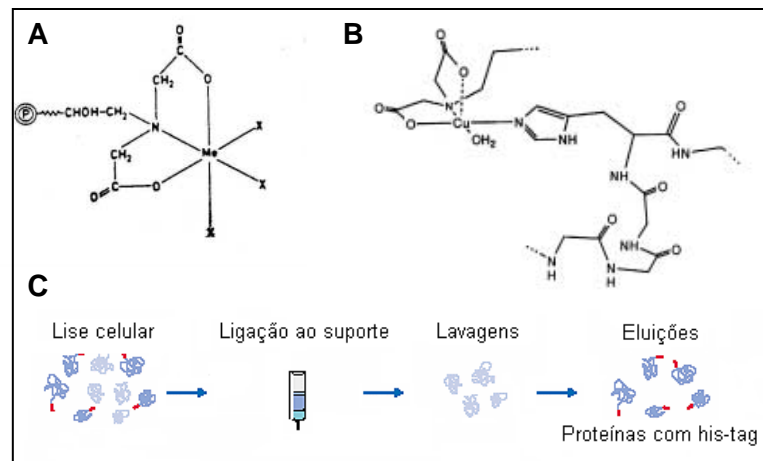


FIGURA 1.1 – Purificação por cromatografia de afinidade (IMAC). **(A)** Representação diagramática de um adsorvente de IMAC. Me: metal; P: suporte cromatográfico insolúvel e X: H₂O, íons de solução tampão ou resíduos de aminoácidos da proteína. **(B)** Resíduo de histidina coordenado ao Cu(II) unido ao grupo iminodiácetico que está imobilizado a um suporte cromatográfico insolúvel (adaptado de Karmali, 2000) **(C)** Purificação das proteínas com *his-tag* (adaptado de QIAGEN,2000).

Diferentes estudos têm demonstrado que a presença da cauda pode afetar características ou funções importantes da proteína a ser estudada. Em alguns casos, a cauda resulta em efeitos positivos, como aumento da solubilidade da proteína recombinante. Em outros casos, as caudas afetam negativamente a estrutura e a função biológica da proteína (atividade, interação proteína-proteína), resultando em efeitos indesejados. Esses efeitos podem ocorrer devido à posição de inserção da cauda, do tamanho ou de modificações pós traducionais na mesma. Recentemente foi demonstrado que a presença da cauda *His-tag* na proteína reguladora AreA de *Aspergillus nidulans* causou uma mudança conformacional no sítio ativo da proteína, porém não afetou sua propriedade de ligação ao DNA (CHANT et al., 2005). Essa constatação é importante quando se deseja realizar análises estruturais de alta resolução em proteínas contendo caudas de histidina. Outro exemplo é que a cauda de histidinas inserida na porção C-terminal da construção da porção Fv do anticorpo associado a tumor (*tumor-associated single-chain Fv construct*) cobriu o sítio de ligação ao antígeno e afetou suas propriedades de ligação (GOEL et al., 2000). Outro estudo, realizado com a proteína de canal aquaporina Z (AqpZ) de *E. coli*, constatou que o tamanho da cauda

introduzida nesta proteína afetou o grau de oligomerização da mesma (tetrâmeros quando a cauda é de 6 histidinas e oligômeros maiores quando a cauda é de 10 histidinas) e que o rendimento da purificação diminuiu quando o tamanho da cauda foi aumentado de 6 para 10 histidinas (MOHANTY e WIENER, 2004). No caso da citocina trimérica do fator de necrose tumoral alfa (TNF), a atividade biológica foi revertida aos valores normais somente após a remoção da cauda de histidinas (FONDA et al., 2002).

Embora alguns grupos mostraram a possibilidade de obter cristais de proteínas de fusão (SMYTH et al., 2003), outros demonstraram que as caudas podem dificultar a cristalização das proteínas e a qualidade dos cristais, requeridos para os ensaios de difração por raios-X e resolução da estrutura tridimensional. Por exemplo, durante a expressão do domínio SH3 da proteína src tirosina quinase de galinha (src SH3) com *His-tag*, foi observada uma modificação pós-traducional (glicosilação) da cauda que produziu uma heterogeneidade (em tamanho e em carga) da preparação protéica. Neste trabalho, foi demonstrado que a remoção da cauda *His-tag* foi essencial para a cristalização da proteína selvagem e da mutante SH3 (KIM et al., 2001). Outro grupo investigou a influência de várias caudas de afinidade de pequeno tamanho na cristalização da proteína que se liga a maltodextrina de *Pyrococcus furiosus* (PfuMBP). Eles não obtiveram cristais com a proteína contendo a cauda *Srep tag II* e constataram que a PfuMBP fusionada a caudas de arginina formou cristais similares aos cristais da proteína sem cauda, porém eles não difrataram bem (BUCHER et al., 2002). Nos estudos por ressonância magnética nuclear (RMN), as caudas são frequentemente removidas após a purificação porque aumentam o tamanho da proteína de interesse e atrapalham os estudos por RMN (CANDEL et al., 2007).

Todas essas constatações reforçam a importância da caracterização funcional das proteínas recombinantes expressas com caudas e que a remoção da mesma é de grande utilidade antes de realizar estudos bioquímicos e estruturais.

As caudas podem ser removidas por processos químicos ou enzimáticos. Os métodos químicos são pouco específicos e geralmente atuam em condições severas que podem danificar a proteína (CARTER, 1990). As reações enzimáticas são mais específicas e ocorrem em condições mais suaves (FORSBERG et al., 1992). O processo de remoção da cauda por esse método envolve a inserção de uma seqüência única de aminoácidos entre a cauda e a proteína de interesse, a qual é susceptível à clivagem por uma protease específica. Esta clivagem permite obter a proteína nativa para posteriores aplicações.

Uma grande variedade de proteases está comercialmente disponível para clivar as caudas de proteínas de fusão como a trombina (JENNY, MANN, LUNDBLAD, 2003), fator Xa (NAGAI, 1994), enteroquinase (FANG, SUN, HUA, 2004), e a protease *Tobacco etch virus* (TEV) (PARKS, 1994) (Tabela 1.1). Essas proteases são mais específicas que a tripsina. A tripsina cliva ligações peptídicas em todos os resíduos de lisina ou arginina presentes na proteína, enquanto a trombina e o fator Xa clivam ligações peptídicas em resíduos de arginina (R) localizados em uma seqüência específica na proteína. Para a trombina a seqüência é LVPRG ou LVPRGS que é derivada da seqüência do fator VIII bovino clivado pela trombina durante o processo de ativação da cascata de coagulação. A clivagem pela trombina resulta em um aminoácido Gly ou Gly-Ser na porção amino terminal da proteína de interesse. O fator Xa cliva geralmente em IEGR, que é uma seqüência derivada da protrombina, hidrolisada pelo fator Xa durante a conversão de protrombina a trombina (JENNY, MANN, LUNDBLAD, 2003).

A enteroquinase reconhece um polipeptídeo de cinco aminoácidos (DDDDKX) e a clivagem ocorre do lado carboxílico da lisina, porém pode ocorrer em outros resíduos dependendo da conformação e do tipo de substrato (CHOI et al., 2001). Análises bioquímicas mostraram que a eficiência de clivagem depende do aminoácido ocupando a posição X situada depois do sítio de reconhecimento (D₄K) (HOSFIELD e LU, 1999). A literatura está

repleta de exemplos de proteínas de fusão que foram clivadas por essas proteases em outros locais que o sítio de clivagem desejado (FORSEBER et al., 1992; WAGNER et al., 1996, STEVENS, 2000; JENNY, MANN, LUNDBLAD, 2003). Por essa razão, quando as proteases trombina, fator Xa e enteroquinase forem utilizadas é necessário realizar uma caracterização do produto desejado após clivagem da proteína para assegurar que não houve digestão em regiões não desejadas.

TABELA 1.1 – Proteases comumente utilizadas para remover a cauda de proteínas de fusão

Protease	Nome	Sítio de clivagem^{a,b}	Referências
TEV	Tobacco etch vírus protease	EXXYXQ/S ou G	Parks et al., 1994
3C	Protease 3C do vírus Coxsackie	LEALFQ/GP	Miyashita et al., 1992
Xa	Fator Xa	IEGR/	Jenny, Mann, Lundblad, 2003
EntK	Enteroquinase	DDDDK/	Hosfield e Lu, 1999
Thr	Trombina	LVPR/GS	Jenny, Mann, Lundblad, 2003
Caspase	Caspase-3	DXXD/	Feeney et al., 2005

^a A (/) indica o local onde ocorre a clivagem pela protease

^b Cada letra representa um aminoácido, onde X pode ser qualquer resíduo

A protease TEV, originalmente denominada *nuclear inclusion a (Nla) protease* é codificada pelo *Tobacco etch virus* da família Potyviridae (DOUGHERTY, 1983; RYAN e FLINT, 1997). Os potivírus são membros da superfamília dos picornavírus que infectam plantas e usam muitas proteases durante a replicação. O *Tobacco etch virus* possui um RNA simples fita e seu genoma (~9500 nucleotídeos) é transcrito em uma única poliproteína de 346 kDa (ALLISON et al., 1986) que é subsequentemente processada por proteases virais. A maioria das clivagens é mediada pela protease TEV de 27 kDa (SEIPELT et al., 1999). A protease TEV reconhece uma seqüência heptapeptídica estritamente específica (EXXYXQ*S/G) (X pode ser qualquer resíduo) (CARRINGTON e DOUGHERTY, 1988) que assegura a maturação viral sem dano às proteínas da célula hospedeira. Essa característica é uma vantagem no momento de eliminar a cauda de proteínas de origem bacteriana ou eucariota, já que é pouco provável que elas apresentem o sítio de reconhecimento específico

da protease TEV. Os aminoácidos que ocupam as posições P6 (E), P3 (Y), P1(Q) e P1'(S/G) do sítio de reconhecimento são essenciais para a clivagem, entretanto, o grau de clivagem é afetado pelo tipo de resíduo de aminoácido ocupando as outras posições (DOUGHERTY e PARKS, 1989; DOUGHERTY, CARY, PARKS, 1989). A clivagem ocorre entre Q/G ou Q/S, resultando em uma serina ou glicina na porção amino terminal da proteína de interesse (PARKS, 1994).

Além da protease TEV ser muito específica, ela é ativa a baixas temperaturas e na presença de vários inibidores de proteases normalmente adicionados durante os processos de purificação (POLAYES et al., 1994). Estruturalmente a protease TEV apresenta dois domínios barril- β antiparalelos, tipicamente encontrados nas serina proteases, como quimotripsina e tripsina. Ela pertence à família das cisteíno-proteases, apresentando a tríade de aminoácidos catalíticos His 46, Asp 81 e Cys 151, localizados na interface entre os domínios (PHAN et al., 2002) (Figura 1.2).

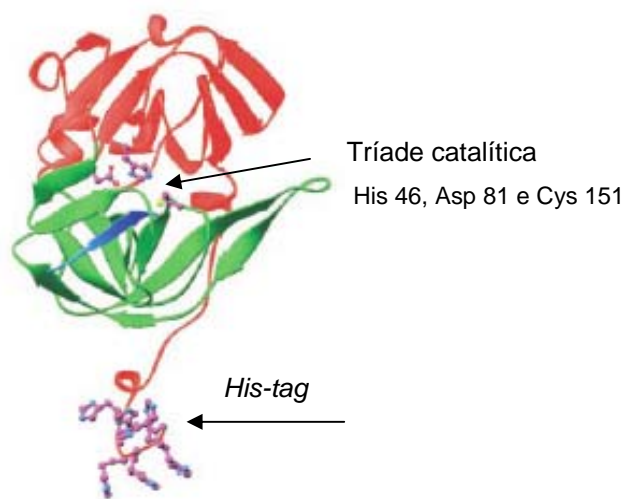


FIGURA 1.2 – Modelo estrutural da protease TEV. Os resíduos do sítio catalítico e cauda de histidinas estão demonstrados como *ball-stick-ball*. O produto peptídico está colorido em azul (adaptado de Phan *et al.*, 2002).

Por todas as vantagens descritas, a protease TEV tem sido a enzima de escolha para remover a cauda das proteínas recombinantes em grandes projetos como o de genômica estrutural de proteínas de *Trypanosoma cruzi*, desenvolvido por um consórcio liderado pelo

Instituto de Biologia Molecular do Paraná (<http://www.ibmp.org.br/>) e de *Mycobacterium tuberculosis* e *M. Leprae*, desenvolvido no Instituto Pasteur de Paris (<http://www.pasteur.fr/SGM>).

Na natureza, a protease TEV é uma porção proteolítica de 27 kDa do polipeptídeo NIa de 49 kDa encontrado como um agregado ao polipeptídeo NIB de 54 kDa em corpos de inclusão de células de plantas infectadas com o vírus (CARRINGTON e DOUGHERTY, 1988; PARKS et al., 1995). A purificação da proteína a partir desses corpos de inclusão da planta é difícil e não rende quantidades significativas da proteína ativa. As primeiras tentativas de purificação da protease TEV recombinante expressa em *E. coli* produziram resultados de rendimento similares, já que a maioria da proteína fica armazenada na fração insolúvel em corpos de inclusão (PARKS et al., 1995). Além desse problema, a protease TEV possui um sítio de auto-clivagem, produzindo uma proteína truncada com atividade catalítica reduzida e de difícil separação da proteína não truncada, pois possuem massas moleculares similares (PARKS et al., 1995) (Figura 1.3). Para resolver esse problema, foram realizadas mutações sítio dirigidas no sítio de auto-clivagem da protease TEV (KAPUST et al., 2001) e obteve-se um mutante S219N que inibiu a auto-proteólise e não afetou a atividade catalítica da enzima (LUCAST, BATEY, DOUDNA, 2001). A protease TEV que possui a mutação S219N se expressa principalmente na fração insolúvel em corpos de inclusão.

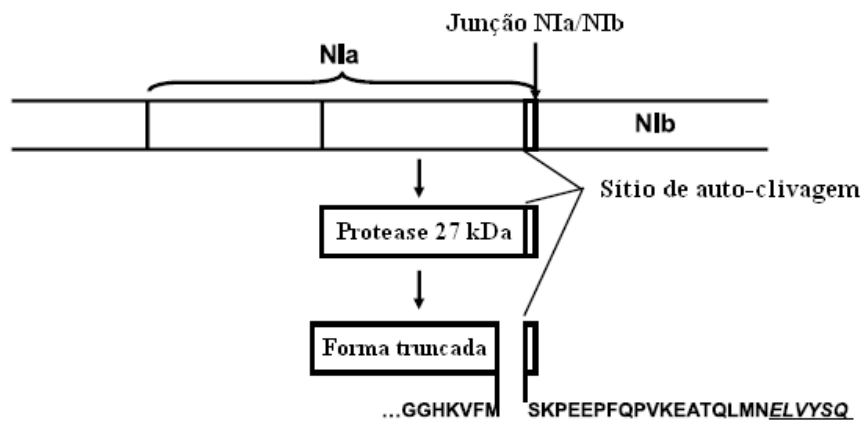


FIGURA 1.3 - Diagrama esquemático do processamento da poliproteína do *Tobacco etch virus* resultando na liberação da protease de 27 kDa. O diagrama também mostra o sítio de auto-clivagem. Os últimos seis resíduos da seqüência da protease de 27 kDa que estão sublinhados correspondem ao sítio proteolítico interno (adaptado de NUNN et al., 2005).

A produção de grandes quantidades da protease TEV em *E. coli* é dificultada devido à baixa solubilidade da mesma e o rendimento é de aproximadamente de 1 mg/l de cultivo (PARKS et al., 1995). Dessa forma, para obter a proteína é necessário utilizar protocolos complexos que permitem sua purificação a partir da fração insolúvel do lisado celular (LUCAST, BATEY, DOUDNA, 2001). A protease TEV deve ser purificada em condições desnaturantes e posteriormente renaturada, sendo este processo muito delicado e determinante quanto à qualidade da preparação (atividade específica).

Recentemente, o problema da solubilidade foi solucionado por três estratégias. O grupo sueco coordenado pela Dra. Helena Berglund desenvolveu um mutante da TEV (TEV_{SH}) que é 5,5 vezes mais solúvel que o mutante S219N (VAN DEN BERG et al, 2006). A TEV_{SH} contém três aminoácidos substituídos, T17D, N68D e L77V localizados em laços que conectam elementos de estrutura secundária na superfície da proteína ou próximo dela (PHAN et al, 2002). A TEV_{SH} diretamente da fração solúvel do lisado celular e obtiveram um rendimento de 54 mg/l (VAN DEN BERG et al, 2006). Em outro caso, a TEV foi co-expressa com chaperonas a 28°C, resultando em 80% de proteína expressa na fração solúvel e obtendo-se 65 mg de TEV por l de cultivo (FANG et al., 2007). Baseado nesses trabalhos, Blommel e

Fox (2007) aperfeiçoaram a construção da protease TEV e utilizaram técnicas de produção em grande escala, alcançando rendimentos de 400 mg/l de cultivo.

A protease TEV é produzida, comercializada e utilizada na forma solúvel. A utilização da protease TEV na forma solúvel aumenta as etapas do processo de purificação da proteína de interesse, porque ao eliminar a cauda é necessário separar a proteína de interesse da TEV. Essa separação é normalmente realizada por gel filtração, que permite a separação da protease, da cauda de histidinas e da proteína clivada e não clivada. Nos casos em que a proteína de interesse possui uma massa molecular semelhante à TEV, a separação torna-se mais difícil, sendo necessárias etapas adicionais de purificação.

Para clivar 3 mg de cada proteína com cauda, são necessários 1000 unidades da protease TEV, que custam aproximadamente US\$ 140. Quando um grande número de proteínas com caudas é estudado, como no caso de projetos de genômica estrutural (<http://www.pasteur.fr/SGM>) torna-se economicamente inviável comprar a TEV e os laboratórios preferem produzi-la. A produção deve ser contínua nesses laboratórios e em grandes quantidades, aumentando o custo total do processo de purificação.

Uma solução interessante seria a imobilização covalente da protease TEV em um suporte sólido. A imobilização de enzimas permite a sua reutilização em vários ciclos de catálise, diminuindo assim a quantidade de enzima solúvel necessária para as reações enzimáticas (BICKERSTAFF, 1997). Em muitos casos, a imobilização estabiliza as proteínas frente a diferentes agentes como a temperatura ou a presença de solventes orgânicos, o que permite obter um biocatalisador com propriedades de estabilidade melhores que os da proteína solúvel. Além disso, a imobilização de enzimas também proporciona um melhor controle operacional, flexibilidade no desenho de reatores e permite que a enzima imobilizada possa ser separada do produto final da reação por filtração ou centrifugação (KATCHALSKY-KATZIR, 1993; GUISÁN et al., 1993).

As propriedades da proteína imobilizada podem ser manipuladas dependendo de vários fatores, como o tipo de química utilizada para a imobilização, os aminoácidos envolvidos na interação, o número de ligações entre a proteína e o suporte e o ambiente gerado ao redor da molécula imobilizada. (GIACOMINI et al., 1998, 2001; FERRER et al., 2002; IRAZOQUI et al., 2002; ULBRICH-HOFFMAN et al., 1999; MATEO et al., 2005). Existem vários métodos de imobilização de enzimas como adsorção, encapsulação e ligação covalente (Figura 1.4). Nos métodos de imobilização por adsorção física, as forças envolvidas incluem ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações iônicas. A grande desvantagem desse método é que devido às ligações não serem covalentes é possível reverter a imobilização modificando as condições que afetam a união da proteína ao suporte (pH, força iônica, temperatura, polaridade do solvente ou presença de um competidor). Os métodos de encapsulação envolvem o encerramento das moléculas de enzima dentro dos poros de uma matriz polimérica, micelas reversas, microcápsulas ou entre membranas macroscópicas (GROBOILLOT et al., 1994).

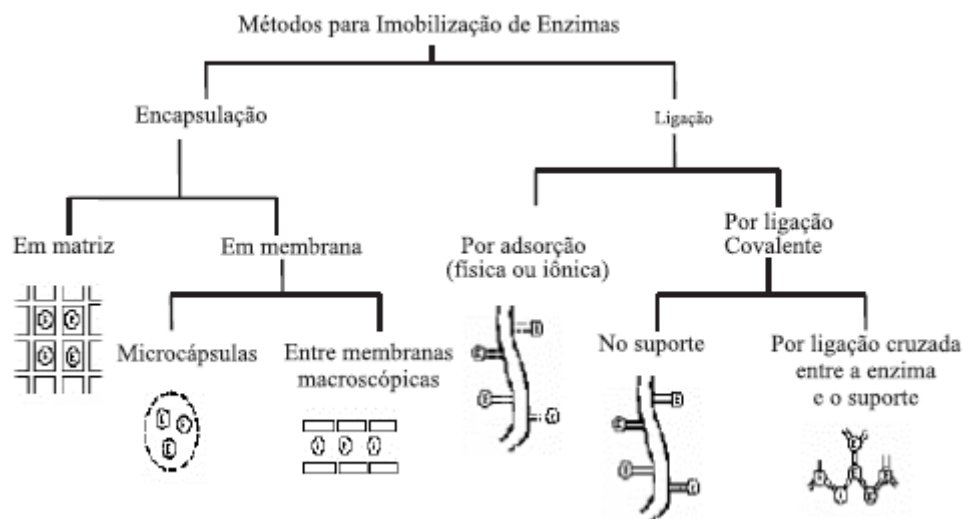
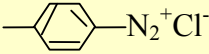
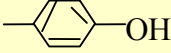
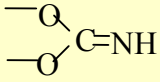
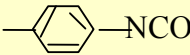
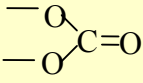
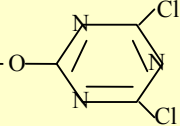
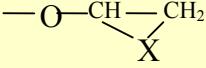
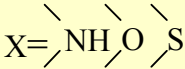


FIGURA 1.4 – Métodos de imobilização de enzimas (extraído de Dalla Vecchia, 2004).

A imobilização covalente de uma proteína em um suporte sólido é baseada nas reações entre os resíduos de aminoácidos da proteína e os grupos reativos dos suportes. As reações geralmente envolvem os grupos amino, tiol, carboxílico e anéis aromáticos de L-tirosina e imidazólicos de L-histidina das proteínas. Para conservar a estrutura e a função da proteína, as químicas de imobilização utilizadas devem ser eficientes em condições suaves. As reações mais comumente utilizadas são de diazotação, formação de ligação amida, alquilação e arilação, formação de bases de Schiff e reações de substituição tiol-dissulfeto (Tabela 1.2). A grande vantagem da imobilização covalente é a estabilidade das ligações que se formam entre a enzima e o suporte. Como a maioria dos suportes geralmente utilizados não possui os grupos funcionais para estas reações de imobilização, é necessário ativá-los previamente (CABRAL et al., 1991; CARLSSON et al., 1998). Atualmente existe uma grande variedade de suportes para a imobilização de proteínas com grupos reativos que permitem direcionar a imobilização utilizando grupos diferentes da superfície da proteína. Isso permite obter biocatalisadores com propriedades diferentes onde a proteína é imobilizada no suporte por um ou múltiplos pontos. Ultimamente, suportes multifuncionais têm sido desenvolvidos (MATEO et al., 2000, 2001). A estratégia mais recente utiliza um suporte que contém uma pequena proporção de grupos tiol e uma maior quantidade de grupos epóxi. Esse tipo de suporte permite dirigir a imobilização da proteína primeiramente pelos grupos tiol, pela formação de ligações de dissulfeto entre a enzima e o suporte e em uma segunda etapa pela reação de outros nucleófilos da superfície protéica (Lys, His, Tyr, Ser, etc.) com os grupos epóxi do suporte (GRAZÚ et al., 2003).

O objetivo deste trabalho é produzir a protease TEV solúvel e imobilizá-la covalentemente em diferentes matrizes. Três estratégias de imobilização foram utilizadas procurando obter um biocatalisador ativo, estável e reutilizável em vários processos de clivagem das caudas de proteínas recombinantes.

TABELA 1.2 - Métodos de imobilização de proteínas por ligações covalentes

Grupos reativos no suporte	Grupos reativos na proteína	Química de imobilização
 Sal de diazônio	-NH ₂ -SH 	Diazotação
 Imidocarbamato	-NH ₂	Formação de imidocarbamato substituído
-R-NCS Isotiocianato	-NH ₂	Formação de isotiouréia substituída
 Isocianato	-NH ₂	Formação de isouréia substituída
 Carbonato cíclico	-NH ₂	Formação de ligação amida
 Triazinil	-NH ₂	Arilação
  Ex: oxirano	-NH ₂ -OH -SH	Alquilação

Continua...

TABELA 1.2 - Métodos de imobilização de proteínas por ligações covalentes

Grupos reativos no suporte	Grupos reativos na proteína	Química de imobilização
-O-CH ₂ -CH ₂ -SO ₂ -CH=CH ₂ Vinil sulfonil	-NH ₂ -SH -OH	Conjugação
-CHO Aldeído	-NH ₂	Formação de base de Schiff
$\text{---}^+\text{NH} = \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{R}_1 \\ \diagdown \text{R}_2 \end{array}$ Imina	-CO ₂ H -NH ₂	Reação de Ugi
$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{---C---OC}_2\text{H}_5 \end{array}$ Imidoéster	-NH ₂	Amidação
$\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{---S} \\ \\ \text{---S} \end{array}$ Tiolsulfonato	-SH	Substituição tiol- dissulfeto
$\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{---S} \\ \\ \text{---S} \end{array}$ Tiolsulfinato	-SH	Substituição tiol- dissulfeto
$\text{---S---S---} \begin{array}{c} \text{C}_5\text{H}_4\text{N} \end{array}$ 2-piridildissulfeto	-SH	Substituição tiol- dissulfeto

Fonte: adaptado de GIACOMINI (2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Construir um biocatalisador da protease TEV pela imobilização em agarose ativada para clivar a cauda de histidinas de proteínas recombinantes

2.2 Objetivos específicos

- Produzir a protease recombinante TEV não mutada (*wild type* - TEV_{WT}) e mutada (TEV_{SH}) e o substrato da TEV, a proteína fosfotirosina fosfatase de *T. cruzi* pela super-expressão em *E. coli* e purificação por cromatografia de afinidade
- Sintetizar os suportes tiolsulfonato-agarose, glutaraldeído-agarose e epóxi-agarose
- Imobilizar a protease TEV nos diferentes suportes sintetizados
- Avaliar e comparar as propriedades bioquímicas da protease TEV solúvel e imobilizada
- Analisar se a remoção da cauda de histidina, pelo biocatalisador de TEV, melhora as propriedades funcionais da fosfotirosina fosfatase de *T. cruzi*

3. METODOLOGIA

3.1. Transformação das bactérias *E. coli*

3.1.1 Obtenção de células competentes para transformação

A metodologia empregada é baseada no protocolo descrito por Ausubel et al. (1995) e tem por finalidade através de tratamento químico tornar cepas bacterianas capazes de incorporar facilmente fragmentos de DNA. As bactérias *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS foram semeadas separadamente em meio LB-ágar (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, ágar 1,5% em pH 7,5) pelo método de esgotamento e mantidas em estufa a temperatura de 37°C por 16 h. Após esse período, uma colônia foi semeada em 10 ml de meio LB (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% em pH 7,5) e mantidas a 37°C com agitação até atingir a DO₆₀₀ 0,4. As bactérias foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso com 25 ml de CaCl₂ 0,1 M a 4 °C e deixado no gelo por 1 h. As bactérias foram então centrifugadas 10 min a 2500 x g e o precipitado foi suspenso com 5 ml de CaCl₂ 0,1 M a 4°C contendo glicerol 20% e mantido 30 durante min em banho de gelo. Posteriormente, as bactérias foram aliquotadas em frações de 150 μ l e armazenadas a -80 °C.

3.1.2 Transformação das bactérias *E. coli*

As bactérias *E. coli* DH5 α e BL21(DE3) foram transformadas com o vetor que contém a seqüência de nucleotídeos que codificam a protease TEV_{WT}, fornecido pelo Laboratório de Bioquímica Estrutural do Instituto Pasteur de Paris. Um volume de 2 μ l de plasmídeo foi

acrescentado a 100 µl de bactérias competentes e mantido 30 min a 4 °C, 2 min a 42 °C e novamente a 4 °C por 2 min. Após esse período, foram adicionados 500 µl de meio LB e as bactérias foram mantidas a temperatura de 37 °C por 1 h. As bactérias foram então semeadas em placa de petri com meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/ml) e mantidas a temperatura de 37 °C por 16 h.

Para a obtenção de transformantes da protease TEV_{SH}, bactérias *E. coli* DH5α e BL21(DE3) pLysS foram transformadas com o vetor pTH24-TEV_{SH} obtido do grupo de Helena Berglund (Instituto Karolinska, Suécia) (VAN DEN BERG et al., 2006), conforme protocolo descrito anteriormente. Para a seleção de bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com o plasmídeo, foi adicionado cloranfenicol (50 µg/ml) ao meio de cultivo LB-ágar, além da ampicilina.

O substrato utilizado para os ensaios de atividade da protease TEV foi a proteína fosfotirosina fosfatase de *T. cruzi* (PTP) de aproximadamente 20 kDa, a qual foi clonada pelo grupo do Prof. Samuel Goldenberg (Instituto de Biologia Molecular do Paraná-IBMP, Brasil). O vetor de clonagem foi o pDEST17, o qual permite a inserção de um sítio de clivagem da TEV entre a cauda de histidinas e a sequência da proteína recombinante. As bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram transformadas com esse vetor e selecionadas adicionando-se ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (50 µg/ml) ao meio de cultivo LB-ágar.

Com as colônias de *E. coli* DH5α transformadas foi realizado um cultivo de 5 ml de LB contendo ampicilina (100 µg/ml) para a preparação de um estoque de DNA plasmidial, utilizando-se para extração do DNA o kit MiniPrep-QIAGEN, seguindo o protocolo padrão do fabricante. Para posterior expressão das proteínas, foi preparado um estoque a -20°C de bactérias *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS transformadas a partir de um precipitado de 50 ml de cultivo, suspenso em glicerol 50 % previamente autoclavado.

3.2 Expressão das proteínas recombinantes

3.2.1 Expressão da protease TEV_{WT}

Para a expressão da protease TEV_{WT}, 10 ml de LB-ampicilina (100 µg/ml) foram inoculados com o estoque de bactérias *E. coli* BL21(DE3)-TEV_{WT} mantidas em glicerol a -20°C. O crescimento foi realizado a 37°C por 16 h e utilizado para inocular 1 l de LB-ampicilina (100 µg/ml) a uma diluição 1:200. O cultivo foi mantido a temperatura de 37°C sob vigorosa aeração (140 rpm) até uma DO₆₀₀ correspondente a fases de crescimento exponencial previamente determinadas. Foram realizados testes de expressão da protease TEV_{WT} com 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) nas seguintes condições: 3 h a 37°C, com indução no início da fase exponencial (DO₆₀₀ ~0.02), metade da fase exponencial (DO₆₀₀ ~0.30) e final da fase exponencial (DO₆₀₀ ~1.2) e também 16 h a 15°C, 22°C e 30°C com indução na metade da fase exponencial. Após esses períodos, os cultivos foram centrifugados a 2500 x g por 20 min e os sobrenadantes descartados. A protease TEV_{WT} foi purificada da fração solúvel e insolúvel.

3.2.2 Expressão da protease TEV_{SH} e da proteína PTP de *T. cruzi*

Para a expressão da protease TEV_{SH} e da proteína PTP foram utilizadas os estoques de bactérias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas que estavam armazenadas em glicerol a -20°C. O crescimento foi realizado a 37°C conforme descrito para a protease TEV_{WT} até uma DO₆₀₀ de ~0.6, adicionando-se cloranfenicol (50 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml) ao meio de cultivo. A expressão da protease TEV_{SH} foi induzida com 1,0 mM de IPTG por um período de 20 h a 20°C conforme descrito por van den Berg et al. (2006) e a expressão da PTP foi

realizada com 0,5 mM de IPTG durante 16 h a 15°C. Após esses períodos, os cultivos foram centrifugados a 2500 g por 20 min e os sobrenadantes descartados. As proteínas foram purificadas a partir da fração solúvel.

3.3 Purificação das proteínas recombinantes

3.3.1 Purificação da protease TEV_{WT} a partir da fração solúvel

As células frescas, obtidas de 1 l de cultivo realizado com indução a 30°C e 22°C durante 16 h foram suspensas em 30 ml de tampão de lise em condições não desnaturantes (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, glicerol 10 %, imidazol 10 mM e inibidores de protease) (Boehringer Maneheim, GmbH, Germany) e rompidas por sonicação (Fisher Scientific Model 60 Sonic Dismembrator) em 10 ciclos de 1 min em banho de gelo. O sobrenadante de lise foi centrifugado a 4°C por 1 h a 8500 x g e depois imobilizado em 3 ml de suporte *Chelating Sepharose* (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) previamente ativada com CuSO₄ 0,1 M, por 1 h a temperatura ambiente sob agitação constante. Para eliminar os contaminantes, o suporte foi lavado com tampões de lavagem (Tampão A: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, glicerol 10%, imidazol 20 mM, triton X-100 0,5%, β-mercaptoetanol 1 mM e Tampão B: o mesmo que A, mas com imidazol 30 mM). A protease TEV_{WT} foi eluída do suporte em 5 etapas: quatro eluições com 3 volumes de coluna (VC) com tampão A sem triton X-100, contendo imidazol 300 mM e uma última eluição com 3 VC com o mesmo tampão contendo imidazol 500 mM.

3.3.2 Purificação da protease TEV_{WT} a partir da fração insolúvel

As células frescas, obtidas de 1 l de cultivo foram suspensas em 50 ml de tampão de lise em condições desnaturantes (Tris-HCL 10 mM, pH 8,0, NaH₂PO₄ 100 mM, GuHCl 6 M), mantidas em banho-maria 65°C por 30 min para dissolver o precipitado e posteriormente submetidas à sonicação. O sobrenadante foi centrifugado e imobilizado em 4 ml de suporte *Chelating Sepharose*, conforme o protocolo descrito anteriormente. As lavagens do suporte e eluição da proteína foram realizadas utilizando o tampão (NaH₂PO₄ 100 mM, uréia 8 M, Tris-HCl 10 mM) a diferentes pHs (lavagem: pH 8.0 e pH 6.0 e eluição: pH 4.0). O suporte foi lavado 4 vezes com 5 VC a pH 8,0 e pH 6,0 e eluída 4 vezes a pH 4,0, utilizando-se 3 VC. Para a renaturação da proteína, as eluições foram ajustadas a pH 8,5 e a proteína foi dialisada 2 vezes a 4°C em tampão de diálise (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, NaCl 500 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 20%, DTT 5 mM) e por último dialisada duas vezes no mesmo tampão contendo glicerol 40%.

3.3.3 Purificação da TEV_{SH} e da PTP de *T. cruzi* a partir da fração solúvel

Para a purificação da TEV_{SH}, foi utilizado o protocolo de purificação da TEV_{WT} a partir da fração solúvel com modificações: foram utilizados 50 ml de tampão de lise; o sobrenadante de lise foi imobilizado em 6 ml de suporte a 4°C e os tampões de lavagem não continham triton X-100 (adaptado de VAN DEN BERG et al., 2006). A proteína foi dialisada em tampão C (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, EDTA 2 mM, glicerol 20%, DTT 2 mM) com concentrações decrescentes de imidazol (150 mM, 75 mM, 35 mM e sem imidazol). O mesmo procedimento foi realizado para a proteína PTP de *T. cruzi*, porém suspendendo-se as células obtidas a partir de 1 l de cultura em 30 ml de tampão de lise, imobilizando-se o sobrenadante de lise em 3 ml de resina a 4°C e utilizando-se os tampões de lavagem A e B, contendo triton X-100 0,5%.

Depois da diálise, as proteínas TEV_{WT}, TEV_{SH} e PTP foram centrifugadas a 2500 g por 10 minutos para eliminar os possíveis materiais precipitados e concentradas por ultrafiltração (Amicon Ultra-15 Millipore, membrana de poro de 10 kDa). A concentração protéica foi determinada por uma curva de calibração obtida com diferentes concentrações de BSA 1 mg/ml utilizando a metodologia de Bradford (Biorad) (BRADFORD, 1976). A pureza das amostras foi analisada por eletroforese em gel SDS-PAGE 12% (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), corado com Azul de Coomassie R-250.

Para melhorar a purificação das proteínas e separar as proteínas monoméricas dos possíveis agregados presentes nas amostras, foi realizada uma etapa adicional de gel filtração. Foi utilizada a coluna Superdex 200 16/60 em um sistema HPLC (AKTA Basic, General Eletrics) para a análise de quantidades preparativas de proteína. A coluna de 150 ml foi lavada com 2 VC de água MilliQ (previamente degaseificada durante 15 min ao vácuo) e equilibrada com 2 VC do tampão C previamente filtrado por 0.22 µm (Millipore) e degaseificado. Foram injetados 5 ml de cada amostra a um fluxo de 0,8 ml/min. O volume dos picos correspondentes a TEV_{WT}, TEV_{SH} e PTP foram coletados, concentrados (Amicon Ultra-15 Millipore, membrana de 10kDa) a 2 mg/ml, aliqotados e congelados a -20 °C.

3.4 Obtenção e caracterização do biocatalisador de TEV imobilizada

As proteases TEV_{WT} e a TEV_{SH} foram imobilizadas covalentemente em três suportes de agarose: um ativado com grupos tiolsulfonato (TSI-agarose) (BATISTA-VIEIRA et al., 1994), outro com grupos aldeído (G-agarose) (GUISÁN et al, 1997) e outro ativado com grupos tiol e epóxi (GRAZÚ et al., 2003). Estes suportes foram sintetizados durante um estágio realizado no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Química de Montevideú, o

qual é dirigido pelo Dr. Batista Vieira. Este grupo possui reconhecida experiência em imobilização de proteínas.

3.4.1 Síntese do suporte tiolsulfinato –agarose

O suporte tiolsulfinato-agarose (TSI-agarose) foi preparado e titulado, essencialmente como descrito por Batista-Vieira et al (1994). Neste método, primeiramente ocorre a reação da epícloridina com a agarose em meio alcalino, formando grupos oxirano. Os grupos oxiranos reagem com tiosulfato de sódio e são convertidos a grupos tiolsulfato, os quais são finalmente reduzidos com DTT a grupos tiol. A formação dos grupos tiolsulfinato ocorre em duas etapas: primeiramente os grupos tiol são oxidados com ferrocianeto de potássio formando estruturas de dissulfeto e posteriormente ocorre a formação dos grupos tiolsulfinatos através do controle da oxidação dos grupos dissulfeto da agarose com o agente oxidante monoperóxifalato de magnésio (Figura 4.6 A). Para quantificar os grupos tiolsulfinato, primeiramente é adicionado glutathiona reduzida (GSH) ao suporte e depois os grupos GSH livres na solução são titulados. Os grupos GSH livres reagem com 2,2'-dipiridildissulfeto (2-PDS) formando 2-tiopiridona e a absorvância é medida a 343 nm. O coeficiente de extinção molar para a 2-tiopiridona a 343 nm é $8.02 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.4.2 Síntese do suporte glutaraldeído-agarose

O suporte glutaraldeído-agarose (G-agarose) foi preparado e titulado conforme descrito por Guisán et al. (1997). Neste método, primeiramente ocorre a reação da agarose com glicidol em meio alcalino na presença de borohidreto de sódio. O suporte gliceril-agarose formado na reação é oxidado com periodato de sódio a glioxil-agarose. Os grupos aldeídos

obtidos são titulados através de uma titulação indireta com iodeto de potássio pelo não consumo de periodato de sódio. O suporte glioxil-agarose é tratado com etilediamina a pH 10,0 formando bases de Schiff, em seguida reduzidas com borohidreto de sódio para formar ligações alquil-amina estáveis (suporte amina-agarose). Foram sintetizados dois suportes, um com alta e outro com baixa carga de grupos amina. A última etapa da síntese do suportes G-agarose consiste na reação dos grupos amina com glutaraldeído, formando suporte Glutaraldeído-agarose (Figura 4.6 B).

3.4.3 Síntese do suporte epóxi-piridil-dissulfeto agarose

O suporte epóxi-piridil-dissulfeto agarose (ET-agarose) foi preparado conforme o método descrito por Grazú et al. (2003), com algumas modificações. Para a síntese dos grupos epóxi, adicionou-se epícloridina em meio alcalino às esferas de agarose, como descrito por Axén et al. (1975). A análise dos grupos epóxi foi realizada conforme descrito por Sundberg e Porath (1974). Para parcial tiolação desses grupos com DTT, 200 ml de bicarbonato de potássio 0,2 M, pH 8,5 e 200 ml de EDTA 1 mM contendo DTT 22 mM foram adicionados a 10 g de suporte epóxi-agarose previamente lavado com água destilada. A mistura foi mantida a temperatura ambiente durante 1 h e a reação foi parada com a lavagem do suporte por filtração em um frasco de sucção com bicarbonato de potássio pH 8,5, água destilada e finalmente com acetato de sódio pH 5,0. O suporte parcialmente tiolado foi armazenado em fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 a 4°C até o uso. A quantidade de grupos tióis no suporte de agarose parcialmente tiolado foi determinada espectrofotometricamente pela titulação com 2-PDS (solução saturada 1,5 mM preparada durante 30 min de agitação e posterior filtração) dissolvida em fosfato de sódio 0,1 M, de acordo com Brocklehurst et al. (1973). Em seguida, o suporte epóxi-agarose parcialmente tiolado foi suspenso em 200 ml de uma solução 1:2

(v/v) de fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0 e acetona, contendo 2-PDS em excesso de duas vezes em relação à quantidade de grupos tióis do suporte. A suspensão foi agitada durante uma 1 h a temperatura ambiente e depois o suporte foi lavado com fosfato de sódio 0,1 M pH 8,0 e com EDTA 1 mM. O suporte epóxi-piridil-dissulfeto agarose (ET-agarose) formado foi armazenado em fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 a 4°C. A titulação dos grupos 2,2-piridilssulfeto é baseada na liberação da 2-tiopiridona após redução do suporte 2-piridilssulfeto-agarose com DTT. Para a quantificação, uma alíquota do suporte seco por vácuo foi suspensa em fosfato de sódio 0,1 M pH 8,0, contendo DTT 25 mM e mantida sob agitação a temperatura ambiente durante 30 min. O sobrenadante foi filtrado e a absorbância medida a 343 nm. O coeficiente de extinção molar para a 2-tiopiridona a 343 nm é $8.02 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.4.4 Imobilização da protease TEV em TSI-agarose

Para imobilizar a TEV pelos grupos tiol das cisteínas, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 contendo 1 mg de enzima a 0,1 g do suporte TSI-agarose seco vácuo. A imobilização foi realizada a 4°C por 16 h com agitação e em seguida o suporte foi lavado com o mesmo tampão de diluição da enzima. Para o bloqueio dos grupos reativos remanescentes, 0,1 g do suporte TSI-agarose seco por vácuo foi suspenso em 1 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 contendo glutatona reduzida 2,5 mM e mantido a temperatura ambiente com agitação durante 60 min. Posteriormente, o suporte foi lavado com 3 ml de tampão D (fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, NaCl 0,5 M), lavado 3 vezes com 3 ml de tampão E (fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, glutatona reduzida 2,5 mM) e adicionou-se 1 ml de tampão E e manteve-se a temperatura ambiente com agitação por 30 min. Em seguida, lavou-se novamente o suporte TSI-agarose com 3 ml de tampão D, com 3 ml de tampão E e novamente

com 3 ml de tampão D. Finalmente, o suporte foi lavado com 5 ml de tampão de atividade (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM) e utilizado imediatamente.

3.4.5 Imobilização da protease TEV em G-agarose

O suporte G-agarose que permite a imobilização da protease TEV pelos grupos ϵ -amino das lisinas foi obtido a partir da ativação de um suporte amino-agarose com alta carga de grupos reativos (75 μ moles de grupos amino / g de gel seco por vácuo) e outro com baixa carga (15 μ moles de grupos amino / g de gel seco por vácuo) com glutaraldeído. Para isso, 0,1 do suporte amino de alta e baixa carga foram suspensos em 112 μ l de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0. Em seguida, foram adicionados 168 μ L de glutaraldeído 25% e agitou-se a temperatura ambiente por 12-14 h. Após esse período, os suportes foram lavados abundantemente com água destilada e equilibrados com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 8,0. Esses suportes foram chamados de G75-agarose e G15-agarose, de acordo com a quantidade de μ moles de grupos amino / g de gel seco por vácuo que continham previamente à ativação com glutaraldeído.

Para a imobilização da protease TEV, foi adicionado 1 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 contendo 1 mg de enzima a 0,1 g de suporte G75-agarose e G15-agarose secos por vácuo. A imobilização foi realizada a 4°C por 16 h com agitação. Ao término desse período, os suportes foram lavados com o mesmo tampão utilizado na imobilização da enzima. Para a redução das bases de Schiff formadas e bloqueio dos grupos aldeído remanescentes nos suportes, 0,1 g de cada suporte foi suspenso em 1 ml de tampão carbonato de sódio 40 mM pH 10,0 contendo 1 mg/ml de borohidreto de sódio e mantidos a temperatura ambiente sob agitação durante 30 min. Posteriormente, os suportes foram lavados com tampão de atividade e utilizados imediatamente.

3.4.6 Imobilização da protease TEV em ET-agarose

O suporte ET-agarose faz parte de uma nova geração de suportes multifuncionais, o qual contém uma pequena quantidade de grupos tiol e uma maior quantidade de grupos epóxi. Primeiramente, para a imobilização pelos grupos tiol do suporte, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 contendo 1 mg de TEV em 0,1 g de suporte ET-agarose seco por vácuo. A mistura foi agitada levemente por 16 h a temperatura ambiente e o sobrenadante foi removido. Para posterior imobilização pelos grupos epóxi, foi adicionado 1 ml de tampão carbonato de sódio 40 mM, pH 9,0, contendo glicerol 20% ao suporte TEV_{SH}-ET-agarose e a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 24 h. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os grupos epóxi remanescentes no suporte foram bloqueados com 400 µl de glicina 3 M, pH 8,50 por 24 h a temperatura ambiente com agitação. Em seguida o suporte TEV_{SH}-ET-agarose foi lavado abundantemente com tampão fosfato de sódio 50 mM e utilizado imediatamente.

3.4.7 Determinação do rendimento da imobilização nos suportes

O rendimento da imobilização da protease TEV nos suportes TSI-agarose, G-agarose e ET-agarose foi determinado através da quantificação das bandas do gel SDS-PAGE da quantidade de protease aplicada ao suporte e da quantidade presente no sobrenadante da imobilização e nos lavados utilizando-se o programa *Scion Image Analysis* (Scion Corporation, EUA). A quantidade de proteína imobilizada representa a diferença entre a quantidade de TEV oferecida ao suporte e a quantidade de proteína recuperada no sobrenadante e lavagens. Os resultados foram expressos em porcentagem, considerando como 100% a quantidade de proteína oferecida ao suporte.

3.5 Teste de atividade da protease TEV solúvel e imobilizada

Para os testes de atividade da protease TEV utilizou-se como substrato a proteína PTP de *T. cruzi* de aproximadamente 20 kDa, a qual contém uma cauda de histidinas (MSYYHHHHHHLESTSLYKKAGS) e um sítio de clivagem da TEV (ENLYFQG).

Para os primeiros testes de atividade da TEV solúvel, foi utilizado uma relação molar enzima:substrato de 1:5, correspondendo a 10 µg de PTP e 3 µg de TEV_{WT} e TEV_{SH} em um volume final de 30 µl de tampão de atividade. A reação ocorreu por 24 h a temperatura ambiente e ao final desse período retirou-se uma alíquota de 12 µl. A reação enzimática foi parada adicionando-se 4 µl de tampão de amostra (5x) (Tris-HCl 0.5 M, pH 8,2, glicerol 10 %, SDS 10 %, DTT 250 mM, azul de bromofenol 0,001 %) e aquecendo-se por 5 min a 95°C. A amostra foi analisada por SDS-PAGE 15%. Para os primeiros testes de atividade da protease TEV imobilizada utilizou-se uma relação molar enzima:substrato de 3,4:1. Adicionou-se 250 µl de tampão de atividade contendo 100 µg de PTP a 0,1 g de cada suporte em uma coluna. A mistura foi mantida a temperatura ambiente com agitação durante 24 h. Ao final da reação, o sobrenadante foi removido por filtração, o suporte foi lavado com tampão de atividade e suspenso em 250 µl do mesmo tampão. Retirou-se uma alíquota de 12 µl do sobrenadante e da suspensão do suporte e analisou-se por SDS-PAGE 12%. A quantidade de PTP clivada e não clivada foi determinada através da quantificação das bandas no gel SDS-PAGE utilizando-se o programa *Scion Image Analysis* (Scion Corporation, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de substrato PTP clivado, considerando como 100% a quantidade de substrato clivado e não clivado presente no gel SDS-PAGE.

3.6 Comparação da atividade da protease TEV solúvel e imobilizada

Para comparar o perfil cinético da protease TEV solúvel e imobilizada em TSI-agarose, foram utilizados 0,04 μg de protease TEV $\times \mu\text{l}^{-1}$ solúvel ou suspensão da protease TEV imobilizada em TSI-agarose e uma relação enzima:substrato de 1:6,5. Para a TEV solúvel, 2,28 μg da TEV_{SH} foram adicionados a 15 μg de PTP em um volume final de 65,5 μl de tampão de atividade. Para a enzima imobilizada, 19 μg of TEV_{SH} foram adicionados a 125 μg de PTP em um volume final de 625 μl de tampão de atividade. A mistura foi agitada a temperatura ambiente, removeram-se alíquotas de 12,5 μl a diferentes intervalos de tempo e analisou-se por SDS-PAGE. A quantidade de PTP clivada e não clivada foi determinada através da quantificação das bandas no gel SDS-PAGE utilizando-se o programa *Scion Image Analysis* (Scion Corporation, EUA). Esta quantificação permitiu calcular os μg de PTP clivada $\times \mu\text{g TEV}^{-1}$ e fazer um gráfico desses resultados em função do tempo de reação. A atividade da TEV foi determinada na região linear do gráfico e expressa em μg de PTP clivada $\times \mu\text{g TEV}^{-1} \times \text{h}^{-1}$. Para avaliar se existiam ou não problemas difusionais do substrato, foram realizados também experimentos utilizando uma relação enzima:substrato de 1:13 além de 1:6,5.

3.7 Teste de estabilidade da protease TEV solúvel e imobilizada

Para avaliar a estabilidade de armazenamento, uma solução da TEV_{SH} solúvel e uma suspensão padrão da enzima imobilizada em TSI-agarose, ambas contendo 0,76 $\mu\text{g/ml}$ foram armazenadas na geladeira a 4°C por 16 dias em tampão de atividade. Alíquotas foram removidas a diferentes períodos de tempo e a atividade enzimática residual foi determinada como descrito no item 3.7.

3.8 Capacidade de reutilização do biocatalisador da protease TEV

A protease TEV imobilizada no suporte TSI-agarose foi submetida a cinco ciclos de clivagem. O biocatalisador utilizado nos ciclos de reuso continha 5 mg de TEV_{SH} / g de suporte. Uma quantidade de 0,1 g do biocatalisador foi adicionada a 100 µg de substrato PTP em um volume final de 250 µl de tampão de atividade. A reação ocorreu a temperatura ambiente com agitação durante 24 h. Ao término desse período, o sobrenadante da reação foi analisado por SDS-PAGE 12% e os µg de PTP clivados determinados como descrito no item 3.5. Os resultados foram expressos em porcentagem, considerando como 100% a quantidade de substrato PTP clivado e não clivado. Antes de começar o próximo ciclo, o biocatalisador foi lavado abundantemente com tampão de atividade e armazenado 24 h a 4°C no mesmo tampão contendo glicerol 10%. Foram realizados cinco ciclos de clivagem (24 h a temperatura ambiente) com intervalos de 24 h (armazenamento a 4°C) entre cada ciclo, totalizando 10 dias de experimento.

3.9 Ensaios funcionais com a PTP de *T. cruzi*

A atividade da PTP de *T. cruzi* com e sem cauda de histidinas foi medida a 30°C e a 37°C em 400 µl de tampão Hepes 20 mM, pH 7,0, DTT 20 mM, utilizando p-nitrofenol fosfato 40 mM (pNPP) como substrato. Utilizou-se $1,5 \times 10^{-3}$ µmoles de PTP por reação e a quantidade de p-nitrofenol produzida foi determinada através da absorbância a 410 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de $17,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das proteínas recombinantes

4.1.1 Otimização das condições de expressão da protease TEV_{WT}

A produção de grandes quantidades da protease TEV_{WT} é dificultada devido à baixa solubilidade da proteína expressa em *E. coli*. Dessa forma, numa primeira etapa foram otimizadas as condições de expressão com o objetivo de obter uma maior quantidade da protease TEV_{WT} na fração solúvel que o descrito anteriormente (1mg/l de cultivo) (PARKS et al., 1995). A expressão da protease TEV_{WT} foi realizada a diferentes temperaturas (15°C, 22°C, 30°C e 37°C) e fases de crescimento da cepa de *E. coli* transformada com o vetor que contém a seqüência de nucleotídeos que codifica para a TEV_{WT}. As fases de crescimento da cepa de *E. coli* transformada foram previamente determinadas, medindo-se a DO a 600 nm em função do tempo (Apêndice A). A figura 4.1 A mostra o gel SDS-PAGE da indução a 37°C (3h) em três fases diferentes de crescimento exponencial bacteriano. Nessas condições, observou-se que a protease TEV_{WT} foi expressa principalmente na fração insolúvel e que a maior quantidade de proteína foi obtida quando a expressão foi realizada na metade da fase exponencial. Uma das estratégias utilizadas para aumentar a solubilidade das proteínas recombinantes é baixar a temperatura de expressão (BANEYX, 1999) para a síntese protéica ocorrer mais lentamente. Dessa forma, realizaram-se outros testes de expressão a 15°C, 22°C e 30°C, com indução na metade da fase exponencial como definido a 37°C. Na temperatura de 15°C não foi detectada expressão da protease TEV_{WT} em nenhuma das frações (solúvel e insolúvel). Nas temperaturas de 22°C e 30 °C, a proteína foi expressa na fração solúvel e insolúvel, porém em pequena quantidade (Figura 4.1 B). Mesmo assim, purificou-se a

protease TEV_{WT} a partir da fração solúvel obtida de um litro de cultivo com indução a 22°C e 30°C, mas o rendimento foi menor que 1 mg/l de cultivo (dados não mostrados), insuficiente para realizar os estudos posteriores.

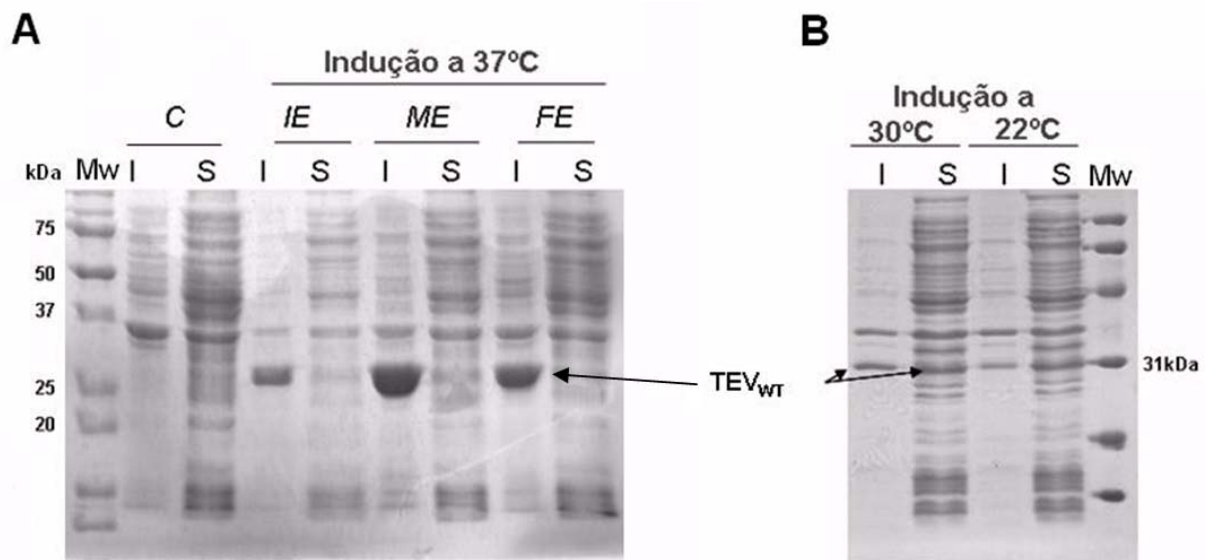


FIGURA 4.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% desnaturante (SDS-PAGE) das frações solúvel (S) e insolúvel (I) do extrato celular de *E. coli* BL21(DE3) expressando a protease TEV_{WT}. **(A)** As células foram induzidas por 3 h a 37°C com 0,5 mM IPTG a partir de culturas no início da fase exponencial. (IE: DO₆₀₀ ~0.02), metade da fase exponencial (ME: DO₆₀₀ ~0.30), final da fase exponencial (FE: DO₆₀₀ ~1.2) de crescimento. C: indica o extrato de células não induzidas com IPTG **(B)** Culturas de bactérias crescidas até a ME e induzidas com 0,5 mM de IPTG por 16 h a 22°C. Mw: marcador de massa molecular. A fração solúvel corresponde ao sobrenadante do lisado celular e a fração insolúvel ao precipitado celular suspenso com SDS 2%. O gel SDS-PAGE 15% foi corado com azul de Coomassie R-250.

4.1.2 Purificação das proteínas recombinantes

Como não foi possível melhorar a expressão da protease TEV_{WT} na fração solúvel, procedeu-se a purificação da proteína a partir da fração insolúvel. Utilizou-se o protocolo descrito por LUCAST e colaboradores (2001), porém utilizando-se as condições de expressão otimizadas neste trabalho: 3 h de indução a 37°C na metade de fase exponencial. As proteínas presentes na fração insolúvel de 1 l de cultivo foram dissolvidas e a protease TEV_{WT} foi purificada por cromatografia de afinidade a metal em condições desnaturantes. A proteína foi eluída da matriz e renaturada através de várias etapas de diálise para retirar gradualmente a

uréia. A figura 4.2 mostra o gel SDS-PAGE contendo as amostras das diferentes etapas da purificação por afinidade.

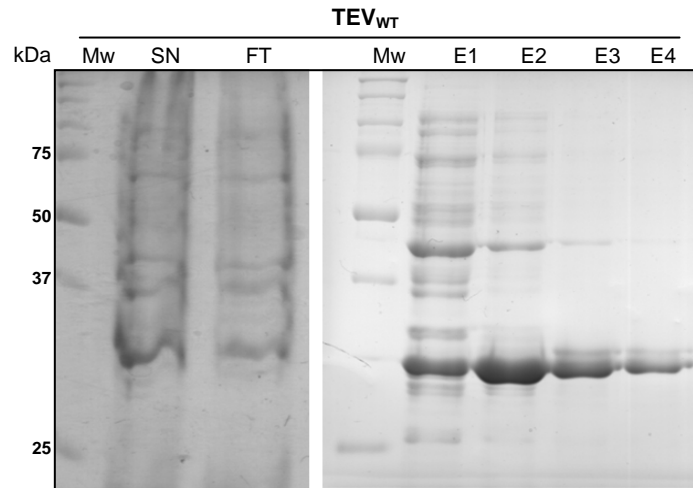


FIGURA 4.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% desnaturante (SDS-PAGE) da purificação por afinidade da protease TEV_{WT}. SN: sobrenadante do lisado celular após 3 h de indução com IPTG 0,5 mM a 37°C, FT: proteínas que não se ligaram no suporte de afinidade; E: eluições com 300 mM de imidazol, Mw: marcador de massa molecular. A migração das amostras do SN e FT está prejudicada devido à presença de cloreto de guanidina (GuHCl) nas amostras. O gel SDS-PAGE 15% foi corado com azul de Coomassie R-250.

Diferentemente da protease TEV_{WT}, o mutante solúvel TEV_{SH} e a proteína PTP de *T. cruzi* (substrato da protease TEV utilizado neste trabalho) foram obtidas da fração solúvel do extrato celular. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal em condições não desnaturantes a partir da fração solúvel, como descrito em materiais e métodos. A figura 4.3 mostra os géis SDS-PAGE da purificação por afinidade da protease TEV_{SH} e da proteína PTP.

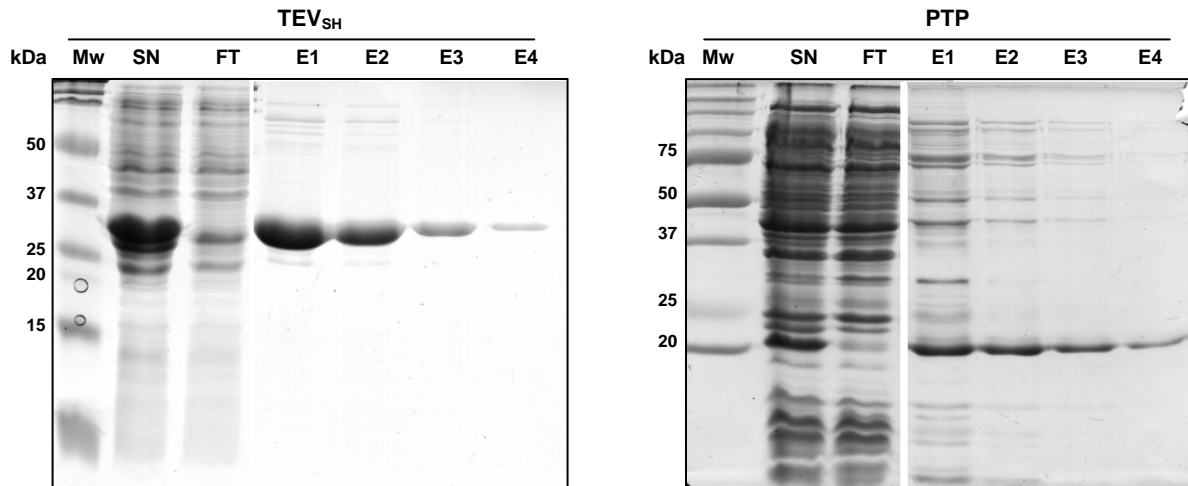


FIGURA 4.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% desnaturante (SDS-PAGE) da purificação por afinidade da protease TEV_{SH} e da proteína PTP. SN: sobrenadante do lisado celular, FT: proteínas que não se ligaram no suporte de afinidade; E: eluições com 300 mM de imidazol. Mw: marcedor de massa molecular. Os géis SDS-PAGE 15% foram corados com azul de Coomassie R-250.

A protease TEV em solução encontra-se na forma monomérica (PHAN et al., 2002) e para a PTP de *T. cruzi* não existiam evidências experimentais prévias, já que esta é a primeira vez que essa proteína foi purificada. Na literatura, os homólogos da família das PTPs são proteínas monoméricas em solução (VAN ETTEN, 2003). Dessa forma, para separar as proteínas monoméricas dos possíveis agregados presentes nas amostras e eliminar outros contaminantes, as proteínas purificadas por afinidade foram dialisadas, concentradas e posteriormente injetadas em uma coluna de gel filtração. A figura 4.4 mostra o perfil cromatográfico das proteínas TEV_{WT}, TEV_{SH} e PTP de *T. cruzi* eluídas da coluna Superdex 16/60 200. A TEV_{WT} e a TEV_{SH} eluíram da coluna de gel filtração em um volume de 87,3 ml e 85,6 ml, correspondendo a uma massa molecular de 29 kDa e 33 kDa respectivamente, o que indica que a protease TEV se encontra na forma monomérica. Os cálculos da massa molecular foram realizados de acordo com uma curva de calibração previamente elaborada injetando-se na coluna proteínas de massa molecular conhecida (Apêndice B). A proteína PTP eluiu da coluna em um volume de 96,5 ml, que corresponde a aproximadamente 20 kDa e que indica que a proteína é monomérica em solução, como seus homólogos. O gel SDS-PAGE dentro da figura 4.4 mostra as bandas das proteínas coletadas em cada pico e observa-se que

as massas moleculares são similares as massas nativas determinadas por gel filtração. Observa-se também que a TEV_{WT} após a etapa de gel filtração permanece com alguns contaminantes associados. O rendimento da purificação das proteínas a partir de 1 l de cultivo foi de 20 mg para a TEV_{WT} e TEV_{SH} e de 5 mg para o substrato PTP, o que foi suficiente para iniciar os próximos ensaios.

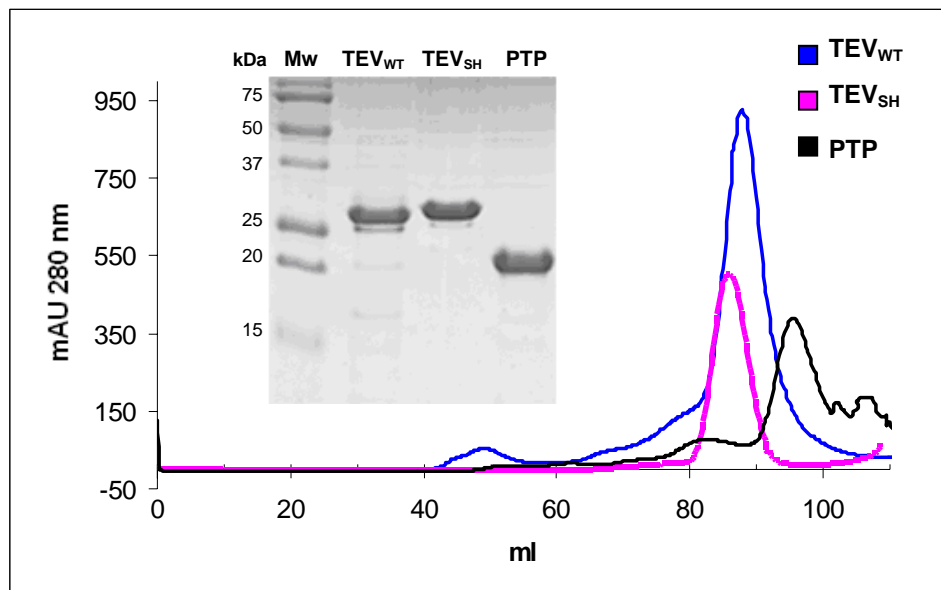


FIGURA 4.4 - Purificação das proteínas recombinantes por gel filtração. Perfil cromatográfico da protease TEV_{WT} e TEV_{SH} e da proteína PTP. Após purificação por afinidade, as proteínas foram dialisadas, concentradas e injetadas em uma coluna preparativa Superdex 200 16/60 (item 3.3.3, metodologia). A diferença do volume de eluição da TEV_{WT} e TEV_{SH} é devida as massas molecular das proteases serem diferentes, 29 kDa para a TEV_{WT} e 33 kDa para a TEV_{SH}. O pico da TEV_{SH} possui uma absorvância menor a 280 nm que a TEV_{WT} porque foram realizadas duas injeções com quantidades menores de proteína. Os picos correspondentes as proteínas foram coletados, concentrados e analisados por SDS-PAGE (12%) (figura inserida).

4.1.3 Teste de atividade da protease TEV solúvel

Para verificar se as proteases TEV_{WT} e a TEV_{SH} eram ativas, realizou-se uma reação de clivagem utilizando a proteína PTP como substrato. Após 24 de reação, retirou-se uma alíquota de 12 µl e analisou-se por SDS-PAGE (figura 4.5). Observou-se que a protease TEV_{WT} e a TEV_{SH} são ativas porque ocorreu a clivagem da cauda *His-tag*. No gel podemos

observar o desaparecimento quase total da banda da proteína PTP com cauda (20 kDa) e o aparecimento de duas novas bandas correspondentes à proteína PTP sem cauda (16,5 kDa) e à cauda *His-tag* liberada (3,5 kDa).

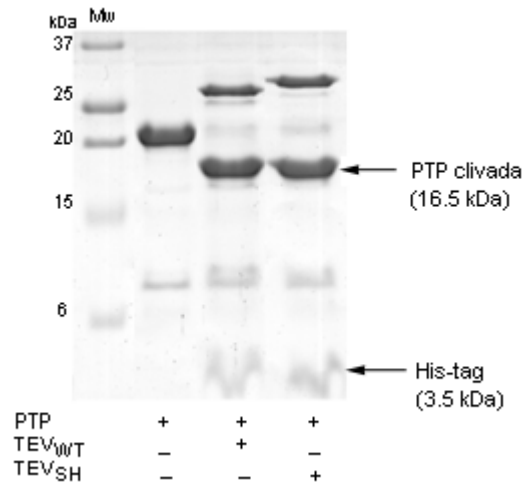


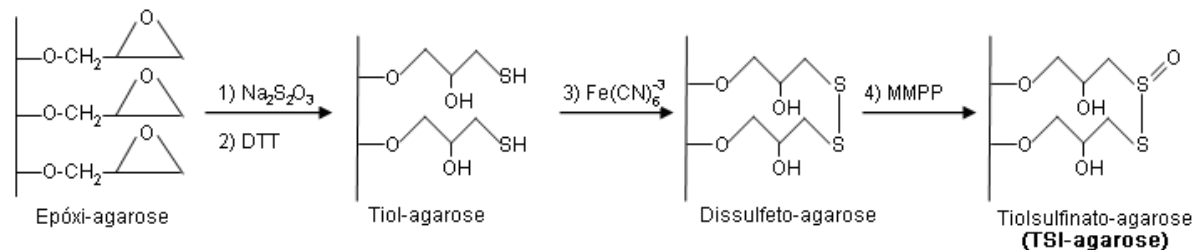
FIGURA 4.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % desnaturante (SDS-PAGE) da atividade da protease TEV_{WT} e TEV_{SH}. Adicionou-se 3 µg de TEV_{WT} e TEV_{SH} a 10 µg de PTP e manteve-se a temperatura ambiente durante 24 h (relação molar enzima:substrato 1:5). A clivagem da cauda da PTP (20 kDa) produziu um produto de 16,5 kDa e a cauda *His-tag* de 3,5 kDa. Mw: marcador de massa molecular. O gel SDS-15% foi corado com azul de Coomassie R-250.

4.2 Síntese dos suportes utilizados na imobilização da TEV

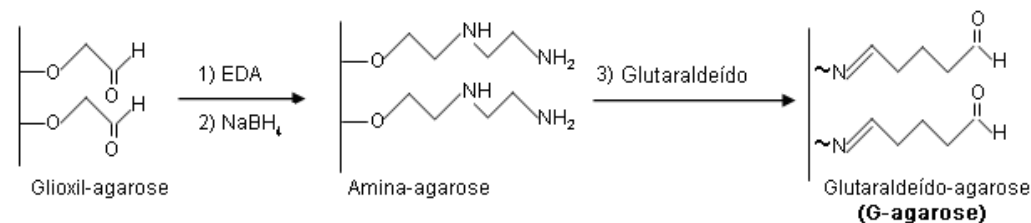
Os suportes foram sintetizados a partir de modificações dos grupos hidroxila da agarose, os quais permitem a introdução de grupos ativos para a imobilização covalente de enzimas através de protocolos relativamente simples. A figura 4.6 mostra os esquemas das sínteses dos diferentes suportes utilizados neste trabalho. A quantidade de grupos ativos (tiolsulfonato) do suporte TSI-agarose foi de 16 µmoles de grupos tiolsulfonato / g de suporte seco por vácuo. Esse tipo de suporte permite a imobilização de proteínas através dos grupos tiol das cisteínas. Para o suporte G-agarose, a quantidade de grupos amino previamente a ativação do suporte amina-agarose com glutaraldeído foi 75 µmoles de grupos amino / g de

gel seco por vácuo (G75-agarose) e 15 μ moles de grupos amino / g de gel seco por vácuo (G15-agarose). O suporte G-agarose permite a imobilização das proteínas através dos grupos ϵ -amino das lisinas. Para o suporte multifuncional ET-agarose, o número de grupos epóxi foi de 52,5 μ moles de grupos epóxi / g de gel seco por vácuo e de 1,27 μ moles de grupos tiol/ g de gel seco por vácuo. No suporte ET-agarose, a imobilização ocorre primeiramente pelos grupos tiol das proteínas e em uma segunda etapa através de outros grupos nucleófilos da superfície da proteína, como os grupos amino das lisinas.

A Síntese do suporte Tiolsulfinato-agarose



B Síntese do suporte Glutaraldeído-agarose



C Síntese do suporte Epóxi-piridil dissulfeto-agarose

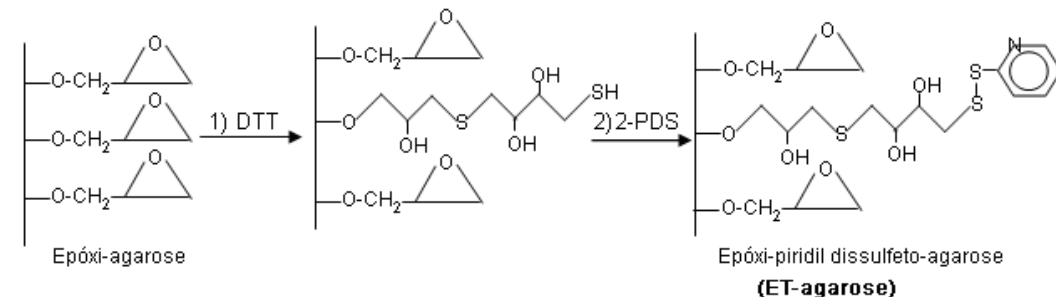


FIGURA 4.6 - Ilustração esquemática da síntese dos suportes. **(A)** Síntese do suporte TSI-agarose. 1) Reação dos grupos oxiranos com tiosulfato de sódio, formando grupos tiolsulfato, 2) posteriormente reduzidos a grupos tiol com DTT. 3) Oxidação dos grupos tiol com ferrocianeto de potássio Fe(CN)_6^{3-} formando estruturas de dissulfeto. 4) Formação dos grupos tiolsulfatos através da oxidação dos grupos dissulfeto da agarose com o agente oxidante monoperóxifalato de magnésio **(B)** Síntese do suporte G-agarose. 1) Reação do suporte glióxil-agarose com etilenodiamina (EDA), formando Bases de Schiff, 2) posteriormente reduzidas com borohidreto de sódio (NaBH_4). 3) reação dos grupos amina da agarose com glutaraldeído formando o suporte G-agarose. **(C)** Síntese do suporte ET-agarose. 1) Tioação parcial dos grupos epóxi com DTT. 2) oxidação dos grupos tiol com 2,2'-dipiridildissulfeto (2-PDS).

4.3 Imobilização da protease TEV

Previamente à realização dos experimentos de imobilização, analisou-se a seqüência e a estrutura da protease TEV utilizando o programa PyMol (DeLano Scientific LLC, EUA). As análises da estrutura mostraram que 12 das 14 lisinas presentes na protease TEV estão expostas e distribuídas por toda a superfície da proteína, das quais três estão próximas à entrada do substrato (K215, K220, K147) (Figura 4.7 A). A protease TEV possui 4 cisteínas, das quais somente 2 estão expostas (Cys 130 e Cys 110) e localizadas do mesmo lado da superfície da TEV e distantes do sítio ativo. A cisteína catalítica (Cys 151) está localizada no interior da molécula. Baseando-se nessas informações é possível esperar um comportamento diferente na imobilização da protease TEV pelas cisteínas e pelas lisinas. Alguns métodos de imobilização podem ocultar o sítio ativo ou distorcê-lo, diminuindo a atividade das enzimas imobilizadas (GÓMEZ et al., 2000; TURKOVA, 1999).

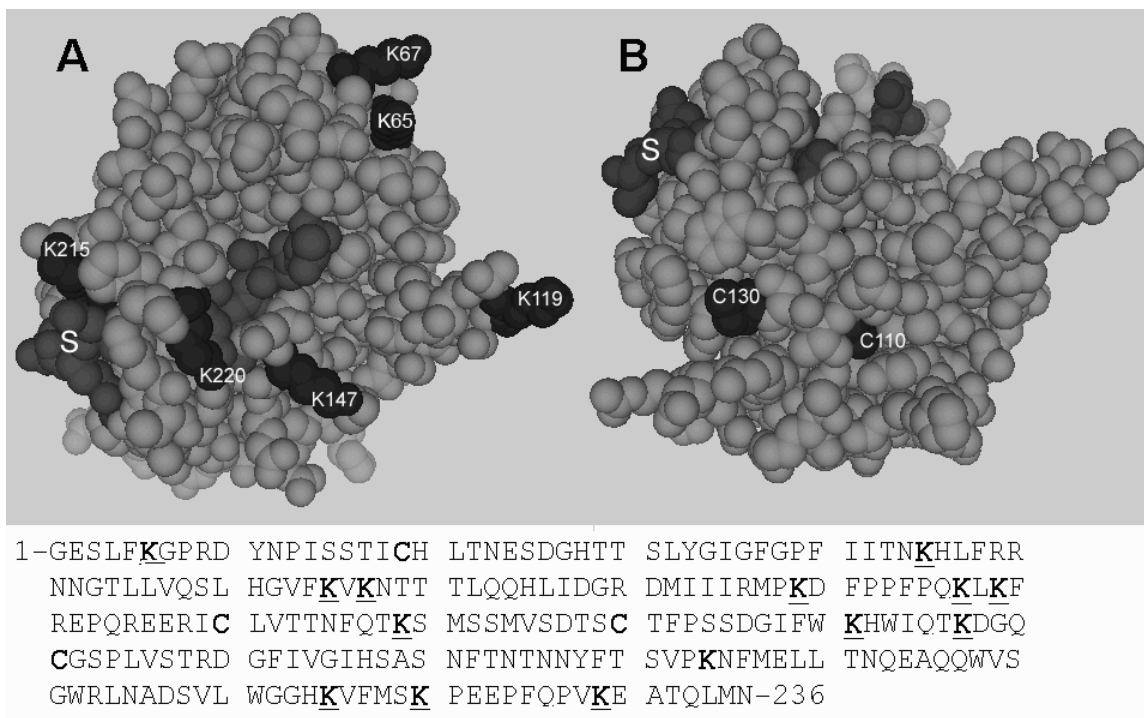
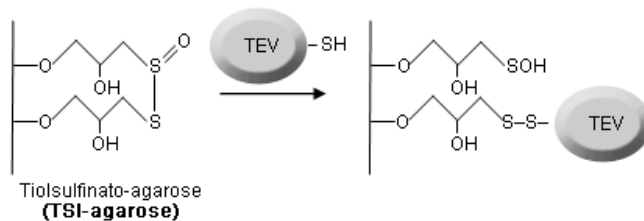


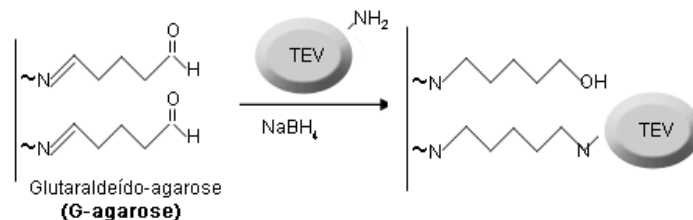
FIGURA 4.7 - Análise da seqüência e da estrutura da protease TEV. **(A)** Lisinas expostas do lado da entrada do substrato. **(B)** Cisteínas expostas da TEV. S: substrato peptídico (Phan et al., 2002). A TEV possui 14 Lis (negrito+sublinhadas) e 4 Cys (negrito). A análise da estrutura da TEV foi realizada utilizando dados da estrutura da protease TEV: PDB-1LVM e PDB-1LVB_B. As imagens foram criadas usando PyMol e a PDB-1LVB_B (estrutura da protease TEV complexada com o substrato TENLYFQSGT).

A imobilização da protease TEV no suporte TSI-agarose é baseada na reação dos grupos tiol (-SH) das cisteínas da proteína com os grupos dissulfeto presentes no suporte sólido (tiolsulfínatos) a pH neutro ou ligeiramente alcalino (Figura 4.8 B) (BATISTA-VIEIRA et al., 1994). O grupo tiol das cisteínas é o único grupo funcional que permite a imobilização covalente e reversível das proteínas. Embora a frequência (1,73 %) com que os grupos tiol se encontram nas proteínas (KARLSSON et al., 1998) e a exposição dos mesmos na superfície sejam baixas (HERMANSON, 1996), ele é o nucleófilo mais reativo encontrado nas proteínas (KARLSSON et al., 1998).

A Imobilização da TEV em TSI-agarose



B Imobilização da TEV em G-agarose



C Imobilização da TEV em ET-agarose

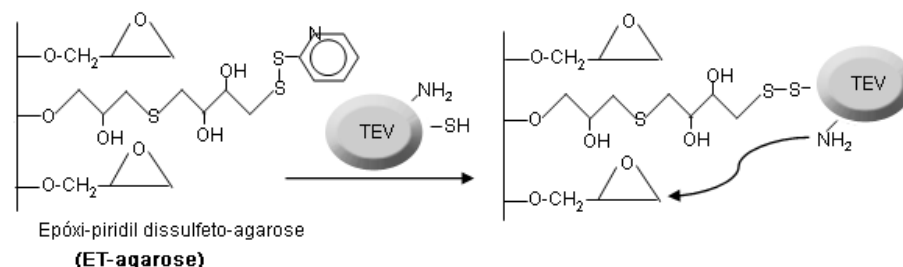


FIGURA 4.8 - Imobilização da protease TEV nos suportes. **(A)** Imobilização da TEV em TSI-agarose através dos grupos tiol das cisteínas. **(B)** Imobilização da TEV em G-agarose através dos grupos amino, formando bases de Schiff, posteriormente reduzidas com borohidreto de sódio. **(C)** Imobilização da TEV em ET-agarose, primeiramente pelos grupos tiol e em uma segunda etapa por outros nucleófilos da superfície da proteína.

A imobilização da protease TEV no suporte G-agarose é baseada na formação de uma base de Schiff entre os grupos carbonila do suporte ativado e os grupos ϵ -amino das lisinas da proteína (Figura 4.8 B). Uma desvantagem desse método é a reversibilidade das uniões por bases de Schiff em meio aquoso, principalmente em pHs baixos. Isso pode ser evitado pela redução das bases de Schiff com borohidreto de sódio, obtendo-se grupos alquilamino estáveis. Ao mesmo tempo, o tratamento com borohidreto de sódio também permite reduzir os grupos aldeído do suporte a grupos hidroxila, evitando ligações adicionais entre a proteína e grupos ativos remanescentes do suporte (CABRAL e KENNEDY, 1991). As lisinas são resíduos de aminoácidos hidrofílicos geralmente expostos na superfície da proteína. Quando estão desprotonadas, tornam-se nucleófilos muito reativos com átomos de cargas $+\delta$ localizadas nas superfícies dos suportes. Além disso, as lisinas geralmente não estão envolvidas no sítio ativo de proteínas (GUISÁN, 1988).

A última estratégia utilizada foi imobilizar a protease TEV em ET-agarose, onde a primeira reação ocorre entre os grupos tiol da proteína e o grupo tiol do suporte e em uma segunda etapa ocorre a ligação entre outros nucleófilos (Lys, His, Tyr, Ser, etc.) da superfície da proteína com os grupos epóxi do suporte (Figura 4.8 C). Esta estratégia desenvolvida recentemente é inovadora, porque permite direcionar o ataque da enzima ao suporte através de áreas definidas na proteína (GRAZÚ et al., 2003). O direcionamento ocorre pela imobilização das cisteínas em uma primeira etapa, porque os grupos tiol das mesmas são os nucleófilos mais reativos encontrados nas proteínas. Muitas proteínas não possuem cisteínas expostas e nesses casos os grupos tiol podem ser introduzidos quimicamente ou podem ser realizadas mutações na proteína para introduzir cisteínas.

Para a imobilização, foram oferecidos 1 mg de TEV_{WT} e TEV_{SH} a 0,1 g de suporte secos por vácuo de G-agarose, TSI-agarose e ET-agarose. As misturas foram mantidas a 4°C durante 18 h com agitação. O rendimento da imobilização foi determinado mediante a

quantificação da proteína clivada e não clivada presente nos géis SDS-PAGE, utilizando-se o programa *Scion Image Analysis* como descrito em materiais e métodos.

A figura 4.9 mostra que uma alta porcentagem da protease TEV oferecida aos suportes TSI-agarose e G-agarose foi imobilizada. No suporte TSI-agarose, 96% da protease TEV_{SH} e 75% da protease TEV_{WT} foram imobilizadas. No suporte G15-agarose foi observado um rendimento de 87% de imobilização da protease TEV_{SH}. No suporte ET-agarose o rendimento de imobilização foi 75% (Figura 4.10).

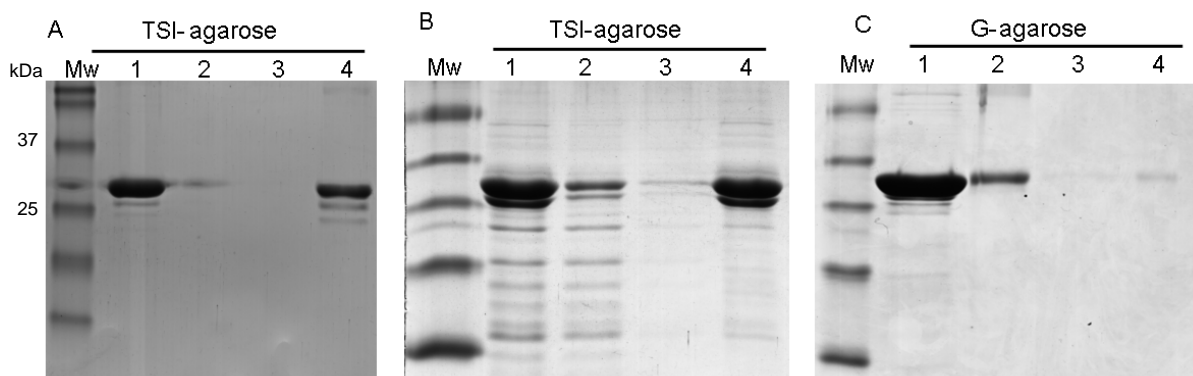


FIGURA 4.9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% desnaturante (SDS-PAGE) da imobilização da protease TEV em TSI-agarose e G-agarose. (A) Imobilização da TEV_{SH} em TSI-agarose. (B) Imobilização da TEV_{WT} em TSI-agarose. (C) Imobilização da TEV_{SH} em G15-agarose. (Mw: marcador de massa molecular, linha 1: quantidade de TEV aplicada ao suporte; linha 2: TEV não imobilizada ao suporte, linha 3: lavagem do suporte, linha 4: quantidade de TEV liberada após ferver o suporte na presença de DTT). O gel SDS-PAGE 12% foi corado com azul de Coomassie R-250.

Embora as três estratégias de imobilização utilizadas sejam covalentes, a imobilização da protease TEV no suporte TSI-agarose é reversível. Como esperado, ocorreu a liberação da TEV imobilizada por ligações de dissulfeto em TSI-agarose depois de aquecer o suporte em água fervente na presença de tampão de amostra que contém o agente redutor DTT (Figura 4.9 A, linha 4). A reversibilidade das ligações covalentes entre a enzima e o suporte TSI-agarose pode ser útil, pois permite que após uso extensivo do biocatalisador, o suporte possa ser reutilizado para uma nova imobilização (CARLSSON et al., 1998).

Para o suporte G-agarose, depois de ferver o suporte com tampão de amostra não foi observado liberação da protease TEV imobilizada, confirmando a irreversibilidade da ligação covalente (figura 4.9 B, linha 4). Para o suporte ET-agarose, após ferver o suporte ocorreu liberação inesperada da protease TEV, o que indica que a proteína se imobilizou somente pelos grupos tiol e não pelos grupos epóxi (figura 4.10, linha 3). A realização de uma nova titulação dos grupos epóxi demonstrou a perda dos mesmos no suporte ET-agarose. O suporte utilizado no artigo que descreve o método original foi sepabeads, que é um suporte comercial que possui uma alta densidade de grupos epóxi na superfície (~100 μ moles/ml) e não agarose como o utilizado neste trabalho (GRAZÚ et al., 2003). Essa perda dos grupos epóxi pode ter ocorrido durante o transporte dos suportes a temperatura ambiente de Montevideu a Florianópolis. Contrariamente, não foi observada a perda de grupos epóxi em suportes comerciais que já possuem grupos epóxi, como sepabeads e eupergit (dados não mostrados). Portanto, o suporte ET-agarose necessita de mais etapas de otimização e caracterização. A utilização do suporte original sepabeads ao invés de agarose poderia ser uma alternativa mais vantajosa, já que a agarose necessita ser ativada com grupos epóxi.

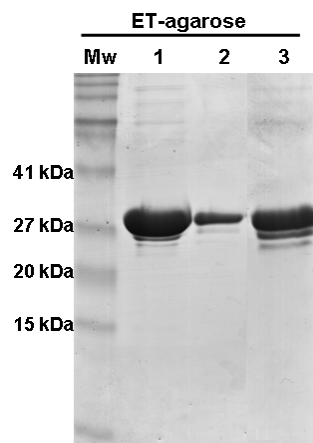


FIGURA 4.10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% desnaturante (SDS-PAGE) da imobilização da protease TEV em ET-agarose. Mw: marcador de massa molecular, linha 1: quantidade de TEV aplicada ao suporte; linha 2: TEV não imobilizada ao suporte, linha 3: quantidade de TEV liberada após ferver o suporte na presença de DTT. O gel SDS-PAGE 12% foi corado com azul de Coomassie R-250.

Como os perfis de imobilização da TEV_{WT} e TEV_{SH} são similares nos suportes e ambas enzimas são ativas (item 4.1.3, resultados e discussão), os experimentos posteriores foram realizados somente com a protease TEV_{SH}, pois o protocolo de purificação é mais simples, já que ela se expressa na fração solúvel.

4.4 Atividade da protease TEV imobilizada

Para avaliar a atividade da protease TEV_{SH} imobilizada nos suportes TSI-agarose e G-agarose, foram realizados testes de atividade a uma relação molar E:S de 3,4:1. Ao término das reações, os sobrenadantes foram separados por filtração, retirou-se uma alíquota de 12 μ l e analisou-se por SDS-PAGE. A figura 4.11, linha 2 mostra que a TEV imobilizada em TSI-agarose cliva 100% da PTP em 24 h a temperatura ambiente. As duas bandas observadas na linha 1 da figura 4.11 do TSI-agarose supõe-se que correspondem a estados de oxidação diferentes da PTP, já que após incubar essa mesma preparação de PTP com 50 mM de DTT ocorre o aparecimento de uma única banda em gel SDS-PAGE e após clivar a cauda (Figura 4.11, linha 2, TSI-agarose), as duas bandas se unificam em uma única banda.

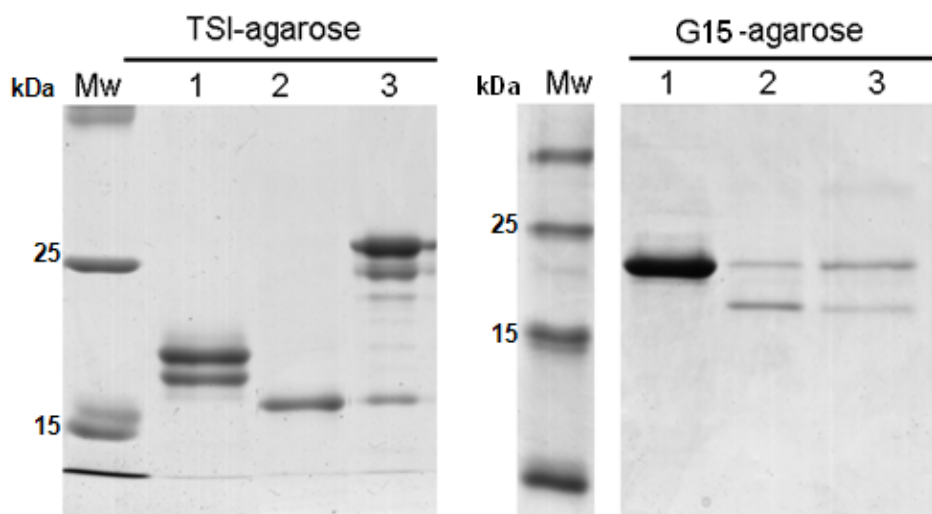


FIGURA 4.11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das frações correspondentes a atividade da TEV imobilizada em TSI-agarose e G15-agarose. 1: PTP utilizada na reação, 2: sobrenadante de reação 24 h a temperatura ambiente, 3: proteínas liberadas do suporte após fervê-lo na presença de SDS e DTT. O gel SDS-PAGE 12% foi corado com azul de Coomassie R-250.

Nas mesmas condições, não houve clivagem da cauda de histidinas utilizando a protease TEV immobilizada no suporte G-agarose altamente carregado com grupos ativos (G75-agarose) (dados não mostrados). A ausência de atividade pode ser causada por distorções na conformação da protease TEV devido à imobilização ou por inativação durante o processo de bloqueio com borohidreto de sódio, o qual pode produzir efeitos deletérios nas proteínas (BLANCO e GUISÁN, 1989). Entretanto, testes realizados com a enzima solúvel nas mesmas condições de bloqueio da enzima immobilizada (Apêndice C) descartaram a possibilidade de perda de atividade durante o bloqueio, sugerindo que a inativação ocorre devido à imobilização. Devido ao maior número de lisinas presentes na superfície da protease TEV, provavelmente a imobilização ocorreu por múltiplos pontos de união com o suporte, causando a perda de atividade por distorções na conformação ativa e/ou obstrução do local de entrada do substrato. Em muitos casos, a imobilização covalente por múltiplos pontos pode aumentar a estabilidade de enzimas monoméricas e multiméricas (Figura 4.12), porque aumentam a rigidez da estrutura terciária da proteína e a estabilizam frente a agentes como calor e solventes orgânicos (GRAZÚ et al., 2004; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005), porém podem ocorrer alterações estruturais, obstrução ou distorção do sítio ativo, diminuindo a atividade das enzimas immobilizadas (GÓMEZ et al., 2000; TURKOVA, 1999).

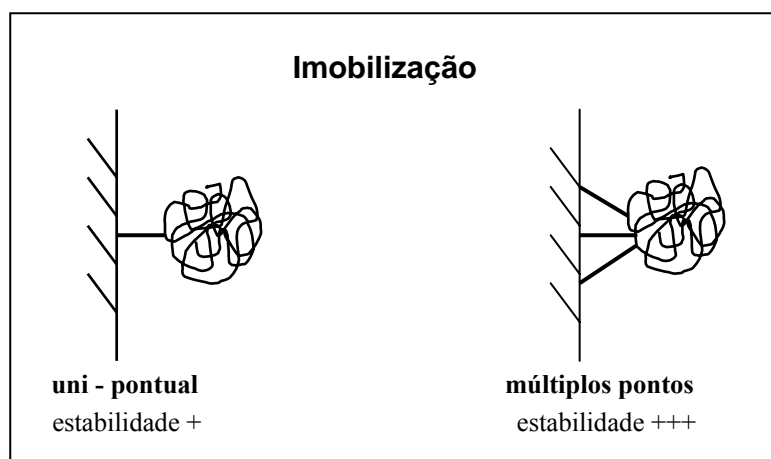


FIGURA 4.12 – Imobilização de proteínas por um ou múltiplos pontos de união ao suporte.

Em uma segunda etapa, a protease TEV foi imobilizada em um suporte com menor quantidade de grupos ativos (G15-agarose) para verificar se uma interação da protease por menos pontos poderia evitar a distorção da conformação ativa da protease e aumentar a atividade. A figura 4.11 mostra o gel SDS-PAGE onde se observou atividade no suporte G15-agarose (da ordem de 50%). Entretanto, a atividade observada é menor que a obtida para a protease TEV imobilizada em TSI-agarose. A imobilização da protease TEV no suporte TSI-agarose provavelmente ocorreu de forma uni ou bi-pontual causando menos alterações na estrutura da proteína. Além disso, as cisteínas estão localizadas distantes do sítio ativo, conforme a estrutura cristalina, o que não impediria a entrada do substrato (Figura 4.7 B).

Baseado nesses resultados selecionou-se a imobilização da protease TEV em TSI-agarose como o suporte mais adequado para ensaios posteriores. No gel SDS-PAGE das frações da atividade da protease TEV (Figura 4.11), observou-se uma ligação não desejada do substrato PTP clivado e não clivado ao suporte G15-agarose e da PTP clivada no suporte TSI-agarose (Figure 4.11, linha 3). As causas dessa união no suporte TSI-agarose foram investigadas. Verificou-se que a união da PTP ocorre com o suporte e não com a TEV imobilizada através de um teste no qual se adicionou PTP ao suporte bloqueado com excesso de glutathione ou β -mercaptoetanol (12,5 mM) e que não continha TEV imobilizada (Apêndice D). Outros testes realizados na presença de NaCl 1 M e inclusive baixando pH para 2,5, mostraram que a PTP continuou se unindo ao suporte, na ausência de TEV, o que sugere que a natureza da interação é covalente reversível e não iônica ou hidrofóbica. Portanto, o substrato PTP estaria interagindo com grupos tiolsulfinato do suporte TSI-agarose, mesmo após bloqueá-lo com excesso de agentes bloqueadores, sugerindo uma possível substituição dos grupos GSH causada por uma alta concentração de PTP (20 μ M). A PTP possui cinco cisteínas, mas ainda não se sabe se estão expostas porque a estrutura ainda não foi resolvida.

4.5 Comparação da atividade da protease TEV_{SH} solúvel e imobilizada

Para comparar o perfil cinético da protease TEV solúvel e imobilizada em TSI-agarose foram utilizados 0,04 µg de protease TEV x µl⁻¹ de solução de uma suspensão de biocatalisador e uma mesma relação enzima:substrato 1:6,5. A figura 4.13 mostra o gráfico representando a massa (µg) de substrato PTP clivados por µg de protease TEV em função do tempo de reação. Para a TEV solúvel, observou-se um comportamento linear até 1 h, permitindo calcular a atividade da enzima solúvel que foi de 2,48 µg de PTP clivados x µg de TEV⁻¹ x h⁻¹. Para a protease TEV imobilizada em TSI-agarose a reação é linear até 3 h, sendo a atividade da enzima imobilizada de 0,76 µg de PTP clivados/µg de TEV x h⁻¹. Esses valores de atividade permitiram determinar uma porcentagem de 70 % de inativação devido à imobilização, comparando-se a atividade da enzima solúvel em relação à imobilizada no suporte TSI-agarose (figura 4.13). A análise da seqüência e da estrutura da TEV (Figura 4.7 B) mostra que somente duas cisteínas estão expostas e localizadas distantes do sítio ativo, o que sugeria que uma imobilização por um ou dois pontos da proteína não poderia causar uma inativação como a que foi encontrada. Como as condições de imobilização são suaves (pH 8.0) a possibilidade de uma inativação devido a essas condições foi descartada. Em muitos casos, uma menor atividade da enzima imobilizada em relação à solúvel pode ocorrer devido a problemas difusionais do substrato, ocasionados principalmente pela porosidade do suporte utilizado, neste caso agarose (CALDWEEL et al. 1976; UHLICH, ULBRICHT, TOMASCHEWSKI, 1996). Alguns estudos demonstraram que quanto menor o diâmetro e os poros das partículas utilizadas para imobilização de enzimas, menores são os problemas difusionais e maior a atividade específica (BAILEY e CHO, 1983; LEE et al., 1980).

Para avaliar esta possibilidade, a atividade da protease TEV foi determinada utilizando-se uma concentração de substrato duas vezes maior que a usada no primeiro ensaio,

passando de uma relação E:S de 1:6,5 a 1:13. Se ocorressem impedimentos difusionais, ao dobrar a quantidade de substrato, a atividade da protease TEV teria que ser maior em comparação com o ensaio utilizando menor quantidade de substrato. Os resultados mostraram o mesmo perfil cinético para as duas relações E:S utilizadas, sugerindo a ausência de problemas difusionais (Apêndice E). Uma outra hipótese é que a protease TEV em solução poderia estar se comportando diferente que a estrutura cristalina (Figura 4.7), apresentando mais resíduos de cisteínas expostos. Considerando a possibilidade de que a cisteína catalítica (cys 151) estivesse exposta em solução, ela poderia se unir covalentemente ao suporte TSI-agarose impedindo a reação com o substrato, causando a inativação da protease. Para esclarecer melhor essa hipótese, seriam necessários estudos complementares por RMN para avaliar o comportamento da TEV em solução. Foram publicados trabalhos que apresentam evidências de sensibilidade a glutatona (oxidada e reduzida) de proteínas contendo cisteínas no sítio ativo (BARRET et al., 1999). Portanto, suspeitou-se que a atividade reduzida da protease TEV imobilizada no suporte TSI-agarose possa ser uma consequência da inativação da protease com a glutatona utilizada durante o procedimento de bloqueio dos grupos tiolsulfinato remanescentes no suporte. Essa hipótese está sendo avaliada no momento.

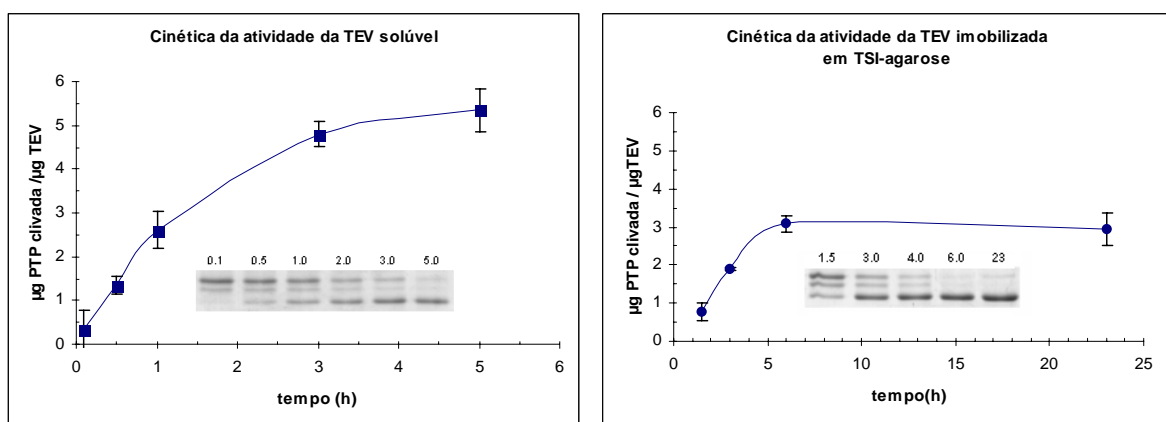


Figura 4.13 - Cinética da atividade da TEV solúvel e imobilizada. A atividade enzimática foi medida utilizando uma relação enzima substrato de 1:5 a 25°C. Removeram-se alíquotas nos tempos indicados e analisou-se por SDS-PAGE 12%. Os valores são médias de dois experimentos independentes e as barras indicam o desvio padrão.

4.6 Estabilidade a 4°C da protease TEV solúvel e imobilizada

Avaliou-se a estabilidade de armazenamento a 4°C da protease TEV solúvel e imobilizada em TSI-agarose. Ambas foram armazenadas a uma concentração de 0,76 µg/µl em tampão de atividade. A atividade residual foi medida após 0, 4, 8 e 16 dias de armazenamento a 4°C conforme procedimento descrito no item 3.7 (figura 4.14). Entre 0 e 8 dias de armazenamento a enzima solúvel perde estabilidade rapidamente, observando-se uma cinética de inativação rápida, com uma atividade residual do ordem de 50% após 5 dias de armazenamento. Entre 8 e 16 dias observou-se uma cinética de inativação lenta, mantendo-se uma atividade residual do ordem de 30%. Para a protease TEV imobilizada a atividade residual observada a tempo 0 permaneceu relativamente estável e após 16 dias de armazenamento apresentou uma atividade residual da ordem de 50%. Isto indica que a quantidade de protease imobilizada que permanece ativa no suporte TSI-agarose é três vezes mais estável que a enzima solúvel.

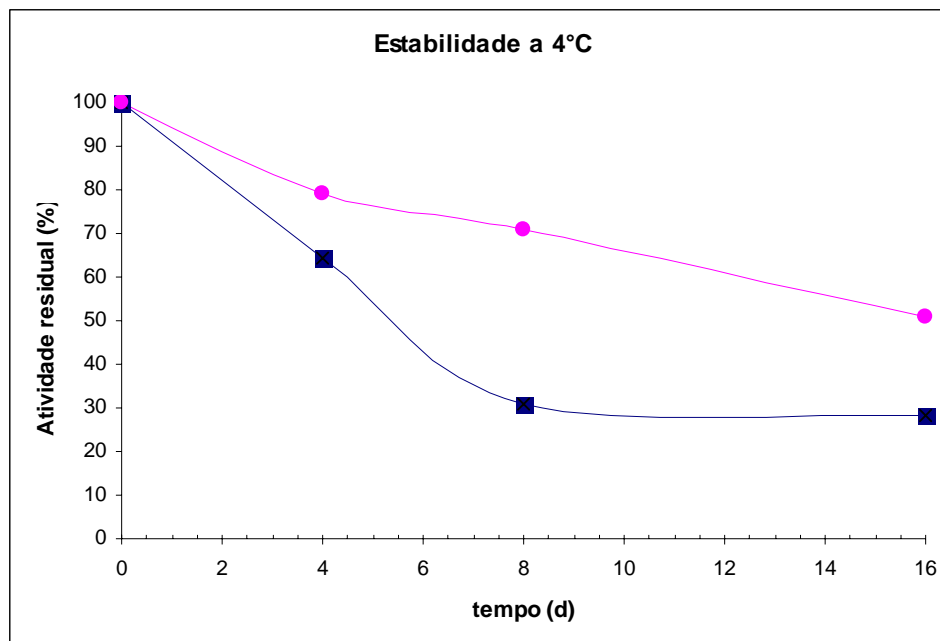


FIGURA 4.14 – Estabilidade de armazenamento a 4°C da TEV solúvel (quadrados) e da TEV imobilizada em TSI-agarose (círculos). A TEV solúvel e a imobilizada foram armazenadas a 4°C por 16 dias em tampão de atividade. Aliquotas foram removidas a diferentes períodos de armazenamento e atividade residual foi analisada utilizando uma relação 1:6,5 (enzima:substrato) como descrito no item 3.7.

Estudos de cinética de inativação térmica de enzimas imobilizadas e de desenovelamento térmico de enzimas imobilizadas marcadas por fluorescência mostraram que a estabilização por imobilização depende muito da região pela qual a enzima se imobiliza ao suporte (MANSFELD et al, 1999). Foi sugerido um modelo que permite entender a estabilização enzimática por imobilização (ULBRICH-HOFMANN et al., 1999). Ele se baseia na concepção de que o desenovelamento de uma proteína sob condições desnaturantes começa em uma região definida da molécula, conhecida como região de desenovelamento. Ao imobilizar uma proteína, a região de desenovelamento da molécula pode estar livre ou unida ao suporte por ligações covalentes ou não covalentes. Portanto, as proteínas em que a região de desenovelamento permaneceu livre irão se desenovelar da mesma forma e com a mesma constante de velocidade que a enzima solúvel. Já nos casos em que a região de desenovelamento se encontra unida ao suporte, o desenovelamento não acontecerá. De acordo com essa teoria, a estabilização de uma proteína por imobilização depende da região pela qual ela foi imobilizada. Só é possível fazer um desenho dirigido quando se conhece a estrutura da enzima e sua região de desenovelamento. Como essas propriedades não se conhecem para a maioria das enzimas, a estabilização por modificação química ou por imobilização é empírica (MANSFELD et al., 1999; ULBRICH-HOFMAN et al., 1999). No caso da imobilização da protease TEV, os resultados obtidos de estabilidade indicariam que a região de desenovelamento já não se encontra livre e que isto explica porque se observou estabilização adicional devido à imobilização.

4.7 Capacidade de reutilização do biocatalisador da TEV

No desenvolvimento dos processos com enzimas imobilizadas, um parâmetro fundamental é a estabilidade operacional. Os processos com enzimas imobilizadas somente

serão mais econômicos que os processos com a enzima solúvel, se for possível que a enzima imobilizada seja capaz de reter considerável atividade enzimática após vários ciclos de uso. Dessa forma, haveria uma redução no custo operacional advindo do menor consumo de enzima, além de compensar as despesas adicionais com os processos de imobilização (ZANIN e MORAES, 2004).

Para determinar a atividade do biocatalisador da TEV em condições operacionais foram realizados cinco ciclos de clivagem usando a PTP como substrato. Para cada ciclo de reutilização, foram utilizados 100 µg de PTP em um volume final de 250 µl de tampão de atividade temperatura ambiente com agitação por 24 h. Na figura observa-se que o biocatalisador da TEV foi ativo em pelo menos 5 ciclos de clivagem (Figura 4.15).

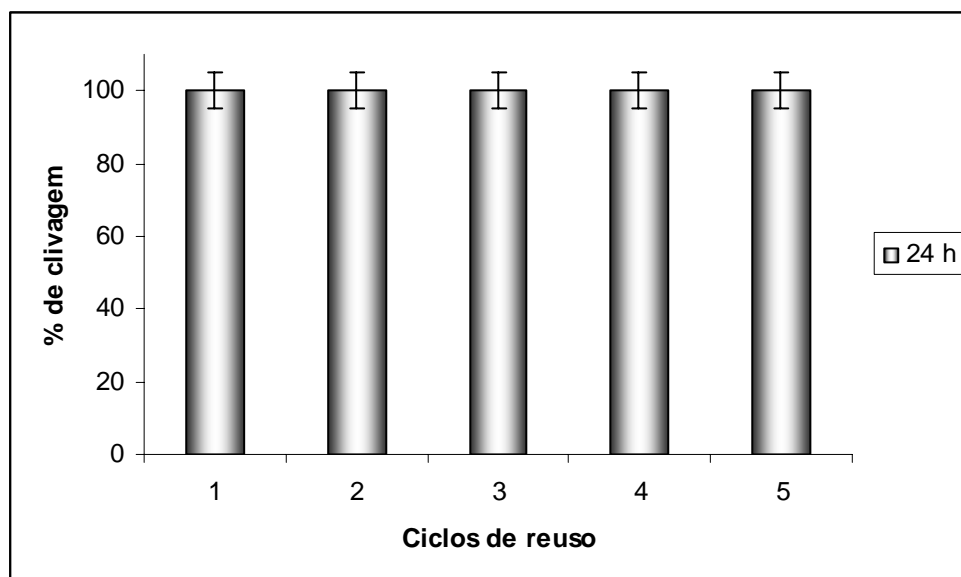


FIGURA 4.15 – Capacidade de reutilização do biocatalisador da TEV. A TEV imobilizada em TSI-agarose foi submetida a cinco ciclos de clivagem a temperatura ambiente. Foram removidas alíquotas a 24 h de reação em cada ciclo e analisadas por SDS-PAGE 12%.

4.8 Ensaio funcionais com a PTP de *T. cruzi*

A atividade da PTP de *T. cruzi* com cauda de histidinas foi medida utilizando como substrato PNPP. Embora estudos de RMN de uma dimensão mostrassem que a proteína se encontra bem enovelada (Apêndice F) não se detectou atividade nas condições testadas. Baseado nesses resultados suspeitou-se que a cauda de histidinas poderia estar interferindo com a atividade e realizou-se a clivagem da mesma utilizando o biocatalisador da TEV imobilizada em TSI-agarose e mediu-se atividade com pNPP a 410 nm. Os resultados mostraram que a PTP sem cauda foi capaz de produzir p-nitrofenol, porém a atividade foi muito baixa e novas condições de atividade precisam ser testadas.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A protease TEV tem sido a enzima escolhida para remover a cauda de histidinas em grandes projetos de genômica estrutural devido às vantagens que ela apresenta, como alta especificidade, atividade a baixas temperaturas e na presença dos inibidores de protease utilizados durante a purificação de proteínas recombinantes. Nesses projetos, onde centenas de proteínas recombinantes são estudadas, é necessário utilizar uma grande quantidade de TEV para clivar a cauda das mesmas. Por ser economicamente inviável comprar a TEV comercial, os laboratórios preferem produzi-la continuamente. Devido à importância dessa protease, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos buscando aumentar o rendimento da purificação da TEV na fração solúvel (VAN DEN BERG et al., 2006; FANG et al., 2007; BLOMMEL e FOX, 2007). O melhor rendimento (400 mg/l) foi obtido com uma nova construção da protease TEV e utilizando fermentadores (BLOMMEL e FOX, 2007). Entretanto, não são todos os laboratórios que possuem fermentadores para obter essas grandes quantidades.

Visando diminuir os gastos com a remoção das caudas de proteínas recombinantes, desenvolvemos um biocatalisador da TEV com alta quantidade de proteína imobilizada no suporte TSI-agarose (5 mg/g de suporte seco por vácuo) que foi reutilizado em pelo menos cinco ciclos de clivagem com 100% de atividade. Além disso, ele é mais estável que a enzima solúvel. Esses resultados são muito promissores e em uma próxima etapa o biocatalisador da protease TEV será doado para laboratórios de cristalografia para remover a cauda de proteínas que não cristalizam ou não difratam bem.

Seria interessante também analisar se o biocatalisador da TEV é capaz de clivar caudas de histidina de proteínas maiores, já que neste trabalho foram analisados somente testes com a

proteína tirosina fosfatase de *T. cruzi* de 20 kDa. Como a estrutura da TEV é conhecida, é possível gerar novas proteínas TEV com especificidades diferentes por engenharia genética.

A imobilização da protease TEV no suporte TSI-agarose não permite a utilização de grandes quantidades de DTT, já que as ligações de dissulfeto entre os grupos tiol da proteína e do suporte são rompidas por esse reagente em altas concentrações. Por outro lado, esse tipo de imobilização covalente reversível é vantajosa, já que ao diminuir a atividade enzimática após uso extensivo, a enzima pode ser liberada do suporte com DTT e o mesmo reutilizado para uma nova imobilização.

A imobilização em suportes que permitam a utilização de grandes quantidades de DTT é desejável, já que a TEV possui uma cisteína catalítica e provavelmente aumentaria a estabilidade e capacidade de reutilização do biocatalisadores e em muitos casos os substratos também necessitam de DTT. Uma alternativa que possibilita a utilização de maiores quantidades de DTT é a imobilização de enzimas em suportes multifuncionais como tiol-epóxi, os quais contêm uma pequena proporção de grupos tiol e uma maior quantidade de grupos epóxi. Nesse tipo de suporte ocorre a imobilização por múltiplos pontos da proteína e no caso de realizar a atividade na presença de DTT, a ligação dissulfeto entre a TEV e o suporte seria rompida, porém a proteína continuaria imobilizada pelas uniões com os grupos epóxi. Os suportes ativados com grupos epóxi são materiais muito eficientes para imobilização de enzimas em escala industrial, porque as ligações formadas são muito estáveis e também é possível estabilizar as enzimas pela união ao suporte por múltiplos pontos (MATEO et al., 2002). Nesse trabalho, tentamos imobilizar a protease TEV em um suporte tiol-epóxi sintetizado a partir da agarose, porém verificamos que houve perda de grupos epóxi nesse suporte. Estamos avaliando a imobilização em um novo suporte tiól-epóxi sintetizado a partir de sepabeads, que foi o material utilizado no artigo que descreve esse método (GRAZÚ et al., 2003). As condições de imobilização já foram otimizadas para não causar inativação

enzimática. Outra alternativa poderia ser a realização de mutações na protease TEV para incrementar o conteúdo de lisinas ou cisteínas do lado oposto do sítio ativo, fazendo com que a TEV se imobilize por essas regiões e não obstrua a entrada do substrato.

Esse trabalho motivou as pesquisadoras Dra. Cecília Giacomini e Dra. Gabriela Irazoqui, especialistas em imobilização de enzimas da Faculdade de Química do Uruguai a continuar caracterizando o suporte multifuncional ET-agarose e outros suportes. Entre as novas estratégias buscadas estão: sintetizar suportes multifuncionais com grupos reativos iminodiacetato-metal(II) e epóxi e um suporte ativado com 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinotetrafluorborato. Esse grupo tem ampla experiência em imobilização de enzimas, porém é a primeira vez que trabalharão com uma proteína em que o substrato é também uma proteína o que implica em desafios nas pesquisas a serem realizadas. Nesses estudos, a protease TEV será utilizada para clivar a cauda e proteínas recombinantes estudadas no Instituto Pasteur de Montevideú. Um projeto em colaboração com nossa equipe de pesquisa foi recentemente apresentado pela Dra. Cecília Giacomini a órgãos financiadores do Uruguai.

Neste trabalho, desenvolvemos um biocatalisador da protease TEV pela imobilização covalente em TSI-agarose que em termos de atividade, estabilidade, reutilização e tempo poderia substituir a utilização da protease TEV na forma solúvel (Figura 5.1).

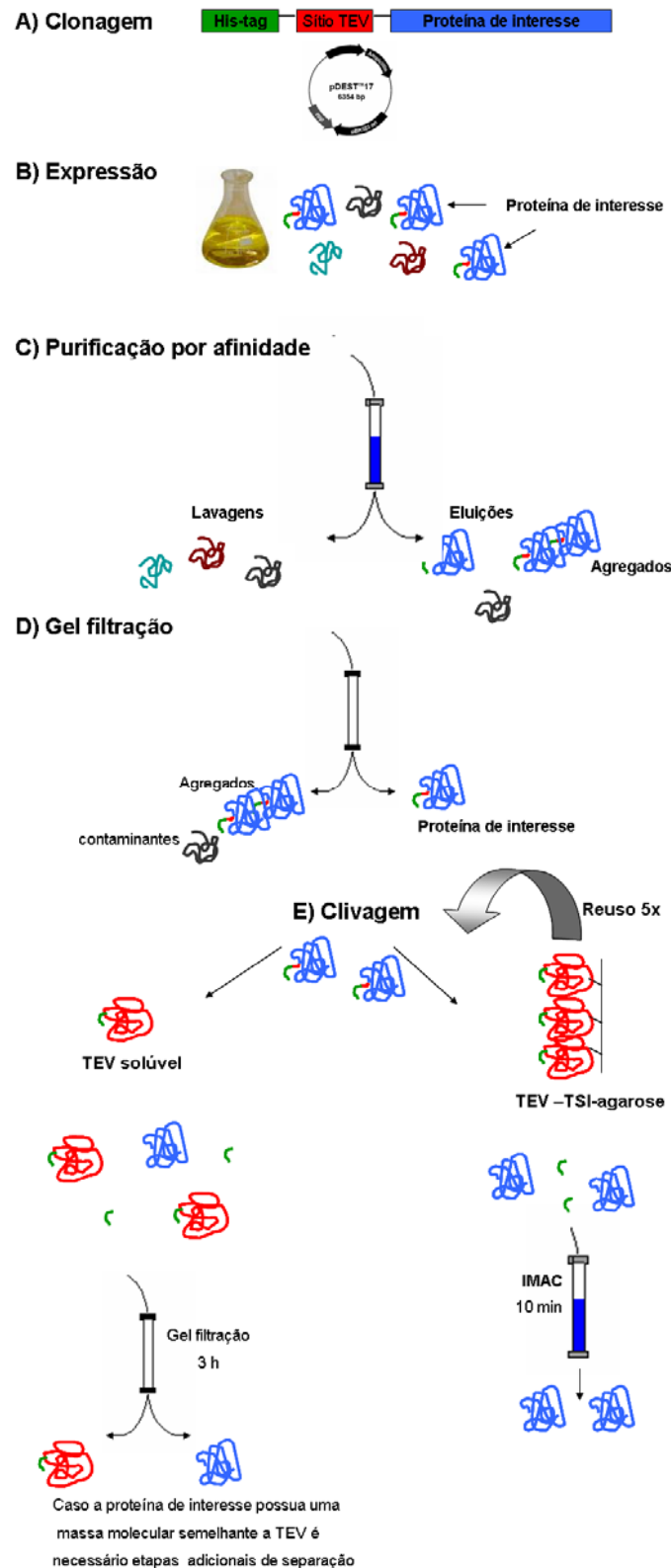


FIGURA 5.1 - Purificação de proteínas recombinantes. **(A)** Clonagem da região codificadora para proteínas com caudas de histidinas e com um sítio TEV. **(B)** Expressão das proteínas. **(C)** Purificação por cromatografia de afinidade. **(D)** Gel filtração para separar as proteínas dos agregados e contaminantes. **(E)** Clivagem das caudas de histidinas. Na utilização da TEV solúvel é necessário realizar uma nova gel filtração para separar a TEV da cauda e da proteína de interesse. Nas clivagens utilizando a TEV imobilizada em TSI-agarose, a TEV é separada dos produtos da reação por filtração e a cauda é removida por cromatografia de afinidade. Além disso, a TEV em TSI-agarose pode ser reutilizada cinco vezes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, R.; JOHNSTON, R. E.; DOUGHERTY, W. G. The nucleotide sequence of the coding region of the tobacco etch virus genomic RNA, evidence for the synthesis of a single polypeptide. **Virology**, v.154, p. 9-20, 1986.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**. 3rd ed.: John Wiley & Sons, 1995.

AXÉN, R., DREVIN, H., CARLSSON, J. Preparation of modified agarose gels containing thiol groups. **Acta Chem. Scand.**, v. B29, n. 4, p. 471-474. 1975.

BAILEY, J.E., CHO, Y.K. Immobilization of glucoamylase and glucose oxidase in activated carbon: effects of particle size and immobilization conditions on enzyme activity and effectiveness. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 25, n. 8, p. 1923–1935, 1983.

BANEYX, F. Recombinant expression of proteins in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, p.411-421, 1999.

BARRET, W. C.; DEGNORE, J. P. ; KENG, Y. F.; ZHANG, Z. Y. YIM, M. B.; CHOCK, P. B. Roles of Superoxide Radical Anion in signal Transduction Mediated by Reversible Regulation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 49, 34543-34546, 1999.

BATISTA-VIERA F.; MANTA C.; CARLSSON, J. Solid-phase thiolsulfonates for the reversible immobilization of thiols. **App. Biochem. Biotechnol.**, v. 44, p. 1-14, 1994.

BECKWITH, J. The all purpose of gene fusion. **Methods Enzymol.**, v. 326, p. 3-7, 2000.

BICKERSTAFF, G.F. Immobilized enzymes. In: **Methods in Biotechnology**, Vol. 1. Immobilization of Enzymes and Cells. Ed. Bickerstaff, GF. **Humana Press**, Inc. Totowa, New Jersey, p. 7-19, 1997.

BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 11, p. 360-366, 1989.

BLOMMEL, P. G.; FOX, B. G. A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease. **Protein Expr. Purif.**, v. 55, n. 1, p. 53-68, 2007.

BORNHORST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. **Methods Enzymol.**, v. 326, p. 245-254, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 75, p. 248-254, 1976.

BRAUN, P.; HU, Y. H.; SHEN, B. H.; HALLECK, A.; KOUNDINYA, M.; HARLOW, E. LABAER, J. Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 5, p. 2654-2659, 2002.

BROCKLEHURST, K.; CARLSSON, J.; KIERSTAN, M.; CROOK, E. Covalent chromatography. Preparation of fully active papain from dried papaya latex. **Biochem. J.**, v. 133, n. 3, p. 573-584, 1973.

BUCHER, M. H.; EVDOKIMOV, A. G.; WAUGH, D. S. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 58, p. 392-397, 2002.

CABRAL, J. M.S.; KENNEDY, J. F. Covalent and coordination immobilization of proteins. In: **Protein Immobilization fundamentals and applications** (ed. RF Taylor) Marcel Dekker, Inc., New York, p. 73-138, 1991.

CALDWELL, K. D.; AXÉN, R.; BERGWALL, M.; PORATH, J. Immobilization of enzymes base on hydrophobic interaction. Preparation and properties of a beta-amylase adsorbate. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 18, n. 11, p. 1573-1588, 1976.

CANDEL, A. M.; CONEJERO-LARA, F.; MARTINEZ, J. C.; VAN NULAND, N. A. J.; BRUIX, M. The high-resolution NMR structures of a single-chain chimeric protein mimicking a SH-3 peptide complex. **FEBS Lett.**, v. 581, n. 4, p. 687-692, 2007.

CARLSSON, J.; BATISTA-VIEIRA, F.; RYDÉN, L. Covalent chromatography. In: **Protein Purification** (ed. J-C Janson and L. Rydén) John Wiley & Son, INC, New York, p. 343-373, 1998.

CARRINGTON, J.C.; DOUGHERTY, W.G. A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 85, n. 10, p. 3391-3395, 1988.

CARTER, P. Site-specific proteolysis of fusion proteins. **ACS Sympos. Ser**, v. 427, p. 181-193, 1990.

CHANT, A.; KRAEMER-PECORE, C. M.; WATKIN, R.; KNEALE, G. K. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. **Protein Expr. Purif.**, v. 39, n.2, p. 152-159, 2005.

CHOI, S.I.; SONG, H. M. ; MOON, J. W., SEONG, B. L. Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from *Sacharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 75, n. 6, p. 718-724, 2001.

DALLA VECHIA, R. Aplicações sintética de lipases imobilizadas em polímeros. **Quím. Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DI GUAN, C.; LI, P.; RIGGS, P. D.; INOUYE, H. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. **Gene**, v. 67, p. 21-30, 1988.

DOUGHERTY, W. G. Analysis of viral RNA isolated from tobacco leaf tissue infected with tobacco etch virus. **Virology**, v. 131, p. 473-481, 1983.

DOUGHERTY, W. G.; CARY, S. M., PARKS, T. D. Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. **Virology**, v. 172, p. 145-155, 1989.

DOUGHERTY, W. G.; PARKS, T. D. Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays. **Virology**, v. 171, p. 356-364, 1989.

EDWARDS, A. M.; ARROWSMITH, C.H.; CHRISTENDAT, D.; DHARAMSI, A.; FRIESEN, J.D.; GREENBLATT, J. F.; VEDADI, M. Protein production: Feeding the crystallographers and NMR spectroscopists. **Nat. Struct. Biol. Suppl.**, v. 7, p. 970-972, 2000.

ESPOSITO, D.; CHATTERJEE, D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. **Curr. Opin. Biotechn.**, v. 17, n. 4, p. 353-358, 2006.

FANG, L.; JIA, K. Z.; TANG, Y. L.; MA, D. Y. ; YU, ., ; HUA, Z. C. An improved strategy for high-level production of TEV protease in *Escherichia coli* and its purification and characterization. **Protein Expr. Purif.**, v. 51, n. 1., p. 102-109, 2007.

FANG, L.; SUN, Q.; HUA., Z. Expression of recombinant Chinese bovine enterokinase catalytic subunit in *P. pastoris* and its purification and characterization. **Acta Biochim. Biophys.**, v. 36, n. 7, p. 513-517, 2004.

FEENEY, B.; SODERBLOM, E. J.; GOSHE, M.B. CLARK, A. C. Novel protein purification system utilizing an N-terminal fusion protein and a caspase-3 cleavable linker. **Protein Exp. Purif.** , v. 47, n. 1, p. 311-318, 2005.

FERRER, M.; PLOU, F.J.; FUENTES, G.; CRUCES, M.A.; ANDERSEN, L.; KIRK, O.; CHRISTENSEN, M.; BALLESTEROS, A. Effect of the immobilization method of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on sucrose acylation. **Biocatal. Biotransform.**, v. 20, n. 1, p. 63-71, 2002.

FONDA, I.; KENIG, M.; GABERC-POREKAR, V.; PRISTOVEK, P.; MENART, V. Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor-alpha drastically changes its properties. **Sci. World J.**, v. 2, p. 1312-1325, 2002.

FORSBERG, G.; BAASTRUP, B.; RONDAHL, H.; HOLMGREN, E.; POHL, G.; HARTMANIS, M.; LAKE, M. An evaluation of different enzymatic cleavage methods for recombinant fusions proteins, applied on Des(1,3) insulin-like growth factor I. **J. Protein Chem.**, v. 11, n. 2, p. 201-211, 1992.

GIACOMINI, C. **Influencia de la química de inmovilización en las propiedades de derivados de β -galactosidasa para su utilización en síntesis de glicósidos.** 2005. 87 f. Tese (Doutorado em química) – Facultad de Química Universidad de la República, Montevideú, Uruguay.

GIACOMINI, C., VILLARINO, A., FRANCO-FRAGUAS, L., BATISTA-VIERA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. **J. Molec. Catal. B: Enzym.**, v. 4, n. 5-6, p. 313-327, 1998.

GOEL, A.; COLCHER, D.; KOO, J. S.; BOOTH, B. J.; PAVLINKOVA, G.; BATRA, S. K. Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single chain Fv construct. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1523, n.1, p. 13-20, 2000.

GOMÉZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, R. Stabilization of invertase by modifications of sugar chains with chitosan. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, n. 5, p. 347-350, 2000.

GRAZÚ, V.; ABIAN, O.; MATEO, C.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. M. Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by epoxy chemistry. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1495-1501, 2003.

GRAZÚ, V.; ABIAN, O.; MATEO, C.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 90, n. 5, p. 597-605, 2004.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. Immobilization of cells for application in the food industry. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 14, p. 75-107, 1994.

GUI SÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUI SÁN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; BASTIDA, A.; ALVARO, G. In: Van den Tweel, A. Harder, r. Buitelaar (Eds.), Stability and Stabilization of Enzymes, **Elsevier**, Amsterdã, p. 55-62, 1993.

GUI SÁN, J.M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA, A.; BLANCO, R.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. Immobilization of enzymes on glyoxyl-agarose: strategies for enzyme by multipoint attachment. In: Immobilization of enzymes and cells, (Bickerstaff G.F., ed.) **Humana Press**, Inc., Totowa, NJ, p. 261-275, 1997.

HAMMARSTRON, M.; HELLGREN, N.; VAN DEN BERG, S.; BERGLUND, H.; HARD, T. Rapid screening for improved solubility of small proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. **Protein Sci.**, v. 11, n. 2, p. 313-321, 2002.

HERMANSON, G.T. Bioconjugate techniques. San Diego: **Academic Press.**, p. 56-80, 1996.

HOSFIELD, T.; LU, Q. Influence of the amino acid residue downstream of (Asp)⁴Lys on enterokinase cleavage of a fusion protein. **Anal. Biochem.**, v. 269, n. 1, p. 10-16, 1999.

IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; BATISTA-VIERA, F.; BRENA, B.M. Generating favourable nanoenviroments for thermal and solvent stabilization of Immobilized β -galactosidase. **Biotech. Bioeng.**, v. 77, n. 4, p. 430-434, 2002.

JENNY, E. J.; MANN, K. G.; LUNDBLAD, R.L. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. **Protein Expr. Purif.**, v. 31, n. 1,

p. 1-11, 2003.

KAPUST, R. B., TÖZSÉR, J., FOX, J. D., ANDERSON, D. E., CHERRY, S., COPELAND, T. D., WAUGH, D. S. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. **Protein Eng.**, v. 14, n. 12, p. 993-1000, 2001.

KARLSSON, E.; RYDÉN, L.; BREWER, J. Ion-exchange chromatography, In; **Protein Purification** (ed. J-C Janson and L. Rydén), John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 145-205, 1998.

KARMALI, A. Cromatografia com metal imobilizado e suas variantes. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, v. 67, p. 2-7, 2000.

KATCHALSY-KATZIR, E. Immobilized Enzymes - Learning from Past Successes and failures. **Trends in Biotechnol.**, v. 11, n. 11, p. 471-478, 1993.

KIM, K. M.; YI, E. C.; BAKER, D.; ZHANG, K. T. J. Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase. **Acta Cryst.**, v. D57, p. 759-762, 2001.

LA VALLIE, E. R.; LU, Z. J.; DIBLASIO-SMITH, E. A.; COLLINS-RACE, L. A.; MCCOY, J. M. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Methods Enzymol.**, v. 326, p. 322-340, 2000.

LEE, D. D.; LEE, G. K.; REILLY, P. J.; LEE, Y. Y. Effect of pore diffusion limitation on dextrin hydrolysis by immobilized glucoamylase. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 22, n. 1, p. 1-17, 1980.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZ'U, V.; BETANCOR, L.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **J. Biotechnol.**, v. 116, n. 1, p. 1-10, 2005.

LUCAST, L. J.; BATEY, R. T.; DOUDNA, J. A. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease. **Biotechniques**, v. 30, n. 3, p. 544-554, 2001.

MANSFELD, J.; VRIEND, G. VAN DEN BURG, B.EIJSINK, V. G. H.; ULBRICH-HOFFMANN, R. Probing the Unfolding Region in a Thermolysin-like Protease by Site-Specific immobilization. **Biochemistry**, v. 38, n. 26, p. 8240-8245, 1999.

MATEO, C.; ABIÁN, O.; BERNEDO, M.; CUENCO, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; GRAZÚ, V.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Some special features of glyoxil supports to immobilize proteins. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 37, p. 456-462, 2005.

MATEO, C.; ALBIAN, O.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Epoxy-sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotecnol. Prog.**, v. 18, n. 3, p. 629-634, 2002.

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ALBIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Multifunctional epoxy-supports. A new tool to improve the covalent immobilization on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 26, n. 7, p. 509-515, 2000.

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; CORTÉS, E.; GARCIA, J. L.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-his-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 76., n. 3, p. 269-276, 2001.

MIYASHITA, K.; KUSUMI, M.; UTSUMI, R.; KOMANO, T.; SATOH, N. Expression and purification of recombinant 3C proteinase of Coxsackievirus B3. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 56, n. 5, p. 746-750, 1992.

MOHANTY, A. K.; WIENER, M. C. Membrane protein expression and production: effects of polystidine tag length and position. **Protein Expr. Purif.**, v. 33, n. 2, p. 311-325, 2004.

NAGAI, K.; THOGERSEN, H. C. Generation of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 309, n. 5971, p. 810-812, 1984.

NUNN, C. M.; JEEVES, M.; CLIFF, M. J.; URQUHART, G. T.; GEORGE, R. R.; CHAO, L. H.; TSCUCHIA, Y.; DJORDJEVIC, S. Crystal structure of tobacco etch virus protease shows the protein C terminus bound within the active site. **J. Mol. Biol.**, v. 350, n. 1, p. 145-155, 2005.

-
- PARKS, T. D.; HOWARD, E. D.; WOLPERT, T. J.; ARP, D. J.; DOUGHERTY, W. G. Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form. **Virology**, v. 210, p. 194-201, 1995.
- PARKS, T. D.; LEUTHER, K. K.; HOWARD, E. D.; JOHNSTON, S. A.; DOUGHERTY, W. G. Release of proteins and peptides using a recombinant plant virus proteinase. **Anal. Biochem.**, v. 216, n. 2, p. 413-417, 1994.
- PHAN, J.; ZDANOV, A.; EVDOKIMOV, A. G.; TROPEA, J. E.; PETERS, H. K.; III, KAPUST, R. B. et al. Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 52, p. 50564-50572, 2002.
- POLAYES, D. A.; GOLDSTEIN, A.; WARD, G.; HUGHES, A. J. TEV protease, recombinant: A site-specific protease for efficient cleavage of affinity tags from expressed proteins. **Focus**, v. 16, n. 1, p. 2-5, 1994.
- PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p. 598-599, 1975.
- QIAGEN. **Ni-NTA Spin Handbook**. 2000. 28 p.
- RYAN, M. D.; FLINT, M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 699-723, 1997.
- SACHDEV, D.; CHIRGWIN, J. M. Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin. **Protein Expr. Purif.**, v. 12, n. 1, p. 122-132, 1998.
- SEIPELT, J.; GUARNE, A.; BERGMANN, E.; JAMES, M.; SOMMERGRUBER, W.; FITA, I.; SKERN, T. The structure of picornaviral proteinases. **Virus Res.**, v. 62, n. 2, p. 159-168, 1999.
- SHIH, Y. P.; KUNG, W.M., CHEN, J. C.; YEH, C. H. WANG, A. H. J.; WANG, T. F. High-throughput screening of soluble recombinant proteins. **Protein Sci.**, v. 11, n. 7, p. 1714-1719, 2002.
- SMITH, D. B. Generation fusions to glutathione S- transferase for protein studies. **Methods Enzymol.**, v. 326, p. 254-270, 2000.

SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. **Gene**, v. 67, n. 1, p. 31-40, 1988.

SMYTH, D. R.; MROZKIEWICZ, M. K.; MCGRATH, W. J.; LISTWAN, P.; KOBE, B. Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. **Protein Sci.**, v. 12, p. 1313-1322, 2003.

STEVENS, R. C. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. **Struct. Fold. Des.**, v. 8, n. 9, p. R177-R185, 2000.

SUNDBERG, L., PORATH, J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. **J.Chromatogr.**, v. 90, p. 87-98, 1974.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, n. 5, p. 523–533, 2003.

TURKOVA, J. Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and functions. **J. Chromatography B**, v. 722, n. 1, p. 11-31, 1999.

UHLICH, T.; ULBRICHT, M.; TOMASCHEWSKI, G. Immobilization of enzymes in photochemically cross-linked polyvinyl alcohol. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 19, n. 2, p. 124-131, 1996.

ULBRICH-HOFFMAN, R.; ARNOLD, U.; MANSFELD, J. The concept of the unfolding region for approaching the mechanisms of enzyme stabilization. **J.Molec.Catal. B: Enzymatic.**, v. 7, n. 1, p. 125-131, 1999.

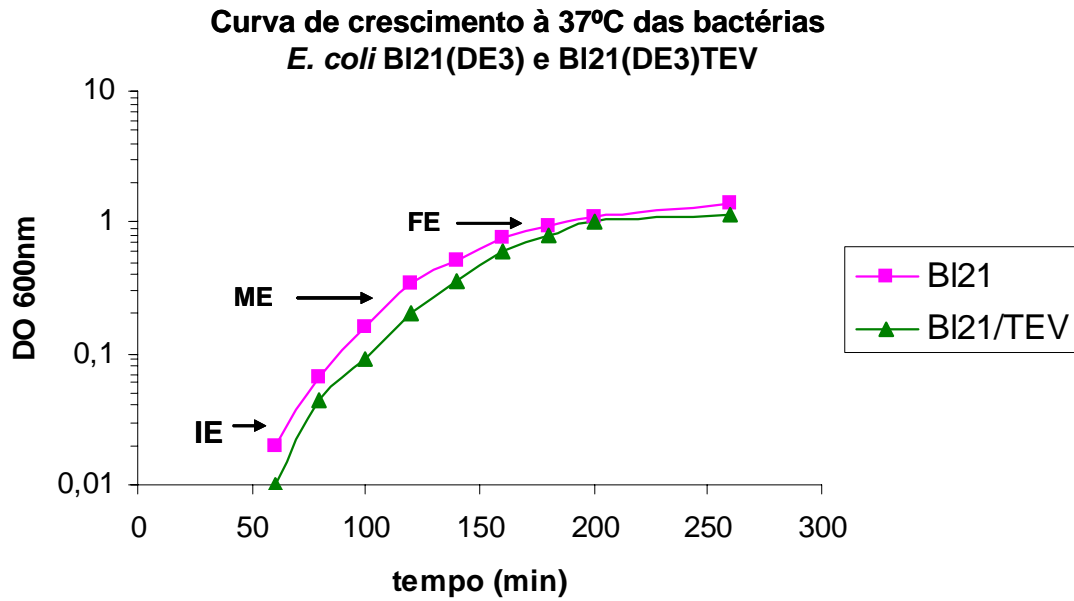
VAN ETTEN, R. L. Low -Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatases. **Handbook of Cell Signaling**, p. 733-740, 2003.

VAN DEN BERG, S.; LOFDAHL, P. A.; HARD, T.; BERGLUND, H. Improved solubility of rTEV protease by directed evolution. **J. Biotechnol.**, v. 121, p. 291-298, 2006.

WAGNER, C. R.; BERGSTROM, C. P.; KONING, K. R.; HANNA, P. E. Arylamine n-acetyltransferase. Expression in *Escherichia coli*, purification, and substrate specificities of recombinant hamster monomorphic and polymorphic isozymes. **Drug. Metab. Dispos.**, v. 24, n. 2, p. 245-253, 1996.

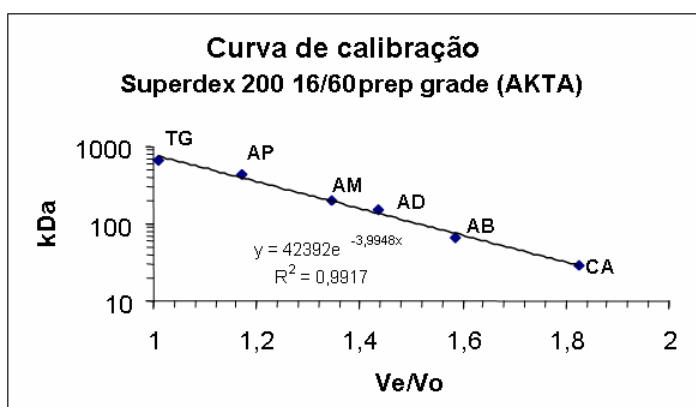
ZANIN, G. M.; MORAES, F.F. Enzimas imobilizadas. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis summa, p.35-85, 2004.

APÊNDICE A



Curva de crescimento das bactérias *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3)TEV a 37°C. As bactérias foram crescidas em meio LB, adicionando-se ampicilina 100 µg/µl ao cultivo de bactérias transformadas com o plasmídeo da TEV. Foram realizadas leituras no espectrofotômetro a DO₆₀₀ a cada 20 min. Estabeleceram-se as seguintes fases de crescimento exponencial: início da fase exponencial (IE) = DO₆₀₀ 0.02 (70 min); metade da fase exponencial (ME) = DO₆₀₀ 0.3 (130 min) e final da fase exponencial (FE) = DO₆₀₀ 1.2 (230 min).

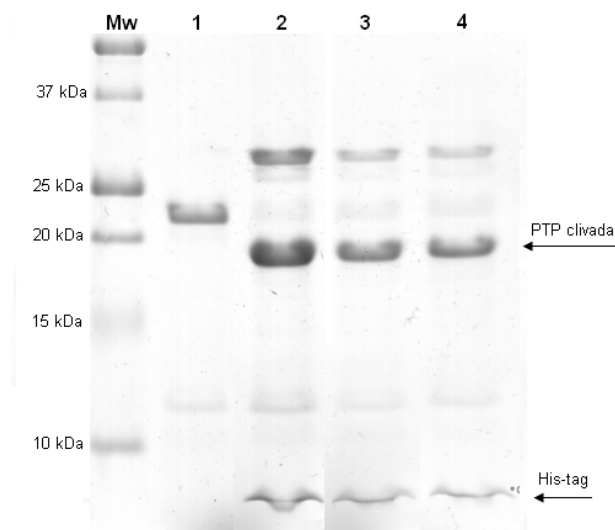
APÊNDICE B



Proteínas	Ve	Ve/Vo	kDa
CA	90	1,94	29,0
AB	77	1,645	66,0
AD	69	1,50	150,0
AM	64	1,38	200,0
AP	57	1,24	443,0
TG	51	1,11	669,0
BD	(Vo) 46	1,00	2000,0

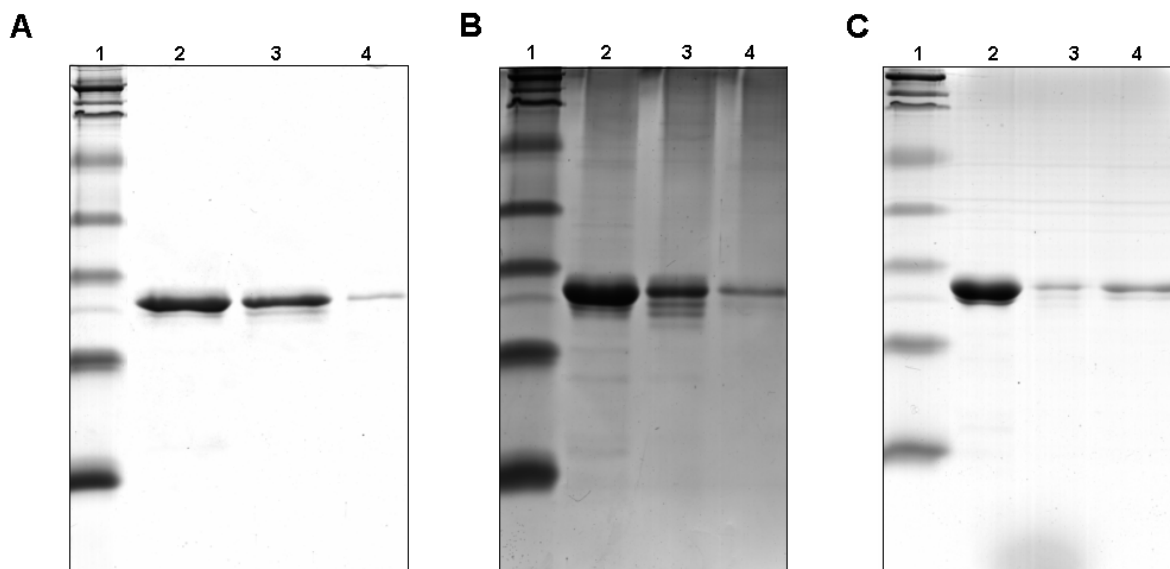
Curva de calibração da coluna GF Superdex 200 16/60. TG: tioreoglobulina, AP: apoferritina, AM: amilase, AD: álcool desidrogenase, AB: albumina, CA: anidrase carbônica, BD: *blue* dextrano, Ve: volume de eluição, V0: volume morto da coluna. As proteínas foram dissolvidas e injetadas na coluna na concentração indica pelo fabricante (GE healthcare).

APÊNDICE C



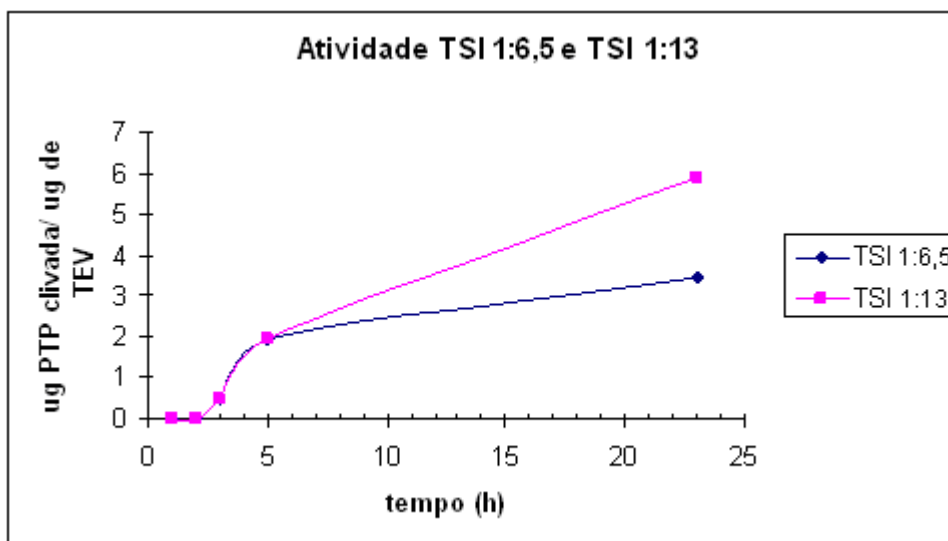
Teste de estabilidade da enzima solúvel na presença de NaBH_4 . A atividade da TEV_{WT} solúvel foi testada após manter a enzima presença de 1mg/ml NaBH_4 durante 30 e 60 min e realizada atividade conforme descrito no item 3.5. 1: PTP, 2: reação TEV+PTP na forma solúvel, 3: reação TEV+PTP com NaBH_4 por 30 min, 4: reação TEV+PTP com NaBH_4 por 60 min. Mw: marcador de massa molecular. O gel SDS-PAGE 15% foi corado com azul de Coomassie R-250.

APÊNDICE D



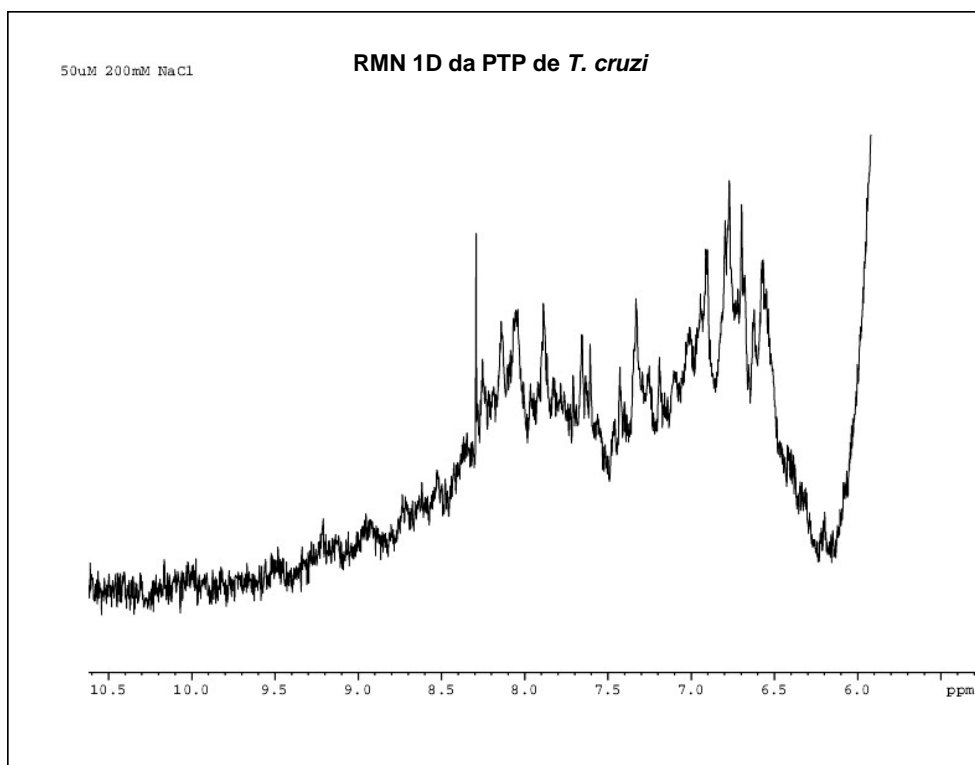
Controles realizados para o suporte TSI-agarose. (A) TSI-agarose bloqueado com 12.5 mM glutationa. (B): TSI-agarose previamente bloqueado com 12.5 mM de β -mercaptoetanol. (C) G-agarose bloqueado com NaBH_4 . 1: marcador de massa molecular; 2: PTP aplicada ao TSI-agarose, 3: PTP que não se uniu ao TSI-agarose, 4: suporte após aquecimento em água fervente na presença de DTT.

APÊNDICE E



Atividade TSI 1:5 e TSI 1:10 após 14 dias de armazenamento a 4°C. Foram realizados testes de atividade utilizando a relação 1:6,5 e 1:13 de enzima:substrato, como descrito em materiais e métodos, item 3.7.

APÊNDICE F



Espectro de ressonância magnética nuclear de 1 dimensão. A região mostrada na figura acima corresponde a porção +6 a 10 ppm e cobre toda a região amídica da proteína, ou seja, todos os NHs dos aminoácidos. Se eles estivessem sobrepostos, a proteína possuiria pouca dispersão dos deslocamentos químicos e estaria desenovelada. A figura mostra ampla dispersão e linhas finas de ressonância. Para a PTP de *T. cruzi* predominam hélices, ela está bem enovelada e possui um tamanho de aproximadamente 20 kDa. Experimento realizado por Guilherme Razzera (Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas –CNRMN- UFRJ).