

Um Novo Scaffold Molecular Baseado na Proteína Top7 Resistente à Condições Extremas de Temperatura e pH.

Curt Boschek¹(PG), David Apyio²(PQ), Tjerk P. Straatsma¹(PQ), Cheryl Baird¹(PQ), Thereza A. Soares³(PQ)*. E-mail: thereza.soares@ufpe.br

¹Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA, USA, ²Beckman Coulter Inc. Chaska, MN, USA, ³Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Palavras Chave: clonagem-expressão gênica, ELISA, reagentes de afinidade com novas funcionalidades, reconhecimento molecular, simulações computacionais.

Introdução

Anticorpos são amplamente utilizados para o diagnóstico e aplicações terapêuticas devido à capacidade de reconhecimento específico de novos reagentes inerente à esta classe de biomoléculas. No entanto, estas aplicações permanecem limitadas devido à complexidade estrutural e instabilidade destas moléculas face às condições não fisiológicas de temperatura e/ou pressão. O desenvolvimento de novos reagentes de afinidade baseados em proteínas altamente estáveis oferecem uma excelente alternativa para aplicações em condições ambientais em que anticorpos são inviáveis. Com este objetivo, a proteína não-natural Top7¹ foi utilizada como um *scaffold* molecular no qual uma seqüência parátipo anti-CD4 foi inserida em um sítio específico (Top7_{CB1}).² Este variante da proteína Top7 exibiu atividade de reconhecimento molecular específico da proteína CD4, mantendo a estrutura terciária em condições térmicas superiores a 95°C e concentrações de guanidina de até 6M.^{2,3}

Resultados e Discussão

A proteína Top7 foi planejada inteiramente *in silico* e sua estrutura cristalográfica revelou uma nova classe de enovelamento nunca observada em proteínas naturais.¹ O presente trabalho apresenta os resultados de estudos comparativos da proteína Top7 e de uma forma variante Top7_{CB1} contendo uma seqüência parátipo anti-CD4. Estes sistemas foram caracterizados^{2,3} através de técnicas experimentais e simulações computacionais segundo o protocolo descrito a seguir: i. simulações computacionais foram realizadas para identificar regiões de maior flexibilidade da Top7 para a inserção da seqüência anti-CD4 contendo 10 aa; ii. plasmídios contendo Top7 e a variante Top7_{CB1} foram produzidos e expressos; iii. curvas de desenovelamento por temperatura e concentração química de HCl-guanidina foram determinadas para verificar a estabilidade comparativa entre as duas

proteínas; iv. simulações computacionais da Top7 e da variante Top7_{CB1} em diferentes condições de temperatura (25°C e 127°C) e pH (2 e 7) foram realizadas para caracterizar a estrutura terciária dos sistemas em particular após a inserção da seqüência anti-CD4. A capacidade de ligação específica à proteína CD4 exibida pela variante Top7_{CB1} - mas não pela Top7 - foi caracterizada por ensaios ELISA como da ordem de nM.² Nossos resultados demonstram que a inserção de uma seqüência parátipo anti-CD4 na estrutura da proteína Top7 resulta em uma nova funcionalidade para a proteína, *i.e.* reconhecimento específico da proteína CD4, sem perda de estabilidade ou estrutura terciária da molécula mesmo quando submetida às condições extremas de temperatura e pH.

Conclusões

Nossos resultados mostram que a proteína artificial Top7 funciona efetivamente como um *scaffold* para a construção de novos reagentes de afinidade resistentes às condições extremas de temperatura e pH.^{1,2} A ausência de ligações dissulfeto, estrutura monomérica e tamanho reduzido (94 aa) da proteína Top7 torna esta molécula atrativa para produção em larga escala com potencial aplicação na detecção de tumores de massa sólida onde a penetração de tecidos tem se mostrado um fator limitante à eficácia de terapias baseadas em anticorpos.

Agradecimentos

United States Department of Energy - Office of Advanced Scientific Computing Research and the Environmental, Molecular Sciences Facility, WA, USA.

¹ Kuhlman, B.; Dantas, G.; Ireton, G.C.; Varani, G.; Stoddard, B.L. e Baker D. *Science*. **2003**, 302, 1364.

² Boschek, C.B.; Apyio, D.O.; Soares, T.A.; Engelmann, H.E.; Pefaur, N.B.; Straatsma, T.P. e Baird, C.L. *Protein Engineering, Design & Selection*. **2009**, 22, 325.

³ Soares, T.A.; Boschek, C.B.; Apyio, D.; Baird, C.L.; Straatsma, T.P. 2010. *J. Mol. Graph. and Mod.* **2010**, 28,755.