

CARACTERIZAÇÃO DO SÍTIO CATALÍTICO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA-I REGIÃO N-DOMÍNIO

Carolina Machado dos Santos e Regina Affonso
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

O sistema renina angiotensina (SRA) é reconhecido como um importante regulador da pressão arterial e da homeostase eletrolítica renal. Este é um sistema que influencia o funcionamento renal, neuronal, cardíaco, pancreático, vascular, adrenal, pituitário, cognitivo, inflamatório e reprodutivo. A Enzima Conversora de Angiotensina (ACE) é classificada como uma metaloprotease dependente de zinco, responsável por catalisar a hidrólise de peptídeos como Ang I e bradicinina (BK). Para ela, foram descritas duas isoformas: a somática (sECA) e a testicular (tECA) [1]. É constituída por duas cadeias de polipeptídeos, as quais possuem 60% de homologia e são denominadas C-domínio e N-domínio e possuem sítios catalíticos com ações distintas. Como a sECA tem uma função chave nesse sistema, é de grande relevância o estudo da atividade de clivagem de seus sítios catalíticos, considerando as especificidades de cada domínio. Em trabalhos anteriores deste laboratório, o sítio catalítico da região C-domínio da sACE foi obtido, com estrutura e atividade avaliadas. Portanto, a obtenção do sítio catalítico da região N-domínio é fundamental no estudo da funcionalidade comparativa entre os dois sítios, a partir do qual poderá ser avaliada a utilização deles como ferramentas de inibição ou clivagem em futuras aplicações na clínica médica. Este trabalho visa avaliar as características físicas químicas do sítio catalítico da enzima ACE, região N-domínio, (aqui denominado csACEn) expressa em sistema bacteriano.

OBJETIVO

- Caracterização do sítio catalítico por peso molecular e imunológico;
- Avaliação da ação de diferentes soluções tampões na clivagem da pré-proteína, a saber- cs-ACEn ligada a uma sequência de elastina;

METODOLOGIA

Expressão da proteína recombinante: A expressão da csACEn recombinante foi feita com a adição de 0,5 mM de IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). O período de ativação foi de 20 h [3].

Precipitação e isolamento da csACEn Foram utilizados as soluções de 0,57M (A) e de 0,8M (B) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Clivagem da proteína: Esta foi feita em Tris 20mM, pH 6.8 ou fosfato de sódio 20mM, pH 6.0

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): As análises de todas as etapas do processo foram realizadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE [2].

Dot blotting: Para esta análise utilizou-se o protocolo descrito em Carvalho *et. al.*, 2014.

RESULTADOS

No início deste trabalho foram feitos experimentos nas temperaturas de 18°C e 25°C, sem expressão da proteína (dados não mostrados). Os resultados obtidos com a temperatura de 37°C foram bastante expressivos. Nas análises em SDS-PAGE, Fig. 1, pode-se observar a proteína na linha

10. Nesta figura, pode ser observado que o pelete resultante da amostra da linha 11 contém contaminante específico, que confirma a clivagem desta da proteína de interesse.

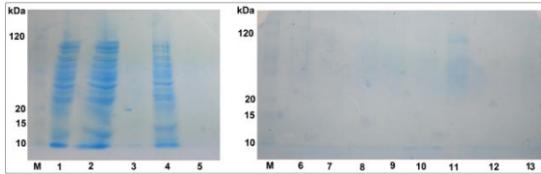


Fig 1 Análise em SDS-PAGE do experimento de isolamento e clivagem. Linhas: 1), sobrenadante do sonicado filtrado; 2) e 3), wash 1 com 0,57M e 0,8M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente; 4) e 5) wash 2 com 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6) csACEn em tris pH 6.8; 7) pellet; 8) csACEn em fosfato de sódio pH 6.0; 9) pellet; 10) csACEn em tris pH 6.8; 11) pellet; 12) csACEn em fosfato de sódio pH 6.0; 13) pellet; e 14 - csACEn em tris pH 6.8

Para confirmar a presença da csACEn nas amostras obtidas nas etapas do experimento de isolamento e clivagem, estas foram submetidas ao ensaio imunológico-Dot blotting. Neste pode ser observado que a proteína de estudo está presente em quase todas as amostras, com exceção da amostra BF.

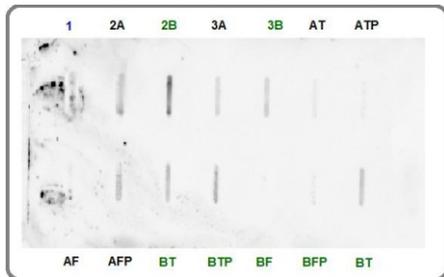


Fig. 2: Análise das amostras por dot blotting utilizando anticorpo anti-ACE. Linhas: 1 – sobrenadante do sonicado filtrado; 2A e 2B- wash 1 com 0,57M e 0.8 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3A e 3B – wash 2 com 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; AT – csACEn em tris pH 6.8; ATP – pellet; AF - csACEn em fosfato de sódio pH 6.0; AFP – pellet; BT – csACEn em tris pH 6.8; BTP –

pellet; BF – csACEn em fosfato de sódio pH 6.0; BFP – pellet; BT- csACEn em tris pH 6.8

As amostras obtidas nos protocolos A e B foram analisadas pelos métodos de SDS-PAGE e Dot Blotting, nos quais se pode observar que o método de A possibilitou a obtenção da proteína de interesse. Nestes dois protocolos de isolamento pode-se observar a presença de cs-ACEn, embora a amostra se encontre ainda com muitas impurezas, a proteína de interesse está presente e na forma solúvel

Quanto a ativação sob temperaturas mais altas, esta foi mais eficiente na expressão da csACEn, pois esta é mais adequada para a expressão em *E. coli*.

CONCLUSÕES

O processo de ativação a uma temperatura maior foi mais produtiva para a expressão da cs-ACEn; O processo de isolamento ainda não foi definido, pois ainda há proteína csACEn na amostra de lavagem. A csACEn foi obtida na sua forma solúvel e praticamente pura após a etapa de clivagem no tampão Tris, embora a clivagem ainda não é totalmente efetiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ELISSEEVA, Yu E.; KUGAEVSKAYA, E. V. Structure and physiological importance of angiotensin converting enzyme domains. Biochemistry (MOSCOW) Supplement series b: Biomedical Chemistry, v. 3, n. 3, p. 237, 2009.
- [2] CARVALHO, Cristina Valleta de; RICCI, Giannina; AFFONSO, Regina. Guia de Práticas em Biologia Molecular. 2. ed. São Paulo: Saraiva, 2015. 2 p. 2 v.
- [3] COOLBAUGH MJ, SHAKALLI MJ, WOOD DW. High-throughput purification of recombinant proteins using self-cleaving intein tags. Analytical Biochemistry 516 (2017) 65-74.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO
CNPq/IPEN.