



Voltar

CARACTERIZAÇÃO DA RENATURAÇÃO DA CISTEÍNA PEPTIDASE CRUZAIÑA UTILIZANDO ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS

Jessica Santiago Guimarães 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]. Cruzaina 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 cruzaina nativa, foram desenvolvidos estudos de renaturação sob pressão desta proteína.

OBJETIVOS

Caracterizar o processo de renaturação em alta pressão da proteína cruzaina expressa na forma de corpos de inclusão citoplasmáticos produzidos em *Escherichia coli*.

METODOLOGIA

Corpos de inclusão da cruzaina, produzidos na linhagem de *E. coli* BL-21

denominados corpos de inclusão. As bandas correspondendo à massa molecular da cruzaina recombinante podem ser observadas na figura 1.

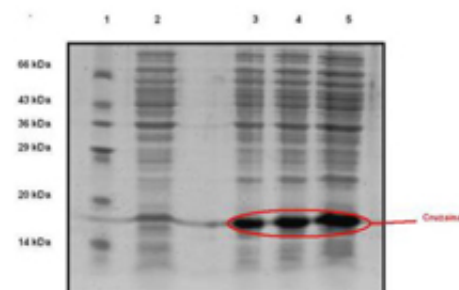


Figura 1 – Extratos celulares de *E. coli* contendo o plasmídeo de expressão pCheYTc. 1 M- Marcador de massa molecular; 2- Expressão não induzida (sem IPTG); 3- Fração insolúvel produzida a 20°C; 4- Fração insolúvel produzida a 30°C; 5- Fração insolúvel produzida a 37°C.

O tratamento por pressão nos corpos de inclusão da cruzaina promoveu uma redução muito efetiva na concentração dos mesmos (Figura 2 A e B), indicando que a alta pressão hidrostática foi eficaz na

(DE3), foram submetidos à ação da pressão (2,4 kbar por 16 horas). A magnitude de desagregação e possíveis mudanças no tamanho e morfologia dos corpos de inclusão submetidos à ação da pressão foi visualizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A ação da cruzaina renaturada sob pressão foi testada pela atividade enzimática desta proteína sobre o peptídeo sintético ZFR-MCA.

RESULTADOS

A cruzaina é expressa majoritariamente na forma de precipitados insolúveis

cromatograma apresentado na Fig. 3 podemos observar um único pico simétrico com um tempo de retenção de 18,5 min, indicando que a cruzaina está no estado monomérico e apresenta alto grau de pureza.

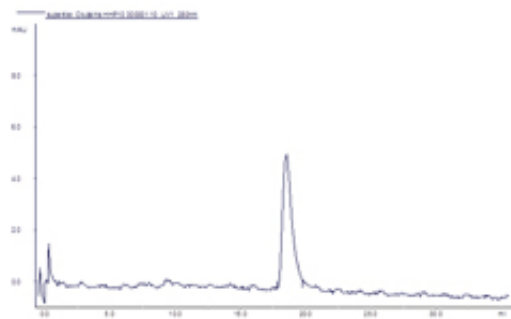


Figura 2. Cromatograma da cruzaina renaturada em alta pressão

A renaturação desta proteína em pH 6.0 resultou em uma proteína com atividade específica similar à atividade da proteína nativa. Confirmando que cisteíno-

desagregação de corpos de inclusão desta proteína.

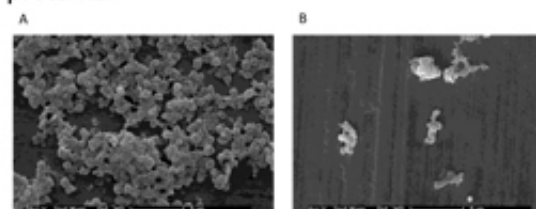


Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos corpos de inclusão da cruzaina. O aumento utilizado foi de 5000 X. **A)** corpos de inclusão e **B)** fração insolúvel dos corpos de inclusão que foram tratados em alta pressão hidrostática.

A cruzaina renaturada em alta pressão foi caracterizada por exclusão molecular. No

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.
- [3] Cazzulo, J. J., M. C. Cazzulo Franke, et al. (1990). "Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*." *Biochim Biophys Acta* **1037**(2): 186-91.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPQ e FAPESP

peptidases como a cruzaina, apresentam maior atividade em pH ácido [3].

Tabela I

Condição de renaturação	Concentração da amostra	Concentração do substrato	Atividade enzimática	Substrato hidrolisado
Cruzaina	20 μ M	5 μ M	500 uAF	$5,91^{-3}$ μ M/min
2,4 kbar (16h) pH 8,0	20 μ M	5 μ M	320 uAF	$3,79^{-3}$ μ M/min
2,4 kbar(16h) pH 6,0	20 μ M	5 μ M	490 uAF	$5,79^{-3}$ μ M/min

CONCLUSÕES

A alta pressão hidrostática foi eficaz na desagregação e renaturação da cruzaina produzida na forma de corpos de inclusão citoplasmáticos. Mudanças no pH exercem um profundo efeito na atividade a enzimática da cruzaina promovendo a renaturação desta proteína com atividade específica similar à da proteína nativa.

[Voltar](#)