

Estudo do enovelamento da protease Pla de *Yersinia pestis* por dicroísmo circular.

Thaís J. Vidal^{1*} (IC), Cristiane D. Ano Bom² (PQ), Luzineide W. Tinoco¹ (PQ)

¹Laboratório de Análise e Desenvolvimento de Inibidores Enzimáticos (LADIE), NPPN, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS, Bl. H, Lab. H010 - Rio de Janeiro – RJ, 21941-902. thaisvidal@gmail.com

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária CT Bl A, Rio de Janeiro – RJ, 21941-909.

Palavras Chave: Peste bubônica, Plasminogênio, Dicroísmo Circular.

Introdução

A “peste bubônica” foi responsável por três grandes surtos devastadores ao longo da história e ainda hoje permanece endêmica em muitos locais. Seu agente etiológico é a bactéria *Y. pestis*, transmitida normalmente por picada de pulgas infectadas.¹ A *Y. pestis* possui alguns mecanismos que favorecem a infecção no hospedeiro. Dentre estes, o mais fortemente associado à virulência da *Yersinia* é a presença da protease plasmina (Pla), uma proteína de membrana externa que pertence à família das omptinas e possibilita a invasão da célula do hospedeiro associando-se ao plasminogênio humano. Um caminho para impedir a invasão da *Y. pestis* nas células humanas é interferir na interação da Pla com o plasminogênio humano. Este trabalho teve como objetivo a expressão, purificação e análise por dicroísmo circular (CD) da Pla. A partir da obtenção da Pla purificada e com seu enovelamento correto, poderão ser feitos os estudos da sua interação com o plasminogênio humano por RMN.

Resultados e Discussão

O crescimento bacteriano e a expressão da Pla foram feitos a 37 °C seguindo o protocolo usado para expressão de proteínas em *E. coli*. Após os procedimentos de lise da parede bacteriana, extração dos corpos de inclusão e reenovelamento, a proteína foi purificada em coluna Ni-NTA e eluída com 200 mM de imidazol. O acompanhamento das etapas de expressão, reenovelamento e purificação foi feito por eletroforese SDS-PAGE 15%. Foram observadas duas bandas na região de 34 KDa, indicando haver uma mistura da Pla nas formas enovelada e desenovelada. A Pla purificada foi submetida à diálise em tampão tris 10 mM, pH 8,0 e neste mesmo tampão com 2,5 mM e 10 mM de Dod (N-Dodecil-N,N-Dimetil-3-amônio-1-propanosulfato), com e sem a adição de NaCl. Após a diálise, as amostras foram analisadas por CD. Os espectros de CD mostram uma banda negativa na região entre 220 nm e 230 nm indicativa de folha- β , característica da Pla.² Contudo, a ausência de bandas positivas em torno de 200 nm indica a

presença de proteína desenovelada.

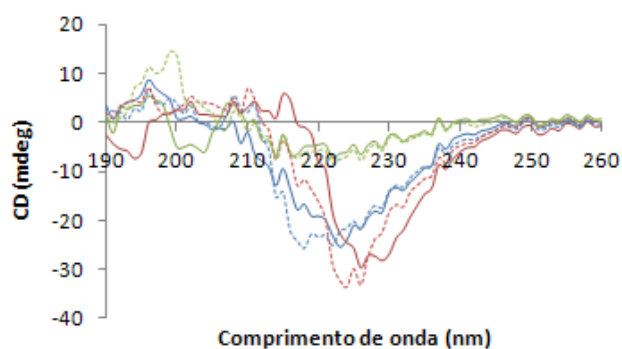


Figura 1. Espectros de CD da Pla em tampão tris 10 mM pH 8,0. Linhas pontilhadas: com 50 mM de NaCl, Linhas contínuas: sem NaCl. Vermelho: sem detergente. Azul: com 2,5 mM de Dod. Verde: com 10 mM de Dod.

O maior grau de enovelamento da Pla foi observado para a amostra dialisada na ausência de detergente (Dod) e com 50 mM de NaCl.

Conclusões

Após os testes de expressão, lise e purificação, foram estabelecidas as condições necessárias para a obtenção da Pla pura. Com a análise dos espectros de CD, foi possível verificar que a Pla adquire um enovelamento mais próximo do esperado na ausência do detergente, o que difere do comportamento observado para as omptinas.

Agradecimentos

CAPES, CNPq, INBEB.

¹ Kukkonen, M.; Lähteenmäki, K.; Suomalainen, M.; Kalkkinen, N.; Emödy, L.; Lang, H. e Korhonen, T. K. *Molecular Microbiology* **2001**, 1097, 1111.

² Eren, E.; Murphy, M.; Goguen, J. e van den Berg, B. *Structure* **18**, 2010, 809, 818.