



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular – CEL
Laboratório de Biofísica

**Obtenção e Caracterização Estrutural de uma
leucil-aminopeptidase de *Leptospira
interrogans* sorovar Hardjo expressa em
Escherichia coli “BL21-DE3”.**

Alice da Cunha Morales Álvares

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Maria de Freitas

Coorientador: Prof^o. Dr^o. Jaime Martins Santana

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília - 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a SÔNIA MARIA DE FREITAS (orientadora)

Laboratório de Biofísica Molecular
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília – UnB

Prof^o. Dr^o. JAIME SANTANA (co-orientador)

Laboratório de Patologia Molecular
Departamento de Patologia Molecular
Universidade de Brasília – UnB

Prof^a Dr^a REGINA MARIA DIAS BUANI DOS SANTOS (examinadora)

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal- FAP-DF
União Educacional do Planalto Central - UNIPLAC

Prof^o. Dr^o. MARCELO PORTO BEMQUERER (examinador)

Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof^a. Dr^a. LÍDIA MARIA PEPE DE MORAES (examinadora)

Laboratório de Biologia Molecular
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília – UnB

*A Deus, que sempre ouviu minhas preces,
meus desabafos, minhas angústias. Que
sempre proporcionou oportunidades
grandiosas em minha vida,
principalmente por permitir chegar até
esta etapa final.*

*Aos meus pais, Antonio Morales Álvares e
Delir Luíza da Cunha Morales, que
nunca deixaram faltar nada em minha
vida. Sempre estiveram presentes,
sempre me conduziram para o melhor
caminho e acreditam em mim.*

*À pessoa que me faz feliz, meu amor,
Alberto de Paiva Borges, que me dá
forças, incentivo e carinho em todos os
momentos de minha vida.*

A uma pessoa especial, que terei sempre em meu coração, prof^a Dr^a Regina Buani. Com toda sua classe e sabedoria, coordenou meu projeto de conclusão do curso de Farmácia pela Uniplac e incentivou-me a seguir a área acadêmica.

Ao diretor da Faciplac, prof Dr Walter Paulo, uma pessoa excelente e de grande reconhecimento. Participou da banca de defesa de meu projeto de conclusão de curso. Suas palavras “não pare por aí, Alice” foi que me incentivaram a seguir esta área acadêmica.

Ao meu querido amigo, Adelson Joel da Silva. Agradeço por tudo. Foram tantos os favores, os aprendizados. Esteve ao

meu lado sempre, guiando-me, com vontade e carinho.

À minha querida professora Dr^a Sônia Maria de Freitas que serviu de instrumento de Deus para eu iniciar a pós-graduação em Biofísica Molecular. Recebeu-me com carinho e muita paciência. Compreendeu minhas dificuldades e orientou-me como filha. Passou sempre muita segurança e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ouvir minhas preces.

Aos meus pais, Antonio Morales Álvares e Delir Luiza da Cunha Morales, que me compreenderam nos momentos mais difíceis desta etapa acadêmica, transmitindo-me muito apoio e confiança.

Ao meu amado, Alberto de Paiva Borges, que sempre apoiou minha vontade de estudar, de aprender. Sempre pronunciou palavras de conforto e incentivo. Nos momentos mais difíceis, fez-me rir, mostrando-me que estou no caminho certo, o caminho que quero seguir. Com seu abraço, transmitia sentimentos bons e enchia-me de alegrias.

Às minhas irmãs Renata e Luciana da Cunha Morales Álvares com as quais posso contar e ao meu sobrinho Eric, que participará de nossas vidas em março de 2010.

À minha segunda família, Emilia, Rodolfo, Elvis, Eliene e Sofia, agradeço pela presença, pela fraternidade e pela existência de vocês.

À minha professora e orientadora da graduação, Regina Buani, que sempre depositou sua confiança em mim, acreditando em meu potencial, aumentando minha confiança para vencer todos os obstáculos de minha vida.

Ao diretor da Uniplac, Dr.º Walter Paulo, pelo carinho e atenção durante e após a graduação. Obrigada pela dedicação, educação e exemplo por todos esses anos.

Aos meus queridos amigos que compõem a equipe de Biofísica, Everton, Sandrielle, Gisele Esteves, Gisele Xavier, Graziela, Cristiano, Roseni e Viviane, pelo bom convívio durante esses dois anos, pelo socorro nos momentos difíceis.

À duas meninas especiais, Larissa Souza e Muriele Taborda, que com muita inteligência e paciência, me auxiliaram durante todo o período de mestrado. Agradeço pelas discussões, pelas explicações esclarecedoras e pelas alegrias.

Aos alunos da equipe de Patologia Molecular, principalmente, ao Hugo de Almeida Souza, pela dedicação e tolerância durante meu aprendizado.

Ao professor Jaime Santana, que me proporcionou oportunidades para o desenvolvimento do trabalho presente.

Ao técnico de laboratório Francisco, que ajudava sempre e de forma imediata, com muita competência e boa vontade.

Aos meus amigos, Flávia e Gabriel, sempre dispostos a ensinar e a ajudar em que for preciso. Sempre alegres e disponíveis nos momentos de dificuldade. Obrigada pelas experiências trocadas durante este período.

À minha amiga de confiança, Arêta Emanuele, pela atenção durante todo esse momento, com carinho, sempre me orientou boas ações.

À Ana, secretária da pós-graduação em Biologia Molecular, com sua competência e excelente trabalho.

Ao LNLS por possibilitar nossas pesquisas de ELD e cristalografia.

Ao amigo de todas as horas, Adelson Joel da Silva, que transmitiu todos seus conhecimentos, com paciência, repetia quantas vezes fossem precisas. Obrigada pelos momentos de alegria, de confiança, de confiança. Muito obrigada pela companhia no LNLS, pelas brigas de dois estressados, que depois acabava em risadas.

À minha orientadora, Sônia Maria de Freitas, que sempre com sorriso no rosto, ensinou, com entusiasmo, os princípios da Biofísica Molecular. Muitíssimo obrigada por ser minha mãe em todos os momentos dessa fase. Agradeço de coração a generosidade e atenção que teve por mim. Obrigada por confiar em mim e depositar tanta responsabilidade. Tenho a senhora em meu coração, e sempre será minha referência, para tudo em minha vida. A senhora é um grande exemplo para mim e meus colegas. Saiba que tenho muito carinho e reconhecimento pela senhora. Não me esquecerei dos jantares deliciosos no LNLS para descontrair, mas depois voltar ao trabalho. Obrigada pela oportunidade de realizar um trabalho incessante e satisfatório ao lado da senhora.

Ao CNPq pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudo.

A todos aqueles que contribuíram em minha caminhada, de forma direta e indireta, recebam o meu muito obrigada, carinhosamente.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α = Alfa

β = Beta

Δ = Delta

θ = Tetha

η = Viscosidade

ε = Coeficiente de absorvidade

λ = Comprimento de onda

l = caminho óptico

μM = Micromolar

μL = Microlitro

\pm = Desvio-padrão

Asp = Aspartato

C-terminal = Domínio carboxi-terminal da cadeia polipeptídica

DC = Dicroísmo circular

D_H = Diâmetro hidrodinâmico

D = Diâmetro

ΔG = Variação da energia livre de Gibbs

ΔS = Variação de entropia

ΔH = Variação de entalpia

ΔG^{25} = Medida de Delta G a 25°C

ΔG_{H_2O} = valor na ausência do desnaturante

ELD = Espalhamento de Luz Dinâmico

E. coli = *Escherichia coli*

FPLC = Cromatografia líquida e rápida de proteínas

F_0 = Intensidade de fluorescência na ausência do atenuador

F = Intensidade de fluorescência na presença do atenuador

F_{app} = Fração aparente de enzima desnaturada

Glu = Glutamato

g = medida de rotação em gravidade

HapepA = Gene pepA de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo

IPTG = β -D-1- tiogalactopiranosídeo de isopropila

K_{SV} = Constante de Stern-Volmer

K_S = Constante de fluorescência estática

K_D = Constante de fluorescência dinâmica

K_{app} = Constante de equilíbrio da enzima desnaturada

kDa = quiloDalton

Lys = Lisina

LAP = Leucil-aminopeptidase

LNLS = Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LB = meio de cultura Luria-Bertani

L-AMC = leucil-7-amino-4-metilcoumarina

mg = Miligrama

mL = Mililitro

mM = Milimolar

m_g = constante de proporcionalidade

M = Molar

nm = Nanômetro

N-terminal = Domínio amino-terminal da cadeia polipeptídica

P_{tot} = concentração de proteína total em termos de monômero

pH = potencial hidrogeniônico

R^2 = Coeficiente de correlação

R_H = Raio hidrodinâmico

R = Constante universal dos gases

S_u = Sinal dicróico da enzima desnaturada

S_f = Sinal dicróico da enzima nativa

SDS = Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE = Gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio

Trp = Triptofano

T°C = Temperatura em graus Celsius

UV = Luz ultra-violeta

V = Voltagem

χ^2 = "Chi-quadrado"

RESUMO

Neste trabalho apresentamos estudo biofísico e estrutural de uma leucil aminopeptidase (LAP), proteína recombinante expressa em *Escherichia coli* e presente em *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo (LAPr-Li). Essa proteína está diretamente relacionada com a patogenicidade dessa bactéria e com a doença leptospirose em animais e humanos. A LAPr-Li foi obtida por transformação do vetor pET19b-HapepA em *E. coli* BL21-DE3, expressa a 20°C, após indução com IPTG 0,3 mM, e purificada por cromatografia de afinidade e de exclusão molecular. Essa enzima apresenta atividade ótima na forma hexamérica em pH 8,5 e temperatura 50°C. A LAPr-Li é formada por dímeros de trímeros formando o hexâmero, cuja atividade depende desta estrutura. A estrutura secundária é constituída de 44,7% de α -hélice e 11,6% por folhas- β . A forma hexamérica, de diâmetro 15,2 nm e massa molecular 320 kDa, foi confirmada por ensaios de oligomerização dependentes da temperatura, por espalhamento de luz dinâmico. Estudos de atenuação de fluorescência, utilizando atenuadores carregados e neutros e ajustes de Stern-Volmer, revelaram que a proteína apresenta duas populações de triptofanos. A caracterização dos microambientes foi baseada nas constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) obtidas para atenuação com cloreto de cézio, que apresentou maior acesso aos resíduos de triptofanos, quando comparado ao iodeto de potássio, carregado negativamente. As constantes de atenuação de fluorescência para o cézio foram $K_{SV1}= 38,6 \text{ M}^{-1}$ e $K_{SV2}= 6,4 \text{ M}^{-1}$ e para iodeto $K_{SV1}= 4,4 \text{ M}^{-1}$ e $K_{SV2}= 0,4 \text{ M}^{-1}$. A estabilidade estrutural da LAPr-Li foi analisada a partir de curvas de desnaturação térmica e química obtidas por dicroísmo circular. A elevação da temperatura para 50°C

em pH 8,5 induziu modificações na estrutura secundária e, conseqüentemente, na conformação da proteína. As curvas de desnaturação térmica (25-95°C) indicaram maior estabilidade estrutural da LAPr-Li nos pHs 3,0 e 5,0, onde nenhuma alteração estrutural e desnaturação foi observada. Em região alcalina (8,0, 8,5 e 9,0) a LAPr-Li não é desnaturada completamente, resultando, portanto, em valores de ΔG^{25} mais baixos ($\sim 2,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$) comparados àqueles obtidos nos pHs 6,0 (3,52 kcal.mol^{-1}) e 7,0 (6,63 kcal.mol^{-1}), onde a proteína se desnaturou completamente. Esse último resultado foi confirmado com a curva de desnaturação, utilizando cloridrato de guanidina em água, onde a desnaturação completa da LAPr-Li resultou no valor de $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ de 6,32 kcal.mol^{-1} .

Palavras-chave: Leucil aminopeptidase, estrutura de proteínas, espalhamento de luz dinâmico, fluorescência estática, dicroísmo circular, leptospirose.

ABSTRACT

In this work we present the biophysical studies of the leucine aminopeptidase (LAP), a recombinant protein expressed in *Escherichia coli* and present in *Leptospira interrogans* serovar Hardjo (LAPr-Li). This protein is related to pathogenicity of the bacteria and the leptospirosis disease in animals and humans. The LAPr-Li was obtained by transformation of the vector pET19b-HapepA in *E. coli* BL21-DE3, expressed at 20°C after induction with 0.3 mM IPTG, and purified by affinity and size exclusion chromatography. The enzyme presents optimal activity as hexamer at pH 8.5 and 50°C. LAPr-Li is self assembled as hexamer from trimers of dimers and its secondary structure consists of 44.7% α -helix and 11.6% for β -sheets. The hexamer with diameter of 15.2 nm and molecular weight 320 kDa was confirmed by dynamic light scattering oligomerization assays. Fluorescence decay studies using charged and neutral quenchers and Stern-Volmer fitting revealed two different populations of tryptophan (exposed and buried) in negatively charged microenvironment. The cesium chloride had greater access to tryptophan residues, when compared to potassium iodide, negatively charged. The constants of fluorescence decay for cesium was $K_{SV1} = 38.6 \text{ M}^{-1}$ and $K_{SV2} = 6.2 \text{ M}^{-1}$ and iodide $K_{SV1} = 4.4 \text{ M}^{-1}$ and $K_{SV2} = 0.4 \text{ M}^{-1}$. The structural stability of LAPr-Li was analyzed from thermal and chemical denaturation curves by circular dichroism spectroscopy. The increase of temperature to 50°C at pH 8.5 induced secondary structure and conformational changes of the protein. It promotes flexibility of the enzyme that appears to be essential for enzymatic activity. The thermal denaturation curves (25-95°C) indicated higher structural stability of LAPr-Li at pH 3.0 and 5.0 in which no

denaturation profile was observed. At pH 8.0, 8.5 and 9.0 LPr-Li was partially denatured resulting in lower values of ΔG^{25} ($\sim 2.0 \text{ kcal.mol}^{-1}$) compared to those obtained at pH 6.0 ($3.52 \text{ kcal.mol}^{-1}$) and 7.0 ($6.63 \text{ kcal.mol}^{-1}$), where the protein was completely denatured. The latter result was confirmed by denaturation using aqueous solution of guanidine hydrochloride, where the complete denaturation of LPr-Li resulted in $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ value of $6.32 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Keywords: Leucyl aminopeptidase, structure of protein, dynamic light scattering, static fluorescence, circular dichroism, leptospirosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias de contaminação por Leptospiras. Condições precárias de moradia, falta de saneamento básico, falta de cuidados por parte dos grupos de risco (Bharti *et al*, 2003).

Figura 2. Ciclo de transmissão da leptospirose.

Figura 3. Bactéria espiroqueta de *Leptospira interrogans*.

Figura 4. Parede celular de Leptospiras.

Figura 5. Alinhamento da sequência de leucil aminopeptidases da família M17.

Figura 6. Estrutura do monômero de *bLAP*.

Figura 7. Estrutura do sítio ativo de LAP bovina.

Figura 8. Estrutura hexamérica, nativa, da LAP bovina.

Figura 9. Extrato bacteriano total da LAPr-Li, após o rompimento da parede bacteriana, nas condições ideais em meio LB representado em gel SDS-PAGE 8%.

Figura 10. Gel SDS 8% das frações obtidas na purificação da LAPr-Li em cromatografia de afinidade.

Figura 11. Cromatograma das frações da enzima eluída em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM em coluna Superdex G-200.

Figura 12. Atividade relativa da LAPr-Li sobre o substrato fluorogênico L-Leu-AMC em tampões com diferentes pHs a 25°C.

Figura 13. Atividade enzimática relativa da LAPr-Li em diferentes pHs com o aumento da temperatura.

Figura 14. Estados oligoméricos da LAPr-Li (14 μ M) em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5 em diferentes temperaturas por ELD. D_h = diâmetro hidrodinâmico.

Figura 15. Espectros de emissão de fluorescência da LAPr-Li em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5 ($A_{280\text{nm}} < 0.1$) com adição de concentrações crescentes de acrilamida, a 25°C. Excitação em 295 nm. ($\lambda_{\text{máx.}}$: 332 nm).

Figura 16. Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência da LAPr-Li por acrilamida, em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5. F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença de acrilamida.

Figura 17. Gráfico de Stern-Volmer para atenuação de fluorescência por acrilamida para a população menos exposta de Trp de HaLAP em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5.

Figura 18. Gráfico de Stern-Volmer para atenuação de fluorescência por acrilamida para a população mais exposta de trp de HaLAP em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5.

Figura 19. Espectros de emissão fluorescente da LAPr-Li em tampão Tris-HCl 20 mM NaCl 200 mM pH 8,5 com adição de concentrações crescentes de iodeto de potássio submetidas a diferentes força iônica, a 25°C. Excitação em 295 nm.

Figura 20. Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência da LAPr-Li por I^- em diferentes força iônica, em tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM pH 8,5. K_{SV} representa a inclinação da reta, F_0 a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente.

Figura 21. Espectros de emissão fluorescente da LAPr-Li em tampão Tris-HCl 20 mM NaCl 200 mM pH 8,5 com adição de concentrações crescentes de cloreto de cézio, a 25°C. Excitação em 295 nm.

Figura 22. Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência por Cs^+ da LAPr-Li em tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM pH 8,5. F_0 , fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente.

Figura 23. Gráfico de Stern-Volmer para atenuação de fluorescência por Cs^+ para a população mais exposta de Trp de LAPr-Li em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5.

Figura 24. Gráfico de Stern-Volmer para atenuação de fluorescência por Cs^+ para a população menos exposta de Trp de LAPr-Li em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5.

Figura 25. Espectro de dicroísmo circular “UV distante do visível” da LAPr-Li na forma nativa ($0,064 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM pH 8,5.

Figura 26. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-Li em diferentes pHs. Comprimento de onda fixado em 222 nm.

Figura 27. Voltagem correspondente às curvas de desnaturação da LAPr-Li em vários pH.

Figura 28. Espectros de dicroísmo circular UV distantes do visível da LAPr-Li ($0,064 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em diferentes pHs.

Figura 29. Espectros de DC registrados de 25-95°C. (A) LAPr-Li em pH 5,0. (B) LAPr-Li em pH 7,0. (C) LAPr-Li em pH 8,5.

Figura 30. Conteúdo das estruturas secundárias da LAPr-Li com aumento da temperatura em pH 8,5.

Figura 31. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-Li em pH 6,0.

Figura 32. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-Li em pH 7,0.

Figura 33. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-Li em pH 8,0.

Figura 34. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-Li em pH 8,5.

Figura 35. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-Li em pH 9,0.

Figura 36. Curvas normalizadas de desnaturação induzida pelo aumento de temperatura em diferentes pHs.

Figura 37. Gráfico de van't Hoff da LAPr-Li em diferentes pHs.

Figura 38. Espectros de dicroísmo circular da LAPr-Li ($0,064 \text{ mg.mL}^{-1}$) em concentrações crescentes de cloridrato de guanidina, em água.

Figura 39. Curva de desnaturação da LAPr-Li em diferentes concentrações de cloridrato de guanidina em água.

Figura 40. Fração de proteínas no estado nativo e desnaturado da LPr-Li (0,064 mg.mL⁻¹) em concentrações crescentes de cloridrato de guanidina em solução aquosa a 25°C.

Figura 41. Energia livre estimada para o desdobramento da LPr-Li (0,064 mg.mL⁻¹) em concentrações crescentes de cloridrato de guanidina a 25°C.

Figura 42. Espectros de dicroísmo circular de renaturação da LPr-Li.

Figura 43. Sinal dicroico máximo da LPr-Li de renaturação em diferentes concentrações de guanidina. A figura inserida mostra a atividade relativa da proteína em cloridrato de guanidina de 6,0 M a 0,5 M.

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Sequência primária de LAP de *L. interrogans* sorovar Lai. NCBI.

Tabela II. Aminoácidos que coordenam os íons de zinco das LAPs de diferentes organismos.

Tabela III. Dados de Espalhamento de Luz Dinâmico da HaLAP 14 μ M em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5, variando a temperatura (25-60°C).

Tabela IV. Constantes de Stern-Volmer para iodeto de potássio com variação da força iônica, em pH 8,5. K_{SV1} representa a população mais exposta de trp e a K_{SV2} , a menos exposta.

Tabela V. Constantes de Stern-Volmer para Cloreto de Césio em pH 8,5. K_{SV1} representa a população mais exposta de trp e a K_{SV2} , a menos exposta.

Tabela VI. Constantes de Stern-Volmer de acrilamida, iodeto de potássio e cloreto de césio para as duas populações de Trp.

Tabela VII. Estrutura secundárias da HaLAP em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5 a 25°C por DC.

Tabela VIII. Parâmetros termodinâmicos da HaLAP em Acetato de Sódio (pH 6) e Tris-HCl (pHs 7 a pH 9).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Considerações gerais e importância do estudo proposto.....	01
1.2. Leptospirose.....	03
1.3. Transmissão e Sintomas.....	05
1.4. Diagnóstico e Tratamento.....	08
1.5. <i>Leptospira interrogans</i> : Genoma e Patogenicidade.....	09
1.6. Aminopeptidases.....	13
1.7. Leucil-aminopeptidases- LAPs.....	14
1.7.1. Aminopeptidases pertencentes à família M1.....	16
1.7.2. Aminopeptidases pertencentes à família M17.....	17
1.7.3. Estrutura e Mecanismo de ação.....	19
2.JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
Organograma.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Transformação das Bactérias.....	32
4.2. Expressão da Proteína.....	32
4.3. Extração da proteína.....	33

4.4. Análise da expressão da proteína em gel de poliacrilamida.....	33
4.5. Ativação da coluna para purificação.....	34
4.6. Purificação da proteína.....	34
4.7. Separação de formas oligoméricas.....	35
4.8. Ensaio de atividade enzimática.....	35
4.9. Influência do pH e da temperatura.....	36
4.10. Espalhamento Dinâmico da Luz- EDL.....	36
4.11. Análises estruturais por fluorescência estática.....	38
4.12. Análises estruturais por Dicroísmo Circular (CD).....	40
4.12.1. Estrutura secundária.....	42
4.12.2. Desnaturação térmica.....	42
4.12.3. Estabilidade frente a agente desnaturante.....	43
4.13. Cristalização da Leucil aminopeptidase.....	45
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Expressão da proteína.....	47
5.2. Purificação da Proteína.....	48
5.3. Efeito do pH e temperatura na atividade da LAPr-Li.....	50
5.4. Condições de oligomerização da LAPr-Li.....	52
5.5. Análise conformacional da LAPr-Li por fluorescência estática.....	54
5.5.1. Atenuação de fluorescência: ambientes dos triptofanos.....	54
5.6. Estabilidade conformacional da LAPr-Li por Dicroísmo Circular.....	63
5.6.1. Estrutura secundária	63
5.6.2. Dependência térmica.....	64
5.6.3. Parâmetros termodinâmicos.....	67

5.6.4. Desnaturação química.....	75
5.6.5. Renaturação da proteína.....	78
5.7. Cristalização da LAPr-Li.....	79
6. DISCUSSÃO.....	80
6.1. Expressão e purificação da LAPr-Li nativa.....	80
6.2. Caracterização da LAPr-Li nativa (hexâmeros) em diferentes pHs e temperaturas.....	82
6.3. Alterações conformacionais da LAPr-Li monitorada pelo ambiente dos triptofanos	85
6.4. Estabilidade estrutural da LAPr-Li associada à atividade analisadas por DC.....	93
6.5. Cristalização da LAPr-Li.....	97
7. CONCLUSÕES.....	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
9. ANEXOS.....	113

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais e importância do estudo proposto

Neste trabalho apresentamos estudo biofísico e estrutural de uma leucil aminopeptidase (LAP), proteína recombinante expressa em *Escherichia coli* e presente em *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo. Essa proteína é fundamental no ciclo de vida do referido microorganismo e está diretamente relacionada com a patogenicidade dessa bactéria e com a instalação da doença leptospirose em animais e humanos. Esta enzima cliva ligação peptídica entre resíduos de leucina na posição N-terminal, com configuração enantiomérica do tipo levógera. A especificidade foi comprovada por sua atividade enzimática elevada utilizando substrato L-Leu-AMC quando comparada às espécies saprófitas, sendo, portanto, um dos fatores responsáveis pela transmissão da leptospirose (Silva, 2008). O gene dessa proteína, *HapepA*, clonado em vetor de expressão pET-19, apresenta regiões de resistência à ampicilina e uma cauda contendo dez resíduos de histidina - material cedido pelo professor Dr. Jaime M. Santana (Laboratório de Patologia Molecular, UnB) e utilizado nesse trabalho para expressão, purificação e caracterização estrutural da LAP.

A *L. interrogans* aloja-se nos túbulos renais do hospedeiro e é eliminada pela urina. Diferentes sorovares dessa espécie são alojados em diferentes tipos de animais, como a espécie bovina que é preferencialmente acometida pelo sorovar Hardjo. O homem é hospedeiro secundário e acidental, que adquire a doença por contato com a urina de animais infectados. A bactéria dissemina-se por todo o organismo, comprometendo a saúde humana.

A LAP é fundamental para o metabolismo dessa bactéria e, conseqüentemente, para a transmissão e instalação das leptospiras nos hospedeiros e a manifestação da leptospirose. Esse fato reforça a importância do estudo aqui proposto, da proteína participante do metabolismo da espiroqueta causadora de leptospirose. Essa enzima é, portanto, um potencial alvo de quimioterapia para o controle da leptospirose, devido à diferença na produção e no metabolismo entre o microorganismo e o homem, além da distância evolutiva entre os dois organismos. Essa distância pode ser caracterizada pela diferença na seqüência primária, principalmente na região N-terminal, o que caracteriza algumas diferenças nas funções dessa proteína. Como exemplo, recentemente foi relatado o papel de uma LAP de *Plasmodium falciparum* relacionando a sua estrutura e função, especificamente no estudo da ação de substratos distintos e inibidores, direcionado para o uso da enzima contra a malária (Maric *et al.*, 2009). Nesse caso a LAP de *P. falciparum* está envolvida na fase terminal de degradação de hemoglobina, gerando peptídeos e aminoácidos livres essenciais para o desenvolvimento do parasita (Maric *et al.*, 2009). Adicionalmente, a caracterização biofísica estrutural da LAP de *L. interrogans* apresentada neste trabalho é inédita e possibilitará o uso dessa enzima em comparações com outras da mesma família. Esse estudo também é fundamental para estabelecer condições de uso biotecnológico e para utilização da enzima como alvo de drogas, visando, no futuro, o controle ou tratamento da leptospirose. Como perspectiva, planejamos determinar a estrutura tridimensional da molécula a partir de cristais da proteína e utilização da técnica de difração de raios-X. Os ensaios de cristalização já estão em andamento, ainda que não estejam no escopo do presente estudo. A elucidação da estrutura, a partir da identificação de

características exclusivas em comparação com outras enzimas de hospedeiros conhecidos, possibilitará elaborar uma estratégia experimental para a síntese racional de inibidores altamente específicos.

A seguir, estão descritos capítulos relacionados à doença leptospirose, associada ao ciclo de vida do microrganismo *Leptospira* e as características bioquímicas e estruturais das leucil aminopeptidases, objeto de estudo do presente trabalho.

1.2. Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose aguda infecciosa, potencialmente grave, causada por uma espiroqueta, a *Leptospira interrogans* (Bharti *et al*, 2003). É também conhecida como “Enfermidade de Weil”, que foi descrita em 1886, pelo patologista alemão Adolf Weil, e em 1917 no Brasil. Atualmente, a leptospirose é uma doença de distribuição mundial com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais, que favorecem a sua transmissão, acometendo animais e o homem de todas as idades e de ambos os sexos (Martins *et al*, 2006; Vijayachari *et al*, 2008).

Essa doença, cujo espectro pode variar desde um processo assintomático até formas graves, é de importância social e econômica por apresentar elevada incidência em determinadas áreas, custo hospitalar elevado, bem como por sua letalidade, que pode chegar a até 40% nos casos mais graves. Sua ocorrência está relacionada às condições precárias de infra-estrutura sanitária e alta infestação de roedores infectados (Vinetz *et al*, 2001). A precariedade de rede de esgoto e drenagem de águas pluviais, a coleta de lixo inadequada e as consequentes inundações são condições favoráveis à

disseminação e à persistência do agente causal no ambiente propiciando epidemias, atingindo, portanto, principalmente a população de baixo nível sócio-econômico (Yanagihara *et al*, 2007) (Figura 1). A infecção também pode ser adquirida por ingestão de água e alimentos contaminados com urina de ratos ou por meio de contato com urina de animais de estimação (cães, gatos). O risco ocupacional ocorre com pessoas que têm contato com água e locais alagados como limpadores de fossas e bueiros, lavradores de plantações de arroz, trabalhadores de rede de esgoto, militares ou pessoas que entram em contato com animais infectados como veterinários e manipuladores de carne (Monahan *et al*, 2009).



Figura 1. Principais vias de contaminação por leptospiros. Condições precárias de moradia, falta de saneamento básico, falta de cuidados por parte dos grupos de risco (Bharti *et al*, 2003).

A doença acomete roedores, mamíferos silvestres, animais domésticos e de importância econômica como bois, cavalos, porcos, cabras e ovelhas. Todos os animais doentes ou infectados são fontes de infecção. Os animais infectados alojam as leptospiros nos túbulos renais que são eliminadas através da urina

durante meses, anos ou por toda a vida, dependendo da espécie animal e do sorovar envolvido. Os seres humanos são infectados casualmente e não tem importância como transmissores da doença. A transmissão de uma pessoa para outra é pouco provável, podendo ocorrer pelo contato com urina, sangue, secreções e tecidos de pessoas infectadas (Romero *et al*, 2003). Os homens são hospedeiros acidentais e terminais dentro da cadeia de transmissão (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2002).

1.3. Transmissão e sintomas

A infecção humana resulta da exposição direta ou indireta à urina de animais infectados. A leptospira patogênica adentra o organismo via pele e mucosas, por ação da enzima hialuronidase, chegando à corrente sanguínea e disseminando-se por todo o organismo do hospedeiro (Adler *et al*, 2009). A presença de pequenos ferimentos na pele facilita a penetração, que pode ocorrer também através da pele íntegra, quando a exposição é prolongada (Figura 2). A imunidade adquirida pós-infecção é sorovar-específica, podendo um mesmo indivíduo apresentar a doença mais de uma vez, sendo que o agente causal de cada infecção pertencerá a um sorovar diferente do anterior.

Depois que a bactéria atinge o sangue, surgem sintomas semelhantes aos da gripe que duram de 3 a 7 dias (Abuauad *et al*, 2005). Com a disseminação sistêmica da infecção ocorre falência renal, icterícia e hemorragias causando sérios danos à saúde como meningite, pneumonia, pancreatite, nefrite, dentre outros, podendo levar à morte (Nascimento *et al*, 2004). Os primeiros sintomas podem aparecer de 7 a 14 dias após a contaminação.

A leptospirose em humanos apresenta diferentes graus de severidade. Clinicamente, duas formas principais foram descritas, a anictérica e ictérica. Na forma anictérica, o quadro clínico com maior gravidade pode ocorrer de forma bifásica: a fase septicêmica e a fase imune. Inicialmente, a doença parece ser discreta, com manifestações iniciais semelhantes às de outras doenças, como febre amarela, dengue, malária, hantavirose e hepatites. O diagnóstico é feito baseado no histórico de risco habitacional e ocupacional. A diferenciação entre a leptospirose grave é feita por meio de exames laboratoriais. A fase septicêmica inicia-se com febre alta, calafrios, cefaléia intensa, dores musculares e mialgias, principalmente nos músculos das panturrilhas (gastrocnêmio). Podem ser também observados os sintomas: dor torácica, tosse seca ou com expectoração, dispnéia e cianose (manchas na pele de coloração azul e arroxeadas). A hemoptise franca (expectoração de sangue proveniente do trato respiratório) (Junior *et al*, 2004) indica extrema gravidade e pode ocorrer de forma súbita, levando ao óbito por asfixia. Distúrbios neurológicos como confusão, delírio e alucinações podem estar presentes. Esta fase dura de 4 a 7 dias, após a qual o paciente pode curar-se ou evoluir com recrudescimento da febre e sintomas gerais (Dolhnikoff *et al*, 2007).

As manifestações clínicas da fase imune ou fase de leptospirúria, fase caracterizada pela formação crescente de anticorpos, pode ser intermitente e durar de meses a anos. Inicia-se na segunda semana da doença e desaparecem em 1 a 3 semanas. Nesta fase, as manifestações neurológicas frequentemente apresentam um quadro de meningite, com cefaléia intensa e vômitos. Menos frequentemente ocorrem encefalite, paralisias focais, espasticidade, nistagmo (movimentos oculares oscilatórios, rítmicos e repetitivos dos olhos) (Portal da

Oftalmologia), convulsões, distúrbios visuais de origem central, neurite periférica, paralisia de nervos cranianos, radiculite (irritação das raízes dos nervos espinhais) (Xhardez, 1990), síndrome de Guillain-Barré (deterioração dos nervos periféricos) (Ropper, 1992) e mielite. Podem ocorrer acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos ou meníngeos, com quadros graves de hipertensão intracraniana e coma. As manifestações mais comuns do envolvimento cardíaco (miocardite) são alterações eletrocardiográficas e arritmias. Pode ocorrer comprometimento ocular com hiperemia ou hemorragia das conjuntivas e hemorragia intra-ocular (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2002).

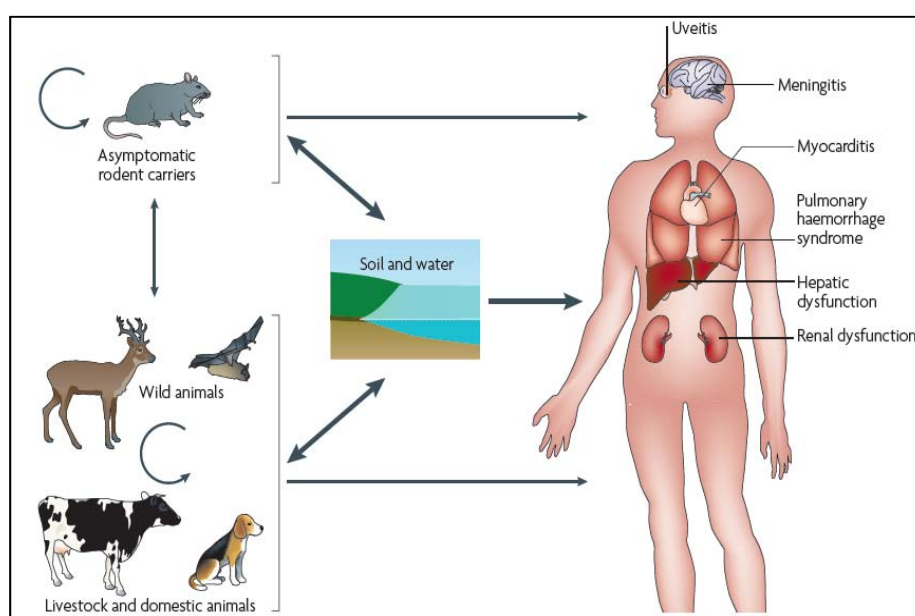


Figura 2. Ciclo de transmissão da leptospirose. Roedores são os principais organismos reservatórios e transmissores doença. Solo, água, animais silvestres e domésticos são contaminados. O homem adquire a doença por contato direto com hospedeiro ou indireto por locais contaminados por urina de animais infectados (Picardeau M. *et al.*, Nature Reviews, 2009).

A forma ictérica, fase de leptospiremia, ocorre por evolução da fase septicêmica com disfunção renal, fenômenos hemorrágicos, alterações hemodinâmicas, cardíacas, pulmonares e de consciência (Spichler *et al*, 2007). A

icterícia, de tonalidade alaranjada bastante intensa, tem início entre o 3º e 7º dia da doença. As hemorragias gastrointestinais e pulmonares são os principais mecanismos implicados com o óbito dos pacientes. A convalescença dura de 1 a 2 meses, período no qual podem persistir a febre, a cefaléia, as mialgias e mal-estar geral por alguns dias. Os níveis de anticorpos detectados pelos testes sorológicos diminuem progressivamente, mas em alguns casos podem permanecer elevados por vários meses (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2002).

1.4. Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico específico é feito pela cultura com amostra de sangue colhida na fase septicêmica, e sorologia com amostra sanguínea colhida a partir do 7º dia de doença. Em relação aos exames inespecíficos, são observadas alterações como leucocitose com neutrofilia, plaquetopenia, elevação das bilirrubinas, transaminases normais ou aumentadas, uréia e creatinina elevadas, potássio sérico normal ou abaixo do normal, creatinocinase (CK) elevada, líquido com pleocitose linfocitária e/ou neutrofílica, fosfatase alcalina elevada, gasometria arterial mostrando acidose metabólica e hipoxemia (Blanco *et al*, 2009). De acordo com o MS, entre 2001 e 2008, foram confirmados 17.447 casos de leptospirose com 1.870 óbitos no Brasil. (<http://www.prodam.sp.gov.br/sms/zoonoses/diagnostico/leptospirose.htm>).

O tratamento é baseado no uso de antibióticos, hidratação e suporte clínico. Não devem ser utilizados medicamentos para dor ou febre que contenham ácido acetilsalicílico (AAS), para evitar o risco de sangramentos, nem antiinflamatórios pelo risco de efeitos colaterais, como hemorragia digestiva e

reações alérgicas. A penicilina G cristalina ou a ampicilina, a tetraciclina, a doxiciclina são os antibióticos mais utilizados (Pappas *et al*, 2006). Para os pacientes alérgicos à penicilina ou que apresentem lesão renal e icterícia, é recomendado o uso do cloranfenicol.

(http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leptospirose_oquefazer.pdf).

No Brasil não existe nenhuma vacina contra a leptospirose para seres humanos, mas sim para cães, bovinos e suínos. As vacinas são bacterinas (cultura morta), não conferindo imunidade permanente. Em animais, a vacina (disponível no Brasil) evita a doença, mas não impede a infecção nem a transmissão da leptospirose para seres humanos.

Para prevenir a leptospirose, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do MS recomenda (Manual de Vigilância Epidemiológica, 1994): evitar o contato com água ou lama de enchentes; uso de equipamentos de proteção individual para indivíduos pertencentes ao grupo de risco; em caso de inundação, lavar os locais que tiveram contato com a água com sabão e água sanitária; jogar fora todo o alimento que teve contato com a água da enchente; armazenar o lixo em recipientes bem fechados e colocá-los na rua para a coleta pública imediata e jamais jogá-lo em córrego, bueiros ou na rua.

1.5. *Leptospira interrogans*: Genoma e patogenicidade

Leptospira é classificado em diferentes genomo-espécies, patogênicas e saprófitas, sendo que nas espécies patogênicas foi observada a presença de enzimas leucil amonopeptidásicas (Brenner *et al*, 1999). As espécies patogênicas de *Leptospira* são de ampla variedade, de acordo com a estrutura e a composição de carboidratos dos lipopolissacarídeos da superfície da membrana

bacteriana (Nascimento *et al*, 2004). As espiroquetas apresentam-se afiladas, em forma de gancho, assemelhando-se a um ponto de interrogação, de onde veio o seu nome *L. interrogans* (Figura 3).

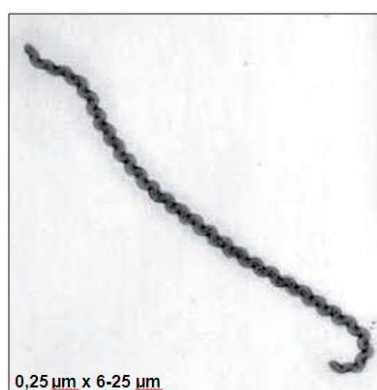


Figura 3. Bactéria espiroqueta de *Leptospira interrogans* (Picardeau *et al*, Genetics and Evolution, 2009).

Existem dezoito genomoespécies de *Leptospira*, sendo oito patogênicos, seis saprofíticos e quatro intermediários, oportunistas. Tais variantes não apresentam especificidade por determinados hospedeiros, mas apresentam certas preferências. O sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* é o mais importante em termos de saúde pública, tendo como hospedeiro preferencial o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*). Já o sorogrupo Pomona tem preferência pelos suínos e o Hardjo, sorovar de estudo, por bovinos (Ren *et al*, 2003).

Leptospira interrogans é uma bactéria espiroqueta gram-negativa, obrigatoriamente aeróbica, pertencente à família *Leptospiraceae* (Brenner *et al*, 1999), encontrada em ambientes úmidos de pH próximo do neutro (6,8-7,4) em temperatura 28°C-30°C (Madigan *et al*, 2005; Trueba *et al*, 2004).

O genoma da *Leptospira* consiste de dois cromossomos circulares, maiores quando comparados com o de outras espiroquetas (Bhart *et al*, 2003).

Apesar do genoma de *L. interrogans* sorovar Hardjo ainda não ter sido totalmente seqüenciado, algumas analogias podem ser feitas comparando com genomas de espécies patogênicas como Lai e Copenhageni.

O mecanismo molecular da patogenicidade de *Leptospiras* ainda não está bem compreendido, porém há evidências de que determinantes de virulência como proteínas de membrana e lipopolissacarídeos são encontrados somente nos microorganismos patogênicos (Palaniappan *et al*, 2007). A patogenicidade das bactérias está relacionada às propriedades genotípicas (Puente *et al*, 2003). O genoma da *L. interrogans* é constituído por diversos genes que codificam proteínas aderentes à membrana do hospedeiro e que degradam a matriz celular facilitando a disseminação da doença, como as proteínas semelhantes às imunoglobulinas (Lig) (Silva *et al*, 2007). Essas proteínas estão expostas à membrana da bactéria e são sintetizadas pelos genes *lig* encontrados somente em *Leptospiras* patogênicas (Koizumi *et al*, 2005; Lin *et al*, 2007). Dentre essas proteínas, estão aquelas que exercem função de adesinas e proteínas ricas em leucina (LLR), com função de ligar a bactéria ao tecido e garantir sua penetrabilidade (Picardeau *et al*, 2008).

Genes que levam à expressão de proteínas importantes para a sobrevivência do microorganismo são conservados entre as espécies patogênicas. Proteínas externas à membrana (OMPs- outer membrane protein) garantem a interação parasito-hospedeiro durante a infecção bacteriana, como a LipL 41 e a LipL 32, lipoproteínas ancoradas pela porção N-terminal (Seixas *et al*, 2007). O tecido epitelial do hospedeiro induz genes que codificam proteínas que facilitam o processo de infecção por *L. interrogans* (Matsunaga *et al*, 2007). A lipoproteína LipL 36 é sintetizada quando a bactéria entra em contato com a superfície do

hospedeiro e neutraliza os anticorpos situados nessa região permitindo a entrada favorável da bactéria (Haake *et al*, 2002). A membrana externa da bactéria contém a proteína transmembrânica OmpL 1 que induz imunoproteção à bactéria contra fagocitose por macrófagos juntamente com a LipL 41, também externa à membrana (Figura 4) (Cullen *et al*, 2003; Gebriel *et al*, 2006).

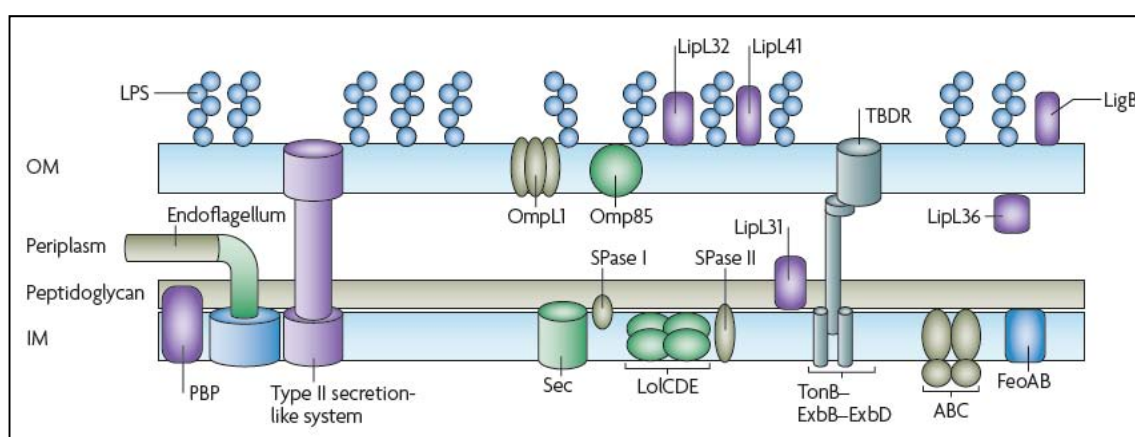


Figura 4. Parede celular de *Leptospiras*. OM: membrana externa (do inglês *outer membrane*) e IM: membrana interna (do inglês *inner membrane*). OM é constituído por lipopolissacarídeos (LPS), proteína L1 porina transmembrânica (OmpL1), e lipoproteínas (LipL32, LipL36, LipL41 e LigB). TBDR é um transportador de citrato, hemina e desferrioxamine sideróforo, dependente do complexo TonB-ExbB-ExbD para transferência de energia para o interior da membrana. A camada interna apresenta um transportador de íons de ferro (FeoAB), proteína ligadora a penicilina (PBP) e a lipoproteína LipL31. O endoflagelo está localizado no periplasma. Outras proteínas são visualizadas, porém ainda não se conhece as suas funções. (Picardeau M. *et al.*, Nature Reviews, 2009).

Exopolissacarídeos, responsáveis pela formação de uma cápsula ou um biofilme, são sintetizados para proteger as bactérias do estresse hídrico e osmótico quando se encontram na água ou no solo ou para auxiliar na persistência da infecção quando estão alojadas nos túbulos renais do hospedeiro (Cullen *et al*, 2002). Apesar do número elevado de proteínas envolvidas na sobrevivência de *L. interrogans* e no processo de infecção causada por essa bactéria, pouco se sabe sobre a ação da LAP nesse organismo. No entanto, foi relatada maior expressão da LAP em espécies patogênicas. Portanto, o interesse de estudar a LAP deve-se às evidências de que essa foi uma das proteínas

diferenciais, encontradas principalmente em *Leptospiras* patogênicas (Silva, 2008).

1.6. Aminopeptidases

Peptidases hidrolisam ligações peptídicas de proteínas e/ou peptídeos. Algumas agem em regiões internas, as endopeptidases e outras a partir das extremidades, as exopeptidases (Taylor, 1993; Gonzáles *et al*, 1996). As exopeptidases são classificadas como carboxipeptidases quando removem aminoácidos do lado C-terminal e aminopeptidases quando removem aminoácidos do lado N-terminal (Smith, 1949).

As aminopeptidases são classificadas de acordo com (1) o número de aminoácidos que clivam; (2) o resíduo que removem de um peptídeo ou proteína; (3) com a localização (citosol ou membrana); (4) com a presença de um íon metálico ou mais e (5) com o pH da atividade máxima (Taylor, 1993). Essas enzimas são conhecidas como metaloproteínas por apresentar íons no sítio ativo, sendo as aminopeptidases com dois íons de zinco e as carboxipeptidases com apenas um íon (Rawlings *et al*, 1998; Lowther *et al*, 2002). O sítio ativo das aminopeptidases está localizado no domínio C-terminal e o sítio de regulação na região N-terminal (Sakiyama *et al*, 2003).

Aminopeptidases citosólicas de diversos microorganismos já foram estudadas estruturalmente como de *Vibrio proteolyticus*, *Aeromonas proteolytica*, *Solanum lycopersicum*, *Pseudomonas syringae*, dentre outros. Essas enzimas pertencem à classe E.C. 3.4.11.X., sendo X a última classificação relacionada ao resíduo de aminoácido a ser clivado, preferencialmente. A ordem de classificação dessas enzimas é assim descrita: EC 3.4.11.1 sendo EC 3 (hidrolases), EC 3.4

(hidrolases de cadeias peptídicas), EC 3.4.11 (aminopeptidases) e EC 3.4.11.1 (leucil aminopeptidases) (Sträter *et al*, 1999). As enzimas classificadas com ação leucil aminopeptidásica (EC 3.4.11.1) e com estrutura tridimensional depositada no PDB- Protein Data Bank foram três: pepA de *E.coli*, bLAP (LAP de lentes de olhos de bovinos) e *Coxiella burnetii* (Sträter *et al*, 1999; Burley *et al*, 1991 e Minasov *et al*, a ser publicado”).

As aminopeptidases apresentam amplo espectro de ação na regulação metabólica por clivar proteínas na forma nativa e oxidada. Elas são responsáveis pela inativação de proteínas não funcionais (Gonzáles *et al*, 1996), desempenhando importantes funções na manutenção, crescimento e defesa celulares (Matsui *et al*, 2006). Além disso, essas enzimas participam do processo de maturação de proteína, hidrólise de peptídeos com ação regulatória, processamento de antígenos, e modulação da expressão de genes (Sato, 2004). As atividades enzimáticas combinadas de ambas as endopeptidases e aminopeptidases, como no caso da leucil aminopeptidase, potenciam a hidrólise de proteínas e peptídeos em aminoácidos livres (Gavigan *et al*, 2001).

1.7. Leucil-aminopeptidases- LAPs

As LAPs clivam ligações peptídicas envolvendo preferencialmente resíduos de leucina localizados na extremidade N-terminal (Stack *et al*, 2007; Grembecka *et al*, 2003). Essas enzimas apresentam amplo espectro de ação e podem hidrolisar ligações peptídicas envolvendo outros aminoácidos, com exceção de prolina e arginina (Jaime *et al*, 2007). São proteínas com ação ótima em pH alcalino e apresentam melhor atividade em temperaturas entre 50°-60°C (Smith *et al*, 1948).

As LAPs são encontradas em organismos procarióticos e eucarióticos e desempenham importantes funções em mecanismos de modificação, ativação e degradação de proteínas e de peptídeos hormonais e não-hormonais (Grembecka *et al*, 2003). Agem na porção N-terminal, sendo essa particularmente a região ativa para tais alterações (Walling, 2006). Essas enzimas apresentam importante papel na localização e também na longevidade das proteínas por remover alguns grupos essenciais para a ação delas (Selvakumar *et al*, 2006).

LAPs pertencem às duas famílias: M1 e M17. Membros dessas famílias apresentam semelhança na estrutura, atividade catalítica e sequência de aminoácidos. A família M1 compreende LAP de animais e plantas e a M17 de animais, plantas e bactérias, como a LAP de *L. interrogans*, objeto de estudo do presente trabalho. Essas proteínas diferem quanto às funções nos processos celulares, biológicos e patofisiológicos (Holz *et al*, 2003). LAPs da família M17 são hexaméricas e apresentam dois cátions divalentes na estrutura; as da família M1 não são hexaméricas e apresentam somente um cátion divalente.

A sequência de aminoácidos na região C-terminal é conservada em todas as LAPs (Gu *et al*, 2002; Sträter *et al*, 1999). Como exemplo, o alinhamento das sequências de LAPs bovina, PepA de *E. coli* e de *Arabidopsis thaliana* demonstra essa similaridade entre resíduos, principalmente da porção C-terminal, onde estão as regiões de ligação de íons metálicos Zn (II) e o sítio ativo das enzimas (Gu *et al*, 1999). As maiores divergências são encontradas na região N-terminal, sendo esta a responsável pelas diferenças estruturais entre LAPs de três organismos distintos: animal, microorganismo e planta e, provavelmente

pelas diferentes funções dessas enzimas, conforme apresentado a seguir (Walling, 2006).

1.7.1. Aminopeptidases pertencentes à família M1

A aminopeptidase encontrada em plantas, como a Arabidopsis AMP1, está ligada à membrana e participa do transporte de auxina, hormônio de crescimento das plantas cujo processo assemelha-se ao da IRAP (do inglês insulin-response aminopeptidase) (Bandyopadhyay et al, 2007). Quatro aminopeptidases dessa família M1 encontradas em animais se destacam: 1. LAP placentar (LAP-P ou IRAP), 2. aminopeptidase sensível a puromicina (PSA), 3. *aminopeptidase insensível à puromicina (PILS) e 4. alanil aminopeptidase ligada à membrana (AAP).* A LAP placentar (aminopeptidase de membrana que responde à insulina), presente nos adipócitos e no músculo esquelético, é co-translocada para a superfície da célula com GLUT-4, proteína de membrana responsável pela recaptação de glicose em resposta à insulina (Nomura *et al*, 2005; Carvalho *et al*, 2004). Essa enzima também age como uma cisteíno aminopeptidase glicosilada (Masayuki *et al*, 2004) que hidroliza a vasopressina durante a gestação de mamíferos. A LAP-P também é uma proteína de membrana presente em vesículas que respondem à ocitocina, hormônio peptídico responsável pelas contrações uterinas e pela ejeção do leite na amamentação. A estimulação pela ocitocina leva à migração das vesículas do citossol para a membrana plasmática (Tsujiimoto *et al*, 2005). A PSA, aminopeptidase sensível a puromicina, análoga ao aminoacil-tRNA, é encontrada em cérebros de animais e degrada encefalina clivando a ligação entre tirosina e ácido glutâmico. A encefalina é um neurotransmissor narcótico penta peptídico

apresentando como último aminoácido uma metionina ou leucina (Constam *et al*, 1995). A aminopeptidase insensível à puromicina, PILS, cliva peptídeos bioativos como angiotensina e degrada peptídeos antigênicos como do vírus HIV, NYTPGPGVRY. A PILS hidrolisa resíduos de leucina seguidos de metionina, cisteína ou fenilalanina (Abe *et al*, 2006). A alanil aminopeptidase ligada à membrana é uma proteína homomérica cuja função é semelhante à da hexamérica da família M17 (Matsui *et al*, 2006).

1.7.2. Aminopeptidases pertencentes à família M17

Em animais, as LAPs funcionam como ubiquitinas, degradando produtos dos processos fisiológicos. Um exemplo disso são as Alanil aminopeptidases (E.C. 3.4.11.2), ativadas por Mn (II) participando do metabolismo da glutatona, um tripeptídeo constituído por resíduos de ácido glutâmico, glicina e cisteína. Essas enzimas clivam a ligação entre os resíduos de glicina e cisteína, impedindo a ação como pro-oxidante (Cappiello *et al*, 2004). É na forma oligomérica que a proteína apresenta atividade e quando os dois sítios dos íons metálicos de cada monômero estão ocupados (Silva, 2008).

LAPs são peptidases encontradas em diversos organismos. Em plantas foram caracterizadas, principalmente, a partir da espécie de tomate *Solanum lycopersicum*. Essas enzimas são expressas durante o desenvolvimento das flores e em resposta a infestações de insetos, infecções por *Pseudomonas syringae* e danos na planta (Pautot *et al*, 2001). Elas podem ser expressas em meio ácido, LAP-A, ou em meio neutro, LAP-N. A função biológica dessas LAPs ainda não é bem compreendida, porém sabe-se que as primeiras apresentam maior especificidade à clivagem de substratos de Asp, Glu, ou Gly e as LAPs-N e

estão envolvidas no processo de preservação celular das plantas (Chao *et al*, 2003).

Yamamoto *et al* (2002) estudou LAP derivada de adipócitos de humanos (A-LAP), por rastreamento de polimorfismos no gene humano e com base em bancos de dados, mostrou o polimorfismo Lys528Arg no gene associado à hipertensão. A substituição de Lys528 por vários resíduos de aminoácidos, incluindo a arginina, aminoácido semelhante, causou diminuição significativa na atividade enzimática. Isso sugere que a lisina é essencial para a ação enzimática da A-LAP. Essa enzima participa da regulação da pressão arterial clivando e inativando a angiotensina II e convertendo calidina em bradicinina, hormônio hipotensor (Goto *et al*, 2006).

Em *Plasmodium falciparum* (PfLAP) apresenta atividade reduzida quando o sítio 1 encontra-se sem o íon zinco (Maric *et al*, 2009). Em contraste, LAP isolada de rins de suínos (pKLAP) apresenta atividade somente quando o sítio 2 está fortemente ligado ao íon zinco e o sítio 1 desocupado (Wart *et al*, 1981).

Em bactérias, aminopeptidases A, PepA, isoladas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, são proteínas ligadas ao DNA que facilitam seu dobramento. Outra função atribuída a essa LAP é a de repressor transcricional do operon carAB que codifica a carbamoil fosfato sintase, primeira enzima envolvida na síntese de pirimidina. PepA se liga a dois motivos do DNA, anteriores ao promotor P1 do operon carAB, formando um complexo multiprotéico. Esse complexo é responsável pela repressão da transcrição da enzima para sintetizar a pirimidina. A PepA é uma exceção das aminopeptidases que apresenta manganês na estrutura e é inibida por zinco (Camacho *et al*, 2007).

A leucil aminopeptidase encontrada na bactéria *L. interrogans* sorovar Hardjo, LAPr-Li, objeto de estudo do presente trabalho, foi bioquimicamente caracterizada como uma peptidase com atividade predominante em meio alcalino. A LAPr-Li é inibida por EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético (Silva, 2008) que se complexa de forma estável com os íons metálicos presentes no sítio ativo da enzima. Quando pré-incubada com íons metálicos como cobalto, manganês e magnésio, não apresenta retorno da atividade. Ao contrário de outras LAPs estudadas como LAP derivada de lentes bovinas (bLAP), de rins de suínos (pLAP) e de *Plasmodium falciparum* (PfLAP) (Maric *et al* 2009).

1.7.3. Estrutura e Mecanismo de ação

A estrutura primária das LAPs é formada por aproximadamente 485 a 510 aminoácidos e dois íons de zinco. A sequência abaixo descrita apresenta os aminoácidos que formam o monômero da LAP de *L. interrogans* sorovar Lai. As LAPs pertencentes à família M17 são semelhantes quanto à estrutura primária.

Tabela I. Sequência primária de LAP de *L. interrogans* sorovar Lai. NCBI.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=leucyl%20aminopeptidase%20LAI>)

MKLDKNIQISIGKNPSKTFYKLQLLLKDHFPENLKTkFSFQTASGIFTGENGQIFTDEVEKIIYLGL
GETSKIKIRGVAQHFFQFGEKLLKWEVGLIHLPKVLTNSLSADLVVYQIVNSLEQGVYAINVLA
KEYKENSCKIGNVSFILQDAAKLKEAEKGLKRGKIVSR YINGVRHIAHL PANHFTPEEFVSRKEIA
KDNLKITVFDEPQLKKEKMGGILSVCEGSDKKAKMILLEYTPVKPITKKKLAIIIGKGLTFDSGGISI
KPAQDMHEMKYDMCGAATAIHAIGAIAELGLGVPVIAAIGVAENMPDAAAIKPGDVYTAYNGITVE
VQNTDAEGRVLVLDVLSYVGKKFKPDYMLDLATLTGAIISLGHEAAGVMSNSDVLTNLLKEASIS
SDERIWEMPLWEEYSEDLKSDIADIRNVAGRAGGSLSAKFLERFVEPGIAWAHIDIAGTAWRKK
TSGTQINGPTGYGVRLLDLVEKIGKKK

O alinhamento múltiplo das LAPs pertencentes à família M17, incluindo a sequência da LAPr-Li, objeto de estudo do presente trabalho, está apresentada na figura 5. As sequências utilizadas nesse alinhamento foram: LAP de *L.*

interrogans sorovar Hardjo, de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis, de *L. biflexia* sorovar Patoc, de *E. coli* e de bovinos *Bos taurus*. O domínio C-terminal, onde se encontra o sítio catalítico das enzimas, apresenta maior similaridade, enquanto que as maiores diferenças foram encontradas no domínio N-terminal. Resultados semelhantes foram encontrados para alinhamentos de outras LAPs de outros organismos, como o caso de LAP de humanos, de *Schizosaccharomyces pombe* (YspII), de ratos, dentre outras (Camacho *et al*, 2007; Kim *et al*, 1994 e Sträter *et al*, 1999). Os resíduos que participam da catálise, Lys270 e Arg344, são idênticos em todas as estruturas apresentadas na figura 5, bem como aqueles envolvidos na coordenação dos íons zinco envolvidos no processo catalítico, Lys258, Asp263, Asp281, Asp340 e Glu342. O bolso hidrofóbico que define a especificidade ao substrato das LAPs analisadas é também altamente conservado, formado pelos resíduos, Met278, Asn338, Ala341, Thr369, Leu370, Gly372, Ala459, Ala486, sendo que este último, na sequência de *Bos taurus* é uma metionina. O domínio N-terminal é formado até o resíduo Tyr195 e o domínio catalítico C-terminal estende-se a partir de resíduos Ile196-Lys495, no caso LAPr-Li. A alça que conecta esses domínios abrange os resíduos Glu161-Ile180, no caso da LAPr-Li (Figura 5).

A estrutura tridimensional das três LAPs pertencentes à família M17 é organizada em dois domínios globulares (Camacho *et al*, 2007) que formam o monômero. As leucil aminopeptidases bacterianas apresentam domínios constituídos, em sua maioria, por α -hélices (Lin *et al*, 2004). As informações estruturais dessas enzimas presentes em microorganismos são baseadas na caracterização estrutural de *E. coli* e *Coxiella burnetii* depositas no PDB (Protein Data Bank) (Sträter *et al*, 1999 e Minasov *et al*, a ser publicado”).

O domínio N-terminal da LAP de lentes de bovinos (*b/LAP*) (Figura 6) é formado por 150 resíduos de aminoácidos organizados em quatro α -hélices que envolvem cinco fitas- β , quatro paralelas e uma antiparalela. Uma longa alça é formado pelos resíduos 151 a 170. Esses resíduos projetam da α -hélice do lado N-terminal e conectam-se às fitas- β do lado C-terminal. Essa alça faz a integração dos domínios N e C-terminal da estrutura (Burley *et al*, 1990) e não participa da atividade catalítica da proteína.

O domínio C-terminal (Figura 6) apresenta um núcleo hidrofóbico composto por oito fitas- β envolvidas por um grupo de α -hélices. Mais afastado desse núcleo estão três fitas- β localizadas na superfície do domínio. Essa região participa de interações com os demais monômeros para formar as estruturas oligoméricas (Burley *et al*, 1990).

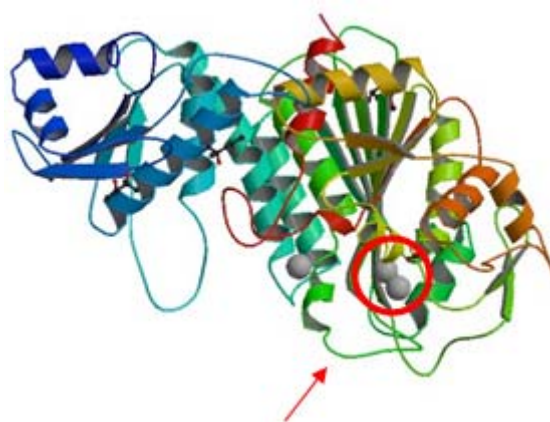


Figura 6. Estrutura do monômero de *b/LAP* A região em azul corresponde ao domínio N-terminal, sendo conectada ao C-terminal por uma alça indicada por uma seta vermelha, a alça sai de uma α -hélice da região N-terminal para uma fita- β na porção C-terminal. O círculo vermelho mostra os dois íons de zinco presentes na estrutura do monômero necessários para a catálise (Burley *et al*, 1990).

O mecanismo de catálise das LAPs ainda não está completamente esclarecido. No entanto as características estruturais de membros da família M17 permitiu a descrição das principais etapas envolvidas no processo de catálise. Cada monômero (54 kDa) apresenta, no lado C-terminal, um sítio ativo com dois íons metálicos co-catalíticos. Esses íons ocupam dois sítios distintos no sítio ativo que se diferem quanto à afinidade aos cátions presentes em solução (Burley *et al*, 1991). No caso da LAP bovina, o zinco presente no sítio 1 apresenta menor afinidade pela enzima e pode interagir com cátions divalentes, enquanto o zinco situado no sítio 2 apresenta maior afinidade, além de conferir estabilidade à estrutura dessa enzima (Kim *et al*, 1993). O zinco localizado no sítio 1 é coordenado pelo átomo de oxigênio da carboxila dos aminoácidos Asp273 e Glu334 e pelo grupamento N da Lys250; o do sítio 2, é coordenado pelos oxigênios das carboxilas dos aminoácidos Asp225, Asp332 e Glu334 (Figura 6) (Burley *et al*, 1991).

O sítio ativo (Figura 7) situa-se entre a extremidade de dois canais de água. O canal maior é a região de ligação do substrato e na extremidade desse canal há um resíduo de Lys262 que participa diretamente do processo de hidrólise e na estabilização da interação da proteína com inibidores por ligação de hidrogênio (Erhardt *et al*, 2005).

Figura 7. Estrutura do sítio ativo de LAP bovina. Íon zinco superior coordenado por Asp273, Glu334 e Lys250 e o inferior por Asp225, Asp332 e Glu334 (Kim *et al*, 1993 e Burley *et al* 1991). Os canais de água envolvidos no sítio ativo estão representados permeando os resíduos Lys250, Asp255 e Lys262 (Erhardt *et al*, 2005).

A coordenação dos íons de zinco varia de acordo com os organismos. A figura 7 representa o sítio ativo da LAP bovina. Em *E. coli*, o Zn(1) é coordenado por Asp275, Glu354 e Asp352 e o Zn(2) por Asp275, Glu354, Asp293 e Lys270. Em LAPs do tomate *Solanum lycopersicum*, o Zn(1) é coordenado por Asp347, Glu429 e Asp(x) e o Zn(2) por Asp347, Glu429, Asp(x) e Lys(x) (Tabela II) (Matsui *et al*, 2006). As informações contidas na tabela II foram baseadas nos dados das duas estruturas cristalográficas da LAP de *E. coli* e bovina.

Tabela II. Aminoácidos que coordenam os íons de zinco das LAPs de diferentes organismos.

<u>Ion</u>	LAP bovina	LAP <u><i>E.coli</i></u>	LAP tomate
Zn (1)	Asp255	Asp275	Asp347
	Asp332	Asp352	Asp(x)
	Glu334	Glu354	Glu429
Zn (2)	Asp255	Asp275	Asp347
	Asp273	Asp293	Asp(x)
	Glu334	Glu354	Glu429
	Lys262	Lys270	Lys(x)

O sítio ativo das LAPs de *E. coli* e de bovino localiza-se no interior da molécula em uma cavidade formada pela associação dos monômeros para formação dos hexâmeros (320 KDa) (Burley, 1990; Sträter *et al*, 1999 e Minasov *et al*, a ser publicado). Os monômeros associam-se em dímeros de trímeros compondo o oligômero (Figura 8).

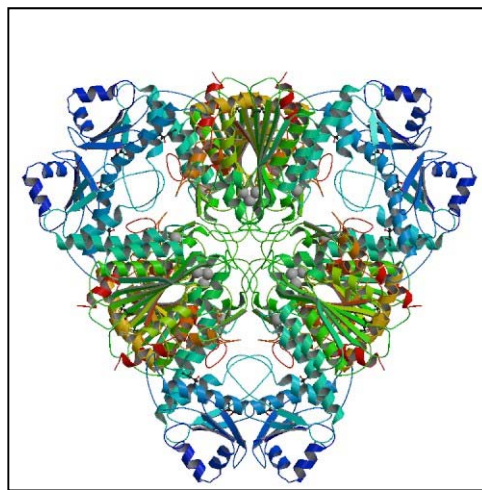


Figura 8. Estrutura hexamérica, nativa, da LAP bovina (Burley *et al*, 1990).

É na forma oligomérica que a proteína apresenta atividade e quando os dois sítios dos íons metálicos de cada monômero estão ocupados (Silva, 2008). LAP de *Plasmodium falciparum* (PfLAP) apresenta atividade reduzida quando o sítio 1 se encontra desocupado (Maric *et al*, 2009). Em contraste, LAPs isoladas de rins de suínos (pKLAP) apresentam atividade somente quando o sítio 2 está fortemente ligado ao íon zinco e o sítio 1 desocupado (Wart *et al*, 1981).

2. JUSTIFICATIVA

A proteína leucil aminopeptidase (LAP), objeto de estudo do presente trabalho, é uma enzima fundamental no ciclo de vida de *L. interrogans* e está diretamente relacionada com a patogenicidade desse microorganismo causador da doença leptospirose em animais e humanos. O homem é hospedeiro secundário e acidental, que adquire a doença por contato com a urina de animais infectados. A *Leptospira* patogênica é capaz de disseminar-se por todo o organismo gerando sintomas semelhantes aos da gripe, e podem desencadear sérios danos à saúde em indivíduos que entraram em contato direto ou indireto com a urina de animais infectados (Nascimento *et al*, 2004). Entre 2001 e 2008, foram confirmados 17.447 casos de leptospirose com 1.870 óbitos no Brasil (Ministério da Saúde, 2008). A *L. interrogans* é representada por sorovares patogênicos que sintetizam a enzima LAP com atividade diferente quando comparada a sorovares não-patogênicos (Silva, 2008). O sorovar Hardjo, cujo principal táxon é a espécie bovina, é patogênico sendo de alta importância médica e biológica.

Essas proteases (LAPs) sintetizadas por esses microorganismos estão envolvidas na fisiologia e patogênese de muitos microorganismos patogênicos, como espiroquetas incluindo a *L. interrogans* (Picardeau *et al*, 2009; Lowther *et al*, 2002), *Plasmodium* e *Tripanossomatídeos* (Gavigan *et al*, 2001), bem como em interações hospedeiro-patógeno, desempenhando importantes papéis no ciclo de vida desses microorganismos. Essas funções são, principalmente, facilitar a infecção local e a disseminação no tecido do hospedeiro, degradar proteínas extracelulares, gerar fatores envolvidos na entrada do parasita nas células do hospedeiro, fornecer nutrientes ao microorganismo a partir de

degradação de proteínas, dentre outras. A expressão de PfLAP (*Plasmodium falciparum*) no citosol do parasita é maior durante o estágio final do ciclo da doença malária. Endopeptidases iniciam a digestão da hemoglobina do hospedeiro e os peptídeos resultantes da degradação são transportados para o citosol do parasita. As LAPs são responsáveis pelo processo de hidrólise final, fornecendo assim nutrientes para o *Plasmodium* (Maric *et al*, 2009). A expressão de genes que codificam proteínas ricas em leucina, LRR, foi encontrada em processos de adesão e invasão de *L.interrogans* a hospedeiros (Ikegami *et al*, 2004). A LAP pode estar relacionada à quebra desses aminoácidos para fornecer como nutrientes à espiroqueta ou até mesmo participar da regulação de expressão desse gene (Picardeau *et al*, 2008).

As LAPs bacterianas apresentam diversidades funcionais. São consideradas enzimas de alta relevância para produção de medicamentos, agroquímicos e alimentos. Algumas LAPs bacterianas participam do processo de conversão de L-homofenilalanil amida em L-homofenilalanina, que apresenta ação inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA), utilizada na produção de enalapril e benzapril, medicamentos que combatem hipertensão (Arima *et al*, 2005).

As LAPs apresentam atividade catalítica somente na sua forma hexamérica (Burley, 1990). Nessa forma oligomérica apenas um dos monômeros associados apresenta o sítio ativo funcional. Os estudos aqui propostos sobre associação estrutural da LAP de *L. interrogans* são de fundamental importância para o entendimento da relação estrutura e função dessa proteína de acordo com seu estado oligomérico.

Somente três estruturas tridimensionais de LAP resolvidas são encontradas no banco de dados PDB (Sträter *et al*, 1999; Burley *et al*, 1991 e Minasov *et al*, a ser publicado”) e os aminoácidos identificados no sítio ativo da proteína variam de acordo com o organismo estudado; animal, vegetal e microorganismos (Burley *et al*, 1991). Essa diferença mostra a importância dos resíduos de aminoácidos na ligação específica de íons metálicos associados à atividade catalítica, à especificidade ao substrato e à ligação de inibidores.

Considerando essas diferenças, a relação da LAP com a saúde humana e a necessidade de aplicações biotecnológicas no controle da leptospirose, a compreensão da organização e estabilidade estrutural dessa enzima poderá auxiliar em futuras intervenções na patogenicidade da bactéria, relacionada diretamente com a atividade dessa enzima. Nesse sentido, essa enzima pode ser caracterizada, portanto, como um potencial alvo de quimioterapia para a leptospirose, devido à diferença na produção e no metabolismo entre o microorganismo e o homem, além da distância evolutiva entre os dois organismos.

Além disso, a caracterização biofísica estrutural da LAP apresentada neste trabalho é inédita e possibilitará usar essa enzima em comparações com outras da mesma família e com seus mutantes, que possam ser obtidos, futuramente, visando a aplicações tecnológicas. Esse estudo também é fundamental para estabelecer condições de uso tecnológico e para utilização da enzima como alvo de drogas, visando ao controle ou tratamento da leptospirose. Como perspectiva, planejamos determinar a estrutura tridimensional da molécula a partir de cristais da proteína e utilização da técnica de difração de raios-X. Os ensaios de cristalização já estão em andamento, ainda que não estejam no

escopo do presente estudo. A elucidação da estrutura, a partir da identificação de características exclusivas em comparação com outras enzimas de hospedeiros conhecidos, possibilitará a síntese racional de inibidores altamente específicos.

O presente trabalho é relevante por constituir estudo de uma proteína importante do ciclo de vida da bactéria, uma leucil aminopeptidase, uma das enzimas responsáveis pela transmissão de uma doença de interesse nacional, a leptospirose. A compreensão da estrutura e da ação de enzimas responsáveis pela patogenicidade de *L. interrogans*, como a LAP, poderá contribuir, no futuro, para o controle epidemiológico, produção de vacinas e tratamento da leptospirose, a partir do desenho racional de inibidores da LAP, garantindo dessa forma saúde pública nacional.

3.1. GERAL

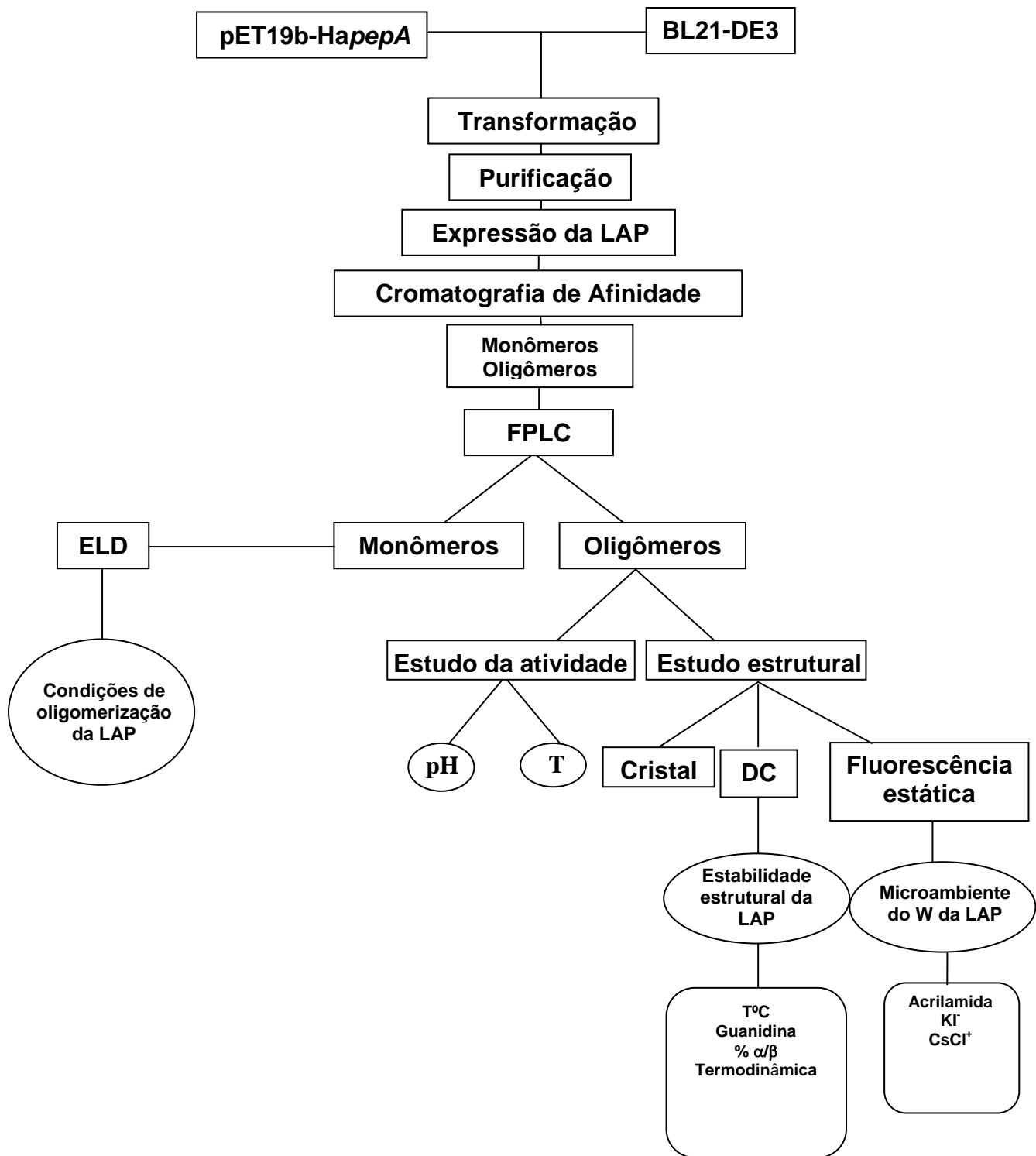
Caracterizar físico-química e estruturalmente a proteína recombinante leucil-aminopeptidase da bactéria *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo expressa em *E. coli* BL21-DE3.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Expressar o gene que codifica essa proteína;
- 2) Purificar a proteína recombinante na forma monomérica e oligomérica (forma ativa);
- 3) Analisar as condições de formação dos oligômeros por espalhamento de luz dinâmico;
- 4) Caracterizar o ambiente molecular dos resíduos de triptofano por fluorescência estática;
- 5) Determinar o conteúdo de estruturas secundárias por dicroísmo circular;
- 6) Estimar a estabilidade da proteína sobre condições de pH e temperatura por fluorescência e dicroísmo circular;
- 7) Analisar o processo de desnaturação e de renaturação da proteína após a adição e a diluição de agente desnaturante por dicroísmo circular;
- 8) Calcular os parâmetros termodinâmicos da LAP;
- 9) Cristalizar e coletar os dados cristalográficos da LAP.

Organograma: Estratégia experimental

Estratégias experimentais



4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos na área de biofísica molecular estrutural, descritos neste trabalho, foram realizados utilizando a proteína recombinante leucil-aminopeptidase de *Leptospira interrogans* expressa em *E. coli*. A construção dos plasmídeos e clonagem do gene foram realizadas previamente por Silva, 2008. O mapa do vetor pET-19b (Novagen) contendo uma sequência N-terminal His•Tag® está apresentado em anexo.

4.1. Transformação das bactérias

O processo de transformação foi feito de acordo com o protocolo pré-estabelecido por Silva, 2008.

4.2. Expressão da proteína

As colônias positivas e mais isoladas foram cultivadas em 5 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 mg/mL a 37°C por 12 horas sob agitação. Após este período, a solução foi aliquoteada e armazenada em soluções de glicerol 15% em volume a - 80°C, consistindo do estoque de clones (1 mL) para serem utilizados nas etapas seguintes de expressão.

As condições ótimas para a expressão da proteína foram aquelas determinadas por Silva, 2008. O estoque de bactérias foi crescido em 100 mL de meio LB líquido autoclavado, a 37°C por 4 horas e a proteína foi expressa com IPTG 0,3 mM (β -D-1-tiogalactopiranosidase de isopropila) a 20°C por 12 horas. Culturas-controle crescidas a 37°C também foram submetidas à agitação por 12 horas a 20°C, sem adição de IPTG, e analisadas em gel SDS-PAGE 8%.

Após a indução, a solução foi centrifugada a 16000g por 10 minutos na *2K15 Sigma Laborzentrifugen*; a parte solúvel foi desprezada e a insolúvel foi armazenada a - 4°C até o momento da purificação. O precipitado contém parte da cultura de células expressando a proteína, de acordo com experimentos realizados previamente por Silva, 2008. A expressão da proteína foi monitorada em gel SDS-PAGE 8%, após a etapa de extração por sonicação.

4.3. Extração da proteína

O conteúdo precipitado resultante da indução foi descongelado e solubilizado em 15 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM) e sonicado à amplitude 40 (10 watts de potência) por 3 minutos com pulsos de 7 segundos, por 3 ciclos, por um processador Ultra-sônico Vibra-Cell VC130 (Sonics). A cada ciclo, foi dado um intervalo de 1 minuto para evitar o aquecimento da solução. A solução sonicada foi centrifugada utilizando *2K15 Sigma Laborzentrifugen* a 16000g por 10 minutos. A parte insolúvel da solução foi dissolvida em reagente de lise BugBuster para análise em gel. O extrato bruto (solúvel) foi adicionado à coluna de níquel com afinidade à histidina, após a ativação da resina His•Resin & Buffer Kit da Novagen (lote N22342). Uma alíquota do extrato solúvel foi retirada para análise em gel de poliacrilamida.

4.4. Análise da expressão da proteína em gel de poliacrilamida

O monitoramento da expressão e da purificação da proteína foi realizado em géis de poliacrilamida 8%, em condições desnaturantes, utilizando um sistema de eletroforese vertical *miniprotean 3* Bio-Rad, com voltagem aplicada a 90 V no gel concentrador e 150 V no gel separador.

Em cada poço foram adicionados 15 μ L de cada fração com 5 μ L de tampão de amostra contendo SDS 0,1% (dodecilsulfato de sódio) e β -mercaptoetanol 50 mM e tampão de corrida Tris-glicina com SDS 0,5%. A visualização das bandas nos géis foi feita a partir do gel corado com azul de Comassie.

4.5. Ativação da coluna para purificação

Nos procedimentos dos itens 4.5 e 4.6, foi utilizado o Protocolo His•Bind® Kits (Novagen), em anexo, seguido de algumas modificações descritas a seguir. A resina em estoque foi adicionada à coluna com capacidade de 10 mL e lavada com 5 mL de água milli-Q para retirar o etanol, restando 500 μ L de resina sedimentada. Foram aplicados 2,5 mL (5 volumes) de NiSO₄ 400 mM à resina para carregá-la e depois 6 mL (3 volumes) de tampão de ligação (Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM) para lavagem. Somente após este procedimento o extrato solúvel contendo a proteína LAP foi submetido à cromatografia de afinidade.

4.6. Purificação da proteína

A proteína contendo uma cauda de 10 resíduos de histidina liga-se ao níquel ao passar pela resina ativada em um fluxo de 8 mL.h⁻¹. Após a passagem dos 15 mL do extrato solúvel à resina, a coluna foi lavada com 5 mL (10 volumes) de tampão de ligação e 15 mL (6 volumes) de tampão de lavagem (Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 100 mM). Na lavagem, foi preciso cuidado para evitar a ressuspensão da resina. A proteína foi eluída da resina por 3 mL (6 volumes) de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol

400 mM). Alíquotas de todas as etapas da purificação foram coletadas para análise em gel de poliacrilamida 8%. A resina foi armazenada em 1,5 mL (3 volumes) de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, EDTA 400 mM, para ser reutilizada em novas purificações.

4.7. Separação de formas oligoméricas

O conteúdo de 3 mL eluído da coluna de afinidade, conforme descrito no item anterior, foi concentrado para 500 µL e aplicado em um *looping* de 500 µL no sistema de cromatografia líquida e rápida de proteínas (FPLC), acoplado à coluna de exclusão molecular, Superdex G-200 (Sigma). A coluna foi previamente equilibrada com tampão de atividade filtrado e deaerado e o fluxo foi ajustado para 0,4 mL.min⁻¹. Das 104 frações coletadas pelo sistema Pharmacia LKB SuperFrac, foram retirados 100 µL de cada para uma placa de 96 poços.

4.8. Ensaio de atividade enzimática

As formas monoméricas e oligoméricas foram identificadas a partir da atividade enzimática da proteína utilizando um substrato fluorogênico. As leituras de fluorescência foram feitas no espectrofotômetro *Spectramax M2^o* (Molecular Devices).

Após a leitura inicial da absorbância em 280 nm, a cada 100 µL de cada fração foi adicionado o substrato L-AMC 20 mM (leucil- 7- amino- 4 metilcoumarina). Essas amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos e a reação enzimática foi interrompida com adição de 200 µL de etanol 100%. Para a leitura da atividade enzimática, as frações foram excitadas a 380 nm e os espectros lidos a 440 nm, comprimento de onda de emissão do

fluoróforo AMC após a clivagem do resíduo de leucil pela enzima. As amostras foram analisadas em triplicatas.

4.9. Influência do pH e da temperatura

Para análise do efeito do pH, amostras da LAP nativa (10 µL) foram diluídas em 100 µL nos tampões acetato de sódio, faixa de pH 3,0 a 6,0 e Tris-HCl de pH 7,0 a 9,0 e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado a cada alíquota o substrato L-AMC 20 mM e as soluções foram incubadas por mais 1 hora a 25°C. As alíquotas foram transferidas para uma placa de 96 poços, a reação foi interrompida com 200 µL de etanol 100% e a atividade enzimática foi determinada a partir da leitura da absorbância a 440 nm no espectrofotômetro *Spectramax M2^e* (Molecular Devices).

Para análise da temperatura ótima da enzima, 10 µL da LAP nativa foram diluídos em 100 µL de tampão de atividade, aquecidas por 30 minutos em um termociclador, variando a temperatura de 25 a 70°C. Em seguida, foi adicionado L-AMC 20 mM em cada alíquota e incubadas por 1 hora. A reação enzimática foi interrompida com 200 µL de etanol 100% e as leituras da emissão de fluorescência do substrato hidrolisado foram feitas a 440 nm.

4.10. Espalhamento Dinâmico de Luz- EDL

Esses ensaios foram realizados para analisar a tendência da proteína em formar estruturas oligoméricas e agregados, em diferentes condições de temperatura e pH. Os experimentos foram realizados no equipamento DynaPro modelo LSR, um detector de espalhamento de luz do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os dados hidrodinâmicos foram analisados utilizando o

“software” Dynamics V6. O comprimento de onda da luz utilizado foi de 800 nm, e a forma molecular da proteína selecionada foi a globular. Os valores considerados foram aqueles obtidos da media de 100 aquisições para cada medida. A temperatura interna foi controlada por um sistema Peltier acoplado ao detector. O programa Dynamics V6 apresenta uma opção “Optimization Calculator” que calcula a concentração ideal a ser utilizada no experimento, de acordo com a massa molecular da proteína a ser estudada e para evitar a formação de agregados, sendo a concentração registrada pelo programa de 14 μM para a LAP.

Amostras da LAP na forma monomérica na concentração de 14 μM , em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5 foram centrifugadas a 5000g a 4°C, filtradas (0,22 μm) e adicionadas à cubeta (80 μL) previamente lavada com detergente Hermax® e metanol e secada com ar comprimido. Os dados foram obtidos e analisados quanto a oligomerização da proteína, variando a temperatura de 25 a 60°C, a partir da relação entre o sinal da intensidade da luz espalhada e a massa da amostra em solução.

O sinal da intensidade da luz espalhada é dado pela seguinte equação, onde τ é o decaimento do tempo:

$$G(\tau) = \int_0^{\infty} I(t) \cdot I(t + \tau) dt$$

Os dados da curva de correlação foram filtrados a partir do valor da linha de base que deve ser 1.000. Isto indica que ocorre difusão suficientemente rápida durante a aquisição tal que a correlação da localização da partícula não está distante da posição inicial. A soma da diferença dos quadrados (SOS) entre a curva de correlação e o melhor ajuste à curva foi calculado usando o método de

análise “cumulants” (Bohm *et al*, 1992). A origem do desvio de SOS deve-se a ruídos, amostras multi-modais, contaminantes, de ampla polidispersividade, etc. Para evitar o ajuste indevido da curva, os dados do SOS devem ser por volta de 500-1000.

Em ELS, o raio hidrodinâmico (R_H) de uma partícula é calculado a partir do coeficiente de difusão (D) via equação de Stokes-Einstein, onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e $f = 6\pi\eta R$ é o coeficiente friccional para uma esfera compacta em meio viscoso.

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Para essas medidas, considera-se que o raio hidrodinâmico de uma hipotética esfera difunde-se com a mesma velocidade da partícula analisada. Este dado é uma aproximação e o raio calculado a partir das propriedades hidrodinâmicas das partículas é um indicativo do tamanho da partícula hidratada.

4.11. Análises estruturais por fluorescência estática

As alterações conformacionais do hexâmero da LAP foram monitoradas no fluorímetro JASCO FP-6500, acoplado a um sistema Peltier JASCO ETC-273T com circulação de água. Os parâmetros para a leitura foram ajustados para excitação a 295 nm, comprimento de onda necessário para excitar o triptofano para um nível de maior energia, emissão em 300 nm, com os “slits” de excitação e emissão ajustados para 5,0 nm cada um.

Os dados foram considerados a partir da média de três medidas de fluorescência obtidas e processadas pelo programa “Spectra Manager”. A velocidade de coleta dos dados foi de 200 nm.min⁻¹. Os dados de emissão de

fluorescência atenuada foram ajustados de acordo com a equação clássica de Stern-Volmer, descrita abaixo:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}v[Q]$$

F e F_0 são intensidades de fluorescência na presença e ausência do atenuador, respectivamente; K_{SV} é a constante de Stern-Volmer e Q é a concentração do atenuador.

As constantes estática e dinâmica resultantes da atenuação por acrilamida foram calculadas a partir da equação modificada de Stern-Volmer, por método iterativo de χ^2 não-linear (Levenberg-Marquardt), descrito abaixo. Os programas utilizados para tratar os dados foram o Spectra Manager (JASCO) e o OriginPro 8.0.

$$\frac{F}{F_0} = \sum_i \frac{f_i}{(1 + K_i[Q])e^{V_i[Q]}}$$

Na equação acima, F e F_0 são intensidades de fluorescência na presença e ausência do atenuador, respectivamente; f_i é a intensidade fracional do componente i ; k_i é a constante de atenuação dinâmica e V_i é a constante de atenuação estática. Os parâmetros foram ajustados de acordo com a seguinte relação:

$$\sum_{i=0}^n f_i = 1 \quad 0 \leq f_i \leq 1 \quad k_i \geq 0 \quad V_i \geq 0$$

Os ensaios fluorimétricos foram feitos com amostras a 1,03 μM para se ter uma absorbância ($\lambda_{280\text{nm}}$) igual ou menor a 0,1, ideal para esse tipo de análise (Lakowicz, 1999), e considerando o valor do ε (coeficiente de absorvidade) de 48485 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A solução de hexâmeros foi preparada para um volume final de 500 μL em uma cubeta de quartzo, titulada com atenuador de fluorescência e submetida à análise espectral. Os atenuadores utilizados foram a acrilamida, neutro, cuja concentração não pôde ultrapassar o seu coeficiente de absorbância ($\varepsilon = 0,23 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), para evitar a absorção de fluorescência a 295 nm por esta; cloreto de cézio, carregado positivamente; e o iodeto de potássio, carregado negativamente. A concentração variou de 0,1 a 0,2 M. Ao iodeto foi adicionado tiosulfato de sódio para evitar a formação de triodeto (I_3^-). O I_3^- absorve fluorescência na região do comprimento de onda do triptofano (Ventura *et al*, 1976). As medidas de atenuação para iodeto foram realizadas com pH 8,5, variando a força iônica (0,2, 0,5 e 1,0). A concentração do sal utilizada para fixar a força iônica foi calculada a partir da equação abaixo, sendo c a concentração analítica expressa em molaridade e z a carga do íon (<http://www.lce.esalq.usp.br/arquimedes/Atividade02.pdf>).

$$\mu = \frac{1}{2} (c_1 z_1^2 + c_2 z_2^2 + c_n z_n^2) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N c_i z_i^2$$

4.12. Análises estruturais por Dicroísmo Circular (CD)

As análises da LAP por dicroísmo circular em diferentes condições foram realizadas no espectropolarímetro Jasco 816 com entrada para nitrogênio

gasoso e acoplado a um sistema Peltier para controle da temperatura. O nitrogênio gasoso chega ao equipamento a 25°C, após passar por uma serpentina em banho de água destilada. O nitrogênio substitui o oxigênio do interior do aparelho para evitar danos no sistema óptico devido à formação de ozônio que ocorre quando há oxigênio na presença de comprimentos de onda entre 260-190 nm.

Os dados foram coletados a partir da média de três medidas do sinal em intervalos de 0,5 s para 30 s e processadas pelo programa "Spectra Manager". A velocidade de coleta dos dados foi de 100 nm.min⁻¹. Os programas utilizados para o registro e tratamento dos dados foram o Spectra Manager (JASCO) e o OriginPro 8.0.

A concentração das amostras estudadas foi padronizada para 0,064mg.mL⁻¹. As leituras feitas em concentrações maiores ocasionam um aumento proibitivo da voltagem, que deve ser menor que 700 V, para não danificar as lentes do equipamento. A análise foi feita em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm. Os dados registrados pelo programa Spectra Manager foram convertidos de miligraus para elipticidade residual molar usando a seguinte equação:

$$\theta = \frac{112 * \alpha}{C * \ell}$$

Onde, α é o sinal dicróico em millidegree, C é a concentração da amostra e ℓ é o comprimento da cubeta utilizada. Para os experimentos de desnaturação, foi fixado o comprimento de onda a 222 nm. Todos os dados foram corrigidos com a linha de base para retirar a contribuição do tampão.

4.12.1. Estrutura secundária

Vários espectros da LAP em diferentes pHs foram obtidos. Para cada condição de pH, diferentes padrões de desnaturação térmica foram obtidos. A LAP foi diluída em tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,0, Tris-HCl 25 mM pHs 7,0 e 8,5. Os espectros registrados em todas as temperaturas (25-95°C) foram considerados para análise das alterações das estruturas secundárias da LAP nos pHs 5,0, 7,0 e 8,5. A porcentagem das estruturas secundárias no pH 8,5 foi calculada a partir do ajuste das curvas dicróicas nos comprimentos de onda de 260 a 190 nm a 25°C, utilizando o programa CDNN 2.1.

4.12.2. Desnaturação térmica

Antes de realizar o experimento de desnaturação térmica, vários espectros foram obtidos para determinar o comprimento de onda a ser fixado para o registro das curvas de desnaturação térmica. Foram acumuladas cinco varreduras e a média dos espectros foi armazenada. Os ensaios de desnaturação térmica foram realizados elevando a temperatura de 25 a 95°C. Os espectros foram coletados a cada 10°C.

As modificações estruturais da enzima em diferentes pHs foram acompanhadas em tampões com faixas de pH entre 3,0 a 9,0, sendo acetato de sódio pHs 3,0, 5,0 e 6,0 e Tris-HCl 25 mM pHs 7,0, 8,0, 8,5 e 9,0. A voltagem registrada pelo equipamento foi monitorada para não exceder 700 V. Os parâmetros termodinâmicos foram calculados para as amostras que apresentaram instabilidade à variação de temperatura com deslocamento do sinal dicróico, como no caso dos pHs 6,0, 7,0, 8,0, 8,5 e 9,0.

Os dados obtidos foram normalizados por conversão da elipticidade molar em fração aparente de enzima desnaturada de acordo com a equação:

$$F_{app} = \frac{|\theta - \theta_f|}{|\theta_f - \theta_u|}$$

Onde, θ é a elipticidade molar a 222 nm, θ_f e θ_u são os sinais dicróicos da enzima nativa e desnaturada, respectivamente. Os dados normalizados foram ajustados para um modelo de dois estados. A temperatura onde 50% das proteínas encontram-se na forma nativa e 50% na forma desnaturada foi calculada a partir dos valores de ΔG (Kcal.mol⁻¹) e da temperatura em Kelvin (T°C +273). Os valores de ΔG foram obtidos pela equação abaixo:

$$\Delta G = -RT \ln K_{app}$$

sendo R a constante dos gases, T a temperatura em Kelvin e K_{app} a constante de equilíbrio aparente de cada sinal dicróico, calculada pela seguinte equação:

$$K_{app} = \frac{\theta_u}{1 - \theta_u}$$

Os valores de ΔS e ΔH foram calculados por meio da equação de van't Hoff obtida da relação entre $R \ln K_{app}$ vs $1/T$ (K). O valor de ΔG^{25} foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

4.12.3. Estabilidade frente a agente desnaturante

A proteína nativa foi diluída em 150 μ L de água com crescentes concentrações de cloridrato de guanidina (0,1-6,0 M). Cada amostra foi incubada

por 24 horas à temperatura ambiente. As medidas dos espectros dicróicos, utilizando o espectropolarímetro JASCO 815, foram feitas no UV próximo do visível (260-350 nm), em diferentes concentrações do desnaturante. A curva de desnaturação (sinal dicróico vs [desnaturante]) foi obtida fixando-se o maior sinal dicróico do espectro de cada amostra, acompanhando o deslocamento do sinal negativo tendendo para o sinal nulo, o que indica modificação da estrutura e desnaturação da enzima. As atividades enzimáticas foram determinadas a partir o mesmo conjunto de soluções, para cada concentração de cloridrato de guanidina.

Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação química foram calculados a partir da dependência de F_{app} sobre a concentração de cloridrato de guanidina. Assumindo um ajuste para dois estados, considera-se que:

$H \rightleftharpoons 6 M$, onde H é o hexâmero, M é o monômero e $K = [M]^6/[H]$. A relação para determinar a constante aparente da dissociação do hexâmero em monômeros está apresentada a seguir:

$$K_{app} = \frac{6F_{app}^6[P_{tot}]^5}{1 - F_{app}}$$

Sendo, K_{app} a constante de equilíbrio de dissociação a cada concentração de cloridrato de guanidina, P_{tot} é a concentração de proteína total (monômero) e F_{app} é a fração aparente de proteína desnaturada. A curva de desnaturação foi normalizada a partir de um ajuste não-linear e a partir dela foi obtida a relação ΔG_{app} versus [Cloridrato de Guanidina] M, utilizando as seguintes equações:

$$\Delta G_{app} = -RT \ln(K_{app})$$

$$\Delta G_{app} = \Delta GH_{20} + mg[desnaturante]$$

Onde ΔG_{app} é a energia livre aparente de desnaturação a uma concentração padrão do desnaturante, R é a constante de gases e T é a temperatura ambiente. ΔG_{app} é a diferença da energia livre entre a enzima nas formas H e M , a uma dada concentração de cloridrato de guanidina. ΔG_{H_2O} é o valor da energia livre na ausência do desnaturante e m_g é a constante de proporcionalidade ($\delta\Delta G_{app}/\delta[G]$).

Para os testes de renaturação, duas amostras da LAP nativa em tampão de atividade foram incubadas por 24 horas com cloridrato de guanidina 6 M. Após esse período, a amostra foi diluída em várias alíquotas visando a reduzir a concentração de guanidina a 0,1 M e em seguida os espectros dicróicos foram obtidos. A curva de desnaturação foi obtida a partir do melhor sinal dicróico dos espectros medidos de cada amostra diluída. A atividade enzimática foi determinada com as amostras recuperadas, conforme metodologia descrita nos itens anteriores, visando verificar se ocorre renaturação e restauração da atividade da enzima.

4.13. Cristalização da Leucil aminopeptidase

Ensaio de cristalização da LAP foram realizados utilizando o método de difusão de vapor em placas de cristalização, em “gota sentada”, utilizando um sistema robotizado do LNLS (Matrix Maker e Honeybee).

Esse sistema robotizado utiliza *kits* disponíveis comercialmente como: “Joint Center for Structural Genomics” (JCSG; Page *et al.*, 2003), “PACT Suite” para análise sistemática do efeito do pH, ânions e cátions (Newman *et al.*, 2005), sinergia de precipitante (Majeed *et al.*, 2003), “Wizard Screens I e II”, “SaltRx”

(Gillilan *et al.*, 1994; Kanaujia *et al.*, 2007), “Crystal Screen 1 e 2” (Jancarik e Kim, 1991) e Jena I e II (Jancarik *et al.*, 2004).

O reservatório das placas utilizado pelo sistema de robotização armazena 80 μL de solução precipitante. A gota foi preparada adicionando 0,7 μL da solução do reservatório e 0,7 μL da solução da proteína. A proteína foi utilizada na forma hexamérica diluída em água Milli-Q para obter concentrações finais de 8,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ adicionados nos poços 1, 2 e 3, respectivamente.

Após a preparação das gotas pelo sistema de robotização, as placas (total de 6, com 96 condições cada uma) foram vedadas e acondicionadas em uma sala com temperatura devidamente controlada (18°C). O monitoramento do crescimento de cristais foi realizado por meio da observação das gotas em uma lupa acoplada ao computador com um programa de captura de imagem.

5. RESULTADOS

5.1. Expressão da proteína

O gel SDS-PAGE 8% do extrato total, após a sonicação da cultura de bactérias BL21-DE3 apresentando o vetor de expressão, mostra uma quantidade significativa de proteína expressa nas condições ideais, quando induzidas com 0,3 mM de IPTG (figura 9, poços 2 e 3 comparados com os poços 4 e 5). Nos primeiros poços não foi adicionado o agente indutor de expressão apresentando, menor quantidade de proteína em relação àquelas células tratadas com 0,3 mM de IPTG.

A LAPr-Li apresenta maior expressão na fração solúvel (poços 3 e 5) da suspensão bacteriana por ser caracterizada como uma proteína citosólica, enquanto que os outros componentes celulares de *E. coli* são encontrados na fração insolúvel do meio juntamente com outras proteínas (poços 2 e 4).

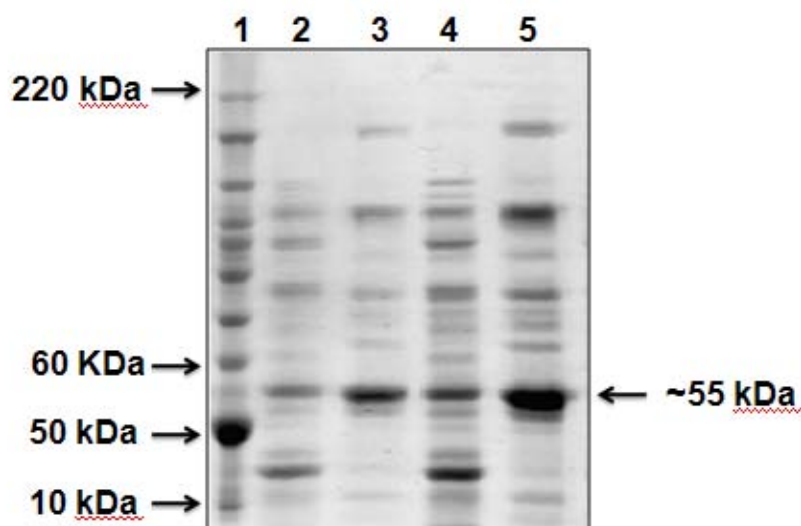


Figura 9. Extrato bacteriano total da LAPr-Li, após o rompimento da parede bacteriana, nas condições ideais em meio LB representado em gel SDS-PAGE 8%. (1) Marcador BenchMark™ protein ladder (Invitrogen); (2) e (3) amostra da fração insolúvel e solúvel em meio não induzido por IPTG 0,3 mM, respectivamente; (4) e (5) amostra da fração insolúvel e solúvel em meio induzido por IPTG 0,3 mM, respectivamente.

5.2. Purificação da Proteína

Amostras da etapa de purificação da LAPr-Li em coluna de afinidade foram analisadas em gel SDS 8%. As bandas coradas apresentaram massa molecular próxima a 55 kDa (Figura 9, poços 4, 5 e 6) correspondentes à massa molecular da LAPr-Li monomérica, sugerindo a presença da proteína na forma não-funcional devido a presença do agente desnaturante (Dodecilsulfato de Sódio – SDS). O gel de poliacrilamida em condições nativas mantém a estrutura quaternária da proteína, sua única forma ativa (dados não mostrados).

Por ser uma proteína recombinante contendo 6 resíduos de histidina, a LAPr-Li apresenta alta afinidade à resina ativada por níquel. A interação entre a proteína e a resina é de natureza não-covalente, facilmente rompida por adição de concentração alta de imidazol. A LAPr-Li é completamente eluída da coluna com imidazol na concentração de 400 mM, suficiente para competir pelo íon metálico deslocando a proteína da coluna e ligando-se ao níquel da mesma (Figura 10, poço 6).

No gel SDS-PAGE 8% (Figura 10) está apresentada a fração protéica não ligada ao níquel, que representa quantidade insignificante quando comparada ao extrato bruto (Figura 9), demonstrando que houve pouca perda do material purificado, após a passagem deste pela coluna de afinidade. O processo de lavagem da coluna, para evitar a presença de contaminantes, utilizando imidazol 10 mM, 40 mM e 100 mM, foi uma etapa necessária mostrando perda mínima de proteína no processo de lavagem da coluna (Figura 10).

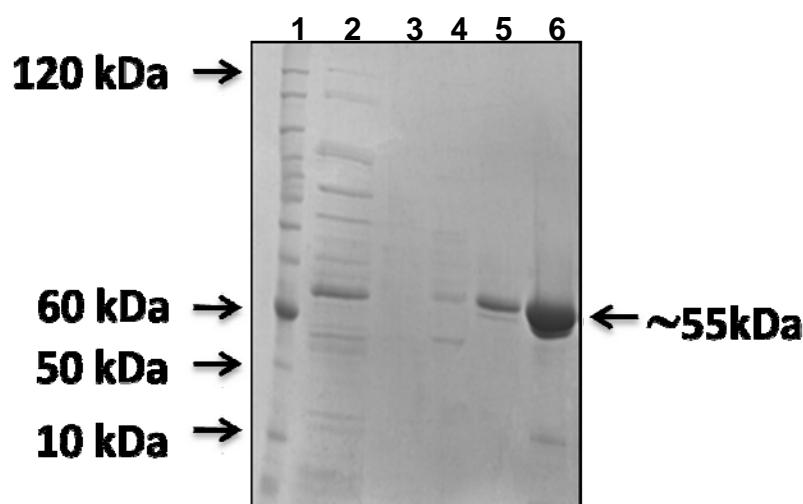


Figura 10. Gel SDS-PAGE 8% das frações obtidas na purificação da LAPr-Li em cromatografia de afinidade. (1) Marcador BenchMark™ protein ladder (Invitrogen); (2) Proteína não ligada ao níquel; (3) Alíquota após lavagem da resina com tampão de ligação (imidazol 10mM); (4) Alíquota após lavagem com tampão contendo imidazol 40mM; (5) Alíquota após lavagem com tampão contendo imidazol 100mM; (6) Enzima eluída após adição de imidazol 400mM.

A cromatografia de exclusão molecular utilizando o sistema cromatográfico FPLC permitiu coletar as frações com as formas oligoméricas separadas e já dialisadas no tampão de atividade impedindo a influência do imidazol nos ensaios de atividade da proteína.

O cromatograma representado na figura 11 mostra frações contendo proteínas nas formas hexamérica (frações de 1-20) e outras incluindo a monomérica (frações de 20 a 100), representadas pelo espectro de cor preta. A maior absorbância foi obtida nas últimas frações coletadas, onde são encontrados os monômeros (frações 70-100), sem atividade enzimática (Figura 11). A atividade enzimática utilizando o substrato L-Leu-AMC 20 mM foi evidenciada somente nas frações correspondentes aos hexâmeros, cromatograma em vermelho (frações 1-20).

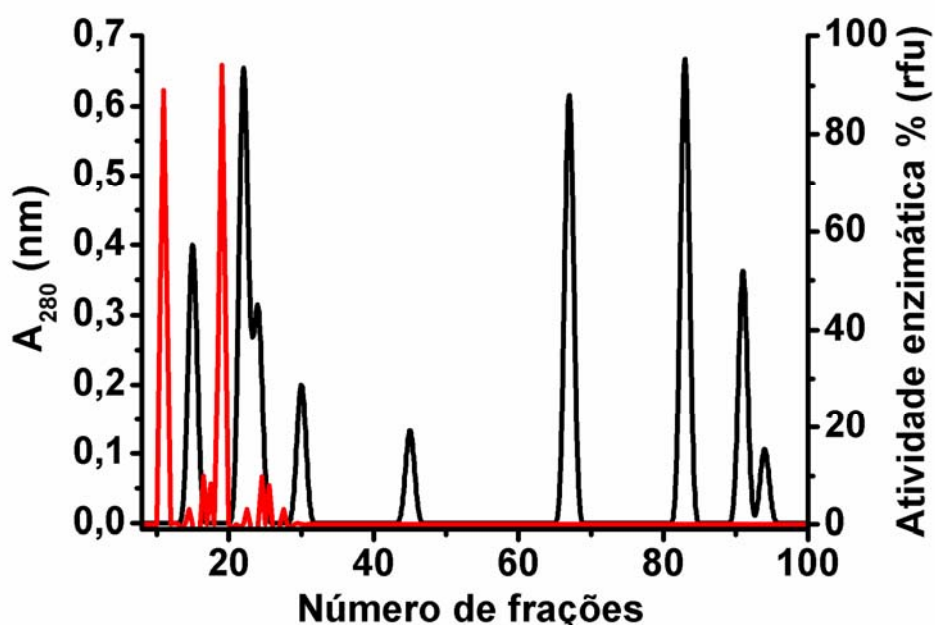


Figura 11. Cromatograma das frações da enzima eluída em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM em coluna Superdex G-200. Em preto, espectros de absorbância a 280 nm. Em vermelho, frações da LAPr-Li que apresentaram atividade enzimática (hexâmeros).

5.3. Efeito do pH e temperatura na atividade da LAPr-Li

Os ensaios de atividade da enzima variando o pH e temperatura estão representados nas figuras 12 e 13. A proteína apresentou aumento gradativo da atividade a partir do pH 7,0-9,0, coincidindo com a faixa de pH de maior atividade dessas enzimas, de forma geral. Em meio ácido a proteína não apresenta nenhuma atividade (Figura 12).

Com o aumento da temperatura foi observado um aumento da atividade, atingindo quase que atividade máxima em 50°C. As temperaturas de 55°C a 60°C foram as temperaturas ótimas para a atividade enzimática, no entanto, a partir de 65°C a atividade reduz-se abruptamente (Figura 13).

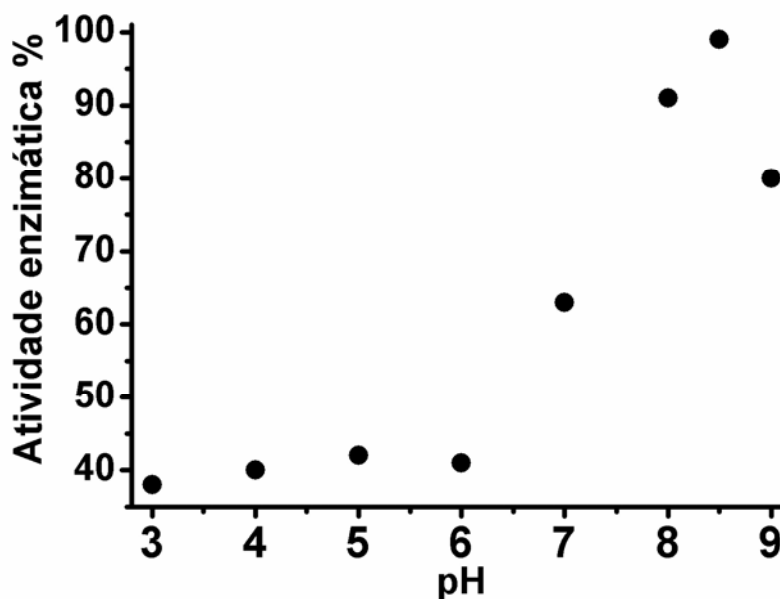


Figura 12. Atividade relativa da LAPr-Li sobre o substrato fluorogênico L-Leu-AMC em tampões com diferentes pHs a 25°C.

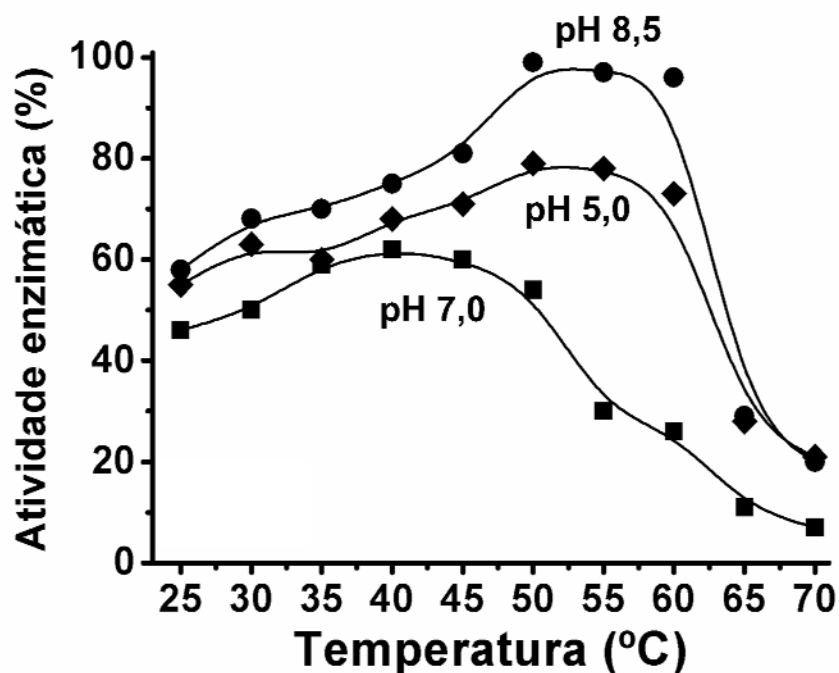


Figura 13. Atividade enzimática relativa da LAPr-Li em diferentes pHs com o aumento da temperatura.

A LAPr-Li apresentou estabilidade estrutural em pH 8,5 e temperatura ~ 50°C (Figura 13). No entanto, na temperatura de 65°C mudanças conformacionais ocorreram e resultaram na diminuição brusca da atividade. Resultados semelhantes foram obtidos em pH 5,0, enquanto que em pH 7,0 a proteína perdeu cerca de 50% de atividade.

5.4. Condições de oligomerização da LAPr-Li

Para este experimento foram utilizadas soluções contendo monômeros da proteína. A LAPr-Li apresentou maior atividade na temperatura de 50°C na forma nativa e hexamérica. A figura 14 mostra a dependência dos estados oligoméricos da LAPr-Li em diferentes temperaturas (25 a 60°C). As formas monômero, tetrâmero e hexâmero ocorrem nas temperaturas de 25, 40 e 50°C, representadas pelas três setas, respectivamente. Os outros picos correspondem a agregados da proteína nas condições estudadas.

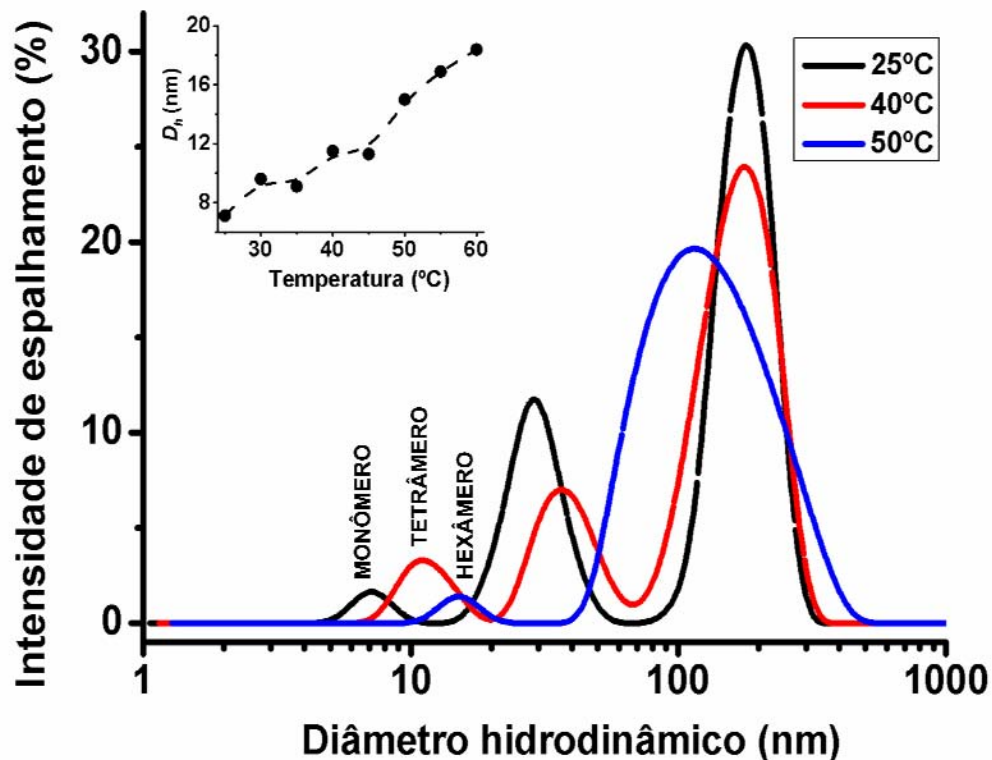


Figura 14. Estados oligoméricos da LAPr-Li (14 μ M) em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5 em diferentes temperaturas por ELD. D_h = diâmetro hidrodinâmico. As setas indicam as formas: monômero (preto), tetrâmero (vermelho) e hexâmero (azul). Os demais picos correspondem a agregados da molécula. Em anexo: variação do diâmetro sob o efeito da temperatura. As formas oligoméricas ocorrem até 40°C, enquanto os agregados ocorrem principalmente em temperaturas mais altas.

A tabela III mostra que a forma monomérica apresentou uma distribuição percentual de 85% na solução a 25°C. Os outros 15% representam formas agregadas da proteína. A análise da porcentagem de massa (tabela III) mostra a predominância das formas correspondentes às massas de cada forma oligomérica e poucos agregados presentes em solução. A 60°C prevaleceu a forma hexamérica da molécula (84%).

Corroborando dados apresentados na literatura (Burley *et al*, 1990 e Silva, 2008), na temperatura de 50°C a LAPr-Li apresenta a forma de um hexâmero com raio de 7,6 nm e massa molecular de aproximadamente 345 kDa. O gráfico

inserido na figura 14 mostra que aos 50°C a LAPr-Li apresenta um diâmetro de aproximadamente 15 nm, e o raio de 7,6 nm, tabela III, em vermelho.

Tabela III. Dados de Espalhamento de Luz Dinâmico da LAPr-Li a 14µM em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5, variando a temperatura (25-60°C).

Temp. (°C)	Raio (nm)	Mm (kDa)	Massa (%)
25	3.6	66*	85.0
30	4.6	117	88.0
35	4.6	118	88.2
40	5.5	181	91.7
45	5.7	196	90.2
50	7.6	345	89.7
55	8.1	418	80.9
60	9.7	475	84.0

☆ Massa molecular do monômero da LAP: 54.076 Da (Silva, 2008). Diâmetro do monômero da LAP: 115 Å (5,75 nm) (Burley, 1990).

5.5. Análise conformacional da LPr-Li por fluorescência estática

5.5.1 Atenuação de fluorescência: ambientes dos triptofanos

As alterações conformacionais da LPr-Li foram monitoradas por atenuação de fluorescência utilizando atenuadores neutros e carregados. A atenuação da intensidade de fluorescência indica que os resíduos de Trp da molécula se encontram acessíveis ao atenuador. A figura 15 mostra que a acrilamida, um atenuador neutro, interage com a proteína e reduz a intensidade de fluorescência em aproximadamente 81%, com deslocamento dos espectros de fluorescência em aproximadamente 81%, com deslocamento dos espectros de 2 nm (332 nm para 330 nm), sugerindo um reposicionamento hipsocrômico dos Trp (para ambientes menos hidrofílicos).

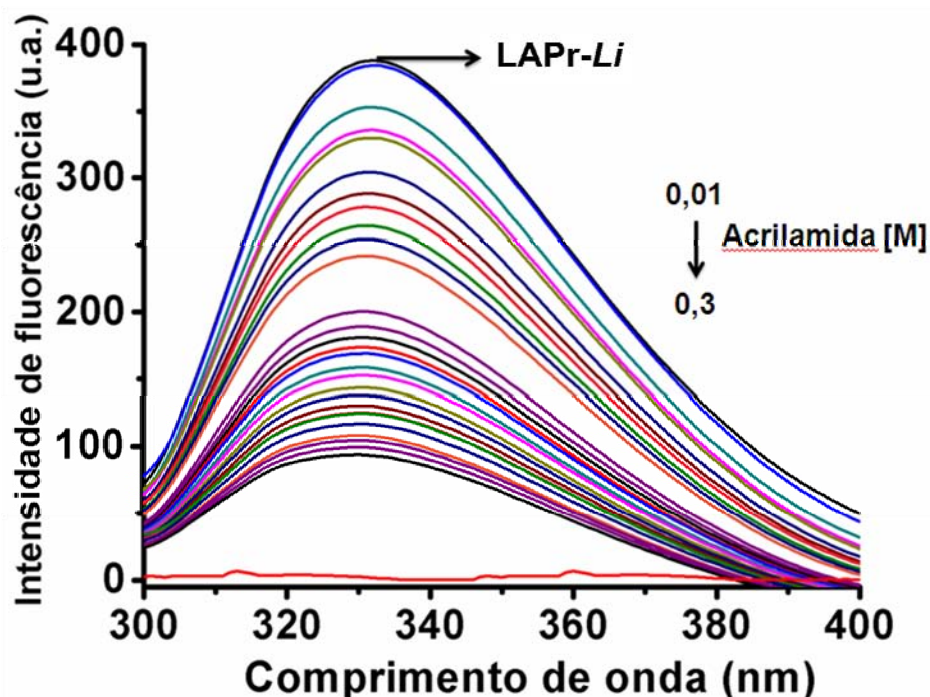


Figura 15. Espectros de emissão de fluorescência da LPr-Li em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5 ($A_{280\text{nm}} < 0.1$) com adição de concentrações crescentes de acrilamida, a 25°C. Excitação em 295 nm. ($\lambda_{\text{máx.}}$: 332 nm). Em preto, o espectro da proteína na ausência do atenuador. O espectro verde é a primeira titulação de acrilamida. Do espectro azul escuro em diante, são as demais titulações do atenuador de intensidade de fluorescência.

Os dados de atenuação da intensidade de fluorescência foram ajustados utilizando a equação clássica de Stern-Volmer (intensidade de fluorescência *versus* concentração do atenuador), conforme observado na figura 16. A curvatura está voltada para o eixo da ordenada, o que indica a ocorrência de dois tipos de atenuação: dinâmica (colisional) e estática (Laskowski, 2004). O ajuste dos dados, considerando o desvio padrão e χ^2 reduzidos, forneceu os valores das constantes de Stern-Volmer, que indicam o grau de exposição ou ambiente dos Trp (Figuras 17 e 18). O χ^2 reduzido foi adequado para todos os ajustes, e o desvio padrão e a distribuição residual apresentaram-se reduzidos para o ajuste de duas populações de Trp. Os valores de Ksv calculadas para os Trp enterrados e expostos foram de $5,4 \text{ M}^{-1}$ e $13,2 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Para verificar se a acrilamida promove atenuação colisional e estática ao mesmo tempo, os dados de fluorescência foram ajustados também pela equação não linear, modificada de Stern-Volmer (Figura 16). A equação modificada de Stern-Volmer é indicada para determinar as constantes de atenuação estática e colisional para moléculas que apresentam muitos resíduos de Trp na estrutura (Ventura *et al*, 1976). Os valores das constantes, considerando os dois tipos de atenuação, foram: constante de atenuação estática (K_S) para a população mais enterrada foi de $0,17 \text{ M}^{-1}$ e a constante dinâmica (K_D) de $5,5 \text{ M}^{-1}$. Para a segunda população de Trp mais expostos, o valor de K_S foi $0,01 \text{ M}^{-1}$ e de K_D foi $19,4 \text{ M}^{-1}$. Esses valores estão de acordo com aqueles encontrados pelo ajuste linear da curva (valores de Ksv), excetuando aquele encontrado para a população de Trp mais expostos ($K_D = 19,4 \text{ M}^{-1}$ e $K_{sv} = 13,2 \text{ M}^{-1}$). Esses dados confirmam que o efeito da acrilamida é preferencialmente a atenuação dinâmica ou colisional, dado os baixos valores encontrados para a constante K_S .

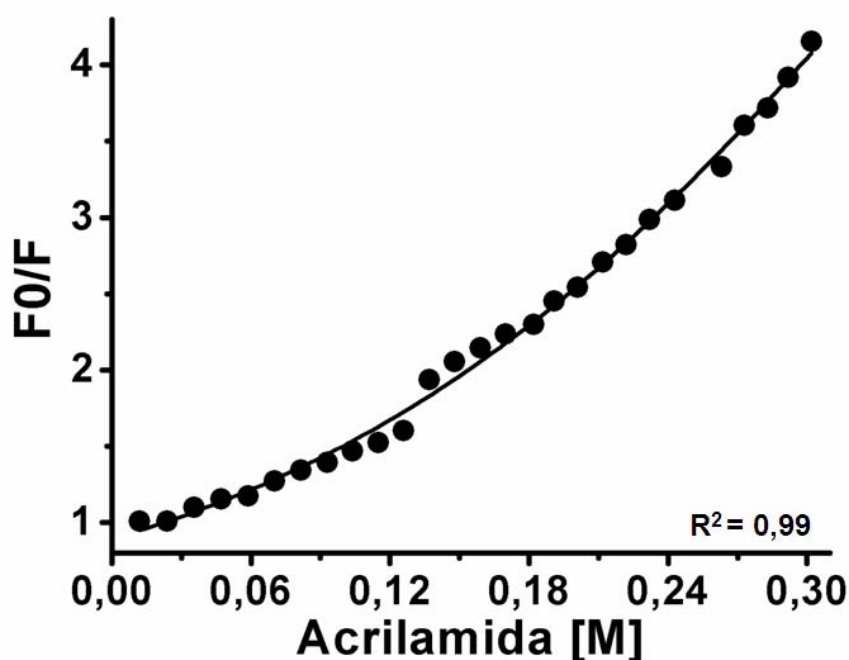


Figura 16. Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência da LAPr-Li por acrilamida, em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5. F₀ é a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença de acrilamida. A linha sólida representa a curva ajustada (método de Levenberg-Marquardt). As constantes estática K_S e dinâmica K_D foram calculadas com os valores de 0,17 M⁻¹ e 5,5 M⁻¹, respectivamente, para a população mais enterrada e 0,01 M⁻¹ e 19,4 M⁻¹, respectivamente, para a mais exposta de Trp.

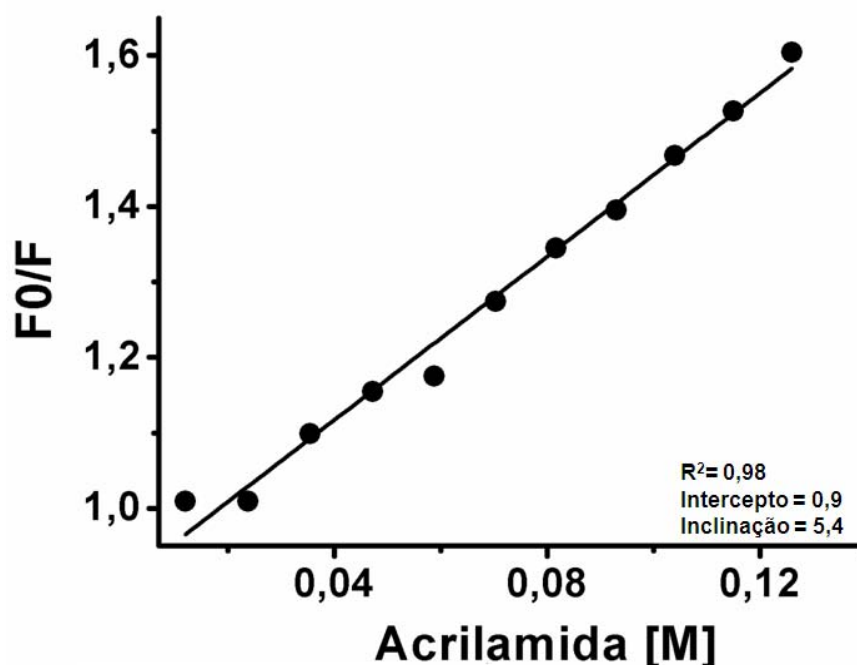


Figura 17. Gráfico de Stern-Volmer para atenuação de fluorescência por acrilamida para a população menos exposta de Trp de LAPr-Li em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5. A linha sólida representa a curva ajustada por método linear. O valor de K_{SV} para essa população foi de 5,4 M⁻¹.

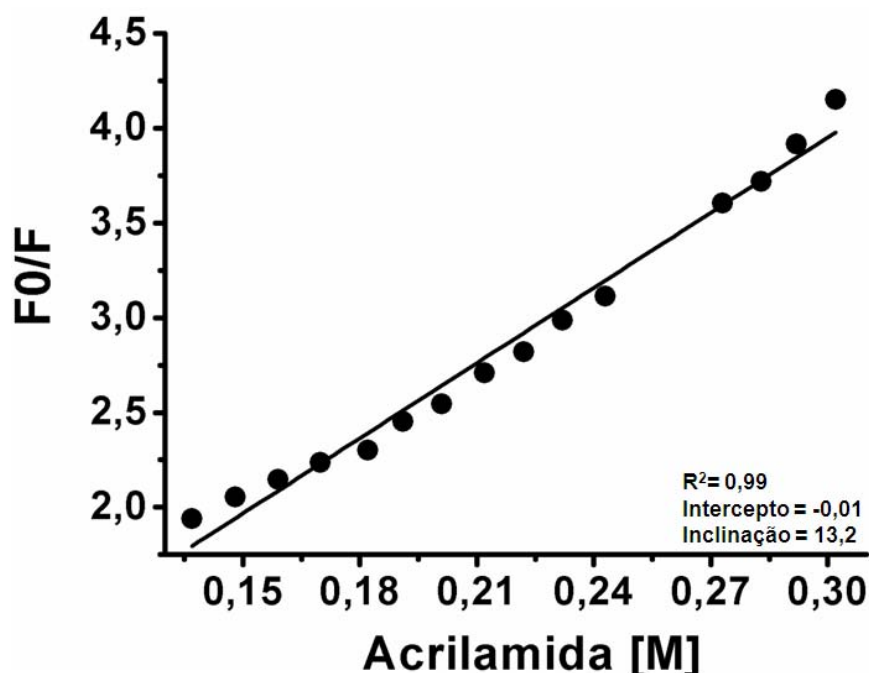


Figura 18. Gráfico de Stern-Volmer para atenuação de fluorescência por acrilamida para a população mais exposta de Trp de LAPr-Li em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5. A linha sólida representa a curva ajustada por método linear. O valor de K_{SV} para essa população foi de $13,2 \text{ M}^{-1}$.

A adição de iodeto, atenuador de carga negativa, à solução de LAPr-Li com variação da força iônica, promoveu redução mínima da intensidade de fluorescência indicando baixo ou nenhum acesso aos microambientes dos Trp (Figura 19). Apesar de baixo efeito na atenuação, foi observada uma maior atenuação da intensidade de fluorescência por iodeto quando a força iônica foi de 1,0 (Figura 19), apresentando maior valor de K_{SV} (Figura 20) e tabela IV. O aumento da força iônica ocasionou mudanças no padrão das interações não covalentes da proteína e favoreceu a atração eletrostática entre o atenuador e o fluoróforo (Ventura *et al*, 1976). No entanto, os valores dessas constantes indicam o baixo acesso do atenuador aos fluoróforos que aqui foram caracterizados como Trp enterrados.

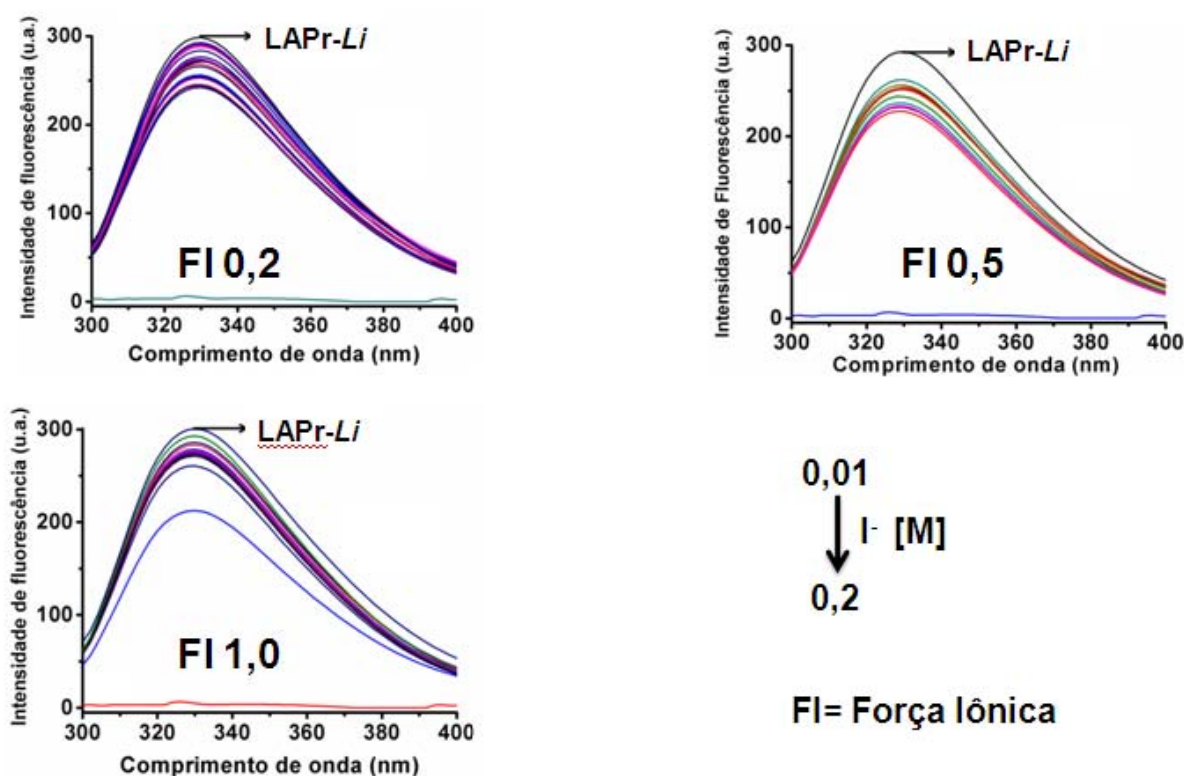


Figura 19. Espectros de emissão fluorescente da LAPr-Li em tampão Tris-HCl 20 mM NaCl 200 mM pH 8,5 com adição de concentrações crescentes de iodeto de potássio submetidas a diferentes forças iônicas, a 25°C. Excitação em 295 nm.

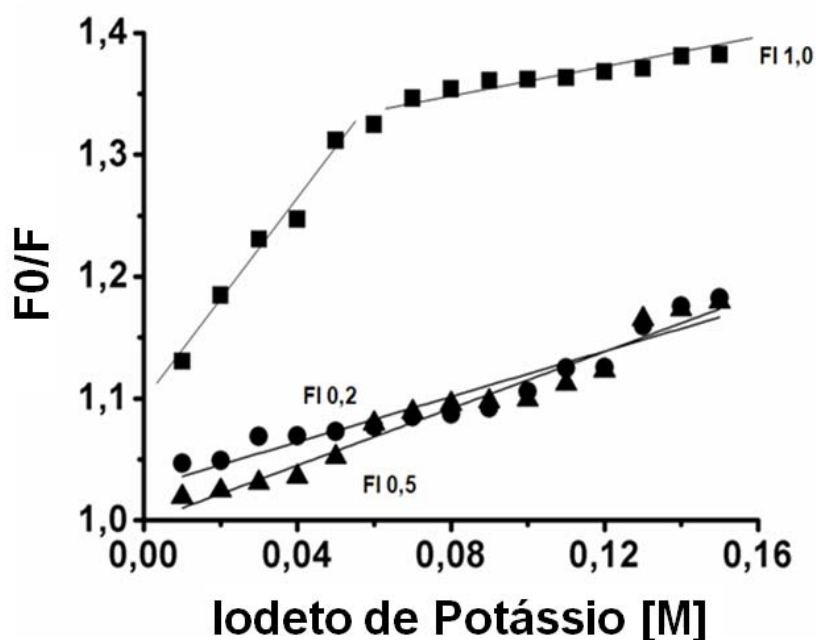


Figura 20. Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência da LAPr-Li por I⁻ em diferentes força iônica, em tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM pH 8,5. K_{SV} representa a inclinação da reta, F₀ a intensidade de fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente. A linha sólida representa a curva ajustada pela equação clássica de Stern-Volmer.

Tabela IV. Constantes de Stern-Volmer para iodeto de potássio com variação da força iônica, em pH 8,5. K_{SV1} representa a população mais exposta de Trp e a K_{SV2} , a menos exposta.

Força iônica	K_{SV1} (M^{-1})	K_{SV2} (M^{-1})
0,2	$1,02 \pm 0,3$	---
0,5	$1,20 \pm 0,003$	---
1,0	$4,48 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,006$

A adição de cloreto de céσιο, atenuador de carga positiva, reduziu significativamente a intensidade de fluorescência, mostrando que o microambiente em que os resíduos de triptofanos da LAPr-Li se encontram é carregado negativamente (Figura 21). Nesse caso, os trp podem estar envolvidos com interações não-covalentes com resíduos de aminoácidos de carga negativa. Os espectros apresentam duas bandas de emissão, centradas em 332 nm e 342 nm, o que indica a presença de outra forma estrutural da LAPr-Li, além do hexâmero. O ajuste do gráfico de Stern-Volmer para o Cs^+ foi feito para duas populações de Trp (Figura 22), sendo ambas as populações de ambientes de caráter negativo.

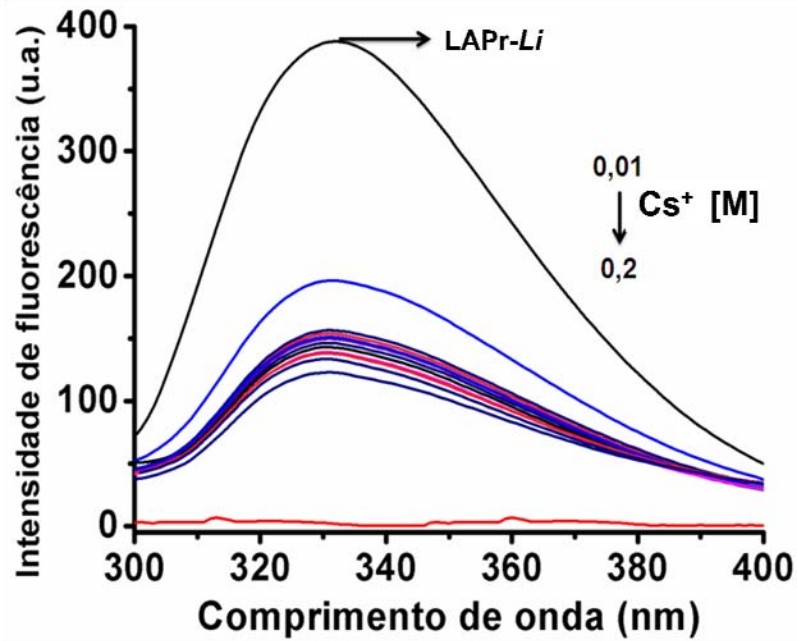


Figura 21. Espectros de emissão fluorescente da LAPr-Li em tampão Tris-HCl 20 mM NaCl 200 mM pH 8,5 com adição de concentrações crescentes de cloreto de céσιο, a 25°C. Excitação em 295 nm.

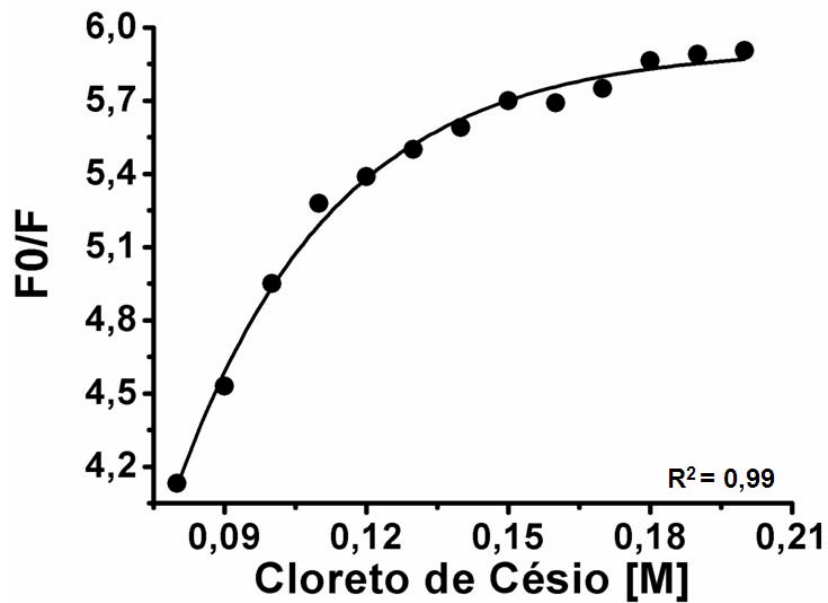


Figura 22. Gráfico de Stern-Volmer para a atenuação de fluorescência por CS^+ da LAPr-Li em tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM pH 8,5. F_0 , fluorescência na ausência e F na presença do atenuador, respectivamente. As curvas ajustadas por método linear, considerando duas populações de Trp resultaram nos valores de K_{SV} representadas na tabela V abaixo.

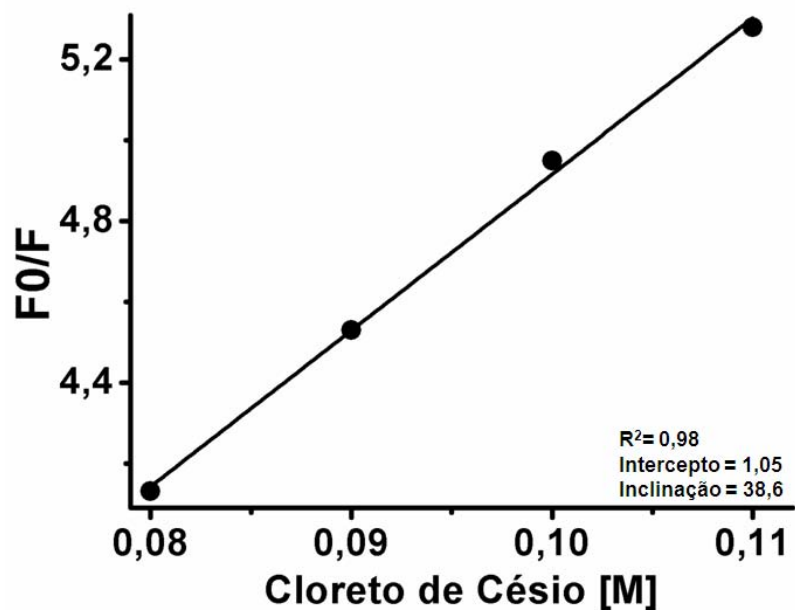


Figura 23. Gráfico de Stern-Volmer para atenuação de fluorescência por CS^+ para a população mais exposta de Trp de LAPr-Li em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5. A linha sólida representa a curva ajustada por método linear. O valor de K_{SV} para essa população foi de $38,6 M^{-1}$.

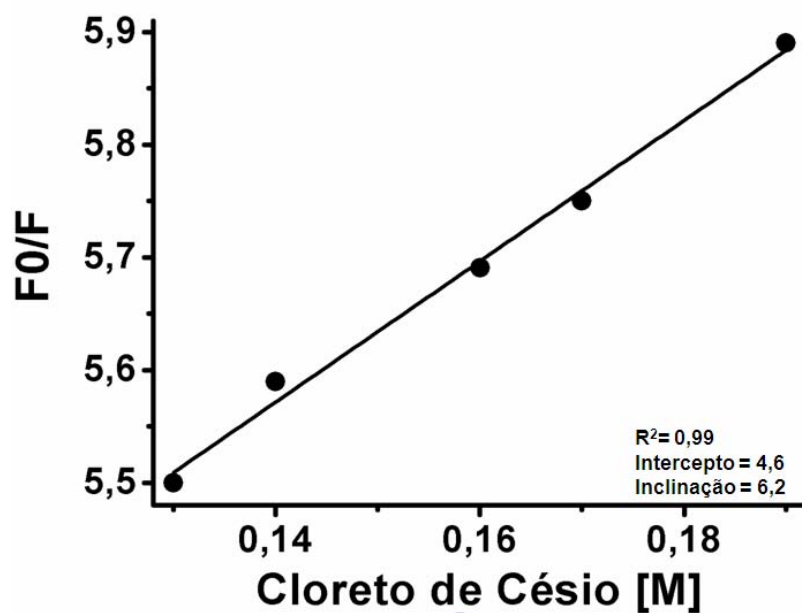


Figura 24. Gráfico de Stern-Volmer para atenuação de fluorescência por Cs^+ para a população menos exposta de trp de LAPr-Li em Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5. A linha sólida representa a curva ajustada por método linear. O valor de K_{SV} para essa população foi igual a $6,2 M^{-1}$.

Tabela V. Constantes de Stern-Volmer para Cloreto de Césio em pH 8,5. K_{SV1} representa a população mais exposta de Trp e a K_{SV2} , a menos exposta.

$K_{SV1} (M^{-1})$	$K_{SV2} (M^{-1})$
$38,6 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,08$

Os valores das constantes de Stern-Volmer para cada atenuador utilizado no estudo estrutural de LAPr-Li nativa estão representados na tabela VI. Todos os atenuadores indicaram duas populações de resíduos de triptofanos uma exposta e outra enterrada. No entanto, para a acrilamida (raio de 1,7 Å) esse efeito foi mais evidente em virtude do poder de penetração desse atenuador na matriz protéica. O acesso dos atenuadores carregados aos resíduos de triptofanos variou principalmente pela diferença de cargas e não pelo tamanho, uma vez que os três atenuadores apresentam raios similares (I^- 2,16 Å, Cs^+ 1,69 Å) (Ventura *et al*, 1976). A interação entre o fluoróforo e o atenuador depende da posição em que os triptofanos se encontram e da carga dos aminoácidos de seu microambiente.

Tabela VI. Constantes de Stern-Volmer de acrilamida, iodeto de potássio e cloreto de césio para as duas populações de Trp. K_{SV1} , população mais exposta; K_{SV2} , população parcialmente enterrada.

	$K_{SV1} (M^{-1})$	$K_{SV2} (M^{-1})$
Acrilamida	$13,2 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,8$
I^-	$4,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,006$
Cl^+	$38,6 \pm 0,1$	$6,2 \pm 1,3$

5.6. Estabilidade conformacional da LAPr-Li por Dicroísmo Circular

5.6.1. Estrutura secundária

O espectro dicróico da LAPr-Li em água a 25°C é mostrado na figura 25. Essa proteína é formada predominantemente por α -hélices e menos por folhas- β (Tabela VII).

Tabela VII. Estruturas secundárias da HaLAP em tampão Tris-HCl 25 mM NaCl 200 mM pH 8,5 a 25°C por DC.

Estrutura Secundária	185-260nm
α -hélice	44,70%
Fitas- β	11,60%
Randômica	4,20%

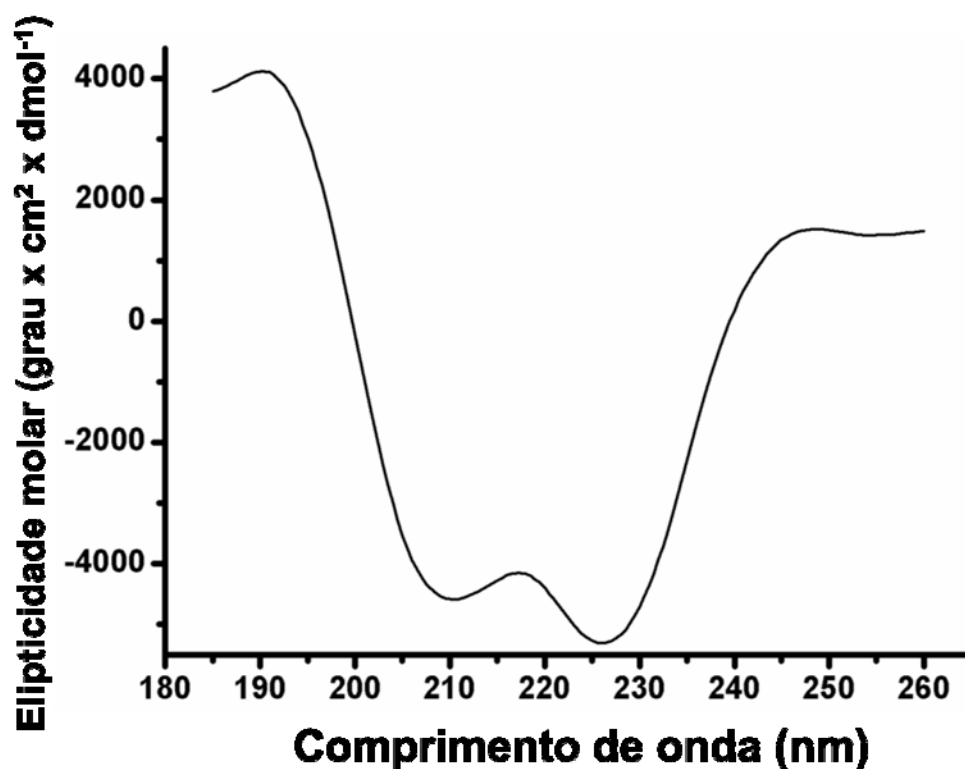


Figura 25. Espectro de dicroísmo circular “distante do UV” da LAPr-Li na forma nativa (0,064 mg.mL⁻¹) em Tri-HCl 25 mM, NaCl 200 mM pH 8,5.

5.6.2. Dependência térmica

As curvas de desnaturação térmica em diferentes pHs mostram que a LAPr-Li apresenta maior estabilidade estrutural em meios ácidos (pH 3,0 e 5,0), tendo em vista que nenhuma alteração estrutural foi evidenciada e nenhum padrão de desnaturação térmica foi encontrado (Figura 26). Em meio alcalino (pHs 8,0, 8,5 e 9,0) o sinal dicróico diminuiu com o aumento da temperatura indicando alterações na estrutura sem no entanto deslocar para valores compatíveis com o processo de desnaturação (sinal dicróico próximo de zero). A desnaturação completa foi observada somente nos pHs 6,0 e 7,0 (Figura 26), indicada pela ausência do sinal dicróico em temperaturas acima de 55°C. A voltagem registrada pelo espectropolarímetro, em todas as condições analisadas, não ultrapassou o valor de 700 V (Figura 27), indicando que a proteína permaneceu em solução até a temperatura máxima de 95°C. Os espectros dicróicos na região UV distante do visível na temperatura de 25°C, apresentados na figura 28, mostram a preservação total da estrutura da proteína em pH 5,0, mudanças conformacionais em pH 8,5, sem configurar desnaturação completa e a completa desnaturação da enzima em pH 7,0.

Os espectros medidos em pH 5,0 com temperatura variando de 25-95°C são semelhantes confirmando a estabilidade da proteína nesse pH (Figura 29A). Em contraste, em pH 7,0 a proteína apresenta modificações estruturais com aumento da temperatura e em temperaturas mais elevadas ela se desnatura, indicado pelo sinal dicróico próximo a zero (Figura 29C). Em pH 8,5 os espectros são alterados com diminuição progressiva do sinal dicróico sob o efeito do aumento da temperatura, indicando mudanças estruturais sem, no entanto, caracterizar a desnaturação total da proteína (Figura 29B).

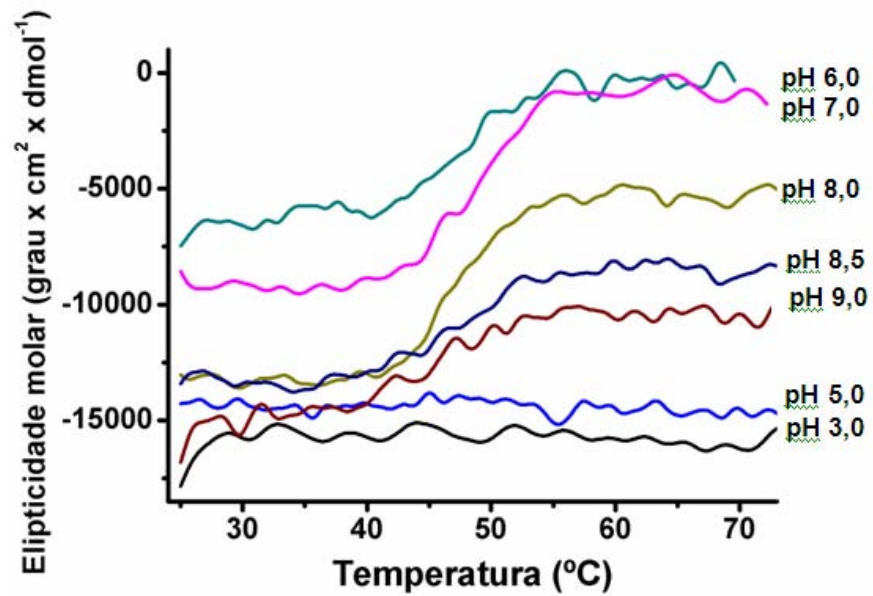


Figura 26. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-Li em diferentes pHs. Acetato de sódio (pH 3,0-6,0) e Tris-HCl (pH 7,0-9,0). Comprimento de onda fixado em 222 nm.

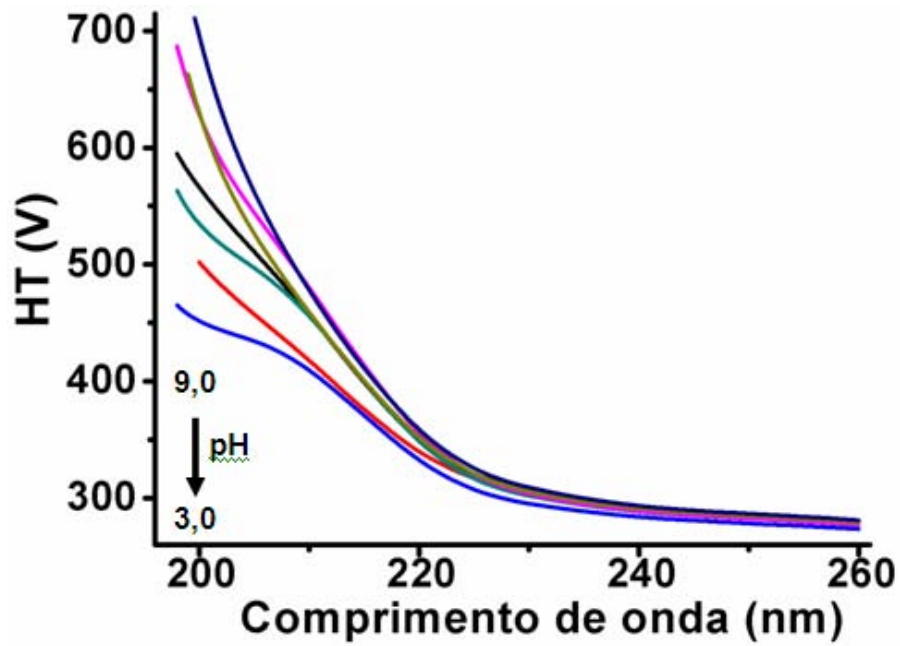


Figura 27. Tensão correspondente às curvas de desnaturação da LAPr-Li em vários pH.

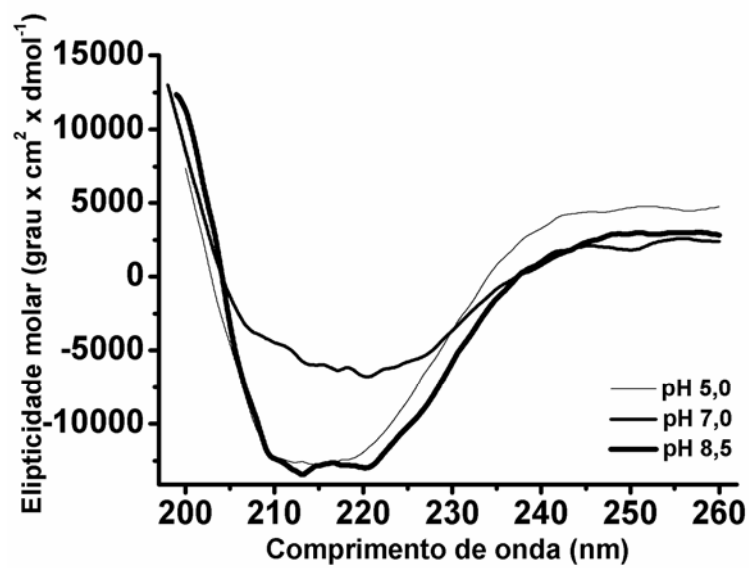


Figura 28. Espectros de dicroísmo circular distantes do UV da LAPr-Li ($0,064 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em diferentes pHs. Acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl pH 7,0 e 8,5.

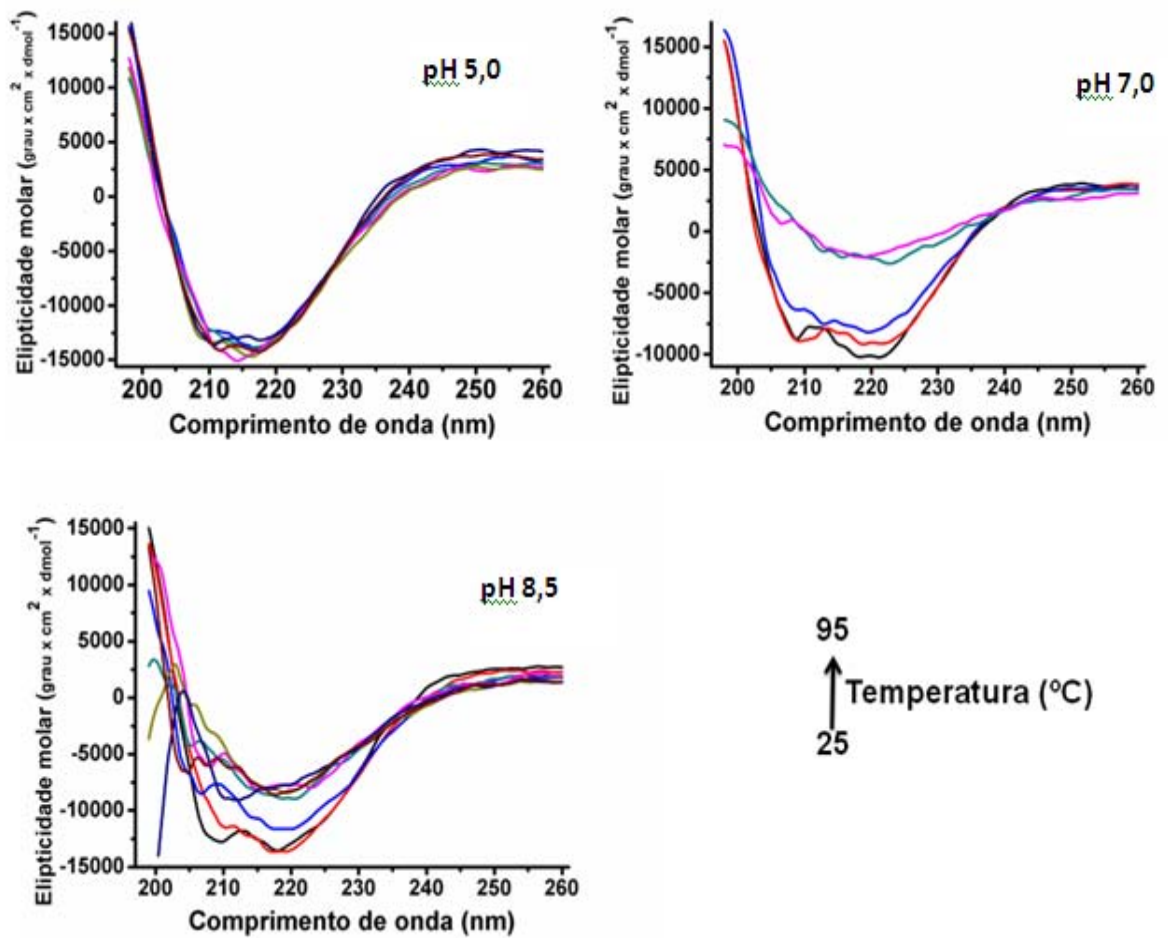


Figura 29. Espectros de DC registrados de 25-95°C. A seta mostra os espectros obtidos na faixa de temperatura de 25-95°C.

O conteúdo das estruturas secundárias foi calculado a partir dos espectros obtidos em diferentes temperaturas e diferentes pHs. Para as condições onde ocorreu a desnaturação, o conteúdo dessas estruturas diminuiu significativamente (dados não mostrados). Para os pHs onde ocorreram alterações nos espectros sem caracterizar a desnaturação total da proteína, como foi o caso dos espectros obtidos em pH 8,5 com aumento gradativo da temperatura (Figuras 30), modificações no conteúdo das estruturas secundárias foram observadas, principalmente as α -hélices que são predominantes na estrutura da LAPr-Li.

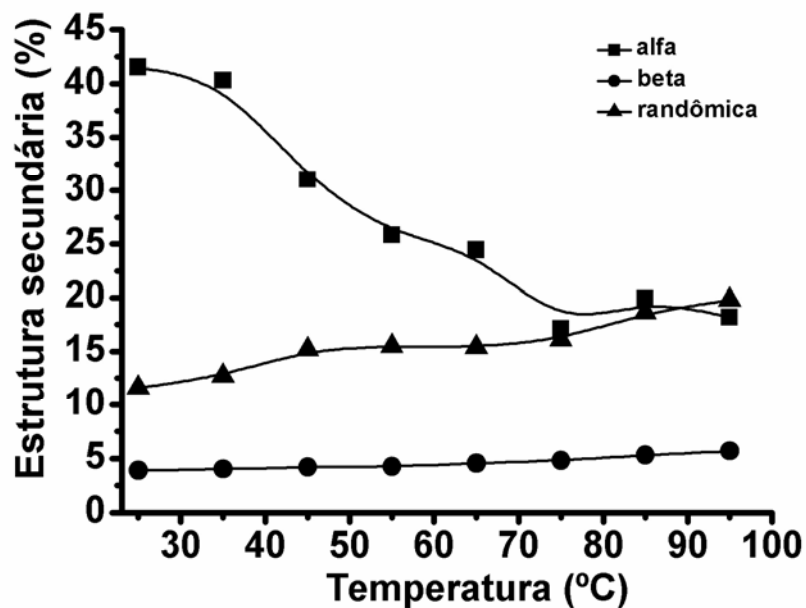


Figura 30. Conteúdo das estruturas secundárias da LAPr-Li com aumento da temperatura em pH 8,5.

5.6.3. Parâmetros termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos que caracterizam a estabilidade estrutural da LAPr-Li nos diferentes pHs foram calculados a partir dos ajustes das curvas de desnaturação em cada uma das condições estudadas (Figura 31-35; tabela

VIII). O menores valores para a energia livre foram obtidos nos pHs 8,0, 8,5 e 9,0 que corresponderam ao processo de desnaturação parcial da proteína e/ou dissociação em temperaturas mais altas. A desnaturação total da molécula ocorreu nos pHs 6,0 e 7,0. Dentre esses dois pHs, a proteína apresentou maior estabilidade no pH7,0 (tabela VIII). No entanto, esses valores provavelmente são menores do que o valor total de ΔG^{25} nos pH 8,0, 8,5 e 9,0, onde os valores encontrados representam um estágio intermediário do processo de desnaturação ou a dissociação dos monômeros em temperaturas mais altas na curva de desnaturação. Isso indica que nesses pHs, a proteína apresenta alta estabilidade térmica, valor esperado considerando que a LAPr-Li apresenta temperatura ótima de atividade de 50°C em pH 8,5. Para a desnaturação completa nesses pH é necessário associar outros agentes desnaturantes como o caso de cloridrato de guanidina ou uréia, o que não foi realizado no presente trabalho.

Tabela VIII. Parâmetros termodinâmicos da HaLAP em Acetato de Sódio (pH 6) e Tris-HCl (pHs 7 a pH 9).

pH	T_m (°C)	ΔH_m (Kcal. mol ⁻¹)	ΔS_m (Kcal. mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔG^{25} (Kcal. mol ⁻¹)
6,0	48,0	44,939 ± 0,4	0,139 ± 0,01	3,517
7,0	48,8	88,880 ± 1,9	0,276 ± 6,61	6,632
8,0	47,5	38,736 ± 0,7	0,121 ± 2,5	2,678
8,5	48,5	27,175 ± 0,3	0,084 ± 0,01	2,142
9,0	49,5	18,724 ± 1,2	0,057 ± 0,5	1,738

As curvas de normalização para todos os pHs estão representadas na figura 36. O valor de entalpia para cada pH pode ser analisado a partir da figura 37.

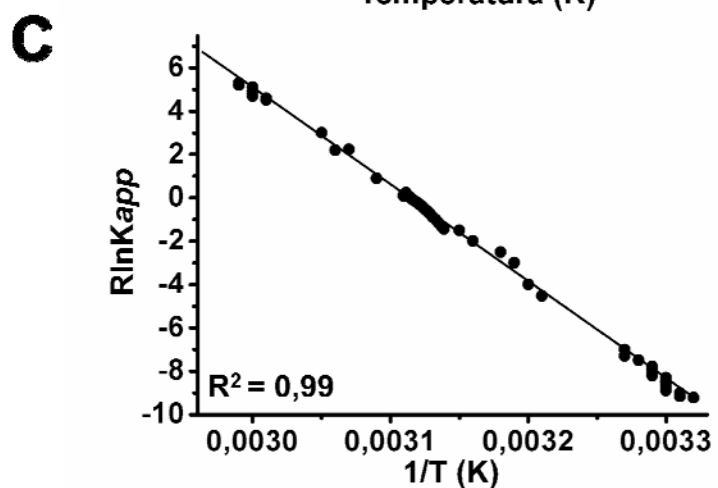
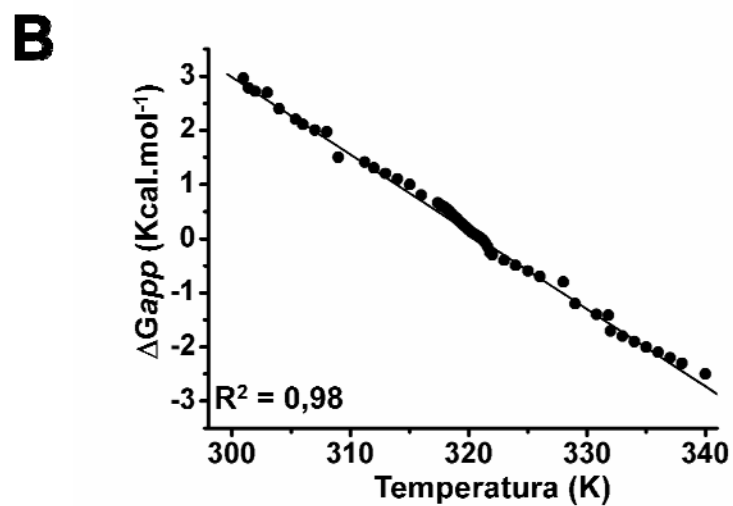
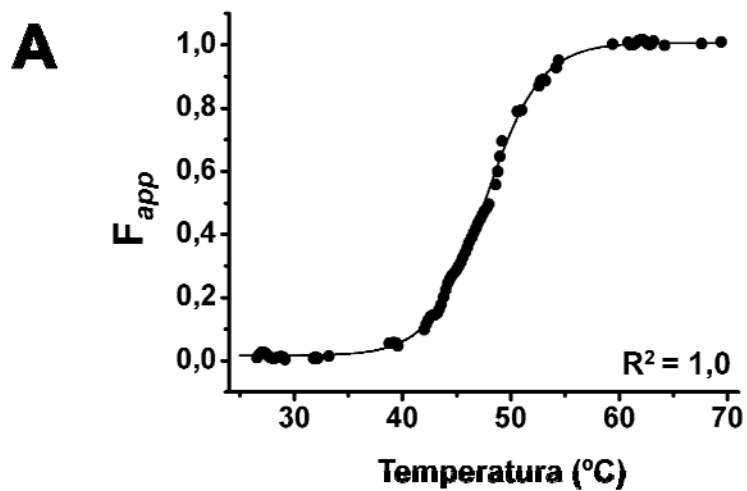


Figura 31. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-LI em pH 8,0. (A) Curva normalizada de equilíbrio de desnaturação induzida pelo aumento de temperatura. (B) Variação da energia com aumento da temperatura. (C) Gráfico de van't Hoff para os cálculos de ΔG^{25} , ΔH e ΔS .

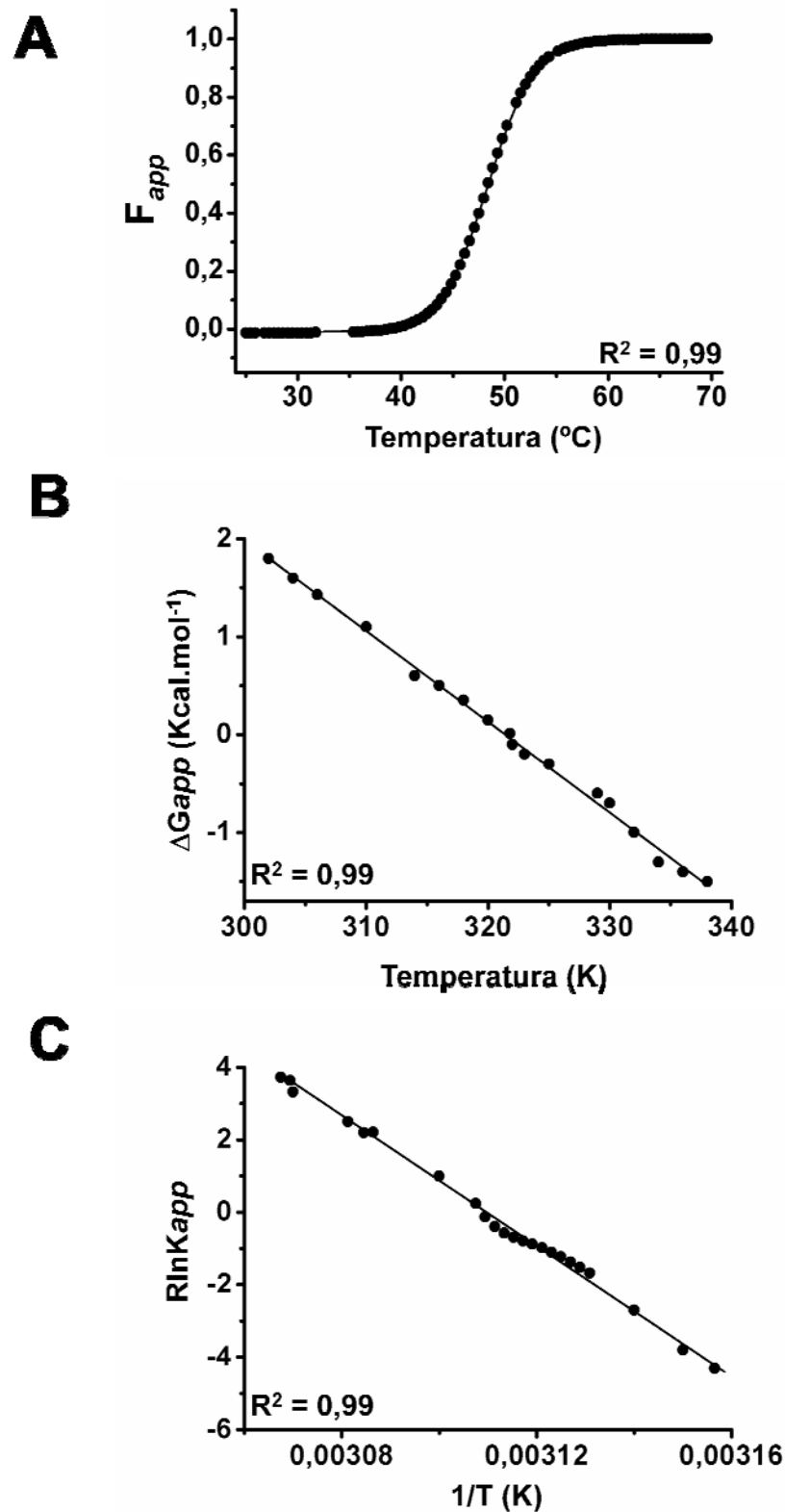


Figura 32. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-Li em pH 7,0. (A) Curva normalizada de equilíbrio de desnaturação induzida pelo aumento de temperatura. (B) Variação da energia com aumento da temperatura. (C) Gráfico de van't Hoff para os cálculos de ΔG^{23} , ΔH e ΔS .

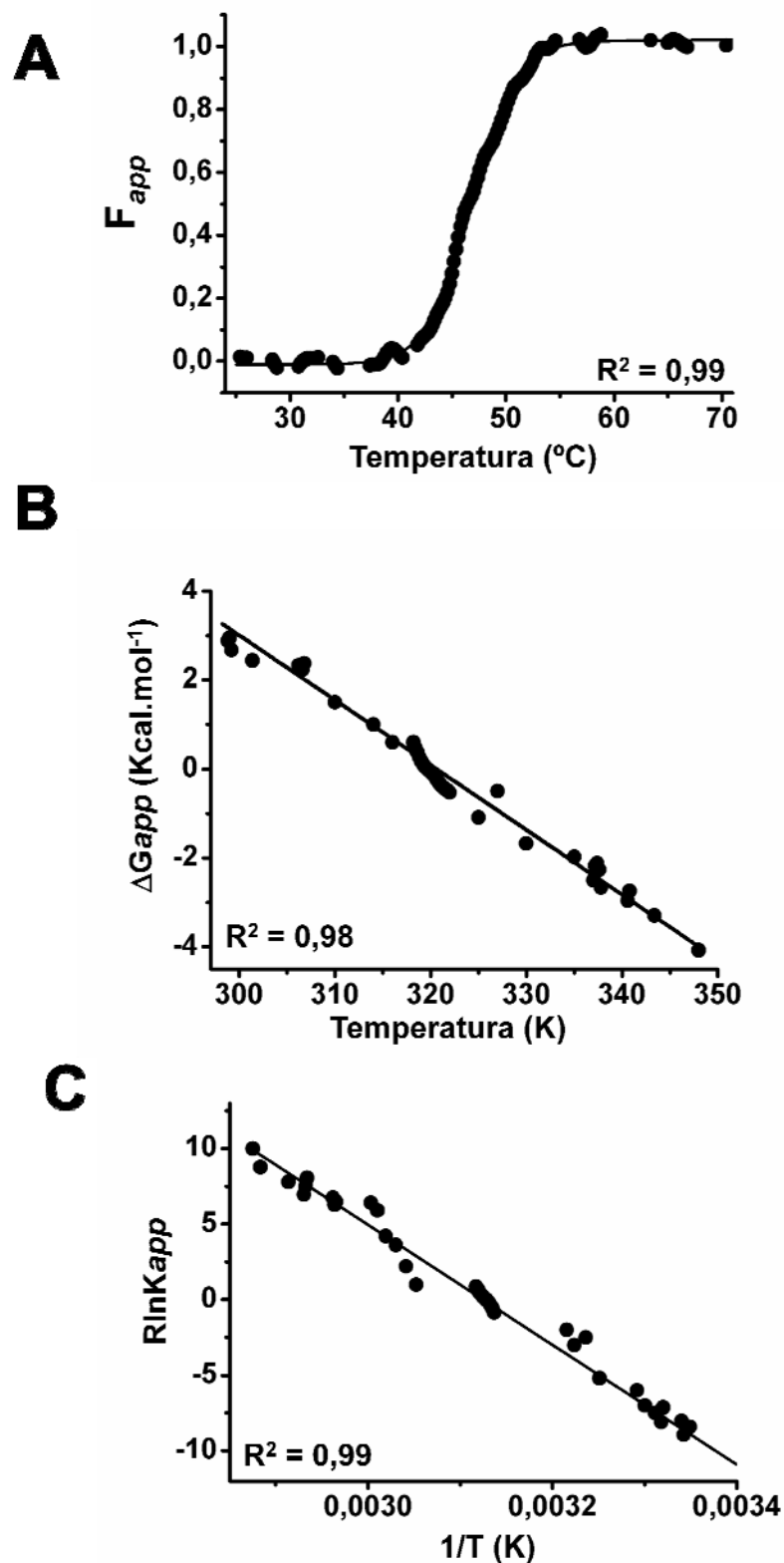


Figura 33. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-LI em pH 8,0. (A) Curva normalizada de equilíbrio de desnaturação induzida pelo aumento de temperatura. (B) Variação da energia com aumento da temperatura. (C) Gráfico de van't Hoff para os cálculos de ΔG^{25} , ΔH e ΔS .

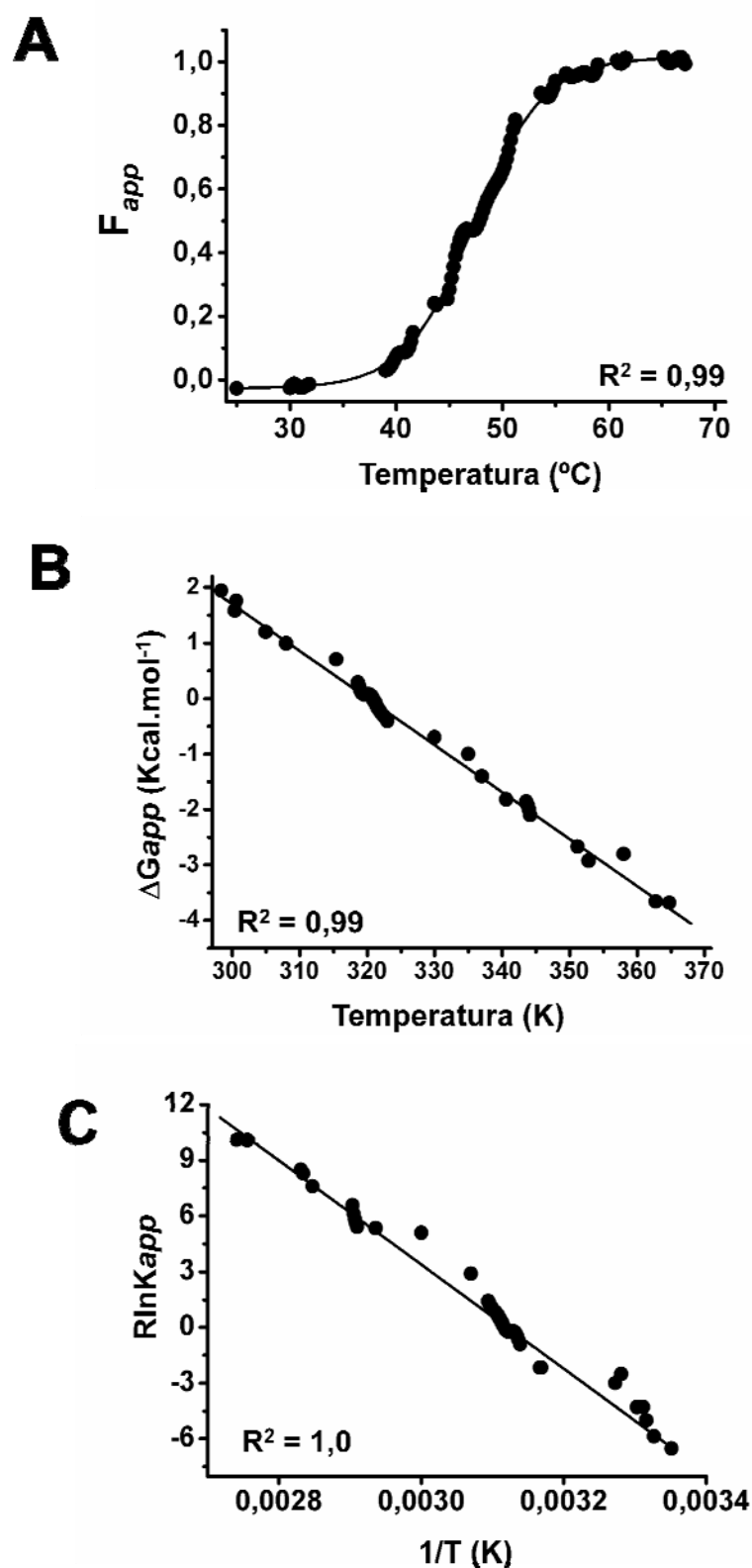


Figura 34. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-LI em pH 8,5. (A) Curva normalizada de equilíbrio de desnaturação induzida pelo aumento de temperatura. (B) Variação da energia com aumento da temperatura. (C) Gráfico de van't Hoff para os cálculos de ΔG^{28} , ΔH e ΔS .

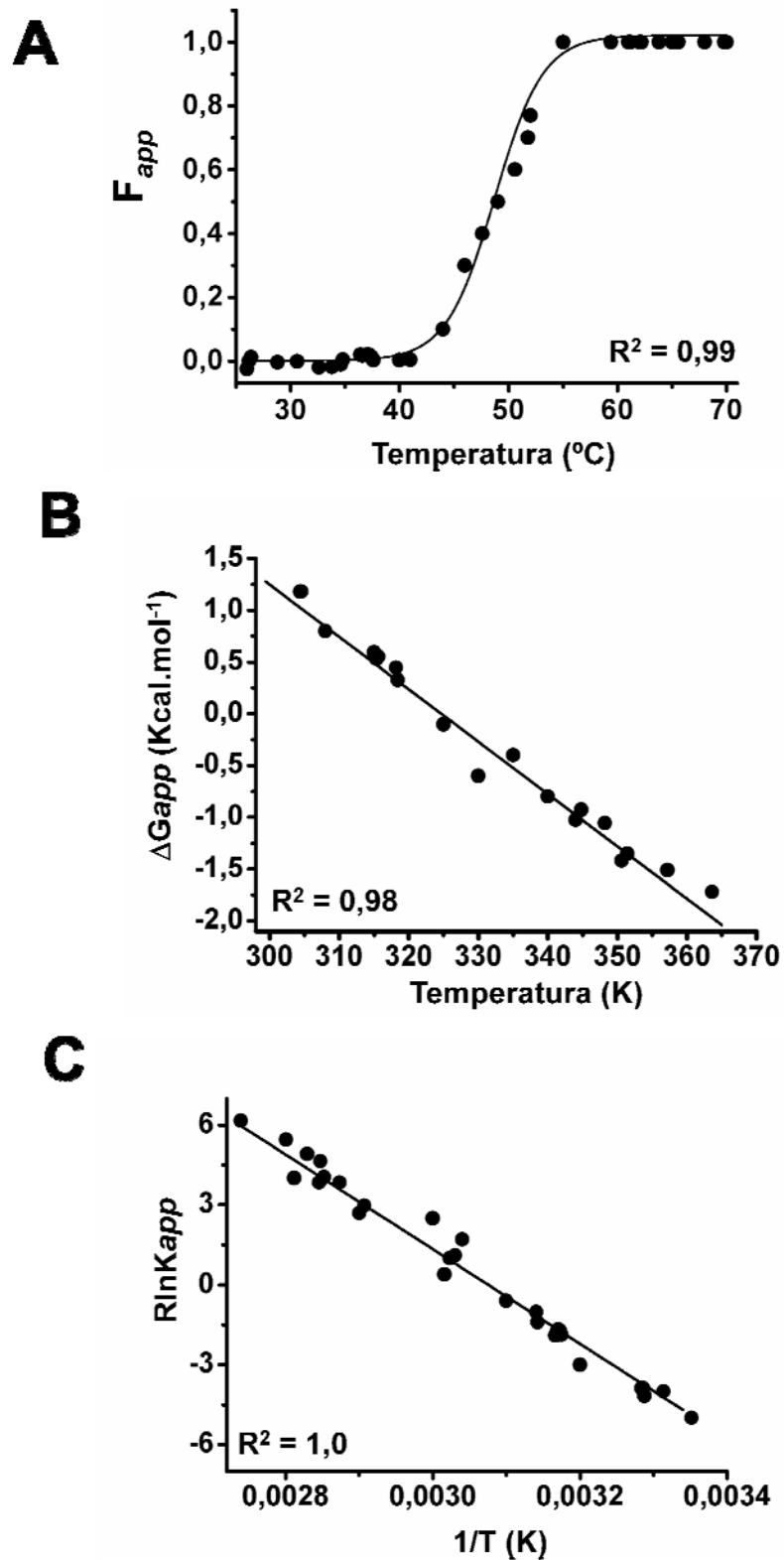


Figura 35. Curvas de desnaturação térmica da LAPr-LI em pH 9,0. (A) Curva normalizada de equilíbrio de desnaturação induzida pelo aumento de temperatura. (B) Variação da energia com aumento da temperatura. (C) Gráfico de van't Hoff para os cálculos de ΔG^{26} , ΔH e ΔS .

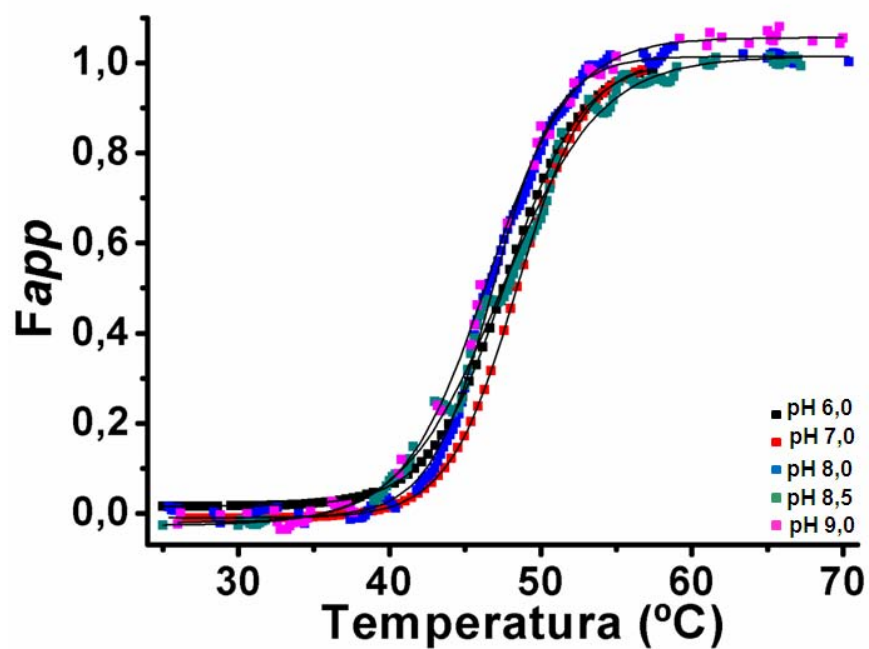


Figura 36. Curvas normalizadas de desnaturação induzida pelo aumento de temperatura em diferentes pHs.

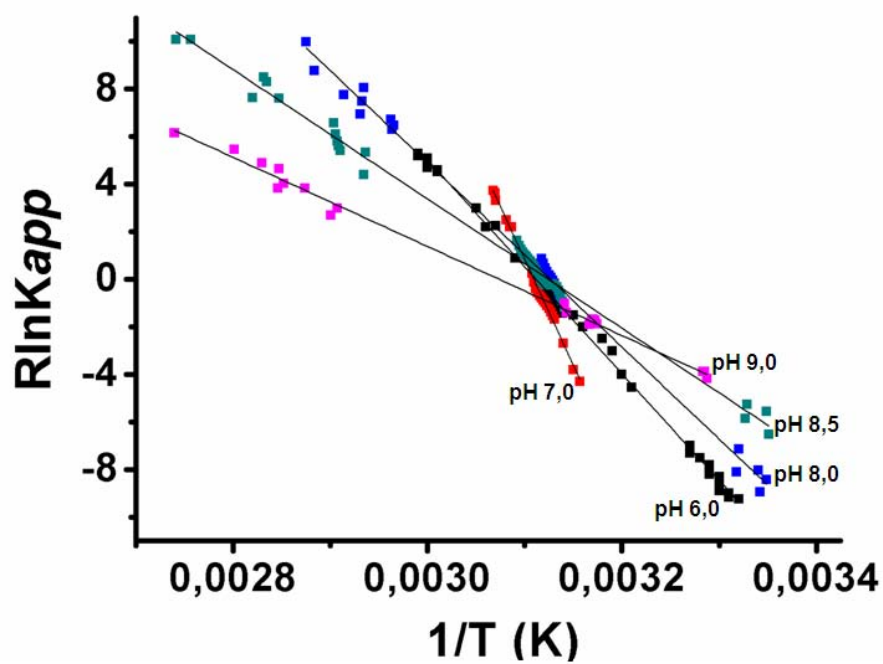


Figura 37. Gráfico de van't Hoff da LAPr-Li em diferentes pHs.

5.6.4. Desnaturação química

A estabilidade estrutural da LAPr-Li foi analisada também a partir de curvas de desnaturação química, utilizando concentrações crescentes de cloridrato de guanidina em solução aquosa, acompanhadas por DC UV próximo (Figura 38). A desnaturação é caracterizada quando os espectros tentem a zero, mostrando a perda do sinal dicróico proporcional a concentrações crescentes do agente desnaturante.

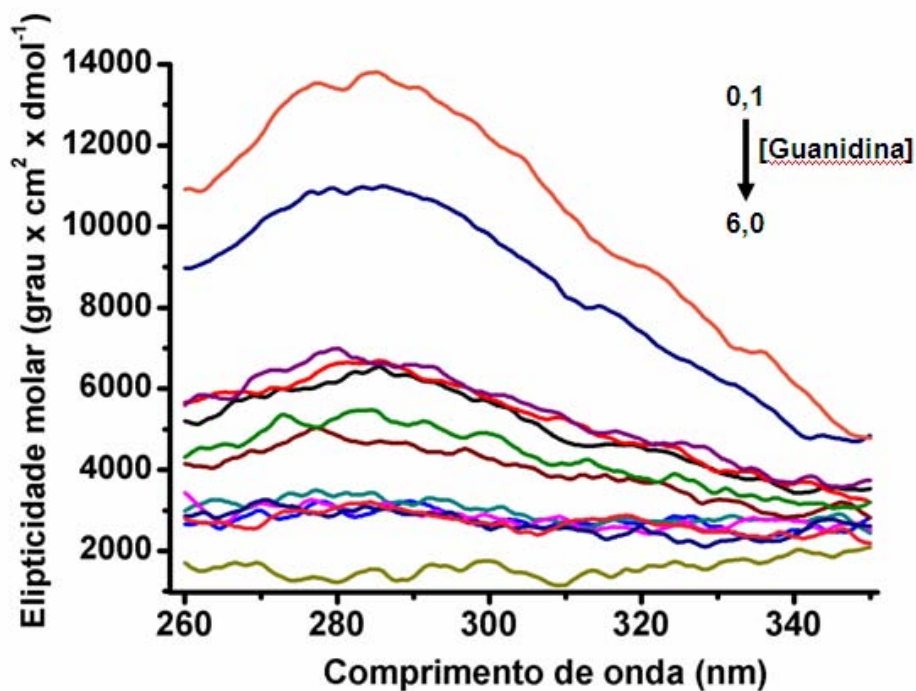


Figura 38. Espectros de dicroísmo circular da LAPr-Li (0,064 mg.mL⁻¹) em concentrações crescentes de cloridrato de guanidina, em água.

A curva de desnaturação foi obtida a partir do sinal dicróico fixo em 285 nm e em concentrações crescentes do desnaturante (Figura 39). A atividade enzimática da proteína diminui gradativamente com o aumento da concentração do desnaturante (Figura 39 inserida). Esses ensaios mostram a perda da estrutura e da função da proteína sob o efeito do cloridrato de guanidina. O pH

onde ocorreu essa desnaturação provavelmente deve ter sido entre 5,5 a 7,0, considerando a proteína em solução aquosa.

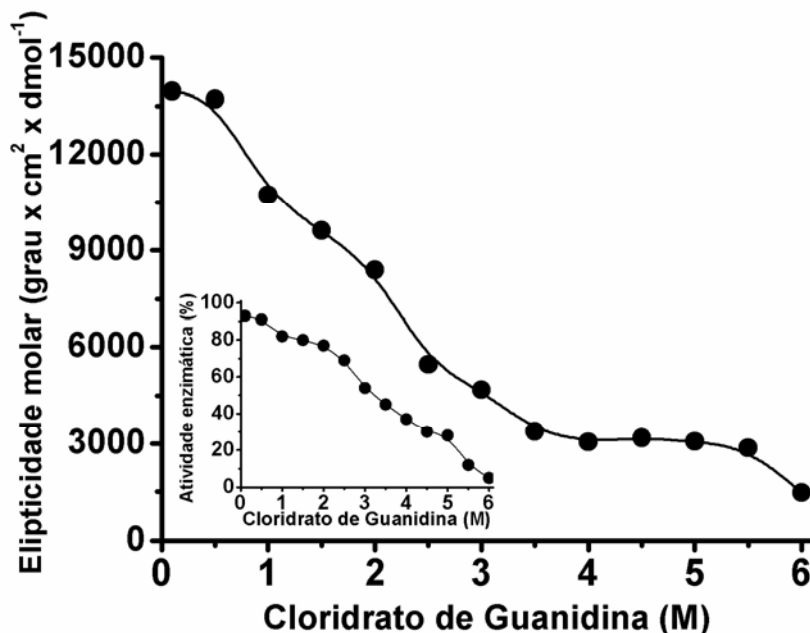


Figura 39. Curva de desnaturação da LAPr-Li em diferentes concentrações de cloridrato de guanidina em água. O sinal dicróico foi monitorado no comprimento de onda de 285 nm. A figura inserida mostra a atividade enzimática relativa da proteína em concentrações crescentes de cloridrato de guanidina em solução aquosa.

Essa curva foi ajustada de acordo com os valores da fração de proteínas no estado nativo e desnaturado (F_{app}) (Figura 40). As constantes de equilíbrio da transição do estado nativo para desnaturado foram estimadas e a partir dessas os valores de ΔG_{app} correspondentes a cada concentração de cloridrato de guanidina foram calculadas (Figura 41). O valor de ΔG_{H_2O} , que representa a energia livre estimada para a proteína na ausência do desnaturante, foi obtido a partir da extrapolação da curva de desnaturação (ΔG_{app} vs [desnaturante]). O ΔG_{H_2O} calculado a 25°C foi de 6,32 kcal.mol⁻¹ em pH aproximadamente de 7,0, considerando a água como solvente.

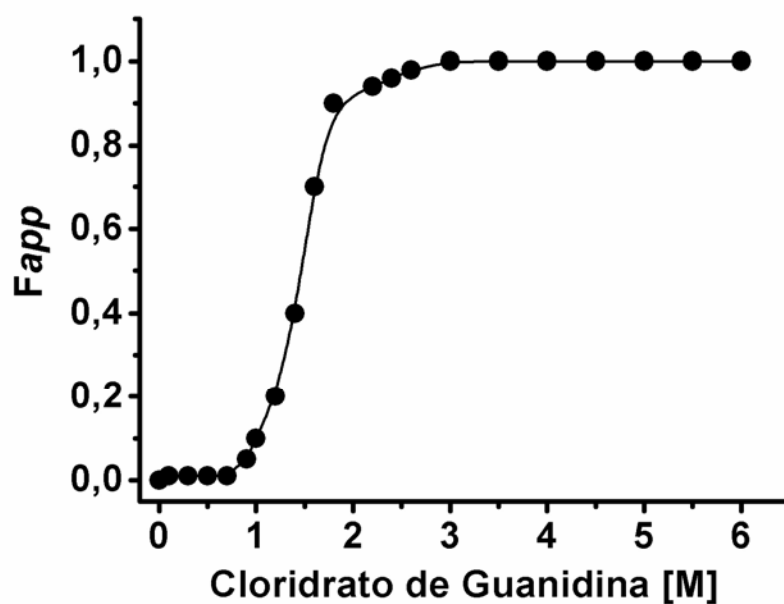


Figura 40. Fração de proteínas no estado nativo e desnaturado da LAPr-Li ($0,064 \text{ mg.mL}^{-1}$) em concentrações crescentes de cloridrato de guanidina em solução aquosa a 25°C .

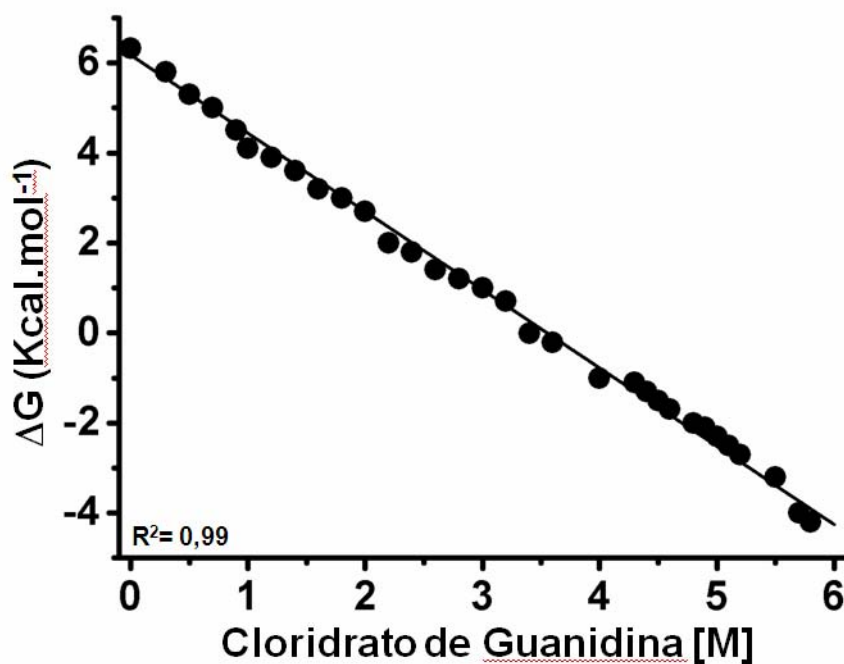


Figura 41. Variação de energia livre estimada para o desdobramento da LAPr-Li ($0,064 \text{ mg.mL}^{-1}$) em concentrações crescentes de cloridrato de guanidina a 25°C .

5.6.5 Renaturação da proteína

A renaturação da LAPr-Li foi acompanhada em soluções diluídas dessa proteína partindo-se de uma solução concentrada de cloridrato de guanidina (6 M) para uma solução de 0,5 M de guanidina (Figura 42). A proteína renaturou 50% indicado pela conversão do sinal dicróico nulo para sinal correspondente à metade do valor obtido para a proteína na ausência do desnaturante. A atividade enzimática foi restaurada em aproximadamente 30% (Figura 43). Essa atividade e a renaturação de 50% podem ser devidas ao residual de cloridrato de guanidina na concentração de 0,5 M.

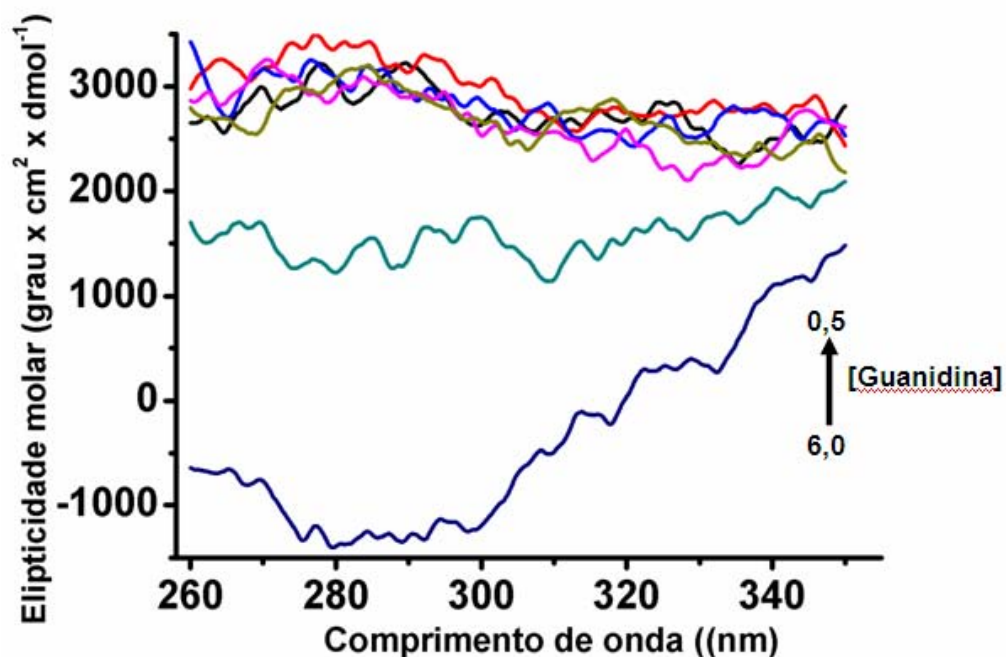


Figura 42. Espectros de dicroísmo circular de renaturação da LAPr-Li. Cada espectro corresponde a uma solução diferente da proteína com concentrações decrescentes de cloridrato de guanidina.

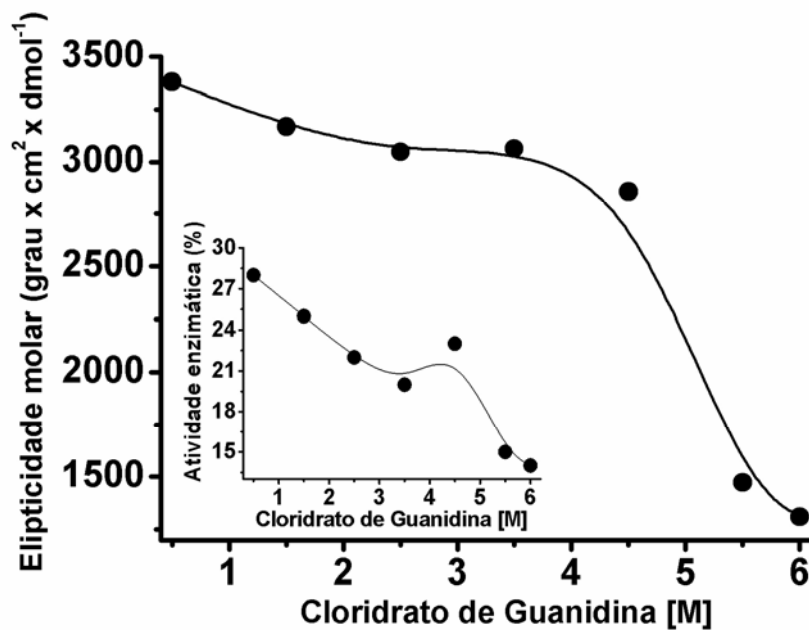


Figura 43. Sinal dicróico máximo da LAPr-Li de renaturação em diferentes concentrações de guanidina. A figura inserida mostra a atividade relativa da proteína em cloridrato de guanidina de 6,0 M a 0,5 M.

5.7. Cristalização da LAPr-Li

Os ensaios de cristalização da LAPr-Li foram realizados no sistema robotizado do LNLS e, até o presente momento, nenhum cristal foi encontrado. Alguns agregados já foram observados além de microcristais e cristais de sal que foram identificados por coleta de dados na linha de difração de raios-X MX2 do LNLS.

6. DISCUSSÃO

6.1. Expressão e purificação da LAPr-Li nativa

As amostras obtidas nas etapas de expressão e purificação da LAPr-Li nativa foram analisadas em géis de poliacrilamida 8% em condições desnaturantes, que mostram bandas coradas representando monômeros da proteína. A cromatografia de afinidade resulta em uma mistura de LAPr-Li na forma monomérica e oligomérica (hexâmeros, tetrâmeros, trímeros, etc). Portanto, a banda correspondente ao monômero, mostrada no gel, é devido à dissociação do hexâmeros por ação dos agentes desnaturantes, que promovem a ruptura das principais interações que mantém a proteína no estado oligomérico, como as ligações de van der Waals e de hidrogênio (Silva, 2008; Burley *et al*, 1990). O hexâmero é a forma ativa da molécula, ou seja, aquela que apresenta atividade enzimática e é, portanto, definida em todo o texto como a forma nativa da proteína.

Fatores como temperatura, concentração de IPTG e tempo de indução influenciam no processo de obtenção da proteína. A indução de proteína em tempo superior ao necessário acarreta formação de corpos de inclusão, o que é comum em expressão de proteínas recombinantes (Ventura *et al*, 2006). Além disso, altas concentrações de IPTG podem causar citotoxicidade nas bactérias, principalmente as da linhagem BL21-DE3 (Silva, 2008). O controle das condições de expressão e purificação da LAPr-Li foi feito como previamente descrito por Silva, 2008. A indução ocorre com IPTG 0,3 mM, suficiente para obtenção de quantidades elevadas da proteína na ordem de aproximadamente 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Outras enzimas citosólicas pertencentes à *E. coli* também foram expressas nesse

sistema, conforme pode ser visto no gel apresentado na figura 9. A proteína de interesse, a LAPr-Li, contendo a cauda de histidina, foi purificada por cromatografia de afinidade em resina contendo níquel ligado covalentemente (Figura 10).

O IPTG é um reagente utilizado para promover maior expressão de proteínas. Nesse trabalho, a quantidade de proteína expressada no meio induzido por IPTG 0,3 mM foi alta na fração solúvel e menor no meio não induzido (figura 9). O fato da LAPr-Li ser recuperada na forma solúvel em todas as condições corrobora com trabalhos que mostram que membros da família M17 são geralmente citosólicos (Gu *et al.*, 1999; Jösch *et al.*, 2003). A recuperação da fração de proteína solúvel foi por rompimento da parede do microorganismo através de um sonicador que emite ondas de ultrassom por meio de uma agulha em contato com a solução. A vibração do meio induz a lise do envoltório bacteriano, com consequente liberação dos componentes citosólicos.

A LAPr-Li pura é completamente eluída com imidazol 400 mM que compete pelos íons de níquel da resina, deslocando a proteína da coluna de afinidade (figura 10). A ligação entre a proteína e a resina permanece em concentrações de até 100 mM de imidazol. As lavagens realizadas nessa concentração foram necessárias para eliminar proteínas contaminantes que se ligam mais fracamente à resina.

Os hexâmeros (320 kDa) e monômeros (54 kDa) da LAPr-Li foram obtidos por cromatografia de exclusão molecular em FPLC utilizando a coluna Superdex G-200. As primeiras frações eluídas dessa cromatografia são as formas de maior massa molecular, correspondentes aos hexâmeros apresentando atividade catalítica (Figura 11). LAPs de outras espécies como *Plasmodium falciparum*, *E.*

coli e a bovina também apresentam atividade enzimática relacionada à estrutura hexamérica (Stack *et al*, 2007; Sträter *et al*, 1999 e Burley *et al*, 1991). Em todas as etapas de obtenção dessa proteína nas formas nativa (hexâmeros) e monomérica resultaram em amostras com grau de pureza e quantidade suficientes para o desenvolvimento de todo o trabalho estrutural discutido a seguir.

6.2. Caracterização da LAPr-Li nativa (hexâmeros) em diferentes pHs e temperaturas

Os sistemas tamponantes utilizados para os ensaios de atividade foram selecionados para as faixas de pH de interesse de estudo. O tampão acetato de sódio foi utilizado para os pHs entre 2,0-6,0 e Tris-HCl pHs 7,0-9,0. Em geral, LAPs da família M17 apresentam maior atividade em meio alcalino (Stack *et al*, 2007 e Dong *et al*, 2005). Similarmente, a atividade enzimática da LAPr-Li aumentou bruscamente com o aumento da alcalinidade do meio. O pH ótimo de atividade da enzima recombinante foi 8,5, corroborando com resultados obtidos por Silva, 2008. A redução da atividade em pH 9,0 sugere que a proteína está adaptada a pHs mais próximos ao do citosol bacteriano (pH 7,4-8,0) (Figura 12) (Wai *et al*, 1999). Os hexâmeros obtidos na etapa de purificação na temperatura de 25°C foram mantidos nessa forma até na temperatura ótima de 50°C.

O perfil de oligomerização da LAPr-Li foi monitorado pelo diâmetro hidrodinâmico da molécula em função da temperatura. Partindo-se de uma solução contendo somente monômeros, os hexâmeros foram obtidos principalmente na temperatura de 50°C, por associação desses monômeros nessas condições. O raio de 3,6 nm (diâmetro de 5,7 nm de acordo com Burley,

1990), determinado no início do experimento na temperatura de 25°C, confirma as formas monoméricas obtidas das frações coletadas da cromatografia em sistema FPLC (Tabela III). A quantidade de massa (%) representada na tabela III mostra a pureza das soluções utilizadas durante o experimento.

No ensaio catalítico a LAPr-Li apresentou maior atividade na temperatura de 50°C. As análises por espalhamento de luz dinâmica (ELD), nessa mesma temperatura, indicaram que os monômeros se associaram formando estruturas de 15,2 nm, com massa aproximada à do hexâmero. Além disso, os dados hidrodinâmicos revelaram que o aumento do diâmetro da proteína ocorre em virtude da expansão da camada de hidratação. A medida de raio é a medida de uma esfera hipotética com velocidade de difusão igual à da partícula analisada. Em ELD, o raio calculado a partir das propriedades difusionais da partícula é um indicativo do tamanho aparente da partícula hidratada (Shaw et al, 2006).

O ELD é uma técnica que permite a obtenção rápida dos resultados e menos destrutiva para amostras de macromoléculas (Borgstahl, 2007), quando comparado a outros métodos utilizados para análise de agregação, o tamanho e oligomerização de moléculas, como cromatografia de exclusão molecular, eletroforese em gel, espalhamento de raios-X a baixo ângulo e espalhamento de luz a ângulo fixo. No ELD as moléculas em solução encontram-se em movimento Browniano apresentando flutuações na intensidade da luz espalhada, ao ser iluminada por um laser. Essas flutuações são medidas por um detector a um ângulo de 90° em relação à luz do laser incidente. O movimento Browniano é o deslocamento difuso e randômico de partículas suspensas em solução. Esse movimento foi descrito por Robert Brown em 1827 que demonstrou a

dependência do tamanho da molécula analisada e das condições do meio em que ela se encontra como viscosidade e temperatura (Borgstahl, 2007).

O aumento do diâmetro da proteína em estudo foi proporcional à elevação da temperatura (Figura inserida na figura 14). Além do hexâmero, as formas agregadas foram obtidas a partir de 50°C, com diâmetros maiores que o esperado, heptâmero e octâmero. Essas formas tendem a um maior espalhamento da luz incidente do que as de menor massa molecular e não são espécies moleculares ativas. Elas aparecem principalmente em concentrações mais altas da proteína como a que foi usada no ensaio de oligomerização (14 μM). Em razão da presença desses agregados, essas amostras não apresentaram atividade enzimática comparada com aquelas utilizadas nos ensaios de atividade (1 μM). Diferentemente da solução da proteína em 14 μM , nessa concentração usada nos ensaios enzimáticos somente estruturas oligoméricas, como o hexâmero, são encontradas.

A concentração de 14 μM foi estimada pelo programa Dynamics V6 como a concentração ideal para análise dessa proteína por ELD. Na concentração mais baixa, a LAPr-Li mantém sua atividade relativamente alta entre 45-60°C. No entanto, com aumento da concentração e da temperatura, a proteína apresenta tendência à formação de agregados em solução, que leva à diminuição da solubilidade e, conseqüentemente, da atividade enzimática. Esses dados podem explicar a dificuldade de cristalização dessa proteína, como está apresentada no final dessa discussão. Essa dificuldade pode ser devido à tendência de formação desses agregados em concentrações superiores, como monômero na concentração de 14 μM e hexâmero na concentração de até 37 μM ,

concentração aproximada usada nos ensaios de cristalização no sistema robotizado do LNLS.

A temperatura ótima da LAPr-Li é de 50°C, mas apresenta também atividade significativamente alta a partir de 35°C até acima de 55%, que corresponde à temperatura de cultivo da bactéria *L. interrogans*. A temperatura e o pH ótimos estimados favorecem pesquisas futuras que visem a utilização dessa proteína em condições de atividade máxima, para aplicações biotecnológicas.

6.3. Alterações conformacionais da LAPr-Li monitorada pelo ambiente dos triptofanos

As variações de intensidade de emissão de fluorescência e o máximo de emissão dos resíduos de triptofanos em proteínas são atribuídos às diferenças nas formas dos anéis indol no estado excitado, e das interações que esse grupo pode fazer com componentes distintos em seus microambientes. As mudanças nos espectros de emissão fluorescente podem indicar alterações conformacionais da proteína em resposta a mudanças do meio, associação de subunidades, ligação de ligantes ou desnaturação da proteína por efeito de pH, temperatura e agentes químicos.

Para estudar mudanças conformacionais ou os ambientes estruturais de grupos aromáticos de proteínas, utiliza-se a técnica de atenuação de fluorescência por adição de agentes conhecidos como atenuadores. Esses compostos são de baixa massa molecular capazes de diminuir a intensidade de fluorescência por contatos com os grupos aromáticos no estado excitado. A facilidade com que esses grupos são apagados ou atenuados depende da exposição aos atenuadores ou apagadores de fluorescência, o que indica o

ambiente ao qual pertencem esses aromáticos ou modificações do meio onde ele se encontra.

A intensidade de fluorescência da LAPr-Li na ausência do atenuador, medida por fluorescência estática, foi proporcional à concentração de proteína utilizada (dados não mostrados). A iluminação constante a partir de um feixe de luz que incide na amostra continuamente permite registrar o espectro de emissão em nanosegundos, tempo compatível com o estado estacionário dos elétrons dos fluoróforos que atingem o estado excitado (Laskowski, 2004). O valor baixo da absorvância da proteína ($\leq 0,05$) utilizada nos experimentos evitou a ocorrência do “efeito do filtro interno” (Laskowski, 2004). Em altas concentrações da proteína, o fluoróforo absorve a energia de emissão no seu comprimento de onda de excitação, promovendo um falso resultado de atenuação de fluorescência (Subbarao *et al*, 1993).

A atenuação na intensidade de fluorescência, dependente da ação do atenuador com o fluoróforo, ocorre de duas maneiras: tipo colisional (atenuação dinâmica) e/ou estático. A atenuação dinâmica ocorre quando o atenuador interage com os fluoróforos da macromolécula por colisão. Isso acarreta diminuição da emissão de fótons pelo fluoróforo ao retornar ao estado fundamental. Na atenuação estática, o atenuador forma complexos não-fluorescentes com os fluoróforos suprimindo completamente a fluorescência da molécula. Esse complexo ao absorver luz, retorna ao estado fundamental sem emitir fótons (Lakowicz, 2004). Nesse trabalho utilizamos três tipos de atenuadores: acrilamida, cloreto de cézio e iodeto de potássio, sendo os três primariamente atenuadores por processo dinâmico.

A acrilamida é um composto polar não iônico que diminui a fluorescência principalmente por processo dinâmico, também conhecido por atenuação colisional, que pode ocorrer com o resíduo localizado na superfície ou no interior apolar da molécula. O iodeto de potássio e o cloreto de cério são compostos carregados negativa e positivamente, respectivamente, e capazes de atenuar a fluorescência por atenuação dinâmica ou colisional, a partir de interações com grupos ionizáveis no ambiente estrutural dos resíduos aromáticos, modificando dessa forma o espectro de fluorescência da proteína. Esses atenuadores apresentam cargas e tamanhos diferentes, e a utilização de cada um deles pode auxiliar na interpretação de dados de microambientes estruturais onde estão os grupos aromáticos de proteínas. A acrilamida apresenta alta capacidade de penetração na matriz protéica, e pode ser utilizada, devido a essa característica, em concentrações menores do que ensaios com I^- ou Cs^+ . Em contrapartida, os atenuadores carregados podem fornecer informações importantes sobre o ambiente em que se encontram os aromáticos das proteínas considerando a capacidade desses reagentes serem atraídos por forças eletrostáticas na molécula. Resumidamente, os espectros de atenuação de fluorescência da LAPr-Li em pH 8,5, utilizando os três tipos de atenuadores, mostram que ao redor dos aminoácidos aromáticos é encontrada maior proporção de resíduos carregados negativamente, o que favoreceu o efeito do $CsCl^+$, ao contrário do KI^- . Além disso, foram identificadas duas populações de triptofanos na proteína, sendo uma exposta e outra enterrada.

O iodeto tem carga negativa e promoveu uma redução mínima da intensidade de fluorescência indicando baixo ou nenhum acesso aos microambientes dos triptofanos (Figura 19). Em contraste, a adição de cloreto de

césio, atenuador de carga positiva, reduziu significativamente a intensidade de fluorescência, mostrando que o microambiente em que os resíduos de triptofanos da LAPr-Li se encontram é carregado negativamente (Figura 21). Nesse caso, os triptofanos podem estar envolvidos com interações não-covalentes com resíduos de aminoácidos de carga negativa e essas interações são perturbadas pela presença do atenuador, alterando o espectro de fluorescência. Os espectros apresentaram duas bandas de emissão, centradas em 332 nm e 342 nm, o que indica a presença de outra forma estrutural da LAPr-Li, além do hexâmero, ou outra conformação resultante da ação do atenuador.

A relação entre a concentração do atenuador e a intensidade de fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer. Essa relação permite a análise das diferentes populações de triptofanos presentes e a acessibilidade do fluoróforo ao atenuador em uma proteína a partir da forma da curva e também pelos valores das constantes de atenuação de Stern-Volmer (K_{sv}). Nesse caso, valores de K_{sv} altos ($> 8,0 \text{ M}^{-1}$) e baixos ($< 8,0 \text{ M}^{-1}$) indicam a acessibilidade e o enterramento dos resíduos de triptofanos, respectivamente. O desvio da linearidade é frequentemente encontrado para atenuação da emissão de fluorescência de triptofano com atenuadores polares ou carregados (Lakowicz, 2004). Quando resulta em uma reta, está ocorrendo um só tipo de atenuação, estática ou dinâmica, indicando uma única classe de fluoróforos igualmente acessíveis ao atenuador. Quando ocorre uma curvatura para cima, estão ocorrendo os dois tipos de atenuação na mesma molécula pelo mesmo atenuador (Lakowicz, 2004).

Outros ensaios de atenuação de fluorescência, variando as condições do solvente, temperatura, presença de ligante, de cofatores, de inibidores, de

substratos, de íons, etc., podem ser realizados e a partir das formas das curvas e das constantes de atenuação, podemos relacionar as mudanças estruturais na proteína em função dessas variações e sua função. Nesse trabalho limitamo-nos a estudar o ambiente do triptofano em pH 8,5, onde a proteína apresenta maior atividade, e também variando a força iônica. Outros ensaios variando o pH, a temperatura e a presença de ligantes estão previstos para ser realizados visando à complementação do estudo do efeito do pH, temperatura e ligantes específicos na estrutura da LAPr-Li.

O microambiente em que se encontram os resíduos de triptofano da LAPr-Li influenciou na redução da intensidade de fluorescência de LAPr-Li por acrilamida, atenuador de carga neutra. Concentrações maiores de acrilamida (0,14 μM) promoveram perturbação na estrutura da proteína, indicada pelo deslocamento de banda dos espectros de emissão para comprimentos de onda menores, efeito hipocrômico (de 332 nm para 330 nm), correspondendo ao deslocamento dos triptofanos para ambientes menos hidrofílicos.

O ajuste desses dados resultou em uma curva voltada para o eixo da ordenada indicando a ocorrência de dois tipos de atenuação. As constantes de atenuação dinâmica e estática foram calculadas a partir dos ajustes da curva considerando duas populações de triptofanos, a partir da equação clássica e modificada de Stern-Volmer. Esses dados confirmaram o tipo preferencial da atenuação ocasionada pela acrilamida e as constantes K_{sv} mostraram a presença das duas populações de triptofanos, uma mais enterrada e outra exposta ao meio em que se encontra e de fácil acesso do atenuador.

A utilização de atenuadores carregados permite caracterizar o microambiente em que os resíduos de triptofanos se encontram. O agente iodeto

de potássio não apresentou redução da intensidade de fluorescência significativa, enquanto que o cloreto de céσιο resultou em forte atenuação. O Iodeto é um atenuador carregado negativamente enquanto que o céσιο é positivo. A baixa atenuação por iodeto sugere que os triptofanos da molécula encontram-se, em sua maioria, internos à estrutura hexamérica. Apesar de existir uma população mais exposta, como foi comprovado por acrilamida, os aminoácidos próximos aos triptofanos são carregados negativamente, impedindo o acesso do atenuador negativo por repulsão e atraindo o de carga positiva. O ajuste para duas populações de triptofanos foi feito para atenuação por Cs^+ , confirmando o resultado obtido por acrilamida.

A seguir serão discutidos os dados referentes à estabilidade estrutural da LAPr-Li, em diferentes valores de pH e temperatura, utilizando as técnicas de fluorescência e dicroísmo circular. Esses dados foram obtidos visando ao estudo da estabilidade da proteína em condições diferentes do solvente.

Proteínas em solução podem sofrer ação de uma série de agentes químicos ou físicos que acarretam mudanças conformacionais que podem afetar a atividade biológica dessas. Essas modificações estão relacionadas com as interações intramoleculares que estabilizam a estruturas da proteína, além das ligações dissulfeto. O rompimento dessas interações pode levar a mudanças na mobilidade de resíduos que aparecem enterrados podendo tornar periodicamente expostos e o surgimento de outras interações não covalentes, alterando a conformação da proteína. Em muitos casos, essas alterações estruturais são importantes para a dinâmica funcional de proteínas, mas muitas vezes o reposicionamento de átomos pode levar à perda da função biológica da molécula.

As alterações estruturais mencionadas estão diretamente relacionadas com a estabilidade das proteínas. A determinação das condições ótimas do meio (solvente) é fundamental para preservação da estrutura e função dessas moléculas. Uma das formas de definirmos essas condições é submeter a proteína a ensaios de desnaturação e renaturação e calcular, a partir de curvas de desdobramentos, parâmetros termodinâmicos que indicam o grau de estabilidade estrutural da macromolécula. Para esses procedimentos, podemos utilizar agentes desnaturantes como temperatura, pH e reagentes químicos como cloridrato de guanidina e ureia. Esses induzem o desdobramento de proteínas globulares e também oligoméricas, podendo passar, durante o desdobramento, por várias fases, com a estabilização de intermediários parcialmente desdobrados até a proteína completamente desnaturada. Os parâmetros termodinâmicos estão relacionados com o rompimento das interações não covalentes (termo entálpico) e com o grau de liberdade dos átomos e a reorganização estrutural durante o processo de desdobramento (termo entrópico). O valor da energia livre da molécula no desdobramento é decorrente da contribuição desses dois termos e indica o quanto a molécula é estável nas condições em que foi realizado o dobramento.

A desnaturação da LAPr-Li foi monitorada por medidas de fluorescência e dicroísmo circular em função do pH, de cloridrato de guanidina e da temperatura. O efeito do pH sobre a fluorescência intrínseca pode indicar mudanças conformacionais e a maior ou menor exposição dos triptofanos, devido a mudanças na polaridade do meio e da proteína. A diminuição do comprimento de onda indica a exposição dos triptofanos para ambientes mais polares. Em pHs de 3-5 alguns resíduos ácidos, como ácido aspártico e ácido glutâmico, são

protonados podendo resultar em mudanças nas propriedades de solvatação da proteína, como também na ruptura das interações eletrostáticas, como pontes salinas e ligações de hidrogênio que estabilizam estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. O mesmo efeito pode ocorrer em meios alcalinos, resultando em ionização de cadeias laterais ou desprotonação de aminoácidos como a histidina, tirosina e meios extremamente alcalinos, como os aminoácidos lisina e arginina. Todas essas alterações provocadas pela diferença do estado iônico levam a mudanças conformacionais ou mesmo a desnaturação da proteína, que podem ser registradas nos espectros de dicroísmo circular e fluorescência.

As medidas dos espectros de DC em diferentes temperaturas e pHs indicaram alterações ocasionadas na estrutura da LAPr-Li nativa dependentes desses dois fatores. As atividades de cada amostra foi testada e apesar do perfil entre os pHs 5,0 e 8,5 ser semelhante, a atividade da enzima em seu pH 8,5 (pH ótimo) foi maior que em pH baixo (Figura 13). A queda da atividade a partir de 45°C (pH 7,0) e 60°C (pH 5,0 e 8,5) ocorre devido a mudanças conformacionais, principalmente pelo efeito da temperatura que aumenta o grau de liberdade dos átomos e a ionização de cadeias laterais dos aminoácidos decorrentes da variação do pH do meio.

Os resultados apresentados na figura 28 sugerem que a estrutura da LAPr-Li mantém-se estável (indicada pelos espectros de CD, figuras 26 e 29A e B) e ativa nos dois pHs 5,0 e 8,5 e menos ativa em pH 7,0, ação dependente também da temperatura. Porém, o arranjo estrutural no pH 5, ocasionado principalmente pela ionização de cadeias laterais de histidinas e de ácido glutâmico, promove alterações do estado iônico da molécula, da solvatação e

modificações conformacionais decorrentes de ruptura e reorganização de outras interações não covalentes que levam à diminuição (75%) da atividade da enzima quando comparada com a atividade em pH 8,5 (95%). No entanto, como discutido a seguir, essas mudanças da proteína no pH 5,0 resultaram no aumento da estabilidade estrutural (Figura 29A), em contraste com a diminuição em 20% da atividade enzimática comparada com a atividade no pH 8,5 em 50°C.

6.4. Estabilidade estrutural da LAPr-Li associada à atividade analisadas por DC

O dicroísmo circular é um fenômeno óptico que ocorre pela diferença entre a medida da absorvância da luz circularmente polarizada em duas direções (para a esquerda e para a direita) que incide sobre uma solução de moléculas de caráter assimétrico. Essa técnica possibilita o estudo estrutural de macromoléculas, apresentando vantagens como necessidade de pouca quantidade de amostra, proporciona medidas rápidas em solução e não é destrutiva à amostra, excetuando as amostras submetidas à desnaturação térmica. Espectros de dicroísmo circular na região próxima do UV (260-360 nm) fornecem informações estruturais referentes à estrutura terciária enquanto que na região UV distante do visível (185-260 nm) fornecem informações das estruturas secundárias e mudanças conformacionais de proteínas.

As leucil aminopeptidases bacterianas apresentam domínios constituídos, em sua maioria, por α -hélices (Lin *et al*, 2004). Similarmente, a LAPr-Li é predominantemente formada por estruturas α -hélice (44,7%), apresentando apenas 11% de folhas- β em pH 8,5 a 25°C. A estrutura tridimensional de duas LAPs conhecidas, baseando-se em três descritas no PDB (Sträter *et al*, 1999;

Burley *et al*, 1991 e Minasov *et al*, a ser publicado”) é organizada em dímeros de trímeros, formando a estrutura hexamérica.

Os espectros de dicroísmo circular mostram a estabilidade da LAPr-Li em diferentes pHs e temperaturas. A elevação da temperatura para 50°C no pH 8,5 induziu modificações na estrutura secundária da proteína, provavelmente extensiva à estrutura tridimensional, principalmente pela redução de ~ 42% para 32% do conteúdo de α -hélice e um aumento de 11,3% para 15% de estruturas folhas- β (Figura 30). Essas modificações sugerem dependência da atividade enzimática associada à nova conformação adotada pela LAPr-Li nesta temperatura, considerada condição ótima para atividade da proteína (pH 8,5 e temperatura de 50°C).

A estrutura da LAPr-Li apresentou alta estabilidade em meio ácido (pH 3,0 e 5,0) quando submetida a altas temperaturas (25-95°C), em conformidade com nenhuma mudança conformacional observada (Figuras 26 e 29A). Porém, nessas condições, a proteína apresentou baixa atividade indicando a necessidade de outras condições iônicas, por desprotonação de aminoácidos e mudanças do padrão das interações não covalentes, e de maior flexibilidade da molécula para a catálise. A estabilidade em pH 5,0 é confirmada pelos espectros coletados com mesmo sinal dicroico em todas as temperaturas analisadas (Figura 29A).

Os valores dos parâmetros termodinâmicos indicaram que em pH 6,0 e 7,0, a proteína preserva sua estrutura nativa até 40°C e desnatura-se completamente a partir de 55°C-95°C, apresentando os maiores valores para ΔH_m (44,939 kcal.mol⁻¹ e 88,880 kcal.mol⁻¹, respectivamente) e ΔG^{25} (3,517 kcal.mol⁻¹ e 6,632 kcal.mol⁻¹, respectivamente - Tabela VIII). Os valores mais altos para ΔH_m mostram que a proteína foi completamente desnaturada com rompimento da

maioria das interações não covalentes, o que foi indicado pela diminuição progressiva do sinal dicróico até próximo de zero (Figura 26). Os valores de ΔG^{25} obtidos nesses pHs são compatíveis com os valores obtidos para proteínas de alta estabilidade estrutural, com valores da energia livre de 5 a 15 kcal.mol⁻¹ (Tabela VIII) (Pace, 1990).

Em pH 8-9 a proteína não se desnaturou completamente e curva de desnaturação foi típica de dissociação e desnaturação parcial, uma vez que o sinal dicróico diminuiu sem no entanto chegar a valores próximos de zero. Os espectros de DC registrados de 25-95°C mostram que além das modificações no conteúdo das estruturas secundárias, ocorre redução da elipticidade molar sem que essa seja anulada (Figura 29B). O espectro de desnaturação em pH 9,0 apresenta uma leve redução de elipticidade com a variação da temperatura, confirmando que a proteína não foi desnaturada completamente. Quando a temperatura atinge ~50°C, ocorreram mudanças conformacionais que conforme os ensaios de atividade enzimática, dependente da temperatura, são necessárias para o aumento da atividade da enzima. Essa flexibilidade da LAPr-Li na temperatura de ~50°C promove rupturas e reorganização das interações não covalentes no meio em que se encontra, que parecem ser fundamentais para a atividade da enzima nesse pH de 8,5. Os valores de ΔG^{25} encontrados nos pH 8,0, 8,5 e 9,0, considerando as curvas de desnaturação térmica de 25-95°C, foram baixos, uma vez que corresponderam somente a energia livre de Gibbs resultante do processo de desnaturação parcial da enzima ou mesmo a dissociação do hexâmero em temperaturas mais elevadas. Por essa razão, a LAPr-Li, nesses pHs foi considerada muito mais estável do que nos pHs 6,0 e

7,0, onde a proteína foi desnaturada completamente com o aumento da temperatura.

A estabilidade da LAPr-Li também foi analisada a partir de uma curva de desnaturação química, utilizando o cloridrato de guanidina, em solução aquosa. Nesse caso, as curvas foram obtidas de espectros de CD UV próximo ao visível (350-260 nm), que permitem analisar mudanças na estrutura terciária de proteínas (Khurama *et al*, 2001). Amostras solubilizadas em cloridrato de guanidina em altas concentrações tendem a absorver na faixa do UV distante aumentando o ruído dos espectros e a voltagem no equipamento. Por essa razão a curva de desnaturação química da LAPr-Li na forma hexamérica foi analisada na faixa do UV próximo. A concentração da proteína foi 0,064 mg.mL⁻¹ (0,2 µM) para evitar também o ruído nos espectros. Em soluções muito concentradas, a absorção da amostra é maior, reduzindo a quantidade de luz que chega ao detector. Isso leva a um aumento da voltagem e, conseqüentemente, do ruído dos espectros.

A curva de desnaturação foi obtida a partir do sinal dicróico fixo em 285 nm e em concentrações crescentes do desnaturante (Figura 39). O processo de desnaturação foi evidente com a diminuição gradativa do sinal dicróico com a adição do agente desnaturante. Os dados foram normalizados e o valor da energia livre, na ausência do agente desnaturante, foi calculado em 6,32 kcal.mol⁻¹. Esses dados coincidiram com os valores obtidos para o ΔG^{25} nos pHs 6,0 e 7,0, uma vez que essa desnaturação química foi realizada em solução aquosa, cujo pH é próximo de 6,5. Além disso, esse resultado corrobora toda a discussão descrita sobre a estabilidade da proteína nessa faixa de pH.

Os ensaios de renaturação da LAPr-Li foram realizados para analisar a reversibilidade do processo de desnaturação, a partir de amostras dialisadas até a concentração de cloridrato de guanidina de 0,5 M. A renaturação foi de aproximadamente 50%, apresentando atividade menor que 50%, em virtude da presença do desnaturante em baixa concentração. Nessa concentração de cloridrato de guanidina (0,5 M) as interações não covalentes podem ser parcialmente rompidas alterando a estrutura da proteína e a atividade enzimática. Os processos de desnaturação e renaturação ocorrem para a maioria das proteínas estudadas, restabelecendo-se as interações não covalentes na ausência do desnaturante (Bolen *et al*, 2008). Para comprovação desse dado, ensaios complementares com renaturação da proteína na ausência total do desnaturante são necessários.

6.5. Cristalização da LAPr-Li

A estrutura molecular da LAPr-Li na forma de hexâmero dificulta o processo de cristalização. Essa etapa é dependente da mobilização da molécula nativa e organizada estruturalmente, preferencialmente na forma de monômeros, em diferentes condições. A cristalização da LAPr-Li ainda não foi concluída talvez por essa razão e também por ser uma proteína de alta massa molecular, apresentando maiores dificuldades para se organizar de forma cristalina. Outra possibilidade está relacionada à flexibilidade da estrutura quando em solução. Como discutido acima, a LAPr-Li em solução, apresenta dinâmica conformacional em condições ideais do meio necessária para o desempenho de sua atividade. As placas contendo a proteína em solução continuam acondicionadas em uma

sala com temperatura devidamente controlada (18°C) e estarão sendo monitoradas periodicamente. Uma alternativa para obter esses cristais é complexar a proteína com seu substrato ou com inibidores. Esta etapa será realizada futuramente.

7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados acima descritos permitiu concluir que:

1. A LAPr-Li foi significativamente expressa a 20°C por indução com IPTG 0,3 mM no citosol de *E. coli* BL21-DE3. Monômeros e hexâmeros são eluídos por cromatografia de afinidade e separados por exclusão molecular, a 25°C.
2. A LAPr-Li apresenta atividade ótima na forma hexamérica em pH 8,5 e temperatura 50°C. A partir de 65°C, ocorre redução de atividade devido à formação de agregados.
3. Hexâmeros, de diâmetro 15,2 nm, são obtidos a 50°C, partindo-se de uma solução monomérica e apresentam estrutura secundária com 44,7% α -hélice e 11,6% por folhas- β . Os monômeros apresentam sítio ativo não-funcional, isoladamente.
4. A LAPr-Li apresenta duas populações distintas de triptofanos: uma exposta e outra enterrada, ambas de caráter negativo. O cloreto de céσιο apresentou maior acesso aos resíduos de triptofanos quando comparado ao iodeto de potássio, carregado negativamente. As constantes de atenuação de fluorescência para o céσιο foram $K_{SV1} = 38,6 \text{ M}^{-1}$ e $K_{SV2} = 6,4 \text{ M}^{-1}$ e para iodeto $K_{SV1} = 4,4 \text{ M}^{-1}$ e $K_{SV2} = 0,4 \text{ M}^{-1}$. A atenuação de fluorescência da LAPr-Li ocorre predominantemente por atenuação colisional. O aumento da força iônica ocasionou mudanças no padrão das interações não covalentes da proteína e favoreceu a atração eletrostática entre o I^- e os Trp.
5. A elevação da temperatura para 50°C em pH 8,5 induziu modificações na estrutura secundária e, conseqüentemente, na conformação da proteína. Nessas condições, a enzima apresenta maior flexibilidade que parece ser

fundamental para a atividade catalítica. A 50°C é observada redução de estruturas α -hélice e aumento de estrutura randômica.

6. A LAPr-Li mostrou maior estabilidade estrutural em meio ácido, sem sofrer desnaturação quando submetida a altas temperaturas. Em pH alcalino, ocorre desnaturação parcial, resultando em mudanças conformacionais associadas à atividade enzimática. Foram obtidos valores de ΔG^{25} mais baixos ($\sim 2,0 \text{ kcal mol}^{-1}$) em pH alcalino comparados àqueles obtidos nos pHs 6,0 ($3,52 \text{ kcal mol}^{-1}$) e 7,0 ($6,63 \text{ kcal mol}^{-1}$), onde a proteína se desnaturou completamente, apresentando, portanto, maior valor de ΔH_m .
7. A desnaturação química, utilizando cloridrato de guanidina em água, apresentou valor de ΔG_{H_2O} de $6,32 \text{ kcal mol}^{-1}$, coincidindo com os valores obtidos para o ΔG^{25} no pH 7,0, uma vez que essa desnaturação química foi realizada em solução aquosa, cujo pH é próximo de 6,5.
8. A LAPr-Li foi renaturada em $\sim 50\%$ em cloridrato de guanidina na faixa de 6,0-0,5 M apresentando 30% de atividade enzimática restaurada nessas condições, devido à presença do desnaturante em baixas concentrações.
9. A cristalização da LAPr-Li ainda não foi concluída por ser uma etapa dependente da mobilização da molécula nativa. A LAPr-Li é uma proteína de alta massa molecular e em solução apresenta dinâmica conformacional dificultando ainda mais sua organização de forma cristalina.
10. Os ensaios de atenuação de fluorescência com monômeros e hexâmeros estão em andamento, em diferentes condições de pH, temperatura, presença do substrato, e íons, visando ao estudo das mudanças conformacionais ocasionadas por esses agentes e a estabilidade da enzima nessas condições. Esses estudos poderão fornecer informações importantes

para escolher uma estratégia de cristalização da proteína. Estudos de estabilidade no pH associado com guanidina em baixas concentrações também estão sendo realizados para comprovar maior estabilidade da proteína em pH 8,5.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, M. et al.** (2006). Puromycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase (PILSAP) is required for the development of vascular as well as hematopoietic system in embryoid bodies *Genes to Cells*, **11**, 719-729.
- Abuauad, A. et al. Leptospirosis: Report of a fulminant fatal case and review. *Rev. chil. infectol.* (2005) vol.22, no.1, p.93-97. ISSN 0716-1018.
- Adler, B. et al. (2009). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
- Arima, J. et al. (2005). Alteration of Leucine Aminopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2 to Phenylalanine Aminopeptidase by Site Directed Mutagenesis. p. 7229–7235 Vol. 71, No. 11, doi:10.1128/AEM.71.11.7229–7235.2005.
- Bandyopadhyay, et al. (2007). Functional and spatial analysis of the PM aminopeptidase At APM1 supports a role in membrane targeting. *Integrative Plant Physiology*.
- Balerna, M. et al (1974). Thermophilic aminopeptidase from *Bacillus stearothermophilus*. IV. *Int. J. Pept. Protein Res.* 6:499-514.
- Bharti, A.R. et al. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global Importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757–71.
- Blanco, R.M. et al. (2009). Leptospiral glycolipoprotein as a candidate antigen for serodiagnosis of human leptospirosis. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254.
- Bohm, G. et al. (1992). Quantitative analyses of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks, *Prot. Engin.* 5 191–195.

- Bolen, D.W. *et al.* (2008). Structure and Energetics of the Hydrogen-Bonded Backbone in Protein Folding. *Annu. Rev. Biochem.*, 77:339–62.
- Borgstahl, G. E. O. (2007). How to use Dynamic Light Scattering to improve the likelihood of growing macromolecular crystals. Chapter 6. From: *Methods in Molecular Biology*, vol. 363: *Macromolecular crystallography protocols: volume 1: Preparation and crystallization of macromolecular* edited by: 5. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Brenner, D.J. *et al.* (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2: 839–58.
- Burley, S.K. *et al.* (1990). Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Biochemistry*, Vol. 87, pp. 6878-6882.
- Burley, S.K. *et al.* (1991). Leucine aminopeptidase: bestatin inhibition and a model for enzyme-catalyzed peptide hydrolysis. *Biochemistry*, Vol. 88, 6916-6920.
- Camacho, *et al.* (2007). Biochemical characterization and structural prediction of a novel cytosolic leucyl aminopeptidase of the M17 family from *Schizosaccharomyces pombe*, *FEBS Journal* 274, p. 6228-6240.
- Cappiello, M. *et al.* (2004). New role for leucyl aminopeptidase in glutathione turnover. *Biochem J.*, 15; 378(Pt 1): 35–44. doi: 10.1042/BJ20031336.
- Carvalho, E. *et al.* (2004).** GLUT4 Overexpression or Deficiency in Adipocytes of Transgenic Mice Alters the Composition of GLUT4 Vesicles and the Subcellular Localization of GLUT4 and Insulin-responsive Aminopeptidase *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, Issue 20, 21598-21605.

- Chao, J.T. *et al.* (2003). Isolation and Characterization of the Neutral Leucine Aminopeptidase (LapN) of Tomato, *Plant Physiology* , Vol. 132, pp. 243–255.
- Constam, D.B. *et al.* (1995). Puromycin-sensitive Aminopeptidase Sequence Analysis, Expression, and Functional Characterization,** Volume 270, Number 45, Issue of November 10, pp. 26931-26939 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
- Cullen, P.A. *et al.* (2002). **Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai.** *Infect Immun.*, **70**:2311-2318.
- Cullen, P.A. *et al.* (2003). **LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species.** *Infect Immun.*, **71**:2414-2421.
- Dolhnikoff, M. *et al.* (2007). **Leptospiral pneumonias.** *Curr Opin Pulm Med.*, **13**:230-235.
- Dong, L. *et al.* (2005). The leucyl aminopeptidase from *Helicobacter pylori* is an allosteric enzyme. *Microbiology*. V.151, p.2017-2023.
- Eftink, M.R. *et al.* (1981). Fluorescence Quenching Studies with Proteins. Review, *Analytical Biochemistry*, 114, 199-277.
- Erhardt, S., *et al.* (2005). *A Water Sluice is Generated in the Active Site of Bovine Lens Leucine Aminopeptidase*, *J. AM. CHEM. SOC.*, 127, 3654-3655.
- Gavigan, C. S.*et al.* (2001). The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117:37-48.
- Gebriel, A.M. *et al.* (2006). **The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens.** *Trop Biomed.*, **23**:194-207.

- Gilliland, G. L. *et al.* (1994). *Acta Cryst. D*.50,408–413.
- Goto, Y. *et al.* (2006). Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase-. *FEBS Letters* 580 1833–1838.
- Grembecka, J. *et al.* (2003). The most potent organophosphorus inhibitors of leucine aminopeptidase. structure-based design, chemistry, and activity, *Journal Medical Chemistry*, 46, 2641-2655.
- Gu, Y.Q. *et al.* (2002). Overexpression, purification and biochemical characterization of the wound-induced leucine aminopeptidase of tomato. *Eur. J. Biochem.* 263, 726-735.
- Guia de Vigilância Epidemiológica, Volume II, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, 2002.
- Haake, D.A. *et al.* (2002). Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun* 2002;70:4936-45.
- Holz, R.C. *et al.* (2003). Co-catalytic metallopeptidases as pharmaceutical targets. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7:197–206 .
- Jaime, E. *et al.* (2007). On the origin of the broad-band selectivity of bovine lens-leucine-aminopeptidase, *ARKIVOC*, p. 77-95.
- Jancarik, J. *et al.* (1991). *Appl. Cryst.* 24,409-411.
- Jancarik, J. *et al.* (2004). Optimum solubility (OS) screening: an efficient method to optimize buffer conditions for homogeneity and crystallization of proteins. *Acta Cryst. D*. 60,1670.

- Jösch, C. *et al.* (2003). Identification of Cytosolic Leucyl Aminopeptidase (EC 3.4.11.1) as the Major Cysteinylglycine-Hydrolysing Activity in Rat Liver. *Biological Chemistry*, 384, 2, 213–218, DOI: 10.1515/BC.2003.023.
- Junior, C. *et al.* (2004). Hemoptysis as a clinical manifestation of a thoracic aortic aneurysm. *Rev. Col. Bras. Cir.*, vol.31, n.4, pp. 276-277. ISSN 0100-6991. doi: 10.1590/S0100-69912004000400014.
- Kanaujia, S. P. *et al.* (2007). *Acta Cryst. F.* 63, 27–29.
- Kim, H. *et al.* (1993). Differentiation and identification of the two catalytic metal binding sites in bovine lens leucine aminopeptidase by x-ray crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry*, v. 90, p. 5006-5010.
- Kim, H. *et al.* (1994). Structure and mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase. *Adv Enzymol. Relat Areas Mol Biol* 68, 153–213.
- Koizumi, N. *et al.* Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 2004;22:1545-52
- Khurama, R. *et al.* (2001). Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry*, 40, 3535-3535.
- Laskowski, J. R. (2004). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer. 2^a ed. 698.
- Lin, Y.P. *et al.* (2007). **A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin.** *Biochem Biophys Res Commun.*, 7, **362**:443-448.
- Lin, *et al.* (2004). A thermostable leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223 *Extremophiles*, v. 8, p. 79-87.

- Lowther, W. T. *et al.* (2002). Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings. *Chem. Rev.* 102:4581-4607.
- Madigan, M. *et al.* (2005). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed., Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1. *Acta Tropica* 100(3) 256–260.
- Majeed, S. *et al.* (2003). *Structure*. 11,1061–1070.
- Manual de Vigilância Epidemiológica – Leptospirose, Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Estadual de Saúde, SP, 1994.
- Manual His•Bind® Kits. (2006). Protocolo TB054, Rev. 0106. Novagen. www.novagen.com.
- Maric, S. *et al.* (2009). The M17 Leucine Aminopeptidase of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*: Importance of Active Site Metal Ions in the Binding of Substrates and Inhibitors. *Biochemistry*, 48, 5435–5439 5435. DOI: 10.1021/bi9003638.
- Martins, L.S. *et al.* (2006). Zoonoses. Disponível em: http://www.mgar.com.br/zoonoses/aulas/aula_leptospirose.htm.
- Masayuki, N. *et al.* (2004). Insulin stimulates placental leucine aminopeptidase/oxytocinase/insulin-regulated membrane aminopeptidase expression in BeWo choriocarcinoma cells, vol. 117, nº3, pp. 187-193.
- Matsunaga, J. *et al.* (2007). Response of *Leptospira interrogans* to Physiologic Osmolarity: Relevance in Signaling the Environment-to-Host Transition, *Infection and Immunity*, p. 2864–2874 Vol. 75, No. 6.
- Matsui, M. *et al.* (2006). Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological Chemistry*, 387, 1535–1544.

- Minasov, G. *et al.* 1.8 Angstrom Resolution Crystal Structure of Cytosol Aminopeptidase from *Coxiella burnetii*. Center for Structural Genomics of Infectious Diseases (CSGID). A ser publicado. DOI:10.2210/pdb3ij3/pdb.
- Monahan, A.M. *et al.* (2009). Leptospirosis: risks during recreational activities. *Journal of Applied Microbiology*, REVIEW ARTICLE, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04220.x.
- Nascimento, *et al.* (2004). Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37: 459-478.
- Newman, J.*et al.* (2005). *Acta Cryst. D.* 61,1426–1431.
- Nomura, S. *et al.* (2005). Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy, *Biochimica et Biophysica Acta* 175, 19 – 25.
- Pace, C. N. (1990). Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15, 14–17.
- Page, R.*et al.* (2003). *Acta Cryst. D.* 59,1028–1037.
- Palaniappan, R.U. *et al.* (2007). **Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis.** *Curr Opin Infect Dis.*, **20**:284-292.
- Pappas, G. *et al.* (2006). **Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections.** *Int J Antimicrob Agents.*, **28**:491-496.
- Pautot, V. *et al.* (2001). The induction of tomato leucine aminopeptidase genes (LapA) after *Pseudomonas syringae* pv. tomato infection is primarily a wound response triggered by coronatine, *Mol Plant Microbe Interact*, Vol. 14, Issue 2, Pg. 214-24, ISSN: 0894-0282.

- Picardeau, M. *et al.* (2008). Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis, Volume 3, Issue 2, e1607PLoS ONE.
- Picardeau, M. *et al.* (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 760–768.
- Picardeau, M. *et al.* (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews*, Volume 7, 736-747.
- Puente X.S. *et al.* (2003). Human And Mouse Proteases: A Comparative Genomic Approach. *Nature* , VOLUME 4, 544 – 558.
- Rawlings, N. D. *et al.* (1998). Introduction: other families of metallopeptidases, *Handbook of proteolytic enzymes*, p. 1448-1452.
- Ren, S. X. *et al.* (2003). Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 422:888-893.
- Romero, E.C. *et al.* (2003). Human Leptospirosis: A Twenty-Nine-Year Serological Study In São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 45(5):245-248.
- Ropper, A.H. (1992). The Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med.*, 326, 1130-6.
- Sato, Y. (2004). Aminopeptidases in Health and Disease: Role of Aminopeptidase in Angiogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* 27(6) 772—776, Vol. 27, No. 6.
- Sakiyama, *et al.* (2003). Aminopeptidase function of dinuclear zinc (II) complexes of phenolbased dinucleating ligands: effect of p-substituents, *Inorganica Chimica Acta* 351, p. 256-260.
- Seixas, F.K. *et al.* (2007). **Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis.** *Can J Microbiol.*, **53**:472-479.

- Selvakumar, P. *et al.* (2006). Review Methionine Aminopeptidase 2 and Cancer, *Biochimica et Biophysica Acta* 1765, 148-154.
- Shaw, A.K. *et al.* (2006). Direct observation of protein residue salvation dynamics, *ScienceDirect*, v. 185, 76-85.
- Silva, E.F. *et al.* (2007). **The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis.** *Vaccine*, **25**:6277-6286.
- Silva, H.A. (2008). Purificação e Caracterização Molecular de Leucil-aminopeptidase de *Leptospira interrogans*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, UnB.
- Smith, E.L. *et al.* (1948). The Specificity Of Leucine Aminopeptidase. *J. Biological Chemistry*, 835-841.
- Smith, E.L. (1949). Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 18:35-58.
- Spichler, A. *et al.* (2007). **Acute pancreatitis in fatal anicteric leptospirosis.** *Am J Trop Med Hyg.*, **76**:886-887.
- Stack, C.M. *et al.* (2007). Characterization of the *Plasmodium falciparum* M17 leucyl aminopeptidase: a protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development. *J.Biol.Chem.*v.282, n°3, p.2069-2080.
- Sträter, N.*et al.* (1999). X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 18:4513-4522.
- Subbarao, N.K. *et al.* (1993). Experimental method to correct fluorescence intensities for the inner filter effect. *Analyst.* 118, 913-916.

- Taylor, A. (1993). Aminopeptidases: towards a mechanism of action. Trends Biochem. Sci., 18. 167- 172.
- Tsujimoto, M. *et al.* (2005). The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. Biochimica et Biophysica Acta 1751, 9 – 18.
- Trueba, G. *et al.* (2004). **Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water.** *Int Microbiol.*, **7**:35-40.
- Ventura, M.M. *et al.* (1976). The quenching of the tryptophyl fluorescence of the Black-Eyed Pea Tripsin and Chymotrypsin Inhibitor by Iodide and Cesium Ions- Effect of Adjacent Ionizable Groups. Acad. Bras. Câncer., 49 .
- Vijayachari, P. *et al.* (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem; *J. Biosci.* 33, 557–569.
- Vinetz, J.M. (2001). **Leptospirosis.** *Curr Opin Infect Dis.*, **14**, 527-538.
- Yamamoto, N. *et al.* (2002) Identification of 33 polymorphisms in the adipocyte derived leucine aminopeptidase (ALAP) gene and possible association with hypertension. *Hum. Mutat.* 19, 251–257.
- Yanagihara, Y. *et al.* (2007). **Current status of leptospirosis in Japan and Philippines.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, **30**:399-413.
- Wart, V. *et al.* (1981). Metal binding stoichiometry and mechanism of metal ion modulation of the activity of porcine kidney leucine aminopeptidase. *Biochemistry*, 20, 5682–5689.
- Wai, S.N. *et al.* (1999). *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiol Lett* 1999;180:123-31.
- Walling, L.L. (2006). Recyclin or Regulation? The role of amino-terminal modifying enzymes. *Curr. Opin. Plant Biol*, 9, 227–233.
- Xhardez, Y. (1990). Manual de Cinesioterapia. Livraria Atheneu Editora.

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leptospirose_oquefazer.pdf

<http://www.prodam.sp.gov.br/sms/zoonoses/diagnostico/leptospirose.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=leucyl%20aminopeptidase%20LAI>

<http://www.lce.esalq.usp.br/arquimedes/Atividade02.pdf>

http://www.portaldaoftalmologia.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=169:nistagmo&catid=36:doencas-dos-olhos&Itemid=41 (2009).

9. Anexos

His•Bind[®] Kits

Table of Contents

About the Kits.....	2
Description	2
Components	4
Storage	4
Overview.....	5
Cell Extract Preparation	5
His•Bind Resin Chromatography	8
His•Bind Resin, Ni-charged, Chromatography	11
His•Bind Column Chromatography	12
His•Bind Quick Columns and Cartridges	13
Quick Columns	13
Quick 900 Cartridges	13
Quick 300 Cartridges	14
His•Mag [™] Agarose Beads.....	14
Processing Sample after Elution	16
References.....	16

© 2006 EMD Biosciences, Inc., an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. BugBuster[®], His•Bind[®], His•Tag[®], PopCulture[®], and the Novagen[®] name are registered trademarks of EMD Biosciences, Inc in the United States and in certain other jurisdictions. D-Tube[™], FRETWorks[™], His•Mag[™], Lysonase[™], MagneTight[™], rLysozyme[™], and S•Tag[™] are trademarks of EMD Biosciences, Inc. Benzonase[®] is registered trademark of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Triton[®] is a registered trademark of Dow Chemical Company.

USA and Canada
Tel (800) 526-7319
novatech@novagen.com

Germany
Tel 0800 100 3496
techservice@merckbiosciences.de

United Kingdom and Ireland
UK Freephone 0800 622935
Ireland Toll Free 1800 409445
customer.service@merckbiosciences.co.uk

All Other Countries
www.novagen.com
novatech@novagen.com

A Brand of EMD Biosciences, Inc., an Affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
www.novagen.com

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR HUMAN OR DIAGNOSTIC USE.

About the Kits

Product	Size	Cat. No.
His•Bind® Resin	10 ml	69670-3
	50 ml	69670-4
	100 ml	69670-5
His•Bind Resin, Ni-charged	10 ml	71035-3
	25 ml	71035-4
	100 ml	71035-5
His•Bind Columns	pkg/5	70971-3
	pkg/25	70971-4
His•Mag™ Agarose Beads	2 × 1 ml	71002-3
	10 × 1 ml	71002-4
His•Bind Buffer Kit	1 kit	69755-3
His•Bind Purification Kit	1 kit	70239-3
His•Bind Quick Columns	pkg/12	70159-3
	pkg/60	70159-4
His•Bind Quick 300 Cartridges	pkg/10	70155-3
	pkg/50	70155-4
His•Bind Quick 900 Cartridges	pkg/10	70156-3
	pkg/50	70156-4
His•Bind Quick Buffer Kit	1 kit	70665-3
BugBuster® His•Bind Purification Kit	1 kit	70793-3
PopCulture® His•Mag Purification Kit	1 kit	71114-3

Description

His•Bind Resin and Buffer Kit

His•Bind Resin is used for rapid one-step purification of proteins containing His•Tag® sequence by metal chelation chromatography. The His•Tag sequence binds Ni²⁺ cations that are immobilized on His•Bind resin using Charge Buffer supplied in the His•Bind Buffer Kit. After unbound proteins are washed away, target protein is recovered by elution with imidazole. The His•Bind Resin can be regenerated and reused many times. The versatile system allows proteins to be purified under gentle, non-denaturing conditions, or in the presence of either 6 M guanidine or urea. Up to 20 mg target protein can be purified on a single 2.5-ml column.

His•Bind Resin, Ni-charged

His•Bind Resin, Ni-charged is a pre-charged version of the popular His•Bind Resin used for purification of His•Tag fusion proteins by metal affinity chromatography. The Ni²⁺ ions are held by chelation with iminodiacetic acid (IDA). The IDA support can be recycled many times with no loss in performance. His•Bind Resin, Ni-charged is supplied as 50% slurry and has binding capacity of up to 8 mg/ml settled resin. The resin is compatible with up to 1.0 mM THP, a reducing agent that is more stable and effective than dithiothreitol (DTT). Use His•Bind Resin, Ni-charged with His•Bind Quick Buffer Set, or Ni-NTA Buffer Kit.

His•Bind Columns

His•Bind Columns are packed with 1.25 ml Ni²⁺-charged His•Bind resin. The binding capacity is 10 mg of target protein per column. Top and bottom frits ensure uniform buffer flow and minimal disturbance of the bed when loading and running the column. The His•Bind Columns can be used under native conditions, or in the presence of either 6 M guanidine or urea. Reuse is not recommended.

His•Bind® Quick Cartridges and Columns

His•Bind Quick Cartridges and Columns are precharged with Ni²⁺ and use a large diameter cellulose matrix that has flow rates 5–50 times faster than agarose resins. Using these formats, target proteins can be purified from crude lysates under native or denaturing conditions in as little as five minutes.

His•Bind Quick 300 and 900 Cartridges are designed for operation with a syringe. His•Bind Quick Columns are designed for use with the Novagen Vacuum Manifold (Cat. No. 70147), which enables processing of up to 12 columns simultaneously.

Product	Approx. capacity/run	Method
His•Bind Quick 300 Cartridge	0.5 mg protein	Syringe
His•Bind Quick 900 Cartridge	2.0 mg protein	Syringe
His•Bind Quick Column	5.0 mg protein	Vacuum

Please note that because His•Bind Quick Resin is cellulose-based, it is not recommended for use with proteins encoding a cellulose binding domain, in addition to the His•Tag® sequence.

His•Mag™ Agarose Beads

His•Mag Agarose Beads are 3-µm diameter beads pre-charged with Ni²⁺, and are ideal for rapid purification of multiple samples with minimal handling. His•Mag Agarose Beads have a binding capacity of 5 mg target protein per 1 ml beads. The beads are compatible with magnetic separation based high throughput applications. Proteins can be purified under non-denaturing conditions or in the presence of either 6 M guanidine or urea.

BugBuster® His•Bind Purification Kit

BugBuster His•Bind Purification Kit combines His•Bind Resin, His•Bind Buffer Kit, Benzonase® Nuclease, and BugBuster Protein Extraction Reagent for convenient preparation of soluble cell extracts, and affinity purification of His•Tag fusion proteins. BugBuster Protein Extraction Reagent is formulated for the gentle disruption of the *E. coli* cell wall, resulting in the liberation of soluble protein. BugBuster® Protein Extraction Reagent provides a simple, rapid alternative to mechanical methods, such as French Press or sonication, for releasing expressed target proteins in preparation for purification. The proprietary formulation utilizes a mixture of non-ionic detergents that is capable of cell wall perforation without denaturing soluble protein. Benzonase® Nuclease is a genetically engineered endonuclease from *Serratia marcescens* (1–2). This promiscuous endonuclease attacks and degrades all forms of DNA and RNA (single stranded, double stranded, linear and circular), and is effective over a wide range of operating conditions (3). Cells are harvested by centrifugation, followed by suspension in BugBuster Protein Extraction Reagent. Extracts prepared using BugBuster Protein Extraction Reagent and Benzonase Nuclease are fully compatible with all of the Novagen His•Bind® supports.

Note: BugBuster Protein Extraction Reagent is supplied in a Tris-HCl-based buffer. For applications requiring other buffers, Novagen offers BugBuster (primary amine free, Cat. No. 70923) Protein Extraction Reagent, which contains a PIPPS buffer, and BugBuster 10X Protein Extraction Reagent (Cat. No. 70921), which does not contain added buffer.

PopCulture® His•Mag Purification Kit

The PopCulture His•Mag Purification Kit is ideally suited for high throughput (HT) protein extraction and purification with His•Mag Agarose Beads in the original culture tube or multiwell plate, without the need for centrifugation or columns. PopCulture Reagent is a Tris-HCl buffered mixture of concentrated detergents formulated to perforate the *E. coli* cell wall, and extract proteins directly in the culture medium without denaturing soluble protein. To further enhance the purification procedure when using PopCulture Reagent, rLysozyme™ Solution is included in this kit. Lysozyme cleaves a peptidoglycan bond in the *E. coli* cell wall, enhancing cell lysis and increasing protein yield(4–5).

Components

His•Bind® Buffer Kit

The His•Bind Buffer Kit contains the following components sufficient to run a minimum of ten 2.5-ml columns:

- 2 × 80 ml 8X Binding Buffer (8X = 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, 40 mM imidazole, pH 7.9)
- 25 ml 8X Wash Buffer (8X = 4 M NaCl, 480 mM imidazole, 160 mM Tris-HCl, pH 7.9)
- 50 ml 4X Elute Buffer (4X = 4 M imidazole, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl, pH 7.9)
- 50 ml 4X Strip Buffer (4X = 2 M NaCl, 400 mM EDTA, 80 mM Tris-HCl, pH 7.9)
- 20 ml 8X Charge Buffer (8X = 400 mM NiSO₄)

His•Bind Purification Kit

- 10 ml His•Bind Resin, 10 ml settled volume (20 ml of a 50% v/v suspension)
- 1 His•Bind Buffer Kit
- pkg/4 Chromatography Columns (2.5-ml resin capacity)

His•Bind Quick Buffer Kit

- 2 × 80 ml 8X Binding Buffer (8X = 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, 40 mM imidazole, pH 7.9)
- 25 ml 8X Wash Buffer (8X = 4 M NaCl, 480 mM imidazole, 160 mM Tris-HCl, pH 7.9)
- 50 ml 4X Elute Buffer (4X = 4 M imidazole, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl, pH 7.9)
- 50 ml 4X Strip Buffer (4X = 2 M NaCl, 400 mM EDTA, 80 mM Tris-HCl, pH 7.9)

BugBuster® His•Bind Purification Kit

- 2 × 100 ml BugBuster Protein Extraction Reagent
- 10,000 U Benzonase® Nuclease, Purity > 90%
- 10 ml His•Bind Resin, 10 ml settled volume (20 ml of a 50% v/v suspension)
- 1 His•Bind Buffer Kit
- pkg/4 Chromatography Columns

PopCulture® His•Mag™ Purification Kit

- 15 ml PopCulture Reagent
- 300 KU rLysozyme™ Solution
- 1 ml rLysozyme Dilution Buffer
- 3 × 1 ml His•Mag™ Agarose Beads, 1 ml settled volume (2 ml of a 50% v/v suspension)
- 80 ml 8X Binding Buffer (8X = 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl, 40 mM imidazole, pH 7.9)
- 2 × 25 ml 8X Wash Buffer (8X = 4 M NaCl, 480 mM imidazole, 160 mM Tris-HCl, pH 7.9)
- 50 ml 4X Elute Buffer (4X = 4 M imidazole, 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl, pH 7.9)

Storage

Store BugBuster Protein Extraction Reagent, His•Bind Quick Columns and Cartridges, and PopCulture Reagent at room temperature. Store His•Bind Resin, His•Bind Resin, Ni-charged, His•Bind Columns, His•Mag™ Agarose Beads, His•Bind Buffer Kit and His•Bind Quick Buffer Kit at 4°C. Store rLysozyme Solution, rLysozyme Dilution Buffer and Benzonase Nuclease at -20°C.

Note: Storage of BugBuster Protein Extraction Reagent and PopCulture Reagent at temperatures below 4°C may cause precipitation of detergents. Incubate BugBuster Protein Extraction Reagent or PopCulture Reagent in room temperature water bath with gentle swirling or inversion to redissolve.

Note: Storage of rLysozyme Solution at -70°C may result in precipitation and loss of activity. Dilutions of rLysozyme Solution with rLysozyme Dilution Buffer of 1:100 or less are stable at 4°C for one week. DO NOT store diluted rLysozyme at -20°C because freezing will result in precipitation and/or loss of activity.

Overview

This technical bulletin describes methods for *E. coli* cell extract preparation, and procedures for purification of protein with a His•Tag[®] sequence using the His•Bind[®] supports. These procedures begin with cell culture that has been induced for target protein production. The fusion protein should contain a sequence of at least 6 consecutive histidine residues (His•Tag sequence) at the N-terminus, C-terminus, or internal to the polypeptide. A detailed discussion of target protein induction using the Novagen pET System can be found in the pET System Manual User Protocol TB055, which accompanies pET vectors and systems, and is also available at www.novagen.com.

For proteins expressed using the pET System, a yield of 20 mg target protein per 100 ml culture is not unusual. Like other affinity chromatography methods, the highest purity of target proteins is achieved when using amounts of extract and resin such that the resin will be near its binding capacity. Thus, we recommend obtaining an estimate of the quantity of target protein present in the extract. SDS-PAGE, Western blot, S•Tag[™] Rapid Assay, FRETWorks[™] S•Tag Assay, or other protein-specific assays can estimate the mass of target protein in crude extracts. Once an estimate of the quantity of target protein has been determined, prepare a corresponding amount of resin, or choose the appropriately sized pre-packed column or cartridge.

While some target proteins remain soluble in the cytoplasm, other proteins form insoluble aggregates, or inclusion bodies in *E. coli*. In addition to the target protein, inclusion bodies also contain contaminating bacterial proteins and nucleic acids. It is possible to solubilize the protein from purified inclusion bodies and perform purification using His•Bind products under denaturing conditions. Modifications required for purification under denaturing conditions are described for each resin format.

Cell Extract Preparation

Considerations before you begin:

- Consider using PopCulture[®] Reagent or BugBuster[®] Protein Extraction Reagent with Benzonase[®] Nuclease and rLysozyme[™] Solution, or BugBuster Protein Extraction Reagent with Lysonase[™] Bioprocessing Reagent to extract soluble proteins, and/or prepare inclusion bodies. These products greatly simplify the process because mechanical disruption is avoided.
- Avoid 2-mercaptoethanol, DTT, and EDTA in solutions that will be used with His•Bind supports. The reducing reagents react with Ni²⁺ to form brown precipitate. EDTA will chelate Ni²⁺ and, thereby, strip the column of the active affinity group.
- If target protein requires a reducing environment, 0.5 M THP Solution (Cat. No. 71194) can be used. THP [Tris(hydroxypropyl)phosphine] is a ready-to-use, water soluble, odorless, pH-neutral reducing agent that is more stable and effective than DTT as a sulfhydryl reductant. THP is more resistant to air oxidation than DTT, and is compatible at a concentration of 1 mM with His•Bind Resin.
- If necessary, protease inhibitors may be added to buffers to protect against degradative enzymes. We recommend initially proceeding without protease inhibitors, as the addition of these reagents is often unnecessary.
- Serine protease inhibitors should be used with caution if the target protein is to be treated with Thrombin (Cat. No. 69671), Factor Xa (Cat. No. 69036), Recombinant Enterokinase (rEK, Cat. No. 69066), or HRV 3C (Cat. No. 71493); any active inhibitor carried through purification may affect cleavage reactions. If proteolytic degradation of target protein is problematic, try adding the following: AEBSF (10–100 μM; Cat. No. 101500); Pepstatin A (1 μM; Cat. No. 516482); Leupeptin (10–100 μM; Cat. No. 108975); Aprotinin (2 μg/ml; Cat. No. 616398); Benzamidine (15 μg/ml; Cat. No. 324890); or Protease Inhibitor Cocktail Set III (without EDTA; Cat. No. 539134). Although it is likely that the inhibitors will be removed, and/or inactivated during purification, we recommend including a dialysis or gel filtration step prior to proteolytic cleavage with Thrombin, rEK, Factor Xa, or HRV 3C.
- Protease inhibitor cocktails that include EDTA are not compatible with His•Bind Resin.

Mechanical disruption method

Soluble fraction

Prepare 1X Binding Buffer for procedures below by diluting the 8X supplied stock or prepare according to buffer compositions provided on page 4.

rLysozyme™ Solution (Cat. No. 71110) is available for efficient bacterial cell lysis. Benzonase® Nuclease (Cat. No. 70664) degrades all forms of nucleic acid, eliminating viscosity and reducing processing time

1. Harvest cells by centrifugation at 10,000 × g for 10 min. Decant supernatant. Allow cell pellet to drain as completely as possible. Resuspend cells in 10 ml ice-cold 1X Binding Buffer, or 1X Fractogel Binding Buffer per 100-ml culture volume. If desired, up to 0.1% NP-40, or another non-ionic detergent, can be added to reduce non-specific binding. If resuspension is difficult, a Dounce homogenizer, blender, or sonicator can be used to break up cell pellet.
2. Sonicate sample in tube on ice, or in a salt-ice bath. Sonication conditions are not specified here because results are dependent on a number of factors including the type of sonicator probe, power setting, and shape and size of vessel containing cells. Avoid long sonication times to prevent sample heating; instead, divide sonication into bursts, allowing cooling between treatment. Sonicate until sample is no longer viscous. If DNA is not sheared by sonication, the viscosity of the extract will cause the column to clog, and the flow rate will be reduced. Larger cell masses may be treated in 1X Binding Buffer by alternative methods, such as French Press.

Optional:

- a) Add rLysozyme Solution to a final concentration of 45–60 KU/gram cell paste. Mix by pipetting up and down. Incubate at 30°C for 15 min prior to sonication.

Note: rLysozyme Solution can be diluted in rLysozyme Dilution Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 0.1% Triton® X-100]. Dilutions should be used as soon as possible and stored on ice, or at 4°C until use. Do not store diluted rLysozyme Solution at –20°C as freezing may result in loss of activity.

- b) Add 1 µl (25 units) Benzonase Nuclease per 1 ml lysis buffer used for resuspension.

Note: Benzonase Nuclease is not recommended for nuclease-free preparations. Protein purification may not remove Benzonase.

- c) Alternatively, add 3 µl Lysonase™ Bioprocessing Reagent (Cat. No. 71230), per 1 ml lysis buffer. Lysonase Bioprocessing Reagent is an optimized, ready-to-use mix of rLysozyme Solution and Benzonase Nuclease.

- d) Add protease inhibitors. Protease inhibitors are compatible with BugBuster® Protein Extraction Reagent and Benzonase Nuclease.

Note: Serine protease inhibitors should be avoided if the target protein will be treated with Thrombin (Cat. No. 69671), Factor Xa (Cat. No. 69036), rEK (Cat. No. 69066), or HRV 3C (Cat. No. 71493). Although purification may remove active inhibitors, dialysis and gel filtration are recommended prior to cleavage. Protease inhibitor cocktails that include EDTA are not compatible with His•Bind® Resin.

3. Centrifuge lysate at 14,000 × g for 20 min to remove debris. Filter post-centrifugation supernatant through a 0.45-µm membrane to prevent clogging of resins (syringe-end filters are convenient for this purpose).

Inclusion body purification

The following protocol describes isolation and washing of inclusion bodies from *E. coli* to remove contaminating proteins, followed by suspension in 1X Binding Buffer plus either 6 M guanidine-HCl or 6 M urea to solubilize target protein.

1. Prepare 1X Binding Buffer by diluting 8X supplied stock with deionized water, or according to buffer compositions provided on page 4 (without denaturant).
2. Harvest cells by centrifugation at 10,000 × g for 10 min. Decant supernatant. Allow cell pellet to drain as completely as possible. Resuspend cells in 40 ml 1X Binding Buffer per 100 ml culture volume.
3. Sonicate briefly (see “Mechanical disruption method,” page 6) to resuspend pellet thoroughly and shear DNA.
4. Centrifuge at 5,000 × g for 15 min to collect inclusion bodies and cellular debris while leaving other proteins in solution.

- Remove supernatant. Resuspend pellet in 20 ml 1X Binding Buffer per 100 ml culture volume (without denaturant). Repeat Step 3. Sonication may be necessary to resuspend pellet.

Note: Repeating this step several times may release more trapped proteins.

- Remove supernatant from final centrifugation and resuspend pellet in 5 ml 1X Binding Buffer containing either 6 M guanidine-HCl or 6 M urea per 100 ml culture volume. See the appropriate section in the following pages for buffer preparation under denaturing conditions.
- Incubate on ice for 1 h to completely solubilize protein. Remove insoluble material by centrifugation at $16,000 \times g$ for 30 min. Filter supernatant through a 0.45- μm membrane prior to performing purification with His•Bind products.

Note: rLysozyme™ Solution may be added at Step 5 for processing insoluble protein fractions, although addition is not required. Lysozyme has been shown to improve the purity of inclusion body preparations by digesting cell wall debris. Add rLysozyme to the resuspended material in 1X Binding Buffer using a final concentration of 1 KU/ml. Vortex gently to mix. Incubate for 5–10 min. Proceed with centrifugation.

Cell extract preparation using BugBuster® Reagent

BugBuster Protein Extraction Reagent is a simple, rapid alternative to mechanical methods of protein extraction, formulated for the gentle disruption of *E. coli* cell wall to liberate active proteins. Cells are harvested by centrifugation, resuspended in BugBuster Protein Extraction Reagent, and incubated briefly at room temperature. Following clarification by centrifugation, the supernatant, containing soluble protein, is ready for purification with His•Bind® products. BugBuster Protein Extraction Reagent can also be used for the preparation of highly purified inclusion bodies prior to processing insoluble target proteins.

BugBuster Protein Extraction Reagent plus Benzonase® Nuclease is an efficient combination for gently releasing target proteins and reducing extract viscosity prior to downstream processing. Cells are harvested by centrifugation, followed by suspension in BugBuster Protein Extraction Reagent and Benzonase Nuclease treatment. During a brief incubation at room temperature, soluble proteins are released, and nucleic acids are digested. Insoluble protein and cell debris is easily removed by centrifugation. The resulting low viscosity, clarified extract contains soluble protein ready for purification with His•Bind products. Soluble extract can be loaded directly onto any His•Bind Resin or His•Mag™ Agarose Beads.

For more information regarding BugBuster Protein Extraction Reagent, see User Protocol TB245.

Cell extract preparation using PopCulture® Reagent

PopCulture Reagent is a buffered mixture of concentrated detergents formulated to efficiently extract proteins from *E. coli* cells directly in their culture medium without cell harvest. The entire procedure, from culturing through purification, can be performed in one day. Therefore it is ideal for small culture volumes (≤ 50 ml) or multiwell plate cultures. An induced *E. coli* culture is treated with PopCulture Reagent for 10 min at room temperature. Proteins in this extract preparation can be assayed directly, or purified using equilibrated His•Bind Resin or His•Mag Agarose Beads. To further enhance the effectiveness of PopCulture Reagent-mediated cell lysis and protein extract preparation, rLysozyme Solution (Cat. No 71110) and/or Benzonase Nuclease (Cat. No. 70746) may be added to PopCulture Reagent prior to use.

If isolation of insoluble protein is desired, centrifugation would be required. After combining the PopCulture total cell extract with the His•Bind support, the supernatant could be centrifuged ($10,000 \times g$) to pellet the inclusion body fraction. Process inclusion bodies according to the “Inclusion body purification” on page 6.

For more information regarding PopCulture Reagent, see User Protocol TB323.

His•Bind® Resin Chromatography

The following protocol is recommended for rapid purification of soluble target protein under native conditions using His•Bind Resin. The highest purity of target proteins can be achieved when using amounts of extract and resin such that the resin will be near its binding capacity. For batch purification from PopCulture® Reagent extracts, use 50 µl 50% slurry His•Mag™ Agarose Beads per 1 ml cell culture. Modifications required for denaturing conditions are described on page 10.

If minor *E. coli* protein contaminants remain bound to the column after standard washing with 1X Wash Buffer containing 60 mM imidazole, additional washes using 100 mM or intermediate imidazole concentrations may be used. However, some fusion proteins containing a His•Tag® sequence may partly or entirely elute with 100 mM imidazole. Generally, proteins with six consecutive histidines elute at lower imidazole concentrations than those with ten consecutive histidines. The Binding Buffer and Elute Buffer can be mixed in various ratios to obtain various imidazole concentrations. For example, 100 mM imidazole buffer can be obtained by combining 13.5 ml 1X Binding Buffer with 1.5 ml 1X Elute Buffer.

Buffer preparation

In the following protocol, one volume is equivalent to the settled bed volume (e.g. 100 µl slurry yields 50µl resin for a settled bed volume of 50 µl).

1. Prepare 5 vol 1X Charge Buffer by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or according to buffer compositions provided on page 4.

Note: For purification from extracts prepared with PopCulture® Reagent, prepare 6 vol 1X Charge Buffer per 1 ml original culture volume.

2. Prepare 13 vol 1X Binding Buffer by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or according to buffer compositions provided on page 4.

Note: For purification from extracts prepared with PopCulture Reagent, prepare 26 vol 1X Binding Buffer per 1 ml original culture volume.

3. Prepare 6 vol 1X Wash Buffer by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or according to buffer compositions provided on page 4.

Note: For purification from extracts prepared with PopCulture Reagent, prepare 26 vol 1X Wash Buffer per 1 ml original culture volume.

4. Prepare 6 vol 1X Elute Buffer by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or according to buffer compositions provided on page 4.

Note: For purification from extracts prepared with PopCulture Reagent, prepare 2–6 vol 0.5X Elute Buffer per 1 ml original culture volume.

Column preparation

Small polypropylene columns, such as the Novagen Chromatography Columns (Cat. No. 69673), that hold 2.5 ml settled resin, can be used to purify up to 20 mg target protein.

Note: Adding a few ml sterile, deionized water to the dry column, and gently pushing on the column top with a gloved finger, will wet the frit and start column flowing.

1. Gently mix bottle of His•Bind Resin by inversion until completely suspended. Using a wide-mouth pipet, transfer desired amount of slurry to column (e.g. 100 µl slurry yields 50 µl resin for settled bed volume of 50 µl). Allow resin to pack under gravity flow. If batch method is preferred, follow the “Small-scale purification–batch method,” on page 9.
2. When level of storage buffer drops to top of column bed, use the following sequence of washes to charge and equilibrate column:
 - a) 3 vol sterile deionized water
 - b) 5 vol 1X Charge Buffer
 - c) 3 vol 1X Binding Buffer

Column chromatography

1. Allow 1X Binding Buffer to drain to top of column bed.
2. Load column with prepared extract.

Note: A flow rate of approximately 10 vol per hour is optimal for efficient purification. If flow rate is too fast, more impurities will contaminate eluted fraction.

3. Wash column with 10 vol 1X Binding Buffer.
4. Wash column with 6 vol 1X Wash Buffer.
5. Elute bound protein with 6 vol 1X Elute Buffer. Alternatively, 6 vol 1X Strip Buffer may be used to remove protein by stripping Ni²⁺ from column. The eluate may be captured in fractions (e.g. 1 ml fractions), if desired.

Small scale purification - batch method

Extract prepared without medium – mechanical or BugBuster® Reagent

His•Bind® Resin can also be used in batch format for small-scale purification. Settled bed volumes of 50–200 µl can be processed in 1.5-ml microcentrifuge tubes. In the following protocol, one volume is equivalent to the settled bed volume (e.g. 100 µl slurry yields 50 µl resin for a settled bed volume of 50 µl).

1. Transfer 100–400 µl slurry to 1.5-ml microcentrifuge tube. Centrifuge for 1 min at 400–1000 × g. Remove supernatant.
2. Use the following sequence of washes to charge and equilibrate resin. For each wash step, add appropriate buffer, invert tube several times to mix, and centrifuge for 1 min at 400–1000 × g.
 - a) 2 times with 2 vol sterile deionized water
 - b) 3 times with 2 vol 1X Charge Buffer
 - c) 2 times with 2 vol 1X Binding Buffer.
3. Add cell extract to 1.5-ml microcentrifuge tube containing prepared resin. Mix gently by inverting tube several times. Incubate for 5 min. Centrifuge for 1 min at 400–1000 × g. Discard supernatant.
4. Wash resin 3 times with 3 vol 1X Binding Buffer.
5. Wash resin 2 times with 3 vol 1X Wash Buffer.
6. Elute bound protein 2 times with 3 vol 1X Elute Buffer. Alternatively, 1X Strip Buffer may be used to elute protein by stripping Ni²⁺ from resin.

Extract prepared with medium – PopCulture® Reagent

His•Bind Resin can also be used in batch format for small scale purification of extracts prepared with PopCulture Reagent. A settled bed volume of 50 µl is recommended per 1 ml original culture volume. In the following protocol, one volume is equivalent to the settled bed volume (e.g. 100 µl slurry yields 50 µl resin for a settled bed volume of 50 µl).

1. Transfer 100 µl slurry to a 1.5-ml microcentrifuge tube. Centrifuge for 1 min at 400–1000 × g. Remove supernatant.
2. Use the following sequence of washes to charge and equilibrate resin. For each wash step, remove supernatant by centrifuging for 1–5 min at 400–1000 × g. Carefully aspirate supernatant.
 - a) 2 times with 2 vol sterile deionized water
 - b) 3 times with 2 vol 1X Charge Buffer
 - c) 2 times with 2 vol 1X Binding Buffer.
3. Resuspend resin in 1 vol 1X Binding Buffer.
4. Add equilibrated resin to prepared extract. Mix gently by pipetting. Incubate for 5 min with gentle mixing. Remove supernatant.

Note: The sample can be processed using a vacuum filter plate system, and transferred to a 0.5-cm diameter column, or a microcentrifuge tube. As required, centrifuge for 1 min at 400–1000 × g prior to removing supernatant in the following wash steps.

1. Wash resin with 20 vol 1X Binding Buffer.

2. Wash resin with 20 vol 1X Wash Buffer.
3. Elute bound protein with 1–3 vol 0.5 X Elute Buffer.
Optional: Repeat elution again with 1–3 vol 0.5X Elute Buffer, and pool supernatants.

Purification under denaturing conditions

If target protein is found in inclusion body fraction, purification with His•Bind® products can be performed under denaturing conditions at room temperature.

1. The inclusion body fraction is solubilized in 1X Binding Buffer, including a denaturant (6 M guanidine-HCl or 6 M urea) according to protocols in “Cell Extract Preparation” section on page 6.
2. The His•Bind Resin is charged and equilibrated, as described previously using 1X Binding Buffer with denaturant.

Note: The Charge Buffer should not contain a denaturant.

3. Purification under denaturing conditions is identical to purification under native conditions, with the modification that Wash and Elution Buffers should contain a denaturant.

Note: A lower imidazole concentration (20 mM) should be used in wash buffer containing denaturant, as target proteins tend to elute at lower imidazole concentrations in the presence of 6 M urea or 6 M guanidine-HCl.

Buffer preparation for purification under denaturing conditions

1. Add solid guanidine-HCl or urea directly to an aliquot of concentrated buffers.
2. Bring to 90% final volume with deionized water. Stir until solid is dissolved.
3. Adjust pH to 7.9 with either HCl or NaOH. Bring to final volume with deionized water.

For example, to prepare 100 ml 1X Binding Buffer with 6M urea, combine 12.5 ml 8X Binding Buffer and 36 g urea. Bring volume up to 90 ml with deionized water. Once urea is dissolved, adjust pH to 7.9. Bring to final volume of 100 ml with deionized water. To prepare 20 mM imidazole Wash Buffer, combine 11 ml 1X Binding Buffer with 4.1 ml 1X Wash Buffer, both including denaturant.

Caution: Urea solutions must be made fresh and used promptly. Urea decomposes to form cyanate ions that can covalently modify primary amines on target protein.

Note: Samples in 6M urea may be mixed with sample buffer and loaded directly on an SDS polyacrylamide gel. Samples in 6M guanidine must be diluted 1:5 in water, or dialyzed, before running on an SDS polyacrylamide gel.

Resin regeneration

When elution is complete, His•Bind Resin can be regenerated for reuse. This process can be carried out many times. However, because some small amounts of protein may not be released with EDTA treatment, we recommend a different sample of resin for each different protein studied.

Routine reuse

Following the last elution step, wash column with 3 bed vol 1X Strip Buffer. The presence of 100 mM EDTA in Strip Buffer will prevent bacterial growth. Store column in this solution and recharge as in “Column preparation” on page 8 before use.

Resin regeneration

When the flow rate of a column slows noticeably or the resin does not turn a strong blue-green color when Charge Buffer is added, clean the resin more thoroughly. One volume is equivalent to the settled bed volume. In Step 13, it is important to use 3 vol water to completely remove EDTA.

- | | | |
|---|-----------------------|-------------------------------|
| 1. 2 vol 6 M guanidine-HCl, 0.2 M acetic acid | 6. 1 vol 75% ethanol | 11. 1 vol water |
| 2. 2 vol water | 7. 5 vol 100% ethanol | 12. 5 vol 100 mM EDTA, pH 8.0 |
| 3. 1 vol 2% SDS | 8. 1 vol 75% ethanol | 13. 3 vol water |
| 4. 1 vol 25% ethanol | 9. 1 vol 50% ethanol | 14. 3 vol 20% ethanol |
| 5. 1 vol 50% ethanol | 10. 1 vol 25% ethanol | 15. Store at 4°C. |

His•Bind® Resin, Ni-charged, Chromatography

The following protocol is recommended for purification of soluble target protein under native conditions using His•Bind Resin, Ni-charged. His•Bind Resin, Ni-charged is supplied as 50% slurry and has binding capacity of up to 8 mg/ml settled resin. The highest target protein purity can be achieved using amounts of extract and resin such that the resin is near its binding capacity. Soluble fractions prepared using BugBuster® Protein Extraction Reagent, PopCulture® Reagent, or mechanical means can be loaded on the His•Bind Resin, Ni-charged. Modifications required for denaturing conditions are described on page 10. The resin is compatible with up to 1.0 mM THP, a reducing agent that is more stable and effective than DTT. Use His•Bind Resin, Ni-charged with His•Bind Quick Buffer Kit.

Note: The His•Bind Resin, Ni-charged can also be used with the Ni-NTA Buffer Kit (Cat. No. 70899).

Buffer preparation

In the following protocol, one volume is equivalent to the settled bed volume (e.g. 100 µl slurry yields 50µl resin for a settled bed volume of 50 µl).

1. Prepare 10 vol 1X Binding Buffer by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or according to buffer compositions provided on page 4.

Note: For purification from extracts prepared with PopCulture Reagent, prepare 20 vol 1X Binding Buffer per 1 ml original culture volume.

2. Prepare 6 vol 1X Wash Buffer by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or according to buffer compositions provided on page 4.

Note: For purification from extracts prepared with PopCulture Reagent, prepare 20 vol 1X Wash Buffer per 1 ml original culture volume.

3. Prepare 6 vol 1X Elute Buffer by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or according to buffer compositions provided on page 4.

Note: For purification from extracts prepared with PopCulture Reagent, prepare 2–5 vol 0.5X Elute Buffer per 1 ml original culture volume.

Column preparation

Small polypropylene columns, such as the Novagen Chromatography Columns (Cat. No. 69673), can be used.

1. Assemble column according to manufacturer instructions. Cap bottom outlet.
2. Gently mix bottle of His•Bind Resin, Ni-charged by inversion until completely resuspended. Using a wide-mouth pipet, transfer desired amount of slurry to column (e.g. 100 µl slurry yields 50 µl resin for settled bed volume of 50 µl).
3. Allow resin to settle under gravity flow.
4. Equilibrate column with 3 vol sterile deionized water.
5. Equilibrate column with 3 vol 1X Binding Buffer.

Column chromatography

Refer to page 9.

Small scale purification - batch method

Refer to page 9.

Purification under denaturing conditions

If target protein is found in inclusion body fraction, purification can be performed with His•Bind Resin, Ni-charged under denaturing conditions. Refer to page 10.

His•Bind® Column Chromatography

The following protocol is recommended for purification of soluble target protein under native conditions using pre-charged His•Bind Column. Soluble fractions prepared using BugBuster® Protein Extraction Reagent, PopCulture® Reagent, or mechanical means can be loaded on the His•Bind Column. Modifications required for denaturing conditions are described on page 10. Each pre-packed column contains 1.25 ml His•Bind Resin and binds up to 10 mg target protein. Cell extract volumes are not specified due to variations in expression levels between individual target proteins. The highest target protein purity can be achieved using amounts of extract and resin such that the resin is near its binding capacity. These single-use columns are designed to fit into most 15- or 50-ml conical centrifuge tubes (e.g. Falcon Cat. No. 352097 or 352098) for convenient fraction collection.

Buffer preparation

1. Prepare 20 ml 1X Binding Buffer per column by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
2. Prepare 10 ml 1X Wash Buffer per column by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
3. Prepare 5 ml 1X Elute Buffer per column by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.

Tip: To avoid clogging and slower flow rates, treat cell extracts with Benzonase® Nuclease. Alternatively, sonicate briefly, clarify by high-speed centrifugation, and pass through a 0.45-µm syringe filter prior to loading. (see "Cell Extract Preparation" section on page 6).

Column preparation

1. Remove His•Bind Column cap.
2. Pour off, or pipet, to remove storage buffer in upper chamber. Remove lower Luer plug.
3. Equilibrate column with 10 ml 1X Binding Buffer. Allow entire buffer volume to flow through column.

Note: Failure to remove storage buffer and fully equilibrate column may cause a loss of resin affinity for target protein, and/or precipitation of purified target protein during purification or subsequent dialysis steps.

Column chromatography

1. After Binding Buffer has drained, load column with prepared cell extract.
2. Wash column with 10 ml 1X Binding Buffer.
3. Wash column with 10 ml 1X Wash Buffer.
4. Elute protein from column with 5 ml 1X Elute Buffer. Alternatively, 5 ml 1X Strip Buffer may be used to elute protein by stripping Ni²⁺ from resin. Eluate may be captured in fractions (e.g., 1 ml fractions), if desired.

Purification under denaturing conditions

If target protein is found in inclusion body fraction, His•Bind Column purification can be performed under denaturing conditions. Refer to page 10.

His•Bind® Quick Column and Cartridges Protocols

The following protocol is recommended for purification of soluble target protein under native conditions using Ni²⁺-charged His•Bind Quick Columns and Cartridges. Soluble fractions prepared using BugBuster® Extraction Reagent, PopCulture® Reagent, or mechanical means can be loaded on Ni²⁺-charged His•Bind Quick Columns and Cartridges. Modifications required for denaturing conditions are described on page 10. Reuse is not recommended. Cell extract volumes are not specified due to variations in expression levels between individual target proteins. The highest target protein purity can be achieved using amounts of extract and resin such that the resin is near its binding capacity.

Tip: To avoid clogging the columns and cartridges treat viscous cell extracts with Benzonase® Nuclease. Alternatively, sonicate briefly, clarify by high-speed centrifugation, and pass through a 0.45-µm syringe filter prior to loading. (see “Cell Extract Preparation” section on page 6).

His•Bind Quick Columns

His•Bind Quick Columns are designed for the Novagen Vacuum Manifold (Cat. No. 70147), or other vacuum source.

Buffer preparation

1. Prepare 45 ml 1X Binding Buffer per column by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
2. Prepare 15 ml 1X Wash Buffer per column by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
3. Prepare 10 ml 1X Elute or Strip Buffer per column by diluting supplied stocks to 1X with deionized water or prepare according to buffer compositions provided on page 4.

Column preparation

1. Attach columns to the Vacuum Manifold.
2. Wet and equilibrate column with 15 ml 1X Binding Buffer. Apply vacuum, and adjust flow rate to 1–3 ml/min.

Column chromatography

1. Load cell extract onto column. Apply vacuum and adjust flow rate to 1–3 ml/min.

Note: Passing flow-through over the same column or cartridge a second time may increase yields.

2. Wash with 30 ml 1X Binding Buffer. Apply vacuum and adjust flow rate to 5–10 ml/min.
3. Wash with 15 ml 1X Wash Buffer.
4. Elute with 10 ml 1X Elute Buffer or 10 ml 1X Strip Buffer.

His•Bind Quick 900 Cartridges

Buffer preparation

1. Prepare 26 ml 1X Binding Buffer per cartridge by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
2. Prepare 10 ml 1X Wash Buffer per cartridge by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
3. Prepare 4 ml 1X Elute or Strip Buffer per cartridge by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.

Cartridge chromatography

Attach cartridge to 20–30-cc syringe loaded with appropriate buffer. Push buffer through cartridge at a rate of approximately 2 drops/sec.

Note: Buffers can be loaded into syringe such that some air space exists between plunger and liquid. A small amount of air pushed through the resin has no negative effect, and allows for a more complete change of buffers, and more efficient elution of target protein.

1. Wet and equilibrate cartridge with 6 ml 1X Binding Buffer.
2. Load cell extract onto cartridge.
3. Wash with 20 ml 1X Binding Buffer.
4. Wash with 10 ml 1X Wash Buffer.
5. Elute with 4 ml 1X Elute Buffer or 4 ml 1X Strip Buffer.

His•Bind® Quick 300 Cartridges

Buffer preparation

1. Prepare 7 ml 1X Binding Buffer per cartridge by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
2. Prepare 2.5 ml 1X Wash Buffer per cartridge by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
3. Prepare 1 ml 1X Elute or Strip Buffer per cartridge by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.

Cartridge chromatography

Attach the cartridge to 5–10-cc syringe loaded with appropriate buffer. Push buffer through cartridge at a rate of approximately 2 drops/sec.

1. Wet and equilibrate column with 2 ml 1X Binding Buffer.
2. Load cell extract onto cartridge.
3. Wash with 5 ml 1X Binding Buffer.
4. Wash with 2.5 ml 1X Wash Buffer.
5. Elute with 1 ml 1X Elute Buffer or 1 ml 1X Strip Buffer.

Purification under denaturing conditions

If target protein is found in inclusion body fraction, His•Bind Quick Column and Cartridge purification can be performed under denaturing conditions. Refer to page 10.

His•Mag™ Agarose Beads

The following protocols describe purification of proteins containing a His•Tag® sequence with Ni²⁺-charged His•Mag Agarose Beads. The binding capacity is 5 mg target protein per 1 ml (settled bed volume) of beads and is provided in 50% slurry. In general, the highest target protein purity is achieved when using amounts of extract and resin such that the resin is near its binding capacity. As a starting point, 50 µl slurry (25 µl resin) is recommended for each 1 ml of culture.

Extract prepared without medium – mechanical or BugBuster® Reagent

Buffer preparation

Note: One volume is equivalent to settled bed volume of beads.

1. Prepare 13 vol 1X Binding Buffer per sample by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
2. Prepare 12 vol 0.5X Wash Buffer per sample by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, and further diluting to 0.5X using 1X Binding Buffer, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
3. Prepare 6 vol 0.5X Elute Buffer per sample by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, and further diluting to 0.5X using 1X Binding Buffer, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.

Purification

1. Transfer the appropriate amount of resuspended His•Mag™ Agarose Beads to a 1.5-ml, 15-ml or 50-ml (e.g. Falcon) tube. Place tube in a Magnetight™ Separation Stand (Cat. No. 69964), or Magnetight Multitube Rack (Cat. No. 70747) to collect beads.
2. Remove supernatant and wash beads 3 times each with 4 vol 1X Binding Buffer.

Note: For each wash, remove tube from rack, add buffer, and resuspend beads. Replace tube in magnetic rack, and remove supernatant. His•Mag Agarose Beads may also be centrifuged (1,000 x g, 3 min) for separation during wash procedures.

3. After final wash, resuspend beads in 1 vol 1X Binding Buffer.
4. Combine equilibrated beads with prepared cell extract. Mix well by inverting tube several times. Incubate for 5 min with occasional mixing.
5. Place tube in magnetic rack to collect beads. Remove supernatant.
6. Wash beads 3 times with 4 vol 0.5X Wash Buffer.

Note: For extracts prepared with PopCulture® Reagent, Wash beads 3 times with 20–30 vol 0.5X Wash Buffer.

Note: For each wash, remove tube from rack, add buffer, and resuspend beads. Replace tube in magnetic rack, and remove supernatant.

7. After removing final wash, add 4 vol 0.5X Elute Buffer. Resuspend beads, and incubate for 5 min with occasional inversion to mix.
8. Place tube in magnetic rack to collect beads. Remove eluted protein to a fresh tube.
Optional: Repeat elution step with a smaller volume of Elute Buffer. Combine supernatants.

Extracts prepared with medium – PopCulture Reagent

For each 1 ml original culture prepared with PopCulture Reagent, use 50 µl 50% slurry His•Mag Agarose Beads.

Buffer preparation

Note: One volume is equivalent to settled bed volume of beads.

1. Prepare 13 vol 1X Binding Buffer per 1 ml sample by diluting supplied stocks to 1X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
2. Prepare 60–90 vol 0.5X Wash Buffer per 1 ml sample by diluting supplied stocks to 0.5X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.
3. Prepare 4–8 vol 0.5X Elute per 1 ml sample by diluting supplied stocks to 0.5X with deionized water, or prepare according to buffer compositions provided on page 4.

Purification

Refer to page 15.

Purification under denaturing conditions

If target protein is found in inclusion body fraction, His•Mag Agarose Bead purification can be performed under denaturing conditions. Refer to page 10.

His•Mag Agarose Bead regeneration

When elution is complete, His•Mag Agarose Beads can be reused 2–3 times using the following regeneration protocol. However, because small amounts of protein remain bound, and may not be released with EDTA treatment, it is advisable to use a different aliquot of beads for each protein.

1. Following the last elution step, wash beads 5 times in 4 vol 1X Strip Buffer.
2. Resuspend and store beads in 20 mM phosphate buffer (NaH₂PO₄/NaOH), pH 7.0 containing 150 mM NaCl, 0.1% NaN₃ and 0.1% Triton® X-100.
3. Prior to re-use, wash beads with 3 vol deionized water.
4. Charge beads by washing 2 times with 3 vol 1X Charge Buffer.
5. Equilibrate beads by washing with 4 vol 1 X Binding Buffer prior to use.

Processing Sample after Elution

After eluting purified protein from a His•Bind® support, the sample can be concentrated, or the buffer changed by one of several methods. The storage buffer for your purified protein is often determined through an empirical process. Inappropriate storage buffer may lead to precipitation of the protein. If the protein was purified under denaturing conditions, removal of the denaturing agent may allow refolding of the protein, and reconstitution of activity, but it may also result in precipitation. Refer to the Novagen Protein Refolding Kit User Protocol TB234 for additional information on protein refolding. Four alternative buffer exchange procedures follow:

1. Dialyze into buffer of choice. Sample will contain nickel; therefore, avoid reducing agents until nickel is removed. If refolding is desired, gradual removal of 6 M guanidine or urea is recommended (e.g., successive changes into 4 M, 2 M, and no denaturant). A three-fold concentration can be achieved by dialysis into storage buffer and 50% glycerol. Glycerol stabilizes protein for long-term storage. After dialysis, the sample may be concentrated by sprinkling solid polyethylene glycol (15,000–20,000 MW) or Sephadex G-50 (Pharmacia) on the dialysis tubing. Use dialysis tubing with an exclusion limit of 6,000 MW or less, and leave solid in contact with tubing until desired volume is reached, replacing with fresh solid, as necessary.
2. Use the Novagen D-Tube™ Dialyzers (see User Protocol TB422) for dialysis and sample concentration.
3. Use plastic disposable microconcentrator units (e.g., Centricon; Amicon), as directed by manufacturer, to both desalt and concentrate the sample by ultrafiltration.
4. Desalt sample by gel filtration on Sephadex (G-10, G-25, G-50; Pharmacia) or Bio-Gel (P6DGM P-10, P-30; Bio-Rad).

References

1. Eaves, G.N., and Jeffries, C.D. (1963) *J. Bacteriol.* **85**, 273–278.
2. Nestle, M., and Roberts, W.K., (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 5213–5218.
3. (1999) *Benzonase® Brochure, Code No. W 220911*. Merck, KGaA, Darmstadt, Germany.
4. Inouye, M., Arnheim, N., and Sternglanz R. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7247.
5. Grabski, A., Drott, D., Handley, M., Mehler, M., and Novy, R. (2001) *inNOVations* **13**, 1–4.
6. Grabski, A., Mehler, M., Drott, D., and Van Dinther, J. (2002) *inNOVations* **14**, 2–5.
7. Janning, P., Schrader, W., Linscheid, M. (1994) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 1035–1040.

pET-19b Restriction Sites

Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations		
AatII	1	5644	BssHII	1	1636	PfiMI	3	807 2675 2724		
AccI	1	3599	Bst1107I	1	3600	PleI	7	486 774 861 1657 3723		
AccII	7	992 1720 2051 3338 3479	BstEII	1	1406			4208 4711		
Acil	89		BstXI	3	1027 1156 1279	PshAI	1	2070		
AfIII	2	1225 3829	BstYI	11		Psp5II	2	2793 2835		
AluI	24		Cac8I	41		Psp1406I	5	887 2255 3154 4948 5321		
AlwI	16		Cjel	26		PstI	1	4967		
Alw21I	8	725 1209 2532 2823 3647	CjePI	28		PvuI	1	5092		
		4147 5308 5393	Clal	1	24	PvuII	3	1825 1918 3420		
Alw44I	4	1205 3643 4143 5389	CviJI	96		RcaI	4	623 4549 5557 5662		
AlwNI	1	4245	CviRI	26		RsaI	4	165 1372 3635 5202		
ApaI	1	1436	Ddel	11		SapI	1	3713		
ApaBI	2	909 2406	Dpnl	29		Sau96I	22			
ApoI	2	1500 5715	DraI	3	4588 4607 5299	Sau3AI	29			
AvaI	2	324 2779	DrdI	2	3522 3937	Scal	1	5202		
Avall	9	1777 2153 2241 2490 2793	DrdII	1	948	ScrFI	24			
		2835 3114 4860 5082	Dsal	3	398 662 2801	SfaNI	24			
BamHI	1	319	EaeI	7	355 533 665 1899 2293	Sfcl	5	138 471 4094 4285 4963		
BanI	12				2798 5110	SgrAI	1	544		
BanII	3	609 623 1436	EagI	1	2293	SphI	1	700		
BbsI	5	1371 1710 2084 2947 5700	Eam1105I	1	4722	SspI	1	5526		
BbvI	28		EarI	3	843 3713 5517	StyI	3	244 398 2723		
BccI	16		Ecil	5	1002 2749 3903 4049 4877	TaqI	14			
Bce83I	7	208 2039 2209 3920 4218	Eco47III	3	630 2131 3083	TaqII	8	1133 1351 2024 3731 5070		
		4459 5327	Eco57I	2	4377 5389			5255 5408 5425		
Bcefl	5	744 1085 1712 2521 4331	EcoNI	1	760	TfiI	7	1904 2206 2360 2658 2879		
Bcgl	8	1517 1551 2051 2085 3406	EcoO109I	5	240 658 2793 2835 5698			3383 3804		
		3440 5227 5261	EcoRI	1	5715	Thal	39			
BclI	1	1239	EcoRII	10	129 948 1263 1803 1860	Tsel	28			
Bfal	6	257 438 2843 4324 4577			2412 2795 3855 3976 3989	Tsp45I	9	124 1406 2234 2501 3268		
		4912	EcoRV	2	187 1675			3481 3576 4978 5189		
BglI	3	2289 2523 4842	FauI	18		Tsp509I	16			
BglII	1	503	FokI	14		Tth111I	1	3574		
BmgI	1	1434	Fspl	3	2712 2810 4944	Tth111II	8	324 1064 1757 3290 4419		
BpmI	6	1063 1552 2186 2740 3356	GdIII	6	355 533 665 1899 2293			4426 4458 5714		
		4792	HaeI	8	953 2274 2346 2403 2800	UbaJI	24			
Bpu10I	1	2935			3844 3855 4307	VspI	4	486 1910 1969 4894		
Bpu1102I	1	267	HaeII	13		XbaI	1	437		
BsaI	1	4783	HaeIII	29		XcmI	3	1081 1597 1615		
BsaAI	1	3581	Hgal	15		XhoI	1	324		
BsaBI	3	502 508 3026	HgiEII	2	823 4415	XmnI	2	3387 5321		
BsaHI	8	548 569 683 1182 1865	Hhal	44		Enzymes that do not cut pET-19b:				
		2560 5259 5641	Hin4I	5	16 1124 2495 4721 4795	AfIII	Agel	AscI	AvrII	BaeI
BsaJI	11		HincII	2	1731 5263	BseRI	BsrGI	Bsu36I	DrallI	FseI
BsaWI	7	189 1544 2047 3018 4035	HindIII	1	29	KpnI	MunI	NheI	NotI	NsiI
		4182 5013	Hinfl	14		NspV	Pacl	PmeI	PmlI	RleAI
BsaXI	1	1884	Hpal	1	1731	RsrII	Sacl	SacII	Sall	SexAI
Bsbl	2	3545 5265	HphI	17		Sfil	Sgfl	Smal	SnaBI	SpeI
BscGI	13		Maell	12		SrfI	Sse8387I	Stul	SunI	Swal
BsgI	3	1076 1276 2989	MaeIII	18						
Bsil	3	4002 5386 5693	Mboll	15						
BsiEI	6	2010 2296 3745 4169 5092	Mlul	1	1225					
		5241	Mmel	2	4044 4228					
BsII	22		MnlI	34						
BsmI	1	2713	MscI	1	2800					
BsmAI	7	922 1327 1453 1840 3470	Msel	24						
		4783 5559	MslI	10	1277 1565 1595 2385 2816					
BsmBI	2	1840 3470			3011 3402 4974 5133 5492					
BsmFI	4	686 2227 2452 3100	MspI	35						
BsoFI	52		MspAII	11						
Bsp24I	12		Mwol	44						
Bsp1286I	11		NarI	5	548 569 683 1865 2560					
BspEI	2	189 3018	NciI	14						
BspGI	3	2413 2490 3355	NcoI	1	398					
BspLU11I	1	3829	NdeI	1	331					
BspMI	1	2408	NgoAIV	4	535 2123 2283 2637					
BsrI	25		NlaIII	31						
BsrBI	3	458 3762 5563	NlaIV	28						
BsrDI	4	1272 1638 4783 4957	NruI	1	2328					
BsrFI	8	160 535 544 911 2123	NspI	4	700 3174 3466 3833					
		2283 2637 4802	Pfi1108I	2	2112 4740					