

Otimização do Processo de Desagregação e Renaturação da Cisteína Protease Cruzaína utilizando Altas Pressões Hidrostáticas

Natália Mestre Egea e Lígia Ely Morganti Ferreira Dias
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

Alta pressão é uma ferramenta útil para dissociação de agregados protéicos em proteínas nativas em uma única etapa, facilitando a preparação de proteínas para estudos estruturais e funcionais [1]. Cruzaína é uma glicoproteína considerada um fator de virulência do parasito *Trypanosoma cruzi* importante na interação parasito-hospedeiro [2]. Assim, com o intuito de obtermos altos níveis de cruzaína nativa a partir de agregados insolúveis e inativos (Corpos de inclusão), diferentes condições de renaturação sob pressão foram testadas.

OBJETIVO

Otimizar o processo de solubilização e de renaturação da proteína cruzaína expressa em forma de corpos de inclusão (CI) citoplasmáticos produzidos em *Escherichia coli* utilizando altas pressões hidrostáticas.

METODOLOGIA

A fim de aumentar a dissociação e renaturação da cruzaína, corpos de inclusão (CI) desta proteína foram produzidos em *E. coli* (DE3), a indução da sua expressão foi realizada pela adição de IPTG e cultivo por 16 horas a 30°C. Amostras em suspensão de CI da cruzaína foram submetidas à ação da pressão. O efeito de aditivos e esquemas de compressão / descompressão na renaturação da cruzaína foram investigados. A dissociação dos agregados protéicos sob pressão associada à aplicação de diferentes temperaturas foi avaliada pela queda nos valores de

espalhamento de luz (excitação a 320 nm e digitalização entre 300 e 350 nm). A magnitude de desagregação e possíveis mudanças no tamanho e morfologia dos corpos de inclusão submetidos à ação da pressão (2,4 kbar) foi visualizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

RESULTADOS

Padronizaram-se os diferentes parâmetros que afetam a renaturação sob pressão. Diferentes esquemas de descompressão e incubação em pressões intermediárias não afetaram o rendimento de renaturação. Esta proteína se encontrou solúvel em todas as condições de pressão na presença de L-arginina, na ausência destas condições não se observou proteína solúvel (Figura 1).

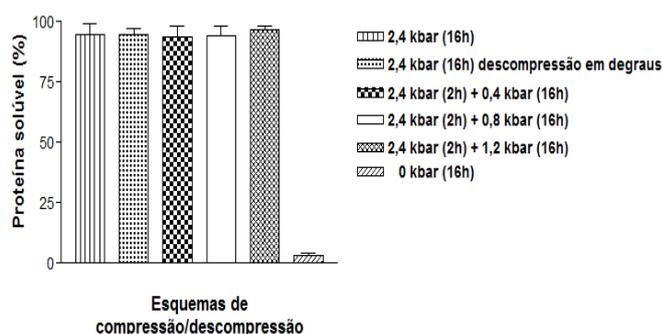


Figura 1. Efeito dos diferentes esquemas de compressão/descompressão na renaturação da cruzaína. Todas as amostras continham 3,3 mM GSH; 6,6 mM GSSG, 0,5 M de L-arginina foram submetidas a diferentes esquemas de compressão e descompressão. Os resultados são expressos na forma de porcentagem de proteína solúvel em função do esquema de descompressão utilizado.

Comprovamos que a dissociação de corpos de inclusão da cruzaína em 2,4 kbar associada à temperatura negativa (-18°C) foi maior em comparação com a

dissociação realizada a 20°C (figura 2A). A magnitude da dissociação foi verificada por MEV de corpos de inclusão da cruzaina antes e após serem submetidos à aplicação de alta pressão (2,4 kbar) e temperaturas negativas (-18°C). Observamos raríssimos CI da cruzaina após aplicação de pressão em temperatura negativa (Figura 2 B e C). Portanto, a aplicação de temperatura negativa mostrou-se importante para elevar e manter a dissociação dos agregados após o retorno à pressão atmosférica.

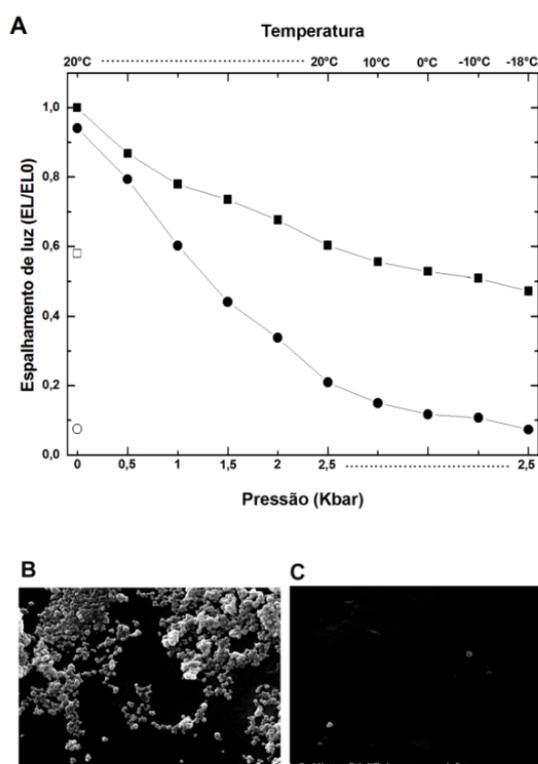


Figura 2. Dissociação em temperaturas negativas e alta pressão hidrostática elevam a dissociação da cruzaina. **A**, Espalhamento de luz de amostras na presença (●) ou na ausência 0,5 M de L-arginina(■) foram monitoradas em função da pressão e temperatura. Cada dado foi coletado quando a pressão ou temperatura se estabilizaram. Os símbolos isolados no lado esquerdo do painel representam o valor de espalhamento de luz após o retorno a pressão atmosférica. **B**, Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de corpos de inclusão da cruzaina não pressurizados. **C**, MEV da fração insolúvel de corpos de inclusão dissociados após compressão de 2,4 kbar em temperaturas negativas na presença de 0,5 M de L-arginina.

CONCLUSÕES

A renaturação da cruzaina promovida pela alta pressão foi otimizada na presença de L-arginina e a utilização de temperaturas negativas (-18°C) e foi obtido um rendimento de praticamente 100%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]Seefeldt, M.B., J. Ouyang, et AL. (2004). "High-pressure refolding of ubiquitin: efficacy and thermodynamics". *Protein Sci* **13**(10): 2639-50.
- [2]Cazzulo, J. J. (2002). "Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease" *Curr Top Med Chem* **2**(11): 1261-71.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPQ e FAPESP