

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**PROTEÍNAS DE FUSÃO ENDOSTATINA-PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE
APOPTÓTICA: EXPRESSÃO E ESTUDO DE ATIVIDADE
ANTIANGIOGÊNICA**

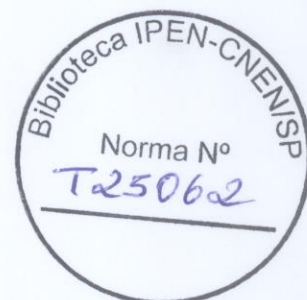
ROSA MARIA CHURA CHAMBI

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

São Paulo

2009



Dedico este trabalho:

*Ao meu amado pai Ricardo Chura,
um homem maravilhoso que sempre
me incentivou a crescer na vida e
sobretudo me ensinou com seu
exemplo a acreditar que tudo é
possível com dedicação e amor pelas
coisas que realizamos*

*À minha amada mãe Gregoria
Chambi, uma mulher
extraordinária, exemplo de
fortaleza, perseverança,
sacrifício, desprendimento e
dedicação a família que sempre
me ensinou a dar valor as coisas
simples da vida*

*Às minhas irmãs **Silvia**,
Haydee, **Joanny**, ao meu irmão
Roberto e às minhas sobrinhas
Maria Fernanda, **Ariana** e
Daniela por sempre torcerem
por mim e me darem forças nos
momentos difíceis*

Viver vale a pena!

Que a felicidade não dependa do tempo, nem da paisagem, nem da sorte, nem do dinheiro. Que ela possa vir com toda a simplicidade, de dentro para fora, de cada um para todos. Que as pessoas saibam falar, calar, e acima de tudo ouvir. Que tenham amor ou então sintam falta de não tê-lo. Que tenham ideal e medo de perdê-lo. Que amem ao próximo e respeitem sua dor, para que tenhamos certeza de que viver vale a pena. Viver é colocar seu sonho à prova. Os brotos da esperança crescem alimentados pelo sonho. É preciso reviver o sonho e a certeza de que tudo vai mudar. É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. Mas é preciso ver as coisas com o coração e nem sempre com a razão.

Não se esqueça de que o aprendizado dura a vida toda. Eleve suas expectativas. Pessoas com sonhos grandes obtêm energia para crescer. Os vencedores pensam em como realizar seu objetivo. Por isso ... Tenha metas claras. Ter objetivos evita desperdícios de tempo, energia e dinheiro. Amplie os seus relacionamentos profissionais. Os amigos são a melhor referência em crises e a melhor fonte de oportunidades na expansão. Ter bons contatos é essencial em momentos decisivos. No mais o importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe ver. Afinal a vida é uma arte, viver vale a pena!

Flávia C. Nery

AGRADECIMENTOS

À Dra. Lígia Ely Morganti Ferreira Dias, uma pessoa maravilhosa que iluminou meu caminho durante todos esses anos. Nunca terei palavras suficientes para agradecer a oportunidade dada, os ensinamentos passados, não só conhecimentos científicos, mas sobretudo os exemplos de vida dignos de serem imitados. Muito obrigada pelo apoio brindado, pela confiança dada, pelo companheirismo, os conselhos dados que com certeza foram os que mais me fizeram amadurecer e crescer. Posso dizer com certeza que nunca me senti só, sempre tive o apoio incondicional nos momentos difíceis de uma amiga que me ensinou com seu exemplo a ser uma boa cientista, determinada que ama seu trabalho e o realiza com a maior competência. Minha maior admiração, respeito, carinho e eterna gratidão.

Às minhas irmãs de coração Magda, Lucy, Zaira, Margoth, Verônica, Kátia, Simone e Victoria, e meus sobrinhos Leo e Livian, minha família para todas as horas, pessoas que me amam e que eu amo sinceramente, que se preocupam e torcem por mim. Muito obrigada pelos momentos felizes, pelo apoio em momentos difíceis. Com certeza a presença de vocês foi e é vital na minha vida. Amizade sincera e apoio incondicional me dão força e ânimos para continuar lutando por meus objetivos.

À minha família brasileira, Antonia, Teresa, Débora, Kimberly, Edjaney, David, Antonio, Rangel, Wong Lo e todos que fazem parte da família Medeiros da Silva que me ensinaram que para fazer parte de uma família não é necessário ter o mesmo sangue.

À Dra. Regina Affonso, uma amiga incondicional e generosa de coração. Obrigada por se preocupar por mim, pela ajuda oferecida e brindada nos momentos que mais precisei, eu agradeço de coração Rê.

Aos colegas e amigos Natália, Danielle, Keli, Janaina, Juliana, Camila, Karina, Danizinha, Fernanda, Alberto, Murilo, Jean, Renata, Elisa, Bia, Priscila, Tiago e Edu, muito obrigada pelo companheirismo e ajuda sempre brindada ao longo de toda esta etapa.

Ao Dr. Gustavo Amarante e à Dra. Jackeline Jacysyn, pela colaboração com os ensaios de apoptose.

Ao Dr. Paulo Lee Ho, pela realização dos ensaios de dicroísmo circular.

Ao Dr Álvaro Prieto da Silva e à Dra Helen Arcuri pela ajuda na modelagem molecular.

A todos os colegas do Centro de Biologia Molecular do IPEN pelo auxílio e apoio.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

À FAPESP pela concessão dos recursos financeiros para realização deste trabalho.

A todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

PROTEÍNAS DE FUSÃO ENDOSTATINA-PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE APOPTÓTICA: EXPRESSÃO E ESTUDO DE ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA

RESUMO

Endostatina é um dos inibidores de angiogênese mais estudados para o tratamento de câncer. Tem mostrado inibir especificamente a proliferação de células endoteliais e ser um potente inibidor de angiogênese e crescimento tumoral. Com o intuito de aumentar sua eficiência terapêutica, fundimos a endostatina a peptídeos indutores de apoptose obtendo proteínas de fusão compostas de dois domínios funcionais: o primeiro domínio composto pela endostatina, que apresenta especificidade pelas células endoteliais ativadas, utilizado para dirigir a proteína de fusão e permitir sua internalização pelas células ativadas, e como segundo domínio, um peptídeo indutor de morte celular programada (Bax ou Bak), possivelmente tóxico somente quando internalizado, por proporcionar a liberação de citocromo C e desencadear a cadeia de eventos que culminam em apoptose celular. Foram desenhadas três proteínas de fusão, duas delas cujos domínios pró-apoptóticos são peptídeos derivados das proteínas Bax ou Bak fundidos no C-terminal da endostatina (endo-bax e endo-bak) e uma terceira proteína de fusão na qual a α -hélice da endostatina foi trocada pela α -hélice do peptídeo Bax (EBE). As proteínas de fusão foram expressas como agregados protéicos em corpos de inclusão produzidos em *E. coli* e renaturadas com sucesso valendo-se da aplicação de altas pressões. O enovelamento destas proteínas foi comprovado por análises espectroscópicas de CD e fluorescência intrínseca, evidenciando que as proteínas de fusão endo-Bax e endo-Bak possuem estrutura secundária e terciária semelhantes à da endostatina selvagem, enquanto a proteína de fusão EBE apresentou estrutura diversa. Tanto a endostatina quanto as três proteínas de fusão foram eficientemente internalizadas pelas células de origem endotelial (C-PAE), o mesmo não ocorrendo quando células de origem não endotelial (NIH 3T3) foram tratadas com as mesmas proteínas, comprovando a especificidade das proteínas de fusão pelas células endoteliais ativadas. Demonstramos que as proteínas de fusão apresentando o peptídeo pró-apoptótico Bax (endo-Bax e EBE) possuem maior atividade de indução de morte de células de origem endotelial por apoptose do que a endostatina nativa. Este pode ser um caminho para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com especificidade para o endotélio tumoral e com ação apoptótica aperfeiçoada com relação à endostatina.

FUSION PROTEINS ENDOSTATIN-PEPTIDES WITH APOPTOTIC ACTIVITY: ESPRESSION AND STUDY OF ANTIANGIOGENIC ACTIVITY

ABSTRACT

Endostatin, one of the most studied angiogenesis inhibitors for cancer treatment, was shown to specifically inhibit the proliferation of endothelial cells and to be a potent angiogenesis and tumor growth inhibitor. In order to increase its therapeutic efficiency, endostatin was fused to pro-apoptotic peptides aiming to obtain fusion proteins composed of two functional domains: the first domain composed by endostatin, which presents specificity for the endothelial cells, used to drive the fusion protein and to allow its internalization by the activated cells, and as second domain, a peptide inductor of programmed cellular death (Bax or Bak), toxic only when internalized, by fostering cytochrome-C release and initiating the chain of events that culminate in cellular apoptosis. Three fusion proteins were designed, at two of them the pro-apoptotic domains (BH3) derived from Bax or Bak were fused to the C-terminal of endostatin (endo-Bax and endo-Bak, respectively). The third fusion protein was obtained by substitution of endostatin's α -helix for the α -helix of the Bax BH3 peptide (EBE). The fusion proteins were expressed as aggregated proteins in inclusion bodies produced in *E. coli* and the refolding was obtained with success by the application of high pressures. The coiling of the proteins was proven by the spectroscopic analysis of circular dichroism and intrinsic fluorescence emitted by Trp. The fusion proteins endo-Bax and endo-Bak hold secondary and tertiary structures similar to wild-type endostatin, while EBE presented a diverse structure. Endostatin and the three hybrid proteins were efficiently internalized by endothelial cells (C-PAE), but not by non-endothelial cells (NIH 3T3 fibroblasts), proving the specificity of the four proteins by activated endothelial cells. Finally, we demonstrated that the presence of the pro-apoptotic peptide bax fused to endostatin potentialized the activity of this protein. Endo-bax and EBE showed higher activity of endothelial cell death induction by apoptosis than wild-type endostatin. This can be a new approach to the development of therapeutic agents with specificity for tumoral endothelium with improved apoptotic action.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Angiogênese.....	1
1.2. Endostatina.....	5
1.3. Peptídeos contendo o domínio BH3 de proteínas pró-apoptóticas.....	9
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Materiais.....	16
3.2. Métodos.....	20
3.2.1. Estudo de modelagem molecular das proteínas de fusão.....	20
3.2.2. Construção dos vetores de expressão.....	23
3.2.2.1. Amplificação e clonagem do gene da endostatina.....	23
3.2.2.2. Mutagênese sítio-específica para obtenção das proteínas de fusão.....	24
3.2.2.3. Subclonagem dos cassetes de expressão: endostatina, endo-Bak, endo-Bax e EBE.....	28
3.2.3. Expressão das proteínas de fusão e isolamento dos agregados protéicos (corpos de inclusão).....	29
3.2.4. Renaturação de agregados de endostatina e mutantes.....	30
3.2.4.1. Renaturação utilizando altas pressões hidrostáticas.....	30
3.2.4.2. Utilização de pressões decrescentes na renaturação da endostatina e seus mutantes.....	31
3.2.4.3. Análise morfológica dos agregados protéicos tratados com altas pressões utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
3.2.5. Purificação da endostatina e dos mutantes.....	31
3.2.6. Caracterização das proteínas renaturadas.....	32
3.2.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	32

3.2.6.2. Western blot.....	33
3.2.6.3. Dosagem de proteínas.....	33
3.2.6.4. Análises espectroscópicas das proteínas renaturadas.....	34
3.2.6.4.1. Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD).....	34
3.2.6.4.2. Espectroscopia de Emissão de Fluorescência.....	34
3.2.7. Análise de atividade da endostatina e das proteínas de fusão.....	35
3.2.7.1. Análise da internalização de endostatina e das proteínas mutantes por Western blot.....	35
3.2.7.2. Análise da internalização de endostatina e mutantes por imunofluorescência.....	35
3.2.7.3. Ensaio de viabilidade celular.....	37
3.2.8. Análise de apoptose.....	38
3.2.8.1. Citometria de fluxo.....	38
3.2.8.2. Ensaio de ativação de caspases.....	38
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Modelagem molecular das proteínas de fusão endostatina-BH3 das proteínas apoptóticas.....	40
4.2. Construção dos vetores de expressão de endostatina e das proteínas de fusão e mutantes.....	47
4.3. Expressão da endostatina e das proteínas de fusão.....	49
4.4. Renaturação de agregados protéicos de endostatina e proteínas de fusão utilizando altas pressões hidrostáticas.....	51
4.4.1. Renaturação de endostatina e seus mutantes aplicando pressões decrecentes.....	55
4.4.2. Análise morfológica dos agregados protéicos tratados com altas pressões utilizando microscopia eletrônica de varredura.....	57
4.5. Purificação e caracterização de endostatina e proteínas de fusão.....	58
4.6. Análises espectroscópicas.....	59

4.6.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).....	59
4.6.2. Espectroscopia de Emissão de Fluorescência.....	61
4.7. Análise da atividade de endostatina e das proteínas mutantes em células endoteliais.....	62
4.7.1. Internalização de endostatina e mutantes avaliada por Western blot.....	62
4.7.2. Internalização de endostatina e mutantes avaliada por imunofluorescência.....	63
4.7.3. Ensaio de viabilidade celular.....	66
4.8. Análise de apoptose de células endoteliais.....	67
4.8.1. Análise por Citometria de fluxo.....	67
4.8.2. Ensaio de ativação de caspase-3.....	68
4. DISCUSSÃO.....	69
5. CONCLUSÕES.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Angiogênese

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Normalmente ocorre durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta é necessária em alguns eventos fisiológicos, como a cicatrização de feridas (HANAHAN; FOLKMAN, 1996).

O controle da angiogênese é feito por um fino balanço entre moléculas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas. Quando os mecanismos de controle falham, a angiogênese, seja excessiva ou deficiente torna-se patológica. Durante a progressão tumoral este balanço é alterado favorecendo os eventos pró-angiogênicos que levam ao crescimento de novos vasos os quais sustentam o crescimento tumoral (SHWEIKI et al., 1992; BERGERS; BENJAMIN, 2003; XU; YIN et al., 2008). A angiogênese tumoral é diferente da angiogênese fisiológica apresentando uma estrutura vascular aberrante, fluxo sanguíneo anormal, incremento da permeabilidade, e maturação demorada (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

A hipótese que o crescimento de tumores e metástases são dependentes de angiogênese foi proposta pela primeira vez por Folkman em 1971. Esta hipótese é bem aceita e comprovada por extensas evidências experimentais, sendo que a angiogênese tumoral emerge como um alvo importante na terapia do câncer (ABDOLLAHI et al., 2005; XU; YIN et al., 2008).

Em um estágio pré-vascular um tumor sólido raramente cresce mais do que 2 a 3 mm e pode conter alguns milhões de células. As células de tumores pré-vasculares podem proliferar tão rapidamente quanto aquelas de um tumor em expansão, no entanto, a taxa de crescimento de células em tumores sem neovascularização fica em equilíbrio com a sua taxa de mortalidade. Uma vez que o

tumor se torna vascularizado, ele cresce exponencialmente. A infiltração de novos vasos sanguíneos supre as células tumorais de oxigênio e nutrientes e remove os produtos de seu metabolismo (FOLKMAN, 1995).

O aumento da população celular tumoral é precedido pela proliferação de novos capilares nas proximidade do tumor. A angiogênese pode facilitar a formação de metástases aumentando a saída de células tumorais do sítio primário e sua entrada na circulação sanguínea através destes capilares, que são mais permeáveis do que os vasos maduros normais (DVORAK et al., 1995; HANAHAN; FOLKMAN, 1996; JOHN et al., 1999).

As células tumorais presentes num tumor primário produzem e liberam fatores angiogênicos nos tecidos próximos ao tumor. Estes fatores se ligam a receptores celulares específicos encontrados nas superfícies das células endoteliais e em consequência, formam novos vasos sanguíneos que vão levar nutrientes e oxigênio para o tumor. Geralmente a migração celular ocorre em direção ao local de origem das moléculas angiogênicas e as formações destes vasos são remodeladas progressivamente para suprir as necessidades fisiológicas locais (CARMELIET, 2000).

A angiogênese tumoral é caracterizada pela liberação de fatores de crescimento pró-angiogênicos no microambiente tumoral, pelo tumor ou por células inflamatórias em resposta a vários estímulos: secreção de fatores de crescimento, hipóxia, stress mecânico, liberação de proteínas inflamatórias, e alterações genéticas tais como ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (FOLKMAN, 2003). Os fatores pró-angiogênicos mais conhecidos são o fator de crescimento de fibroblastos (forma ácida ou aFGF e forma básica ou bFGF) (HORI et al., 1991; KANDEL et al., 1991; NGUYEN et al., 1994) e o fator de crescimento de célula endotelial (VEGF) (KIM et al., 1993; BOOCOOCK et al., 1995), os quais apresentam ação mitogênica sobre as células endoteliais. Tanto o VEGF quanto bFGF apresentam expressão aumentada em células de vários tipos de tumores (KONG; CRYSTAL, 1998). A hipóxia das células tumorais leva a um

aumento de expressão de VEGF (SHWEIKI et al., 1992). Estas duas famílias de fatores angiogênicos podem promover a neovascularização de uma maneira sinérgica (PEPPER et al., 1992). Entre outros reguladores positivos de angiogênese estão a angiotropina, angiogenina, o fator de crescimento epidérmico, citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e proteínas da matriz tais como colágeno e as integrinas (RIBATTI et al., 2000).

Considerando o requerimento da angiogênese para o crescimento e progressão tumoral, podemos assumir que a inibição da angiogênese poderia prevenir a progressão tumoral e de suas metástase. Vários inibidores de angiogênese têm recebido particular atenção por seu potencial terapêutico, assim muitos deles têm sido desenvolvidos usando como alvo as células endoteliais vasculares a fim de bloquear a angiogênese tumoral (O'REILLY et al., 1994).

Utilizar como alvo células que suprem o crescimento tumoral ao invés das células tumorais em si é uma abordagem particularmente promissora, pois estas células são geneticamente estáveis e, portanto menos aptas a sofrerem mutações que as tornem capazes de desenvolver resistência às drogas. Este tipo de terapia apresenta vantagens se comparada com a quimioterapia convencional como baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais, um amplo espectro de atividade e um reduzido risco de desenvolvimento de resistência (BISACCHI et al., 2003).

Até o momento vários inibidores da angiogênese têm sido desenvolvidos para o tratamento de câncer entre eles inibidores indiretos da angiogênese que geralmente inibem a atividade de fatores pró-angiogênicos ou a expressão de receptores pró-angiogênicos nas células endoteliais (MARGOLIN et al., 2001) e inibidores diretos da angiogênese que previnem a proliferação de células endoteliais (O'REILLY et al., 1994; O'REILLY et al., 1997; GUTHEIL et al., 2000).

Inibidores endógenos da angiogênese são definidos como proteínas ou fragmentos de proteínas capazes de inibir a formação de vasos sanguíneos. Pelo

menos 27 diferentes proteínas e pequenas moléculas foram descritas com a função de atuar como inibidores de angiogênese (NYBERG *et al.*, 2005; RIBATTI, 2009).

Entre os inibidores de angiogênese muito estudados podemos citar: interferons, inibidores de metaloproteinases, angiostatina (fragmento proteolítico do plasminogênio), trombospondina (fragmento proteolítico derivado do colágeno IX) e a endostatina (fragmento proteolítico derivado do colágeno XVIII) (GOOD *et al.*, 1990; O'REILLY *et al.*, 1994; O'REILLY *et al.*, 1997).

Agentes têm sido desenvolvidos para ter como alvo diferentes estágios da angiogênese. Estes incluem drogas inibidoras da degradação da matriz extracelular, inibidores de metaloproteinases da matriz (MMPs), tais como marimastate, prinomastate, BMS27529, BAY12-9566, e neovastate que são drogas que bloqueiam a sinalização das células endoteliais via o fator de crescimento de célula endotelial vascular (VEGF) e seu receptor (VEGFR) incluindo rhuMAb VEGF, SU5416, SU6668, ZD6474, CP547, 632 e ZD4190 (SRIDHAR; SHEPHERD, 2003).

Em 2005 a administração federal de alimentos e medicamentos (FDA) aprovou o uso de inibidores de angiogênese para o tratamento do câncer nos estados Unidos e em 28 países incluindo a união europeia (FOLKMAN, 2006). O tratamento com estes inibidores é considerado a quarta modalidade de terapia contra o câncer. Até o momento, a administração de inibidores de angiogênese em testes clínicos, assim como em vários modelos animais, tem mostrado resultados promissores (KWON; LIBUTTI, 2006).

Dentre os inibidores endógenos de angiogênese mais promissores, para o tratamento de tumores sólidos humanos pode-se ressaltar a endostatina um inibidor de angiogênese grandemente investigado para o tratamento de câncer (KONG; CRYSTAL, 1998; GASPARINI, 1999; CRISTOFANILLI *et al.*, 2002; SRIDHAR; SHEPHERD, 2003; TANDLE *et al.*, 2004).

1.2. Endostatina

A endostatina, é um fragmento de 20 kDa da porção C-terminal do colágeno XVIII. Esta proteína descrita por O'Reilly e col. (1997) foi purificada do produto de secreção de uma linhagem celular murina de hemangioendotelioma e tem mostrado ser um inibidor específico de proliferação e migração de células endoteliais e angiogênese e crescimento tumoral (DHANABAL; VOLK et al., 1999; SAUTER et al., 2000; HU et al., 2008).

Em 1998 Hohenester determinou sua estrutura cristalográfica por raios-X e cristalografia a 1.5 Å. A endostatina é um fragmento de 184 aminoácidos dos quais 42% são aminoácidos hidrofóbicos e quatro são cisteínas que formam duas pontes dissulfídicas Cys33 –Cys173 e Cys135–165. Sua estrutura esta composta predominantemente de folhas- β , loops e também de duas α -hélices (Figura 1).

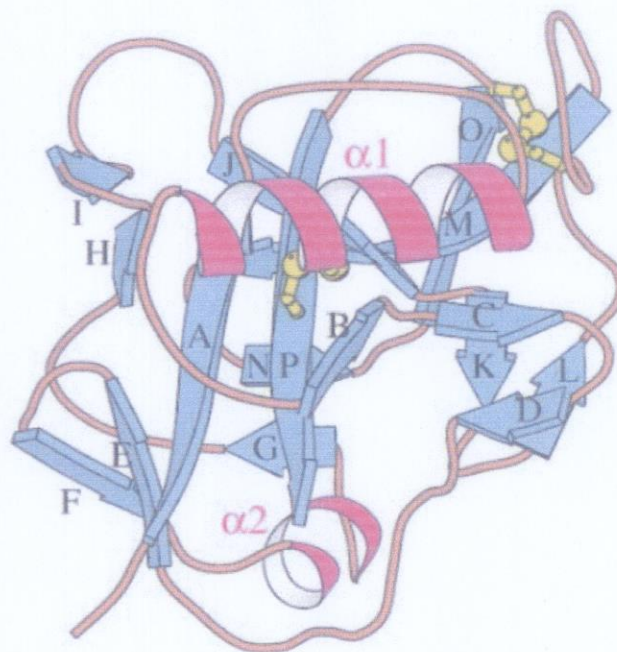


Figura 1: Representação da estrutura da endostatina. As folhas- β estão sequencialmente marcadas de A-P. As α -hélices estão representadas em *pink* e as pontes dissulfídicas em amarelo (Hohenester, 1998).

O grande interesse pela endostatina na área médica surgiu quando foi verificada sua capacidade de inibir tumores de tecido sólido *in vivo*, suprimindo o fenótipo angiogênico, afetando a formação de vasos sanguíneos e o crescimento de tumores. Portanto esta proteína é um dos inibidores de angiogênese mais estudados para o tratamento de câncer (LI et al., 2006). Trata-se por estes fatos de um agente com importante potencial terapêutico por ser um potente inibidor de angiogênese e crescimento tumoral (O'REILLY et al., 1997; BERGERS et al., 1999; REN et al., 2003).

Endostatina possui um amplo espectro de ação sobre diferentes tumores. O tratamento com esta proteína (20 mg/kg/dia) levou a quase completa regressão (estado de microtumores) de diferentes modelos de tumores primários (carcinoma pulmonar de Lewis, fibrosarcoma T241, hemangioendotelioma EOMA e melanoma B16F10) estabelecidos (O'REILLY et al., 1997). O crescimento de metástases de tumor de pulmão de Lewis, após a remoção do tumor primário, foi quase completamente suprimido pela administração de endostatina enquanto nos camundongos tratados com solução salina, as metástases desenvolveram-se rapidamente (O'REILLY et al., 1997).

Em um trabalho relacionado, Boehm e col. (1997) mostraram que ciclos repetitivos de endostatina administrados em camundongos portadores de tumores subcutâneos de diferentes tipos celulares, não produziram resistência ao tratamento, mesmo após 6 ciclos repetitivos de tratamento com endostatina. Os tumores se apresentaram em um estado de dormência prolongada ou permanecendo em um estado microscópico latente, mesmo após o término do tratamento.

A habilidade da endostatina em inibir a angiogênese também foi observada em numerosos estudos *in vivo*. O tratamento com endostatina tem sido correlacionado à inibição da angiogênese em modelos animais, sem efeito colateral, toxicidade ou desenvolvimento de resistência à droga (BOEHM et al., 1997; O'REILLY et al., 1997; PERLETTI et al., 2000; HU et al., 2008).

O tratamento de tumores e metástases utilizando a endostatina apresenta algumas vantagens sobre a quimioterapia convencional: o endotélio vascular é um alvo que pode ser facilmente atingido por agentes antiangiogênicos administrados sistemicamente; a endostatina é altamente específica para células endoteliais ativadas e sob condições fisiologicamente normais. Com exceção dos órgãos reprodutores femininos, as células endoteliais não se dividem; a endostatina possui baixa toxicidade; não causa resposta imunológica por se tratar de uma proteína endógena e apresenta ação sobre diferentes tipos de tumores, pois sua atuação é sobre o endotélio e não sobre as células tumorais.

A bioatividade da endostatina foi estudada extensivamente e é atribuída preferentemente a receptores de superfície celular. Muitas proteínas como as integrinas, tropomiosina, laminina e a metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) têm sido indicadas como receptores com diferentes afinidades de ligação os quais medeiam sua função (JAVAHERIAN et al., 2002; KIM et al., 2002; SUDHAKAR et al., 2003). No entanto recentemente Shi (SHI et al., 2007) reportou a nucleolina como sendo o novo receptor da endostatina, presente preferencialmente nas células endoteliais ativadas. Neste estudo Shi demonstrou que a endostatina se liga com alta afinidade e especificamente à nucleolina, presente na superfície celular. Quando a nucleolina é bloqueada, a atividade antiangiogênica da endostatina é perdida, demonstrando que a nucleolina medeia a internalização da endostatina. Assim esta proteína é transportada até o núcleo das células endoteliais inibindo a fosforilação da nucleolina, fator crítico para a proliferação celular.

Dhanabal (1999) e Schichiri e Hirata (SHICHIRI; HIRATA, 2001) demonstraram que a endostatina também atua reduzindo a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bcl2 e Bcl-XL assim como fatores de crescimento associados, levando ao incremento de 15-30 vezes na taxa de apoptose em células endoteliais. Além disto induz a ativação da caspase-3, uma protease intracelular que inicia a apoptose. Em ensaios *in vivo* a endostatina inibe a fosforilação de ERK-1 e 2 via VEGF e bFGF (SIM et al., 2000), além de diminuir a produção de *c-myc*, uma proteína necessária para a migração de células endoteliais (SHICHIRI; HIRATA,

2001), e a inibição da *ciclina-D*, levando a parada do G1 em células endoteliais (HANAI et al., 2002).

Endostatina é o primeiro inibidor endógeno que entrou em testes clínicos. Injeções intravenosas de endostatina não mostraram toxicidade significativa em pacientes tratados por períodos prolongados (EDER et al., 2002; HERBST et al., 2002; ABDOLLAHI et al., 2004; KULKE et al., 2006), mostrando uma farmacocinética linear na qual um incremento da dose resulta em um incremento proporcional de biodisponibilidade no plasma (HERBST et al., 2002).

No entanto, existem algumas restrições importantes com relação ao uso da endostatina para o tratamento antiangiogênico de tumores, uma delas é a necessidade de administração de altas doses para obtenção do efeito antiangiogênico. Os trabalhos que utilizam a endostatina para tratamento e que obtêm regressão de tumores sólidos em modelos animais, utilizam a dose de 20 mg/Kg de camundongo por dia (BOEHM et al., 1997; O'REILLY et al., 1997; KISKER et al., 2001). Para o homem esses valores corresponderiam a uma quantidade de aproximadamente 1,4 g de endostatina por paciente por dia. Se utilizarmos como referência as doses diárias utilizadas para o tratamento de nanismo com o hormônio de crescimento: da ordem de 35 µg/Kg/dia (por volta de 2,4 mg/dia), chegaremos à conclusão de que o tratamento de pacientes utilizando a endostatina é inviável devido à dificuldade de obtenção de quantidades suficientes desta proteína pura.

Estudos recentes demonstraram que a ação da endostatina não seria de uma forma dose-dependente, mas sim como uma curva dose-resposta em forma de sino, onde a eficácia do tratamento na diminuição do crescimento observa-se quando são utilizadas doses intermediárias (CELIK et al., 2005) o que sugere que provavelmente seja necessário o ajuste dos níveis de endostatina para obtenção de inibição do crescimento tumoral.

Foi demonstrado que a endostatina tem ação sobre diferentes tipos de linhagens celulares de origem endotelial, o mesmo não ocorrendo com células de outras origens (O'REILLY et al., 1997; DHANABAL; VOLK et al., 1999; DIXELIUS et

al., 2000). Dixelius (2000) e Zhou (ZHOU *et al.*, 2005) demonstraram que a endostatina é internalizada rapidamente por células endoteliais, mas não por células de origem não endotelial.

Não podemos deixar de lembrar a importância da especificidade da endostatina pelas células endoteliais ativadas. No caso de ocorrência de internalização da endostatina com maior potencial apoptótico pelas células endoteliais em estado quiescente, ocorreriam danos a vasculatura existente. Existem indicações de que esta especificidade existe. Foi demonstrada ausência ou diminuição do efeito da endostatina sobre as células endoteliais em estado quiescente. A ação da endostatina sobre as células endoteliais aparentemente mimetiza sua ação *in vivo*, ou seja, a endostatina é seletiva para a vasculatura tumoral aonde existe angiogênese (DHANABAL; VOLK *et al.*, 1999; DIXELIUS *et al.*, 2000).

1.3. Peptídeos contendo domínio BH3 de proteínas pró-apoptóticas

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação de apoptose, dentre estas, as proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases.

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000). A ativação de apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial).

A primeira é conhecida como via extrínseca, devido ao fato de ser estimulada por fatores extracelulares, os quais se ligam aos membros de uma família de proteínas presentes na superfície celular, denominada receptores de morte. Esta via é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (BUDIHardjo *et al.*, 1999). Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos (Figura 2). A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular" (NAISMITH; SPRANG, 1998). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, desencadeando assim a morte por apoptose (DANIEL *et al.*, 2001).

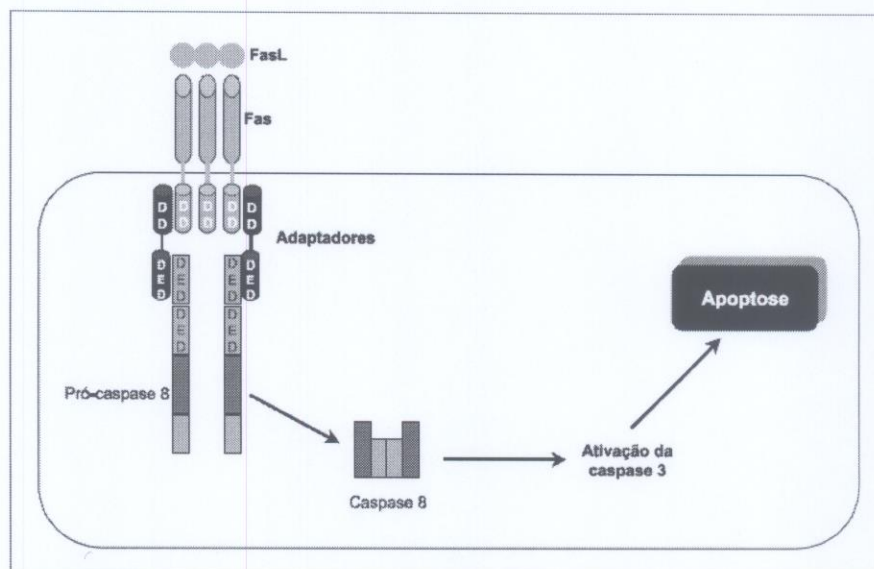


Figura 2: Via extrínseca da ativação da apoptose (Grivicich, 2007)

DD=domínio de morte; DED=efetor do domínio de morte

A segunda, denominada via intrínseca, é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (DESAGHER; MARTINOU, 2000) (Figura 3).

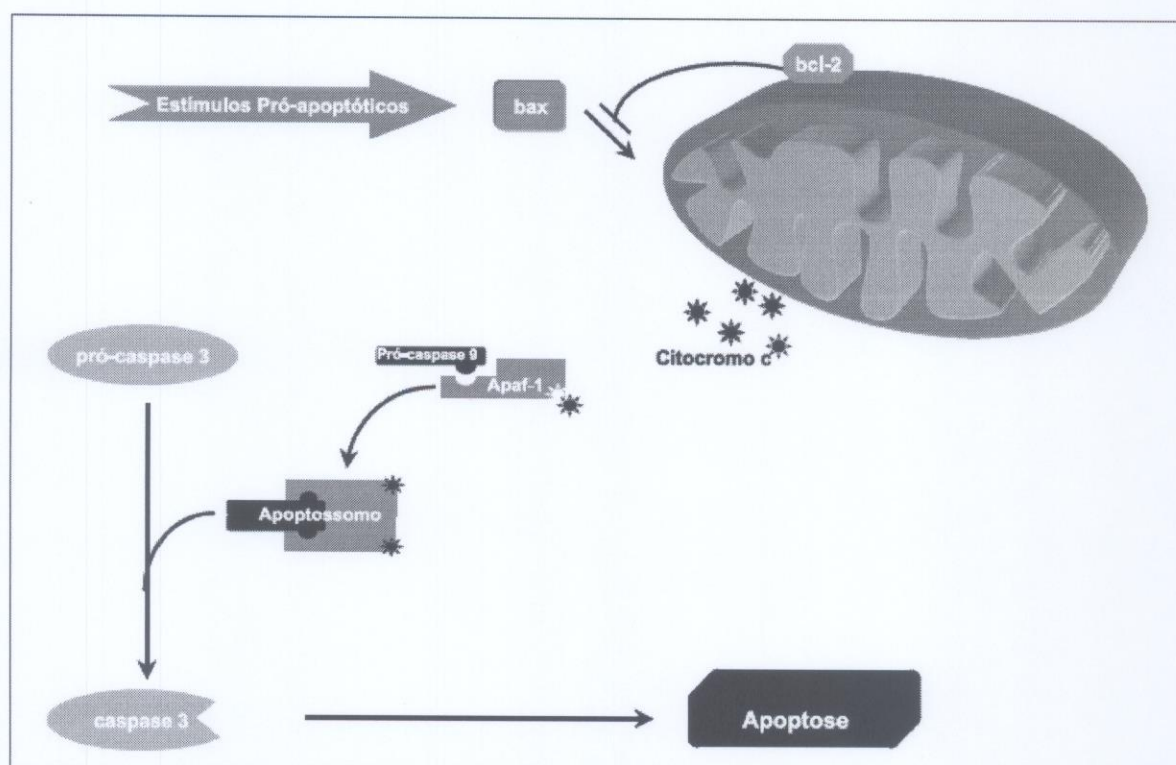


Figura 3: Via Intrínseca da ativação da apoptose (Grivicich, 2007).

Apaf-1=fator de ativação de protease associada à apoptose 1

Bcl-2 e proteínas relacionadas são uma família de moléculas que regulam a apoptose (ADAMS; CORY, 1998; CHAO; KORSMEYER, 1998; REED, 2000; HARADA; GRANT, 2003; PETROS *et al.*, 2004; FENNELL; CHACKO, 2008). O

desajuste de várias proteínas desta família está implicado em diversas condições patológicas. Níveis de expressão elevados de Bcl-2 são encontrados em uma ampla variedade de cânceres humanos (FERNANDEZ et al., 2002), mediando uma maior resistência das células à apoptose e maior resistência à quimio e radioterapias.

Foram descritas várias proteínas relacionadas à Bcl-2. Enquanto algumas são anti-apoptóticas como a Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-W, Mcl-1, A-1, entre outras, alguns dos membros desta família, que incluem Bax, Bak, Bcl-x_S, Bok/Mtd, Bak, Bik, Bid, Bim, Hrk e Blk apresentam funções biológicas opostas, promovendo a apoptose celular. (ADAMS; CORY, 1998; KELEKAR; THOMPSON, 1998; REED, 2000; CHAN; YU, 2004; FLETCHER; HUANG, 2008).

São características desta família de proteínas a habilidade dos seus membros de interagir entre si formando heterodímeros e homodímeros e dividir homologia em uma das quatro regiões designadas de regiões de homologia a Bcl-2 (BH): domínios BH1, BH2, BH3 e BH4 (Figura 4).

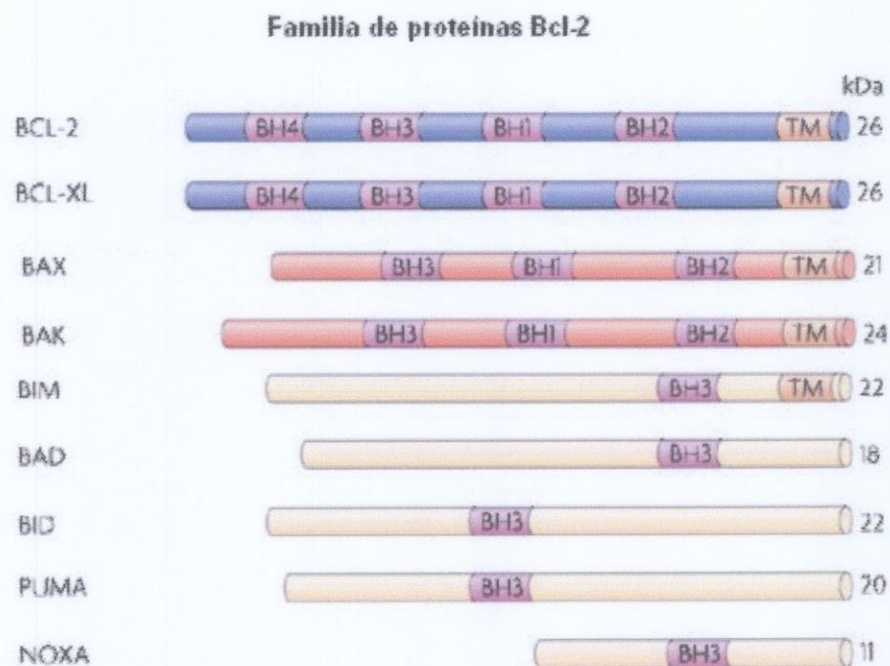


Figura 4: Domínios BH1 presentes na família de proteínas Bcl-2 (Taylor, 2008).

Enquanto todas as quatro regiões estão presentes em algumas das proteínas, incluindo Bcl-2 e Bcl-x_L, outras não apresentam um ou mais desses domínios. As proteínas que atuam como inibidoras de apoptose apresentam no mínimo três domínios BH1, BH2 e BH3, bem como um domínio trans-membrana. O BH3 das proteínas pró-apoptóticas da família da Bcl-2 se apresenta como o domínio mínimo requerido para a indução de apoptose (ADAMS; CORY, 1998; GROSS *et al.*, 1999; HUANG; STRASSER, 2000; BORNER, 2003; CHAN; YU, 2004; FENNELL; CHACKO, 2008). Peptídeos (16 a 33 aminoácidos) baseados na região mínima do domínio BH3 de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bak) se apresentaram como potentes indutores de morte celular programada, por meio de desestabilização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo C da mitocôndria e ativação da cascata de caspases, culminando em apoptose celular (COSULICH *et al.*, 1997b; FINNEGAN *et al.*, 2001; POLSTER *et al.*, 2001; LA VIEIRA *et al.*, 2002; SHANGARY; JOHNSON, 2002; HARADA; GRANT, 2003; LI *et al.*, 2007). Este efeito foi mais estudado em células cancerosas e pode ser verificado, inclusive em células, expressando altos níveis das proteínas apresentando efeito protetor: Bcl-2 e Bcl-x_L, mas se mostra bem mais evidente nas células em que a expressão das proteínas protetoras não está aumentada (FINNEGAN *et al.*, 2001; LA VIEIRA *et al.*, 2002; SHANGARY; JOHNSON, 2002), como no caso das células endoteliais ativadas.

Entre as proteínas pró-apoptóticas mais estudadas, estão Bax e Bak. Enquanto Bak reside constitutivamente na membrana externa da mitocôndria e no retículo endoplasmático de células saudáveis, Bax reside predominantemente no citosol. Quando recebem um estímulo apoptótico oligomerizam iniciando uma mudança conformacional formando homodímeros e heterodímeros na superfície da mitocôndria mediando a liberação do citocromo-c do espaço da inter-membrana para o citosol, desta maneira ativando a caspase-3 e iniciando a cascata apoptótica (ZONG *et al.*, 2003).

Células que não possuem Bax e Bak, mesmo com superexpressão de ativadores de apoptose, não entram em apoptose (SCORRANO; KORSMEYER,

2003), o que demonstra que essas proteínas são importantes para desencadear os eventos que resultam em morte celular.

Sequências que consistem somente do domínio BH3 de Bax e Bak tem mostrado ser eficientes para induzir apoptose (CHITTENDEN; FLEMINGTON et al., 1995; HAN et al., 1996; ZHOU et al., 2000). Estudos utilizando peptídeos de fusão possuindo o domínio BH3 fundido a sequências que promovam sua internalização levaram à perda da viabilidade celular. No entanto, sua ação não é específica sobre células tumorais, induzindo também apoptose quando internalizada por células saudáveis (HOLINGER et al., 1999).

Tendo conhecimento destas propriedades, no presente estudo combinamos a ação específica da endostatina: internalização, efeito inibitório e antiproliferativo sobre células endoteliais, com a atividade apoptótica do domínio BH3. Assim, sequências que correspondem aos domínios BH3 das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, por se tratarem de potentes indutores de apoptose, induziriam a morte celular se adequadamente internalizados nas células endoteliais ativadas por meio de fusão com a endostatina. As proteínas de fusão teriam as vantagens da endostatina, ou seja, com ação antiangiogênica específica para as células endoteliais ativadas, mas com propriedades apoptóticas potencializadas de modo que não sejam necessários níveis permanentemente altos de endostatina na circulação para obtenção de regressão de tumores.

2. OBJETIVOS

- 1) Realizar estudos de modelagem molecular de proteínas de fusão contendo o domínio endostatina e o domínio pró-apoptótico das proteínas Bax e Bak da família Bcl-2.
- 2) Construir plasmídeos para expressão em *Escherichia coli* de endostatina e 3 proteínas de fusão contendo o domínio endostatina e um domínio pró-apoptótico.
- 3) Realizar a expressão em *Escherichia coli*, renaturação e purificação destas proteínas.
- 4) Realizar estudo da atividade apoptótica das proteínas de fusão em células de origem endotelial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Equipamentos e acessórios principais

- Aparelho Mili-Q-plus, purificador de água, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.
- Autoclave, Kavoklave II, Blackburn, Inglaterra.
- Banho-maria, modelo 100, Fanem, São Paulo, Brasil.
- Balança analítica, modelo AW 220, Shimadzu, Japão.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo 5818, Eppendorf, Alemanha.
- Citometro de fluxo FACScalibur, Bencton-Dickinson, San Jose, CA, E.U.A.
- Eletroporador, modelo II, Invitrogen, San Diego, CA, E.U.A.
- Estufa de cultura de células, modelo 3158, Farma Scientific, Ohio, E.U.A.
- Espectrofotômetro, Ultrospec III, Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.
- Espectropolarímetro Jasco-J810, Jasco Corporation, Japão.
- Fluxo laminar modelo 2256, TROX, Curitiba, Brasil.
- Freezer -80 °C, modelo NV-65126, Nuaire, Japão.
- Fluorímetro F-4500 (Hitachi), Tóquio, Japão.
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421, Tecnal, Brasil.
- Leitor de ELISA, modelo MR 4000, Dynatech Biotech, E.U.A.
- Microscópio invertido Nikon, modelo TMS, Japão.
- Microscopio de fluorescência Card Zeiss, Göttingen, Alemanha.
- Microscópio eletrônico de varredura Phillips, modelo XL30, Holanda.
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Thermolyne, Dubuque, IA, E.U.A.
- Sistema de eletroforese vertical, modelo SE250, Hoefer, Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, E.U.A.

- Sistema de eletroforese horizontal, modelo EPS 500/400, Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.
- Sistema de alta pressão, HiP, Pennsylvania, E.U.A.
- Sistema FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography") Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.
- Transiluminador modelo Macrouve, Hoefer, San Francisco, E.U.A.
- Termociclador Perkin Elmer.

Reagentes principais utilizados em procedimentos de Biologia Molecular

- Agarose, Gibco-BRL, Grand Island, NY, E.U.A.
- Ampicilina sódica, Bayer, São Paulo, Brasil.
- Kanamicina, Sigma Chemical, Steinheim, Alemanha.
- Ágar-ágar purificado para bacteriologia, Merck, São Paulo, Brasil.
- Bacto-triptona, Difco, São Paulo, Brasil.
- Clorofórmio p.a. Merck, São Paulo, Brasil.
- Enzimas de restrição, e tampões respectivos da Promega, Madison, E.U.A.
- Extrato de levedura para microbiologia, Difco, São Paulo, Brasil.
- Fragmento Klenow da DNA polimerase I, Amersham Pharmacia, Biotech.
- Marcador de tamanho de pares de bases: DNA Lambda digerido com *Eco* RI, *Hind* III, Sigma Chemical, Steinheim, Alemanha.

Vetores plasmídicos

- pETHK, N° 63404, ATCC, Manassas, VA, E.U.A.
- pET20b, N° Cat. 69739-3, Novagen, Madison, EUA.
- pET28a, N° Cat. 69739-3, (66864-3), Novagen, Madison, EUA.

Linhagens celulares

- Células C-PAE (linhagem celular vascular de artéria de bezerro) foram adquiridas da ATCC (American Type Tissue Collection), Manassas, VA, E.U.A. (CCL-209).
- Células NIH 3T3, CRL-1658, foram adquiridas da ATCC (American Type Tissue Collection), Manassas, VA, E.U.A.

Reagentes utilizados na cultura celular

- Antibióticos e antimicóticos, Gibco-BRL, Life technologies, Grand Island, NY, E.U.A.
- Bicarbonato de sódio, Gibco-BRL, Gathersburg, MD, E.U.A.
- Dimetilssulfóxido (DMSO), MERCK, São Paulo.
- HEPES, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.
- Meio mínimo essencial *Eagle's* (E-MEM), Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil.
- Soro fetal bovino (SFB) Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.
- Tripsina, SIGMA, St. Louis, MO, E.U.A.

3.1.6. Outros

- Anticorpo policlonal anti-endostatina murina, Chemicon, Temecula, CA, E.U.A.
- Anticorpo anti-caspase 3, 610323, BD transduction Laboratories
- Cepa DH5 α : supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.
- Cepa HB2151: nalr thi-1 ara Δ (lac-proAB) [F' proAB lacIqZ Δ M15
- Cepa BL21pLys: F $^-$, ompT, hsdS_B(r_B $^-$, m_B $^-$), dcm, gal, λ (DE3), pLysS (Cm^r)
- Colunas HiTrap Heparin HP (GE Healthcare).

- Fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), RD Systems, Minneapolis, MN, E.U.A.
- Kit para purificação de DNA, Qiagen, Hilden, Alemanha.
- Kit para biotinizacão de proteínas, NZ-link, Pierce.
- Material plástico estéril para cultura celular, Corning Costar Corp., Cambridge, MA, E.U.A.
- Marcador de massa molecular de proteínas, RPN 755, Amersham Life Science.
- Membrana de PVDF, Bio-RAD, Hercules, CA, E.U.A..
- Estreptavidina conjugada com Alexa 488, S11223, Invitrogen, Eugene, oregon, E.U.A.
- MTS:3-(dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium. Promega.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Estudo de modelagem molecular das proteínas de fusão

A modelagem molecular por homologia é o principal método computacional utilizado para prever estruturas terciárias de proteínas. A busca e seleção dos moldes da endostatina (1KOE) e das sequências dos domínios BH3 dos peptídeos pró-apoptóticos Bax e Bak foram realizadas utilizando o banco de dados de estruturas terciárias de proteínas *Protein Data Bank* (PDB - (BERMAN et al., 2000). O alinhamento da sequência da endostatina com a sequência das proteínas a serem modeladas foi realizada utilizando algoritmos de alinhamento do programa BLASTP (BOURNE e WEISSIG, 2003). A modelagem foi realizada utilizando o programa MODELLER (SANCHEZ; SALI, 1997). Este programa realiza a modelagem por homologia de estruturas de proteínas por satisfação de restrições espaciais. O programa constrói a estrutura tridimensional das proteínas baseado nas coordenadas tridimensionais do molde. No presente estudo utilizou-se a versão 9v4 do programa.

Métodos de análise dos modelos

Os modelos podem ser avaliados como um todo, bem como por regiões individuais. Como a qualidade do modelo depende em grande parte do molde utilizado, é preciso que este tenha sido obtido em alta resolução ($\leq 2 \text{ \AA}$) e com um fator-R satisfatório ($\leq 20\%$). A qualidade do modelo construído será proporcional à qualidade da estrutura tridimensional utilizada como molde

(SANCHEZ; SALI, 1997). Os programas utilizados para a análise foram Procheck e Verify 3D.

O programa Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993) analisa a geometria global da estrutura ou cada resíduo individualmente, utilizando parâmetros estereoquímicos derivados de estruturas de alta resolução ou bem refinadas (MORRIS *et al.*, 1992), que constituem sua base de dados. Trata-se de um programa pertencente ao pacote CCP4 (Collaborative Computational Project No 4) utilizado para verificar a qualidade estereoquímica de proteínas.

Os parâmetros usados são aqueles descritos por Morris *et al.* (1992). Estes parâmetros utilizados como informações estereoquímicas checadas pelo programa são: ligações covalentes, planaridade de grupos planares (aromáticos, ligações peptídicas, etc.) ângulos diédricos, quiralidade, interações não covalentes, ligações de hidrogênio da cadeia principal e pontes de dissulfeto.

O Verify 3D (BOWIE *et al.*, 1991; LUTHY *et al.*, 1992) mede a compatibilidade entre a sequência de aminoácidos de uma proteína e o modelo da sua estrutura tridimensional, usando um perfil 3D.

Fazendo-se uso das ferramentas anteriormente citadas foram feitas as modelagens das seguintes proteínas de fusão:

1. Endo-Bax: Fusão N-terminal de uma cauda 6(His) ao domínio endostatina seguido de um espaçador 2 (Gly) em fusão C-terminal com o domínio BH3 da proteína apoptótica Bax.
2. Endo-Bak: 6His-endostatina Endo-Bax-Gly-Gly-domínio BH3 da proteína apoptótica.
3. EBE: Fusão N-terminal de uma cauda 6x(His) ao domínio endostatina cuja α -hélice 1 foi substituída pelo peptídeo de 17 aa formador de α -hélice do domínio BH3 da proteína apoptótica Bax.

Na figura 5 estão representados os alinhamentos das proteínas de fusão onde aparecem as seguintes sequências em destaque:

- Em vermelho: seis histidinas
- Em laranja: aminoácidos da 1^a α -hélice da endostatina
- Em marrom: Gly-Gly
- Em azul: aminoácidos da α -hélice do BH3 do Bax (16 aminoácidos importantes para a atividade apoptótica)
- Em lilás: domínio BH3 (16 aminoácidos importantes para a atividade apoptótica) da proteína Bak
- Em rosa: cisteína da 1^a α -hélice
- Sublinhados: argininas importantes para a ligação da endostatina ao heparan sulfato
- Em verde: os primeiros e últimos aminoácidos desordenados da endostatina que não formam estrutura cristalográfica

	1				50
Endo	<u>HHHHHMH</u> TH	QDFQPVLHLV	ALNTPLSGGM	RG <u>IRGADFOC</u>	<u>FQQARAVGLS</u>
Endo-Bax	<u>HHHHHMH</u> TH	QDFQPVLHLV	ALNTPLSGGM	RG <u>IRGADFOC</u>	<u>FQQARAVGLS</u>
Endo-Bak	<u>HHHHHMH</u> TH	QDFQPVLHLV	ALNTPLSGGM	RG <u>IRGADFOC</u>	<u>FQQARAVGLS</u>
EBE	<u>HHHHHMH</u> TH	QDFQPVLHLV	ALNTPLSGGM	RG <u>IRKKLSEC</u>	<u>LKRIGDEILDS</u>
	51				100
Endo	<u>GTFRAFLSSR</u>	LQDLYSIVRR	ADRGSVPIVN	LKDEVLSPSW	DSLFSGSQGG
Endo-Bax	<u>GTFRAFLSSR</u>	LQDLYSIVRR	ADRGSVPIVN	LKDEVLSPSW	DSLFSGSQGG
Endo-Bak	<u>GTFRAFLSSR</u>	LQDLYSIVRR	ADRGSVPIVN	LKDEVLSPSW	DSLFSGSQGG
EBE	<u>GTFRAFLSSR</u>	LQDLYSIVRR	ADRGSVPIVN	LKDEVLSPSW	DSLFSGSQGG
	101				150
Endo	<u>LQPGARIFSF</u>	DGRDVLRHPA	WPQKSVWHGS	DPSGRRLMES	YCETWRTETT
Endo-Bax	<u>LQPGARIFSF</u>	DGRDVLRHPA	WPQKSVWHGS	DPSGRRLMES	YCETWRTETT
Endo-Bak	<u>LQPGARIFSF</u>	DGRDVLRHPA	WPQKSVWHGS	DPSGRRLMES	YCETWRTETT
EBE	<u>LQPGARIFSF</u>	DGRDVLRHPA	WPQKSVWHGS	DPSGRRLMES	YCETWRTETT
	151				200
Endo	GATGQASSLL	SGRLLEQKAA	SCHNSYIVLC	IENSFMTSFS	K.....
Endo-Bax	GATGQASSLL	SGRLLEQKAA	SCHNSYIVLC	IENSFMTSFS	<u>KGGKKLSECL</u>
Endo-Bak	GATGQASSLL	SGRLLEQKAA	SCHNSYIVLC	IENSFMTSFS	<u>KGGQVGRQL</u>
EBE	GATGQASSLL	SGRLLEQKAA	SCHNSYIVLC	IENSFMTSFS	K.....
	201				
Endo				
Endo-Bax	<u>KRIGDEILDS</u>				
Endo-Bak	<u>AIIGDDINR</u>				
EBE				

Figura 5: Alinhamento múltiplo entre a sequência primária da endostatina com as sequências das proteínas de fusão (endo-Bax, endo-Bak e EBE).

3.2.2. Construção dos vetores de expressão

3.2.2.1. Amplificação e clonagem do gene da endostatina

O gene da endostatina murina presente no vetor pETKH1 (ATCC nº63404), já possuindo os 6 codons para expressão da cauda de polihistidinas, foi amplificado, utilizando-se a técnica de PCR, incluindo-se nas extremidades os sítios para as enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI*, a 5' e a 3' do gene, respectivamente. O iniciador "sense" foi desenhado de modo a que o gene da endostatina quando clonado no vetor pET20b (Novagen, Madison, EUA) entrasse em fase de leitura após a sequência codificante para o peptídeo sinal pelB. Os "primers" utilizados para esta reação foram:

Sense:

5' GTT CCA TGG CTC ACC ATC ACC ACC AC 3'

Antisense:

5' GTT GAA TTC TAT TTG GAG AAA GAG GT 3'

A amplificação por PCR foi realizada em Termociclador (Perkin Elmer ou MJ Research) empregando-se um volume final de 25 μ L constituído de 100 pmol de cada "primer", 750 ng de DNA molde, 10 mM de dNTPs, 1 unidade (U) da polimerase (Taq-polimerase) e 50 mM de $MgCl_2$.

As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial de 92°C, hibridação com os "primers" a 58,2 °C e extensão dos "primers" a 72 °C. Foram realizados 30 ciclos e a reação foi interrompida por resfriamento a 4 °C.

A análise dos DNAs amplificados por PCR foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Em seguida este DNA amplificado foi aplicado a um gel de agarose a 1% contendo 1 % de brometo de etídio. Após a corrida eletroforética a banda de aproximadamente 550 pares de bases foi visualizada em transiluminador de luz ultravioleta, cortada e retirada do gel. Este DNA foi purificado utilizando-se o kit para purificação de fragmentos de DNA (QIAGEN) e em seguida digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI*. O gene da endostatina foi clonado no vetor pET20b+ (Novagen), digerido com as mesmas enzimas de restrição. A reação de ligação entre o gene da endostatina e o vetor plasmidial pET20b+ foi realizada empregando-se T4DNA-ligase (6 U) e o respectivo tampão de ligação, utilizando-se 100 ng de DNA, 30 ng do vetor linearizado, ATP 10 mM em 10 μ L de reação total. A reação foi incubada durante 16 horas a 4 °C.

O produto de ligação foi utilizado para transformação de células competentes HB2151. DNAs plasmídicos de colônias isoladas foram purificados e a presença do gene da endostatina foi confirmada por análise de restrição. Este vetor foi denominado pET20-endo e foi utilizado para realizar a mutagênese sítio-específica.

3.2.2.2. Mutagênese sítio-específica para obtenção das proteínas de fusão

Foram realizados procedimentos de mutagênese sítio específica para introdução de codons correspondentes aos peptídeos apoptóticos Bak ou Bax após o gene da endostatina no vetor. A construção do terceiro vetor foi realizada pela troca dos nucleotídeos correspondentes à primeira α -hélice do gene da endostatina pela α -hélice do peptídeo Bax .

Obtenção de DNA fagemídico de fita simples do vetor pET20-endo na cepa RZ1032(dut⁻ e ung⁻)

Para o procedimento de mutagênese sítio-específica utilizou-se o DNA de fita simples do vetor pET20-endo. Este DNA foi produzido fazendo-se a transformação de uma cepa de *E. coli* contendo o epissomo F' e o genótipo dut⁻ e ung⁻ (RZ1032). A preparação do DNA fagemídico de fita simples foi realizada transferindo-se uma colônia de *E. coli* RZ1032 recém transformada com o plasmídeo pET20-endo para um tubo estéril contendo 1,5 mL de meio YT com 100 µg/µL ampicilina e deixou-se crescer sob agitação a 37°C até que a densidade óptica a 600 nm atingisse 0,2. Adicionaram-se então 10 µL de um estoque de fago auxiliar R408 contendo aproximadamente 10¹⁰ unidades formadoras de placa/mL. As culturas foram deixadas sob agitação a 37°C por 5 a 6 horas, decantando-se em seguida o material em microcentrífuga a 12000rpm por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo estéril e adicionaram-se 200 µL de uma solução de polietilenoglicol (PEG) 8000 a 20% e NaCl 2,5M agitando-se e deixando-se 15 minutos a temperatura ambiente. O DNA fágico foi centrifugado por 5 minutos em microcentrífuga (12000rpm). O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de TE, sendo extraído com 50µL de fenol tamponado. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionaram-se 9 µL de acetato de sódio 3M (pH5,5) e 300µL de etanol. O tubo foi incubado por 15 minutos a -20°C para a precipitação do DNA e em seguida foi centrifugado em microcentrífuga a 12000 g por 15 minutos, retirando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol a 70% e seco. O DNA de fita simples foi então ressuspenso em 25 µL de TE, quantificado após eletroforese em gel de agarose a 0,6% e estocado a -20°C.

Os oligonucleotídeos, desenhados como sequência complementar, invertida da fita simples do DNA molde (pET20-endo), utilizados para os procedimentos de mutagênese sítio-dirigida foram os seguintes:

ENDO-BAX (92 bases)

5'**TCGACGGAGCTCGAATTCTA**AGAGTCCAGTTCGTCACCGATACGTT
TCAGGCATTCAGACAGTTTTTT**ACCACCTTTGGAGAAAGAGGTCAT** 3'

Sequências complementares ao cDNA de fita simples:

- Cinza: sequência do gene da endostatina
- Violeta: sequência do vetor pET20
-

Sequências introduzidas:

- Verde: dois resíduos de glicina
- Azul: domínio BH3 do BAX
- Preto: codon stop

ENDO-BAK (92 bases)

5'**TCGACGGAGCTCGAATTCTA**ACGGTTGATGTCGTCACCGATGATA
GCCAGCTGACGACCAACCTGACC**ACCACCTTTGGAGAAAGAGGTC**
AT 3'

Sequências complementares ao cDNA de fita simples:

- Cinza: sequência do gene da endostatina
- Violeta: sequência do vetor pET20
-

Sequências introduzidas:

- Verde: dois resíduos de glicina
- Azul escuro: domínio BH3 do BAX
- Preto: codon stop

EBE (87 bases)

5'**AGGAAAGCCCGGAAGGTGCC**AGAGTCCAGTTCGTCACCGATAC
GTTTCAGGCATTCAGACAGTTTTTT**ACGGATACCACGCATGCCT** 3'

Sequência complementar:

- Cinza: gene da endostatina

Sequência introduzida:

- Azul: domínio BH3 do BAX

Para a reação de mutagênese sítio-específica seguiu-se o protocolo descrito por Kunkel (KUNKEL, 1985). O anelamento dos oligonucleotídeos ao DNA molde foi feito com 5 μ L (1pmol) de DNA de fita simples contendo resíduos uracila, 1 μ L do oligonucleotídeo fosforilado (5pmoles), 1 μ L de tampão de anelamento e 3 μ L de água destilada. Incubou-se a reação a 55°C por 5 minutos e deixou-se esfriar a temperatura ambiente por 10 minutos. O molde de DNA foi copiado após a adição dos seguintes reagentes: 4 μ L de uma solução contendo 2,5mM de cada um dos 4 nucleotídeos em TE, 1 μ L de tampão de ligase 10x concentrado, 1 μ L de ATP 10mM, 2 μ L de água destilada, 1 unidade de DNA polimerase (fragmento de Klenow) e 1 unidade de T4 DNA ligase. A mistura de reação foi incubada por duas horas a temperatura ambiente sendo que 5 μ L desta mistura foram utilizados para a transformação de bactérias *E. coli* da cepa HB 2151 (*dut*⁺ *ung*⁺) competentes.

Foram realizadas as purificações do DNA plasmídico de vários clones. A seleção de clones apresentando as mutações desejadas foi primeiramente realizada por análise de restrição utilizando-se as enzimas *Nco*I e *Pst*I para os clones de endostatina-BH3 de Bax (pET20 endo-Bax) e endostatina-BH3 de Bak (pET20 endo-Bak), os quais deveriam apresentar fragmento com 55 pares de bases a mais do que o DNA utilizado como molde. A pré-seleção de clones de plasmídeos, no qual a α -hélice de endostatina foi trocada pela α -hélice do Bax (pET20 EBE), (os quais não deveriam apresentar alteração de tamanho) foi realizada por análise de restrição utilizando-se a enzima de restrição *Mva*1269I (ou *Bsm*I) presente somente na sequência de cDNA que codifica para a α -hélice de Bax. Os plasmídeos que apresentaram digestão por esta enzima, foram selecionados. Os plasmídeos pré-selecionados foram enviados para sequenciamento, utilizando como iniciadores tanto a sequência de DNA do promotor de T7 como também o primer "T7 terminator". Os sequenciamentos foram realizados no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP).

3.2.2.3. Subclonagem dos cassetes de expressão: endostatina, endo-Bak, endo-Bax e EBE no vetor pET28

Os fragmentos de DNA correspondentes aos cDNAs das 4 proteínas presentes no vetor plasmídico de expressão pET20 foram digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI*. A reação foi realizada empregando-se 20 µg de cada vetor, 10 U das respectivas enzimas incubadas por 2 horas a 37 °C em tampão adequado e a seguir inativadas a 80 °C. Os fragmentos obtidos foram separados realizando uma corrida eletroforética em gel de agarose 1 % e purificados utilizando o Kit de purificação de fragmentos de DNA (QIAGEN).

As ligações dos fragmentos de DNA de interesse ao plasmídeo pET28 foram feitas em 10 µL de reação contendo uma mistura do inserto com o vetor linearizado, mantendo uma proporção de 150 ng de inserto para 30 ng de vetor, 10 mM de ATP, 3U de T₄ DNA ligase em tampão apropriado. As reações de ligação foram incubadas por 4 horas a 20 °C e a seguir transformadas nas células competentes *E coli* DH5α para propagação plasmidial.

Os vetores denominados pET28-endo, pET28-endo-Bak, pET28-endo-Bax e pET28-EBE foram selecionados por análise de restrição e transformados em bactérias *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3)pLys para expressão.

3.2.3. Expressão das proteínas de fusão e isolamento dos agregados protéicos (corpos de inclusão)

Bactérias *E. coli* BL-21 (DE3) pLys S competentes foram transformadas com os vetores e plaqueadas em ágar LB contendo kanamicina (30µg/mL). Colônias recém transformadas foram semeadas em 250 mL de meio rico 2HKSII (JENSEN; CARLSEN, 1990) (20 g de triptona /L, 10 g de extrato de leveduras /L, 4 g de casaminoácidos /L, 0,8 g de MgSO₄ /L, 0,08 g de CaCl₂/L, 3,1 g K₂SO₄ /L e 380 µL de solução traços de metais/L), contendo kanamicina e cultivadas a 37°C sob agitação até que a densidade óptica a 600 nm atingisse 3.0 quando então se adicionou IPTG (concentração final de 0,5mM). O cultivo foi mantido nas mesmas condições por mais 16 horas, medindo-se novamente as densidades ópticas (600nm) ao final deste período. Volumes de amostras correspondentes a 0,1 de densidade óptica ($A_{600 \text{ nm}}$) foram congelados e posteriormente aplicadas em gel de SDS-PAGE, o qual foi seguido de coloração do gel ou transferência das proteínas para membranas para imunoblotting. Os meios de cultura foram centrifugados a 2500 x g por 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados contendo as proteínas de interesse foram processados. A fração insolúvel, contendo os corpos de inclusão, foi ressuspensa em 50 mL de tampão contendo 100 mM Tris-HCl pH 7.5 e 5 mM EDTA, seguida pela adição de lisozima em concentração final de 50 µg/mL e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. A suspensão foi sonicada na presença de 0.1% de deoxicolato de sódio, seguida por centrifugação a 8000x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e a fração insolúvel foi ressuspensa em 0,05M Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA contendo 0,1 % de deoxicolato de sódio. O procedimento de centrifugação e ressuspensão foi repetido duas vezes e o precipitado resultante foi dissolvido em 15 mL de 0,05mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 3 M de uréia e centrifugada 8000 x g for 10 min at 4°C. As lavagens com uréia foram repetidas 5 vezes, o precipitado resultante da última

centrifugação foi lavado duas vezes com 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, e ressuspensas no mesmo tampão.

3.2.4. Renaturação de agregados de endostatina e mutantes

Inicialmente foi seguido o protocolo descrito na literatura para renaturação de endostatina (HUANG et al., 2001). Este método se mostrou pouco reprodutível resultando geralmente em proteínas agregadas. Na tentativa de obter proteínas estáveis que apresentassem uma conformação correta desenvolvemos uma nova metodologia que se baseia na utilização de altas pressões hidrostáticas para solubilizar e renaturar proteínas agregadas.

3.2.4.1. Renaturação utilizando altas pressões hidrostáticas

Os corpúsculos de inclusão das proteínas recombinantes foram ressuspensos em tampão de renaturação (50mM Tris HCl pH 7.5, 1mM EDTA) contendo diferentes concentrações do agente denaturante GdnHCl (0-6M) com a presença ou ausência do par oxidante/redutor, (GSH/GSSG). Foram testadas variações da razão molar deste par redox com uma concentração final de 10mM. As suspensões foram colocadas em sacos plásticos, os quais foram selados, introduzidos em outro plástico maior o qual foi selado a vácuo e então colocado em um vaso de pressão contendo uma mistura de óleo e água como fluido de transmissão. Foi aplicada uma pressão de 30000 psi por 16 horas. Após despressurização lenta (aproximadamente 20 minutos) as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos para separar os agregados insolúveis da fração solúvel. A fração solúvel foi então dialisada contra tampão Tris HCl 50mM pH 7.5 a fim de retirar o reagente GdnHCl, novamente centrifugada nas mesmas condições e logo estocada a -20°C.

3.2.4.2 Utilização de pressões decrescentes na renaturação da endostatina e seus mutantes

Com o intuito de otimizar o processo de renaturação foram aplicados diferentes esquemas de despressurização. Foi seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente mas desta vez a despressurização foi realizada em forma decrescente diminuindo 5000 psi de pressão a cada 30 minutos até atingir pressão atmosférica. Este esquema de despressurização foi aplicado a todas as proteínas. Após despressurização as amostras foram centrifugadas, dialisadas e a seguir foram analisadas e purificadas.

3.4.2.3. Análise morfológica dos agregados protéicos tratados com altas pressões utilizando Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Mudanças na morfologia dos corpos de inclusão de endostatina e das proteínas de fusão antes e após serem submetidos ao processo de renaturação utilizando altas pressões foi avaliada por MEV. Amostras insolúveis (corpos de inclusão, proteínas que permaneceram insolúveis após pressurização e proteínas que precipitaram durante a diálise) foram lavados com água milli-Q. Foram aplicados 50 µL em porta-amostras e secados em dessecador por 16 horas. Após secagem as amostras receberam um banho de ouro e foram então visualizadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Phillips 515 operando a 15 kV.

3.2.5. Purificação da endostatina e dos mutantes

Após diálise as proteínas endostatina as proteínas de fusão renaturadas foram aplicadas em coluna HiTrap Heparin HP (GE Healthcare)

contendo 1 mL de resina pré lavada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 e pré equilibrada com 5 volumes de coluna em tampão Tris HCl 50 mM pH 7.5. A coluna foi lavada com 10 mL de tampão de equilíbrio e as proteínas foram eluídas usando um gradiente de NaCl (0-1M). As purificações foram realizadas aplicando um fluxo de 1mL por minuto. As frações foram coletadas em coletor automático do sistema FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography") com determinação contínua da absorvância em comprimento de onda de 280 nm. As frações que continham os picos principais foram coletadas e diálisadas contra tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 para realizar a retirada do NaCl das amostras purificadas.

3.2.6. Caracterização das proteínas renaturadas

3.2.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise da expressão, purificação e renaturação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15 % seguindo protocolo descrito por Laemli (1970). As amostras foram aplicadas sob condições redutoras ou não redutoras na presença de tampão de amostra e aquecidas por 5 minutos a 95 °C. A corrida eletroforética foi realizada a 80 volts por 3 horas. Junto com as amostras também foi aplicado um marcador de massa molecular (GE Healthcare) para uso como padrão de massa das proteínas analisadas. Para coloração, o gel foi imerso em uma solução contendo 0,25% de "Comassie blue G" e 10% de ácido acético por 2 horas. A seguir o gel foi descorado em uma solução com 8% de ácido glacial acético, sendo realizadas trocas sucessivas até a visualização das bandas correspondentes às proteínas de interesse.

3.2.6.2. Western Blot

Para Western Blot as amostras foram submetidas a SDS-PAGE (15%) e em seguida transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A transferência das proteínas foi realizada por eletroeluição do seguinte modo: colocaram-se 8 folhas de papel filtro pré-umedecido em tampão de transferência (0,3% glicina, 0,6% Tris-base, 0,04% SDS, 20% metanol) e em seguida, do polo positivo para o polo negativo, colocaram-se a membrana de nitrocelulose, o gel e mais 8 folhas de papel filtro pré-umedecidas. A corrente foi fixada de acordo com a área de gel ($0,85\text{mA por cm}^2$) para a transferência total das proteínas, realizada por 1 hora. A membrana foi lavada com tampão fosfato-salina (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado e liofilizado (Molico, São Paulo, Brasil) e então foi incubada por 10 horas com o anticorpo policlonal anti-endostatina (Chemicon, Temecula, CA, U.S.A.) diluído 150 vezes em PBS contendo 5% de leite em pó desnatado. As reações foram detectadas pela incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por uma hora. Foi utilizado o sistema de detecção ECL seguindo-se as instruções do fabricante (GE Healthcare) e a seguir as membranas foram expostas a filmes de radiografia, os quais foram revelados.

3.2.6.3. Dosagem de proteínas

A determinação do conteúdo proteico foi realizada utilizando o método padronizado por Bradford (1976), cuja reação baseia-se na capacidade das proteínas interferir com a absorvância do corante "Coomassie Brilliant Blue" G250 (GE Healthcare) em meio altamente ácido, resultando em modificação proporcional de cor, detectável em 595 nm.

Foi elaborada uma curva padrão com 0,0312 mg/mL a 1mg/mL de albumina humana (SIGMA-ALDRICH) em tampão Tris 50 mM. Como branco se utilizou o tampão Tris 50 mM. As densidades ópticas foram obtidas em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 595 nm. Os dados obtidos com as soluções padrão de albumina possibilitaram a obtenção de uma reta com função linear: $Y=Ax+B$, sendo Y = absorvância à 595 nm, x = concentração protéica, A = coeficiente angular da reta e B = constante da reta.

3.2.6.4. Análises espectroscópicas das proteínas renaturadas

3.2.6.4.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados utilizando o espectropolarímetro Jasco-J810 equipado com um sistema de banho-maria líquido com controle de temperatura. Os espectros de dicroísmo circular no UV distante (260-190 nm) foram adquiridos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0.1 cm de caminho óptico. Os espectros de CD foram obtidos empregando-se médias de cinco varreduras. A estrutura secundária das proteínas obtidas pelo CD foi calculada utilizando o programa K2D (<http://www.embl-heidelberg.de/andrade/k2d>).

3.2.6.4.2 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

Os estudos de emissão intrínseca de fluorescência da endostatina e das proteínas de fusão foram realizados no espectrômetro de fluorescência F-4500 (Hitachi), utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As amostras foram excitadas a 288 nm e a emissão da fluorescência foi monitorada no intervalo de 300-400 nm.

3.2.7 Análise de atividade da endostatina e das proteínas de fusão

3.2.7.1 Análise da internalização de endostatina e das proteínas e mutantes por Western Blot

Células endoteliais C-PAE (5×10^4) foram semeadas em placas de 12 poços. As células foram mantidas a 37°C, em incubadora umidificada de CO₂, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas o meio de cultura foi trocado por meio com 2% de soro fetal bovino + 10ng/mL de bFGF e adicionou-se endostatina ou as proteínas de fusão (10µg/mL), incubando-se em diferentes tempos: 0, 30, 90 e 180 minutos. Cada poço foi lavado 3 vezes com PBS e a seguir as células foram lisadas pela adição de tampão de amostra para SDS-PAGE e incubação a 60°C por 5 minutos. As amostras foram coletadas, fervidas e tratadas como usualmente para aplicação em SDS-PAGE. Após a corrida eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose. O Western blotting foi realizado utilizando-se anticorpo anti-endostatina e 2º anticorpo anti-IgG de coelho ligado à peroxidase. As reações foram detectadas utilizando-se quimioluminescência (kit ECL da GE) e exposição das membranas a filmes de raios-X que foram posteriormente revelados.

3.2.7.2 Análise da internalização de endostatina e mutantes por imunofluorescência

Endostatina e seus mutantes foram biotinizados com sulfo-NHS-LC-Biotin da EZ-Link utilizando um kit de biotinizacão conforme instruções do fabricante (Pierce) e então dialisados contra tampão fosfato para retirada do excesso de biotina.

Células CPA-E (5×10^4) foram semeadas em lamínulas de 2,5x2,5 cm, colocadas em placas de 6 poços e mantidas em meio mínimo essencial "Eagle's" (EMEM) suplementado com 2% soro fetal bovino, 50 U/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2 mM L-glutamina e incubadas em ambiente úmido a 37°C, na presença de 5% CO₂. Após 24 horas de incubação o meio foi trocado e as células foram incubadas por 12 horas com meio EMEM fresco contendo 2% soro fetal bovino e bFGF (5 ng/mL) e então foram adicionados endostatina ou os mutantes biotinilados (10 µg/mL). Como controle negativo foi realizado o mesmo ensaio com a linhagem celular murina não endotelial NIH 3T3.

Após incubação o meio de cultura foi retirado e as lamínulas com as células aderidas foram lavadas por três vezes com tampão fosfato (PBS) e logo permeabilizadas e fixadas pela adição de 800 µL de metanol gelado e incubação por 6 minutos. As lamínulas foram retiradas da placa de cultura e lavadas duas vezes com PBS e logo incubadas por 40 minutos com PBS contendo 1% de BSA. A seguir as lamínulas foram incubadas com Alexa 488 conjugado com estreptavidina (Invitrogen) por 45 minutos. As células foram lavadas cinco vezes com PBS e então foi adicionado Vectashield, composto que contém DAPI, reagente que permite a visualização do núcleo celular. As lamínulas foram fixadas em um porta-amostra, incubadas por duas horas a 4 °C e analisadas e fotografadas em microscópio de imunofluorescência.

3.2.7.3. Ensaio de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular é um método colorimétrico no qual se utiliza um composto tetrazólico (3-(dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, sal inerte, MTS) e um reagente acoplador de elétrons (metassulfato de fenazida, PMS) (CORY *et al.*, 1991). O MTS é bio-reduzido pelas células ao produto formazan que é solúvel no meio de cultura. A conversão do MTS em formazan solúvel é executada pela enzima desidrogenase, encontrada em células metabolicamente ativas e pode ser medida diretamente de placas de 96 poços sem adição de outros reagentes. A absorvância a 490 nm, que corresponde à quantidade de formazan formado, é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura.

A linhagem celular C-PAE (célula endotelial de artéria do pulmão de bezerro), foi adquirida da ATCC (CCL-209) (Manassas, VA) e foi utilizada para testar a habilidade da endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE em inibir a proliferação de células endoteliais. As células foram mantidas em meio mínimo essencial "Eagle's" (EMEM) suplementado com 20% soro fetal bovino, 50 U/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2 mM L-glutamina e incubadas em ambiente úmido a 37°C, na presença de 5% CO₂. As incubações foram realizadas em placas de 96-poços com um volume final de 100 µL/poço de EMEM contendo 2% soro fetal bovino, com concentrações iniciais de células de 5 x 10³ células/poço. Após 24 horas de incubação o meio foi trocado por 90 µL de EMEM fresco contendo 2% soro fetal bovino e 5 ng/mL de bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos) e então foram adicionados 10 µL das proteínas purificadas, em diferentes diluições. Como controle foi utilizado o mesmo volume de Tris 50 mM. Cada amostra foi analisada em triplicata. As placas foram colocadas em incubadora úmida com 5% de CO₂ por 72 horas a 37°C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 µL de uma solução de 20 MTS: 1 PMS à cada poço e a

placa foi incubada por mais 2 horas. As leituras de absorvância, com filtro de 495 nm, foram feitas em uma leitora de ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços).

3.2.8. Análise de apoptose

3.2.8.1 Citometria de fluxo

A apoptose foi avaliada após tratamento das células endoteliais com endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE. Foram utilizadas células bovinas C-PAE semeadas em placas de 6 poços ($1,5 \times 10^5$ células/poço) em meio EMEM com 20% de soro fetal bovino. Após 24 horas o meio foi trocado por 1 mL de meio com 2% de soro fetal bovino, 20 ng/mL de bFGF e 20µg/mL de endostatina, endo-Bak, endo-Bax ou EBE. Após 16 horas as células não aderentes foram coletadas das placas contendo células tratadas e os seus controles correspondentes, em seguida os poços foram tripsinizados e as células aderentes foram adicionadas às já coletadas. As suspensões contendo todas as células de cada poço foram centrifugadas (240 x g por 5 minutos) e as células foram incubadas por 1 hora (4°C) com 300 uL de solução de iodeto de propídio em tampão HFS (50µg/mL de iodeto de propídio - PI, 0.1% Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio) para marcação. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur, Bencton-Dickinson).

3.2.8.2. Ensaio de ativação de caspase-3

A caspase 3 é uma protease intracelular ativada durante a apoptose. A atividade apoptótica da endostatina e seus mutantes foi

avaliada pela ativação desta caspase. Foram semeadas 4×10^5 células C-PAE em meio EMEM com 20% de soro fetal bovino. Após 24 horas o meio foi trocado por meio com 2% de soro fetal bovino, 20 ng/mL de bFGF e 20 μ g/mL de endostatina, endo-Bak, endo-Bax ou EBE. Após 24 horas as placas contendo células tratadas e os seus controles correspondentes foram tripsinizadas, as células aderentes ou não foram coletadas e centrifugadas (240 x g por 5 minutos), ressuspendidas em 100 μ L de tampão de amostra, fervidas e aplicadas em gel de SDS-PAGE, em seguida transferidas seguindo o mesmo processo do item 3.2.7.1 utilizando o anticorpo primário anti caspase-3.

4. RESULTADOS

4.1 Modelagem molecular das proteínas de fusão endostatina-BH3 das proteínas apoptóticas:

Foram gerados 1000 modelos de cada proteína e a escolha do melhor modelo foi baseada na qualidade estereoquímica utilizando o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al. 1993), e a função objetiva do MODELLER (SALI; BLUNDELL, 1993). As imagens da estrutura tridimensional dos modelos foram geradas a partir do programa PyMOL (DELANO, 2002 -<http://www.pymol.org>). Todos os modelos criados apresentam boa qualidade estereoquímica sendo considerados modelos confiáveis.

a) Modelagem da Endostatina-GG-BH3 do Bax e Endostatina-GG-BH3 do Bak

Para a modelagem da endostatina-GG-BH3, contendo os peptídeos com 16 resíduos de aminoácidos, que são os domínios mínimos com atividade apoptótica das proteínas Bax e Bak (que apresentam estruturas similares entre si), foram utilizadas como modelo as estruturas em solução das proteínas pro-apoptóticas Bax e Bak humanas (SUZUKI *et al.*, 2000). Na modelagem do peptídeo responsável pela atividade pró-apoptótica de Bax com 16 aminoácidos (SATTLER et al., 1997) foi utilizado um fragmento correspondente à α -hélice 2 e parte da α -hélice 3 do BH3 do Bax .

Foi utilizado como modelo da endostatina o domínio endostatina murina do fragmento C-Terminal de 184 resíduos da cadeia α 1 do Colágeno XVIII (1KOE) (HOHENESTER et al., 1998) (Figura 6). O domínio da endostatina murina compreende o resíduo Gln138 até Phe309 do colágeno XVIII ou Gln 7 até Phe179 da endostatina. Os primeiros 10 e os últimos 6 resíduos não são visíveis no modelo cristalográfico provavelmente por estarem desordenados.

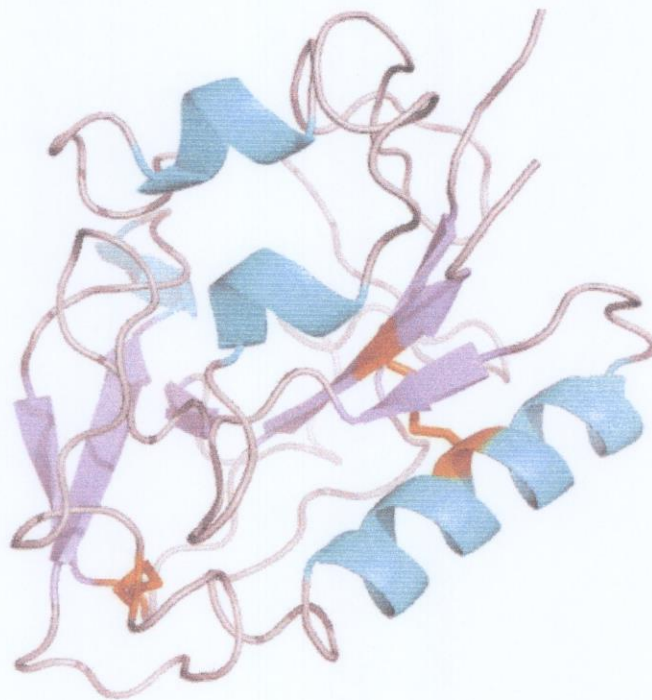


Figura 6: Modelo teórico (1KOE) da estrutura tridimensional da proteína endostatina mostrando as α -hélices representadas em azul turquesa, as folhas- β representadas em lilás e as pontes dissulfídicas representadas em laranja. Este modelo foi gerado a partir do programa PyMOL (DELANO, 2002).

Os modelos tridimensionais hipotéticos gerados por dinâmica molecular mostram os peptídeos Bax ou Bak como sequências sem conformação presentes no fragmento C-terminal da endostatina (Figura 7). A endostatina possui 4 resíduos de cisteína (entre as cisteínas C33-C173 e C135-C165). O peptídeo com 16 aminoácidos de Bax, por sua vez, possui uma cisteína na sexta posição. Na

construção da proteína endostatina-GG-BH3 do Bax (endo-Bax), a cisteína do fragmento de Bax poderia ter sido trocada por outro aminoácido similar que não formasse ponte dissulfídica (ex: serina). Foi considerado, no entanto, que devido ao fato da cisteína estar presente na porção C-terminal da proteína provavelmente quando este aminoácido estivesse sendo adicionado à molécula durante a síntese da proteína, as duas pontes dissulfídicas anteriores já estariam formadas e por isso a cisteína permaneceu na posição original.

O modelo gerado para a proteína de fusão Endo-Bak (Figura 7B) mostrou uma molécula com muitas mudanças na sua estrutura secundária com uma diminuição de α -hélice, ausência de folhas- β , sem formação de pontes dissulfídicas e aumento de regiões sem estrutura (*random coil*), evidenciando que a presença do peptídeo Bak afetou significativamente a conformação desta proteína de fusão no modelo gerado.

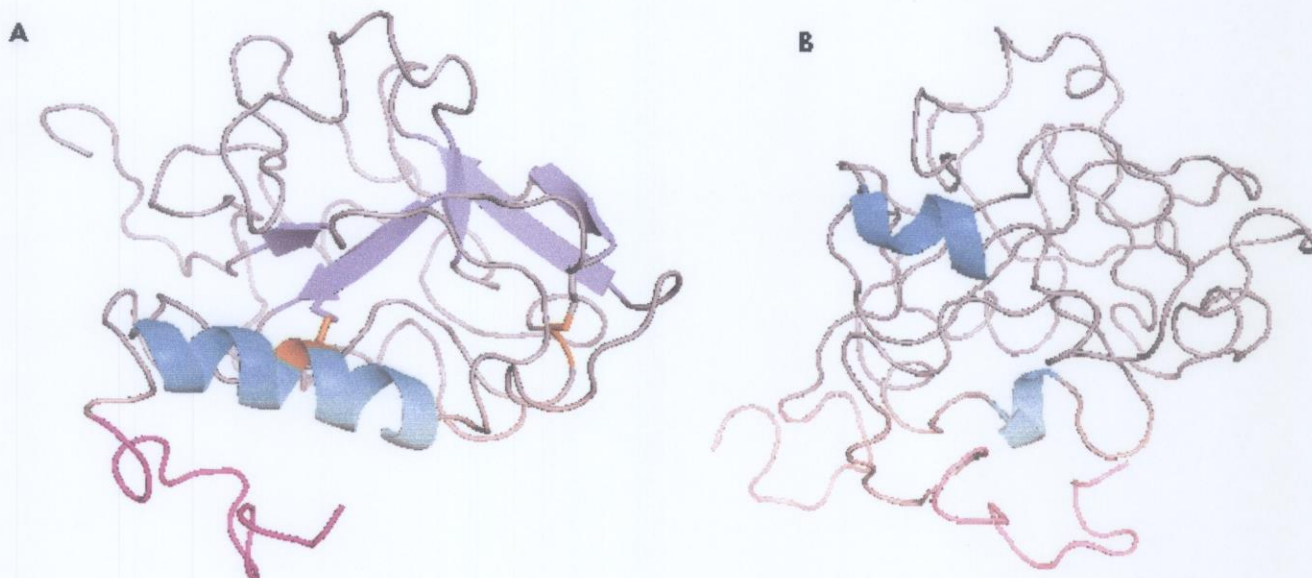


Figura 7: Modelos hipotéticos das estruturas mais estáveis das proteínas de fusão gerados após dinâmica molecular **A**, endostatina-GG-BH3 do Bax e **B**, endostatina-GG-BH3 do Bak. Em roxo está representado o peptídeo Bax e em rosa o peptídeo Bak. Em lilás estão representadas as folhas- β e em azul turquesa a α -hélice. Estes modelos foram gerados utilizando-se o programa PyMOL (DELANO, 2002).

b) Endostatina na qual a primeira α -hélice foi trocada pela α -hélice do BH3 do Bax

Nesta proteína mutante a α -hélice da endostatina (com 14 aa) foi substituída pelo fragmento de Bax com 16 resíduos (Figuras 8 e 9) (SATTLER et al., 1997), 1997). Neste modelo a cisteína na posição 6 do fragmento de α -hélice de Bax foi mantida na mesma posição (8ª posição da α -hélice da endostatina) em que fica a Cisteína 33 do domínio endostatina para formar uma ponte dissulfeto com a Cisteína 173. Consideramos que a ponte dissulfídica poderia dar estabilidade no caso da primeira α -hélice da endostatina ser trocada pela α -hélice do domínio BH3 do Bax. Foram retirados os 4 resíduos depois da α -hélice da endostatina para que a α -hélice da Bax pudesse se encaixar nessa posição.

BAX-END	14		QPVLH	LVALNTPLSG	GMRG	IRKKLS	ECLKRIGDEL
							: : :
1koe	138		QPVLH	LVALNTPLSG	GMRG	IRGADF	QCFQQARAVG
BAX Frag	1					KKLS	QCLKRIGDEL
							. * . .
BAX-END	49	DSGTFRAFLS	SRLQDLYSIV	RRADRGSVPI	VNLKDEVLSP	SWDSLFGSQ	
1koe	173	LSGTFRAFLS	SRLQDLYSIV	RRADRGSVPI	VNLKDEVLSP	SWDSLFGSQ	
BAX frag	16	DS					
		*					
BAX-END	99	GQLQPGARIF	SFDGRDVLRH	PAWPQKSVWH	GSDPSGRRIM	ESYCETWRTE	
1koe	223	GQLQPGARIF	SFDGRDVLRH	PAWPQKSVWH	GSDPSGRRIM	ESYCETWRTE	
BAX Frag							
FUSAO	149	TTGATGQASS	LLSGRLLEQK	AASCHNSYIV	LCIENSF		
1koe	273	TTGATGQASS	LLSGRLLEQK	AASCHNSYIV	LCIENSF		
BAX Frag							

Figura 8: Alinhamento das seqüências lineares da proteína EBE com a endostatina. Azul: fragmento de Bax (16 resíduos); vermelho: α -hélice de endostatina; verde: folhas- β .

Comparando-se os modelos das figuras 6 (endostatina) e 9 (endostatina na qual a α -hélice foi trocada pela α -hélice do BH3 de Bax -EBE) pode-se observar que as pontes dissulfeto e a estrutura secundária da α -hélice foram mantidas no modelo da proteína de fusão. Além disso, houve pouca mudança na estrutura da molécula com a troca de α -hélices. Pode-se também verificar que neste modelo esta α -hélice fica bastante exposta, o que pode favorecer a atividade apoptótica do BH3 do Bax.

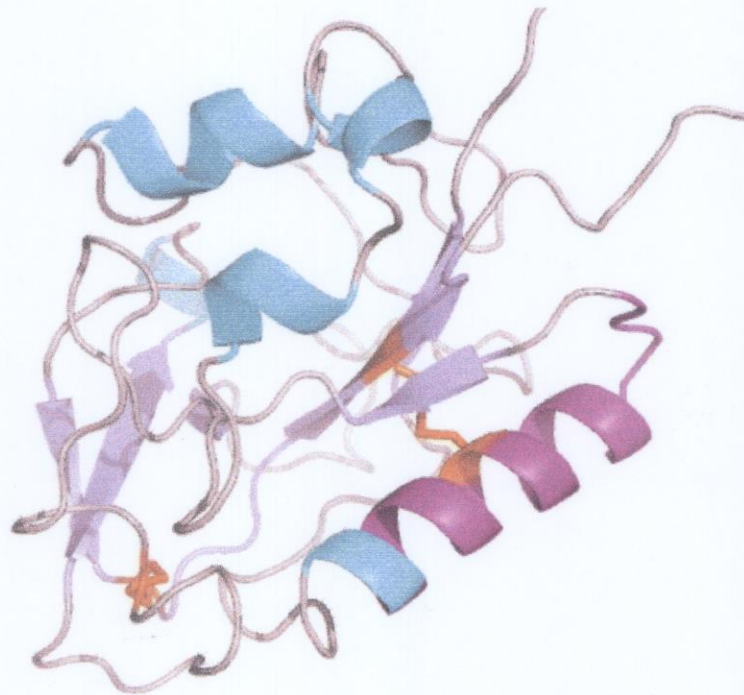


Figura 9: Proteína de fusão em que a α -hélice da endostatina foi trocada pela α -hélice do peptídeo do Bax (EBE). Em roxo está representado o segmento correspondente ao fragmento de Bax com 16 resíduos, inserido na estrutura da endostatina. Os dois resíduos remanescentes da 2ª α -hélice da endostatina e as outras α -hélices são indicados em azul turquesa.

c) Análise da superfície hidrofóbica da endostatina e proteínas de fusão

Pela análise da estrutura gerada pelo programa Molegro podemos visualizar a distribuição das regiões hidrofóbicas, hidrofílicas e neutras da superfície das proteínas modeladas. Na figura 10 estão representadas a distribuição de hidrofobicidade das quatro proteínas, endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE. Observam-se modificações na disposição das regiões hidrofóbicas das proteínas de fusão se comparadas com a proteína nativa, endostatina.

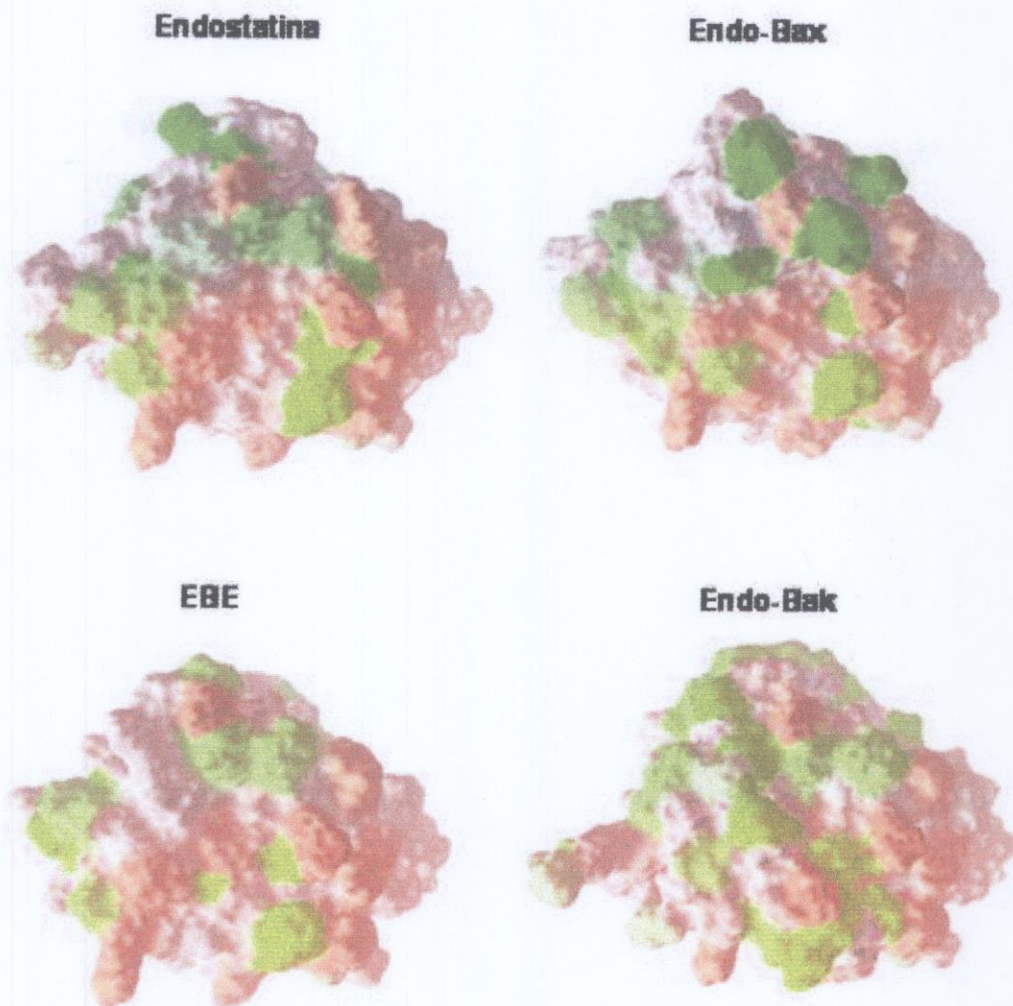


Figura 10. Diagramas de hidrofobicidade das proteínas modeladas, endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE gerados pelo programa Molegro. Representadas em verde as regiões hidrofóbicas, em laranja as regiões hidrofílicas e em branco as regiões neutras.

d) Análise da distribuição eletrostática da endostatina e das proteínas de fusão

Na figura 11 podemos observar as regiões carregadas na superfície das proteínas modeladas. A previsão das cargas, representadas nesta figura, também foi realizada pelo programa Molegro. Em azul estão representadas as regiões carregadas positivamente, em vermelho as regiões carregadas negativamente e em branco estão representadas as regiões neutras. Observam-se poucas mudanças na distribuição de cargas das proteínas mutadas se comparadas com a endostatina nativa pela análise de dinâmica molecular, o que indica estabilidade destas proteínas.

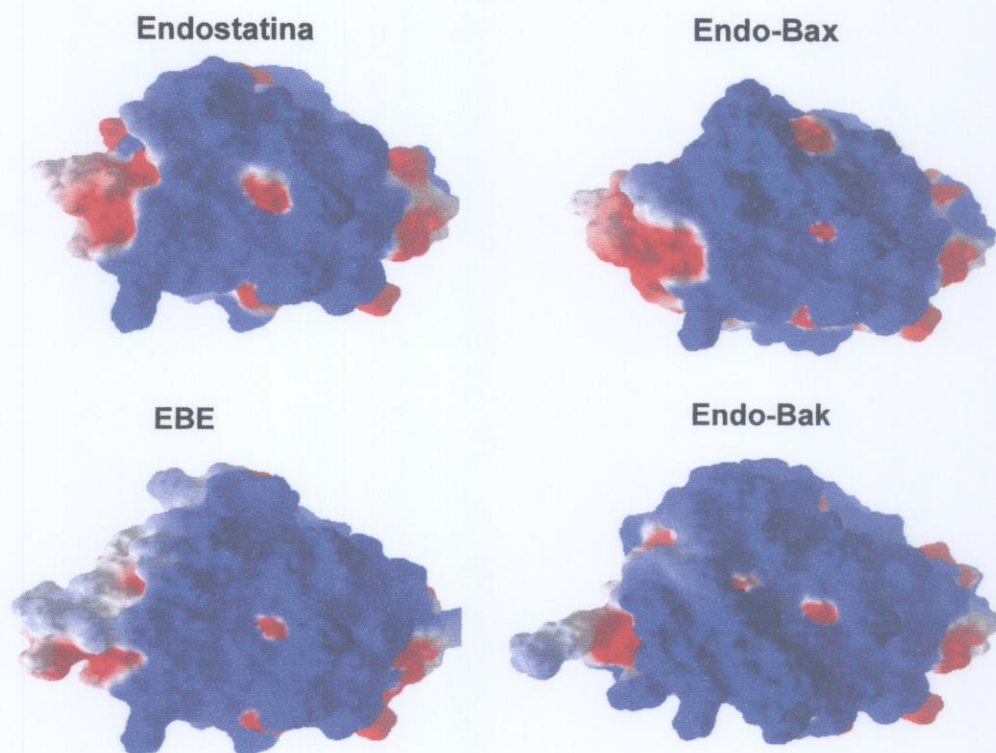


Figura 11. Diagrama das superfícies eletrostáticas das proteínas modeladas, endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE gerado pelo programa Molegro. Representadas em azul as regiões carregadas positivamente, em vermelho as regiões carregadas negativamente e em branco as regiões neutras

4.2 Construção dos vetores de expressão de endostatina e das proteínas de fusão

Os DNAs correspondentes aos cassetes de expressão das 4 proteínas foram clonados no vetor pET20 e foram obtidos plasmídeos transformados com os respectivos genes: pET-endo, pET20-endo-Bax, pET20-endo-Bak, e pET20-EBE. A introdução das sequências desejadas por mutagênese sítio dirigida nas construções foram confirmadas pela clivagem desses plasmídeos com enzimas que flanqueiam o gene da endostatina e dos mutantes (endo-Bax, endo-Bak e EBE) e também por sequenciamento.

Os vetores de expressão pET20, contendo sequências codificantes para um peptídeo sinal, seguido da sequência de cada uma das 4 proteínas de fusão, foram transformados nas células BL21(DE3) e feitas cultura e ativação destas células. No entanto, níveis muito baixos de endostatina e dos 3 mutantes foram obtidos no espaço periplasmático dessas bactérias, somente visíveis por Western-blot do choque osmótico das bactérias ativadas (dados não mostrados). Por isso, os DNAs das 4 proteínas foram subclonados no vetor pET28, o qual não possui a sequência codificante para peptídeo sinal e, portanto, as proteínas expressas em *E coli* transformadas com essas novas construções deveriam ser produzidas e estocadas no citoplasma das bactérias hospedeiras.

A análise dos clones positivos digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII* para as três construções pET28-endo, pET28-endo-Bax e pET28-endo-Bak estão apresentados na figuras 12A, 13B e 14D, confirmando a eficiência da clonagem. Para a construção pET28-EBE foi realizada outra estratégia de análise desta vez utilizando enzimas que gerariam três fragmentos no caso da presença da sequência de Bax (Figura 12 C). A presença de três bandas confirmou a eficiência da clonagem.

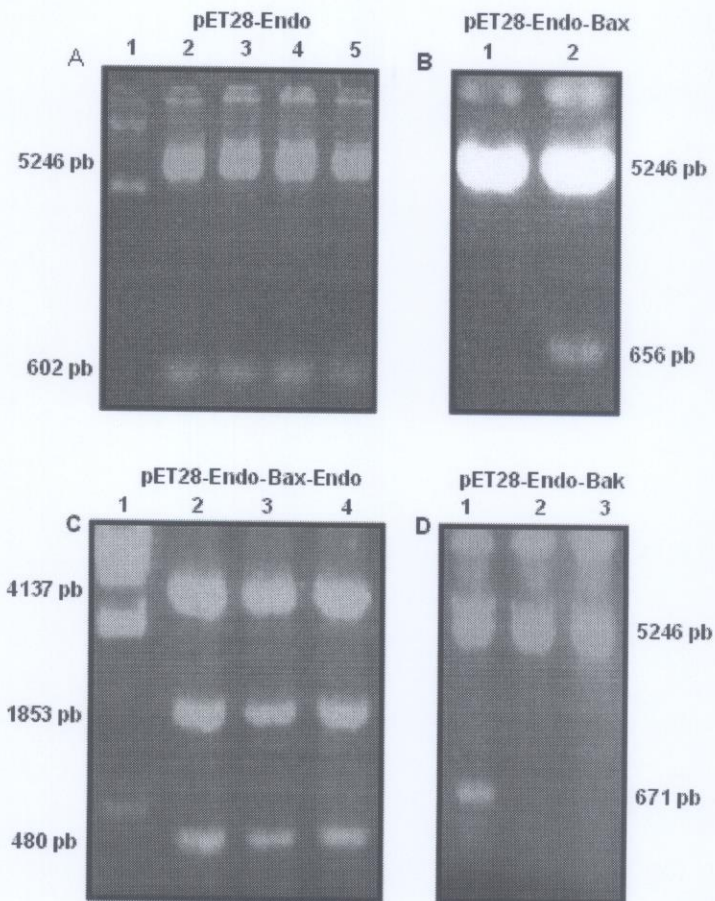


Figura 12: Seleção por tamanho de clones positivos para as quatro construções; **A:** Clones digeridos com as enzimas *NcoI* e *Hind III*. Coluna 1: pET28; Colunas 2,3,4 e 5: clones positivos para pET28-Endo apresentando um fragmento de 5246 pb correspondente ao vetor e um fragmento menor de 602 pb correspondente ao cDNA da endostatina. **B:** Clones digeridos com as enzimas *NcoI* e *Hind III* Coluna 1: pET28; Coluna 2: clone positivo para pET28-Endo-Bax apresentando um fragmento de 5246 pb correspondente ao vetor e um fragmento menor de 656 pb correspondente ao cDNA da endostatina juntamente com Bax. **C:** Clones digeridos com as enzimas *BsmI* e *Hind III* Coluna 1: pET28; Colunas 2,3,4 e 5: clones positivos para pET28-EBE apresentando tres fragmentos 4137 pb, 1853 pb e 480 pb. **D:** Clones digeridos com as enzimas *BglII* e *Hind III* Coluna 1: pET28; Coluna 2: clone positivo para pET28-Endo-Bak apresentando um fragmento de 5246 pb correspondente ao vetor e um fragmento menor de 671 pb correspondente ao cDNA da endostatina e do Bak.

Após seleção dos clones positivos para cada construção foi feita outra análise de restrição com todos os transformantes apresentando fragmentos de DNA com o número esperado de bases (Figura 13).

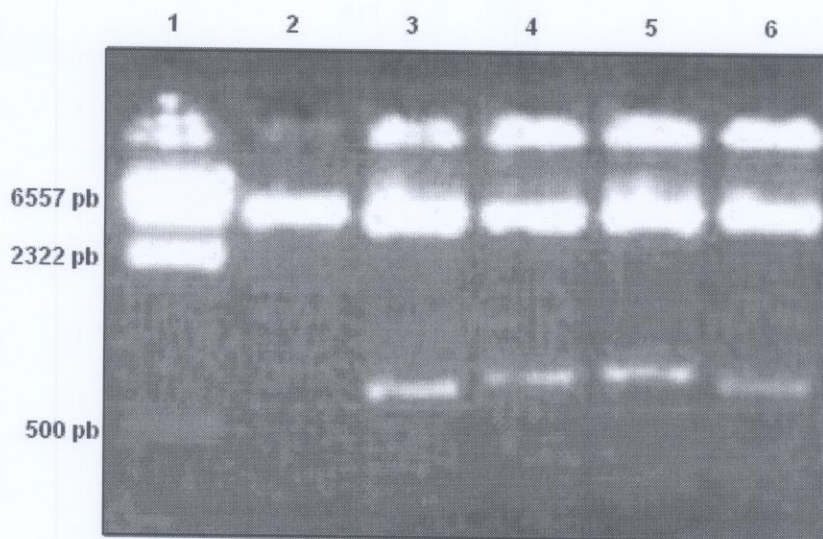


Figura 13: Análise de restrição dos clones positivos para a reação de ligação entre o vetor pET28 e os insertos: endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE. Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas *Hind* III e *Bgl* II. Coluna 1: Marcador de tamanho molecular em pares de bases; coluna 2: pET28; coluna 3: pET28-endo; coluna 4: pET28-endo-Bax, coluna 5: pET28-endo-Bak e coluna 6: pET28-EBE.

4.3 Expressão da endostatina e das proteínas de fusão

Foram obtidos bons níveis de expressão de endostatina e das proteínas de fusão obtidas após indução do promotor T7 presente no vetor pET28, pela adição de IPTG às bactérias hospedeiras. A utilização do meio rico 2HKSII no lugar do meio LB (Luria Bertani), o qual é mais comumente utilizado na expressão de proteínas, nos permitiu otimizar os níveis de expressão das proteínas recombinantes, diminuindo relativamente a presença de contaminantes provenientes da bactéria (Figura 14). O meio 2HKSII é um meio rico utilizado para a produção de altos níveis de massa de *E. coli* (DE OLIVEIRA et al., 1999). As lavagens da fração insolúvel (corpos de inclusão) foram realizadas para a retirada de lipoproteínas e outras proteínas expressas pela bactéria. Este protocolo mostrou-se eficiente na obtenção de corpúsculos de inclusão mais puros permitindo a retirada de contaminantes que

poderiam dificultar o processo de renaturação. Na mesma figura pode ser observada também a diferença nas massas moleculares da endostatina e das proteínas de fusão. A substituição da α -hélice da endostatina (Figura 14, colunas 2 e 6) pela α -hélice do Bax (colunas 5 e 9) não levou a uma alteração significativa na massa molecular desta proteína. No entanto, as massas moleculares das proteínas mutantes endo-Bax e endo-Bak se apresentaram levemente maiores devido à fusão no C-terminal da endostatina dos peptídeos pró-apoptóticos Bax ou Bak (colunas 3, 4 e 7, 8; respectivamente).

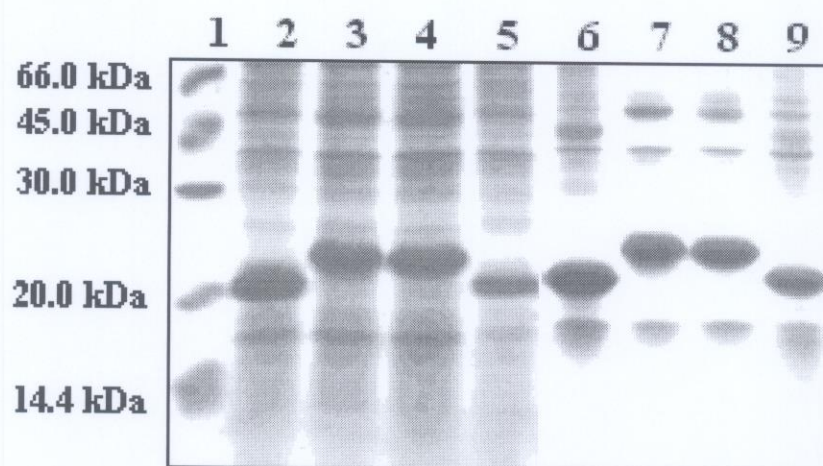


Figura 14: Análise por SDS-PAGE (15%) da expressão e pureza de corpos de inclusão de endostatina e das proteínas de fusão, após diferentes etapas de lavagem. Foram aplicadas amostras correspondentes a 0,1 unidades ópticas ($A_{600 \text{ nm}}$). Coluna 1, Padrão de massa molecular. Colunas 2, 3, 4 e 5: expressão de endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE, respectivamente. Colunas 6, 7, 8, 9: corpos de inclusão após lavagens, endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE, respectivamente.

4.4 Renaturação de agregados protéicos de endostatina e proteínas de fusão utilizando altas pressões hidrostáticas

A renaturação de endostatina produzida em *E. coli* foi um desafio. Métodos tradicionais foram testados resultando em agregação das 4 proteínas após remoção do agente desnaturante (YOU et al., 1999; MARSHALL, 2002). Na tentativa de obter proteínas com um correto enovelamento fizemos uso de uma nova metodologia na qual se faz uso de altas pressões hidrostáticas para solubilizar e renaturar proteínas agregadas em corpos de inclusão.

A pressão é um parâmetro físico que modula interações proteína-solvente por meio de alterações de volume. A diferença de energia livre de Gibbs (ΔG) entre dois estados protéicos é igual à diferença no volume parcial molar entre os respectivos estados (SILVA, 1993). Altas pressões hidrostáticas deslocam o equilíbrio para estados com menor volume. Por conseguinte, termodinamicamente as altas pressões favorecem a conformação protéica com menor volume. Proteínas com frações grandes de cavidades não expostas à água são, portanto, altamente sensíveis à pressão. As proteínas agregadas possuem maior volume do que quando na conformação nativa devido à presença de cavidades intermoleculares não expostas à água. Consequentemente o tratamento sob pressão modula a dissociação de agregados. Pressões hidrostáticas da ordem de 200 a 300MPa desagregam proteínas, desfavorecendo interações hidrofóbicas e eletrostáticas intermoleculares. Fizemos uso de esta técnica para renaturar as proteínas recombinantes, endostatina e proteínas de fusão. Inicialmente foram feitas todas as padronizações para os corpos de inclusão da proteína endostatina e depois essas mesmas condições foram aplicadas para as proteínas de fusão. Foram testados diferentes parâmetros: concentração de agente desnaturante, concentração e proporção do par redox (GSH/GSSG) no tampão de renaturação. As amostras foram pressurizadas em 200MPa (30000 psi) durante 16 horas. Na figura 15 podemos visualizar bandas de aproximadamente 20 kDa correspondentes ao monômero da endostatina solúvel por pressurização em tampão contendo 1.5 M de GdnHCl e diferentes razões do par

redox GSH/GSSG com um total de 1 mM. As proporções de 2:1, 1:1 e 2:1 do par redox se mostraram mais eficientes para obtenção de endostatina solúvel quando comparadas com as condições: ausência do par redox ou utilizando-se outras proporções desses reagentes.

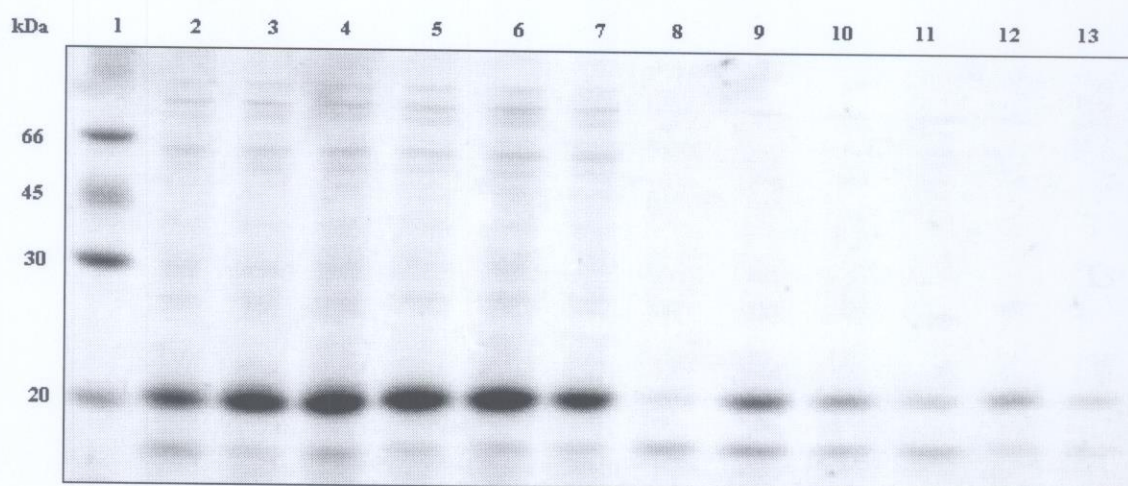


Figura 15: Efeito de diferentes proporções de GSH:GSSG na solubilização de corpos de inclusão (IBs) de endostatina submetidas a altas pressões hidrostáticas, os IBs foram ressuspensos em tampão de renaturação contendo 1,5 M de GndHCl e diferentes proporções de GSH e GSSG com uma concentração molar total de 1 mM. Coluna 1: padrão de massa molecular. Colunas 2-7: amostras submetidas a altas pressões hidrostáticas (30000 psi) por 16 horas. Coluna 8-13: amostras mantidas a pressão atmosférica. Coluna 2 e 8, amostras sem GSH/GSSG. Coluna 3 e 9: GSH:GSSG=4:1. Colunas 4 e 10: GSH-GSSG=2:1, Coluna 5 e 11: GSH:GSSG=1:1. Coluna 6 e 12: GSH e GSSG=1:2. Coluna 7 e 13: GSH:GSSG=1:4.

No processo de renaturação sob pressão a otimização da proporção e concentração apropriadas dos reagentes oxidante e redutor foi essencial para a obtenção de endostatina renaturada. Quando a concentração molar do par redox foi variada observou-se um melhor rendimento de renaturação nas concentrações total de 0,5, 1 e 2,5 mM de glutationas oxidada e reduzida. Nas outras condições foram

observadas níveis menores de rendimento de endostatina solúvel e renaturada (Figura 16).

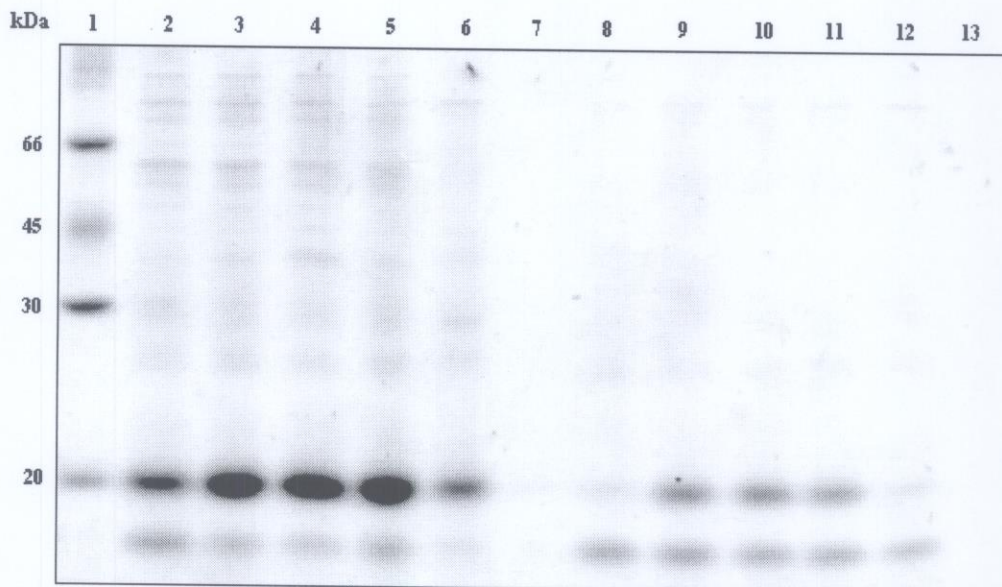


Figura 16: Diferentes concentrações do par redox (GSH/GSSG) mantendo a proporção de 1:1. Coluna 1: Padrão de massa molecular. Colunas 2 e 8: amostras sem GSH/GSSG. Colunas 3 e 9 GSH/GSSG=0.5 mM. Colunas 4 e 10: GSH/GSSG=1mM. Colunas 5 e 11: GSH/GSSG=2.5 mM. Coluna 6 e 12: GSH/GSSG=5 mM. Colunas 7 e 13: GSH:GSSG=10 mM.

A fim de encontrarmos a melhor condição de renaturação sob pressão e melhorar os níveis de rendimento de endostatina nativa foi feito um estudo de diferentes concentrações de GdnHCl (Figura 17), mantendo as condições de par redox (1:1 de GSH/GSSG) já padronizadas anteriormente. Na ausência de GdnHCl os corpos de inclusão de endostatina não solubilizaram, mas ao incrementar a concentração de GdnHCl até 2M podemos observar o incremento de intensidade das bandas correspondentes a endostatina nativa. Em concentrações desnaturantes de GdnHCl (6 M) a intensidade da banda correspondente a endostatina é fraca, indicando que a proteína foi solubilizada mas não renaturada corretamente, reagregando durante o processo de diálise. Amostras mantidas em pressão atmosférica, apresentaram baixos níveis de solubilização em todas as concentrações

de GdnHCl. No entanto sob altas pressões hidrostáticas (30000 psi), os agregados protéicos de endostatina dissolveram com concentrações não desnaturantes de GdnHCl (1-2M).

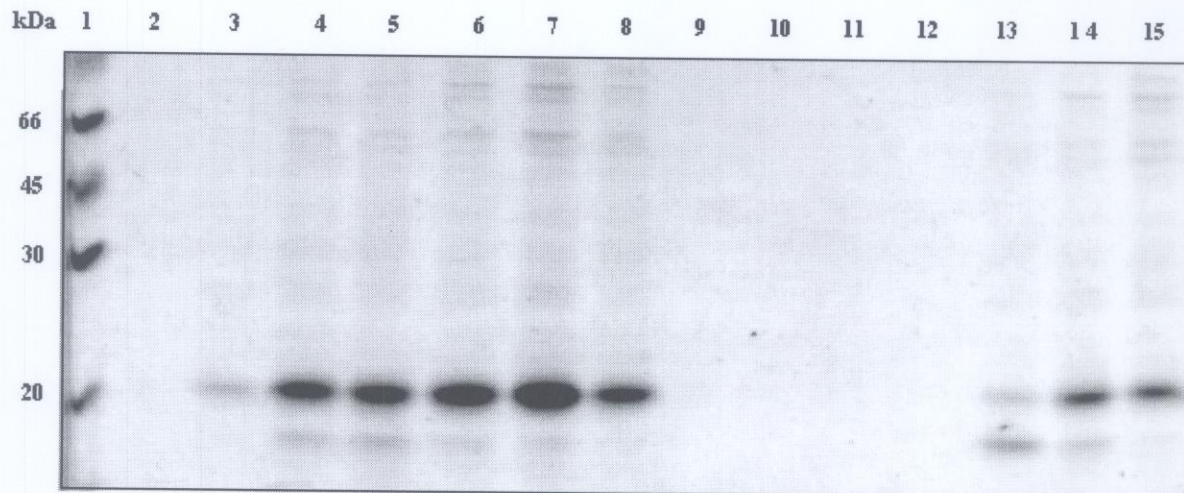


Figura 17. Efeito da molaridade de GdnHCl na solubilização e renaturação de IBs de endostatina. Coluna 1: padrão de massa molecular. Colunas 2-8: amostras submetidas a altas pressões hidrostáticas (30000 psi) por 16 horas. Colunas 6-13, amostras mantidas a pressão atmosférica. Colunas 2 e 9 amostras sem GdnHCl. Colunas 3 e 10: 5 M GdnHCl. Colunas 4 e 11: 0.75 M GdnHCl. Colunas 5 e 12: 1M GdnHCl. Colunas 6 e 13: 1.5 M GdnHCl. Colunas 7 e 14: 2M GdnHCl. Colunas 8 e 15: 6M GdnHCl.

Os parâmetros de renaturação sob pressão já padronizados para endostatina foram aplicados para as proteínas de fusão, endo-Bax, endo-Bak e EBE, obtendo-se bons resultados de renaturação das proteínas mutantes como se observa na Figura 18. Pela análise do gel de eletroforese as proteínas se encontram puras, pois não se podem observar bandas que não sejam as proteínas endostatina e os mutantes ou seus dímeros, no caso da endo-Bax (coluna 3), o que indica que, se existem contaminações por proteínas de *E. coli*, elas são pequenas.

O rendimento final de renaturação a partir de agregados em corpos de inclusão, foi de 30 % de endostatina solúvel renaturada a partir de proteína agregada nos corpos de inclusão.

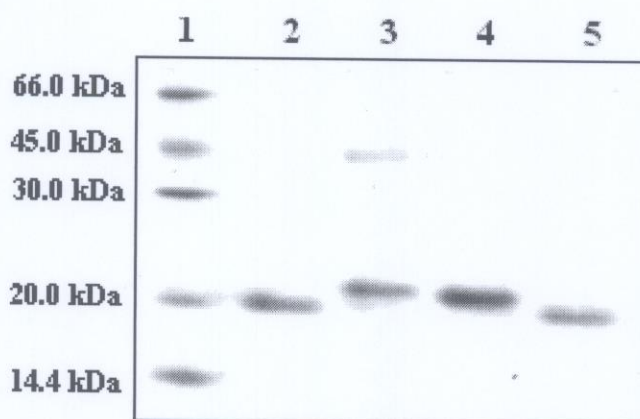


Figura 18: Análise da renaturação de agregados protéicos de endostatina e mutantes aplicando altas pressões hidrostáticas (30000 psi). O tampão de renaturação para todas as amostras foi 50mM Tris HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 1,5 M GdnHCl, 1mM GSH/GSSG. Coluna 1: Padrão de massa molecular. Coluna 2: Endostatina. Coluna 3: endo-Bax. Coluna 4: endo-Bak e Coluna 5: EBE.

4.4.1 Renaturação da endostatina e seus mutantes aplicando pressões decrescentes

Na figura 19 podemos observar que a despressurização em degraus de pressão (5000psi a cada 30 minutos) das amostras de suspensão de corpos de inclusão foi eficaz para elevar os níveis de obtenção das proteínas, aumentando o nível de recuperação de todas as proteínas renaturadas. Bandas com intensidades maiores podem ser observadas quando pressões decrescentes

foram utilizadas na renaturação de todas as quatro proteínas. Este esquema de despressurização permitiu otimizar a renaturação da endostatina e mutantes.

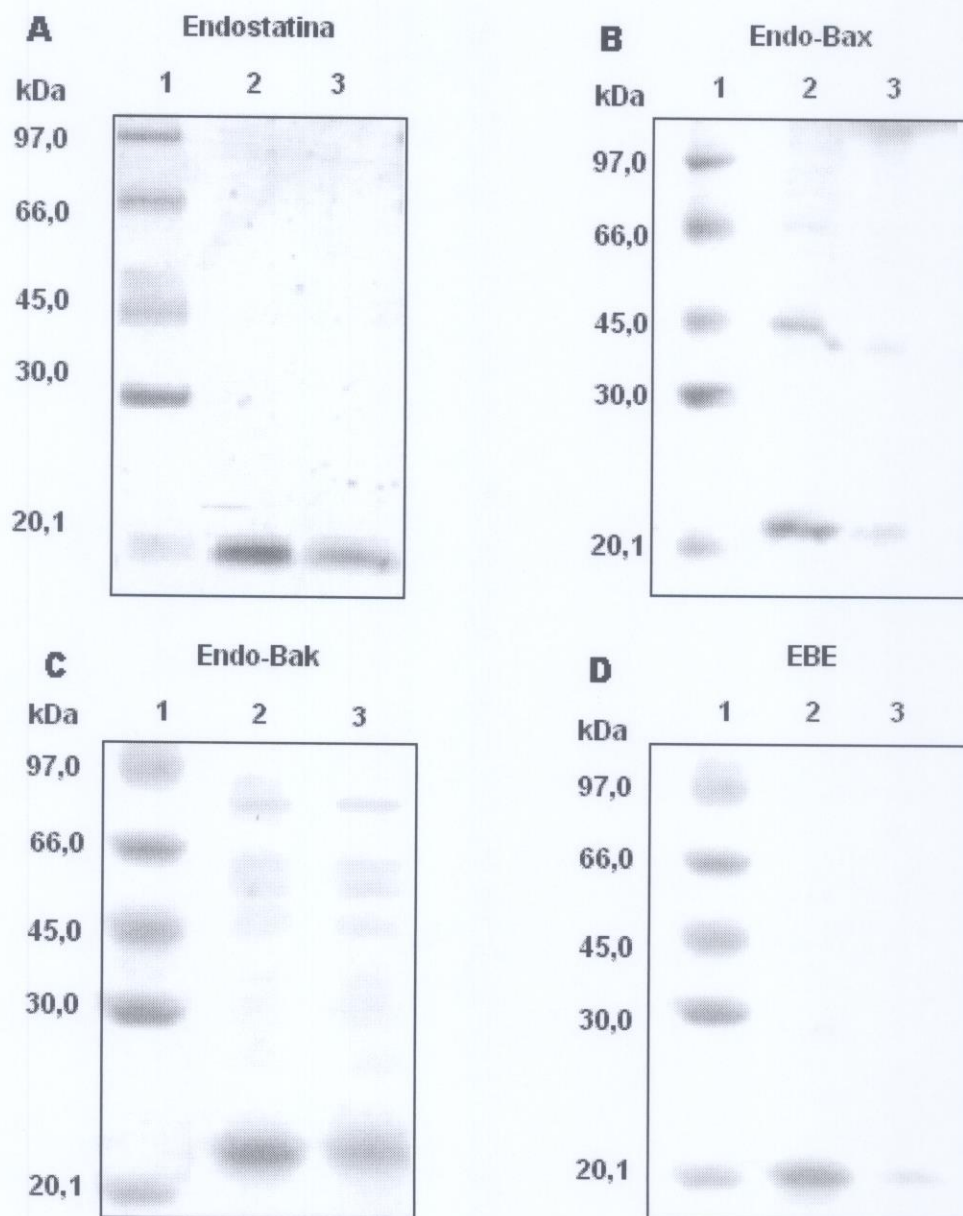


Figura 19. Efeito da aplicação de pressões decrescentes na renaturação da endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE, A, B, C e D respectivamente. Coluna 1: padrão de massa molecular, Coluna 2: Amostras submetidas a uma pressão inicial de 35000 psi mantida por 30 minutos e então a despressurização foi realizada cada 30 minutos abaixando 5000 psi ate atingir a pressão atmosférica. Coluna 3: amostras submetidas a 35000 psi por 16 horas e despressurização direta.

4.4.2. Análise morfológica dos agregados protéicos tratados com altas pressões utilizando Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma importante ferramenta para estudo de caracteres morfológicos. Imagens de corpos de inclusão de endostatina antes e após da aplicação de altas pressões para sua renaturação podem ser observados na Figura 20. As micrografias nos permitem visualizar mudanças na morfologia dos agregados protéicos antes e após aplicação de pressão sobre a desagregação dos corpos de inclusão da endostatina. Observamos que a quantidade de corpos de inclusão é diminuída após ação da pressão o que evidencia a solubilização dos corpos de inclusão pela ação da pressão. Após diálise pode se observar a presença de uma quantidade menor de agregados protéicos com uma morfologia totalmente diferente se comparados com os corpos de inclusão, esses agregados são provavelmente proteínas que não se enovelaram corretamente e que agregaram e precipitaram após retirada dos agentes caotrópicos e solubilizadores, durante a diálise.

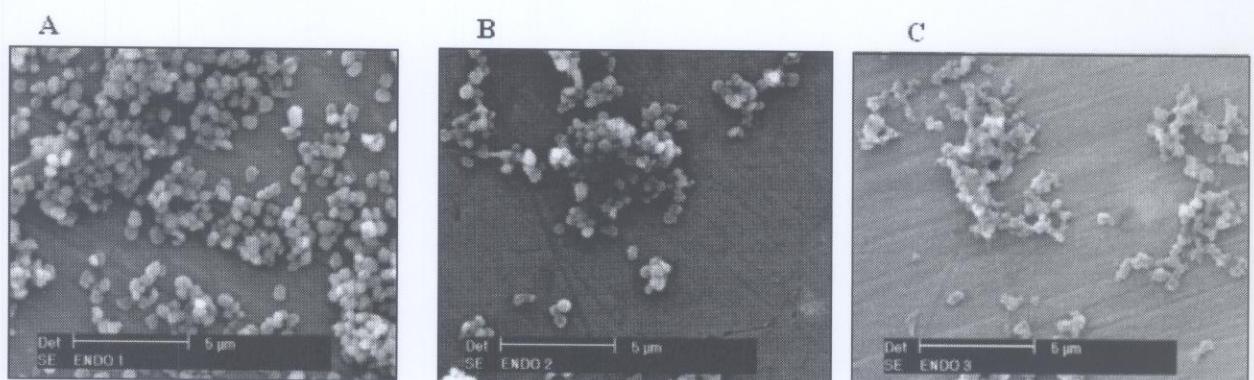


Figura 20. Micrografias de corpúsculos de inclusão antes e após serem submetidos a renaturação sob pressão. **A:** Corpos de inclusão de endostatina. **B:** Agregados insolúveis após pressurização. **C:** Fração insolúvel após diálise.

4.5 Purificação e caracterização de endostatina e proteínas de fusão

A ligação de endostatina à heparina e a purificação desta proteína em resina de afinidade, pela ligação à heparina foi já descrita (HOHENESTER *et al.*, 1998). A endostatina e os híbridos foram purificados em resina de heparina, sendo obtidos bons rendimentos e grau de purificação, como pode ser observado na Figura 21, e evidenciado pela presença de bandas referentes às proteínas recombinantes, endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE, com as massas moleculares esperadas (Figura 21, A, B, C e D).

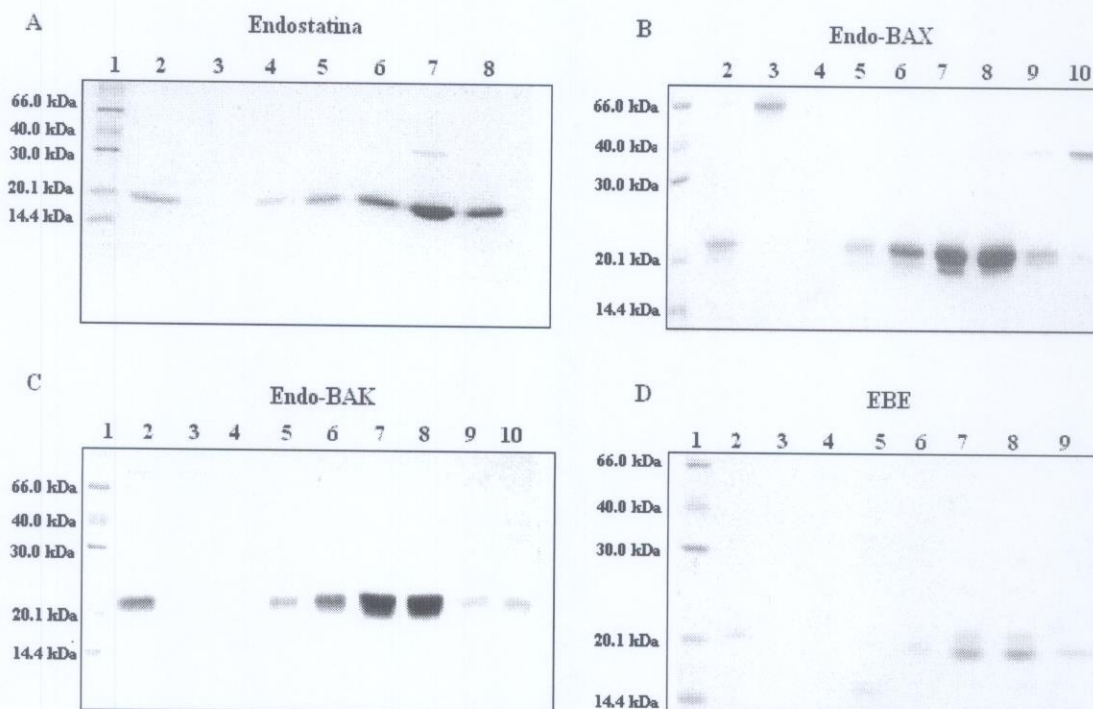


Figura 21. Análise de proteínas renaturadas sob pressão purificados utilizando uma coluna de heparina. **A.** Endostatina. **B.** endo-Bax, **C.** endo-Bak. **D.** EBE. Coluna 1, Padrão de peso molecular. Coluna 2, amostras antes da purificação. Colunas 6-8, proteínas purificadas eluídas com 0.5 M de NaCl.

Todas as proteínas foram analisadas por Western blot após renaturação frente ao anticorpo anti-endostatina. Na figura 22 observam-se bandas correspondentes a endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE, com as respectivas diferenças nos tamanhos visualizados na análise por PAGE, confirmando sua ligação ao anticorpo específico.

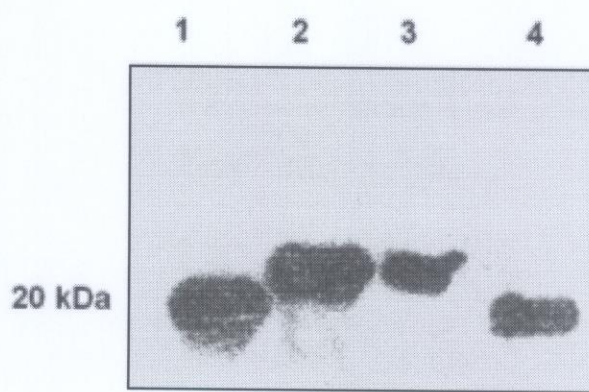


Figura 22: Western blot das proteínas recombinantes solúveis. Coluna 1: endostatina; coluna 2: endo-Bax; coluna 3: endo-Bak; coluna 4: EBE.

4.6 Análises espectroscópicas

4.6.1 Espectroscopia de Dicrosimo Circular (CD)

A espectroscopia de CD é uma ferramenta muito utilizada no estudo da estrutura secundária de proteínas. Por este método também é possível verificar mudanças conformacionais, alterações ocorridas em função da temperatura, de pH, força iônica e monitorar fenômenos de desnaturação e renaturação (PELTON; MCLEAN, 2000).

Experimentos de análise de CD foram empregados para avaliar a estrutura secundária da endostatina e das proteínas de fusão. Como controle positivo foi

utilizada a endostatina nativa produzida em CHO (Células de ovário de Hamster Chinês) (Figura 23). Os espectros de CD a 20 °C das proteínas endostatina, endo-Bax, endo-Bak e o controle positivo exibem um pico negativo a 205 nm. Tanto a endostatina quanto as proteínas de fusão (endo-Bax e endo-Bak) apresentam um perfil idêntico ao da endostatina nativa com um conteúdo de 7 % de α -hélice, 51 % de folhas- β e 42% de estrutura desordenada (*random coil*) analisados pelo programa K2D. Esses dados estão de acordo com a estrutura secundária reportada para a endostatina, confirmando que as proteínas analisadas possuem estrutura secundária (WU et al., 2004; HE et al., 2005), evidenciando que o processo de renaturação utilizando altas pressões hidrostáticas levou à renaturação com obtenção de proteínas com estrutura secundária nativa.

A proteína de fusão EBE apresentou um perfil de CD diferente se comparado com as outras proteínas com um aumento do conteúdo de α -hélice (11%) diminuição de folhas- β (36 %) e aumento da porcentagem de estrutura desordenada (53 %).

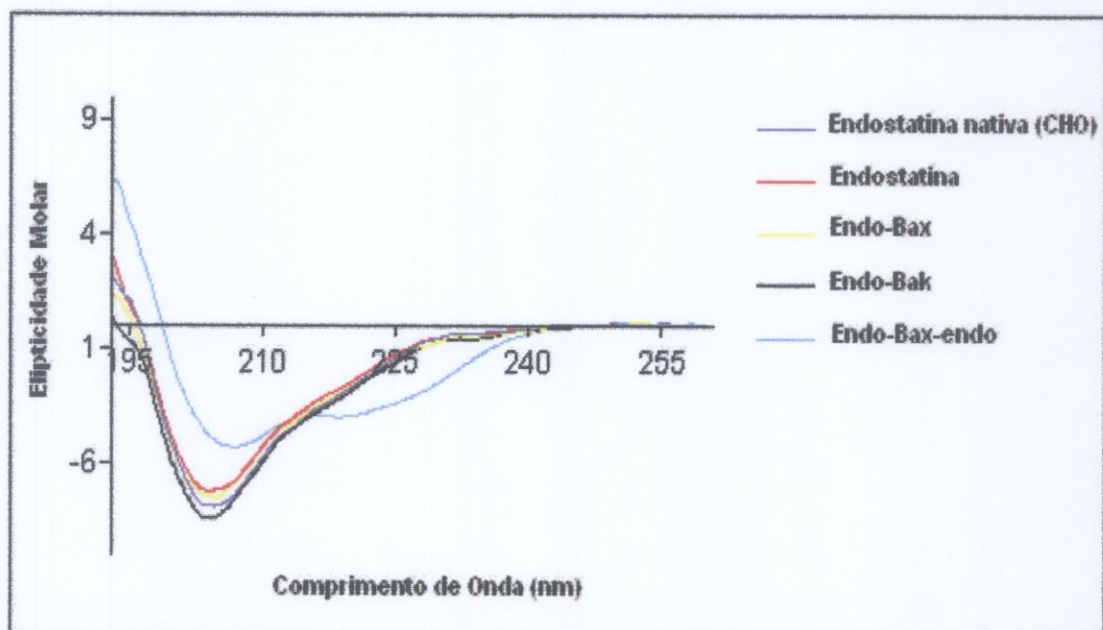


Figura 23. Sobreposição dos espectros de diâmetro circular de endostatina nativa (produzida em CHO) e das proteínas renaturadas utilizando altas pressões: endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE.

4.6.2 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

A espectroscopia de emissão de fluorescência é muito utilizada para caracterizar macromoléculas biológicas e verificar mudanças conformacionais de proteínas que contêm fluorescêntes naturais (fluoróforos) como triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) (LAKOWICZ, 1983). A endostatina possui 4 resíduos de triptofano distribuídos na sua estrutura (HOHENESTER et al., 1998), o que torna a fluorescência intrínseca um bom marcador de modificações da sua estrutura terciária.

O espectro de fluorescência da endostatina nativa produzida em células CHO mostrou uma emissão máxima a 318 nm quando excitada a 288 nm (Figura 24). As proteínas renaturadas; endostatina, endo-Bax e endo-Bak apresentaram espectros semelhantes à da proteína nativa. Esses dados estão de acordo com os espectros para endostatina nativa relatados na literatura (ZHOU *et al.*, 2005). No entanto, para a EBE um espectro diferente foi observado apresentado uma emissão máxima a 345 nm, o que confirma que esta proteína possui uma estrutura diferente das outras, provavelmente com os triptofanos mais expostos.

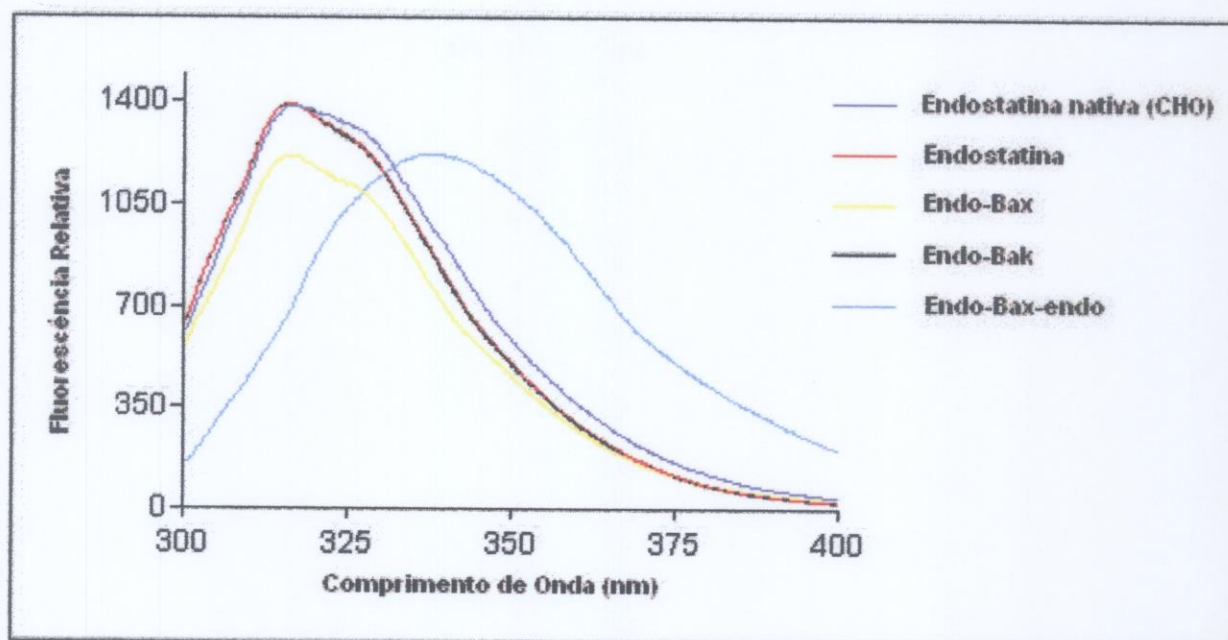


Figura 24. Espectro de emissão de fluorescência de endostatina nativa produzida em células CHO e das proteínas renaturadas sob pressão, endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE.

4.7. Análise de atividade de endostatina e das proteínas mutantes em células endoteliais

4.7.1. Internalização de endostatina e mutantes avaliada por Western blot

Segundo a literatura (DIXELIUS et al., 2000; MACDONALD et al., 2001), a endostatina é especificamente internalizada pelas células endoteliais e é co-localizada com a tropomiosina, nos microfilamentos das células endoteliais. Com a finalidade de determinarmos se as proteínas mutantes também seriam internalizadas, células endoteliais (C-PAE) foram incubadas com 10µg/mL de endostatina ou das proteínas mutantes em diferentes tempos. Em um primeiro experimento utilizamos somente a endostatina, que foi internalizada aos 15 minutos, aumentando sua internalização conforme o tempo foi incrementado, sendo maior aos 90 minutos (dados não mostrados). Conforme se pode verificar na figura 25 houve internalização da endostatina e também das proteínas de

fusão após 30 minutos de incubação. As proteínas continuaram presentes nas células endoteliais mesmo após 3 horas de incubação. Endo-Bak e EBE internalizaram em menor grau nos tempos iniciais de internalização se comparadas com a endostatina e endo-Bax.

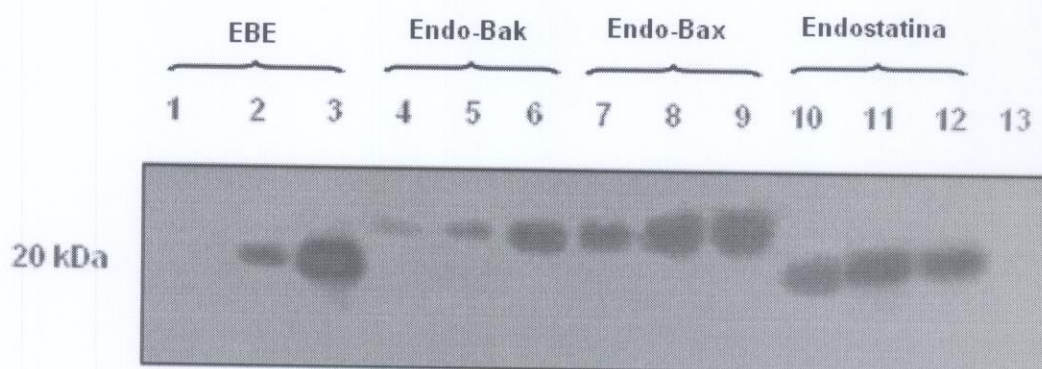


Figura 25: Western blot das proteínas recombinantes endostatina e proteínas de fusão internalizadas pela linhagem endotelial C-PAE após diferentes tempos de incubação com e sem 10 µg/ mL das respectivas proteínas. Coluna 1, 2, 3: Células tratadas com EBE por 30, 90 e 180 minutos, respectivamente. Coluna 4, 5, 6: Células tratadas com endo-Bak por 30, 90, 180 minutos respectivamente; Coluna 7, 8, 9: Células tratadas com endo-Bax por 30, 90, 180 minutos, respectivamente; Coluna 10, 11, 12: Células tratadas com endostatina por 30, 90, 180 minutos, respectivamente; Coluna 13: Células mantidas por 3 horas sem a adição das proteínas recombinantes.

4.7.2. Internalização avaliada por imunofluorescência

Para determinar o padrão de internalização da endostatina e das proteínas de fusão, células C-PAE foram incubadas por um período de uma hora com 10µg,/mL das respectivas proteínas biotiniladas. A associação destas proteínas às células C-PAE foi detectada. Como observado na figura 26, após uma hora de incubação todas as proteínas se distribuíram pelas células, incluindo os núcleos. No entanto este comportamento não foi observado quando células de origem não endotelial NIH 3T3 (Figura 27) foram tratadas nas mesmas condições, demonstrando a ausência de especificidade da endostatina e das proteínas de fusão sobre células de origem não endotelial.

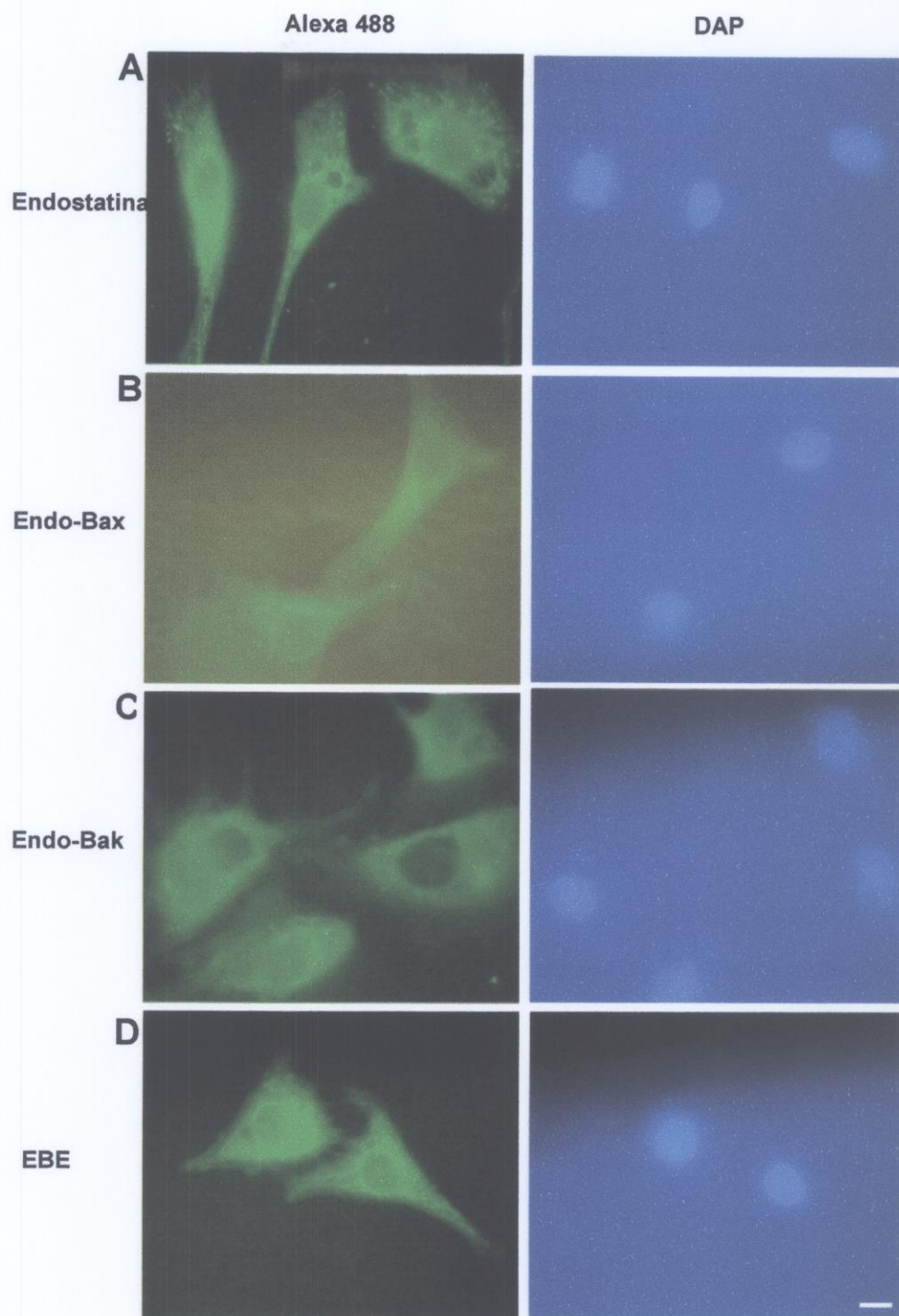


Figura 26. Internalização de endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE pela linhagem endotelial C-PAE. Células C-PAE foram incubadas por uma hora com 10 ug/mL de cada uma das 4 proteínas. A ligação foi detectada utilizando alexa 488 conjugada com estreptavidina. Amostras foram analisadas em microscópio (barra 10 uM). A, B, C e D, células C-PAE incubadas com endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE, respectivamente.

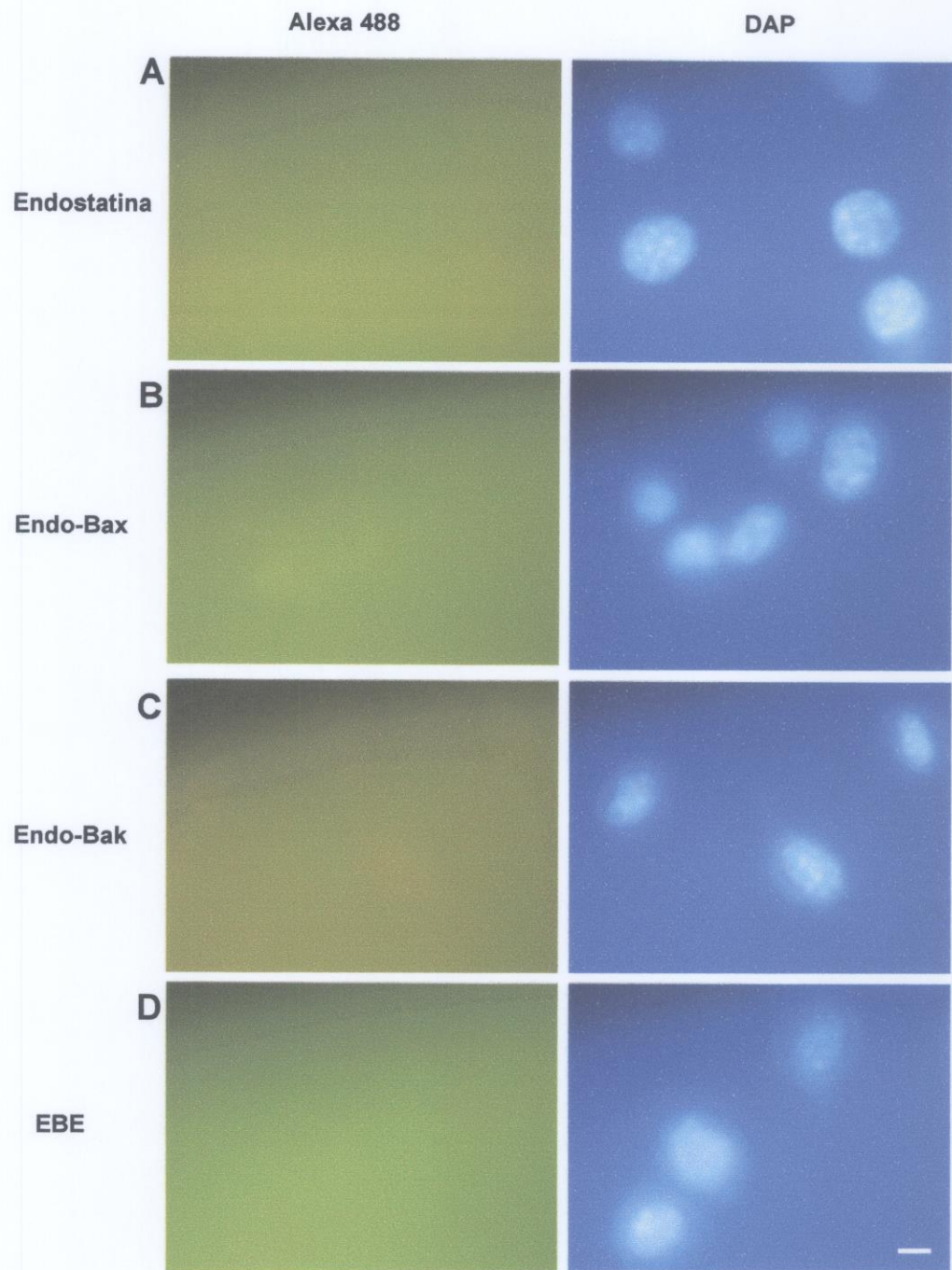


Figura 27. Ausência de internalização de endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE por fibroblastos murinos NIH 3T3. Células NIH 3T3 foram incubados por uma hora com 10 μg /mL de cada uma das 4 proteínas. A ligação foi detectada utilizando alexa 488 conjugada com estreptavidina. Amostras foram analisadas em microscópio (barra 10 μM). A, B, C e D, células NIH 3T3 incubadas com endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE, respectivamente (barra 10 μM).

4.7.3. Ensaio de viabilidade celular de células endoteliais

A habilidade da endostatina e dos seus mutantes, endo-Bax, endo-Bak e EBE em diminuir a viabilidade de células endoteliais de pulmão de bezerro (C-PAE) são mostrados na Figura 28. Tanto a endo-Bax quanto a EBE mostraram maior atividade sobre a viabilidade das células endoteliais (com reduções de 50 e 34,2 %, respectivamente) do que a endostatina e endo-Bak (ambas com redução de 23,9 %). Estes resultados indicam que a presença do peptídeo pró-apoptótico Bax nas duas proteínas de fusão potencializou a atividade da endostatina sobre as células endoteliais.

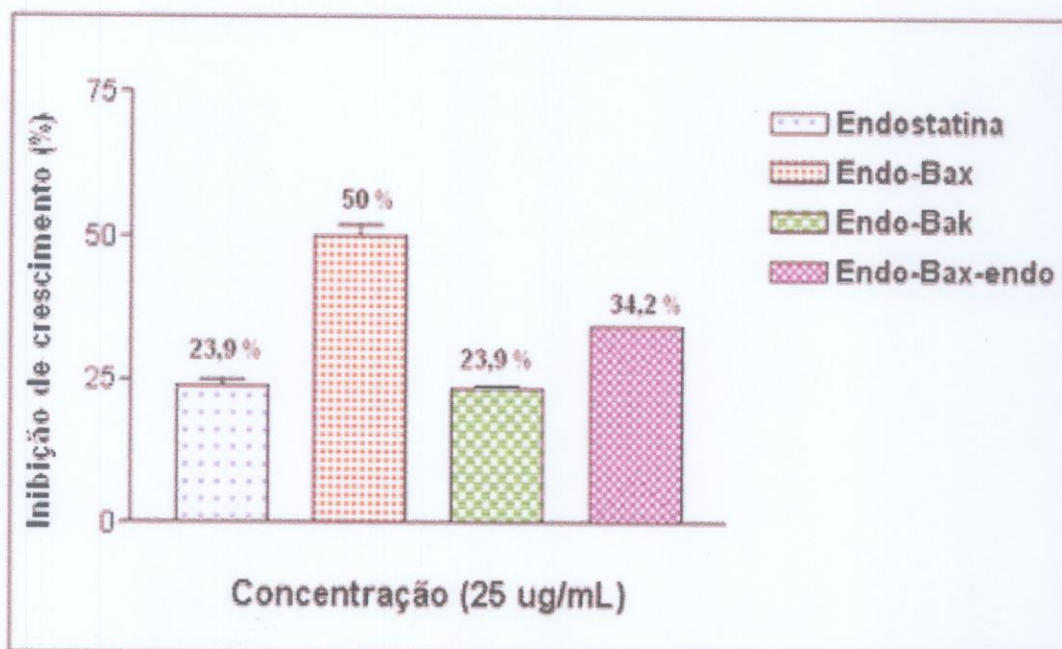


Figura 28: Ensaio de viabilidade celular (MTS). Efeito do tratamento com endostatina, endo-Bax, endo-Bak ou EBE, na viabilidade de células endoteliais de pulmão de bezerro (C-PAE). 5000 células foram incubadas por 72 horas com as respectivas proteínas. Teste realizado em triplicata.

4.8.1. Análise por citometria de fluxo

Células de origem endotelial (C-PAE) tratadas por 16 horas com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada proteína apresentaram um maior grau de apoptose na presença das proteínas de fusão se comparada com a endostatina nativa. Na figura 29 podemos observar que endo-Bax e EBE induzem maior grau de morte celular ($63,9 \pm 5,0 \%$, $61,0 \pm 2,5 \%$) se comparadas com a morte celular induzida pela endostatina nativa ($35,6 \pm 2,8\%$). A proteína endo-Bak apresentou um efeito mais similar ao da endostatina sobre as células endoteliais ($44,4 \pm 0,9 \%$).

Estas proteínas foram também testadas com fibroblastos murinos NIH 3T3 (células de origem não endotelial) não sendo observada morte celular significativa ($3 \pm 2 \%$), confirmando a especificidade da endostatina sobre linhagens endoteliais (DIXELIUS et al., 2000).

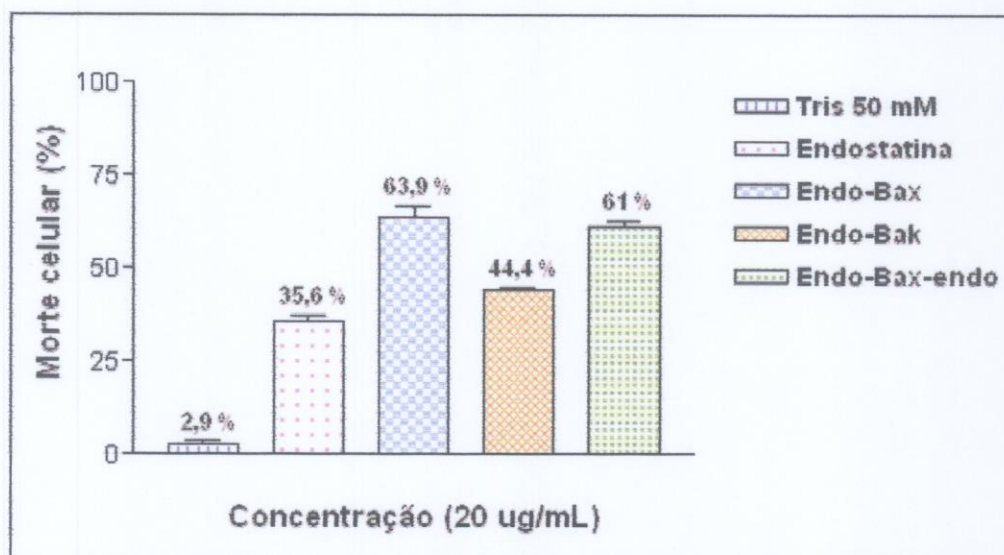


Figura 29: Efeito do tratamento com endostatina, endo-Bax, endo-Bak ou EBE, na apoptose de células endoteliais de origem bovina (C-PAE). $1,5 \times 10^6$ células foram incubadas por 16 horas com 20 μg das respectivas proteínas. A análise foi feita por citometria de fluxo após incorporação de iodeto de propídio em tampão HFS. Teste realizado em triplicata.

4.8.2 Ensaio de ativação de caspase-3

A análise por western blot mostrou a presença de caspase-3 ativada após 16 horas de incubação com 20 $\mu\text{g/mL}$ de endostatina e das proteínas mutantes, demonstrado pela visualização de bandas correspondentes à caspase-3 após incubação com um anticorpo específico contra esta proteína. Tanto a endostatina nativa quanto as proteínas mutantes (endo-Bax, endo-Bak e EBE) ativaram a caspase-3. Não se observou diferença significativa nos níveis de ativação da caspase-3 entre as proteínas endostatina, endo-Bax e Endo-Bak, no entanto o tratamento com EBE levou à formação de uma banda com uma intensidade ligeiramente maior se comparada com as outras, como pode ser observado na figura 30 (Coluna 5). Observa-se também a presença de bandas que correspondem à pró-caspase-3, forma inativa da caspase-3 também presente em células saudáveis, como pode ser verificado pela presença desta banda em células que não receberam tratamento (coluna 1 da Figura 30). Podemos afirmar que todas as proteínas foram capazes de ativar a caspase-3, enzima importante para desencadear os eventos que culminam em apoptose, no entanto a proteína de fusão aparentemente EBE foi mais eficiente em ativar a caspase-3 se comparada com as outras proteínas evidenciando a capacidade desta proteína de fusão em induzir um maior grau apoptose em células de origem endotelial.

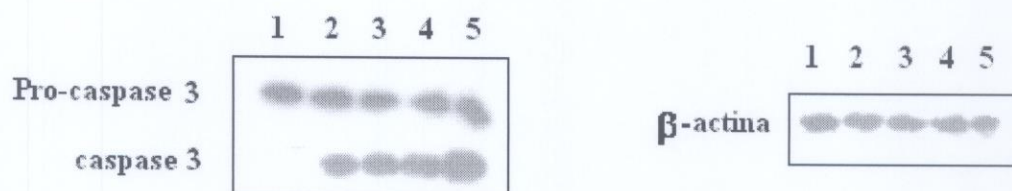


Figura 30: Análise por western blot dos níveis de ativação da caspase-3 das células C-PAE tratadas com 20 $\mu\text{g/mL}$ de endostatina ou das proteínas mutantes (endo-Bax, endo-Bak e EBE). Coluna 1. sem tratamento, Coluna 2. tratadas com endostatina, Coluna 3. tratadas com Endo-Bax, Coluna 4. tratadas com Endo-Bak e Coluna 5. tratadas com EBE. Como controle do ensaio foi utilizada β -actina.

5. DISCUSSÃO

A supressão da angiogênese tem provado ser uma eficiente estratégia que leva à regressão tumoral. Assim, inibidores de angiogênese são considerados uma nova classe de agentes antitumorais que se caracterizam por apresentar baixa toxicidade e resistência a drogas, inibindo o crescimento tumoral pelo bloqueio da formação de novos vasos sanguíneos, os quais provêm oxigênio e nutrientes que permitem o crescimento tumoral (KERBEL; FOLKMAN, 2002; FOLKMAN, 2004).

A endostatina é um dos inibidores de angiogênese mais estudado e testado em múltiplos testes clínicos. Sua atividade anti-tumoral é atribuída à sua especificidade em inibir a proliferação de células endoteliais, agindo pela inibição indireta do crescimento tumoral (FOLKMAN, 2006). Apesar das vantagens do tratamento com esta proteína, existem restrições enquanto ao seu uso: meia vida curta (duas horas), a necessidade de uma administração continua para o tratamento ser eficiente (10-100mg/m²/dia), além de dificuldades na renaturação e obtenção de quantidades suficientes de endostatina solúvel e corretamente enovelada. Somente 1-2 % de endostatina ativa são obtidas utilizando métodos convencionais de renaturação, quantidade insuficiente para testar sua atividade antiangiogênica e antitumoral *in vivo* (O'REILLY *et al.*, 1997).

A indução de apoptose tem sido um dos mecanismos mais testados para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer (MANSAT *et al.*, 1997; MICHAEL *et al.*, 1997; DEVIREDDY *et al.*, 2001; GELLER *et al.*, 2001; LEHMANN *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que peptídeos pertencentes à família Bcl-2, família de proteínas que desempenha um papel importante na regulação da morte celular por apoptose induzida por uma grande variedade de estímulos, são eficientes em promover apoptose (COLOMBEL *et al.*, 1993; KRAJEWSKI *et al.*, 1997). Esses

peptídeos consistem de regiões mínimas correspondentes ao domínio BH3, denominado domínio de morte ou domínio mínimo necessário para induzir apoptose. Peptídeos sintéticos compostos de sequências curtas (16 aminoácidos) que correspondem ao domínio BH3 das proteínas pro-apoptóticas Bax e Bak, têm provado ser potentes indutores de apoptose desencadeando a ativação de caspases e o processo que envolve a liberação de citocromo C e culmina em morte celular programada (CHITTENDEN; HARRINGTON *et al.*, 1995; ZHA *et al.*, 1996; COSULICH *et al.*, 1997a; SATTLER *et al.*, 1997; KELEKAR; THOMPSON, 1998a; MOREAU *et al.*, 2003).

Han e Chittenden demonstraram que regiões correspondentes ao domínio BH3 de proteínas pro-apoptóticas Bax (HAN *et al.*, 1996) e Bak (CHITTENDEN; HARRINGTON *et al.*, 1995) mostraram ser suficientes para induzir apoptose (ZHOU *et al.*, 2000). Embora tal abordagem tenha sido utilizada para induzir apoptose de células tumorais, sua aplicação terapêutica *in vivo* não seria factível pois esses peptídeos não possuem especificidade por células tumorais e também podem ser internalizados inclusive por células não tumorais (FINNEGAN *et al.*, 2001). Para que esses peptídeos tenham especificidade celular é necessário que estejam fundidos a sequências que permitam sua internalização (MYC *et al.*, 2007).

Assim, foi interesse principal do presente estudo usar as propriedades da endostatina e aumentar sua eficiência terapêutica, fundido a peptídeos indutores de apoptose que pertençam ao domínio BH3 das proteínas pro-apoptóticas Bax e Bak, obtendo-se proteínas de fusão compostas de dois domínios funcionais: o primeiro domínio composto pela endostatina, que apresenta especificidade pelas células endoteliais ativadas, utilizado para dirigir a proteína de fusão e permitir sua internalização pelas células ativadas, e um segundo domínio, composto de um peptídeo indutor de apoptose (Bax ou Bak) tóxico somente quando internalizado.

Modelos tridimensionais hipotéticos de três proteínas de fusão, gerados utilizando o programa MODELLER (SANCHEZ *et al.*, 2000), mostram proteínas, duas consistem da fusão de domínios pro-apoptóticos das proteínas Bax e Bak (16

aminoácidos) fundidos no C-terminal da endostatina e uma terceira na qual a α -hélice da endostatina foi trocada pela α -hélice do peptídeo Bax. Estas proteínas foram denominadas de endo-Bax, endo-Bak e EBE, respectivamente.

Análises de dinâmica molecular nos permitiram simular o comportamento e avaliar a estabilidade das proteínas de fusão em meio aquoso. Otimizações estruturais foram realizadas por métodos de minimização de energia disponibilizadas no pacote GROMACS ([www. GROMACS.org](http://www.GROMACS.org)) (DELANO, 2002).

Os modelos hipotéticos das proteínas de fusão endo-Bax e endo-Bak gerados por dinâmica molecular mostram aos peptídeos Bax e Bak como sequências sem conformação, esta característica já foi observada em outros estudos. Chittenden e colaboradores (1995) observaram que o peptídeo Bak não apresenta estrutura em solução, no entanto este peptídeo forma uma α -hélice quando complexada à proteína Bcl-_{XL}. O mesmo pode ser aplicado para o peptídeo Bax, que também muda de conformação expondo seu domínio de morte quando se liga à Bcl-_{XL} (SUZUKI *et al.*, 2000). Foram observadas diferenças entre os modelos de Endo-Bax e endo-Bak. Enquanto o primeiro apresenta uma estrutura semelhante à endostatina nativa, com formação de α -hélice, folhas- β e formação de pontes dissulfídicas, o segundo modelo teve sua estrutura grandemente afetada com o aumento de porcentagem de regiões sem conformação, diminuição de sua estrutura secundária e ausência de formação de pontes dissulfídicas. Estas mudanças poderiam afetar a estabilidade e manutenção de estrutura terciária, essenciais para desempenhar sua função fisiológica (MORBIDELLI *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2006; XU; TAN *et al.*, 2008).

Um estudo mais criterioso foi realizado para a criação da proteína mutante EBE na qual se substituiu a α -hélice, presente na endostatina, pela α -hélice do Bax. Estudos da estrutura da endostatina por cristalografia (HOHENESTER *et al.*, 1998) mostram que esta proteína forma uma ponte dissulfídica entre as cisteínas 33 e 173 conectando a α -hélice maior com uma folha- β central. Mutações, nas quais estas cisteínas foram substituídas por resíduos que não formam pontes dissulfídicas,

levam à perda de toda a estrutura terciária e da maioria de seus efeitos inibitórios como migração e proliferação em células endoteliais humanas (ZHOU *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2006). Sabendo da importância da formação de pontes dissulfídicas para manter a estabilidade e função da endostatina, foi realizada a troca de α -hélice da endostatina pela α -hélice do Bax de tal modo que fosse mantida a cisteína na posição 33 para que pudesse formar a ponte dissulfídica com a cisteína 173. A α -hélice do peptídeo Bax apresenta uma cisteína na posição 6. Na proteína mutante EBE esta cisteína foi colocada na mesma posição da cisteína 33 presente na endostatina e para que a α -hélice do Bax coubesse nessa posição foi necessário retirar 4 resíduos da α -hélice da endostatina. No modelo de EBE, gerado por dinâmica molecular, a α -hélice foi formada e a ponte dissulfídica foi mantida, o que nos permite inferir que em solução, após as trocas de α -hélices esta proteína apresentaria poucas mudanças se comparada com a endostatina nativa.

De acordo com Sasaki (SASAKI *et al.*, 1999) as argininas R25, R28, R54 e R140 da endostatina murina são importantes para a ligação à heparina e ao heparan sulfato, podendo apresentar papel importante para sua atividade antiangiogênica. Foi demonstrado que as argininas R69 e R70 também são importantes para a atividade antiangiogênica da endostatina. Olsson e cols. (OLSSON *et al.*, 2004) testaram um peptídeo contendo sequências da endostatina onde estão presentes estas argininas. Este peptídeo mostrou-se eficiente em inibir angiogênese e reduzir a vascularização tumoral. Todas essas argininas foram mantidas nas três proteínas de fusão. Cho e cols. (CHO *et al.*, 2004) fizeram uma endostatina recombinante mutante sem os primeiros 31 aminoácidos da endostatina inclusive até o 6º da 1ª α -hélice e também sem os últimos 44 aminoácidos. Este mutante apresentou atividade biológica maior tanto *in vitro*, quanto *in vivo* do que a endostatina nativa, indicando que os seis primeiros aminoácidos da α -hélice não são fundamentais para a atividade biológica da endostatina.

A hidrofobicidade é um fator muito importante na estabilidade de uma proteína e tem um papel relevante no seu enovelamento. Proteínas com uma conformação

nativa apresentam menor superfície de exposição ao solvente, requerendo menos energia livre para sua hidratação. Esta energia requerida vem das interações hidrofóbicas entre grupamentos apolares de aminoácidos, os quais no estado desenovelado estes grupamentos estão expostos ao solvente apresentado maior superfície de exposição ao solvente (TIMASHEFF, 2002).

A endostatina é uma proteína globular composta de 184 aminoácidos, dos quais, 42% são resíduos hidrofóbicos (HOHENESTER *et al.*, 1998). Proteínas globulares se caracterizam pela localização de resíduos hidrofóbicos no interior da proteína enquanto os resíduos polares ou carregados se situam na superfície da proteína. Diagramas de hidrofobicidade e superfície eletrostática das proteínas de fusão e da endostatina nativa foram gerados utilizando o programa Molegro (<http://www.molegro.com>). Este programa colore a proteína dependendo de sua característica hidrofóbica (verde), hidrofílica (laranja) e neutra (branca). Utilizando essa ferramenta percebe-se que a distribuição das regiões hidrofóbicas, hidrofílicas e neutras, nos modelos das proteínas de fusão (endo-Bax, endo-Bak e EBE) não mostraram modificações significativas se comparadas com a superfície da endostatina nativa o que nos dá um indicativo da similaridade entre a endostatina e as proteínas de fusão e também da estabilidade dessas proteínas híbridas.

Análises da superfície eletrostática após dinâmica molecular foram realizadas para verificar possíveis modificações na disposição de cargas após fusão dos peptídeos Bax ou Bak no C-terminal da endostatina ou após troca das α -hélices da endostatina pela do Bax. Endostatina apresenta um grande número de resíduos básicos, na sua superfície, particularmente argininas. 11 das 15 argininas se caracterizam por se agrupar e servir como sítio de ligação ao heparan sulfato. Além disso, sua disposição na superfície da proteína e seu alto grau de conservação sugerem uma importante função (HOHENESTER *et al.*, 1998; SASAKI *et al.*, 1998). Foi demonstrado que mutações nas argininas que se apresentam como sítios primários ou secundários de ligação à heparina, diminuíram a atividade antiangiogênica permitindo a sinalização de fatores de crescimento realizada pelo heparan sulfato, indicando sua importância para a atividade da endostatina

(OLSSON *et al.*, 2004). Poucas mudanças são observadas na disposição de cargas entre os modelos obtidos dos mutantes (endo-Bax, endo-Bak e EBE) quando comparados com a superfície eletrostática da endostatina. Esses dados nos permitem acreditar que a fusão de maneira geral não afetou o perfil eletrostático, mantendo as propriedades e características estruturais da endostatina nativa.

Construções de plasmídeos para expressão periplasmática das 4 proteínas foram realizadas. Fazendo uso de mutagênese sítio dirigida (KUNKEL, 1985), obtivemos os plasmídeos necessários para expressão das proteínas de fusão, endo-Bax, endo-Bak e EBE, confirmados pelo sequenciamento. Entretanto não se alcançou sucesso na obtenção de quantidades razoáveis das proteínas solúveis no periplasma. Portanto realizamos uma subclonagem dos genes, desta vez para a expressão citoplasmática como corpúsculos de inclusão utilizando o vetor pET28. Empregando este vetor, bons níveis de expressão da endostatina e das proteínas de fusão foram alcançados. A substituição do meio LB pelo meio enriquecido 2HKSII nos possibilitou obter altos níveis protéicos em um menor volume de meio de cultura otimizando emprego de reagentes e facilitando seu processamento. Este meio de cultura é geralmente utilizado em processos de fermentação com o intuito de alcançar maiores níveis de densidade celular (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Sabemos que em geral o correto enovelamento de uma proteína determina sua função. Além disso, uma correta formação de pontes dissulfídicas são essenciais para formação de uma adequada estrutura secundária e terciária (FU *et al.*, 2009). A renaturação da endostatina bioativa a partir de corpos de inclusão tem provado ser um desafio (YOU *et al.*, 1999; MARSHALL, 2002). A principal razão é que durante o processo de renaturação e após remoção de agentes desnaturantes ou detergentes, a endostatina agrega facilmente, obtendo-se somente 1 % de recuperação de proteína solúvel (O'REILLY *et al.*, 1997).

Realizamos várias tentativas de renaturação empregando metodologias descritas na literatura (YOU *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2001). Todas falharam na obtenção de proteínas com um correto enovelamento, pois geralmente estas

agregavam continuamente durante a diálise, purificação ou congelamento e descongelamento (dados não mostrados).

Estudos recentes têm mostrado que pressões hidrostáticas moderadas (30 000 psi) são uma alternativa atrativa às técnicas tradicionais de desnaturação e diluição, tanto em termos de rendimentos quanto de simplicidade no processo e potencial para aumentar rendimentos de proteínas com conformação nativa e atividade biológica a partir de agregados (GOROVITS; HOROWITZ, 1998; FOGUEL *et al.*, 1999; ST JOHN *et al.*, 1999; ST JOHN *et al.*, 2001; ST JOHN *et al.*, 2002; LEFEBVRE *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006).

Utilizando esta técnica, padronizamos parâmetros importantes para o enovelamento correto da endostatina. Como descrito na literatura a endostatina apresenta 4 cisteínas as quais formam duas pontes dissulfídicas importantes para a manutenção da sua estrutura (JOHN; FORSSMANN, 2001; MORBIDELLI *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2006). No entanto, sabemos que a alta pressão não quebra pontes dissulfídicas. Nesses casos, um par oxido-redutor pode ser incluído nas soluções de pressurização de modo a facilitar a quebra das ligações dissulfídicas inter-moleculares e formação de pontes dissulfídicas nativas (ST JOHN *et al.*, 2002;) Após a desagregação induzida por pressão, a formação e quebra de pontes dissulfídicas é necessária para permitir a formação de moléculas com as menores energias livres (ST JOHN *et al.*, 2002). Nossos dados confirmam que a concentração e proporção adequada do par redox (GSH/GSSG), mostraram-se importantes no processo de renaturação da endostatina utilizando altas pressões hidrostáticas.

Pressões hidrostáticas são capazes de desagregar proteínas, desfavorecendo interações hidrofóbicas e eletrostáticas inter moleculares. Em contraste, as pontes de hidrogênio não são sensíveis à alta pressão hidrostática devido à desprezível mudança de volume associada à quebra dessas pontes (RANDOLPH *et al.*, 2002). Agentes caotrópicos como o GdnHCl e ureia foram descritos como úteis para facilitar a quebra das pontes de hidrogênio entre proteínas nos agregados. Isto foi

evidenciado na renaturação da endostatina, onde a adição de concentrações não desnaturantes de GdnHCl (1-2M) foi imprescindível para favorecer a renaturação da endostatina sob pressão.

As proteínas de fusão apresentam as mesmas características que a endostatina, de tal forma que os mesmos parâmetros foram aplicados para sua renaturação. Demonstramos neste estudo que a aplicação de altas pressões hidrostáticas foi eficiente para a renaturação da endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE.

A aplicação de pressões altas (30 Kpsi), seguida da aplicação de pressões intermediárias decrescentes e mantidas durante tempos mais elevados se mostrou eficiente na renaturação de corpos de inclusão da "green fluorescent protein" (GFP), favorecendo o seu enovelamento (dados do nosso grupo ainda não publicados). Demonstramos que o enovelamento das proteínas pode ser favorecido em condições de pressão intermediária (entre 35 Kpsi e pressão atmosférica). Estes parâmetros devem ser otimizados para cada proteína, pois teoricamente a pressão a ser aplicada deve depender do volume de cada proteína em seu estado de enovelamento nativo.

Assim, verificamos a eficiência da aplicação de pressões intermediárias na renaturação da endostatina e das proteínas de fusão, confirmando que esta condição favorece a obtenção de maiores níveis de proteínas com estrutura nativa.

A microscopia eletrônica de varredura nos permitiu visualizar a ação da pressão sobre os agregados protéicos de endostatina. As micrografias mostram a diminuição da quantidade de agregados e mudança de morfologia dos mesmos. Essas imagens nos fornecem dados sobre os efeitos da aplicação de pressão nos agregados protéicos.

A endostatina apresenta alta afinidade pela heparina, esta característica esta relacionada com 11 argininas presentes na sua sequência e que são apontadas com resíduos que servem de sítios de ligação ao heparan sulfato (HOHENESTER *et al.*,

1998; SASAKI *et al.*, 1998). Nossos mutantes de endostatina mostraram grande afinidade pela heparina o que facilitou sua purificação e permitiu a obtenção de proteínas com alta pureza. No entanto, a proteína de fusão EBE, mostrou uma recuperação menor se comparada com as outras proteínas de fusão. Embora apresente na sua sequência as argininas essenciais para permitir sua ligação à heparina, a troca da α -hélice deve ter afetado sua estabilidade o que provavelmente leva à agregação e menor recuperação de proteína pura.

Técnicas espectroscópicas são muito empregadas para avaliar o correto enovelamento de proteínas. Dicroísmo circular é uma das técnicas empregadas para avaliar a estrutura secundária de proteínas. Diversos estudos se valeram desta ferramenta para avaliar o correto enovelamento e mudanças na estrutura secundária da endostatina como mutações em regiões importantes para a manutenção da estrutura da endostatina, mudanças de pH e a ação de agentes desnaturantes que permitam a perda da sua estrutura (LI *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2006).

Os perfis dos espectros de CD confirmaram que as proteínas de fusão (endo-Bax e endo-Bak) apresentam uma estrutura secundária bastante semelhante à da endostatina nativa (7% de α -hélice, 51% de folhas- β , 42% de estrutura desordenada (WU *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2005). Esses resultados não confirmam os dados obtidos pela modelagem molecular, nos quais o modelo da endo-Bak aparece com menor conformação. EBE não apresentou o mesmo perfil de CD provavelmente porque a troca de α -hélices afetou significativamente sua estrutura secundária.

A emissão de fluorescência do triptofano é um bom marcador para detectar estrutura terciária e mudanças ocasionadas quando condições desnaturantes são aplicadas (KAY; BALDWIN, 1996). A endostatina possui quatro triptofanos na sua estrutura (HOHENESTER *et al.*, 1998), o que torna a emissão de fluorescência intrínseca da endostatina, em comprimento de onda característico do triptofano, um bom marcador de estrutura terciária.

Zhou e cols (2005) reportaram que a emissão máxima do triptofano da endostatina nativa se apresenta em 320 nm. Estudos de emissão de fluorescência mostraram que as proteínas de fusão, endo-Bax e endo-Bak, apresentam um espectro de emissão idêntico ao da endostatina nativa. No entanto, a proteína EBE novamente mostrou uma estrutura diferente se comparada com a proteína nativa, provavelmente os triptofanos se encontrem mais expostos o que se pode evidenciar com uma emissão máxima em maior comprimento de onda, a 345 nm. Resultados semelhantes foram observados em mutantes que carecem da formação de pontes dissulfídicas apresentando uma máxima emissão em 340 nm perto do estado completamente desnaturado da endostatina (350 nm). Esta proteína se apresenta com estrutura terciária diferente das outras três.

A internalização da endostatina por células de origem endotelial, e a ausência deste efeito por linhagens de origem não endotelial, já foi amplamente comprovada por diferentes estudos. Dixelius (DIXELIUS *et al.*, 2000) observou a rápida internalização da endostatina pelas células endoteliais IBE na presença de 10 µg/mL da proteína. Zhou (2005) testou a habilidade da endostatina nativa e mutantes a serem internalizados pela linhagem endotelial HMECs, mostrando que mudanças que afetam a estabilidade da endostatina tem um efeito muito significativo na sua capacidade de internalização.

Nossos resultados mostram que tanto a endostatina como as proteínas de fusão endo-Bax, endo-bak e EBE foram internalizadas pela linhagem endotelial C-PAE o mesmo não acontecendo com linhagens não endoteliais (fibroblastos NHI 3T3), comprovado pelo ensaio de imunofluorescência e demonstrando a especificidade da endostatina e das proteínas de fusão por células de origem endotelial. É importante salientar que, apesar de ter sido demonstrada ausência de estrutura correta na proteína EBE, demonstramos que ela também foi internalizada pelas células endoteliais. Variações no tempo de internalização foram apreciadas para cada proteína, fator provavelmente ocasionado pelas mutações, que de algum modo afetaram o tempo de internalização mas não a capacidade de internalização.

Ensaio biológicos evidenciaram que a fusão da endostatina aos peptídeos pro-apoptóticos potencializou seu efeito antiproliferativo. Endo-bax e EBE mostraram maior atividade sobre células de origem endotelial (50 e 34,2 %, respectivamente) quando comparado com a endostatina (23,9 %). Apesar de as análises de dinâmica e modelagem da endo-Bak terem mostrado uma proteína com pouca estrutura e sem formação de pontes dissulficas, esta proteína apresentou estrutura secundária e terciária semelhante à endostatina nativa, comprovadas pela análise por dicroísmo circular e por fluorescência intrínseca do triptofano. Provavelmente a ação desta proteína se deva exclusivamente à ação apoptótica da endostatina e não do peptídeo de BH3 de Bak. Isto porque esta proteína não mostrou elevação do efeito antiproliferativo (23,9%) em relação à endostatina nativa.

A fusão dos peptídeos pró-apoptóticos potencializou a atividade apoptótica da endostatina. Nossos resultados confirmam esta afirmação. Ensaio de avaliação de apoptose por citometria de fluxo mostram que endo-Bax e EBE se apresentaram como melhores indutores de apoptose se comparados com a endostatina nativa (61, 63,9 e 35, %, respectivamente). Endo-Bak, novamente mostrou pouca diferença de atividade apoptótica se comparada com a atividade da endostatina (44,4 e 35,6 % respectivamente).

Apesar de o ensaio de ativação de caspase-3 não ter mostrado uma diferença que evidenciasse um maior efeito apoptótico das proteínas de fusão se comparadas com endostatina, este resultado é um indicativo que nossas proteínas são capazes de produzir a ativação da caspase-3 e desencadear os eventos celulares que culminam em apoptose.

Diferentes estratégias tem sido estudadas com o intuito de compreender melhor a atividade antiangiogênica da endostatina e definir as sequências que são importantes e suficientes para sua atividade, relacionando sua estrutura à atividade biológica. Substituições de argininas importantes atenuam atividade antiangiogênica

da endostatina (CHO *et al.*, 2004; OLSSON *et al.*, 2004). Deleções do C-terminal e N-terminal da endostatina se mostraram que estas sequências não são essenciais para a atividade da endostatina (YAMAGUCHI *et al.*, 1999; CHO *et al.*, 2004).

Existem poucos trabalhos que fazem uso da interessante propriedade da endostatina que é a especificidade por células endoteliais para sua associação a outras sequências que possam potencializar sua atividade.

Yang e colaboradores (OU-YANG *et al.*, 2006) produziram uma proteína de fusão composta da enzima citosina deaminase fundida à endostatina. Esta proteína de fusão apresentou maior atividade pela adição de um substrato específico que promove a ação tóxica da enzima citosina deaminase. Este mutante mostrou-se eficiente em inibir a proliferação de células endoteliais pela indução de apoptose.

Beck e cols (BECK *et al.*, 2003) combinaram a ação de um antagonista da prolactina (G129R), que possui a habilidade de inibir a proliferação de células de câncer de pulmão humano, com a atividade antiangiogênica da endostatina obtendo a proteína de fusão G129-endostatina. Esta proteína exibiu um maior efeito inibitório sobre as células de origem endotelial HUVEC. Além disso, a aplicação da G129-endostatina aumentou a meia vida de camundongos apresentando tumores (câncer de pulmão). Esta estratégia se mostrou eficiente para este tipo de linhagem tumoral.

Um estudo realizado por Ellerby (ELLERBY *et al.*, 1999) mostrou que peptídeos sintéticos compostos por domínios que conferem afinidade por células endoteliais fundidos com peptídeos capazes de induzir morte celular foram internalizados e se mostraram potentes indutores de apoptose.

No presente estudo, combinamos a ação da endostatina: internalização e efeito antiproliferativo sobre as células endoteliais, com atividade apoptótica do domínio BH3 das proteínas Bax e Bak obtendo proteínas de fusão com um duplo efeito terapêutico sobre células de origem endotelial potencializado. Nossos

resultados comprovam que esta fusão incrementou o efeito apoptótico da endostatina.

Outros estudos precisam ser realizados para desvendar o mecanismo exato pelo qual as proteínas de fusão exercem maior atividade apoptótica. É possível que o incremento dos níveis do peptídeo do Bax no interior da célula após internalização estimularia a sinalização de Bax e outras proteínas apoptóticas intracelulares, levando à dimerização, oligomerização e mudanças de conformação para desencadear apoptose, tudo isto associado à redução de proteínas anti-apoptótica ocasionada pela ação da endostatina (DHANABAL; RAMCHANDRAN *et al.*, 1999), (SHICHIRI; HIRATA, 2001)

Moreau (2003) testou a atividade do peptídeo que utilizamos em nosso estudo (16 resíduos do domínio BH3 do Bax) comprovando que esta molécula é capaz de ocasionar apoptose somente na presença de Bax intracelular. Sabemos que Bax na sua conformação nativa é pobremente direcionado para a mitocôndria e só adquire a habilidade de interagir com esta organela em resposta a um estímulo (RUFFOLO *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2001; POLSTER *et al.*, 2001). Assim, o peptídeo de Bax provavelmente atua como sensibilizador levando à mudança na conformação de Bax intracelular, o qual expõe seu domínio de morte o que permite sua homodimerização e leva à inibição de proteínas anti-apoptóticas como a BCL-X_L, ocasionando à desestabilização da membrana mitocôndrial permitindo a liberação de citocromo-c e desencadeando apoptose.

Diferentes estudos, que utilizam sequências que geralmente não apresentam estrutura, tem comprovado que fragmentos de 10-27 aminoácidos correspondentes a regiões importantes para atividade da endostatina, apresentam-se suficientes para manter sua atividade (WICKSTROM *et al.*, 2004; BECKER *et al.*, 2006). Embora EBE não apresente todas as características estruturais da endostatina nativa, foi observado no presente estudo que ainda mantém as propriedades que lhe conferem bioatividade sendo potencializada pela associação ao peptídeo do Bax, demonstrado pelos ensaios de internalização, viabilidade celular e apoptose celular.

Isto pode ser explicado provavelmente pela manutenção de regiões importantes para sua atividade.

Nossos resultados demonstram que a fusão de sequências indutoras de morte celular à endostatina, potencializa sua ação antiangiogênica e é uma estratégia muito promissora para o tratamento do câncer. Endostatina pode ser utilizada para direcionar diferentes agentes indutores de apoptose, devido a sua especificidade por células endoteliais, e ter um maior efeito antiangiogênico. Isto é particularmente interessante já que não seriam necessários altos níveis de endostatina para a obter de regressão tumoral, tornando viável sua utilização em terapias.

6. CONCLUSÕES

As proteínas de fusão; endostatina, endo-Bax, endo-Bak e EBE foram obtidas com sucesso após renaturação utilizando altas pressões hidrostáticas, suas identidades foram confirmadas por Western blot. O correto enovelamento foi confirmado por CD e Fluorescência. Endo-Bax e EBE apresentaram maior atividade apoptótica sobre as células endoteliais quando comparado com o efeito do tratamento de endostatina selvagem, evidenciado pelo maior grau de apoptose e ativação da caspase-3 após sua internalização pela linhagem endotelial C-PAE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, A.;HAHNFELDT, P.;MAERCKER, C.;GRONE, H. J.;DEBUS, J.;ANSORGE, W.;FOLKMAN, J.;HLATKY, L.;HUBER, P. E. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Molecular Cell*, v.13, n.5, p.649-663, 2004.

ABDOLLAHI, A.;HLATKY, L.;HUBER, P. E. Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist Updat*, v.8, n.1-2, p.59-74, 2005.

ADAMS, J. M.;CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, v.281, n.5381, p.1322-6, 1998.

BECK, P.;WYSOWSKI, D. K.;DOWNEY, W.;BUTLER-JONES, D. Statin use and the risk of breast cancer. *J Clin Epidemiol*, v.56, n.3, p.280-5, 2003.

BECKER, C. M.;SAMPSON, D. A.;SHORT, S. M.;JAVAHERIAN, K.;FOLKMAN, J.;D'AMATO, R. J. Short synthetic endostatin peptides inhibit endothelial migration in vitro and endometriosis in a mouse model. *Fertil Steril*, v.85, n.1, p.71-7, 2006.

BERGERS, G.;BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, v.3, n.6, p.401-10, 2003.

BERGERS, G.;JAVAHERIAN, K.;LO, K. M.;FOLKMAN, J.;HANAHAN, D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*, v.284, n.5415, p.808-12, 1999.

BERMAN, H. M.;WESTBROOK, J.;FENG, Z.;GILLILAND, G.;BHAT, T. N.;WEISSIG, H.;SHINDYALOV, I. N.;BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v.28, n.1, p.235-242, 2000.

- BISACCHI, D.;BENELLI, R.;VANZETTO, C.;FERRARI, N.;TOSETTI, F.;ALBINI, A. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. **Cancer Detect Prev**, v.27, n.3, p.229-38, 2003.
- BOEHM, T.;FOLKMAN, J.;BROWDER, T.;OREILLY, M. S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. **Nature**, v.390, n.6658, p.404-407, 1997.
- BOOCOCK, C. A.;CHARNOCK-JONES, D. S.;SHARKEY, A. M.;MCLAREN, J.;BARKER, P. J.;WRIGHT, K. A.;TWENTYMAN, P. R.;SMITH, S. K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v.87, n.7, p.506-16, 1995.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v.39, n.11, p.615-647, 2003.
- BOURNE, P.E.; WEISSIG, H. **Structural Bioinformatics** Wiley-Liss; p. 509-524, 2003.
- BOWIE, J. U.;LUTHY, R.;EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v.253, n.5016, p.164-70, 1991.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** , v 72: p.248-254. 1976.
- BUDIHardjo, I.;OLIVER, H.;LUTTER, M.;LUO, X.;WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.15, p.269-90, 1999.
- CARMEliET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med**, v.6, n.4, p.389-95, 2000.

- CELIK, I.;SURUCU, O.;DIETZ, C.;HEYMACH, J. V.;FORCE, J.;HOSCHELE, I.;BECKER, C. M.;FOLKMAN, J.;KISKER, O. Therapeutic efficacy of endostatin exhibits a biphasic dose-response curve. **Cancer Res**, v.65, n.23, p.11044-50, 2005.
- CHAN, S. L.;YU, V. C. Proteins of the Bcl-2 family in apoptosis signalling: From mechanistic insights to therapeutic opportunities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.31, n.3, p.119-128, 2004.
- CHAO, D. T.;KORSMEYER, S. J. BCL-2 FAMILY: Regulators of cell death. **Annual Review of Immunology**, v.16, p.395-419, 1998.
- CHENG, E. H.;WEI, M. C.;WEILER, S.;FLAVELL, R. A.;MAK, T. W.;LINDSTEN, T.;KORSMEYER, S. J. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. **Mol Cell**, v.8, n.3, p.705-11, 2001.
- CHITTENDEN, T.;FLEMINGTON, C.;HOUGHTON, A. B.;EBB, R. G.;GALLO, G. J.;ELANGO VAN, B.;CHINNADURAI, G.;LUTZ, R. J. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. **EMBO J**, v.14, n.22, p.5589-96, 1995.
- CHITTENDEN, T.;HARRINGTON, E. A.;O'CONNOR, R.;FLEMINGTON, C.;LUTZ, R. J.;EVAN, G. I.;GUILD, B. C. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. **Nature**, v.374, n.6524, p.733-6, 1995.
- CHO, H.;KIM, W. J.;LEE, Y. M.;KIM, Y. M.;KWON, Y. G.;PARK, Y. S.;CHOI, E. Y.;KIM, K. W. N-/C-terminal deleted mutant of human endostatin efficiently acts as an anti-angiogenic and anti-tumorigenic agent. **Oncol Rep**, v.11, n.1, p.191-5, 2004a.
- COLOMBEL, M.;SYMMANS, F.;GIL, S.;O'TOOLE, K. M.;CHOPIN, D.;BENSON, M.;OLSSON, C. A.;KORSMEYER, S.;BUTTYAN, R. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. **Am J Pathol**, v.143, n.2, p.390-400, 1993.

- CORY, A. H.;OWEN, T. C.;BARLTROP, J. A.;CORY, J. G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Commun**, v.3, n.7, p.207-12, 1991.
- COSULICH, S. C.;WORRALL, V.;HEDGE, P. J.;GREEN, S.;CLARKE, P. R. Regulation of apoptosis by BH3 domains in a cell-free system. **Curr Biol**, v.7, n.12, p.913-20, 1997a.
- CRISTOFANILLI, M.;CHARNSANGAVEJ, C.;HORTOBAGYI, G. N. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. **Nat Rev Drug Discov**, v.1, n.6, p.415-26, 2002.
- DANIEL, P. T.;WIEDER, T.;STURM, I.;SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v.15, n.7, p.1022-1032, 2001.
- DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA., 2002.
- DE OLIVEIRA, J. E.;SOARES, C. R.;PERONI, C. N.;GIMBO, E.;CAMARGO, I. M.;MORGANTI, L.;BELLINI, M. H.;AFFONSO, R.;ARKATEN, R. R.;BARTOLINI, P.;RIBELA, M. T. High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in Escherichia coli periplasmic space. **J Chromatogr A**, v.852, n.2, p.441-50, 1999.
- DESAGHER, S.;MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol**, v.10, n.9, p.369-77, 2000.
- DEVIREDDY, L. R.;TEODORO, J. G.;RICHARD, F. A.;GREEN, M. R. Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. **Science**, v.293, n.5531, p.829-34, 2001.

- DHANABAL, M.;RAMCHANDRAN, R.;WATERMAN, M. J.;LU, H.;KNEBELMANN, B.;SEGAL, M.;SUKHATME, V. P. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*, v.274, n.17, p.11721-6, 1999.
- DHANABAL, M.;VOLK, R.;RAMCHANDRAN, R.;SIMONS, M.;SUKHATME, V. P. Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.258, n.2, p.345-352, 1999.
- DIXELIUS, J.;LARSSON, H.;SASAKI, T.;HOLMQVIST, K.;LU, L.;ENGSTROM, A.;TIMPL, R.;WELSH, M.;CLAESSON-WELSH, L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood*, v.95, n.11, p.3403-11, 2000.
- DVORAK, H. F.;BROWN, L. F.;DETMAR, M.;DVORAK, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, v.146, n.5, p.1029-39, 1995.
- EDER, J. P., JR.;SUPKO, J. G.;CLARK, J. W.;PUCHALSKI, T. A.;GARCIA-CARBONERO, R.;RYAN, D. P.;SHULMAN, L. N.;PROPER, J.;KIRVAN, M.;RATTNER, B.;CONNORS, S.;KEOGAN, M. T.;JANICEK, M. J.;FOGLER, W. E.;SCHNIPPER, L.;KINCHLA, N.;SIDOR, C.;PHILLIPS, E.;FOLKMAN, J.;KUFEL, D. W. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J Clin Oncol*, v.20, n.18, p.3772-84, 2002.
- ELLERBY, H. M.;ARAP, W.;ELLERBY, L. M.;KAIN, R.;ANDRUSIAK, R.;RIO, G. D.;KRAJEWSKI, S.;LOMBARDO, C. R.;RAO, R.;RUOSLAHTI, E.;BREDESEN, D. E.;PASQUALINI, R. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med*, v.5, n.9, p.1032-8, 1999.
- FENNELL, D. A.;CHACKO, A. Exploiting BH3 only protein function for effective cancer therapy. *Front Biosci*, v.13, p.6682-92, 2008.

FERNANDEZ, Y.;GU, B.;MARTINEZ, A.;TORREGROSA, A.;SIERRA, A. Inhibition of apoptosis in human breast cancer cells: role in tumor progression to the metastatic state. *Int J Cancer*, v.101, n.4, p.317-26, 2002.

FINNEGAN, N. M.;CURTIN, J. F.;PREVOST, G.;MORGAN, B.;COTTER, T. G. Induction of apoptosis in prostate carcinoma cells by BH3 peptides which inhibit Bak/Bcl-2 interactions. *British Journal of Cancer*, v.85, n.1, p.115-121, 2001.

FLETCHER, J. I.;HUANG, D. C. Controlling the cell death mediators Bax and Bak: puzzles and conundrums. *Cell Cycle*, v.7, n.1, p.39-44, 2008.

FOGUEL, D.;ROBINSON, C. R.;DE SOUSA, P. C., JR.;SILVA, J. L.;ROBINSON, A. S. Hydrostatic pressure rescues native protein from aggregates. *Biotechnol Bioeng*, v.63, n.5, p.552-8, 1999.

FOLKMAN, J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, v.333, n.26, p.1757-63, 1995.

FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, v.3, n.7, p.643-51, 2003.

FOLKMAN, J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS*, v.112, n.7-8, p.496-507, 2004.

FOLKMAN, J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*, v.312, n.5, p.594-607, 2006.

FU, Y.;TANG, H.;HUANG, Y.;SONG, N.;LUO, Y. Unraveling the mysteries of endostatin. *IUBMB Life*, v.61, n.6, p.613-26, 2009.

GASPARINI, G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs*, v.58, n.1, p.17-38, 1999.

GELLER, H. M.;CHENG, K. Y.;GOLDSMITH, N. K.;ROMERO, A. A.;ZHANG, A. L.;MORRIS, E. J.;GRANDISON, L. Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside. **J Neurochem**, v.78, n.2, p.265-75, 2001.

GOOD, D. J.;POLVERINI, P. J.;RASTINEJAD, F.;LE BEAU, M. M.;LEMONS, R. S.;FRAZIER, W. A.;BOUCK, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.17, p.6624-8, 1990.

GOROVITS, B. M.;HOROWITZ, P. M. High hydrostatic pressure can reverse aggregation of protein folding intermediates and facilitate acquisition of native structure. **Biochemistry**, v.37, n.17, p.6132-5, 1998.

GRIVICICH, I; REGNER, A.;BRONDANI DAROCHA, A. Morte celular por apoptose.

Revista Brasileira de Cancerologia. v53(3): 335-343, 2007.

GROSS, A.;MCDONNELL, J. M.;KORSMEYER, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, v.13, n.15, p.1899-1911, 1999.

GUTHEIL, J. C.;CAMPBELL, T. N.;PIERCE, P. R.;WATKINS, J. D.;HUSE, W. D.;BODKIN, D. J.;CHERESH, D. A. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3. **Clin Cancer Res**, v.6, n.8, p.3056-61, 2000.

HAN, J.;SABBATINI, P.;PEREZ, D.;RAO, L.;MODHA, D.;WHITE, E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. **Genes Dev**, v.10, n.4, p.461-77, 1996.

HANAHAHAN, D.;FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v.86, n.3, p.353-64, 1996.

- HANAI, J.;DHANABAL, M.;KARUMANCHI, S. A.;ALBANESE, C.;WATERMAN, M.;CHAN, B.;RAMCHANDRAN, R.;PESTELL, R.;SUKHATME, V. P. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem*, v.277, n.19, p.16464-9, 2002.
- HARADA, H.;GRANT, S. Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol*, v.7, n.2, p.117-38, 2003.
- HE, G. A.;XUE, G.;XIAO, L.;WU, J. X.;XU, B. L.;HUANG, J. L.;LIANG, Z. H.;XIAO, X.;HUANG, B. J.;LIU, R. Y.;HUANG, W. L. Dynamic distribution and expression in vivo of human endostatin gene delivered by adenoviral vector. *Life Sciences*, v.77, n.12, p.1331-1340, 2005.
- HE, Y.;ZHOU, H.;TANG, H.;LUO, Y. Deficiency of disulfide bonds facilitating fibrillogenesis of endostatin. *J Biol Chem*, v.281, n.2, p.1048-57, 2006.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v.407, n.6805, p.770-6, 2000.
- HERBST, R. S., HESS, K. R., TRAN, H. T., TSENG, J. E., MULLANI, N. A., CHARNSANGAVEJ, C., MADDEN, T., DAVIS, D. W., MCCONKEY, D. J., O'REILLY, M. S., ELLIS, L. M., PLUDA, J., HONG, W. K. and ABBRUZZESE, J. L. Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, v.20, n.18, p.3792-3803, 2002b.
- HOHENESTER, E.;SASAKI, T.;OLSEN, B. R.;TIMPL, R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *EMBO J*, v.17, n.6, p.1656-64, 1998.
- HOLINGER, E. P.;CHITTENDEN, T.;LUTZ, R. J. Bcl-2 peptides antagonize Bcl-2(L) function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.19, p.13298-13304, 1999.

- HORI, A.;SASADA, R.;MATSUTANI, E.;NAITO, K.;SAKURA, Y.;FUJITA, T.;KOZAI, Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. **Cancer Res**, v.51, n.22, p.6180-4, 1991.
- HU, B.;ZHU, H. W.;ZHU, L. P.;LI, C.;RONG, Z. G.;XU, J. M.;WU, Z. W.;WANG, J. J.;XU, G. X. Bioactivity, pharmacokinetics, and immunogenicity assays in preclinical and clinical trials for recombinant human endostatin. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.29, n.11, p.1357-1369, 2008.
- HUANG, D. C. S.;STRASSER, A. BH3-Only proteins - Essential initiators of apoptotic cell death. **Cell**, v.103, n.6, p.839-842, 2000.
- HUANG, X.;WONG, M. K.;ZHAO, Q.;ZHU, Z.;WANG, K. Z.;HUANG, N.;YE, C.;GORELIK, E.;LI, M. Soluble recombinant endostatin purified from Escherichia coli: antiangiogenic activity and antitumor effect. **Cancer Res**, v.61, n.2, p.478-81, 2001.
- JAVAHERIAN, K.;PARK, S. Y.;PICKL, W. F.;LAMONTAGNE, K. R.;SJIN, R. T.;GILLIES, S.;LO, K. M. Laminin modulates morphogenic properties of the collagen XVIII endostatin domain. **J Biol Chem**, v.277, n.47, p.45211-8, 2002.
- JENSEN, E. B.;CARLSEN, S. Production of recombinant human growth hormone in Escherichia coli: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. **Biotechnol Bioeng**, v.36, n.1, p.1-11, 1990.
- JOHN, H.;FORSSMANN, W. G. Determination of the disulfide bond pattern of the endogenous and recombinant angiogenesis inhibitor endostatin by mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v.15, n.14, p.1222-8, 2001.
- JOHN, H.;PREISSNER, K. T.;FORSSMANN, W. G.;STANDKER, L. Novel glycosylated forms of human plasma endostatin and circulating endostatin-related fragments of collagen XV. **Biochemistry**, v.38, n.32, p.10217-24, 1999.

KANDEL, J.;BOSSY-WETZEL, E.;RADVANYI, F.;KLAGSBRUN, M.;FOLKMAN, J.;HANAHAN, D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*, v.66, n.6, p.1095-104, 1991.

KAY, M. S.;BALDWIN, R. L. Packing interactions in the apomyoglobin folding intermediate. *Nat Struct Biol*, v.3, n.5, p.439-45, 1996.

KELEKAR, A.;THOMPSON, C. B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*, v.8, n.8, p.324-30, 1998.

KERBEL, R.;FOLKMAN, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*, v.2, n.10, p.727-39, 2002.

KIM, K. J.;LI, B.;WINER, J.;ARMANINI, M.;GILLETT, N.;PHILLIPS, H. S.;FERRARA, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, v.362, n.6423, p.841-4, 1993.

KIM, Y. M.;HWANG, S.;PYUN, B. J.;KIM, T. Y.;LEE, S. T.;GHO, Y. S.;KWON, Y. G. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Fik-1. *J Biol Chem*, v.277, n.31, p.27872-9, 2002.

KIM, Y. S.;RANDOLPH, T. W.;SEEFELDT, M. B.;CARPENTER, J. F. High-pressure studies on protein aggregates and amyloid fibrils. *Methods Enzymol*, v.413, p.237-53, 2006.

KISKER, O.;BECKER, C. M.;PROX, D.;FANNON, M.;D'AMATO, R.;FLYNN, E.;FOGLER, W. E.;SIM, B. K. L.;ALLRED, E. N.;PIRIE-SHEPHERD, S. R.;FOLKMAN, J. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Research*, v.61, n.20, p.7669-7674, 2001.

KONG, H. L.;CRYSTAL, R. G. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis. *J Natl Cancer Inst*, v.90, n.4, p.273-86, 1998.

KRAJEWSKI, S.;THOR, A. D.;EDGERTON, S. M.;MOORE, D. H., 2ND;KRAJEWSKA, M.;REED, J. C. Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53-immunopositive breast cancers. *Clin Cancer Res*, v.3, n.2, p.199-208, 1997.

KULKE, M. H.;BERGSLAND, E. K.;RYAN, D. P.;ENZINGER, P. C.;LYNCH, T. J.;ZHU, A. X.;MEYERHARDT, J. A.;HEYMACH, J. V.;FOGLER, W. E.;SIDOR, C.;MICHELINI, A.;KINSELLA, K.;VENOOK, A. P.;FUCHS, C. S. Phase II study of recombinant human endostatin in patients with advanced neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol*, v.24, n.22, p.3555-61, 2006.

KUNKEL, T. A. Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis without Phenotypic Selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.82, n.2, p.488-492, 1985.

KWON, M.;LIBUTTI, S. K. Advances in understanding angiogenesis through molecular studies. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v.64, n.1, p.26-32, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.

LAKOWICZ, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York, 341-379, 1983.

LASKOWSKI, R.A.; *et al.*, PROCHECK - A program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.* v.26, p.283-291, 1993.

LA VIEIRA, H.;BOYA, P.;COHEN, I.;EL HAMEL, C.;HAOUZI, D.;DRUILLENEC, S.;BELZACQ, A. S.;BRENNER, C.;ROQUES, B.;KROEMER, G. Cell permeable BH3-peptides overcome the cytoprotective effect of Bcl-2 and Bcl-X-L. *Oncogene*, v.21, n.13, p.1963-1977, 2002.

LEFEBVRE, B. G.;GAGE, M. J.;ROBINSON, A. S. Maximizing recovery of native protein from aggregates by optimizing pressure treatment. *Biotechnol Prog*, v.20, n.2, p.623-9, 2004.

LEHMANN, S.;BENGTZEN, S.;PAUL, A.;CHRISTENSSON, B.;PAUL, C. Effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on leukemic cells from patients with non-M3 acute myelogenous leukemia: studies of cytotoxicity, apoptosis and the pattern of resistance. *Eur J Haematol*, v.66, n.6, p.357-64, 2001.

LI, B.;WU, X.;ZHOU, H.;CHEN, Q.;LUO, Y. Acid-induced unfolding mechanism of recombinant human endostatin. *Biochemistry*, v.43, n.9, p.2550-7, 2004.

LI, R.;BOEHM, A. L.;MIRANDA, M. B.;SHANGARY, S.;GRANDIS, J. R.;JOHNSON, D. E. Targeting antiapoptotic Bcl-2 family members with cell-permeable BH3 peptides induces apoptosis signaling and death in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Neoplasia*, v.9, n.10, p.801-11, 2007.

LI, X. P.;LI, C. Y.;LI, X.;DING, Y.;CHAN, L. L.;YANG, P. H.;LI, G.;LIU, X.;LIN, J. S.;WANG, J.;HE, M.;KUNG, H. F.;LIN, M. C.;PENG, Y. Inhibition of human nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis in mice by adenovirus-associated virus-mediated expression of human endostatin. *Mol Cancer Ther*, v.5, n.5, p.1290-8, 2006.

LUTHY, R.;BOWIE, J. U.;EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, v.356, n.6364, p.83-5, 1992.

MACDONALD, N. J.;SHIVERS, W. Y.;NARUM, D. L.;PLUM, S. M.;WINGARD, J. N.;FUHRMANN, S. R.;LIANG, H.;HOLLAND-LINN, J.;CHEN, D. H. T.;SIM, B. K. L. Endostatin binds tropomyosin - A potential modulator of the antitumor activity of endostatin. *Journal of Biological Chemistry*, v.276, n.27, p.25190-25196, 2001.

MANSAT, V.;BETTAIEB, A.;LEVADE, T.;LAURENT, G.;JAFFREZOU, J. P. Serine protease inhibitors block neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin. *FASEB J*, v.11, n.8, p.695-702, 1997.

MARGOLIN, K.;GORDON, M. S.;HOLMGREN, E.;GAUDREAU, J.;NOVOTNY, W.;FYFE, G.;ADELMAN, D.;STALTER, S.;BREED, J. Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data. *J Clin Oncol*, v.19, n.3, p.851-6, 2001.

MARSHALL, E. Cancer therapy. Setbacks for endostatin. *Science*, v.295, n.5563, p.2198-9, 2002.

MICHAEL, J. M.;LAVIN, M. F.;WATTERS, D. J. Resistance to radiation-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells is associated with defective ceramide signaling. *Cancer Res*, v.57, n.16, p.3600-5, 1997.

MORBIDELLI, L.;DONNINI, S.;FILIPPI, S.;MESSORI, L.;PICCIOLI, F.;ORIOLI, P.;SAVA, G.;ZICHE, M. Antiangiogenic properties of selected ruthenium(III) complexes that are nitric oxide scavengers. *Br J Cancer*, v.88, n.9, p.1484-91, 2003.

MOREAU, C.;CARTRON, P. F.;HUNT, A.;MEFLAH, K.;GREEN, D. R.;EVAN, G.;VALLETTE, F. M.;JUIN, P. Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J Biol Chem*, v.278, n.21, p.19426-35, 2003.

MORRIS, A. L.;MACARTHUR, M. W.;HUTCHINSON, E. G.;THORNTON, J. M. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, v.12, n.4, p.345-64, 1992.

MYC, A.;PATRI, A. K.;BAKER, J. R., JR. Dendrimer-based BH3 conjugate that targets human carcinoma cells. *Biomacromolecules*, v.8, n.10, p.2986-9, 2007.

NAISMITH, J. H.;SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*, v.23, n.2, p.74-9, 1998.

NGUYEN, M.;WATANABE, H.;BUDSON, A. E.;RICHIE, J. P.;HAYES, D. F.;FOLKMAN, J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth

factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst*, v.86, n.5, p.356-61, 1994.

NYBERG, P.;XIE, L.;KALLURI, R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Research*, v.65, n.10, p.3967-3979, 2005.

O'REILLY, M. S.;BOEHM, T.;SHING, Y.;FUKAI, N.;VASIOS, G.;LANE, W. S.;FLYNN, E.;BIRKHEAD, J. R.;OLSEN, B. R.;FOLKMAN, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, v.88, n.2, p.277-85, 1997.

O'REILLY, M. S.;HOLMGREN, L.;SHING, Y.;CHEN, C.;ROSENTHAL, R. A.;MOSES, M.;LANE, W. S.;CAO, Y.;SAGE, E. H.;FOLKMAN, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, v.79, n.2, p.315-28, 1994.

OLSSON, A. K.;JOHANSSON, I.;AKERUD, H.;EINARSSON, B.;CHRISTOFFERSON, R.;SASAKI, T.;TIMPL, R.;CLAESSON-WELSH, L. The minimal active domain of endostatin is a heparin-binding motif that mediates inhibition of tumor vascularization. *Cancer Res*, v.64, n.24, p.9012-7, 2004.

OU-YANG, F.;LAN, K. L.;CHEN, C. T.;LIU, J. C.;WENG, C. L.;CHOU, C. K.;XIE, X.;HUNG, J. Y.;WEI, Y.;HORTOBAGYI, G. N.;HUNG, M. C. Endostatin-cytosine deaminase fusion protein suppresses tumor growth by targeting neovascular endothelial cells. *Cancer Res*, v.66, n.1, p.378-84, 2006.

PELTON, J. T.;MCLEAN, L. R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical Biochemistry*, v.277, n.2, p.167-176, 2000.

PEPPER, M. S.;FERRARA, N.;ORCI, L.;MONTESANO, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, v.189, n.2, p.824-31, 1992.

- PERLETTI, G.;CONCARI, P.;GIARDINI, R.;MARRAS, E.;PICCININI, F.;FOLKMAN, J.;CHEN, L. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. **Cancer Res**, v.60, n.7, p.1793-6, 2000.
- PETROS, A. M.;OLEJNICZAK, E. T.;FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v.1644, n.2-3, p.83-94, 2004.
- POLSTER, B. M., KINNALLY, K. W. and FISKUM, G. BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.41, p.37887-37894, 2001.
- RANDOLPH, T. W.;SEEFELDT, M.;CARPENTER, J. F. High hydrostatic pressure as a tool to study protein aggregation and amyloidosis. **Biochim Biophys Acta**, v.1595, n.1-2, p.224-34, 2002.
- REED, J. C. Mechanisms of apoptosis. **Am J Pathol**, v.157, n.5, p.1415-30, 2000.
- REN, B.;HOTI, N.;RABASSEDA, X.;WANG, Y. Z.;WU, M. The antiangiogenic and therapeutic implications of endostatin. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v.25, n.3, p.215-24, 2003.
- RIBATTI, D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. **Leuk Res**, v.33, n.5, p.638-44, 2009.
- RIBATTI, D.;VACCA, A.;PRESTA, M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. **Gen Pharmacol**, v.35, n.5, p.227-31, 2000.
- RUFFOLO, S. C.;BRECKENRIDGE, D. G.;NGUYEN, M.;GOPING, I. S.;GROSS, A.;KORSMEYER, S. J.;LI, H.;YUAN, J.;SHORE, G. C. BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria. **Cell Death Differ**, v.7, n.11, p.1101-8, 2000.

- SALI, A.;BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, v.234, n.3, p.779-815, 1993.
- SANCHEZ, R.;PIEPER, U.;MELO, F.;ESWAR, N.;MARTI-RENOM, M. A.;MADHUSUDHAN, M. S.;MIRKOVIC, N.;SALI, A. Protein structure modeling for structural genomics. *Nat Struct Biol*, v.7 Suppl, p.986-90, 2000.
- SANCHEZ, R.;SALI, A. Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. *Proteins-Structure Function and Genetics*, p.50-58, 1997.
- SASAKI, T.;FUKAI, N.;MANN, K.;GOHRING, W.;OLSEN, B. R.;TIMPL, R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J*, v.17, n.15, p.4249-56, 1998.
- SASAKI, T.;LARSSON, H.;KREUGER, J.;SALMIVIRTA, M.;CLAESSON-WELSH, L.;LINDAHL, U.;HOHENESTER, E.;TIMPL, R. Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J*, v.18, n.22, p.6240-8, 1999.
- SATTLER, M.;LIANG, H.;NETTESHEIM, D.;MEADOWS, R. P.;HARLAN, J. E.;EBERSTADT, M.;YOON, H. S.;SHUKER, S. B.;CHANG, B. S.;MINN, A. J.;THOMPSON, C. B.;FESIK, S. W. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, v.275, n.5302, p.983-6, 1997.
- SAUTER, B. V.;MARTINET, O.;ZHANG, W. J.;MANDELI, J.;WOO, S. L. C. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, n.9, p.4802-4807, 2000.
- SCORRANO, L.;KORSMEYER, S. J. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*, v.304, n.3, p.437-44, 2003.

SHANGARY, S.;JOHNSON, D. E. Peptides derived from BH3 domains of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x(L) and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death. *Biochemistry*, v.41, n.30, p.9485-95, 2002.

SHI, H.;HUANG, Y.;ZHOU, H.;SONG, X.;YUAN, S.;FU, Y.;LUO, Y. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. *Blood*, v.110, n.8, p.2899-906, 2007.

SHICHIRI, M.;HIRATA, Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *Faseb Journal*, v.15, n.6, p.1044-1053, 2001.

SHWEIKI, D.;ITIN, A.;SOFFER, D.;KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, v.359, n.6398, p.843-5, 1992.

SILVA, J. L.;WEBER, G. Pressure stability of proteins. *Annu Rev Phys Chem*, v.44, p.89-113, 1993.

SIM, B. K.;MACDONALD, N. J.;GUBISH, E. R. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev*, v.19, n.1-2, p.181-90, 2000.

SRIDHAR, S. S.;SHEPHERD, F. A. Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer*, v.42 Suppl 1, p.S81-91, 2003.

ST JOHN, R. J.;CARPENTER, J. F.;BALNY, C.;RANDOLPH, T. W. High pressure refolding of recombinant human growth hormone from insoluble aggregates. Structural transformations, kinetic barriers, and energetics. *J Biol Chem*, v.276, n.50, p.46856-63, 2001.

- ST JOHN, R. J.;CARPENTER, J. F.;RANDOLPH, T. W. High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.23, p.13029-33, 1999.
- ST JOHN, R. J., CARPENTER, J. F. and RANDOLPH, T. W. High-pressure refolding of disulfide-cross-linked lysozyme aggregates: thermodynamics and optimization. *Biotechnol Prog*, v.18, n.3, p.565-71, 2002.
- SUDHAKAR, A.;SUGIMOTO, H.;YANG, C.;LIVELY, J.;ZEISBERG, M.;KALLURI, R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.100, n.8, p.4766-71, 2003.
- SUZUKI, M.;YOULE, R. J.;TJANDRA, N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, v.103, n.4, p.645-54, 2000.
- TANDLE, A.;BLAZER, D. G., 3RD;LIBUTTI, S. K. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J Transl Med*, v.2, n.1, p.22, 2004.
- TAYLOR, P.;HARDIN, P. E. Rhythmic E-box binding by CLK-CYC controls daily cycles in per and tim transcription and chromatin modifications. *Mol Cell Biol*, v.28, n.14, p.4642-52, 2008.
- TIMASHEFF, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.99, n.15, p.9721-6, 2002.
- WICKSTROM, S. A.;ALITALO, K.;KESKI-OJA, J. An endostatin-derived peptide interacts with integrins and regulates actin cytoskeleton and migration of endothelial cells. *J Biol Chem*, v.279, n.19, p.20178-85, 2004.
- WU, X.;HUANG, J.;CHANG, G.;LUO, Y. Detection and characterization of an acid-induced folding intermediate of endostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, v.320, n.3, p.973-8, 2004.

- XU, H. L.;TAN, H. N.;WANG, F. S.;TANG, W. Research advances of endostatin and its short internal fragments. *Curr Protein Pept Sci*, v.9, n.3, p.275-83, 2008.
- XU, H. M.;YIN, R.;CHEN, L.;SIRAJ, S.;HUANG, X.;WANG, M.;FANG, H.;WANG, Y. An RGD-modified endostatin-derived synthetic peptide shows antitumor activity in vivo. *Bioconjug Chem*, v.19, n.10, p.1980-6, 2008.
- YAMAGUCHI, N.;ANAND-APTE, B.;LEE, M.;SASAKI, T.;FUKAI, N.;SHAPIRO, R.;QUE, I.;LOWIK, C.;TIMPL, R.;OLSEN, B. R. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J*, v.18, n.16, p.4414-23, 1999.
- YOU, W. K.;SO, S. H.;LEE, H.;PARK, S. Y.;YOON, M. R.;CHANG, S. I.;KIM, H. K.;JOE, Y. A.;HONG, Y. K.;CHUNG, S. I. Purification and characterization of recombinant murine endostatin in E. coli. *Exp Mol Med*, v.31, n.4, p.197-202, 1999.
- ZHA, H.;AIME-SEMPE, C.;SATO, T.;REED, J. C. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem*, v.271, n.13, p.7440-4, 1996.
- ZHOU, H.;WANG, W.;LUO, Y. Contributions of disulfide bonds in a nested pattern to the structure, stability, and biological functions of endostatin. *J Biol Chem*, v.280, n.12, p.11303-12, 2005.
- ZHOU, X. M.;LIU, Y.;PAYNE, G.;LUTZ, R. J.;CHITTENDEN, T. Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser155. *J Biol Chem*, v.275, n.32, p.25046-51, 2000.
- ZONG, W. X.;LI, C.;HATZIVASSILIOU, G.;LINDSTEN, T.;YU, Q. C.;YUAN, J.;THOMPSON, C. B. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol*, v.162, n.1, p.59-69, 2003.