



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE UMA α_2 -
MACROGLOBULINA BACTERIANA E AVALIAÇÃO DO SEU
POTENCIAL USO NA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES**

Mestranda: Julia Freitas Daltro Vidal

Orientador: Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Brasília, DF
Fevereiro de 2018

JULIA FREITAS DALTRO VIDAL

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE UMA α_2 -MACROGLOBULINA BACTERIANA E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL USO NA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Brasília, DF
Fevereiro de 2018

Dissertação de autoria de Julia Freitas Dalto Vidal, intitulada “CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE UMA α_2 -MACROGLOBULINA BACTERIANA E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL USO NA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES” apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em 28 de fevereiro de 2018, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Goncalves Barbosa
Universidade de Brasília
(Orientador)

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Universidade de Brasília
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada
Universidade Católica de Brasília
(Examinador Externo)

Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger
Universidade de Brasília
(Examinador Interno-Suplente)

Brasília-DF

2018

À minha mãe, por todo o incentivo e apoio

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o suporte durante esses dois anos.

Ao meu orientador, Dr. João Alexandre R. G. Barbosa, por toda a aprendizagem e incentivo à pesquisa durante os seis anos em que tive o prazer de ser sua aluna.

Aos professores Dra. Sônia de Freitas, Dr. Napoleão Valadares, e Dr. Aisel Garay, por toda a ajuda prestada nos momentos de necessidade. À professora Andréa Dessen, por disponibilizar o gene para a α_2 -macroglobulina utilizado nesse trabalho.

Aos professores Dr. Carlos André Ricart, Dr. Marcelo Ramada e Dr. Ricardo Krüger, pela disponibilidade em participar da banca examinadora. Em especial agradeço ao Dr. Marcelo Ramada pela colaboração e por todo o auxílio prestado na realização de uma parte crucial deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Gideane Mendes, Jônatas Lima, Muhammad Faheem, Patrícia Alves, Paulo Jardim, Luisa Meneghetti, Gustavo Trajano, Amanda Souza, Alzira de Freitas, Cláudia Bravo, Azadeh Mehdad, João Paulo Fernandes, Diogo de Sá, Diego Honda, Liem Garay e em especial ao técnico Chiquinho. Obrigada pela ajuda, pelo convívio e por transformarem o Laboratório de Biofísica Molecular em um lugar tão caloroso. Sentirei muito a falta de todos vocês.

Aos meus amigos pessoais e a todos os outros colegas da UnB que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa sem a qual não seria possível realizar esse trabalho.

Esse trabalho não ocorreria sem a contribuição de cada um de vocês. A todos meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

As α_2 -macroglobulinas (A2M) são proteínas de alto peso molecular que atuam como inibidoras de amplo espectro de proteases. Essa inibição ocorre por meio de um mecanismo que envolve o aprisionamento físico da protease seguido pela formação de uma ligação covalente entre ambas as proteínas. A capacidade de captura das diversas classes de proteases poderia permitir sua utilização na identificação das mesmas em extratos celulares, podendo ser aplicada tanto na descoberta de novas proteases como na detecção de proteases alvo. Esse trabalho tem por objetivo caracterizar biofisicamente a α_2 -macroglobulina de *Salmonella enterica* e avaliar sua potencial utilização na identificação de proteases. A proteína foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) e purificada por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+}), seguido por cromatografia de exclusão molecular. Foram realizados ensaios de dicroísmo circular a fim de verificar seu padrão de estrutura secundária em diferentes pH, bem como sua estabilidade térmica (25-95 °C). Ensaio de fluorescência foram realizados com o intuito de analisar mudanças estruturais sofridas em uma ampla faixa de pH (3,5-9,0). Experimentos de ultracentrifugação analítica foram realizados a fim de compreender melhor a interação entre a A2M e a tripsina. Tanto a capacidade de ligar-se a proteases, como a habilidade em capturar proteases quando ligada em coluna foram testadas utilizando-se tripsina. Confirmadas tais capacidades, foram realizados testes com os extratos de *Escherichia coli*, *Vigna unguiculata* e *Pichia pastoris* a fim de detectar proteases ali presentes. As proteínas foram submetidas à proteólise e analisadas por espectrometria de massas. Houve mudanças no padrão de estrutura secundária quando a proteína foi submetida a pH ácidos e básicos (4,0 e 9,0) quando comparado ao pH próximo da neutralidade (7,5). Durante sua desnaturação térmica verificou-se que há agregação em temperaturas superiores a $\sim 47^\circ\text{C}$ em todos os pH testados (4,0, 7,5 e 9,0), demonstrando que a proteína não é estável termicamente. Foi observado que a proteína quando ligada à tripsina apresenta um padrão eletroforético e um perfil de eluição em gel filtração que indica a ocorrência de mudança conformacional. Entretanto, não foi obtido o mesmo resultado nos experimentos de ultracentrifugação analítica. A A2M aparenta formar dímeros, principalmente quando na presença da tripsina. Não houve a detecção de proteases nos testes com os extratos celulares testados. Contudo, tais testes devem ser aprimorados para um resultado mais confiável.

Palavras-chave: α_2 -macroglobulina, protease, inibidor

ABSTRACT

α_2 -macroglobulins (A2M) are high molecular weight proteins that act as broad spectrum peptidase inhibitors. The inhibition occurs by a mechanism that involves the capture of the peptidase followed by the formation of a covalent bond between the two proteins. The capture of all the peptidases classes could allow its utilization in the identification of these proteins in cellular extracts, being possibly applied in the discovery of new peptidases and in the detection of target peptidases. The aim of this work was the biophysical characterization of the α_2 -macroglobulin from *Salmonella enterica* and evaluation of its potential use in the identification of proteases. The recombinant A2M protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by immobilized metal ion affinity chromatography followed by size exclusion chromatography. Circular dichroism assays were performed in order to verify the A2M secondary structure in different pH conditions, as well as its thermal stability in a temperature range of 25-95 °C. Fluorescence spectroscopy assays were performed to analyze structural changes in a wide range of pH (3.5-9.0). The ability of A2M to bind peptidases and its capacity to capture peptidases when immobilized to a column were tested using trypsin. Once these abilities were confirmed, tests were carried out with extracts of *Escherichia coli*, *Vigna unguiculata* and *Pichia pastoris* in order to identify its captured peptidases. Proteins were hydrolyzed and analyzed by mass spectrometry. Analytical ultracentrifugation experiments were performed in order to better understand the interaction between A2M and trypsin. There were changes in the secondary structure when the protein was subjected to acid and basic pH (4.0 and 9.0) when compared to neutral pH (7.5). During its thermal denaturation it was found that there is aggregation at temperatures above ~ 47 ° C in all tested pH conditions (4.0, 7.5 and 9.0), showing that the protein is not thermally stable. It was verified that the protein when bound to trypsin has an electrophoretic migration and a gel filtration elution profile that indicates the occurrence of conformational change. However, the same result was not observed with the analytical ultracentrifugation experiments. A2M seems to form dimers, especially in the presence of trypsin. There was no detection of peptidase in the tests with the cell extracts. However, such tests must be improved for a more reliable result.

Key words: α_2 -macroglobulin, peptidase, inhibitor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de catálise das principais classes de proteases.....	19
Figura 2. Ligação tioéster formada pelas cadeias laterais dos resíduos de cisteína e glutamina.....	23
Figura 3. Mecanismo esquemático da inibição de proteases realizada pela A2M humana.....	25
Figura 4. Mecanismo esquemático de inibição de proteases pela A2M bacteriana.....	26
Figura 5. Estrutura cristalográfica da A2M de <i>S. enterica</i> ser. Typhimurium.....	27
Figura 6. SDS PAGE 10% (m/v) mostrando o perfil proteico das células BL21 (DE3) transformadas com o vetor pET28a construído.....	38
Figura 7. Cromatograma da purificação da α_2 -macroglobulina por afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+}).....	39
Figura 8. SDS PAGE 10% (m/v) mostrando os picos eluídos durante a cromatografia de afinidade.....	40
Figura 9. Cromatograma da purificação da α_2 -macroglobulina por exclusão molecular.....	41
Figura 10. SDS PAGE 10% (m/v) mostrando os picos eluídos durante a cromatografia por exclusão molecular.....	41
Figura 11. Cromatograma da purificação por exclusão molecular do produto da reação entre a α_2 -macroglobulina e a tripsina em pH 7,5.....	42
Figura 12. Teste de atividade da tripsina realizada com o purificado do produto da reação entre a A2M e a tripsina em pH 7,5.....	43
Figura 13. PAGE nativo mostrando os picos eluídos durante a purificação do produto da reação entre a α_2 -macroglobulina e a tripsina.....	43
Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas obtidos durante a purificação da α_2 -macroglobulina nativa e da complexada com tripsina em pH 7,5.....	44
Figura 15. Cromatograma da purificação por exclusão molecular do produto da reação entre a α_2 -macroglobulina e a tripsina em pH 9,0.....	45

Figura 16. Teste de atividade da tripsina realizada com o purificado do produto da reação entre a A2M e a tripsina em pH 9,0.....	45
Figura 17. Cromatograma do teste de captura de proteases pela A2M quando imobilizada em coluna de afinidade (Ni^{2+}).....	46
Figura 18. Teste de atividade da tripsina realizado com as frações eluídas durante o teste de captura de proteases com a A2M imobilizada em coluna.....	47
Figura 19. Cromatograma do teste de identificação de proteases em extrato de <i>E. coli</i> utilizando a A2M imobilizada.....	48
Figura 20. Cromatograma do teste de identificação de proteases em extrato de <i>P. pastoris</i> utilizando a A2M imobilizada.....	49
Figura 21. Cromatograma do teste de identificação de proteases em extrato de <i>V. unguiculata</i> utilizando a A2M imobilizada.....	50
Figura 22. Espectros de CD (260-195 nm) a 25°C em tampão Tris e Acetato de sódio 2 mM nos pH 4,0, 7,5 e 9,0.....	53
Figura 23. Curvas de desnaturação térmica da α_2 -macroglobulina monitoradas a 218 nm nos pH 4,0, 7,5 e 9,0.....	54
Figura 24. Espectros de CD (260-195 nm) em tampão acetato de sódio 2 mM no pH 4,0 de 25 a 95°C.....	55
Figura 25. Espectros de CD (260-195 nm) em tampão tris 2 mM no pH 7,5 de 25 a 95°C.....	55
Figura 26. Espectros de CD (260-195 nm) em tampão tris 2mM no pH 9,0 de 25 a 95°C.....	56
Figura 27. Espectros de fluorescência da α_2 -macroglobulina em diferentes pH (3,5 a 9,0).....	57
Figura 28. Análise da velocidade de sedimentação da A2M pura por ultracentrifugação analítica.....	58
Figura 29. Análise da velocidade de sedimentação por ultracentrifugação analítica da A2M em complexo com a tripsina.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação geral das proteases com seu código da <i>Enzime Comission</i> (EC) acompanhado pelo mecanismo de ação específico de cada grupo.....	16
Tabela 2. Utilização de proteases nas diferentes indústrias.....	21
Tabela 3. Dados referentes às amostras submetidas à espectrometria de massas.....	51
Tabela 4. Proteínas identificadas por espectrometria de massas a partir dos peptídeos gerados por tripsinização das amostras obtidas dos testes com extratos.....	52
Tabela 5. Comparação entre o percentual conhecido de estrutura secundária da α_2 -macroglobulina com os obtidos em diferentes pH a 25 °C.....	53
Tabela 6. Dados dos experimentos de ultracentrifugação analítica com a A2M nativa e complexada com tripsina.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

A2M	α_2 -macroglobulina
BAPNA	N_α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride
BRD	<i>Bait region domain</i> (Domínio de isca)
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	DL-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECAM	α_2 -macroglobulina de <i>E. coli</i>
g	Gramma
HCl	Ácido clorídrico
h	Hora (s)
IPTG	Isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Luria-bertani
M	Molar
μ g	Micrograma
μ g/mL	Micrograma por mililitro
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
m/v	Massa por volume
mA	Miliampere
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mM	Milimolar
Min	Minutos
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NaOH	Hidróxido de sódio
ng/mL	Nanograma por mililitro

nm	Nanômetro
O.D.	<i>Optical density</i> (densidade ótica)
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (https://www.rcsb.org/pdb)
Rmsd	<i>Root Mean Square Deviation</i>
r.p.m.	Rotação por minuto
s	Segundos
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (cromatografia de exclusão
molecular)	
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TED	<i>thioester domain</i> (Domínio da ligação tioéster)
TFA	Ácido trifluoroacético
UV	Ultravioleta
U/ μ L	Unidade por microlitro
V	Volts
v/v	Volume por volume
<i>V. unguiculata</i>	<i>Vigna unguiculata</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. PROTEASES	15
1.1.1. Mecanismo catalítico	15
1.1.1.1. Serina proteases	17
1.1.1.2. Proteases Aspárticas.....	17
1.1.1.3. Metaloproteases.....	18
1.1.1.4. Cisteína proteases.....	18
1.1.2. Proteases em processos biológicos.....	19
1.1.3. Proteases na indústria	20
1.1.4. Identificação de proteases	21
2.2. INIBIDORES DE PROTEASES.....	22
2.2.1. α_2 -macroglobulinas (A2M).....	23
2.2.1.1. α_2 -macroglobulinas eucariontes.....	24
2.2.1.2. α_2 -macroglobulinas bacterianas.....	25
2.2.1.2.1. α_2 -macroglobulina de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium.....	26
4. OBJETIVOS	29
4.1. OBJETIVOS GERAIS	29
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1. EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA PARA A A_2 -MACROGLOBULINA DE <i>S. ENTERICA</i>	30
5.1.1. Transformação de células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pelo método de choque térmico	30
5.1.2. Indução da expressão em um clone positivo.....	30
5.2. PURIFICAÇÃO DA A_2 -MACROGLOBULINA.....	31
5.2.1. Purificação por meio de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+}) ...	31
5.2.2. Purificação por meio de cromatografia de exclusão molecular (SEC)	32
5.3. TESTES DE CAPTURA DE PROTEASES PELA A_2 -MACROGLOBULINA.....	32
5.3.1. Teste de captura de tripsina em solução.....	32
5.3.1.1. Teste de captura de tripsina no pH 9,0.....	33
5.3.1.2. Análise do perfil eletroforético do complexo A2M-Tripsina.....	33
5.3.2. Teste de captura de proteases quando imobilizada em coluna.....	33
5.3.2.1. Teste de captura da tripsina	33
5.3.2.2. Teste de captura de proteases em extratos celulares.....	33
5.3.2.2.1. Preparo das amostras.....	34
5.3.3.2.2. Cromatografia utilizando a A2M imobilizada	34
5.3.3.2.3. Preparo das amostras para espectrometria de massas	34
5.3.3.2.4. Análise do conteúdo proteico utilizando espectrometria de massas.....	35
5.4. ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERMOESTABILIDADE POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	36
5.5. ANÁLISE DO EFEITO DO PH NA ESTRUTURA TERCIÁRIA POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	36
5.6. ANÁLISE POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA DA A2M E DO COMPLEXO COM TRIPSINA	36

6. RESULTADOS	38
6.1. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO E ANÁLISE DA SOLUBILIDADE.....	38
6.2. PURIFICAÇÃO DA A ₂ -MACROGLOBULINA.....	39
6.2.1. <i>Purificação por meio de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni²⁺) ...</i>	39
6.2.2. <i>Purificação por meio de cromatografia por exclusão molecular (SEC).....</i>	40
6.3. TESTE DE CAPTURA DE PROTEASES PELA A ₂ -MACROGLOBULINA.....	42
6.3.2. <i>Teste de captura de proteases em solução.....</i>	42
6.3.2.1. <i>Teste de captura de tripsina no pH 9,0.....</i>	44
6.3.3.1. <i>Teste de captura da tripsina</i>	46
6.3.3.2. <i>Testes de captura de proteases em extratos celulares.....</i>	47
6.3.3.2.1. <i>Cromatografias utilizando a A2M imobilizada.....</i>	47
6.3.3.2.2. <i>Análise do conteúdo proteico por espectrometria de massas.....</i>	50
6.4. ANÁLISES DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERMOESTABILIDADE POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	51
6.4.1. <i>Estrutura secundária a 25°C em diferentes pH.....</i>	51
6.4.2. <i>Análise de termoestabilidade.....</i>	54
6.5. ANÁLISE DO EFEITO DO PH NA ESTRUTURA TERCIÁRIA POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	56
6.6. ANÁLISE POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA DA A2M E DO COMPLEXO COM TRIPSINA	57
7. DISCUSSÃO	60
8. CONCLUSÃO.....	64
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. PROTEASES

As proteases (ou enzimas proteolíticas) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. Embora todas possuam a mesma capacidade de catabolizar proteínas, diferem significativamente em diversos fatores, como por exemplo, o tamanho, a localização e a organização da estrutura quaternária (SANMAN & BOGYO, 2014). A evolução as selecionou de acordo com as mais diversas condições encontradas nos organismos, tais como variação de pH, temperatura e especificidade de substrato (TURK, 2006; JISHA et al., 2013). De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular – IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) as proteases são classificadas dentro do subgrupo 4 do grupo 3, grupo o qual engloba as hidrolases.

Devido à sua grande diversidade de estrutura e ações, podem receber vários tipos de classificações. Quando o pH é considerado, são classificadas como ácidas, neutras ou alcalinas; com base no sítio onde agem no substrato, podem ser exo- ou endo- enzimas e, sobretudo, de acordo com seu mecanismo catalítico, podem ser classificadas principalmente como serina proteases, proteases aspárticas, metaloproteases ou cisteína proteases (Tabela 1) (RAO et al., 1998; JISHA et al., 2013). No banco de dados online MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops>) encontra-se todo tipo de informação sobre proteases e seus inibidores. Seu princípio organizacional parte de uma classificação hierárquica onde conjuntos de sequências homólogas de proteases e inibidores são agrupados em espécies, as quais são agrupadas em famílias e por fim compiladas em clãs. As famílias contêm sequências relacionadas e os clãs estruturas relacionadas (RAWLINGS et al., 2016).

1.1.1. Mecanismo catalítico

Independente da sua classificação, para hidrolisar a ligação peptídica todas as proteases devem superar três obstáculos: (I) a estabilidade da ligação amida devido à ressonância entre o nitrogênio e o grupo carbonila, o que faz com que as proteases geralmente ativem a ligação amida através da interação do oxigênio da carbonila com um resíduo que age como ácido, podendo assim distorcer a ligação peptídica rompendo a estabilização da ressonância; (II) a fraqueza da água como nucleófilo, necessitando que haja a ativação da água, realizada geralmente por um resíduo que aja como base; (III) a pobreza da amina como grupo de saída, fazendo com que a protease a protone antes da expulsão (HEDSTROM, 2002).

Tabela 1. Classificação geral das proteases com seu código da *Enzime Comission* (EC) acompanhado pelo mecanismo de ação específico de cada grupo. Tabela adaptada de JISHA et al., 2013.

Protease	Código EC	Mecanismo
Exopeptidases	3.4.11-19	Cliva a ligação peptídica proximal ao C ou N-terminal do substrato
Aminopectidases	3.4.11	Age no N-terminal liberando um único resíduo
Dipeptidases	3.4.13	Exopeptidases específica para dipeptídeos
Dipeptidil peptidase	3.4.14	Libera um dipeptídeo do N-terminal de um polipeptídeo
Tripeptidil peptidase	3.4.14	Libera um tripeptídeo do N-terminal de um polipeptídeo
Peptidildipeptidase	3.4.15	Libera dipeptídeo do C-terminal
Carboxipeptidase	3.4.16-18	Libera um único resíduo do C-terminal de um polipeptídeo
Protease tipo serina	3.4.16	Carboxipeptidase com serina no sítio ativo envolvida na catálise
Metaloprotease	3.4.17	Carboxipeptidase que utiliza um íon na catálise
Cisteína protease	3.4.18	Carboxipeptidase com cisteína no sítio ativo
Omega peptidases	3.4.19	Remove resíduos terminais que são ligados por ligações isopeptídicas
Endopeptidases	3.4.21-24	Cliva ligações internas em cadeias polipeptídicas
Serina protease	3.4.21	Endopeptidases que possuem serina no sítio ativo envolvida na catálise
Cisteína protease	3.4.22	Possui cisteína no sítio ativo
Protease Aspártica	3.4.23	Resíduo de ácido aspártico envolvido na atividade catalítica
Metaloprotease	3.4.24	Usa um íon metálico no mecanismo catalítico
Endopeptidases de mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99	Age nas ligações peptídicas

1.1.1.1. *Serina proteases*

Configura-se como um dos grupos mais abundante e diverso em termo de função, sendo encontradas em todos os reinos vivos, assim como em muitos genomas virais. Seu nome é em virtude da presença de uma serina nucleofílica no sítio ativo. Estão agrupadas em treze clãs sendo divididas em 40 famílias. Desempenham papéis importantes na saúde e em doenças humanas, tendo suas propriedades químicas moldado a evolução molecular desses processos (PAGE & CERA, 2008; VANDERMARLIERE et al., 2013). As serina proteases do tipo tripsina são as proteases mais estudadas do genoma humano, sendo a tripsina uma das proteases digestivas mais importantes dos vertebrados (NIU et al., 2011; VANDERMARLIERE et al., 2013).

O mecanismo catalítico das serina proteases se inicia com um ataque nucleofílico da serina ao grupo carbonila do substrato. Este ataque é potencializado pela tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195, numeração da quimotripsina) que potencializa o caráter nucleofílico do oxigênio gama da serina. Isto ocorre através da ionização da serina por meio da doação do seu próton ligado ao oxigênio gama ao nitrogênio da histidina. Essa histidina forma uma ligação de hidrogênio com um ácido aspártico do sítio ativo, tornando o seu nitrogênio mais eletronegativo. O ataque da serina resulta na formação de um intermediário acil-enzima e na liberação do fragmento N-terminal da ligação rompida. Em seguida uma molécula de água é ativada pela histidina e ataca o intermediário acil-enzima, o que resulta na liberação do C-terminal da ligação peptídica. Ao final o próton da histidina retorna à serina restaurando assim a enzima (Figura 1-A) (HEDSTROM, 2002; VANDERMARLIERE et al., 2013).

1.1.1.2. *Proteases Aspárticas*

As proteases aspárticas pertencem ao clã AA das endopeptidases, o qual é caracterizado pelo uso da água como nucleófilo ligada a dois resíduos catalíticos de ácido aspártico (DUNN, 2001). Definem-se por diversos fatores, dentre eles, pela presença de dois resíduos de ácido aspártico localizados dentro de dois motivos Asp-Thr/Ser-Gly responsáveis pela atividade catalítica, pelo pH ótimo ácido, pela região de clivagem preferencialmente entre aminoácidos grandes e hidrofóbicos e a inibição pelos inibidores pepstatina A, DAN (diazó-acetyl-norleucine methyl ester), e EPNP (*1,2-epoxy-3-(p-nitro-phenoxy) propane*). Estão amplamente distribuídas entre todos os reinos além de serem encontradas também em vírus (HORIMOTO et al., 2009; GUO et al., 2013).

Tomando como exemplo os membros pertencentes à família A1, a qual engloba aqueles membros que possuem similaridade de sequência com a pepsina suína, o mecanismo catalítico tem o seu início por meio da subtração de um próton da molécula de

água por um dos resíduos de aspartato do sítio ativo, levando a molécula de água a realizar um ataque nucleofílico à carbonila da ligação peptídica. O intermediário formado pode ser quebrado tanto pela doação do próton retirado pelo ácido aspártico, quanto pela aquisição de um próton do solvente, com ambos levando ao desligamento do grupamento amina (Figura 1-C) (DUNN, 2001).

1.1.1.3. Metaloproteases

As metaloproteases são enzimas que utilizam metal como elemento chave na catálise. O zinco é o mais utilizado, podendo também ser encontrado cobalto, manganês ou níquel (CERDÀ-COSTA & GOMIS-RÜTH, 2014; AULD, 2013). Tais metais localizam-se no fundo do sítio ativo ancorados em cadeias laterais de resíduos ali presentes (AULD, 2013). Encontram-se distribuídas em 14 clãs e são separadas em dois grupos, a depender da quantidade de íons metálicos (um ou dois) envolvidos na catálise (RAWLINGS & BARRETT, 2013). Seu exemplo mais estudado compreende as metaloproteases de matriz, uma família de enzimas envolvida no remodelamento de tecido e na sinalização celular (BERTINI et al., 2006).

No mecanismo de catálise considerado consenso, o processo se inicia com a ligação de uma molécula de água ao íon metálico seguido pela interação com uma base (geralmente um glutamato) que a polariza e aumenta sua eletronegatividade. A carbonila da ligação peptídica é atacada pela molécula de água gerando um intermediário, o qual é desfeito pela transferência de dois prótons à amina de saída (Figura 1-D) (CERDÀ-COSTA & GOMIS-RÜTH, 2014).

1.1.1.4. Cisteína proteases

As cisteína proteases têm como característica a presença de um resíduo de cisteína envolvido na catálise. Embora possuam mecanismo catalítico semelhante, são uma classe de proteases que se originou separadamente diversas vezes durante a evolução (BARRETT; RAWLINGS, 2001). Compreende 82 famílias classificadas em 14 clãs, onde o clã CA, que compreende o das proteases tipo papaína, é o mais numeroso (KĘDZIOR et al., 2016). No seu mecanismo catalítico, a cisteína do sítio ativo é desprotonada, agindo como um nucleófilo e atacando a carbonila da ligação peptídica. Uma histidina do sítio ativo doa um próton à amina de saída e é formado um intermediário através de uma ligação tioéster, o qual é hidrolisado liberando o C-terminal (Figura 1-B) (POLGAR, 2013).

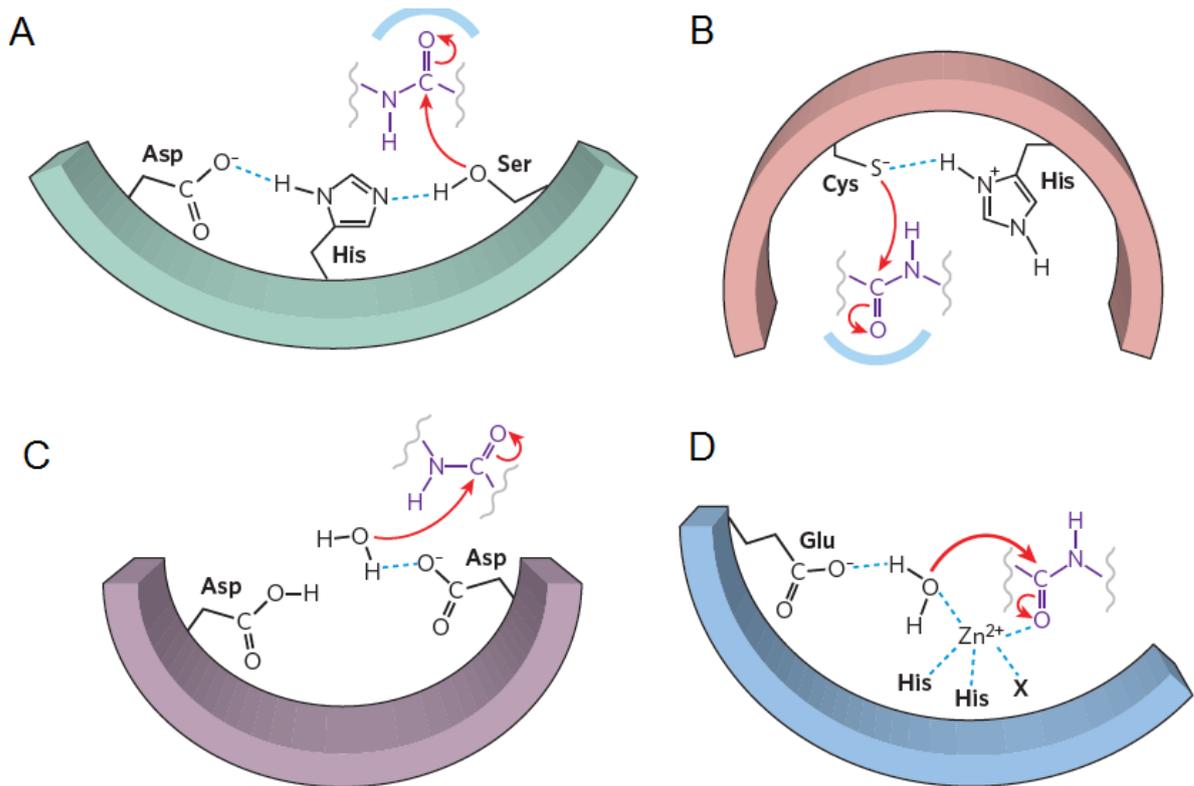


Figura 1. Mecanismo de catálise das principais classes de proteases. **A:** Serina protease; **B:** Cisteína protease; **C:** Protease aspártica; e **D:** Metaloprotease. Adaptado de EREZ et al., 2009.

1.1.2. Proteases em processos biológicos

As proteases presumivelmente surgiram nos primórdios da evolução das proteínas como simples enzimas destrutivas necessárias ao catabolismo dos organismos primitivos. Entretanto, vieram a realizar, com o tempo, atividades altamente específicas no processamento de proteínas, controlando diversos processos biológicos. Deste modo, as proteases regulam o destino, a localização e a atividade de várias proteínas, modulam as interações proteína-proteína, contribuem para o processamento da informação celular e geram, transduzem e amplificam os sinais moleculares. Como resultado dessas ações, as proteases influenciam a replicação e transcrição de DNA, proliferação e diferenciação celular, morfogênese e remodelação de tecido, coagulação sanguínea, inflamação, imunidade, autofagia, necrose, apoptose, dentre outros processos. As proteases também apresentam papéis chave no metabolismo de plantas, atuando, por exemplo, na resposta a mudanças ambientais, na senescência e na morte celular (GARCÍA-LORENZO, 2006; LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

Alterações em processos proteolíticos estão envolvidas em diversas patologias, tais como câncer, desordens degenerativas e doenças cardíacas. Logo, muitas proteases são

foco da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de drogas e na criação de biomarcadores (TURK, 2006; LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). No câncer, por exemplo, as proteases responsáveis pelo aumento da atividade proteolítica representam candidatos a biomarcadores que podem ser utilizados para fins diagnósticos. Os níveis detectados desses biomarcadores podem ser utilizados como métrica para pressupor a eficácia terapêutica de tratamentos (LEBEAU et al., 2013). Em doenças cardiovasculares, diversas proteases são listadas como potenciais biomarcadores. Dentre eles encontram-se diversas catepsinas, cujo aumento do nível no sangue está associado ao infarto agudo do miocárdio (HUA & NAIR, 2015).

1.1.3. Proteases na indústria

Metodologias que envolvam a hidrólise proteica encontram grandes aplicações industriais. Tais aplicações podem ser encontradas nas indústrias de detergente e de alimentos, sendo também aplicadas na produção de couro, tecidos, medicamentos, na formulação de amostras para análise de aminoácidos ou estudos proteômicos e até no desenvolvimento de hidrolisados de proteínas projetados para suporte nutricional (TAVANO, 2013; SINGH et al., 2016). A aplicação das proteases nas mais diversas indústrias encontra-se resumida na tabela 2.

Na indústria de detergentes, as proteases são empregadas na digestão de manchas derivadas de alimentos, de sangue e de outras secreções corporais, removendo as manchas de maneira eco-amigável, onde há menor período de imersão e agitação. São usadas como constituintes essenciais em formulações de detergentes visando aprimorar sua performance, os quais são usados em lavagens domésticas, em soluções de limpeza para lentes de contato e em próteses dentárias (SINGH et al., 2016). Na indústria alimentícia, estão principalmente envolvidas na modificação das propriedades de proteínas a fim de melhorar no alimento o valor nutricional, a solubilidade, a digestibilidade, o sabor, a palatabilidade e redução de compostos alergênicos (GUPTA et al., 2002; TAVANO, 2013; SINGH et al., 2016).

Para fins medicinais, as proteases contribuem no desenvolvimento de agentes terapêuticos, tais como antimicrobianos e anti-inflamatórios. Além de econômico, o tratamento da inflamação com o uso de protease não possui qualquer efeito colateral relatado. A serratiopeptidase é a protease mais eficaz usada contra a inflamação, sendo também utilizada para inibir a liberação do peptídeo indutor da dor (bradicinina), ou seja, como analgésico (SINGH et al., 2016). Proteases são também empregadas, junto com antibióticos, no tratamento de queimaduras e ferimentos e na eliminação de asparagina em várias formas de leucemia (RAO et al., 1998).

Por possuírem funções fisiológicas em todos os seres vivos, as proteases de valor comercial podem ser encontradas e prospectadas nas mais diversas fontes. As proteases de origem vegetal mais estudadas são a bromelina, a ficina e a papaína extraídas de *Ananas comosus*, *Ficus carica* e *Carica papaya*, respectivamente. Estas proteases são utilizadas na fabricação de cerveja, no amaciamento de carne, na coagulação do leite, dentre outras aplicações (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011; SINGH et al., 2016). As proteases animais mais usadas são a tripsina pancreática, a quimotripsina, a pepsina e a renina. A tripsina, por exemplo, é utilizada no biocontrole de pestes, e em diversas aplicações médicas. Entretanto, os maiores produtores de proteases de valor industrial são os microrganismos, devido, principalmente, à sua ampla especificidade de substrato (SINGH et al., 2016). Como englobam organismos dos mais variados tipos, são capazes de produzir proteases termoestáveis bem como proteases que funcionam em uma ampla faixa de pH, as quais despertam alto interesse comercial (SOUZA et al., 2015). As proteases termoestáveis, por exemplo, são utilizadas nas indústrias de couro e detergentes, uma vez que consistem em processos que requerem altas temperaturas (RAO et al., 1998). As proteases alcalinas são geralmente utilizadas como aditivos de detergentes (TAVANO, 2013).

Tabela 2. Utilização de proteases nas diferentes indústrias. Adaptado de SINGH et al., 2016.

Indústria	Aplicações
Alimentos	Melhoramento da digestibilidade, palatabilidade etc.; melhoramento na recuperação de óleos de frutos do mar; amaciamento da carne; redução da alergenicidade
Detergente	Melhoramento do processo de lavagem
Síntese de peptídeos	Síntese peptídica enantiosseletiva
Têxtil	Desenvolvimento de textura
Couro	Processamento do couro
Biorremediação	Tratamento de esgoto
Farmacêutica	Anticâncer, anti-inflamatórios, agentes coagulantes
Outras	Recuperação de prata, desgomagem da seda

1.1.4. Identificação de proteases

Hoje, uma das metodologias mais utilizadas na identificação de novas proteases e de outras enzimas é o sequenciamento e anotação de genomas, onde a função de proteína é anotada de acordo com a similaridade de sequências. Entretanto, esse tipo de metodologia

gera muitas sequências hipotéticas que dificilmente serão caracterizadas, não fornecendo, dessa forma, informação definitiva. Além disso, ocorrem muitos erros em anotações, onde genes com alta similaridade produzem proteínas que catalisam reações essencialmente diferentes. O banco de dados MEROPS atualmente restringiu as sequências adicionadas somente àquelas que venham de proteínas caracterizadas ou de hipotéticas provenientes de organismos de interesse comercial e médico (KUZNETSOVA et al., 2005; PROSSER et al., 2014; RAWLINGS et al., 2018).

Outras metodologias de identificação de proteases baseiam-se em ensaios de atividade da enzima. Um deles é o realizado *in vitro* com a enzima purificada, cuja sequência pode ter sido obtida a partir de genes hipotéticos. Seu maior problema é que requer, pelo menos, um conhecimento básico prévio do tipo de reação catalisada e da especificidade do substrato. Logo, apresenta aplicabilidade limitada (PROSSER et al., 2014). Varredura em bibliotecas metagenômicas também é uma metodologia bastante utilizada. Nesse caso, são realizados diversos tipos de ensaios com os clones de forma a detectar a atividade desejada. Como correspondem a sequências de DNA não muito grandes, em teoria não é difícil supor qual o gene responsável pela atividade (IQBAL et al., 2014).

2.2. INIBIDORES DE PROTEASES

Apesar das funções vitais desempenhadas pelas proteases, a degradação descontrolada das proteínas pode ser muito prejudicial à célula. Existem vários mecanismos que limitam a proteólise indesejada, sendo o mais importante entre eles as interações das enzimas com proteínas ou outras substâncias que as inibem, os quais são denominados de inibidores (RAWLINGS, 2010). Os inibidores de proteases, assim como as proteases, podem ser classificados em famílias, onde leva-se em consideração a homologia de sequências, e em clãs onde é levado em consideração o tipo de dobramento. A forma como os inibidores proteicos interagem com a protease pode variar grandemente, embora duas formas gerais possam ser reconhecidas: (1) reações irreversíveis do tipo armadilha, onde a inibição depende da clivagem de uma ligação peptídica interna do inibidor, levando a uma mudança conformacional e ao aprisionamento da protease. É classificada como irreversível porque não há reparação da modificação sofrida pelo inibidor. As três famílias de inibidores que apresentam esse tipo de inibição compreende as serpinas, as α_2 -macroglobulinas, e as proteínas p35; (2) reações reversíveis de ligação forte, onde há interação forte entre o inibidor e o sítio ativo da protease. Nesse caso uma região do inibidor liga-se à enzima de uma forma semelhante ao substrato (RAWLINGS et al., 2004).

2.2.1. α_2 -macroglobulinas (A2M)

As α_2 -macroglobulinas compreendem uma família de proteínas de alta massa molecular (monômeros com mais de 1400 resíduos de aminoácidos) e multidomínio que funcionam como inibidoras de amplo espectro de proteases, onde sua inibição independe do mecanismo catalítico da endopeptidase envolvida. Em sua maioria possuem uma ligação tioéster (grupo funcional R-S-CO-R') interna crítica ao seu funcionamento, formada entre as cadeias laterais de uma cisteína e de uma glutamina localizada três resíduos à frente na sequência (Figura 2) (DOAN & GETTINS, 2008; GARCIA-FERRER et al., 2015; GOULAS et al., 2017). Estão presentes em todos os tipos de metazoários, sendo encontradas tanto na circulação de vertebrados e invertebrados como nos ovos de répteis e aves (SOTTRUP-JENSEN, 1989; DOAN & GETTINS, 2008). Também estão presentes em alguns procaríotos, tais como bactérias gram-negativas patogênicas e colonizadoras de eucariotos superiores (BUDD et al., 2004; NEVES et al., 2012). Entretanto, encontram-se ausentes em arqueias, protozoários, fungos e plantas (GOULAS et al., 2017). A atividade inibitória das A2M ocorre por meio do aprisionamento físico das proteases que se segue após a clivagem de uma região de isca, embora haja uma variação entre o mecanismo eucariótico e o procariótico (MARRERO et al., 2012; GARCIA-FERRER et al., 2015). Nesses mecanismos o tioéster reage com a protease, ligando-se covalentemente a ela (DODDS&ALEX LAW, 1998).

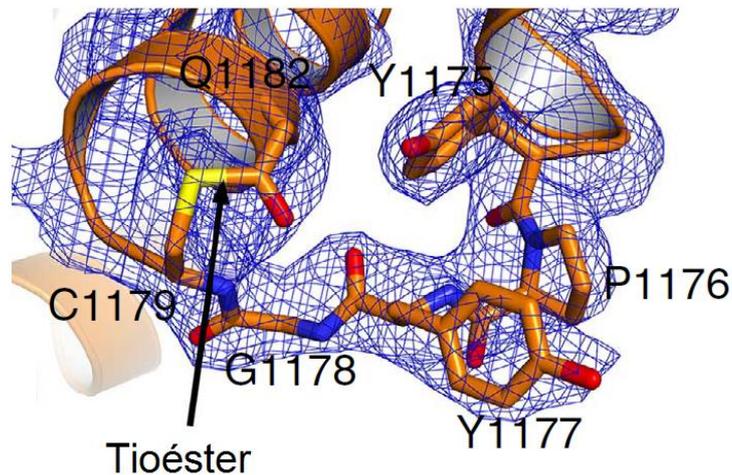


Figura 2. Ligação tioéster formada pelas cadeias laterais dos resíduos de cisteína 1179 e glutamina 1182. A ligação é a responsável por ligar covalentemente a protease à A2M. Adaptado de WONG & DESSEN, 2014.

2.2.1.1. α_2 -macroglobulinas eucariontes

As A2M de vertebrados são glicoproteínas tetraméricas compostas de subunidades idênticas, onde cada par de subunidades é ligado, via ligação dissulfeto, e interage de forma não covalente com um par adjacente (SOTTRUP-JENSEN, 1989; KOLODZIEJ et al., 2002). As A2M, juntamente com as proteínas do complemento (C3 e C4), são proteínas da imunidade inata e formam uma superfamília de proteínas semelhantes estruturalmente e evolutivamente relacionadas (WONG & DESSEN, 2014). Ambas possuem a ligação tioéster interna (caracterizada pelo motivo conservado CxEQ) (NEVES et al., 2012), o que as possibilita de ligar-se covalentemente ao alvo. Acredita-se que as A2M sejam mais antigas, tendo em vista que as A2M estão presentes em moluscos e artrópodes, os quais não possuem a proteína C3. Sabe-se que a C3 originou-se a partir de duplicação gênica da A2M (DODDS & ALEX LAW, 1998).

A α_2 -macroglobulina humana é a mais estudada dentre as eucarióticas. Sintetizada pelo fígado, é encontrada na circulação em uma alta concentração, equivalendo a aproximadamente 3% do total de proteínas plasmáticas (GOULAS et al., 2017). É composta por quatro subunidades de 180 kDa cada, ordenadas em dímeros os quais ligam-se entre si através de ligações dissulfeto (DODDS & ALEX LAW, 1998; MARRERO et al., 2012). Na sua forma inativa, o tetrâmero consegue acomodar peptidases dentro de si. O mecanismo se inicia quando, lá dentro, a protease cliva uma região de isca chamada de BRD (*bait region domain*). O domínio BRD contém 39 resíduos de aminoácidos com muitos potenciais sítios de reconhecimento, de modo que mesmo as proteases que possuam especificidade rara possam ser capturadas. Após a clivagem, o tetrâmero sofre uma drástica modificação conformacional dando origem à sua forma induzida, resultando no aprisionamento da protease em seu interior, em um mecanismo conhecido como do tipo "planta carnívora" (*Venus flytrap*). A clivagem da região de isca expõe a ligação tioéster (que se encontra no domínio TED- *thioester domain*) que até então encontrava-se enterrada no interior da proteína. A amina de uma lisina da superfície da protease reage com o tioéster, clivando-o e ligando as duas proteínas covalentemente (MARRERO et al., 2012; GARCIA-FERRER et al., 2015; GOULAS et al., 2017). Nesse processo há a ligação do carbonil- γ do resíduo de glutamina com o grupamento amino da lisina, formando uma ligação do tipo isopeptídica (Figura 3) (QUIGLEY et al., 1991). A indução da A2M leva à exposição do domínio de ligação ao receptor (RBD- *receptor-binding domain*), o qual se liga a receptores de superfície das células levando à remoção da A2M e da protease da circulação. O rearranjo conformacional também pode ser obtido pelo tratamento da proteína com metilamina, um nucleófilo pequeno capaz de inativar a ligação tioéster (WONG; DESSEN, 2014). Nessa conformação a região de isca encontra-se intacta porém a proteína não mais reage com outras proteases porque já encontra-se fechada. Outras A2M tetraméricas operam de forma

similar à humana, sendo descrita de vários mamíferos, aves, anfíbios, répteis e invertebrados (GOULAS et al., 2017).



Figura 3. Mecanismo esquemático da inibição de proteases realizada pela A2M humana. No estado nativo o tetrâmero apresenta-se aberto com a região de isca acessível à protease (*Pac-Man* amarelo). Uma vez que a protease cliva a isca, a ligação tioéster se torna exposta de forma a ficar acessível à lisina da superfície da protease, levando à formação da ligação covalente entre a lisina e a glutamina. A mudança estrutural induzida pela ligação de ambas leva ao fechamento do tetrâmero e aprisionamento da protease. Imagem adaptada de GOULAS et al., 2017.

2.2.1.2. α_2 -macroglobulinas bacterianas

Encontradas em bactérias patogênicas e colonizadoras de metazoários, as A2M bacterianas foram provavelmente adquiridas por meio de transferência horizontal gênica a partir de eucariotos superiores. Acredita-se que teriam ocorrido algumas poucas transferências iniciais com o gene se espalhando para outras bactérias colonizadoras por meio de, pelo menos, dez eventos separados de transferência horizontal (BUDD et al., 2004). Encontram-se ancoradas na membrana interna de bactérias gram-negativas viradas para o espaço periplasmático onde funcionariam como um sistema imune inato rudimentar (WONG; DESSEN, 2014; GOULAS et al., 2017). A A2M bacteriana também possui o motivo CxEQ e é codificada por um gene localizado próximo ao gene que codifica para a proteína ligante de penicilina c1 (PBP 1c), uma proteína que desempenha papel chave na síntese de peptidoglicano. Tal observação leva a crer que ambas as proteínas provavelmente atuam em conjunto durante a infecção, onde a A2M protege a bactéria contra proteases e a PBP 1c age no reparo da parede celular em caso de ruptura (NEVES et al., 2012; WONG & DESSEN, 2014). Além disso, estudos com a A2M de *E. coli* (ECAM) revelaram que as células do tipo selvagem têm uma maior taxa de sobrevivência do que aquelas *knockout* para o gene da ECAM (GARCIA-FERRER et al., 2015).

As A2M bacterianas são monoméricas e, apesar de compartilharem algumas características com as eucarióticas, diferem no modo de ação. Como demonstrou Garcia-Ferrer e colaboradores (2015), a captura da protease pela proteína bacteriana não ocorre pelo aprisionamento do tipo “planta carnívora” e sim por meio de um mecanismo do tipo “ratoeira” (*snap-trap*). Nesse caso, a clivagem da região de isca (a qual apresenta, aproximadamente, 25 resíduos) gera uma mudança conformacional monomérica, o que leva à exposição da ligação tioéster transformando a A2M em uma estrutura mais compacta que culmina na ligação à protease e seu aprisionamento (Figura 4). Apesar da captura da protease pela A2M ser considerada como uma inibição, ela não ocorre para todos os substratos. Pequenos substratos ainda conseguem ter acesso à protease em seu interior. Há somente a inibição da proteólise quando os substratos são proteínas de alta massa molecular (DOAN; GETTINS, 2008; GARCIA-FERRER et al., 2015). Ademais, diferente das eucarióticas, as A2M bacterianas não sofrem mudança estrutural quando tratadas com metilamina; no seu caso, só há mudança para o estado induzido se houver clivagem da região de isca (GOULAS et al., 2017).



Figura 4. Mecanismo esquemático de inibição de proteases pela A2M bacteriana. A clivagem da região de isca (domínio BRD) expõe a ligação tioéster a qual interage com uma lisina da superfície da protease (*Pac-Man* amarelo) ligando ambas covalentemente. Imagem adaptada de GOULAS et al., 2017.

2.2.1.2.1. α_2 -macroglobulina de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium

Wong & Dessen (2014) resolveram, por difração de raios X, a estrutura cristalográfica da A2M da bactéria *Salmonella enterica*. A proteína de 180 kDa e 1644 resíduos apresenta 13 domínios, dentre eles o TED e o BRD, que estão também presentes nas versões eucarióticas. Entretanto, apresenta os domínios MG1 e MG2, que são únicos às bactérias. Tendo em vista que seu N-terminal é ancorado à membrana interna bacteriana, os autores acreditam que tais domínios fornecem maior liberdade de movimento na captura

de proteases, sendo, portanto, uma adaptação desenvolvida pelas bactérias à localização ancorada, diferente da eucarionte, que encontra-se no sistema circulatório.

A estrutura cristalográfica revelou que o seu motivo tioéster possui uma leucina no resíduo variável (CLEQ) e que há um bolsão ao redor do tioéster composto por resíduos aromáticos e hidrofóbicos, os quais o protegem da hidrólise pela água. Além disso, os autores conseguiram confirmar que para que haja uma captura efetiva da protease o tioéster necessita estar intacto. Nesse caso, eles criaram um mutante com sítio de clivagem da protease TEV, e realizaram dois testes, onde no primeiro inocularam a TEV com a A2M nativa e no segundo a TEV com a A2M tratada com metilamina que, como já citado anteriormente, inativa a ligação tioéster. Os autores verificaram por SDS-PAGE e por espectrometria de massas que a TEV encontrava-se ligada somente à A2M nativa.

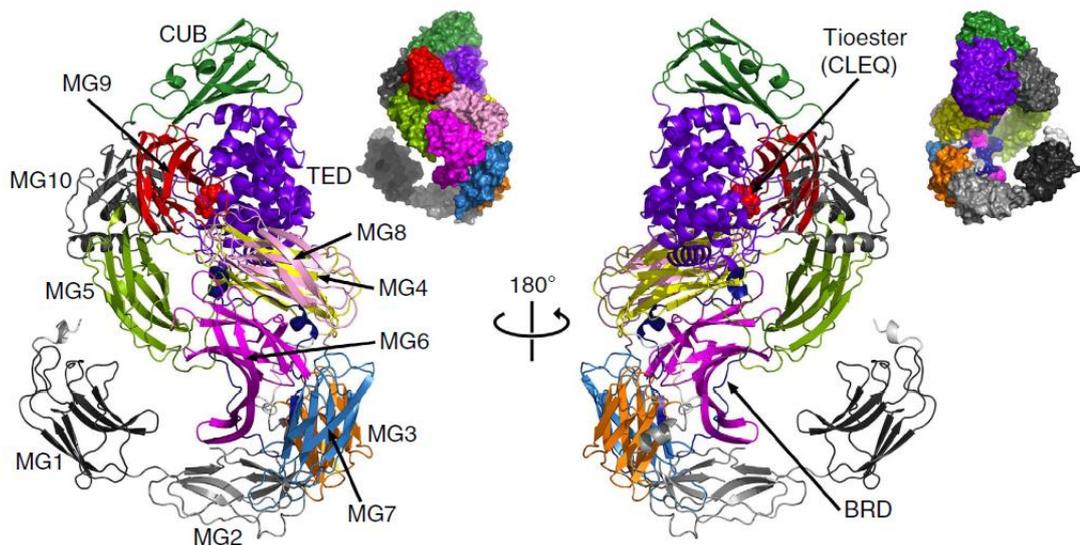


Figura 5. Estrutura cristalográfica da A2M de *S. enterica* ser. Typhimurium. Estrutura geral da A2M exibida da forma nativa, antes da reação com proteases. O sítio do tioéster está enterrado na interface entre os domínios TED e MG10. Adaptado de WONG & DESSEN, 2014.

3. JUSTIFICATIVA

As proteases são uma das mais importantes classes de enzimas, atuando em diversos processos biológicos. São fundamentais desde a coagulação do sangue (KRARUP et al., 2007), até na metástase de células tumorais (DASS et al, 2008). Além disso, são proteínas de alto interesse industrial, sendo aplicadas nos mais distintos processos (LI et al., 2012).

A utilização da α_2 -macroglobulina no isolamento de proteases a partir de diferentes fontes celulares pode ser uma importante ferramenta no entendimento do papel dessas enzimas em diversos processos biológicos, sejam eles fisiológicos ou de patogenicidade. Além disso, podem servir como uma ferramenta de descoberta de novas proteases. Embora muitas espécies já possuam seu genoma sequenciado e muitas proteases sejam anotadas a partir de alta identidade em alinhamentos, poucas são confirmadas como proteases por métodos bioquímicos (RAWLINGS et al., 2014). Logo, o uso da A2M também pode auxiliar a caracterizar proteases até então hipotéticas.

Embora técnicas de identificação de proteases semelhantes já tenham sido desenvolvidas com outros inibidores (SATHLER et al., 2010), elas são limitadas à identificação das proteases pertencentes somente à classe na qual o inibidor atua. Por outro lado, as α_2 -macroglobulinas, por inibirem todos os tipos de protease, configuram-se como uma opção mais vantajosa. Sua utilização com o propósito de identificar proteases poderá ajudar significativamente no aumento do conhecimento dessa classe de enzimas.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Caracterização biofísica de uma α_2 -macroglobulina de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium heteróloga e avaliação do seu potencial uso na seleção e identificação de proteases.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressão da α_2 -macroglobulina de *S. enterica* em *Escherichia coli* BL21 (DE3);
- Purificação da α_2 -macroglobulina por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+}) seguido por cromatografia por exclusão molecular;
- Caracterização estrutural e de estabilidade da α_2 -macroglobulina por análises de dicroísmo circular, fluorescência e ultracentrifugação analítica;
- Criação de uma metodologia de identificação de proteases utilizando a α_2 -macroglobulina;
- Validação da metodologia de identificação de proteases.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA PARA A α_2 -MACROGLOBULINA DE *S. enterica*

5.1.1. Transformação de células de *E. coli* BL21 (DE3) pelo método de choque térmico

A construção contendo o gene da α_2 -macroglobulina foi cedida pela Dra. Andréa Dessen, do Instituto de Biologia Estrutural da Universidade Grenoble Alpes, França. Foi utilizado para a expressão o vetor pET28a, o qual confere à proteína heteróloga uma cauda com seis resíduos de histidina (HisTag 6x) e a capacita a ser purificada utilizando-se uma coluna de afinidade a níquel (Ni^{2+}). O gene compreende a proteína dos resíduos 19 a 1644, tendo sido retirado os resíduos do N-terminal que compreendem o peptídeo sinal e a LAGC lipobox.

Para a transformação das células bacterianas, ~60 ng do vetor construído foi misturado a 100 μL de células de *E. coli* BL21 (DE3) competentes (D.O.₆₀₀ de ~9,0). A mistura foi incubada em gelo por aproximadamente 45 minutos e em seguida submetidas a 42°C durante 90 segundos. Após o choque térmico, as células foram novamente incubadas em gelo por 5 minutos. Logo após, 900 μL de meio de cultura LB (peptona de caseína 1% (m/v), NaCl 1% (m/v) e extrato de levedura 0,5% (m/v)) foi adicionado às células e essas foram incubadas a 37°C durante 1 h. Posteriormente, 100 μL de células foram plaqueados em placa de Petri contendo 25 mL de meio LB sólido (peptona de caseína 1% (m/v), NaCl 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v) e ágar 2% (m/v)), acrescido de canamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A canamicina age como o marcador de seleção, ou seja, seleciona positivamente aqueles clones que foram transformados, tendo em vista que o vetor pET28a confere à bactéria resistência a esse antibiótico.

5.1.2. Indução da expressão em um clone positivo

Foi selecionada uma colônia positiva (transformada com o vetor) proveniente da transformação das células BL21 (DE3) descrita no Item 5.1.1. Essa colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido acrescido de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina e incubada a 37°C *overnight*, sob agitação (220 r.p.m). A partir desse inóculo foram feitos estoques de célula em glicerol 20% (v/v) (120 μL de células com 80 μL de glicerol 50% (v/v)) sendo em seguida armazenadas a -80°C. Para a expressão, um desses estoques foi inoculado em 250 mL de meio LB acrescido de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 220 r.p.m. até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,6-0,8, quando foi induzida com IPTG 1 mM. A expressão ocorreu durante 16 horas (*overnight*) a 25°C.

A expressão foi confirmada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (m/v) (SDS-PAGE). As amostras a serem analisadas foram misturadas ao tampão Laemmli (60 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS (dodecil sulfato de sódio) 2% (m/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 40% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v)) e fervidas durante 5 min. O gel separador 10% (m/v) foi preparado utilizando-se 3 μ L de TEMED, 150 μ L de SDS 10% (m/v), 50 μ L de PSA (persulfato de amônia) 10% (m/v), 1,25 mL de Tris-HCl pH 8,8, 1,6 mL de acrilamida 30% (m/v) e 2,1 mL de água destilada. O gel concentrador 5% (m/v) foi preparado utilizando-se 75 μ L de SDS 10% (m/v), 3 μ L de TEMED, 25 μ L de PSA 10% (m/v), 340 μ L de Tris-HCl pH 6,8, 420 μ L de acrilamida 30% (m/v) e 1,75 mL de água destilada. 20 μ L de cada amostra foram adicionados à canaleta do gel, o qual foi corrido em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM e SDS 0,1% (m/v)) a aproximadamente 160 V e 45 mA. Terminada a corrida o gel foi corado com solução de Commassie (*commassie brilliant blue* R-250 0,1% (m/v), metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)) *overnight* e descorado com acetato 20% (v/v). As amostras analisadas corresponderam separadamente ao *pellet* (parcela insolúvel) e sobrenadante (parcela solúvel) obtidos após a lise celular realizada no item 5.2.1.

5.2. PURIFICAÇÃO DA α_2 -MACROGLOBULINA

5.2.1. Purificação por meio de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+})

Os 250 mL de expressão (Item 5.1.2.) foram centrifugados a 5000 x g durante 10 minutos, com o sobrenadante sendo descartado e o *pellet* ressuspensionado em tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4 50 mM e NaCl 300 mM, pH 7,5) seguindo uma proporção de 4 mL de tampão para cada grama de *pellet*. Em seguida adicionou-se os inibidores de protease aprotinina (0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pepstatina (0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PMSF (1mM) e leupeptina (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As células ressuspensas foram então ultrasonicadas (ultrasonicador S250A, Branson Ultrasonics) durante 15 min, com *dutycycle* de 20% e à amplitude de 30%. Após a lise, o *pellet* foi separado do sobrenadante por centrifugação a 7000 x g durante 40 minutos. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante filtrado em uma membrana com poro de 0,45 μm .

A purificação foi realizada utilizando-se o equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare) e a coluna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare). O tampão fosfato de sódio foi utilizado como tampão de ligação e de eluição, com o diferencial de que o de eluição era acrescido de 500 mM de imidazol. A amostra filtrada foi injetada na coluna em um fluxo de 1 mL/min. Para a remoção de proteínas contaminantes a coluna foi submetida a diversas lavagens com diferentes concentrações de imidazol. A eluição da α_2 -macroglobulina ocorreu a partir de 100 mM de imidazol.

5.2.2. Purificação por meio de cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Foi realizada uma segunda etapa de purificação, desta vez por exclusão molecular, a fim de remover proteínas contaminantes que foram eluídas junto com a α_2 -macroglobulina da coluna de afinidade. Toda a proteína eluída no Item 5.2.1. foi concentrada em 500 μL utilizando-se um Vivaspin 50 (Sartorius) com *cutoff* de 30 kDa. Utilizando-se o equipamento AKTA Purifier (GE Healthcare), os 500 μL de amostra foram injetados na coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) em um fluxo de 750 $\mu\text{L}/\text{min}$, o qual foi mantido durante toda a purificação. Foi utilizado o mesmo tampão fosfato de sódio descrito no Item 5.2.1. A purificação foi confirmada por meio de SDS-PAGE 10%, seguindo o protocolo descrito no Item 5.1.2. A concentração da proteína foi determinada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Equação 1:} \quad C \text{ (mg/mL)} = 10 \times A_{280} / A_{280}^{1\%}$$

Onde C é a concentração em mg/mL, A_{280} é a absorbância a 280 nm e $A_{280}^{1\%}$ é a absorbância da proteína a 280 nm quando a 1%, cujo valor teórico para a A2M é de 12,73 UA.mL/mg.

5.3. TESTES DE CAPTURA DE PROTEASES PELA α_2 -MACROGLOBULINA

5.3.1. Teste de captura de tripsina em solução

Para certificar-se que a A2M encontrava-se em sua estrutura nativa, ou seja, com capacidade de aprisionar proteases, a mesma foi incubada com a protease tripsina suína (em tampão fosfato de sódio 50 mM e NaCl 300 mM) em uma proporção molar de 1:10 (tripsina: α_2 -macroglobulina) durante aproximadamente 10 minutos. A concentração de ambas foi calculada como descrito no Item 5.2.2. ($A_{280}^{1\%}$ da tripsina: 15,9 UA.mL/mg). Logo após, a amostra foi injetada em uma coluna de exclusão molecular seguindo os passos descritos no Item 5.2.2. Os picos eluídos foram coletados e submetidos a um teste de atividade da tripsina utilizando-se o substrato BAPNA (N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, Sigma). Devido ao fato da protease, quando aprisionada dentro da A2M, ainda apresentar atividade contra pequenos substratos, o uso do BAPNA, que possui somente 434.88 Da, confirma a presença da tripsina aprisionada quando testada nos picos eluídos em volumes próximos ao equivalente à A2M. O teste de atividade foi feito em uma microplaca de 96 poços, onde foi pipetado 80 μL de cada pico eluído e 200 μL da solução de BAPNA (BAPNA 0,8 mg/mL, Tris-HCl 100 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8.2). A A2M pura foi utilizada como controle negativo e a tripsina pura como controle positivo. A reação ocorreu durante 1 hora à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) e foi finalizada pela adição de 30 μL de

ácido acético 30% (v/v). A atividade foi detectada por meio da leitura da absorbância a 410 nm.

5.3.1.1. *Teste de captura de tripsina no pH 9,0*

Para analisar a capacidade da A2M em capturar proteases em pH alcalino, foi realizado um teste seguindo os passos descritos no item 5.3.1., com a diferença de que, ao invés do uso do tampão fosfato de sódio pH 7,5, utilizou-se durante a purificação o tampão Tris-HCl 25 mM acrescido de 150 mM de NaCl no pH 9,0. A A2M, anteriormente purificada no tampão fosfato, foi dialisada em água ultrapura e ressuspensa no tampão tris pH 9,0.

5.3.1.2. *Análise do perfil eletroforético do complexo A2M-Tripsina*

Para analisar o perfil eletroforético da A2M quando ligada à tripsina foi feito um gel de poliacrilamida em condição nativa utilizando-se o protocolo descrito em 5.1.2, com algumas modificações. Nesse caso, houve a substituição do SDS 10% no preparo do gel por água, a não utilização de SDS no tampão de corrida, o ajuste de seu pH para 7,5, bem como a utilização do tampão de amostra nativo (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 40% (v/v) e azul de bromofenol 0,01% (m/v)). A amostra analisada foi a obtida em 5.3.1.

5.3.2. **Teste de captura de proteases quando imobilizada em coluna**

5.3.2.1. *Teste de captura da tripsina*

Realizou-se um experimento semelhante ao descrito no item 5.2.1 com o propósito de verificar a capacidade da A2M em ligar-se a proteases quando imobilizada em coluna de afinidade. Nesse experimento, ~100 nmol de A2M foi injetado na coluna de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+}) em um fluxo de 0,5 mL/min, seguida pela tripsina, em proporção molar de 1:1 com a A2M, utilizando-se o mesmo fluxo. A coluna foi em seguida submetida a lavagem com tampão fosfato de sódio com 50 mM de imidazol, a fim de remover eventuais moléculas de tripsina ligadas a coluna. A eluição da A2M em possível complexo com a tripsina foi realizada com 250 e 500 mM de imidazol, respectivamente.

Para certificar que a proteína eluída encontrava-se ligada à tripsina realizou-se o ensaio de atividade descrito no item 5.3.1. A reação ocorreu durante 1 h.

5.3.2.2. *Teste de captura de proteases em extratos celulares*

Confirmada a capacidade da A2M em ligar-se à tripsina quando imobilizada em coluna, testou-se a possibilidade de sua utilização na captura de proteases em extratos celulares. Nesse experimento foram utilizados extratos de *Escherichia coli* (BL21 DE3), *Pichia pastoris* (X33) e semente de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda).

5.3.2.2.1. Preparo das amostras

Para o preparo do extrato de *E. coli* uma colônia foi inoculada em 250 mL de meio LB e crescida por ~16 h a 37°C e 220 rpm. Logo após, a cultura foi centrifugada por 15 min a 5500 x g e o pellet ressuscitado em 10 mL tampão fosfato de sódio. As células foram lisadas por ultrasonicação durante 15 min à amplitude de 30% e *dutycycle* de 20%. Em seguida a amostra foi centrifugada a 7500 x g por 45 minutos. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante filtrado em uma membrana com poro de 0,45 µm.

Para o extrato de *P. pastoris* uma colônia foi inoculada em 200 mL de meio YPD (extrato de levedura 1% (m/v), dextrose 2% (m/v), peptona 2% (m/v)) e crescida por ~72 h a 30°C e 200 rpm. Em seguida a cultura foi centrifugada por 15 min a 5500 x g e o *pellet* ressuscitado em 50 mL de tampão fosfato de sódio. As células foram lisadas por ultrasonicação à amplitude de 40% e *dutycycle* de 30% por 30 minutos. A cada 5 min de lise era realizada uma pausa de 5 min para evitar o aquecimento da amostra. Em seguida a amostra foi centrifugada a 7500 x g por 45 minutos. O sobrenadante foi então filtrado em uma membrana com poro de 0,45 µm

No preparo do extrato de *V. unguiculata*, 25 g de feijão triturado foi adicionado a 100 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (acrescido de 300 mM de NaCl). O feijão foi misturado ao tampão utilizando-se um liquidificador por aproximadamente 2 min, em potência máxima. Em seguida a mistura foi filtrada utilizando-se um pano umedecido e centrifugada a 7500 x g por 30 minutos. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante obtido foi filtrado utilizando-se uma membrana com poro de 0,45 µm.

Mediu-se a concentração proteica dos três extratos utilizando-se o método de Bradford (BRADFORD, M.M., 1976), onde a curva padrão utilizada no cálculo da concentração encontra-se no Apêndice II.

5.3.3.2.2. Cromatografia utilizando a A2M imobilizada

Para todos os testes utilizou-se uma proporção massa/massa de 1:5 entre A2M e os extratos, onde para os extratos de *P. pastoris* e *E. coli* utilizou-se ~2 mg de A2M e para o de *V. unguiculata*, ~1 mg. Os testes foram realizados utilizando-se o tampão fosfato com e sem imidazol descrito no item 5.2.1. A A2M foi injetada na coluna de afinidade HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare), seguido pela injeção dos extratos, ambos a um fluxo de 0,5 mL/min. Em seguida, as proteínas foram eluídas por meio de lavagens da coluna com tampão contendo 15, 50, 250 e 500 mM de imidazol.

5.3.3.2.3. Preparo das amostras para espectrometria de massas

Amostras eluídas em grandes concentrações de imidazol foram dialisadas em água utilizando-se um Amicon Ultra-0,5 mL (Milipore). Em seguida, a concentração proteica de

cada amostra foi determinada utilizando-se o método de Bradford (curva padrão presente em Apêndice II). Para a tripsinização das amostras dialisadas diluiu-se 2 µL de tampão bicarbonato de amônio 250 mM (pH 8) em 8 µL da amostra seguido pela adição de 5 µL de DTT 100 mM (diluído em tampão bicarbonato de amônio 50 mM) e 55 µL de tampão bicarbonato de amônio 50 mM. A mistura foi incubada a 55 °C por 45 minutos. Terminada a incubação, adicionou-se 25 µL de iodoacetamida 100 mM (diluída em bicarbonato de amônio) e 25 µL de tampão bicarbonato de amônio. A mistura foi incubada, no escuro, a temperatura ambiente, por 1 hora. Adicionou-se a tripsina em uma proporção massa/massa de 1:50 (tripsina:amostra) a partir de um estoque a 0,1 µg/µL. A reação ocorreu a 37 °C por ~18 h. Terminada a reação, ocorreu a diálise das amostras utilizando-se Stage Tip c18. Três discos da membrana foram adicionados a cada ponteira (p200) utilizada para cada amostra. As membranas foram umedecidas usando 100 µL de acetonitrila 100% e, em seguida, equilibradas através de duas lavagens com solução de TFA 0,1% (v/v), seguido por centrifugação a 7000 x g por 10 min. Logo após, adicionou-se as amostras às Stage Tips seguido pela centrifugação a 700 x g por ~ 4 minutos. A Stage Tip foi submetida a três lavagens com 100 µL de TFA 0,1% (v/v) seguido por centrifugação a 3000 x g por ~5 minutos. Em seguida a amostra foi eluída utilizando-se 20 µL de tampão de eluição I (acetonitrila 25% (v/v) em TFA 0,1% (v/v)), seguido por 20 µL do tampão de eluição II (acetonitrila 50% (v/v) em TFA 0,1% (v/v)) e finalizado com 20 µL de tampão III (acetonitrila 100%). Após a adição de cada tampão centrifugou-se a 700 x g por ~5 min. As amostras foram secas utilizando-se um SpeedVacuum (SPD1010, Thermo Fischer scientific).

5.3.3.2.4. Análise do conteúdo proteico utilizando espectrometria de massas

Após a secagem das amostras, as mesmas foram ressuspendidas em 10 µL de água ultrapura e analisadas por espectrometria de massa, utilizando um espectrômetro do tipo MALDI-TOF/TOF (Autoflex Speed, Bruker Daltonics). Foi aplicada em uma placa de MALDI, para cristalização do material, uma mistura de uma solução de matriz (10 mg.mL⁻¹ de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrila e 0,3% (v/v) de TFA) com 1 µL de cada uma das amostras, em uma proporção de 3:1. O mesmo procedimento foi realizado com uma solução de calibrantes externos (Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics). Após a calibração do equipamento, as amostras foram analisadas e seus espectros de MS obtidos em modo positivo refletido, com faixa de massa/carga de 700-5600 m/z. Após confirmação da razão massa/carga, os espectros de MS/MS foram obtidos a partir da fragmentação dos íons precursores, via LIFT (Suckau et al., 2003). Os espectros gerados foram analisados por meio do programa FlexAnalysis (Bruker Daltonics). Esta atividade foi realizada na Universidade Católica de Brasília, pelo professor Dr. Marcelo Ramada.

5.4. ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERMOESTABILIDADE POR DICROÍSMO CIRCULAR

Utilizou-se para as medidas de dicroísmo circular um espectropolarímetro Jasco J-815 provido de um sistema de controle de temperatura Peltier. Os ensaios foram realizados com os tampões acetato de sódio (2 mM, pH 4,0) e Tris-HCl (2 mM, pH 7,5 e 9,0) com a proteína na concentração de 0,12 mg/mL. Para a obtenção dos espectros utilizou-se uma cubeta de 0,1 cm. Utilizando-se a Equação 2 calculou-se as elipticidades molares a partir das elipticidades obtidas:

$$\text{Equação 2:} \quad [\theta] \text{ (grau.cm}^2\text{.dmol}^{-1}\text{)} = 115.\alpha/10.C.l$$

Sendo, α o sinal dicróico em miligraus, C a concentração da amostra (mg/mL) e l o trajeto ótico (cm) da cubeta utilizada. Primeiro foram gerados espectros a 25 °C seguido pela desnaturação térmica a qual foi conduzida de 25 °C a 95 °C para todos os pHs. A partir das curvas obtidas a estabilidade térmica da proteína foi determinada. Para estipular o percentual de estrutura secundária realizou-se a deconvolução dos espectros utilizando-se o programa CDNN (BÖHM, 1997).

5.5. ANÁLISE DO EFEITO DO pH NA ESTRUTURA TERCIÁRIA POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência foram feitas utilizando-se um espectrofluorímetro Jasco FP-650. A amostra foi excitada em 295 nm e os espectros de fluorescência obtidos na faixa de 300-400 nm, a 25 °C. Modificações conformacionais da A2M foram analisadas em diferentes pHs, no intervalo de 3,5 a 9,0, com incrementos de 0,5. Tampão acetato de sódio (10 mM) foi utilizado entre os pH 3,5-6,0 e Tris-HCl (10 mM) entre os pH 6,5-9,0. A concentração de A2M utilizada foi de 0,023 mg/mL. Os valores obtidos para as linhas de base de cada pH foram subtraídos dos valores encontrados.

5.6. ANÁLISE POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA DA A2M E DO COMPLEXO COM TRIPSINA

Os experimentos de ultracentrifugação analítica por velocidade de sedimentação (UCA-SV) foram realizados a 20,000 rpm em uma ultracentrífuga analítica *ProteomeLab XL-A/XL-I* (Beckman Coulter, EUA), equipada com um rotor de titânio *An-60 Ti* de quatro posições (Beckman, EUA). O rotor foi equilibrado a 20 °C na câmara de vácuo e foram usadas células de alumínio padrão com uma peça central de duplo canal e janelas de quartzo. Os dados de varredura de absorvância foram adquiridos a 280 nm com resolução radial de 20 μ m, em intervalos de 5 minutos para cada leitura da amostra. As análises foram

realizadas usando a proteína A2M pura e complexada com a tripsina em tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,5 contendo 0,3 M de NaCl. Soluções de proteínas (500 μL) de A2M pura e do complexo (obtido conforme o item 5.3.1.) foram usadas nas seguintes concentrações: 2,18 μM ; e 6,53 μM para a A2M; e 1,86 μM para complexo A2M-tripsina.

O software *SEDENTERP* (<http://bitcwiki.sr.unh.edu/>) foi usado para estimar o volume específico parcial da proteína (v), a densidade (ρ) e a viscosidade (η) da solução. As varreduras radiais coletadas foram analisadas usando o modelo de análise de distribuição contínua do coeficiente de sedimentação ($c_{(s)}$) pelo software *SEDFIT v14.7*. Todos os parâmetros foram permitidos flutuar livremente. O $c_{(s)}$ foi calculado usando a correção apropriada para a viscosidade e densidade da água a 20 °C ($S_{20,w}$). A distribuição $c(s)$ foi convertida em $c(S_{20,w})$ usando o software *SEDFIT*.

6. RESULTADOS

6.1. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO E ANÁLISE DA SOLUBILIDADE

A expressão foi realizada por meio da inoculação de um clone positivo em meio LB e para a indução utilizou-se IPTG 1 mM. Na figura 6 é possível observar que não havia produção da proteína antes da adição do indutor, um indicativo de que as bandas encontradas após a indução correspondem à proteína heteróloga. Além disso, observa-se que a A2M está presente na parcela insolúvel do lisado, possivelmente formando corpos de inclusão. Todavia, isso não configura-se como um problema, visto que a parcela solúvel, ou seja, da proteína na sua estrutura nativa, é muito maior. A formação de três bandas equivalentes à A2M no gel da figura 6 se deve ao fato da proteína sofrer autólise quando fervida, uma característica das proteínas que possuem a ligação tioéster interna. A autólise gera dois fragmentos, um de 130 kDa e outro de 50 kDa. A outra banda visualizada na figura 6, de 180 kDa, equivale à proteína intacta.

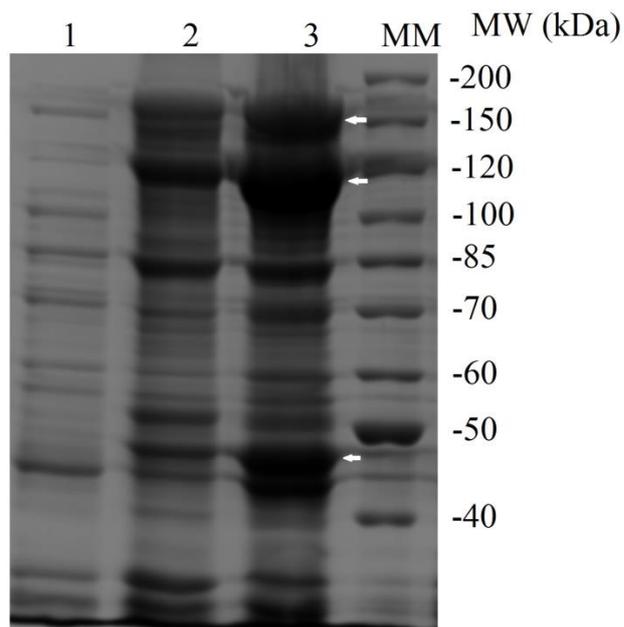


Figura 6. SDS PAGE 10% mostrando o perfil proteico das células BL21 (DE3) transformadas com o vetor pET28a construído. 1: Perfil proteico antes da indução; 2: Perfil proteico da parcela insolúvel; 3: Perfil proteico da parcela solúvel; MM: Marcador de massa molecular. As setas brancas indicam as três bandas esperadas após a fervura da amostra, sendo uma de 180 kDa, uma de 130 kDa e uma de 50 kDa.

6.2. PURIFICAÇÃO DA α_2 -MACROGLOBULINA

6.2.1. Purificação por meio de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+})

A presença de uma cauda com seis resíduos de histidina (HisTag 6x) capacitou a proteína a ser purificada por meio de cromatografia de afinidade ao níquel. Durante a purificação a coluna foi lavada com diferentes concentrações de imidazol (agente que compete com as histidinas pela interação com o Ni^{2+}) a fim de remover proteínas contaminantes que tenham interagido com a resina. Como observado na Figura 7, dois picos de proteína (picos 2 e 3) foram eluídos nas concentrações de imidazol de 10 e 50 mM. Como visualizado na figura 8, tais picos não correspondem à A2M e sim a proteínas contaminantes. Os três picos de proteína que foram eluídos nas concentrações de 100, 250 e 500 mM de imidazol correspondem à A2M, como confirmado por SDS PAGE (Figura 8).

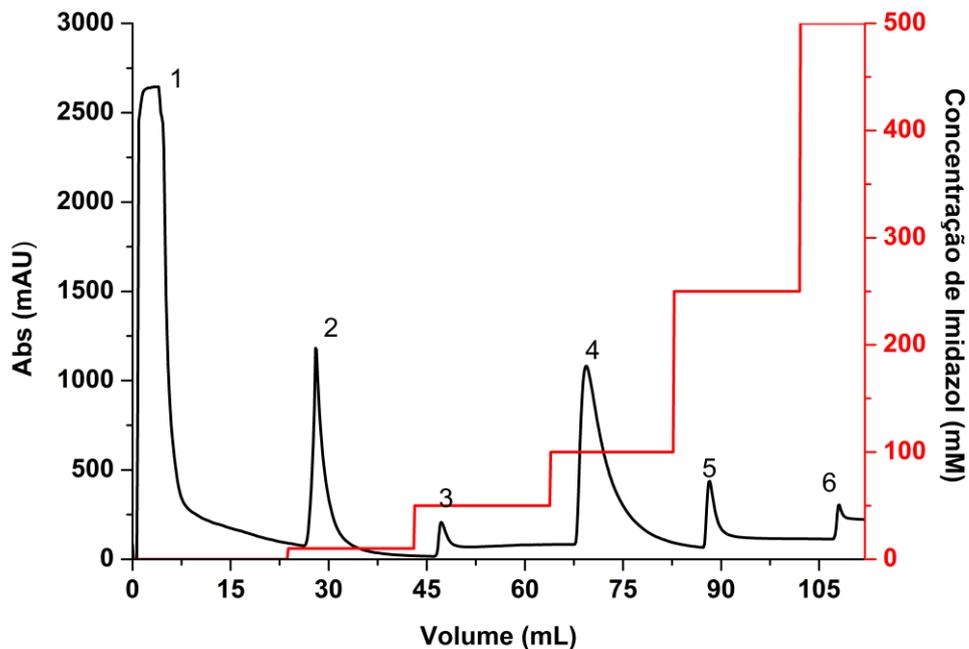


Figura 7. Cromatograma da purificação da α_2 -macroglobulina por afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+}). Encontra-se representado em vermelho o aumento gradual na concentração de imidazol ocorrido durante as lavagens da coluna.

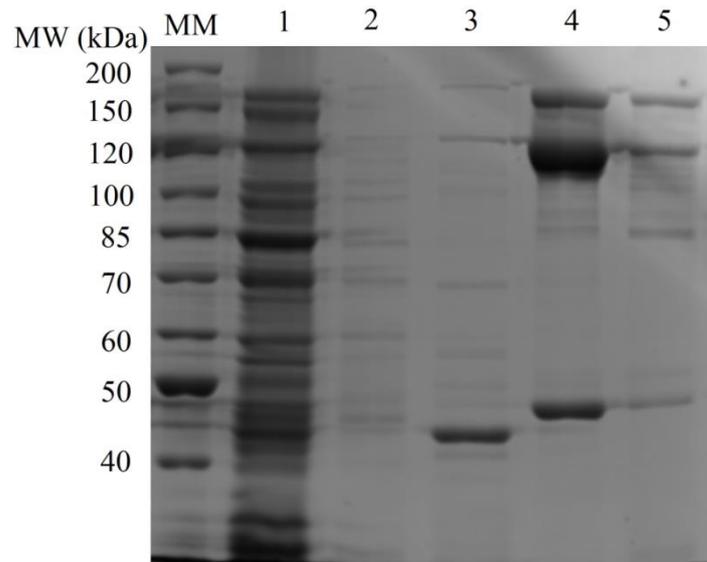


Figura 8. SDS PAGE 10% mostrando os picos eluídos durante a cromatografia de afinidade. MM: Marcador de massa molecular; 1: *Flow Through* (proteínas que não ligaram à coluna) representado pelo pico 1 na Figura 7; 2: Proteínas eluídas com 10 mM de imidazol (pico 2); 3: Proteínas eluídas com 50 mM de imidazol (pico 3); 4: Proteínas eluídas com 100 mM de imidazol (pico 4); 5: Proteínas eluídas com 250 e 500 mM de imidazol (picos 5 e 6).

6.2.2. Purificação por meio de cromatografia por exclusão molecular (SEC)

A fim de obter a proteína o mais pura possível realizou-se a cromatografia por exclusão molecular. Nesse tipo de cromatografia as proteínas são separadas por diferença de tamanho. A amostra injetada na coluna compreendeu os picos 4, 5 e 6 obtidos na cromatografia por afinidade (Figura 7). Houve a eluição de dois pequenos picos em aproximadamente 8 e 10 mL e a eluição de um grande pico no volume de ~12 mL (figura 9). Com a finalidade de analisar o conteúdo de tais picos foi feito um SDS PAGE (10%) com as amostras eluídas. Como visualizado na figura 10, os picos 1 e 2 apresentaram o mesmo perfil de bandas que seria esperado para a A2M. Isso pode indicar que uma pequena parcela da proteína forma dímeros, tendo em vista que sua eluição ocorreu antes do que seria esperado para a A2M monomérica. De acordo com a curva de calibração da coluna (Apêndice I), o volume na qual a A2M monomérica foi eluída (~11,76 mL) corresponde a uma proteína de ~215 kDa, enquanto o volume do pico 2 (~10,05 mL) corresponde a uma proteína de ~460 kDa. Tal parâmetro possui uma margem de erro grande, principalmente pela coluna ser antiga e sua calibração não muito precisa. Entretanto, tais valores dão certa dimensão de que de fato trata-se de um dímero.

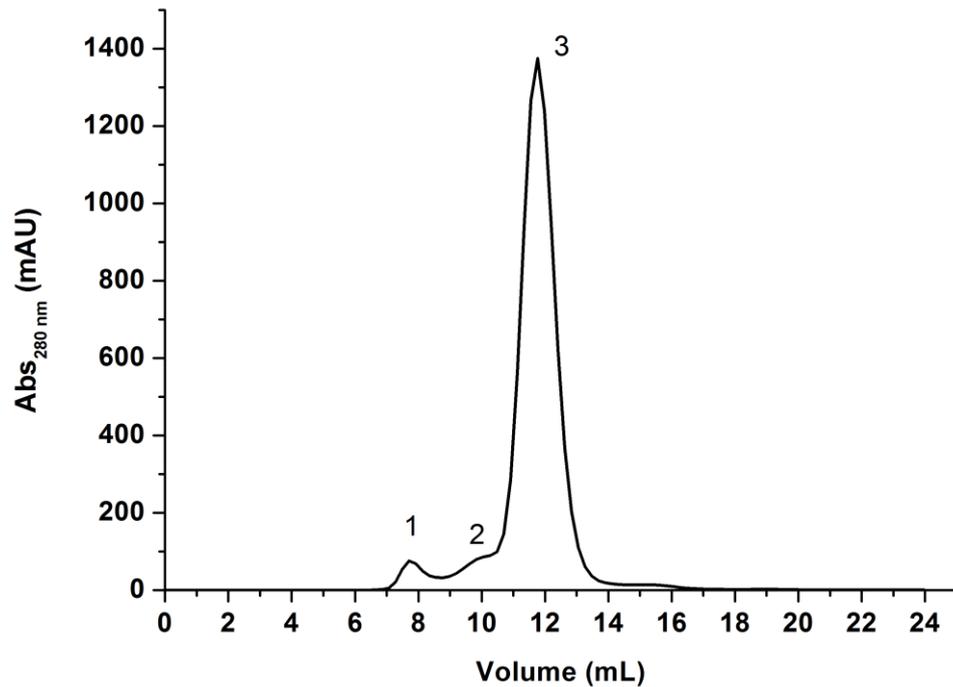


Figura 9. Cromatograma da purificação da α_2 -macroglobulina por exclusão molecular. 1: Pico equivalente ao *void* da coluna; 2: Pico equivalente a um possível dímero da A2M; 3: A2M monomérica.

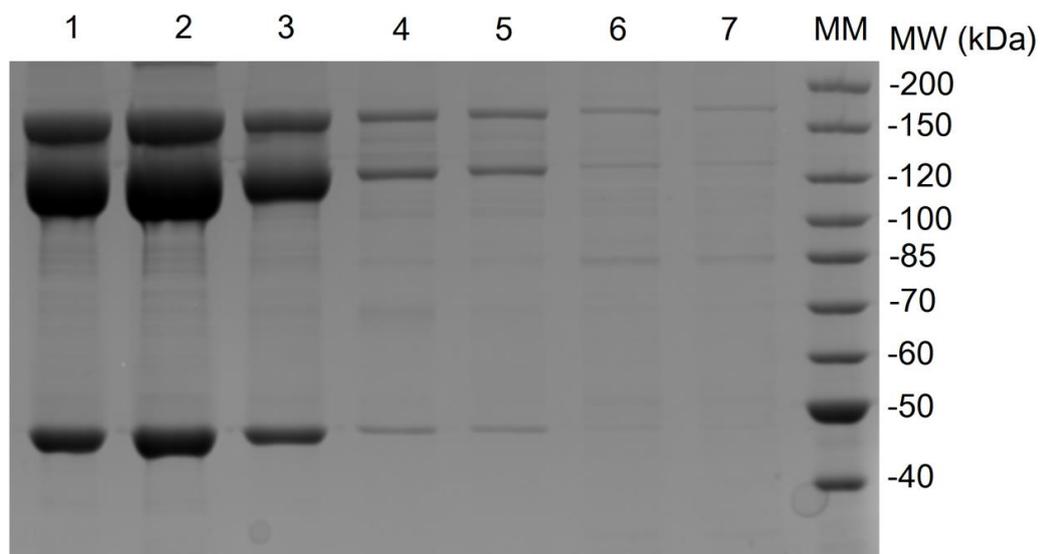


Figura 10. SDS PAGE 10% mostrando os picos eluídos durante a cromatografia por exclusão molecular (Figura 9). Aplicou-se no gel 5 μ L de cada amostra. Canaletas 1 a 3: pico 3; canaletas 4 e 5: pico 2; canaletas 6 e 7: pico 1; canaleta MM: marcador de massa molecular.

6.3. TESTE DE CAPTURA DE PROTEASES PELA α_2 -MACROGLOBULINA

6.3.2. Teste de captura de proteases em solução

A capacidade da α_2 -macroglobulina em ligar-se a proteases foi confirmada por cromatografia de exclusão molecular do produto da reação dela com a tripsina, seguido por um teste de atividade da tripsina. Três picos foram identificados nessa cromatografia (figura 11), o primeiro compreendendo, provavelmente, a um dímero da α_2 -macroglobulina (figura 13). Tal pico também é observado no cromatograma de SEC da proteína pura (como descrito em 6.2.2.), apresentando, no entanto, tamanho proporcionalmente menor. Maior mobilidade eletroforética das bandas equivalentes ao pico 2 foi observada quando comparado à banda da proteína nativa (figura 13). Além disso, houve uma diferença de aproximadamente 1 mL entre o volume de eluição da proteína nativa e a complexada. Tal volume de eluição (12,54 mL) corresponderia a uma proteína de ~153 kDa (figura 14) de acordo com a curva de calibração da coluna (ver Apêndice I).

A partir da figura 12 é possível confirmar que no pico 2 encontra-se a α_2 -macroglobulina complexada com a tripsina, visto que a amostra apresentou atividade quando comparado ao controle negativo. Além disso, possivelmente o pico 3 equivale à parcela de tripsina que não ligou-se à α_2 -macroglobulina, tendo em vista que pareceu apresentar atividade contra o BAPNA.

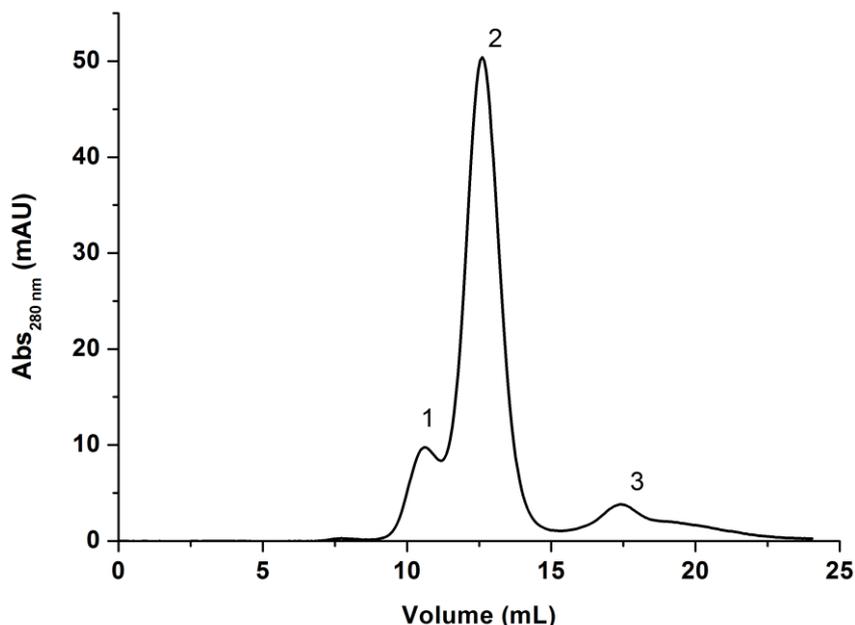


Figura 11. Cromatograma da purificação por exclusão molecular do produto da reação entre a α_2 -macroglobulina e a tripsina em pH 7,5. Pico 1: Provável dímero da A2M; Pico 2: A2M monomérica; Pico 3: Provável tripsina pura.

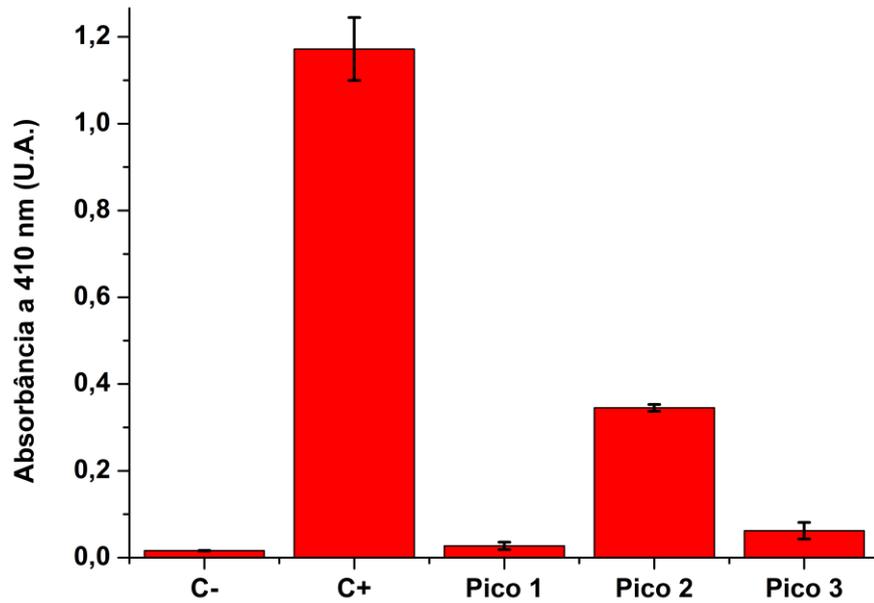


Figura 12. Teste de atividade da tripsina realizada com o purificado do produto da reação entre a A2M e a tripsina em pH 7,5. C-: Controle negativo; C+: Controle positivo; Pico 1: Amostra equivalente ao pico 1 da figura 11; Pico 2: Amostra equivalente ao pico 2; Pico 3: Amostra equivalente ao pico 3.

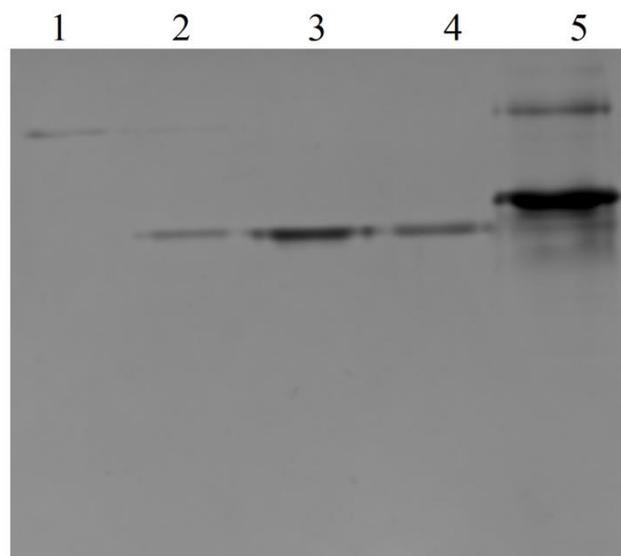


Figura 13. PAGE nativo mostrando os picos eluídos durante a purificação do produto da reação entre a α_2 -macroglobulina e a tripsina. 1: pico 1 (Figura 11); 2 a 4: pico 2; 5: A2M nativa.

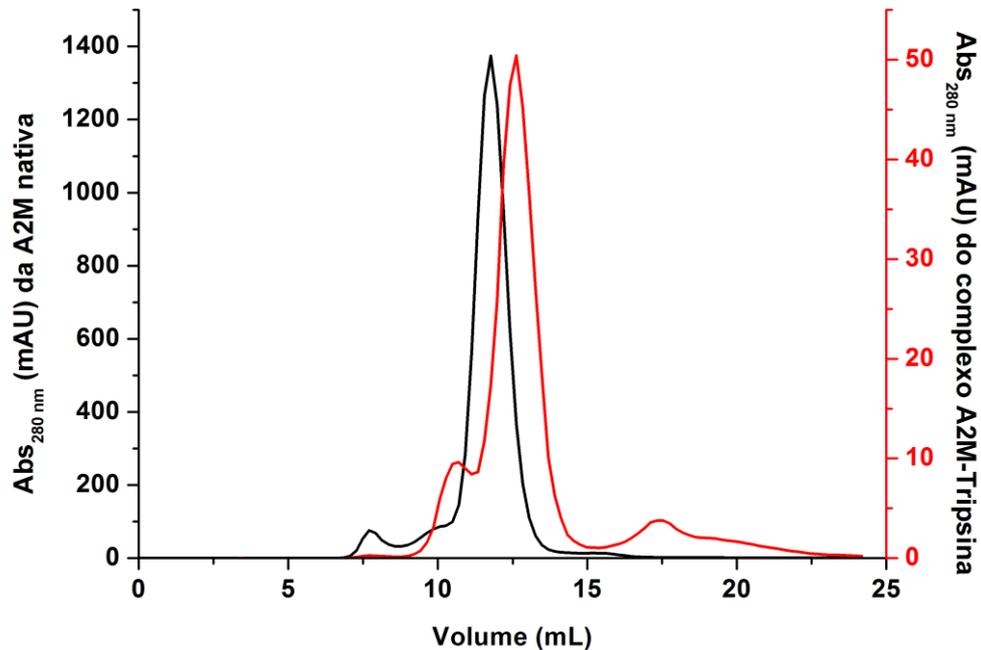


Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas obtidos durante a purificação da α_2 -macroglobulina nativa (preto) e da complexada com tripsina (vermelho) em pH 7,5. É possível observar o deslocamento para a direita do pico de eluição da A2M quando complexada.

6.3.2.1. Teste de captura de tripsina no pH 9,0

Para analisar a capacidade da A2M em capturar proteases em pH alcalino realizou-se o teste de captura da tripsina em pH 9,0. Assim como no teste em pH 7,5 (Figura 11), o cromatograma em pH 9,0 apresentou a eluição de três picos (figura 15). Entretanto, houve um deslocamento de ~3 mL no volume de eluição dos três picos, quando comparado ao experimento anterior. Tendo em vista que parecem se tratar dos mesmos picos, tal diferença muito provavelmente está relacionada a algum erro de sincronia com o equipamento utilizado ou mesmo modificação da resina da coluna, a qual já encontrava-se relativamente desgastada, com regiões compactadas em suas extremidades. Como verificado na figura 16, a A2M demonstrou capacidade de capturar proteases quando em pH alcalino.

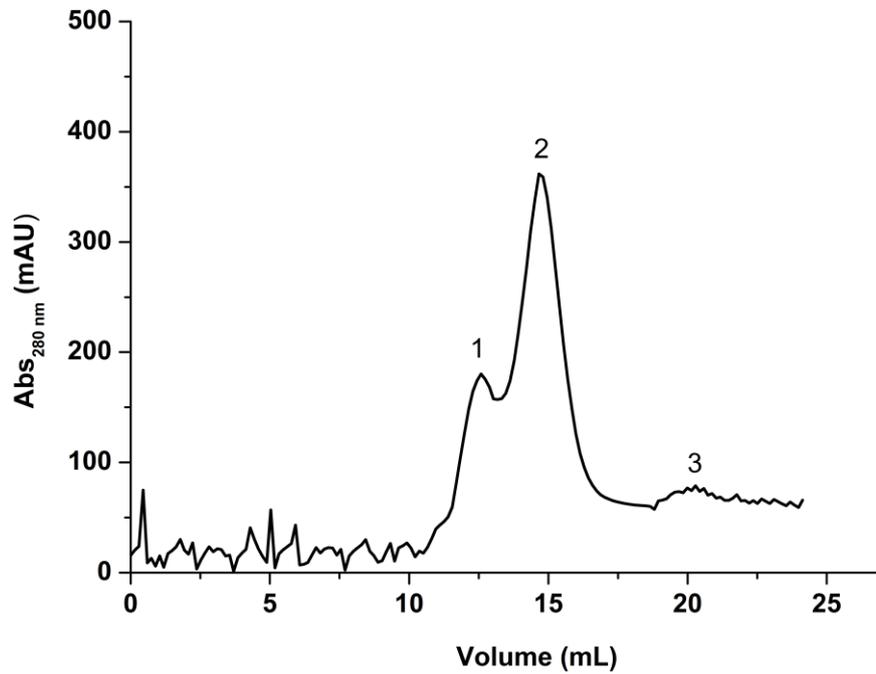


Figura 15. Cromatograma da purificação por exclusão molecular do produto da reação entre a α_2 -macroglobulina e a tripsina em pH 9,0.

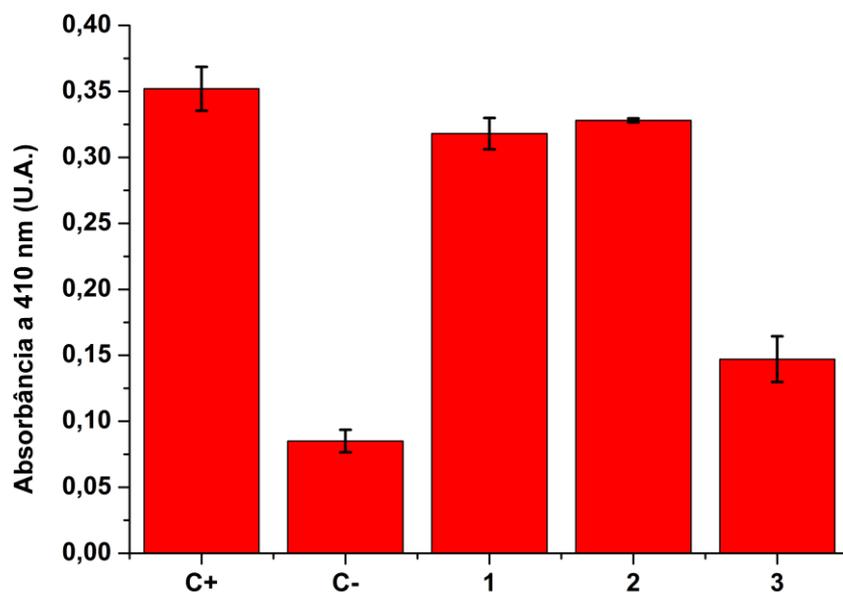


Figura 16. Teste de atividade da tripsina realizada com o purificado do produto da reação entre a A2M e a tripsina em pH 9,0. C-: Controle negativo; C+: Controle positivo; 1: Amostra equivalente ao pico 1 da figura 15; 2: Amostra equivalente ao pico 2; 3: Amostra equivalente ao pico 3.

6.3.3. Teste de captura de proteases quando imobilizada em coluna

6.3.3.1. Teste de captura da tripsina

Para testar se a A2M é capaz de ligar-se a proteases quando imobilizada realizou-se uma cromatografia onde a A2M foi a fase estacionária e a tripsina foi constituinte da fase móvel. No cromatograma (Figura 17) verifica-se o aparecimento de um pico logo após a injeção da tripsina na coluna, antes do início das lavagens com imidazol. Tal pico muito provavelmente corresponde à tripsina que não interagiu com a A2M da coluna, como demonstra o teste de atividade (figura 18).

Quando a coluna foi lavada com 250 mM de imidazol eluiu-se uma fração proteica que apresentou atividade tripsínica próxima à do controle positivo. Tendo em vista que a tripsina não apresenta uma cauda de histidina (His6x), não era esperado que a mesma interagisse com a coluna. Por conta disso, tal fração muito provavelmente diz respeito ao complexo A2M-tripsina. Conforme mostrado na Figura 18, o aumento na absorbância a 280 nm observado após a eluição da fração citada não apresentou nenhuma atividade. Tal absorbância muito provavelmente foi ocasionada pela alta concentração de imidazol.

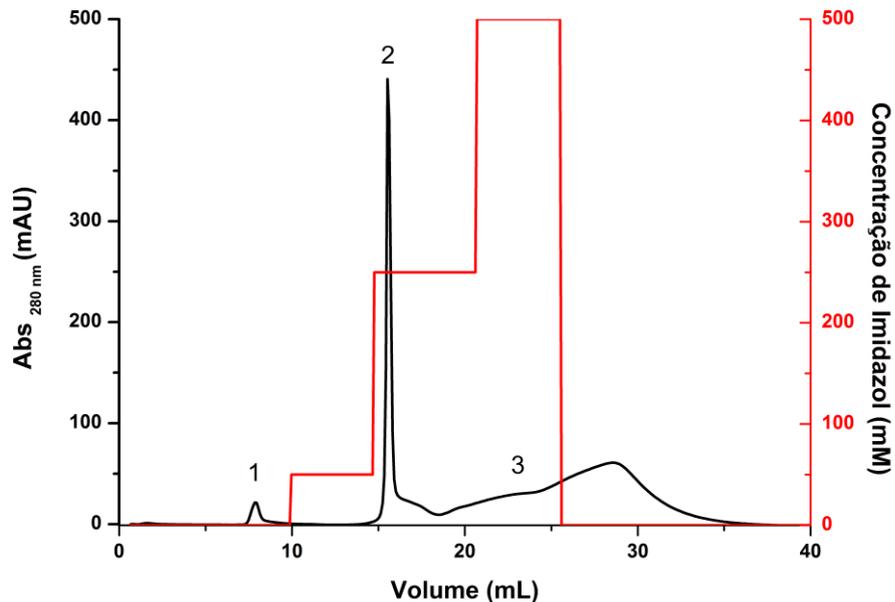


Figura 17. Cromatograma do teste de captura de proteases pela A2M quando imobilizada em coluna de afinidade (Ni^{2+}). O cromatograma retrata a purificação a partir da injeção da tripsina. 1, 2 e 3 referem-se aos picos eluídos nas concentrações de pré-50, 250 e 500 mM de imidazol, respectivamente.

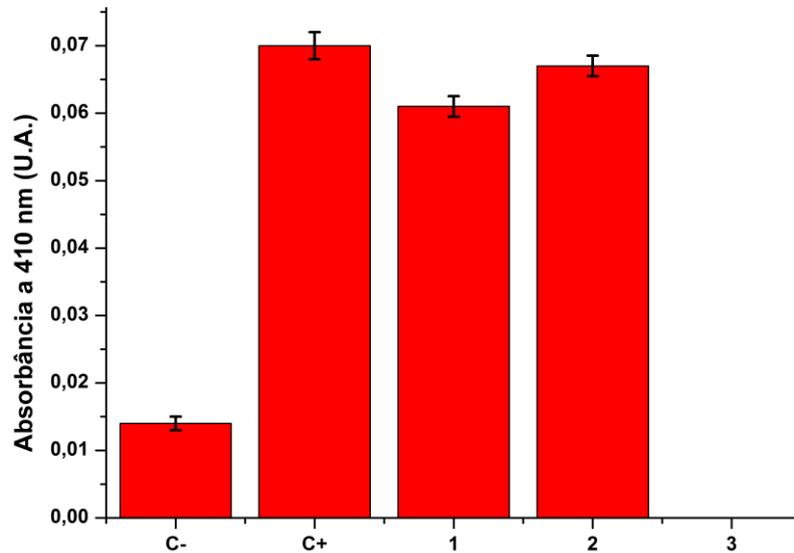


Figura 18. Teste de atividade da tripsina realizado com as frações eluídas durante o teste de captura de proteases com a A2M imobilizada em coluna. C-: Controle negativo (A2M pura); C+: Controle positivo (tripsina pura); 1: Amostra equivalente ao pico 1 da figura 16; 2: Amostra equivalente ao pico 2; 3: Amostra equivalente ao pico 3.

6.3.3.2. Testes de captura de proteases em extratos celulares

Tal teste foi realizado a fim de verificar se a A2M é capaz de capturar proteases de extratos quando imobilizada da mesma forma como é capaz de capturar a tripsina pura. Como o conteúdo de proteases de tais extratos é muito diverso, não foi viável a realização de um teste de atividade como forma de detecção da presença de proteases. Deste modo, a espectrometria de massas foi a opção escolhida para a detecção e identificação das mesmas.

6.3.3.2.1. Cromatografias utilizando a A2M imobilizada

A captura de proteases dos extratos pela A2M foi realizada através de uma cromatografia na qual a A2M funcionou como fase estacionária. Primeiramente a A2M foi aderida à coluna de afinidade a metal imobilizado (Ni^{2+}) através de sua cauda de histidina (His6x) a qual possui afinidade pelo níquel. Logo após, injetou-se na coluna os extratos celulares de *E. coli*, *V. unguiculata* e *P. pastoris*, seguido por lavagens com um crescente de imidazol. Nos três experimentos houve a eluição de proteínas em quase todas as concentrações de imidazol utilizadas (figuras 19 a 21). Nas concentrações mais baixas (15 e 50 mM) é possível que o eluído contenha contaminação por outras proteínas dos extratos

que interagiram fracamente com a coluna; já nas concentrações mais altas (250 e 500 mM) há uma probabilidade maior de que haja somente a macroglobulina pura ou em interação com outras proteases.

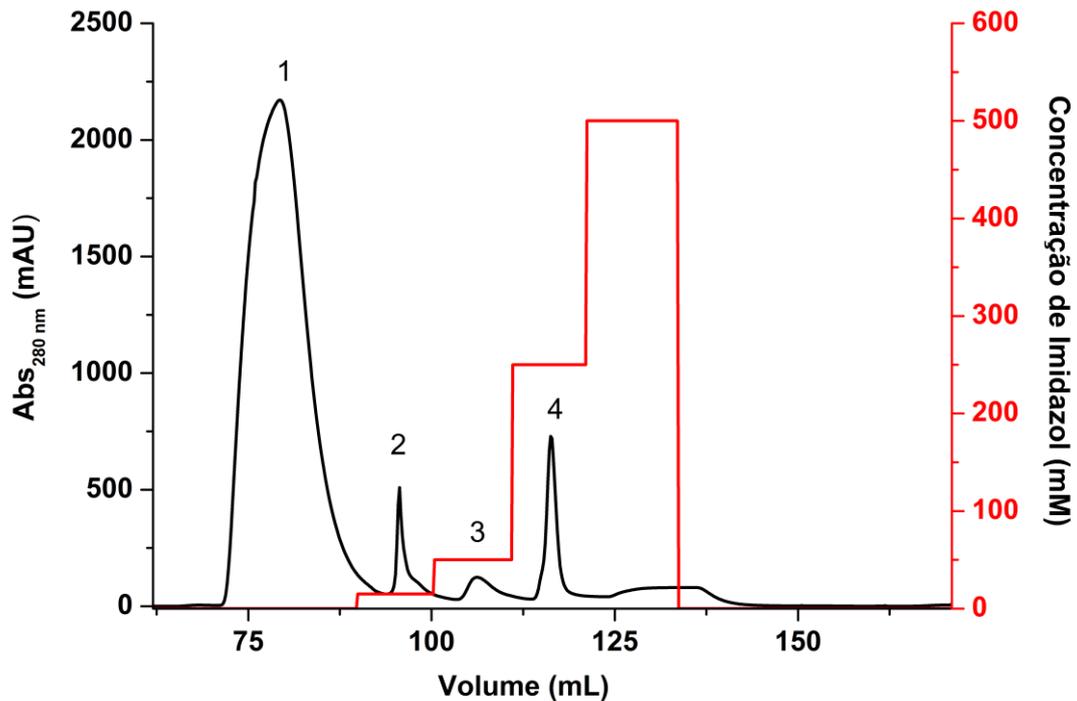


Figura 19. Cromatograma do teste de identificação de proteases em extrato de *E. coli* utilizando a A2M imobilizada. A A2M já encontrava-se ligada à coluna de afinidade por (Ni^{2+}) quando o extrato foi passado. O pico 1 equivale ao *flow through*, ou seja, àquilo que passou direto pela coluna, sem interagir. Encontra-se representado em vermelho o aumento gradual na concentração de imidazol ocorrido durante as lavagens da coluna.

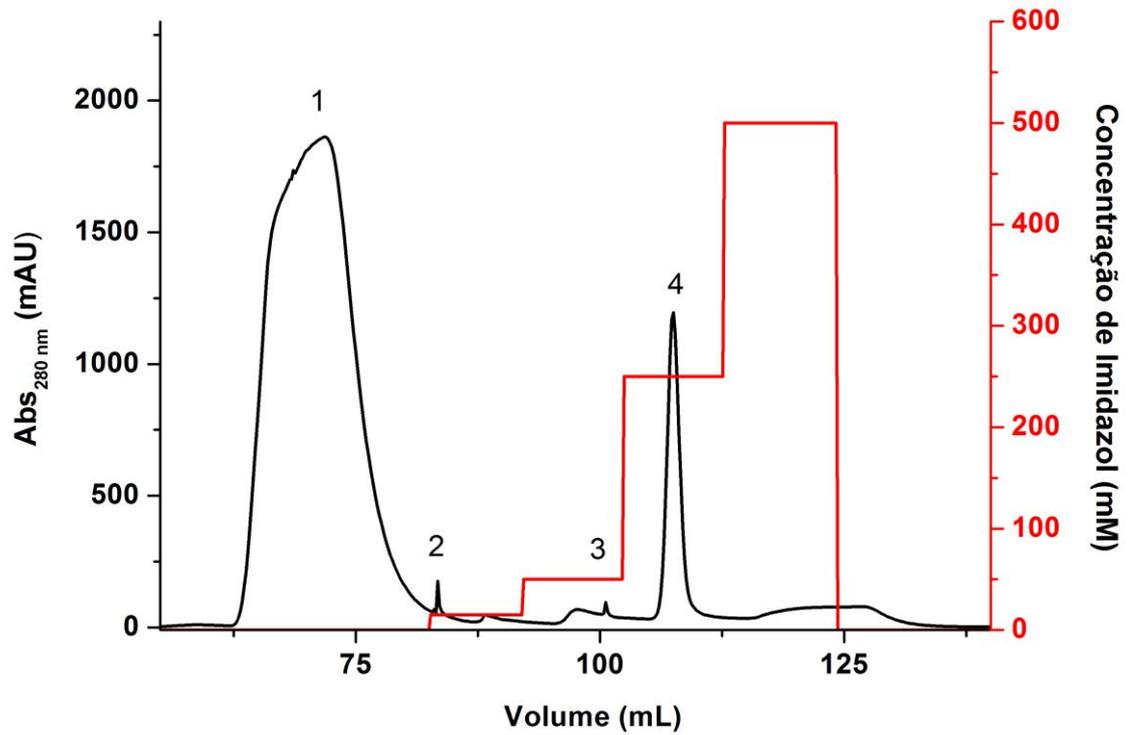


Figura 20. Cromatograma do teste de identificação de proteases em extrato de *P. pastoris* utilizando a A2M imobilizada. A A2M já encontrava-se ligada à coluna de afinidade por (Ni^{2+}) quando o extrato foi passado. O pico 1 equivale ao *flow through*, ou seja, àquilo que passou direto pela coluna, sem interagir. Encontra-se representado em vermelho o aumento gradual na concentração de imidazol ocorrido durante as lavagens da coluna.

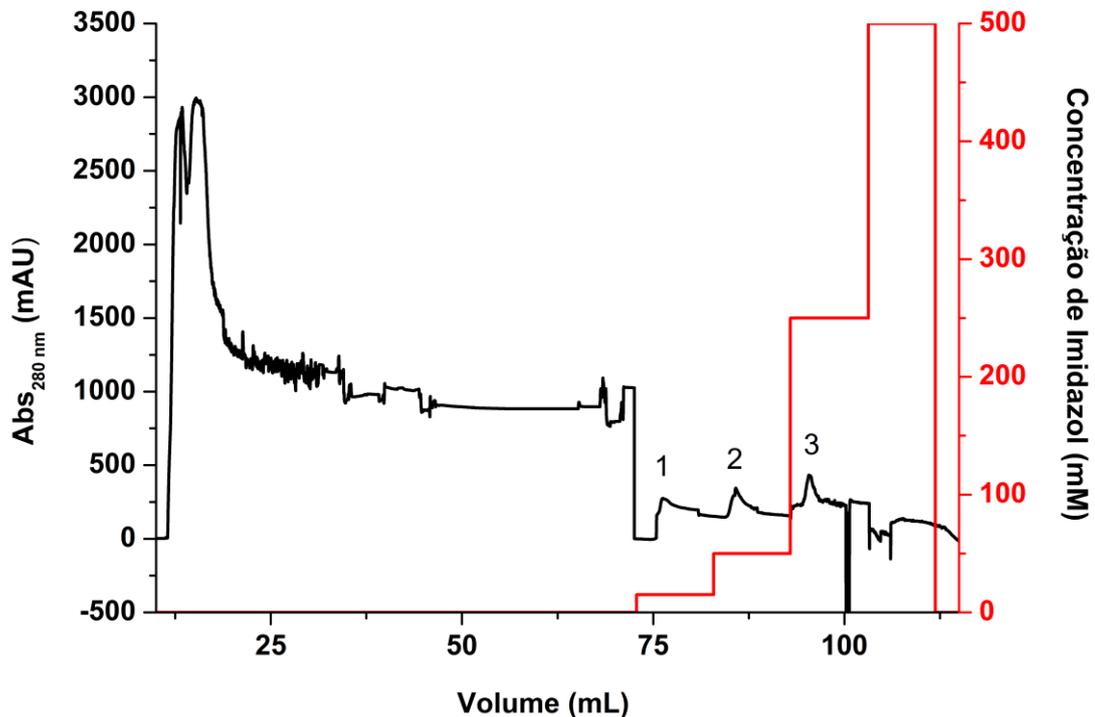


Figura 21. Cromatograma do teste de identificação de proteases em extrato de *V. unguiculata* utilizando a A2M imobilizada. A A2M já encontrava-se ligada à coluna de afinidade por (Ni^{2+}) quando o extrato foi passado. Durante a cromatografia houve a entrada de bolhas de ar na coluna, o que ocasionou a variação da absorbância no cromatograma. Encontra-se representado em vermelho o aumento gradual na concentração de imidazol ocorrido durante as lavagens da coluna.

6.3.3.2.2. Análise do conteúdo proteico por espectrometria de massas

As amostras eluídas em altas concentrações de imidazol foram tripsinizadas e submetidas à espectrometria de massas para identificar o seu conteúdo proteico (Os espectros de MS e MS/MS encontram-se nos apêndices III e IV, respectivamente). As amostras selecionadas correspondiam, em sua maioria, àqueles picos eluídos com 250 mM de imidazol (tabela 3). Uma amostra do teste com tripsina (6.3.2) também foi submetida à espectrometria, a fim de detectar um peptídeo que possuísse a ligação covalente entre a A2M e a tripsina. Entretanto, tal peptídeo não foi detectado (tabela 4).

Nenhuma protease foi detectada nas amostras analisadas. Como mostra a tabela 4, nas amostras 1, 2, 3, 4, 8 e 9 todos os peptídeos sequenciados correspondiam à A2M. Entretanto, nas amostras 5, 6 e 7 nenhum peptídeo da A2M foi identificado. Nesse caso, proteínas endógenas dos organismos usados foram detectados, onde um precursor da cadeia beta da β -conglucina foi identificado nas amostras referente à *V. unguiculata* e o

fator de alongação Tu para a *E. coli*. Tal resultado era esperado para a amostra de *E. coli*, (amostra 7) tendo em vista que é referente a um pico eluído em baixa concentração de imidazol (50 mM) (figura 19) e, por isso, era mais provável que contivesse proteínas que interagiram fracamente com a coluna. Os peptídeos encontrados nas amostras de *V. unguiculata* foram associados a outras espécies do mesmo gênero por conta dessa espécie ainda não ter tido o seu genoma sequenciado.

Tabela 3. Dados referentes às amostras submetidas à espectrometria de massas. A coluna “quantidade de proteína” refere-se à massa total contida no volume utilizado no experimento. As amostras do mesmo teste com mesma concentração de imidazol referem-se à primeira e segunda metade dos picos eluídos, respectivamente.

Amostra	Teste com:	[imidazol] em que a amostra foi eluída (mM)	Quantidade de proteína (µg)
1	A2M pura	-	0,08
2	tripsina	-	1,12
3	<i>P. pastoris</i>	250	1,56
4	<i>P. pastoris</i>	250	2,06
5	<i>V. unguiculata</i>	250	1,65
6	<i>V. unguiculata</i>	250	1,51
7	<i>E. coli</i>	50	1,26
8	<i>E. coli</i>	250	1,44
9	<i>E. coli</i>	250	1,33

6.4. ANÁLISES DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERMOESTABILIDADE POR DICROÍSMO CIRCULAR

6.4.1. Estrutura secundária a 25°C em diferentes pH

O percentual de estrutura secundária da A2M foi avaliado por dicroísmo circular, com o espectro sendo acompanhado de 260-195 nm (de ultravioleta próximo a ultravioleta distante) para os pH 4,0, 7,5 e 9,0. Os espectros obtidos nos pH 4,0 e 9,0 apresentaram um sinal dicróico maior que o obtido para pH 7,5 (Figura 22). De acordo com os dados apresentados na tabela 5 a proteína quando em pH 7,5 apresentou um perfil de estrutura secundária bastante próximo daquele determinado pela sua estrutura cristalográfica (PDB ID 4U48). Isso sugere que a proteína encontrava-se na forma nativa. Entretanto, nos pH 4,0 e 9,0 houve mudança na estrutura secundária da proteína, a qual passou a apresentar menos

Tabela 4. Proteínas identificadas por espectrometria de massas a partir dos peptídeos gerados por tripsinização das amostras obtidas dos testes com extratos.

Amostras	Descrição (proteína/espécie)	Número de acesso (NCBI)	[M+H ⁺] observado	Sequência	e-value
1,2,3,4,8 e 9	alpha-2-macroglobulin (<i>Salmonella enterica</i>)	WP_052944196.1	1854.04	VKPGSLASFVSQWEYR	9.00E-08
1,2,3,4,8 e 9	alpha-2-macroglobulin (<i>Salmonella enterica</i>)	WP_052944196.1	1979.15	LNYPDLINAPTGLWHVR	1.00E-09
1,2,3,4,8 e 9	alpha-2-macroglobulin (<i>Salmonella enterica</i>)	WP_052944196.1	2219.21	DAVAALGFQFGNIAEENL SR	2.00E-09
1,2,3,4,8 e 9	alpha-2-macroglobulin (<i>Salmonella enterica</i>)	WP_052944196.1	2332.27	YSDNTQASTFAAQAYAAL VLAR	2.00E-09
1,2,3,4,8 e 9	alpha-2-macroglobulin (<i>Salmonella enterica</i>)	WP_052944196.1	2464.47	RVEQAIWPADTLPGIRPQ FAAK	3.00E-14
1,2,3,4,8 e 9	alpha-2-macroglobulin (<i>Salmonella enterica</i>)	WP_052944196.1	2525.43	NLDADQLAALEVTNTGSQ PLWLR	1.00E-14
5 e 6	beta-conglycinin, beta-chain like precursor (<i>Vigna radiata</i>)	NP_001304231.1	1503.69	EQNNPFYFSSDR	0.042
5 e 6	beta-conglycinin, beta-chain like precursor (<i>Vigna radiata</i>)	NP_001304231.1	2118.01	IPAGTTFFLVNPNNDNLR	6.00E-11
5 e 6	beta-conglycinin, beta-chain like precursor (<i>Vigna radiata</i>)	NP_001304231.1	2640.55	SKPNTLLPHHADADFLLV VLNGR	2.00E-15
5 e 6	beta-conglycinin, beta-chain like precursor (<i>Vigna angularis</i>)	XP_017414389.1	2816.58	VLFGEQQQQGEEESQEE GVIVELKR	6.00E-14
7	elongation factor Tu (<i>Escherichia coli</i>)	WP_071932136.1	1964.81	ELLSQYDFPGDDTPIVR	5.00E-09
7	elongation factor Tu (<i>Escherichia coli</i>)	WP_071932136.1	2116.99	AIDKPFLPIEDVFSISGR	2.00E-10

folha β e mais hélice α . Os percentuais de estrutura secundária da estrutura cristalográfica foram obtidos utilizando-se o método DSSP do servidor *2Struc* (<http://2struc.cryst.bbk.ac.uk/twostruc>).

Tabela 5. Comparação entre o percentual conhecido de estrutura secundária da α_2 -macroglobulina com os obtidos em diferentes pH a 25°C.

	Estrutura cristalográfica pH 7,5 (%)	pH 7,5 (%)	pH 4,0 (%)	pH 9,0 (%)
Hélice α	12,6	11,1	17,8	17,8
Folha β	37,0	34,3	32,1	31,2
Outros	50,5	55,2	50,3	50,8

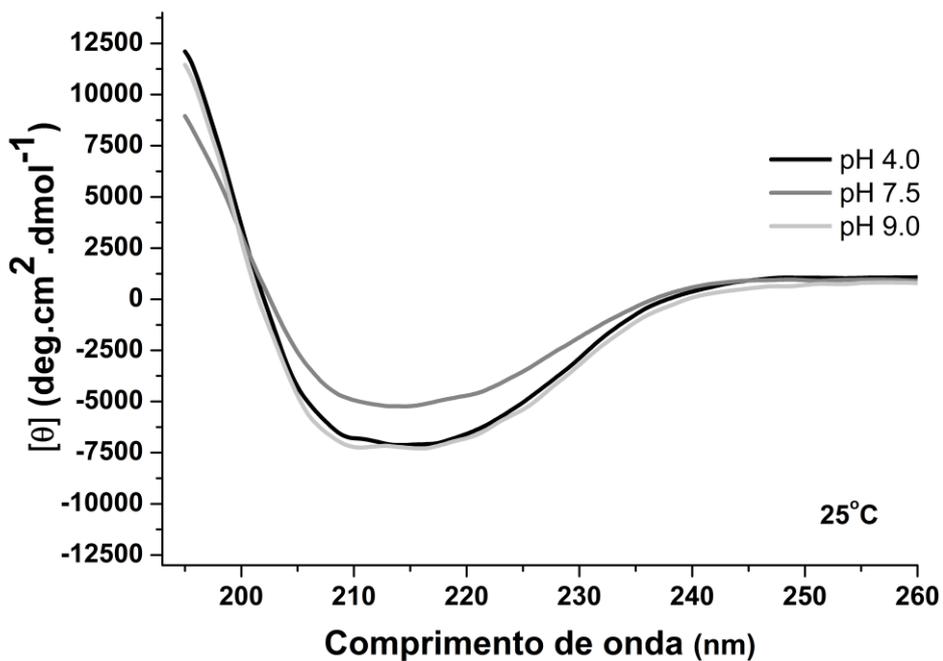


Figura 22. Espectros de CD (260-195 nm) a 25°C em tampão Tris e acetato de sódio 2 mM nos pH 4,0, 7,5 e 9,0.

6.4.2. Análise de termoestabilidade

Nos ensaios de desnaturação térmica foi avaliada a estabilidade estrutural da A2M de 25 a 95 °C. A leitura foi fixada no comprimento de onda de 218 nm, tendo em vista que é o comprimento de onda característico de folhas β , estrutura de maior presença na A2M. Como observado na figura 23, até aproximadamente 47 °C a estrutura da proteína apresentou estabilidade, demonstrada pela linearidade das curvas. Entretanto, a partir de 47 °C houve aumento no sinal dicróico para os três pH. Tal aumento em comparação ao estado nativo, bem como a formação de precipitado na cubeta durante a experimentação, indica que a proteína está agregando. Diferentemente dos pHs 4,0 e 7,5, a curva do pH 9,0 apresentou aumento do sinal dicróico aparentemente um pouco antes de 47 °C seguido pela sua diminuição por volta dos 55 °C. Além do aumento do sinal dicróico também houve aparecimento de um mínimo na região de 200 nm, compatível com estrutura desordenada (figura 26). Os espectros coletados a cada 10 °C durante a desnaturação estão apresentados nas figuras 24, 25 e 26. Observa-se nas três figuras o mesmo aumento do sinal dicróico visualizado nas curvas de desnaturação.

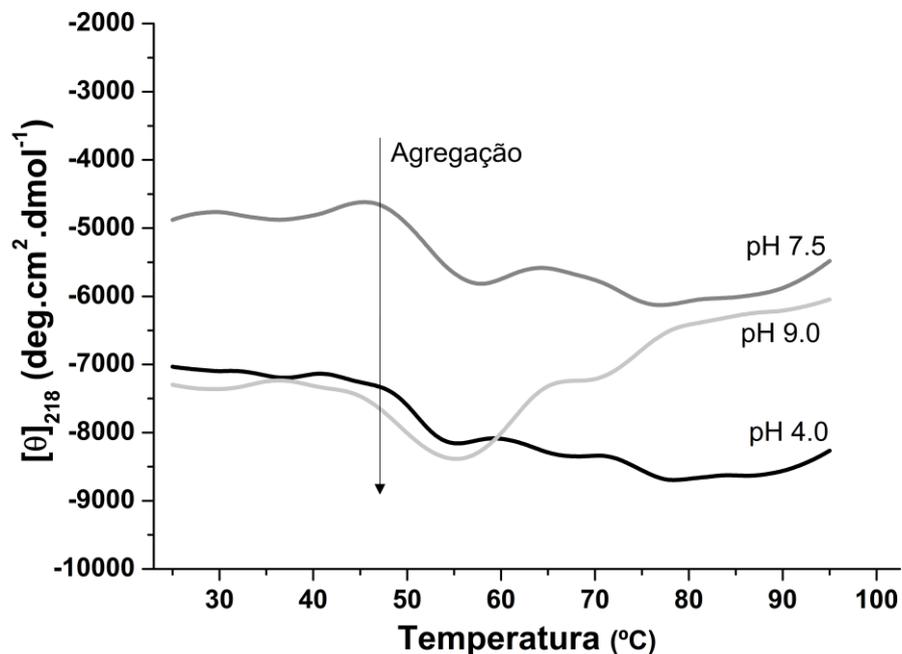


Figura 23. Curvas de desnaturação térmica da α_2 -macroglobulina monitoradas a 218 nm nos pH 4,0, 7,5 e 9,0. O aumento do sinal dicróico indica que a partir de $\sim 47^{\circ}\text{C}$ houve agregação da proteína.

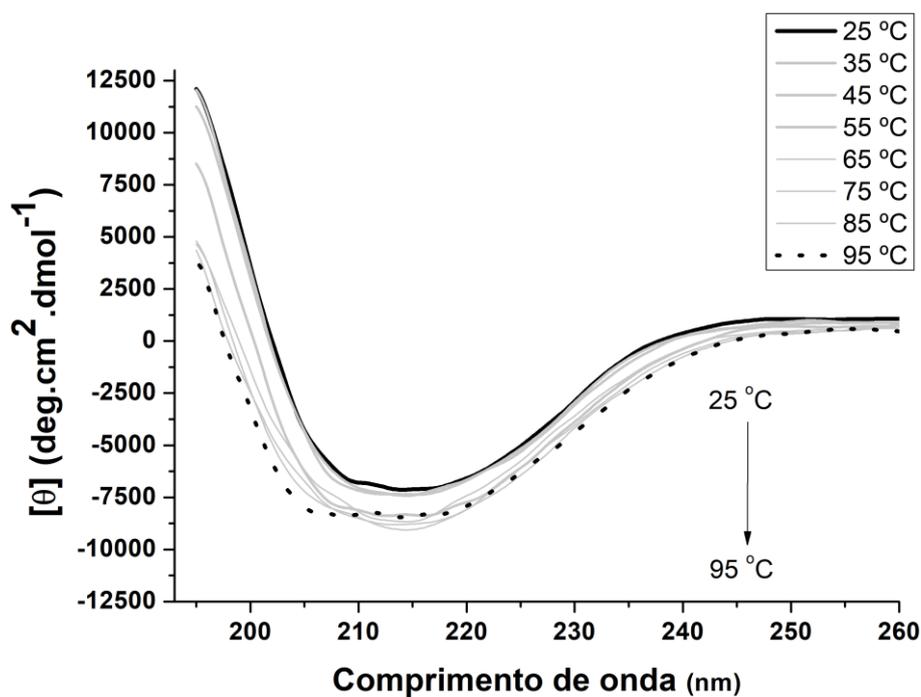


Figura 24. Espectros de CD (260-195 nm) em tampão acetato de sódio 2 mM no pH 4,0 de 25 a 95°C. A seta indica aumento do sinal dicróico seguindo o aumento da temperatura.

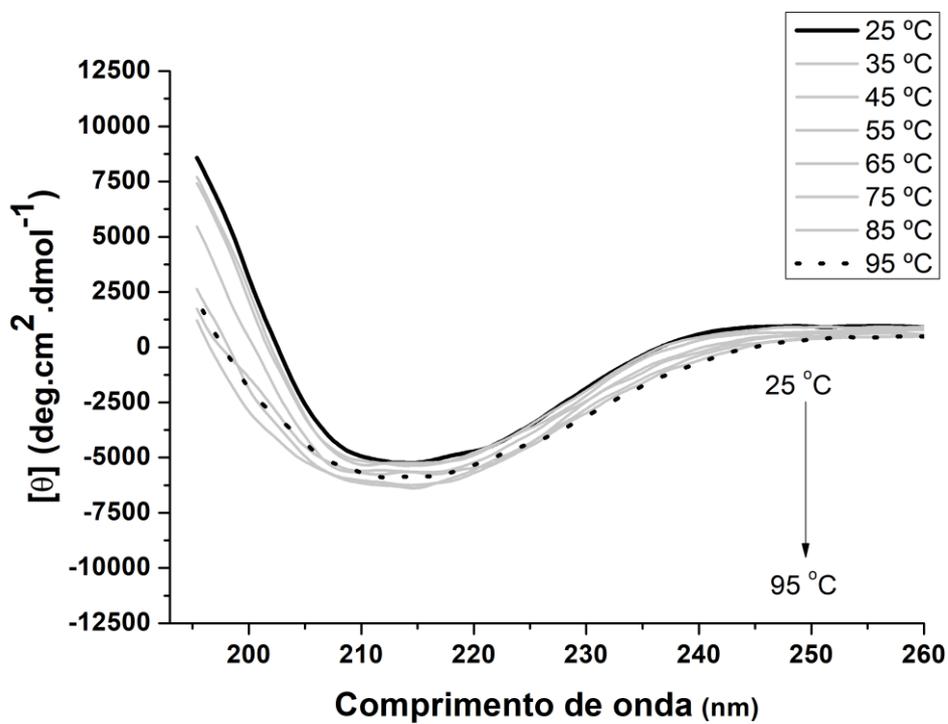


Figura 25. Espectros de CD (260-195 nm) em tampão Tris-HCl 2 mM no pH 7,5 de 25 a 95°C. A seta indica aumento do sinal dicróico seguindo o aumento da temperatura.

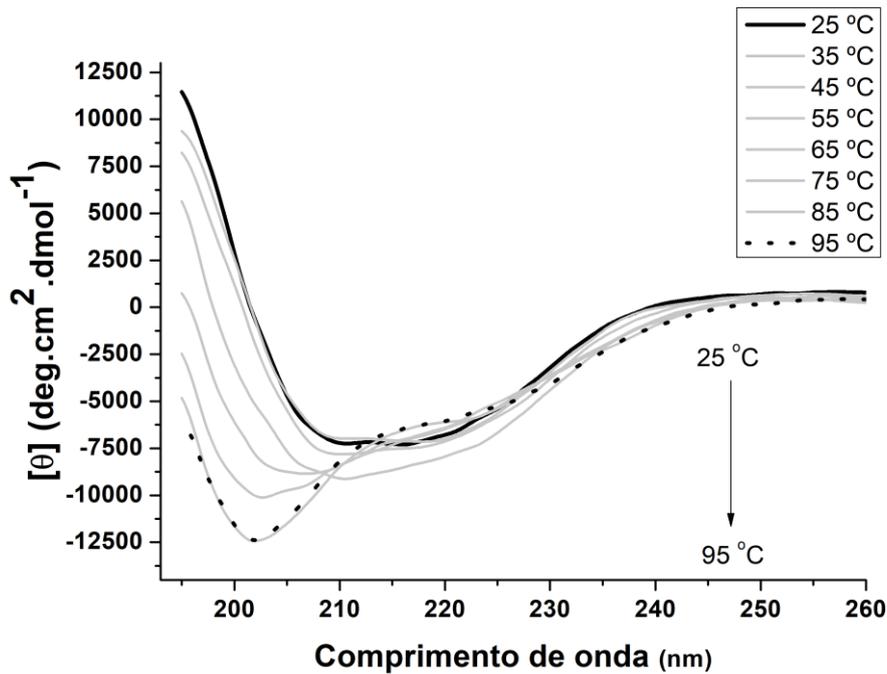


Figura 26. Espectros de CD (260-195 nm) em tampão Tris-HCl 2 mM no pH 9,0 de 25 a 95°C. A seta indica aumento do sinal dicróico seguindo o aumento da temperatura.

6.5. ANÁLISE DO EFEITO DO pH NA ESTRUTURA TERCIÁRIA POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência em diferentes pH possibilita analisar a influência do pH no posicionamento e nas interações de triptofanos. Conforme mostra a figura 27, houve deslocamento da banda de emissão para comprimento de ondas menores quando em pH ácido (3,5). Isso sugere que houve mudança na localização do triptofano para ambientes mais hidrofóbicos.

A intensidade da fluorescência dos triptofanos foi influenciada pelos diferentes pH, visto que houve tendência dos pH ácidos (4,0-6,0) ocasionarem maior atenuação da fluorescência quando comparado aos básicos (7,5-9,0). A acidificação do meio provavelmente promoveu alterações na vizinhança dos triptofanos, levando à supressão de sua fluorescência por meio da interação dos grupamentos indol com grupamentos vizinhos. Grupamentos ácidos, quando protonados, tendem a suprimir a fluorescência. Em baixos pH, a cadeia lateral dos aminoácidos ácido glutâmico e ácido aspártico encontram-se protonadas, de acordo com seus valores de pKa (4,25 e 3,86, respectivamente). É provável que tais aminoácidos tenham ocasionado a supressão da fluorescência detectada em baixos pH.

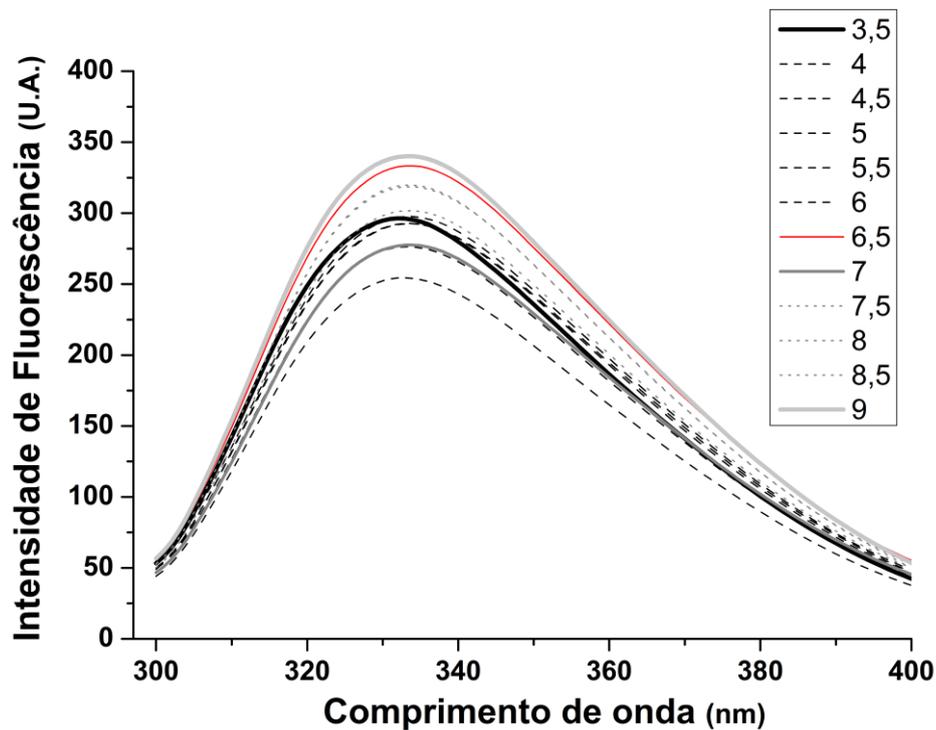


Figura 27. Espectros de fluorescência da α_2 -macroglobulina em diferentes pH (3,5 a 9,0).

6.6. ANÁLISE POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA DA A2M E DO COMPLEXO COM TRIPSINA

Foi realizada a análise da A2M pura e complexada com a tripsina com intuito de verificar a mudança que ocorre no coeficiente de sedimentação da A2M quando esta liga-se à tripsina. Durante a análise de dados realizada com o SEDFIT manteve-se os parâmetros fixados deixando o *frictional ratio* (f/f_0) como o parâmetro de ajuste do processo. O software SEDENTERP foi utilizado na determinação da densidade (ρ) e da viscosidade (η) do tampão, com valores de 1,015 g/mL e 0,0105 poise, respectivamente.

O valor de rmsd das análises da curva de $c(S)$ da A2M pura a 2,18 μM foi de 0,0047, o menor rmsd obtido dentre as concentrações analisadas. Como verificado na figura 28, a espécie encontrada possuía coeficiente de sedimentação ($S_{20,w}$) de 7,5 S correspondendo a uma molécula de 163 kDa. Houve, desta forma, uma discrepância de 17 kDa (~10%) com relação à massa real da A2M (180 kDa). A concentração 6,54 μM apresentou dados similares à de 2,18 μM , sendo o rmsd de 0,0079, e o coeficiente de sedimentação de 7,5 S, correspondendo a uma molécula de 163 kDa.

A amostra analisada do complexo A2M-tripsina (1,86 μM) apresentou o rmsd de 0,0059. Como mostrado na figura 29, a espécie encontrada possuía coeficiente de sedimentação ($S_{20,w}$) de 7,9 S correspondendo a uma molécula de 192 kDa. Esse tamanho

não difere muito do que seria esperado para o complexo, se for considerado o tamanho estimado para a A2M de 163 kDa mais o tamanho aproximado de 25 kDa da tripsina. Todos os dados do experimento de ultracentrifugação com ambas as amostras encontram-se agrupados na tabela 6.

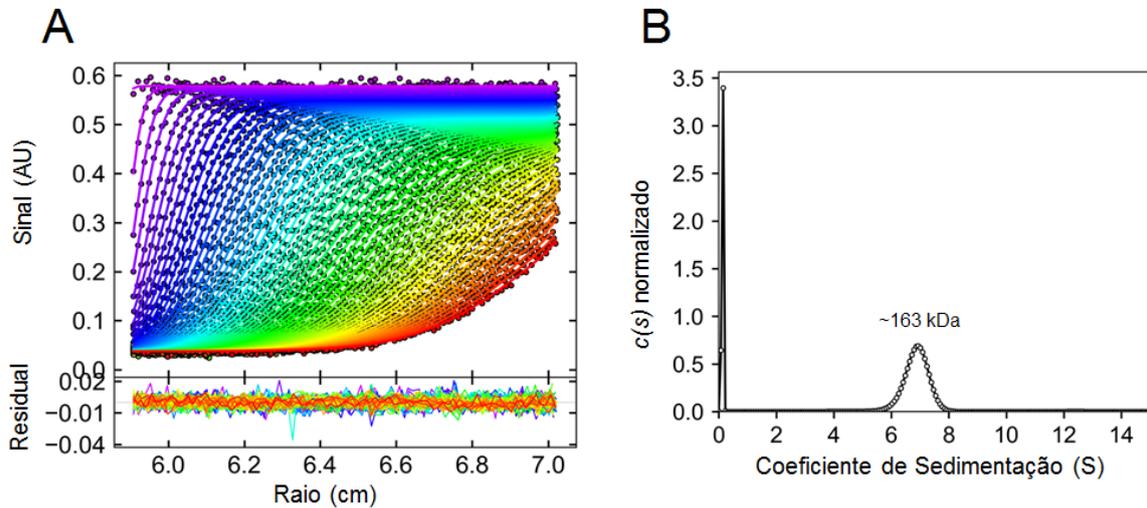


Figura 28. Análise da velocidade de sedimentação da A2M pura por ultracentrifugação analítica. **A:** Perfil de sedimentação relativo à absorbância a 280 nm em função da distância radial do eixo de rotação para 2,18 μM de A2M em fosfato de sódio 0,05 M pH 7,5 contendo 0,3 M de NaCl. **B:** Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação obtido a partir dos dados mostrados em A, com um nível de confiança de 0,95 e *frictional ratio* (f/f_0) de 1,39. A análise de sedimentação mostrou um pico de 7,5 S em condições padrões ($S_{20,w}$) referente a uma espécie de peso molecular de 163.032 Da.

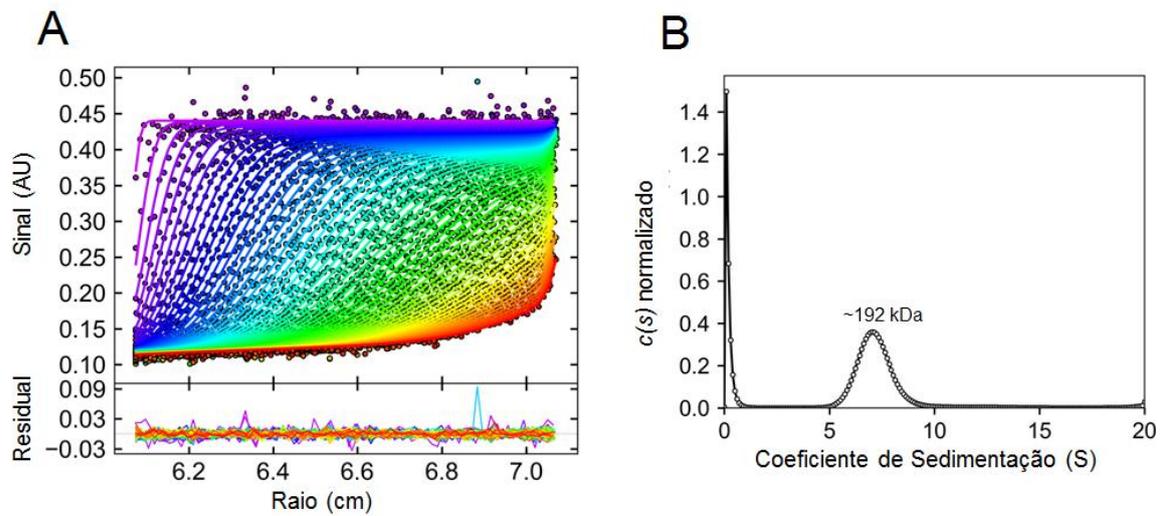


Figura 29. Análise da velocidade de sedimentação por ultracentrifugação analítica da A2M em complexo com a tripsina. **A:** Perfil de sedimentação relativo à absorbância a 280 nm em função da distância radial do eixo de rotação para 1,86 μM do complexo em fosfato de sódio 0,05 M pH 7,5 contendo 0,3 M de NaCl. **B:** Distribuição contínua do coeficiente de sedimentação obtido a partir dos dados mostrados em **A**, com um nível de confiança de 0,95 e *frictional ratio* (f/f_0) de 1,48. A análise de sedimentação mostrou um pico de 7,9 S em condições padrões ($S_{20,w}$) referente a uma espécie de peso molecular de 192.125 Da.

Tabela 6. Dados dos experimentos de ultracentrifugação analítica com a A2M nativa e complexada com tripsina.

A2M	Conc. (mM)	$S_{20,w}$	M.M. (kDa)	f/f_0	rmsd
Nativa	2,18	7,5	163	1,39	0,0047
	6,54	7,5	163	1,40	0,0079
Complexada com tripsina	1,86	7,9	192	1,48	0,0059

7. DISCUSSÃO

A α_2 -macroglobulina de *S. enterica* é uma proteína de treze domínios, cuja estrutura cristalográfica resolvida por Wong & Dessen (2014) demonstra similaridade com proteínas envolvidas na defesa imune de eucariotos superiores. Apesar dos estudos estruturais bastante elucidativos, tal proteína não foi bem caracterizada bioquímica e biofísicamente, tendo em conta que esse estudo foi o único publicado sobre a mesma. Em vista do escopo desse trabalho, sua caracterização é uma etapa importante no conhecimento das limitações do seu uso na detecção de proteases.

Quando uma protease cliva a região de isca da A2M ocorre um rearranjo estrutural que possibilita a captura da protease, resultando em uma estrutura mais compacta que a anterior. De acordo com Garcia-Ferrer e Colaboradores (2015), tal compactação estrutural é consistente com maior migração eletroforética, bem como com um perfil diferente de eluição em cromatografia de exclusão molecular. Além disso, Neves e Colaboradores (2012) verificaram que, independente se a A2M encontra-se ligada ou não a uma protease, se ela estiver em seu estado induzido, haverá uma migração mais rápida. Logo, a massa da protease não altera de forma significativa a velocidade de migração. Tais resultados condizem com o encontrado para a A2M tanto em gel nativo como em SEC (Figuras 11 a 13). Como verificado, mesmo quando comprovada a captura da tripsina a A2M induzida foi eluída (em SEC) em um volume referente a uma proteína de menor massa.

A ultracentrifugação analítica é uma metodologia que permite a caracterização de proteínas em solução, sem interação com qualquer matriz ou superfície. No experimento de velocidade de sedimentação é aplicada uma força centrífuga que causa a depleção de macromoléculas e a formação de uma divisão da concentração que se move em direção ao fundo da célula no passar do tempo. O movimento dessa divisão no decorrer do tempo determina o valor do coeficiente de sedimentação (s) (LEBOWITZ et al., 2002). O coeficiente de sedimentação (s) de uma macromolécula depende do seu tamanho, forma, grau de hidratação e concentração. O *frictional ratio*, informa sobre a forma bruta da molécula. É normalmente expresso como a relação f/f_0 , onde f é o coeficiente de fricção da molécula ao sedimentar e f_0 é o coeficiente de uma esfera ideal de mesmo peso molecular. O *frictional ratio* indica, portanto, o quanto aquela molécula desvia-se de uma esfera ideal (SMITH, 1988). O aumento do coeficiente de sedimentação quando a A2M encontra-se ligada a proteases foi verificado por Doan & Gettings (2008) em ECAM e por Bjork & Fish (1982) em estudos com a A2M humana. Bjork & Fish verificaram que houve aumento no coeficiente de sedimentação da A2M complexada quando comparada à nativa, indicando aumento na massa do complexo. Tais dados assemelham-se ao encontrado para a A2M (Figuras 28 e 29). Entretanto, os autores verificaram que houve diminuição no *frictional ratio* da A2M

humana complexada, o que demonstra que houve compactação estrutural do complexo. A A2M, entretanto, apresentou aumento do *frictional ratio* quando complexada em comparação à nativa, indicando que não houve compactação da molécula, embora tal evento tenha sido observado nos experimentos de migração eletroforética e de SEC. Tal resultado poderia ser explicado por uma mudança estrutural sofrida pela A2M durante o processo da ultracentrifugação, entretanto não há nenhum indício de que esta modificação tenha ocorrido, tornando este dado experimental inconclusivo até o momento.

A formação de dímeros em A2M bacterianas já foi relatada em ECAM por Garcia-Ferrer e Colaboradores (2015) como uma consequência da clivagem entre os resíduos R¹⁶²-D¹⁶³ pela tripsina, termolisina e elastase. Localizada entre os dois primeiros domínios da ECAM (MG0-NIE), a clivagem desse local remove a região que ancora a proteína à membrana. Os autores postulam que a clivagem seguida da dimerização seria o mecanismo pelo qual a ECAM induzida é liberada no espaço periplasmático. Além de possuir o mesmo sítio de clivagem (Apêndice V), os resultados de SEC da A2M condizem com o descrito para a ECAM. Na figura 9 observa-se a presença de dímeros, apesar de se encontrarem em baixa proporção quando comparado ao total de monômeros. Se a formação de dímeros é dada somente pela forma descrita pelos autores, tais moléculas devem ter sido muito provavelmente clivadas por proteases endógenas da *E. coli*. Contudo, quando incubada com tripsina, a proporção de dímeros de A2M aumentou significativamente (figuras 11 e 15), evidenciando os dados encontrados pelos autores. Ademais, os autores demonstraram que tais dímeros não eram afetados por altas concentrações de sais, detergentes ou agentes redutores.

A tendência à autólise em altas temperaturas na região do tioéster em macroglobulinas e proteínas similares já é conhecida há bastante tempo, como descrevem Barrett e Colaboradores (1979). Nesse processo o nitrogênio da ligação peptídica da glutamina ataca seu carbonil- γ , levando simultaneamente à ciclização (formação do ácido carboxílico pirrolidona), clivagem da ligação tioéster e ruptura da ligação peptídica (ISAAC; ISENMAN, 1992). Embora alguns trabalhos citem que a detecção da fragmentação ocorra durante a fervura (DOAN & GETTINS, 2008), ela já foi também detectada em temperaturas bem menores. Estudando a fragmentação de proteínas C3 em condições desnaturantes, Sim & Sim (1981) mostraram que a autólise da proteína ocorria em temperaturas acima de 64 °C, apesar de ter sido detectada, em menor proporção, em 56 °C. Além disso, os autores mostraram que a autólise é acompanhada pela precipitação da proteína, o que é esperado considerando-se que com a autólise há a exposição de resíduos hidrofóbicos até então enterrados, favorecendo a agregação. Os autores chegaram à conclusão que a autólise é acelerada quando em pH alcalino, dado semelhante ao encontrado nos ensaios apresentados no presente estudo. Embora tais dados relacionem-se ao encontrado para a

A2M durante os ensaios de dicroísmo circular, a temperatura de início da autólise (47 °C) foi bem mais baixa do que a encontrada no estudo citado. Tal característica impõe uma limitação no uso da A2M para a identificação de proteases. Proteases de organismos termofílicos, os quais apresentam temperatura ótima de crescimento acima de 60 °C (ZEIKUS, 1979), não poderiam ser detectadas, já que necessitam estarem ativas para tal.

A forte influência do pH sobre a estrutura de proteínas está relacionada à interferência que este causa nas interações eletrostáticas entre os aminoácidos. Em pH ácido, por exemplo, o aumento de cargas positivas na proteína pode levar à diminuição da estabilidade de sua estrutura por conta da quebra de interações importantes (ANDERSON et al., 1990). Como verificado, a A2M apresentou atividade de captura quando em pH básico (9,0) (Figuras 15 e 16). Essa característica é bastante desejável quando o propósito é a identificação de proteases, principalmente quando leva-se em consideração a importância das proteases alcalinas na indústria (TAVANO, 2013). Tal dado mostra que mesmo havendo mudança na estrutura secundária da A2M quando em pH básico (Tabela 5) ela não foi suficiente para causar sua inatividade. Tal teste também deverá ser realizado com uma proteína ácida, tal como pepsina, para verificar se as mudanças observadas nas estruturas secundária e terciária (Figura 27) em pH ácido inativam a A2M.

A imobilização de inibidores de proteases em colunas de cromatografia para a captura de proteases não é algo novo. Comercialmente, colunas de benzamidina (inibidor de serina proteases) são utilizadas na purificação ou na remoção de proteases de extratos (ALEXANDER et al., 1988). A imobilização com o fim de identificar novas proteases também já foi realizada. Sathler e Colaboradores (2010) modificaram a ecotina, um inibidor de serina proteases produzido por *E coli*, com o intuito de aumentar sua afinidade e especificidade. Sua imobilização em coluna ocorreu por meio da ligação covalente do inibidor à resina, o que é desejável por possibilitar a reutilização da coluna. Lamentavelmente não é viável a utilização de tal metodologia com a A2M. A clivagem durante o processo de interação com a protease e a formação de uma ligação covalente entre ambas tornam impossível o reaproveitamento da coluna. Nesse caso, a melhor alternativa é a imobilização através de interação não covalente com a coluna, como a realizada no presente trabalho. Tendo em vista que a A2M já possuía uma cauda de histidina para purificação, sua imobilização foi realizada facilmente.

Embora no único trabalho publicado sobre a α_2 -macroglobulina de *S. enterica* (WONG & DESSEN, 2014), não haja testes comprovando sua capacidade de ligar-se a vários tipos de proteases (somente à TEV), tais dados são relatados na literatura para a ECAM (DOAN; GETTINS, 2008; NEVES et al., 2012). Tendo em vista que ambas possuem alta identidade (Apêndice V) é razoável inferir que a A2M aja da mesma forma. Por

consequente, é plausível o seu uso com o objetivo de capturar os mais diversos tipos de proteases.

Os extratos utilizados para os testes de captura foram escolhidos de forma a englobar os diversos tipos de organismos e com base na disponibilidade de seu genoma. *E. coli* e *P. pastoris* são organismos extensivamente estudados, cujas proteases, caso tivessem sido detectadas, seriam facilmente identificadas nos bancos de dados. *V. unguiculata*, por outro lado, não possui seu genoma sequenciado, e toda e qualquer protease que tivesse sido encontrada seria uma proteína nova, validando, desta forma, a metodologia de identificação de novas proteases. Essa foi a razão da escolha de tal organismo. Consta no banco de dados MEROPS que a *E. coli* (cepa K12) possui 1436 diferentes proteases entre putativas e conhecidas, a *P. pastoris* 125 e a *V. unguiculata* 5 proteases. Entretanto, para a *V. unguiculata* tal número não reflete sua totalidade de proteases, pelo motivo já relatado anteriormente.

As proteínas identificadas por espectrometria de massas (além da A2M) foram o precursor da cadeia beta da β -conglucina e o fator de alongação Tu. A β -conglucina é uma proteína de armazenamento abundante em leguminosas. Apresenta-se como trímero sendo formada principalmente pelas subunidades α , α' e β (ZHANG et al., 2010). O fator de alongação Tu atua no ribossomo bacteriano durante a tradução, tendo importante função na seleção do tRNA (SCHUETTE et al., 2009). A alta concentração da β -conglucina no grão de feijão pode ter aumentado sua probabilidade de interagir com a coluna e assim ser detectada. Já o fator de alongação Tu, como já dito anteriormente, foi detectado em uma amostra eluída em baixa concentração de imidazol, onde era plausível encontrar proteínas endógenas da bactéria que interagiram fracamente com a coluna (Tabela 4).

A não detecção de proteases nas amostras eluídas não determina que a metodologia seja ineficaz, mas sim que ela deve ser aprimorada. É provável que proteases tenham sido capturadas, mas a não detecção se deve, muito provavelmente, à sua baixa concentração, principalmente quando comparada à concentração de A2M, que foi a proteína predominantemente encontrada. Além disso, como era necessária a realização do experimento de MS/MS para identificação dos peptídeos, nem todos os peptídeos detectados em MS obtiveram sucesso na fragmentação. Novos testes devem ser realizados, porém, algumas mudanças podem ser efetuadas. Uma maior proporção de extrato em relação a A2M poderia aumentar a concentração de proteases capturadas. Além disso, a realização de um pré-teste utilizando kits de detecção de proteases, os quais possuem substratos para os mais diversos tipos de enzimas, é conveniente. Desta forma, só seriam levados para a espectrometria as amostras que seguramente apresentassem proteases.

8. CONCLUSÃO

- A A2M sofre uma mudança estrutural quando complexada/induzida pela tripsina, tornando-se mais compactada.
- A A2M muito provavelmente forma dímeros quando em pH 7,5 e 9,0, principalmente quando em contato com a tripsina. Presume-se que tal fato seja causado pela clivagem da A2M pela tripsina entre seus dois primeiros domínios.
- A autólise do tioéster na A2M inicia-se a aproximadamente 47 °C (em pH 4,0, 7,5 e 9,0), sendo a temperatura mais baixa encontrada na literatura para proteínas similares. Tal resultado limita o uso da A2M em altas temperaturas.
- A A2M apresenta atividade de captura da tripsina em pH neutro (7,5) e básico (9,0). Apesar de haver mudança estrutural em pH básico, esta não inativa a A2M.
- Embora tenha sido verificado que a A2M é capaz de capturar a tripsina quando imobilizada em coluna, não houve detecção de proteases nos testes de captura realizados com os extratos de *E. coli*, *V. unguiculata* e *P. pastoris*. Entretanto, não se pode afirmar que não seja possível utilizar a A2M na identificação de proteases. Tais testes devem ainda ser aprimorados.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953–960, 1988.
- ANDERSON, D. E.; BECKTEL, W. J.; DAHLQUIST, F. W. pH-Induced Denaturation of Proteins: A Single Salt Bridge Contributes 3-5 kcal/mol to the Free Energy of Folding of T4 Lysozyme. **Biochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2403–2408, 1990.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary Lines of Cysteine Peptidases. **The Biochemical Journal**, v. 290, n. 1, p. 205-218, 1993.
- BARRETT, A. J.; BROWN, M. A.; SAYERS, C. A. The electrophoretically 'slow' and 'fast' forms of the α_2 -macroglobulin molecule. **The Biochemical Journal**, v. 181, n. 2, p. 401-418, 1979.
- BERTINI, I.; CALDERONE, V.; FRAGAI, M.; et al. Snapshots of the Reaction Mechanism of Matrix Metalloproteinases. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 47, p. 7952-7955, 2006
- BJÖRK, I.; FISH, W. W. Evidence for similar conformational changes in alpha 2-macroglobulin on reaction with primary amines or proteolytic enzymes. **The Biochemical Journal**, v. 207, n. 2, p. 347–56, 1982.
- BÖHM, G. CDNN—CD Spectra Deconvolution. 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BUDD, A.; BLANDIN, S. LEVASHINA, E.A. et al. Bacterial α_2 -macroglobulins: colonization factors acquired by horizontal gene transfer from the metazoan genome?. **Genome biology**, v. 5, n. 6, 2004.
- CERDÀ-COSTA, N.; GOMIS-RÜTH, F. X. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. **The Protein Society**, v. 23, p. 15–21, 2014.
- DASS, K.; AHMAD, A.; AZMI A. S. et al. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 2, p. 122-136, 2008.
- DOAN, N.; GETTINS, P. G. W. Alpha -Macroglobulins Are Present in Some Gram-negative

Bacteria: CHARACTERIZATION OF THE α 2-MACROGLOBULIN FROM ESCHERICHIA COLI. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 42, p. 28747–28756, 2008.

DODDS, M. W.; ALEX LAW, S. K. The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C3, C4 and α 2-macroglobulin. **Immunological Reviews**, v. 166, n. 1, p. 15-26, 1998.

DUNN, B. M. Overview of pepsin-like aspartic peptidases. **Current Protocols in Protein Science**, p. 21.3, 2001.

EREZ, E.; FASS, D.; BIBI, E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 371, 2009.

GARCIA-FERRER, I.; ARÊDE, P.; GÓMEZ-BLANCO, J.; et al. Structural and functional insights into Escherichia coli α 2-macroglobulin endopeptidase snap-trap inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 27, p. 8290–8295, 2015.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; BADILLO-CORONA, J. A.; ARANDA-BARRADAS, J. S.; OLIVER-SALVADOR, C. Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 983–996, 2011.

GOULAS, T.; GARCIA-FERRER, I.; MARRERO, A.; et al. Structural and functional insight into pan-endopeptidase inhibition by α 2-macroglobulins. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 9, p. 975–994, 2017.

GUO, R.; XU, X.; CAROLE, B.; et al. Genome-wide identification , evolutionary and expression analysis of the aspartic protease gene superfamily in grape. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 554, 2013.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002.

HORIMOTO, Y.; DEE, D. R.; YADA, R. Y. Multifunctional aspartic peptidase prosegments. **New Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 318–324, 2009.

HUA, Y.; NAIR, S. Pathophysiology , molecular mechanisms and clinical applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 2, p. 195–208, 2015.

IQBAL, H. A.; CRAIG, J. W.; BRADY, S. F. Antibacterial enzymes from the functional screening of metagenomic libraries hosted in *Ralstonia metallidurans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, n. 1, p. 19–26, 2014.

ISAAC, L.; ISENMAN, D. E. Structural requirements for thioester bond formation in human complement component C3. Reassessment of the role of thioester bond integrity on the conformation of C3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 10062–10069, 1992.

JISHA, V.; SMITHA, R.; PRADEEP, S.; et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n. 3, p. 39–51, 2013.

KRARUP, A.; WALLIS, R.; PRESANIS, J. S. et al. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. **PloSone**, v. 2, n. 7, 2007.

KOLODZIEJ, S. J.; WAGENKNECHT, T.; STRICKLAND, D.K. et al. The three-dimensional structure of the human α 2-macroglobulin dimer reveals its structural organization in the tetrameric native and chymotrypsin α 2-macroglobulin complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 31, p. 28031-28037, 2002.

KUZNETSOVA, E.; PROUDFOOT, M.; SANDERS, S. A.; et al. Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. **FEMS Microbiology Review**, v. 29, p. 263–279, 2005.

LEBEAU, A. M.; LEE, M.; MURPHY, S. T.; et al. Imaging a functional tumorigenic biomarker in the transformed epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 1, p. 93–98, 2013.

LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. **Protein Science**, v. 11, n. 9, p. 2067–2079, 2002.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S. et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1-11, 2012.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.

MARRERO, A.; DUQUERROY, S.; TRAPANI, S.; et al. The Crystal Structure of Human α 2 - Macroglobulin Reveals a Unique Molecular Cage. **Angewandte Communications**, v.51, p. 3340–3344, 2012.

NEVES, D.; ESTROZI, L. F.; JOB, V.; et al. Conformational States of a Bacterial α 2-

Macroglobulin Resemble Those of Human Complement C3. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35384, 2012.

NIU, W.; CHEN, Z.; GANDHI, P. S.; et al. Crystallographic and Kinetic Evidence of Allostery in a Trypsin-like Protease. **Biochemistry**, v. 50, n. 29, p. 6301–6307, 2011.

PAGE, M. J.; CERA, E. DI. Review Serine peptidases : Classification , structure and function. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 65,n. 7-8, p. 1220–1236, 2008.

PROSSER, G. A.; LARROUY-MAUMUS, G.; CARVALHO, L. P. S. DE. Metabolomic strategies for the identification of new enzyme functions and metabolic pathways. **EMBO reports**, v. 15, n. 6, p. 657–669, 2014.

QUIGLEY, J. P.; IKAI, A.; ARAKAWA, H. et al. Reaction of proteinases with alpha 2-macroglobulin from the American horseshoe crab, *Limulus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 29, p. 19426-19431, 1991.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RAWLINGS, N. D. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1463–1483, 2010.

RAWLINGS, N. D.; WALLER, M.; BARRETT, A. J. et al. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 503-509, 2014.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes , their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. 343–350, 2016.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; THOMAS, P. D.; et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes , their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. 624–632, 2018.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 378, n. 3, p. 705–716, 2004.

SANMAN, L. E.; BOGYO, M. Activity-Based Profiling of Proteases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 249–273, 2014.

SATHLER, P. C.; CRAIK, C. S.; TAKEUCHI, T. et al. Engineering ecotin for identifying proteins with a trypsin fold. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2355-2365, 2010.

SIM, R. B.; SIM, E. Autolytic fragmentation of complement components C3 and C4 under denaturing conditions, a property shared with α 2-macroglobulin. **Biochemical Journal**, v. 193, n. 1, p. 129-141, 1981.

SCHUETTE, J. C.; MURPHY IV, F. V.; KELLEY, A. C.; et al. GTPase activation of elongation factor EF-Tu by the ribosome during decoding. **EMBO Journal**, v. 28, n. 6, p. 755–765, 2009.

SINGH, R.; MITTAL, A.; KUMAR, M.; MEHTA, P. K. Microbial Proteases in Commercial Applications. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 4, p. 365–374, 2016.

SMITH, C. A. Estimation of sedimentation coefficients and frictional ratios of globular proteins. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 16, n. 2, p. 104-106, 1988.

SOTTRUP-JENSEN, L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 20, p. 11539-11542, 1989.

SOUZA, P. M. DE; LISA, M.; BITTENCOURT, D. A.; et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M. et al. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 7, p. 952-965, 2003.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

TURK, B. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785–799, 2006.

VANDERMARLIERE, E., MUELLER, M., MARTENS, L. Getting Intimate With Trypsin, the Leading Protease in Proteomics. **Mass Spectrometry Review**, v. 32, n. 6, p. 453–465, 2013.

WONG, S. G.; DESSEN, A. Structure of a bacterial α 2-macroglobulin reveals mimicry of eukaryotic innate immunity. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–9, 2014.

ZEIKUS, J. G. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 1, n. 4, p. 243–252, 1979.

ZHANG, H.; LI, L.; MITTAL, G. S. Effects of high pressure processing on soybean beta-conglycinin. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, n. 3, p. 568–583, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE I

Curva de calibração da coluna Superdex 200 (GE Healthcare).

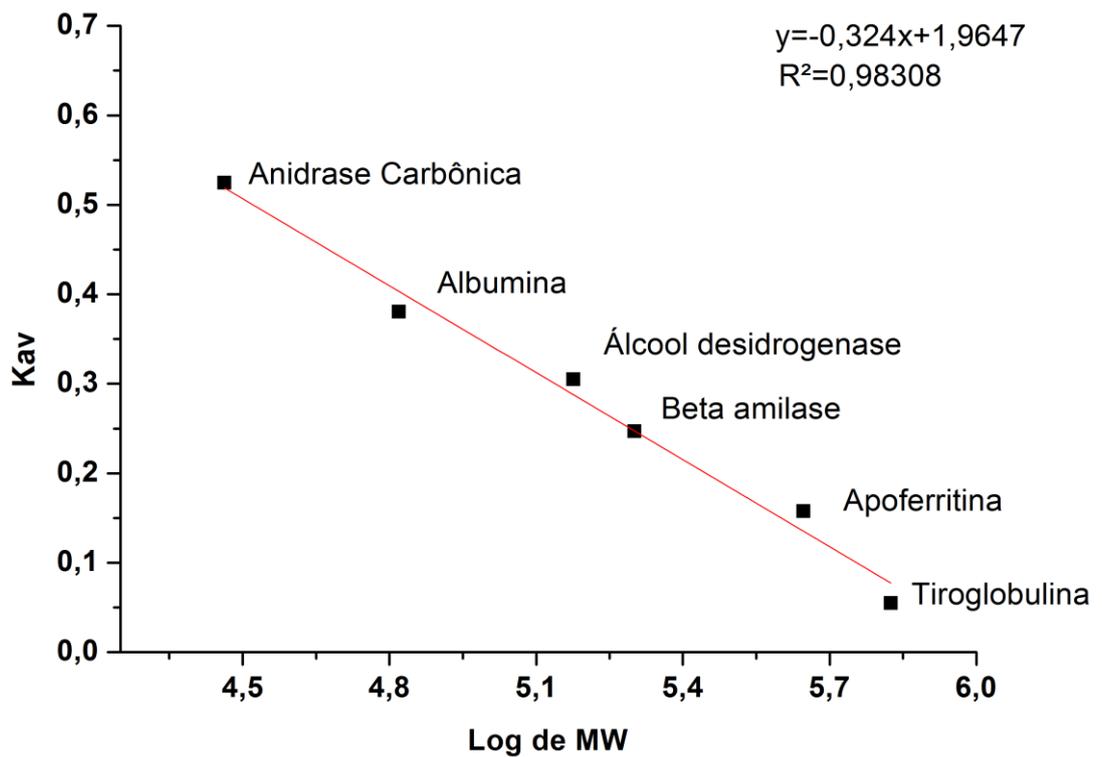
K_{av} (Coeficiente de partição) = $V_e - V_o / V_c - V_o$ onde,

V_e = volume de eluição da proteína analisada;

V_o (volume *void* da coluna) = 7,97 mL

V_c (volume geométrico da coluna) = 24,00 mL

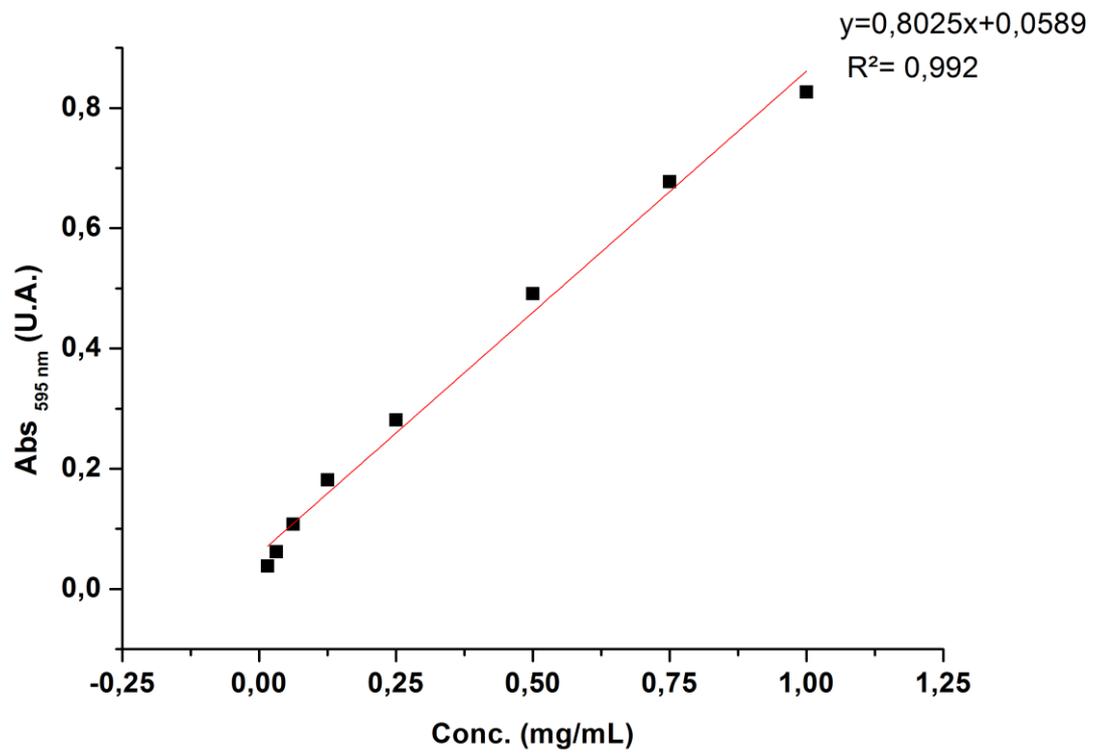
Calcula-se o K_{av} e define-se o log de MW a partir da equação da reta.



APÊNDICE II

Curva padrão para o método de Bradford

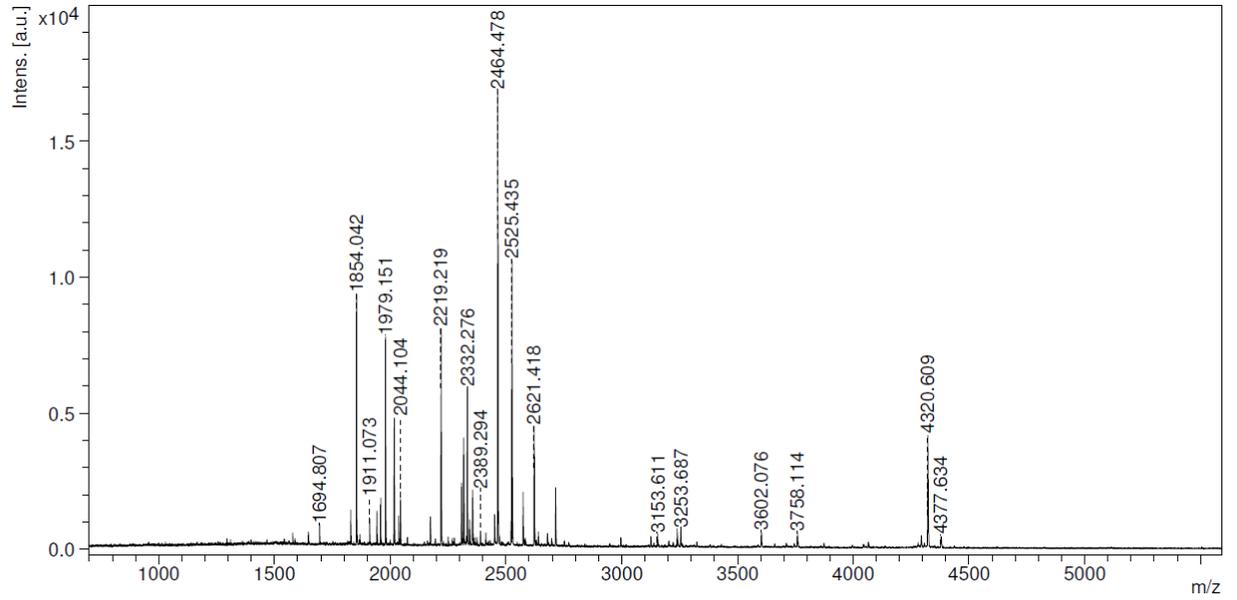
Curva padrão elaborada com albumina. As amostras foram lidas a 595 nm. Para o cálculo da concentração utilizou-se a equação da reta.



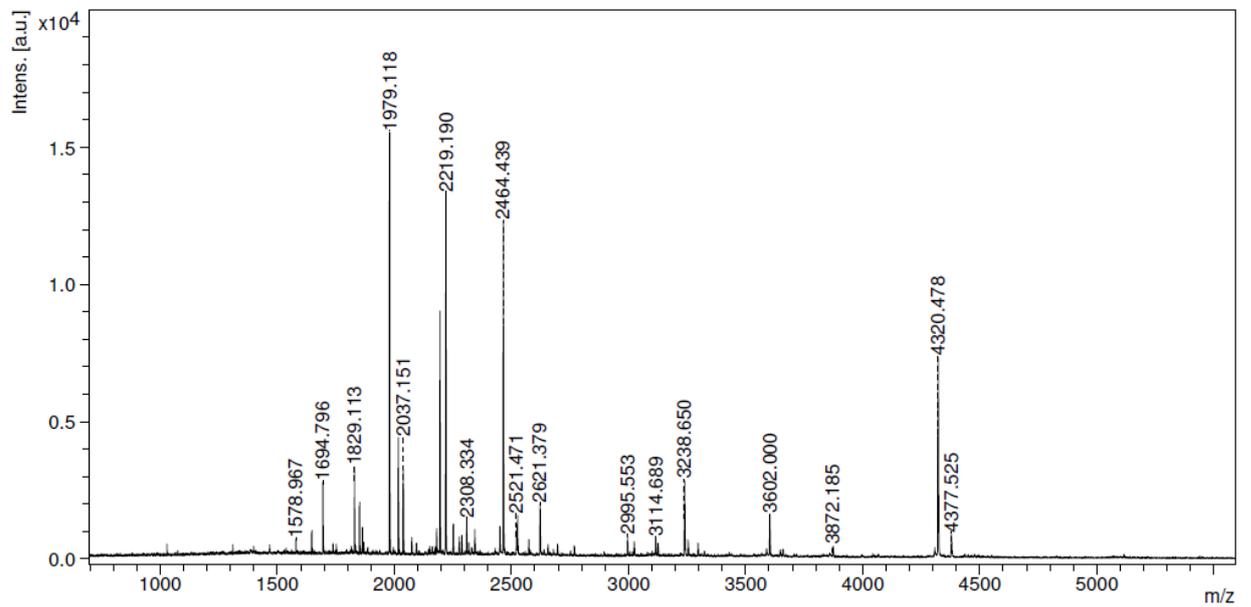
APÊNDICE III

Espectros de MS

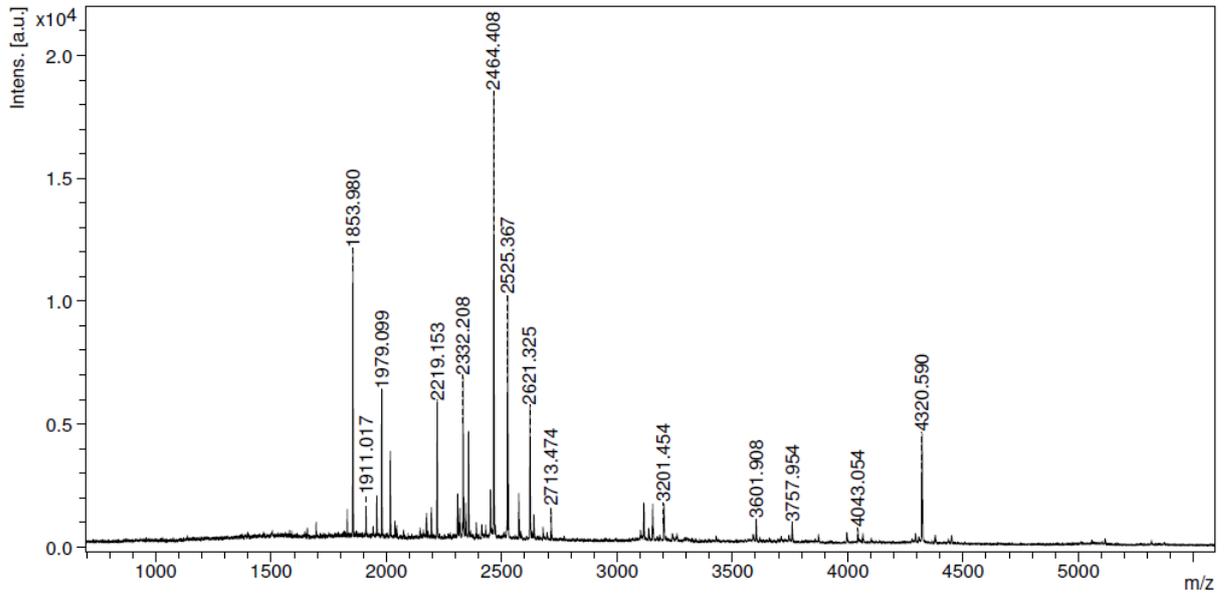
Amostra 1



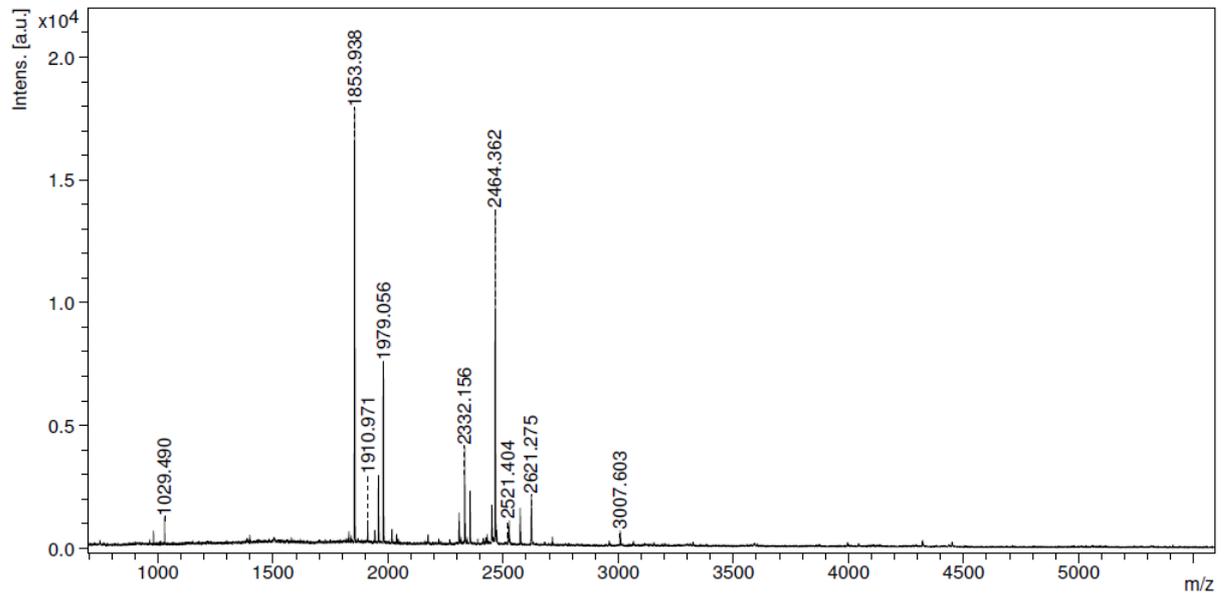
Amostra 2



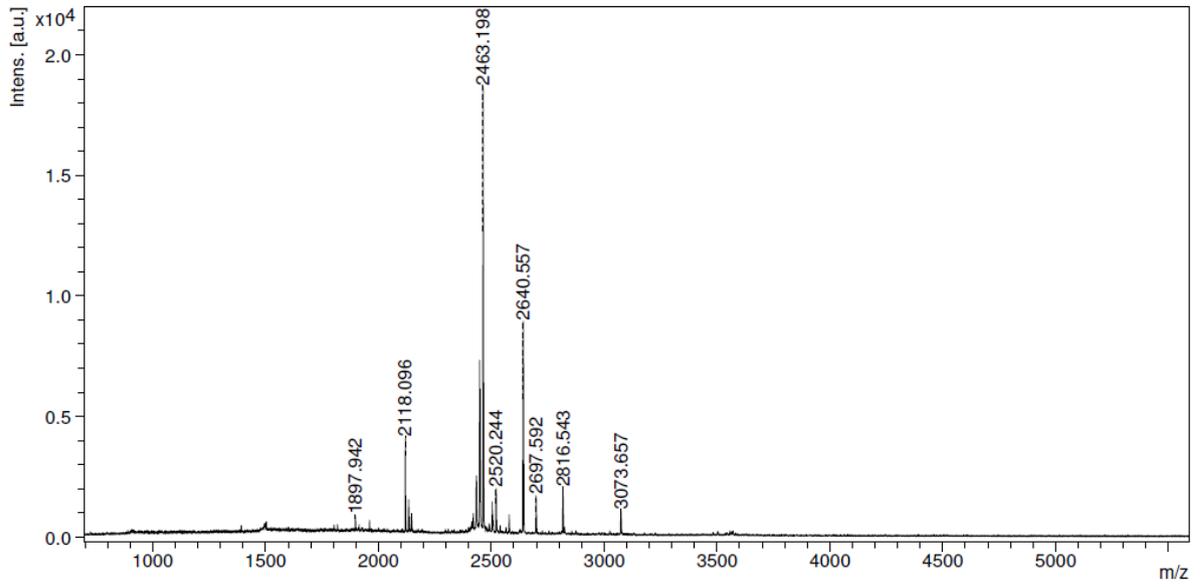
Amostra 3



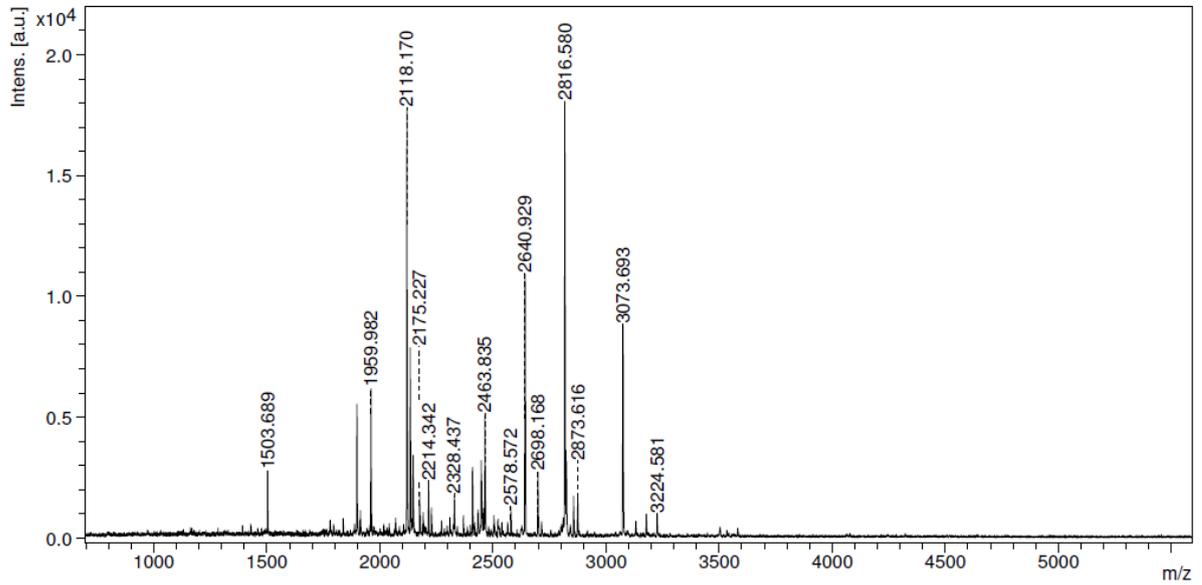
Amostra 4



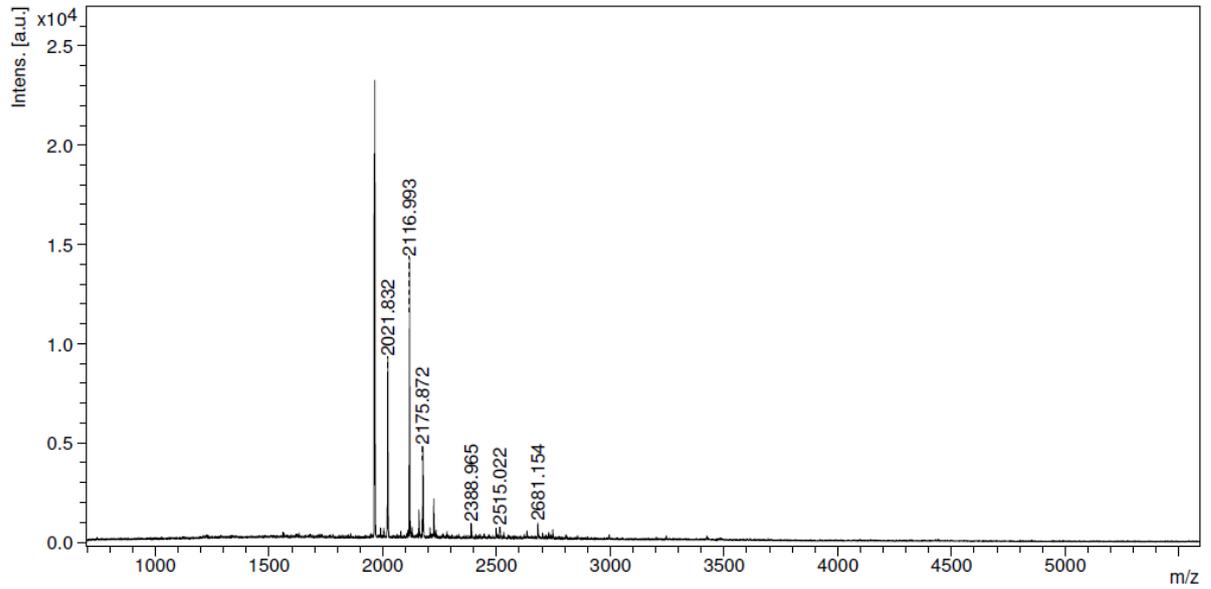
Amostra 5



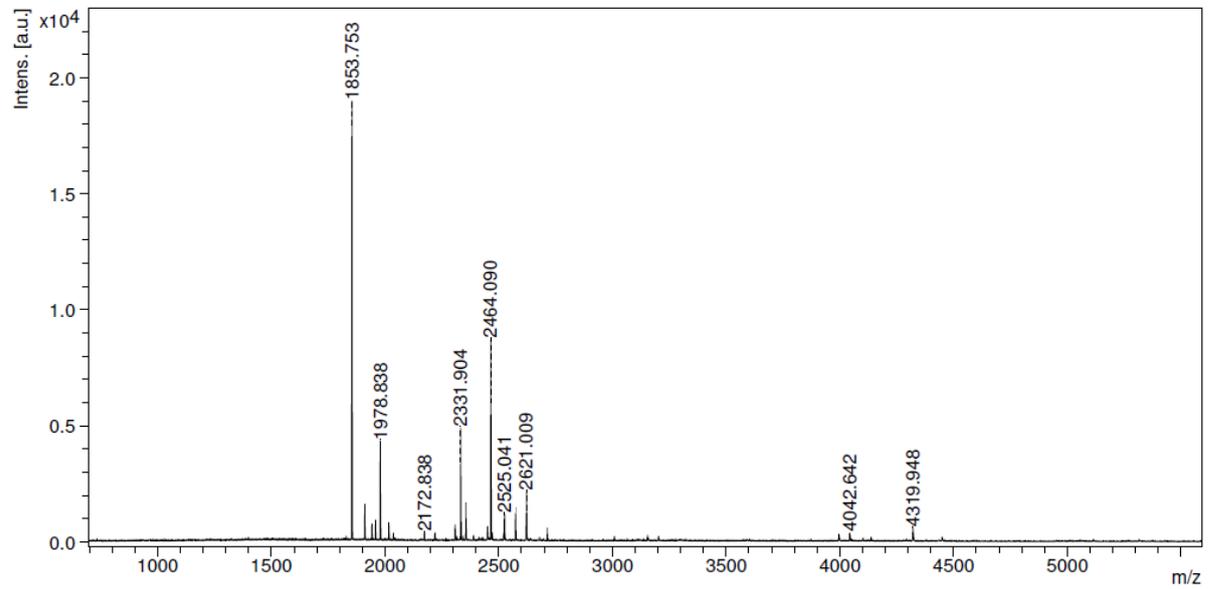
Amostra 6



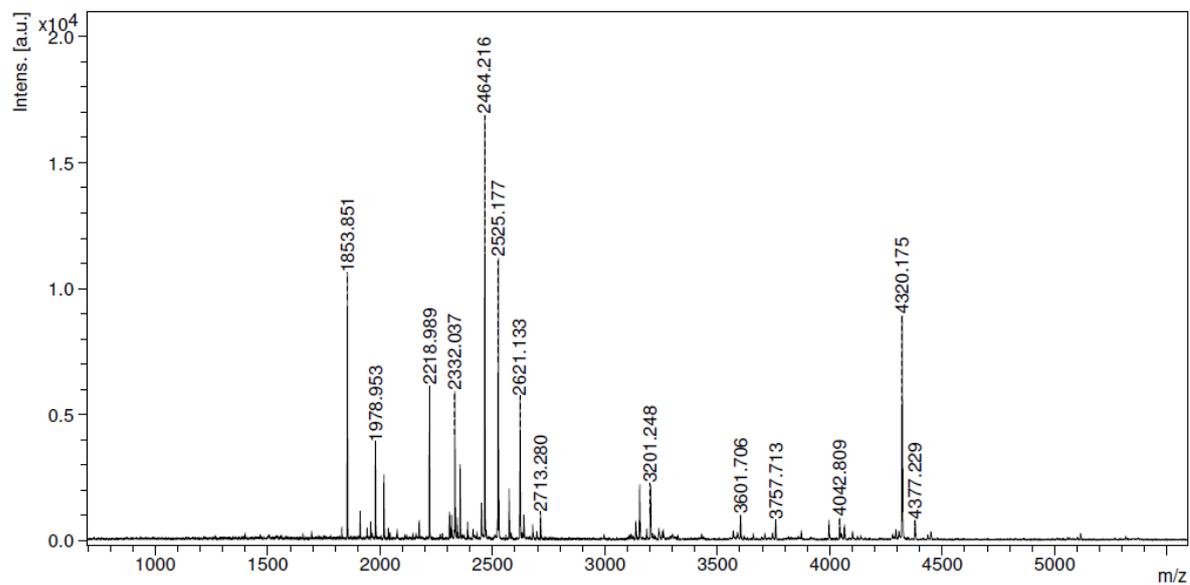
Amostra 7



Amostra 8



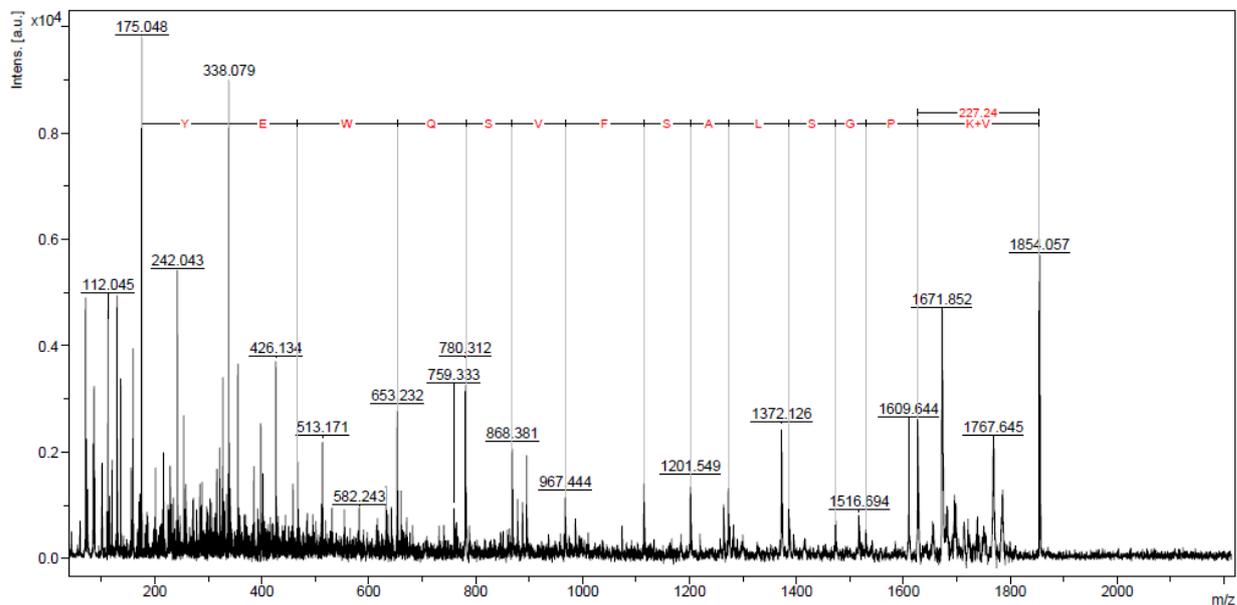
Amostra 9



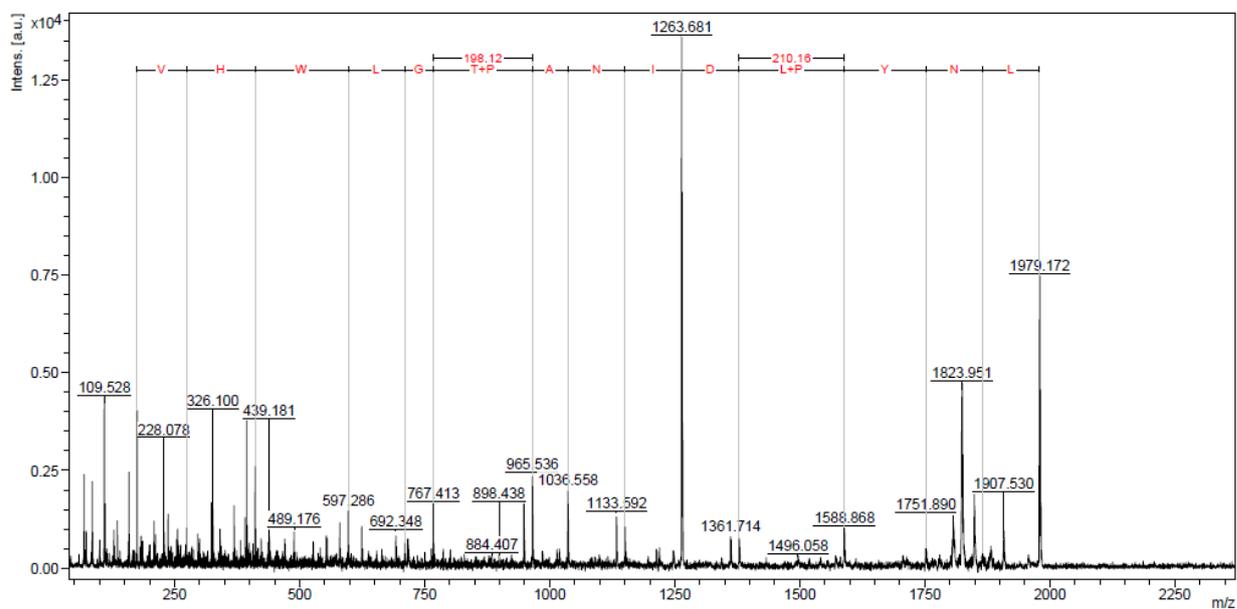
APÊNDICE IV

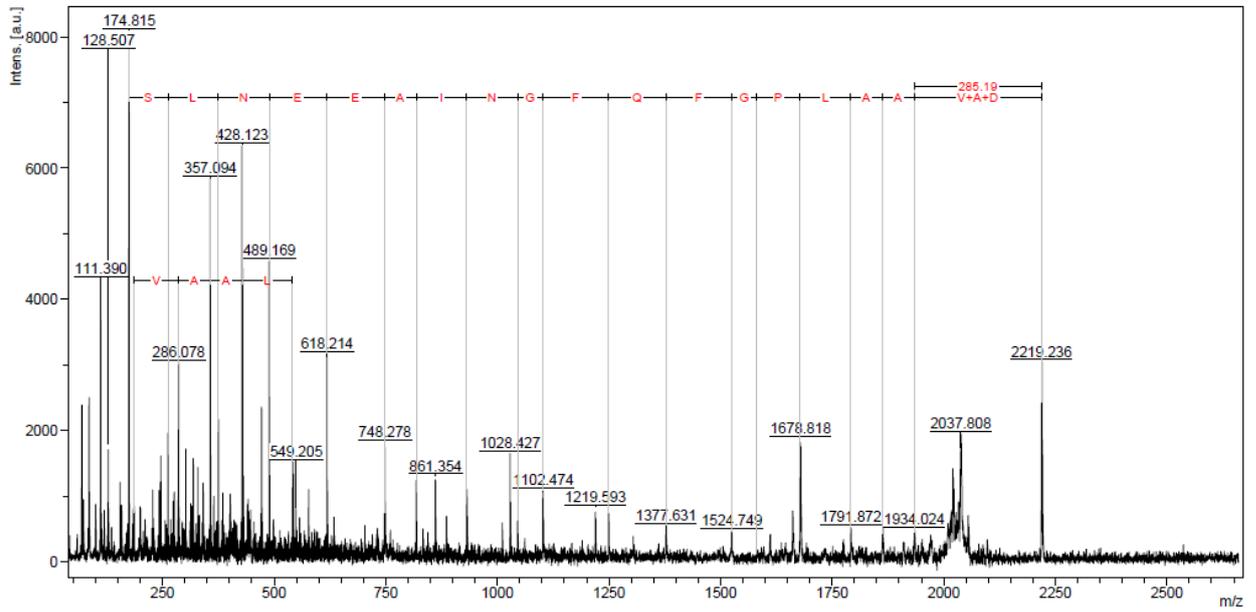
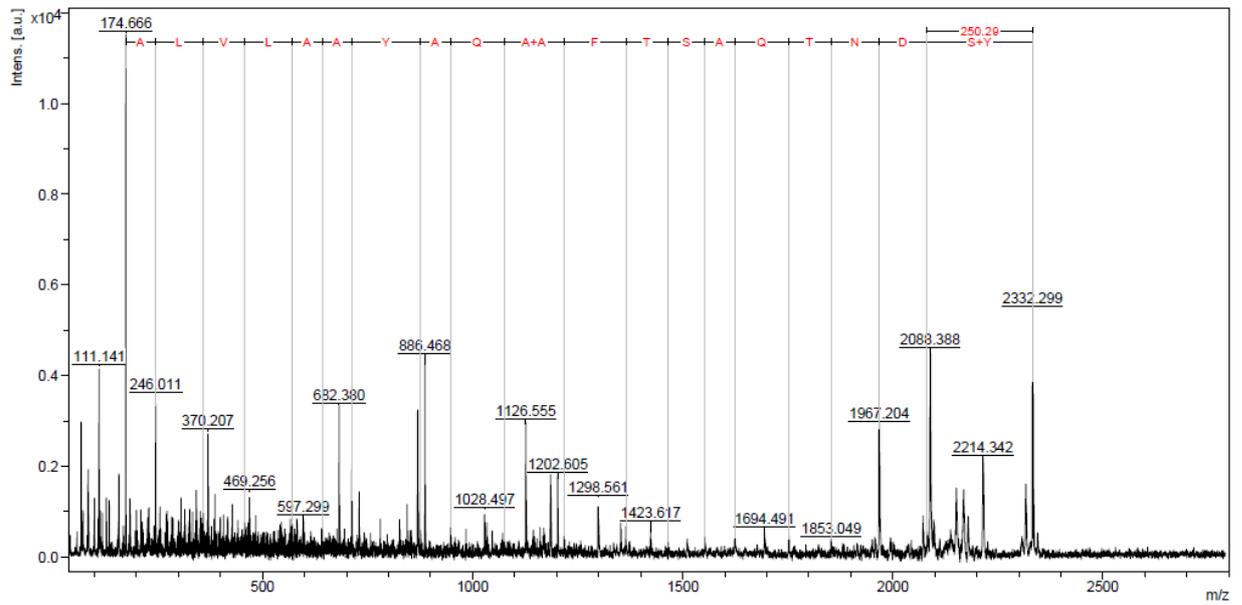
Espectros de MS/MS

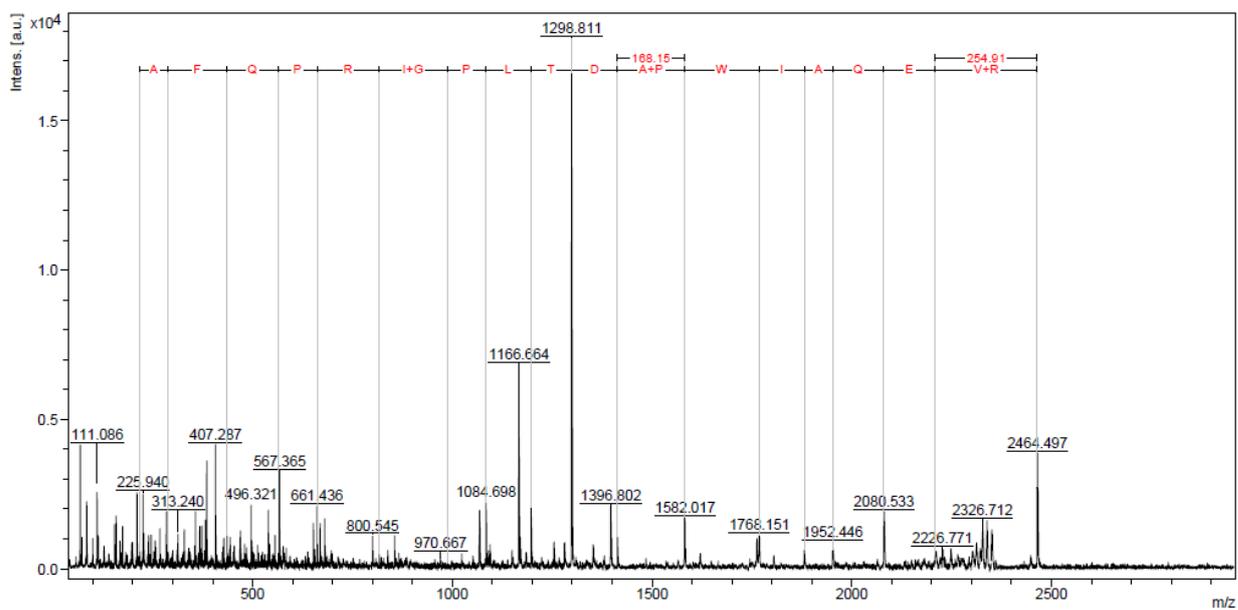
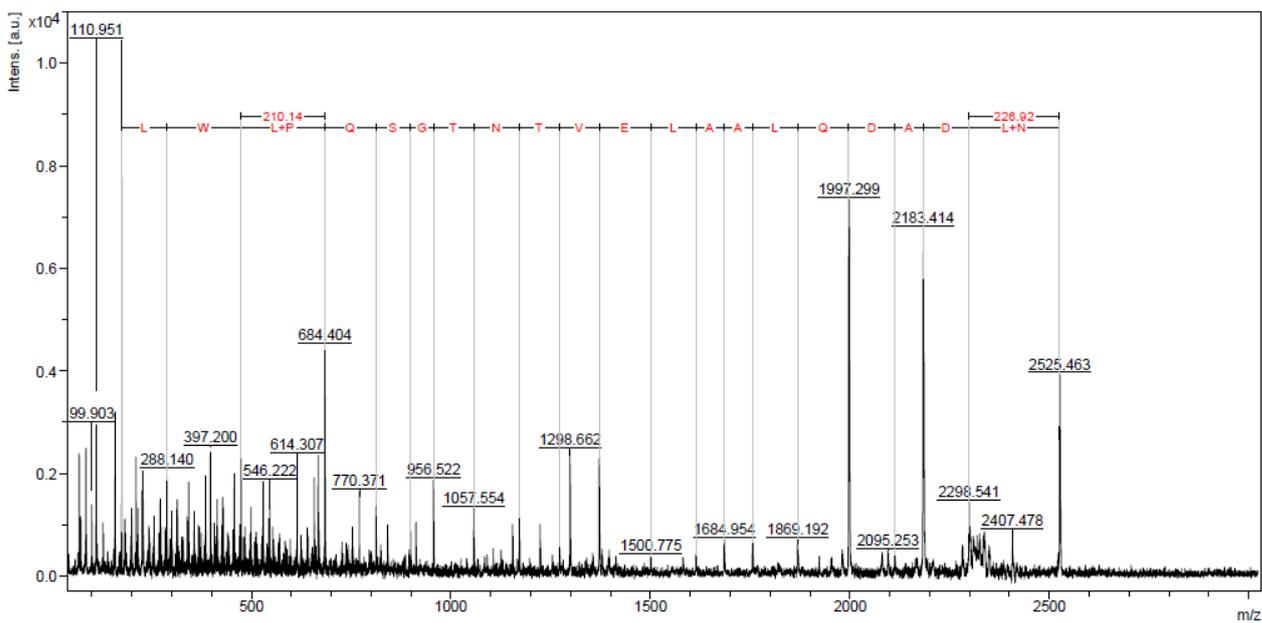
M+H⁺ 1854.04 (amostras 1,2,3,4,8 e 9)

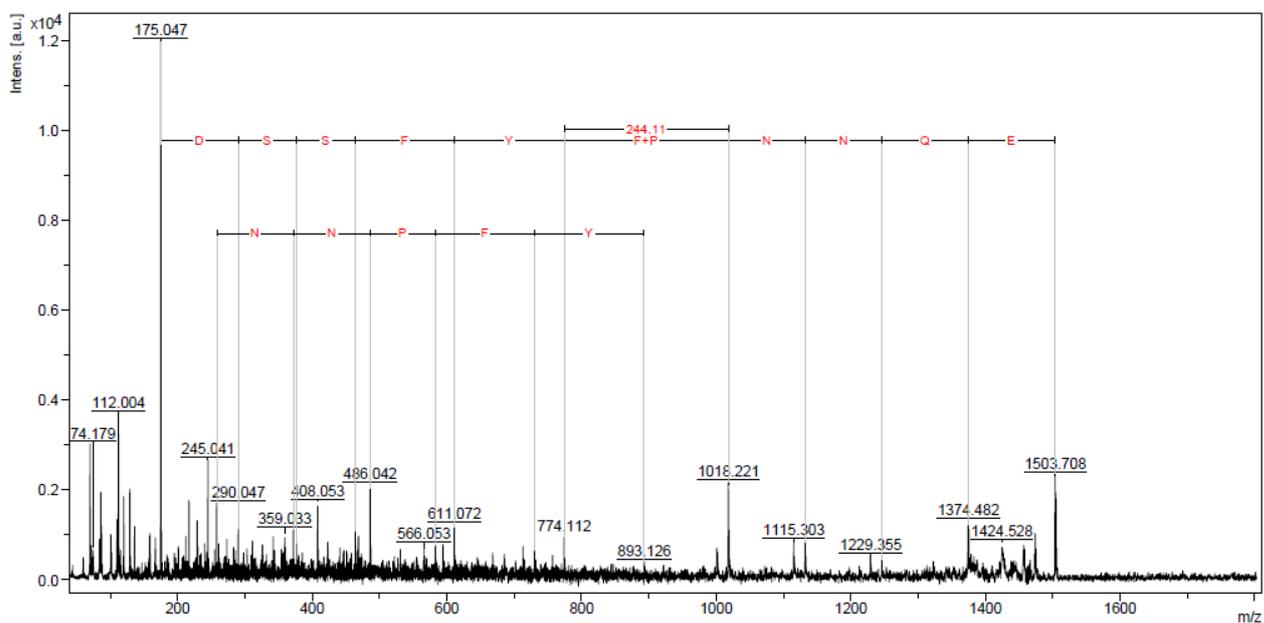
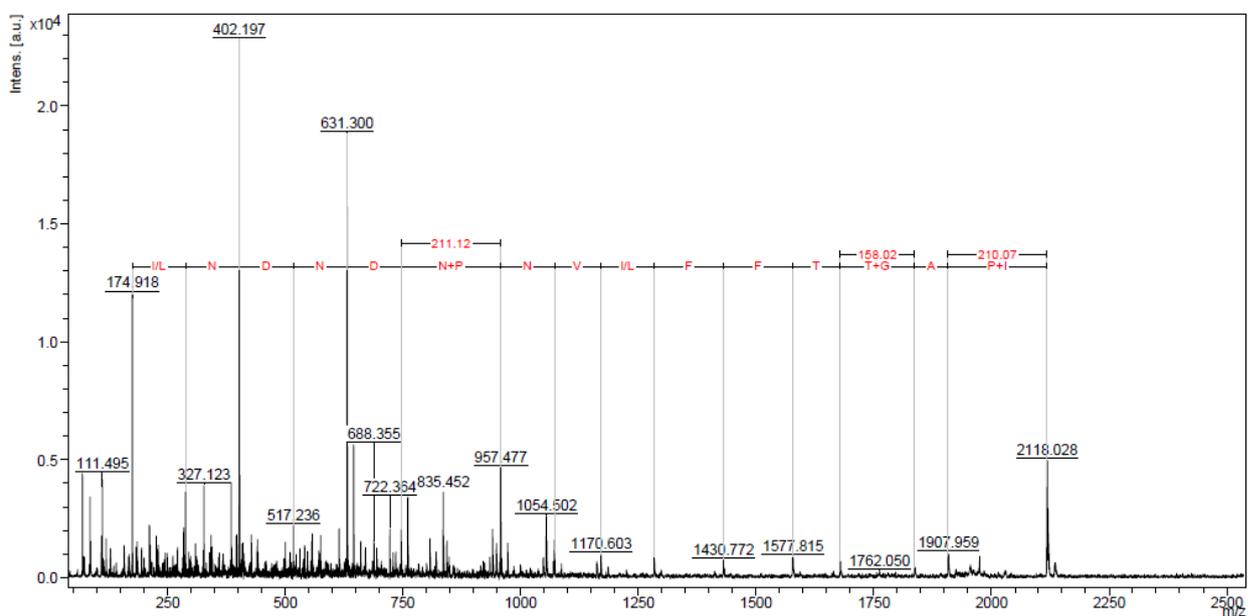


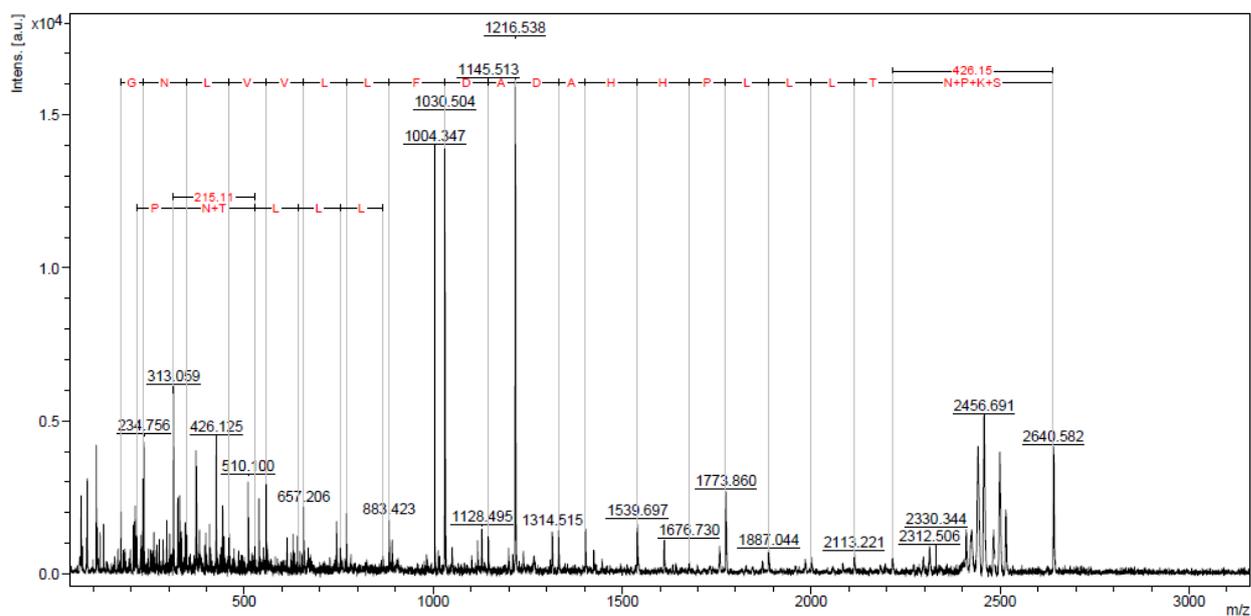
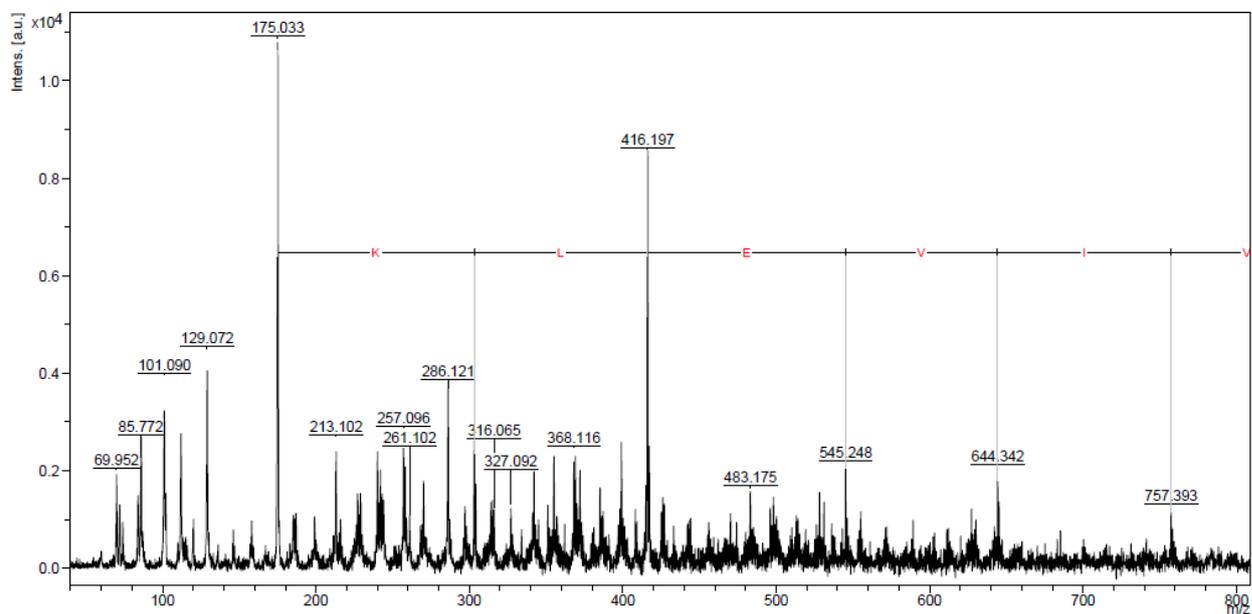
M+H⁺ 1979.15 (amostras 1,2,3,4,8 e 9)

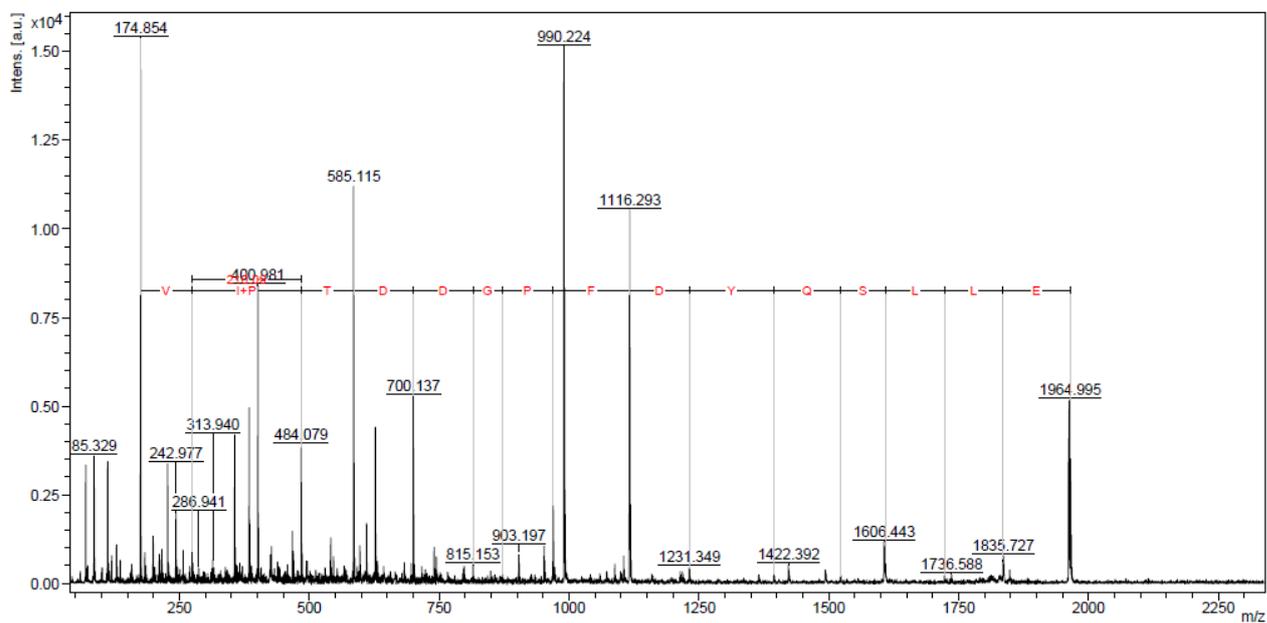
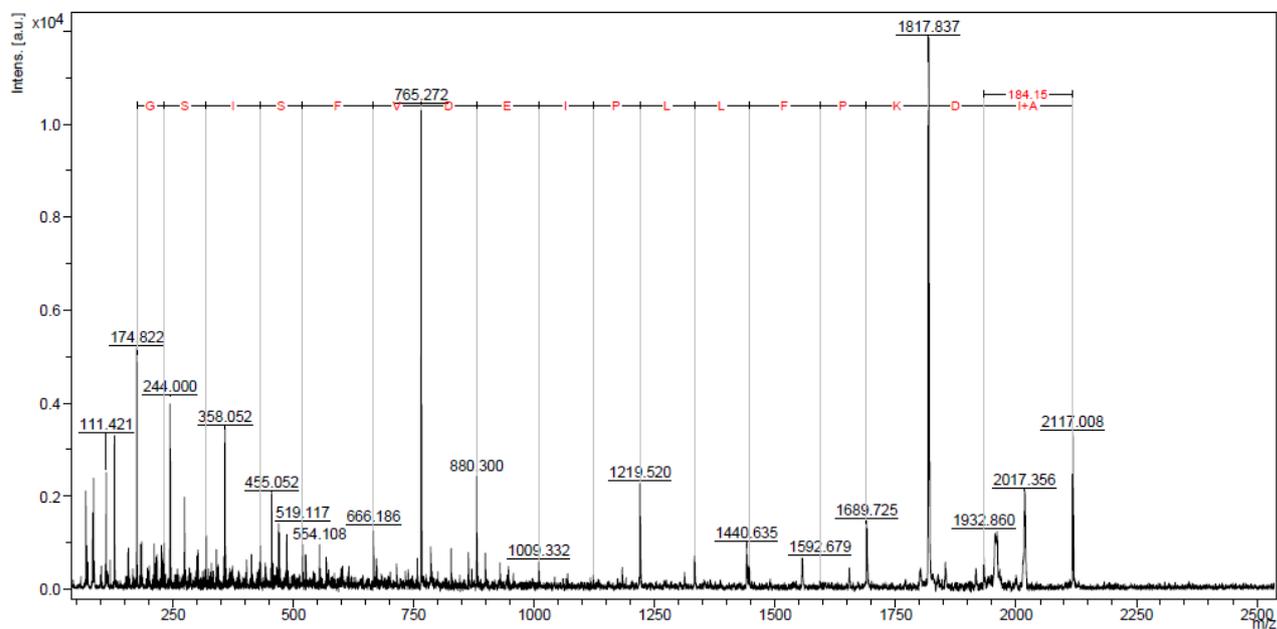


M+H⁺ 2219.21 (amostras 1,2,3,4,8 e 9)M+H⁺ 2332.27 (amostras 1,2,3,4,8 e 9)

M+H⁺ 2464.47 (amostras 1,2,3,4,8 e 9)M+H⁺ 2525.43 (amostras 1,2,3,4,8 e 9)

M+H⁺ 1503.69 (amostras 5 e 6)M+H⁺ 2118.01 (amostras 5 e 6)

M+H⁺ 2640.55 (amostras 5 e 6)M+H⁺ 2816.58 (amostras 5 e 6)

M+H⁺ 2816.58 (amostra 7)M+H⁺ 2116.99 (amostra 7)

APÊNDICE V

Alinhamento entre as sequências da A2M e da ECAM

A sequência de cima corresponde à A2M e a de baixo à ECAM. Destacado em cinza encontra-se o sítio de clivagem relacionado à dimerização.

SEQUENCE	1	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMDNNDKTAPTTKSEAPAVAQPSPAQDPAQL	50
		.. : .:. ... :	
SEQUENCE	1	ASS-----ENASSAKLSVP-----ER	16
SEQUENCE	51	QKLAQQSQGKALTLLDASEAQLDGAATLVLTFSIPLDPEQDFSRVVHVVD	100
	 : :	
SEQUENCE	17	QKLAQQSAGKVLTLDDLSEVQLDGAATLVLTFSIPLDPDQDFSRVIHVVD	66
SEQUENCE	101	AASGSVDGAWELAPNLKELRLRHLEPERVLVTVDPVKALNNATFGKSY	150
		.. . : : : . : : : : : : : : : : : : : : : : :	
SEQUENCE	67	KKSGKVDGAWELSDNLKELRLRHLEPKRDIVTIGKEVKALNNATFSKDY	116
SEQUENCE	151	EKTITTRDVQPSVGFASRGSLLPGKIAEGLPVMALNVNHVDVNFVRVKPG	200
		: : : . : : .	
SEQUENCE	117	EKTITTRDIQPSVGFASRGSLLPGKVVVEGLPVMALNVNVDVNFVRVKPE	166
SEQUENCE	201	SLASFVSQWEYRSSLNWNESDNLKMDLVYTGFRFDLNPARTREKLLLLP	250
		.:. : : : : : . : : : :	
SEQUENCE	167	SLPAFISQWEYRNSLANWQSDKLLQMDLVYTGFRFDLNPARTREKLLLLP	216
SEQUENCE	251	LSDIKPLQQAGVYVAVMNQAGHYNYSNAATLFTLSDIGVSAHRYHNRLDI	300
		. : : . : . : :	
SEQUENCE	217	LGDIKPLQQAGVYLAVMNQAGRYDYSNPATLFTLSDIGVSAHRYHNRLDI	266
SEQUENCE	301	FTQSLENGAAQSGIEIVLLNDKGQTLAQTSDAQGHVQLEADKAAALLLA	350
		: . : . : : : : : : : : : : : : : : : : :	
SEQUENCE	267	FTQSLENGAAQQGIEVSLNEKGQTLTQATSDAQGHVQLENDKNAALLLA	316
SEQUENCE	351	RKEEQTTLLDLTLPALDLSEFNVAGAPGYSKQFFMFGPRDLYRPGETVIL	400
		: . : : : : : : : : : : : : : : : : : :	
SEQUENCE	317	RKDGQTTLLDLKLPALDLAEFNIAGAPGYSKQFFMFGPRDLYRPGETVIL	366
SEQUENCE	401	NGLLRDSGKTLPDQPVKLEVVKPDGQVMRTVVSQPENGLYRLNYPLDIN	450
		: . : : : : : : : : : : : : : : : : :	
SEQUENCE	367	NGLLRDADGKALPNQPIKLDVIKPDGQVLRVVSQPENGLYHFTWPLDSN	416
SEQUENCE	451	APTGLWHVRANTGDNLLRSWDFHVEDFMPERMALNLTAKTPLAPADEVK	500
		. : : : : : : : . . : : . . .	
SEQUENCE	417	AATGMWHIRANTGDNQYRMWDFHVEDFMPERMALNLTGEKTPLPKDEVK	466
SEQUENCE	501	FSVVGYYLYGAPANGNTLQGQLFLRPLRDAVAALPGFQFGNIAEENLSRS	550
		: : : : : : : : : : : : : : : : : : :	
SEQUENCE	467	FSVVGYYLYGAPANGNTLQGQLFLRPLREAVSALPGFEFGDIAAENLSRT	516
SEQUENCE	551	LDEVQLTLDKGRGEVSAASQWQEAHSPLQVILQASLLESGRPVTRRVE	600
		: . . : . . . : :	
SEQUENCE	517	LDEVQLTLDKGRGEVSTESQWKETHSPLQVIFQGSLLESGRPVTRRAE	566
SEQUENCE	601	QAIWPADTLPGIRPQFAAKAVYDYRTDTTVNQPIVDEDSNAAFIVYANA	650
		. : : : : : : : : : : : : : : : : :	
SEQUENCE	567	QAIWPADALPGIRPQFASKSVYDYRTDSTVKQPIVDEGSNAAFIVYSDA	616
SEQUENCE	651	QGEKKAIVSGLQVRLIRRRDYWNWSESEGWQSQFDQKDLVEGEQTLDLN	700
		. : : : : : : : : : : : : : : : : : :	
SEQUENCE	617	QGVKKAIVSGLQVRLIRRRDYWNWSEDEGWQSQFDQKDLIENEQTLDLK	666

