



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Expressão e caracterização bioquímica parcial de uma serinoprotease
recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis*.**

Guilherme Nunes Moreira Costa

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

UBERLÂNDIA - MG
2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Expressão e caracterização bioquímica parcial de uma serinoprotease
recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis*.**

Guilherme Nunes Moreira Costa

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837e
2014 Costa, Guilherme Nunes Moreira, 1990-
Expressão e caracterização bioquímica parcial de uma serinoprotease recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis* / Guilherme Nunes Moreira Costa. - 2014.
80 f. : il.

Orientadora: Maria Inês Homsí Brandeburgo.
Coorientadora: **Renata Santos Rodrigues**.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses. 3. *Bothrops* - Teses. I. Brandeburgo, Maria Inês Homsí. II. **Rodrigues, Renata Santos**. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Expressão e caracterização bioquímica parcial de uma serinoprotease
recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis*.**

Guilherme Nunes Moreira Costa

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

Examinadores: Prof. Dr. Fábio de Oliveira
Dra. Johara Boldrini França

Data da Defesa: 29 / 07 / 2014.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Profa. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por me conceder força e tranquilidade para enfrentar esta etapa da minha vida.
- À minha mãe Denise Nunes Moreira por ser o meu porto seguro nos momentos bons e ruins, sempre me confortando com seu amor incondicional.
- À minha namorada Tamires dos Santos Paschoal por ser uma ótima companheira para todos os momentos, me fazendo sentir especial todos os dias.
- À minha avó Aurora, meu irmão Gustavo e à Sofia que me propiciam um lar repleto de carinho e serenidade, me fortalecendo para as tarefas diárias.
- À Profa. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo pelos valiosos ensinamentos, pela paciência em me atender e pelo tempo dedicado em me ajudar a desenvolver este e outros trabalhos.
- À Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues por me ajudar nas atividades de bancada, sempre com boa vontade, disposição e um sorriso no rosto.
- Às professoras Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini, pela receptividade no laboratório e no grupo de pesquisa.
- À Dra. Thais Ferreira Isabel pela sua fundamental ajuda no desenvolvimento deste trabalho e por sua contribuição ao meu aprendizado. Com certeza muito do meu conhecimento atual jamais seria adquirida sem a sua ajuda.
- À Ma. Dayane Lorena Naves de Souza pela atenção e prontidão em ajudar o próximo sem esperar nada em troca. Que Deus te abençoe!

- Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais: David, Débora, Vitor Gabriel, Sarah, Patrícia, Daiana, Fernanda, Márcia, Stéfani, Luana, Vanessa, Isabela, Letícia, Elisa, Mônica e Maxwell pelo companheirismo no dia a dia do laboratório.
- Às técnicas do laboratório e acima de tudo minhas amigas, Marina e Sebastiana (Tianinha).
- À Profa. Dra. Ana Maria Bonetti e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho por cederem tão gentilmente as dependências de seus laboratórios para a realização de algumas etapas do desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (INGEB-UFU) e ao seu corpo docente por me propiciarem esta maravilhosa oportunidade para meu crescimento pessoal e profissional.
- À Universidade Federal de Uberlândia por minha formação como biólogo e como futuro Mestre em Genética e Bioquímica.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro no desenvolvimento deste projeto.
- À todos que contribuíram mesmo que indiretamente com este trabalho.

SUMÁRIO

Apresentação.....	1
Capítulo 1.....	4
Introdução.....	5
Componentes da Peçonha Ofídica.....	5
Serinoproteases.....	6
Serinoproteases de Peçonha.....	9
Biologia Molecular.....	12
Referências Bibliográficas	16
Capítulo 2.....	21
Resumo.....	22
Abstract.....	23
1. Introdução.....	24
2. Material e Métodos.....	25
2.1. Obtenção do gene da serinoprotease da biblioteca de cDNA de <i>B. pauloensis</i>	25
2.2. Sequenciamento e análise de nucleotídeos da rBpSP-II.....	26
2.3. Clonagem e expressão da rBpSP-II.....	26
2.3.1. Eletroforese em gel de agarose.....	26
2.3.2. Amplificação do gene da serinoprotease rBpSP-II.....	27
2.3.3. Clonagem da rBpSP-II em pTZ57R/T.....	28
2.3.4. PCR das colônias transformantes.....	29
2.3.5. Clivagem enzimática do DNA plasmidial (PTZ57R/T - rBpSP-II).....	29

2.3.6. Obtenção e clivagem enzimática do vetor pPICZ α A.....	30
2.3.7. Ligação do inserto rBpSP-II no vetor pPICZ α A.....	31
2.3.8. PCR para confirmação das colônias transformantes.....	32
2.3.9. Extração do DNA plasmidial por lise alcalina (Miniprep).....	33
2.3.10. Sequenciamento dos clones recombinantes.....	33
2.3.11. Linearização do plasmídeo recombinante.....	34
2.3.12. Preparação das células competentes de <i>P. pastoris</i>	34
2.3.13. Transformação das células competentes de <i>P. pastoris</i> por eletroporação e plaqueamento.....	35
2.3.14. PCR de colônia dos transformantes de <i>P. pastoris</i>	35
2.3.15. Indução em larga escala da rBpSP-II em <i>P. pastoris</i>	36
2.4. Purificação e Diálise.....	37
2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE).....	38
2.6. Imunodeteção da serinoprotease recombinante.....	38
2.7. Caracterização bioquímica.....	39
2.7.1. Atividade coagulante.....	39
2.7.2. Atividade fibrinogenolítica.....	40
2.7.3. Atividade sobre substratos cromogênicos.....	40
3. Resultados.....	41
3.1. Avaliação e sequenciamento dos clones codificantes de serinoprotease presentes na biblioteca de cDNA da glândula da serpente <i>B. pauloensis</i>	41
3.2. Amplificação do cDNA da serinoprotease rBpSP-II.....	43
3.3. Clonagem do vetor pTZ57R/T-rBpSP-II em <i>E. coli</i> DH5 α competentes.....	44

3.4. Indução em larga escala da rBpSP-II em <i>P. pastoris</i>	49
3.5. Purificação da rBpSP-II.....	50
3.6. Imunodeteccção da rBpSP-II.....	51
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	52
3.8. Caracterização bioquímica.....	53
3.8.1. Atividade coagulante.....	53
3.8.2. Atividade fibrinogenolítica.....	54
4. Discussão e Conclusão.....	57
Agradecimentos.....	61
Referências Bibliográficas.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST – programa computacional para busca de homologias entre biomoléculas (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool).

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar.

DIFP – diisopropilfluorofosfato (inibidor de serinoproteases).

DMC – Dose Mínima Coagulante.

dNTPs – desoxirribonucleotídeos trifosfatados.

EDTA - ácido elilenodiamino tetra-acético.

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo.

LB - Luria Bertani (meio de crescimento de bactérias).

MCS - Múltiplos Sítios de Clonagem (Multiple Cloning Sites).

NCBI - Centro de informações biotecnológicas dos Estados Unidos (**N**ational **C**enter for **B**io**t**echnology **I**nformation).

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction).

PDB - Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Base).

PMSF - fluoreto de fenilmetilsufonil (inibidor de serinoproteases).

SVSP - Serinoprotease de Peçonha de Serpente.

SVTLE - Enzimas de Peçonha de Serpente Semelhantes à Trombina.

TAE - Tampão Tris-acetato EDTA.

TBS - Tampão Tris-salina (Tris Buffered Saline).

x-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo, substrato para a enzima. β -galactosidase.

YPD - Extrato de levedura, peptona e dextrose (**Y**east **E**xtract **P**eptone **D**extrose).

YPDS - Meio YPD com adição de sorbitol.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: A tríade catalítica da quimotripsina (código PDB 4CHA). Fonte: Polgar, 2005.....7

Figura 2: Comparação dos padrões catalíticos das SVTLEs e da trombina sobre o fibrinogênio. Os símbolos α , β e γ representam as cadeias do fibrinogênio, enquanto que as letras A e B representam os fibrinopeptídeos liberados pela hidrólise. **Fonte:** Castro et al., 2004.....10

Figura 3: Esquema da cascata de coagulação sanguínea, vias fibrinolíticas e agregação plaquetária, com os sítios de atuação das SVSPs. **Fonte:** Serrano, 2013.....11

Figura 4: Síntese e secreção proteica em células de organismos eucariontes. As vias e os principais processos metabólicos das proteínas secretadas estão demonstrados, incluindo passos não produtivos como degradação e agregação. **Fonte:** Graf. et al., 2009.....14

Capítulo 2

Figura 1: Diagrama do vetor de clonagem pTZ57R/T (*Fermentas*) contendo os sítios de restrição e a sequência da região MCS.....28

Figura 2: Diagrama de um vetor de expressão pPICZ α A (3593pb) (Invitrogen), contendo os sítios das enzimas de restrição; a região α -factor, responsável pelo direcionamento da proteína recombinante ao sobrenadante; a marca de seleção que confere resistência a ZeocinaTM; o promotor AOX1; os resíduos de histidina e o epítipo c-myc.....31

Figura 3: Blastn da sequência nucleotídica da serinoprotease da biblioteca de cDNA de *Bothrops pauloensis* contra a sequência de cDNA da serinoprotease da biblioteca de cDNA de *B. insularis* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).....42

Figura 4: Sequência parcial de nucleotídeos da serinoprotease de *Bothrops pauloensis*.....43

Figura 5: Análise do produto de amplificação do cDNA da serinoprotease de interesse por eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo como mostrado pela seta. 1 kb: padrão de pares de base (1 kb Gene Ruller, Fermentas); serino: cDNA da serinoprotease de *Bothrops pauloensis* (260 ng/μL); Bco: controle negativo.....43

Figura 6: Amplificação dos clones recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1 kb: padrão de pares de base (1 kb Gene Ruller, Fermentas); Bco - controle negativo; Col 1, 2, 3, 4 e 5 – Colônias recombinantes (pTZ57R/T-rBpSP-II).....44

Figura 7: Miniprep dos clones recombinantes pTZ57R/T-rBpSP-II. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo.....45

Figura 8: PCR de colônia para confirmação dos clones recombinantes em vetor pPICZαA-rBpSP-II. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1 kb: padrão de pares de base (1 kb Gene Ruller, Fermentas); Bco – controle negativo; 1 – 44 – número das colônias.....46

Figura 9: PCR de colônia para confirmação da orientação dos clones recombinantes em vetor pPICZαA-rBpSP-II. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1 kb: padrão de pares de base (1 kb Gene Ruller, Fermentas); Bco – controle negativo; 15, 24, 25, 28, 33 e 44 – número das colônias positivos. 1 – PCR com oligonucleotídeos α -factor e antisense específico;

2 – oligonucleotídeos *sense* específico e AOX3'; 3 – oligonucleotídeos *sense* e *antisense* específicos.....47

Figura 10: Análise do sequenciamento da serinoprotease recombinante. Binsularis - *Bothrops insularis* cluster BITS01A (GenBank: AF490536.1); SerinoRec: rBpSP-II – serinoprotease recombinante sequenciada pelo sequenciador automático DNA Sequencer ABI Prism 377 (Applied Biosystem). Em amarelo – tríade catalítica da serinoprotease - rBpSP-II; Em vermelho – resíduos de cisteína; Em cinza – cauda de histidina.....48

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% da linearização do material de interesse com a enzima de restrição *PmeI*, corado com brometo de etídeo. 1- Não linearizado; 2- Linearizado.....48

Figura 12: Análise da expressão da proteína recombinante em *P. pastoris* a 26 °C por 144 horas. **(A):** SDS-PAGE 12,5%, corado com *Comassie blue*. kDa – Bench Marker Protein Ladder (Invitrogen), NI – 0h e I – 144h. **(B):** Análise das bandas do extrato celular de *P.pastoris* antes da indução com metanol pelo programa GelAnalyser. **(C):** Análise das bandas do extrato celular de *P. pastoris* após a indução com metanol a 26 °C por 144 horas pelo programa GelAnalyser.....50

Figura 13: Eletroforese em gel de acrilamida 12,5% das frações obtidas no processo de purificação da rBpSP-II em resina de Níquel. kDa: Bench Marker Protein Ladder (Invitrogen); 1 – Suspensão de células de levedura antes da indução da expressão gênica; 2 – Eluato; 3 – Lavagem; 4 – Concentração de imidazol 10 mM; 5 – Concentração de imidazol 25 mM; 6 – Concentração de imidazol 50 mM; 7 – Concentração de imidazol 75 mM; 8 - Concentração de imidazol 100 mM; 9 – Concentração de imidazol 250 mM.....51

Figura 14: Western blotting da serinoprotease recombinante utilizando anticorpo primário anti-His (GE). SDS-PAGE 12,5%, corado por *Comassie blue*. Proteína recombinante pura com massa molecular esperada de 40 kDa. Marcador de

massa molecular *Bench Marker Protein Ladder*; 1 e 2 – rBpSP-II (em duplicata). Seta indica a proteína recombinante.....52

Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12.5% na presença de agentes desnaturantes (SDS-PAGE) da rBpSP-II. P – Padrão de massa molecular Thermo scientific: β -galactosidase (116 kDa), Soroalbumina bovina (66.2 kDa), Ovoalbumina (45.0 kDa), lactato desidrogenase (35.0 kDa), Enzima de Restrição Bsp98I (25.0 kDa), β -lactoglobulina (18.4 kDa), lisozima (14.4 kDa). Serino – rBpSP-II.....53

Figura 16: Gráfico de regressão linear utilizado na determinação da DMC. Sendo que o eixo **X** representa a concentração da proteína em μg e o eixo **Y** representa o tempo em segundos. A partir desta construção gráfica, foi determinado o valor da Dose Mínima Coagulante (DMC).....54

Figura 17: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de agentes desnaturantes dos produtos de proteólise do fibrinogênio pela rBpSP-II. Em cada teste foram incubados 50 μL de fibrinogênio com diferentes doses da proteína (0 μg , 1 μg , 5 μg , 10 μg , 15 μg e 20 μg) a 37 °C por uma hora.....55

Figura 18: Atividade proteolítica da rBpSP-II sobre diferentes substratos cromogênicos. A determinação da atividade proteolítica foi realizada com diferentes doses da enzima sobre os substratos S-2222, S-2238 e S-2251 incubados por 45 minutos a 37 °C. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm.....56

Figura 19: Perfil proteômico da peçonha de *B. pauloensis* exibindo a ocorrência das diferentes classes de toxinas identificadas na sua constituição. A ocorrência relativa, expressa em porcentagem, está exibida entre parênteses. Abreviações: CRISP – Proteína secretória rica em cisteína; SVMP – Metaloproteases de peçonha ofídica; PLA₂ - Fosfolipases A₂; BPP/C-NP – Peptídeos potencializadores de bradicinina; LAO - ácido L-amino-oxidase; NGF – fator de crescimento neural. **Fonte:** Rodrigues, 2012.....59

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Estrutura e mecanismo catalítico das serinoproteases conhecidas.

Fonte: Page & Di Cera, 2008.....7

Capítulo 2

Tabela 1: Valores encontrados nos testes de determinação da DMC.....54

Apresentação

A peçonha ofídica é constituída principalmente por proteínas, as quais apresentam uma ampla variedade de propriedades bioquímicas, servindo como uma rica fonte de estudos nos mecanismos de envenenamento, na relação estrutura-função destas biomoléculas e em diversos processos fisiológicos.

Uma das classes de proteínas que estão presentes na constituição da peçonha bruta são as serinoproteases. Estas proteínas são capazes de interferir em diversos pontos da hemostasia, se tornando assim ferramentas importantes nos estudos de desordens hemostáticas. Diversas serinoproteases foram utilizadas em estudos ou até mesmo como modelos na síntese de fármacos.

No entanto, um dos maiores empecilhos na utilização destas proteínas é a sua obtenção em quantidades adequadas, uma vez que a purificação da peçonha ofídica é um processo árduo e que muitas vezes gera um rendimento baixo de proteínas puras. Isso sem mencionar que a extração da peçonha bruta causa um estresse significativo nas serpentes. Dessa forma, técnicas alternativas para obtenção de proteínas isoladas e em larga escala se tornaram um objetivo de inúmeros pesquisadores.

As técnicas de expressão heteróloga de proteínas se destacaram por permitir uma obtenção facilitada e em larga escala, utilizando organismos mais simples de se manipular. Assim, inúmeras proteínas vêm sendo expressas por técnicas de biologia molecular nos últimos anos, utilizando bactérias e leveduras como hospedeiros alternativos.

Neste trabalho, o objetivo foi obter e caracterizar bioquimicamente uma serinoprotease da peçonha da serpente *B. pauloensis* no sistema de expressão heteróloga em levedura metilotrófica *Pichia pastoris*.

A dissertação foi elaborada de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica e a formatação está de acordo com as normas vigentes da ABNT. No capítulo 1 está apresentada uma fundamentação teórica a respeito do trabalho realizado, com explicações sobre os componentes da peçonha de serpentes, as propriedades, características e importância das serinoproteases, além de uma abordagem sobre o desenvolvimento de técnicas

de biologia molecular. No capítulo 2 apresentamos a clonagem, a expressão e caracterização bioquímica parcial de uma serinoprotease *thrombin-like*, denominada rBpSP-II da peçonha de *B. pauloensis*.

Presentation

Snake venom represents a rich source of proteins compounds which have a wide variety of biochemical properties. Those components may serve as tools to understand the mechanisms of poisoning, to study the structure-function of those biomolecules and to explore various physiological processes.

A class of proteins that are present in the constitution of the crude venom is the serine proteases. These proteins are able to interfere at different points in hemostasis, thus becoming important tools in studies of hemostatic disorders. Serine proteases have been used in various studies or even as templates in the synthesis of new drugs.

However, one of the major obstacles in the use of these proteins is its production in appropriate amounts, since the purification of ophidian venom's is a laborious process and often produces a low yield of pure proteins. In addition, the extraction of crude venom normally causes significant stress in snakes. Consequently, alternative techniques to obtain pure proteins in large scale have become a goal of many researchers.

The technique of heterologous protein expression has emerged in the last years and has been used as methodology to overcome those obstacles. This strategy allows a facilitated large-scale acquisition of pure proteins using simpler organisms to manipulate. Thus, many proteins have been expressed by molecular biology techniques in recent years using bacteria and yeast as alternative hosts.

The objective of this work was to obtain and characterize biochemically one serine protease from the venom of the snake *B. pauloensis* using heterologous expression system with the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.

The dissertation was prepared according to the standards of the Graduate Program in Genetics and Biochemistry and the format is in accordance with the standards of ABNT Program. A theoretical framework about the work is presented

in Chapter 1 including explanations about the snake venom(apostrophe)s components and the importance of serine pretease, its properties and characteristics. . Furthermore, it is discussed in this chapter the strategies and approaches concerning molecular biology techniques. . The cloning, expression and partial biochemical characterization of a thrombin-like serine protease, named rBpSP-II from the venom of *B. pauloensis* is presented in Chapter 2

Capítulo 1

Fundamentação teórica

Introdução.

COMPONENTES DA PEÇONHA OFÍDICA

As peçonhas ofídicas são compostas por moléculas biologicamente ativas com a função de matar ou enfraquecer suas presas. As serpentes da família Viperidae apresentam diversas toxinas proteolíticas em sua peçonha, as quais desempenham ações em diversos aspectos fisiológicos (SANCHEZ et al., 2007). Vários desses componentes estimulam ou inibem o mecanismo hemostático, incluindo a cascata de coagulação sanguínea, fibrinólise, hipotensão, integridade vascular e função plaquetária (MARKLAND, 1998; HIGUCHI et al., 2007; SANCHEZ e SWENSON, 2007).

As espécies do gênero *Bothrops* são responsáveis por mais de 90% dos acidentes ofídicos registrados em território brasileiro (BELLO et al., 2006). A peçonha destas serpentes tem sido alvo de pesquisadores que almejam compreender a ação sistêmica do envenenamento e a aplicação biotecnológica de seus constituintes (SWENSON E MARKLAND, 2005; RAMOS E SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; GOMES et al., 2011). Os acidentes botrópicos têm como característica danos teciduais como hemorragias, necroses e edemas, além de alterações na coagulação sanguínea devido a sua interação com os fatores da cascata de coagulação (GUTIÉRREZ E LOMONTE, 1989; CAMEY et al., 2002; WHITE, 2005).

Na constituição das peçonhas ofídicas, podemos encontrar diferentes tipos de enzimas proteolíticas que podem ser classificadas de acordo com a sua característica funcional e por sua interferência na hemostasia. As proteínas procoagulantes possuem capacidade de ativação de alguns fatores da cascata de coagulação sanguínea ou em alguns casos possuem ação similar à trombina, sendo muitas vezes denominadas proteínas “*trombin-like*”. As proteínas anticoagulantes apresentam capacidade de inibir a coagulação, seja por meio da formação do complexo IX/X ou por inibição de fatores da cascata de coagulação sanguínea, tais como a trombina. As enzimas fibrinogenolíticas são as proteases capazes de degradar o fibrinogênio e/ou a fibrina e também as proteínas ativadoras de plasminogênio (WHITE, 2005). Tais componentes também são

classificados de acordo com a sua estrutura. Dentre elas estão as fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, metaloproteases e serinoproteases, enquanto outras, tais como desintegrinas e lectinas tipo-C, não possuem atividade enzimática (MARKLAND, 1998; JIANG et al, 2009).

SERINOPROTEASES

As enzimas proteolíticas participam de diversos processos biológicos, tanto como catalisadores inespecíficos de degradação quanto como agentes altamente específicos para o controle de eventos fisiológicos (NEURATH, 1984). Estas enzimas são agrupadas de acordo com similaridades na sequência e estrutura e organizadas em um banco de dados denominado MEROPS. O sistema de classificação utilizado neste banco de dados agrupa as peptidases em clãs de acordo com o seu mecanismo catalítico e agrupa em famílias com base na ancestralidade comum. Até 2011, já haviam sido depositadas 192.053 sequências de peptidases, classificadas em 44 clãs e 225 famílias (RAWLINGS & BARRET, 2012).

As enzimas proteolíticas da classe das serinoproteases possuem mais de 26.000 sequências depositadas, sendo agrupadas em 13 clãs e 40 famílias. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, estando presente em diversos organismos. O termo serinoprotease veio da presença de um resíduo de aminoácido Ser nucleofílico no sítio ativo da enzima, responsável pelo ataque ao grupo carbonil do substrato. O perfil nucleofílico do sítio ativo das serinoproteases geralmente depende da tríade de aminoácidos Asp-His-Ser (Figura 1), sendo observada pela primeira vez na estrutura da enzima quimotripsina (BLOW, 1969).

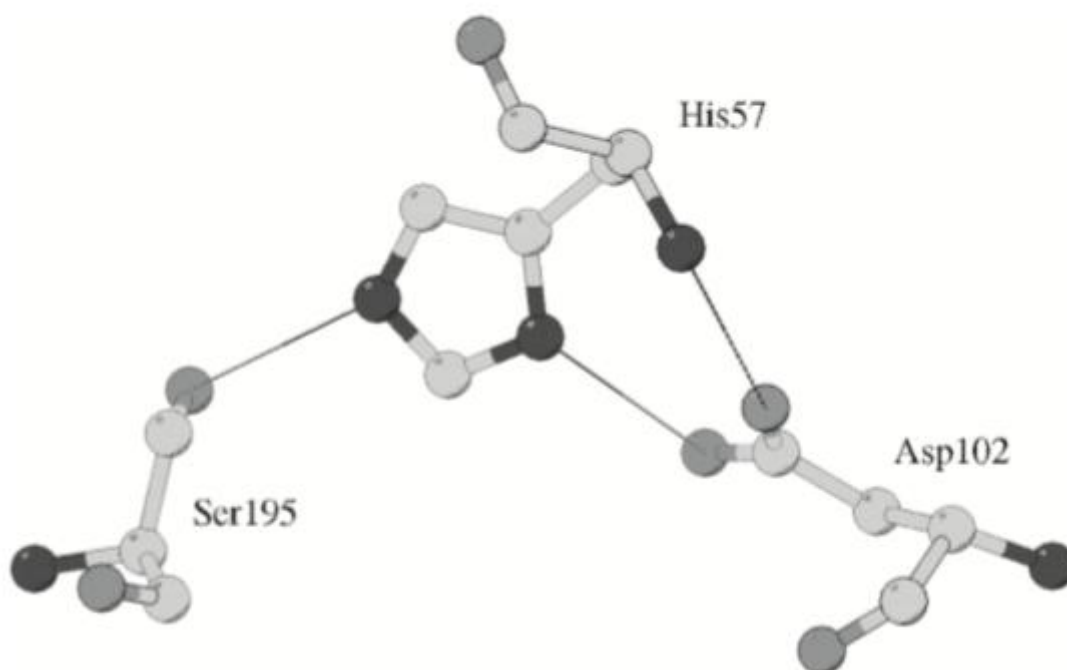


Figura 1: A tríade catalítica da quimotripsina (código PDB 4CHA). Fonte: Polgar, 2005.

Muitas vezes as serinoproteases apresentam um mecanismo mais simples onde uma Lys ou His pairing com a Ser catalítica, enquanto outras apresentam um mecanismo onde um par de His se combinam ao resíduo de Ser nucleofílico para realizar a catálise. Em praticamente todos esses tipos de mecanismos, o resíduo de Ser do sítio ativo pode ser inativado por inibidores tais como o PMSF e DIFP (PAGE & DI CERA, 2008).

Tabela 1: Estrutura e mecanismo catalítico das serinoproteases conhecidas. **Fonte:** Page & Di Cera, 2008

Clan	Families	Representative member	Fold	Catalytic residues	#	Primary specificity	PDB
PA	12*	Trypsin	Greek-key β -barrels	His, Asp, Ser	195	A, D, F, G, K, Q, R, W, Y	1DPO
SB	2	Subtilisin, sedolisin	3-layer sandwich	Asp, His, Ser	221	F, W, Y	1SCN
SC	2	Prolyl oligopeptidase	α/β hydrolase	Ser, Asp, His	554	G, P	1QFS
SE	6	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	α -helical bundle	Ser, Lys	62	D-A	3PTE
SF	3	LexA peptidase	all β	Ser, Lys/His	119	A	1JHH
SH	2	Cytomegalovirus assemblin	α/β Barrel	His, Ser, His	132	A	1LAY
SJ	1	Lon peptidase	$\alpha + \beta$	Ser, Lys	679	K, L, M, R, S	1RR9
SK	2	Clp peptidase	$\alpha\beta$	Ser, His, Asp	97	A	1TYF
SP	3	Nucleoporin	all β	His, Ser	na	F	1KO6
SQ	1	Aminopeptidase DmpA	4-layer sandwich	Ser	250	A, G, K, R	1B65
SR	1	Lactoferrin	3-layer sandwich	Lys, Ser	259	K, R	1LCT
SS	14	L,D-Carboxypeptidase	β -sheet + β -barrel	Ser, Glu, His	115	K	1ZRS
ST	5	Rhomboid	α -barrel	His, Ser	201	D, E	2IC8

A variety of catalytic units have arisen to assist the requisite nucleophilic Ser. # = residue acting as nucleophile. *Seven additional families in clan PA of viral origin apply a nucleophilic Cys to mediate bond hydrolysis.

Estudos envolvendo enzimas digestivas como a tripsina e a quimotripsina revelaram que estas enzimas clivam a cadeia polipeptídica na porção C-terminal de resíduos com cadeia lateral carregada positivamente (Arg ou Lys) ou resíduos hidrofóbicos (Phe, Trp, Tyr). A maioria das enzimas do clã PA apresentam características semelhantes à tripsina, que utiliza a tríade catalítica para clivar seletivamente a cadeia lateral da Arg, embora existam algumas exceções (POLGAR, 2005). O mecanismo de catálise da quimotripsina é realizado através de uma ligação de hidrogênio entre os resíduos Asp-102 e His-57 (posições na molécula de quimotripsina), o que leva a abstração de um próton do resíduo Ser-195 e resulta em um poderoso aminoácido nucleofílico (CRAIK et al., 1987; SPRANG et al., 1987; HEDSTROM, 2002; POLGAR, 2005).

A ativação de grande parte das serinoproteases semelhantes à quimotripsina (família S1), demandam o processamento proteolítico de um precursor sintetizado na forma de zimogênio (NEURATH, 1957). As proteínas precursoras são clivadas para a sua ativação em lugares idênticos em todos os membros da família S1, entre os resíduos 15 e 16 (posições na molécula de quimotripsina). A nova porção N-terminal gerada pela clivagem induz alterações conformacionais levando a formação de uma interação eletrostática intramolecular, onde o resíduo de Asp194 estabiliza tanto o sítio de ligação de substrato quanto a região do oxiânion. A estabilização da proteína madura se dá pela formação de 3 a 6 pontes dissulfeto distribuídas pela estrutura tridimensional. A ativação de zimogênios configura um eficiente mecanismo regulatório onde a enzima pode exercer sua função no momento fisiológico adequado, evitando uma ativação prematura. Tais propriedades derivam da estrutura de enovelamento da quimotripsina, sendo fundamental em diversos processos biológicos (PAGE & DI CERA, 2008).

SERINOPROTEASES DE PEÇONHA

As serinoproteases de peçonha de serpente (SVSPs – *Snake Venom Serine Proteases*) são classificadas como integrantes do clã PA, família S1 (quimotripsina) e pertencentes à subfamília A. São sintetizadas como zimogênios e apresentam uma cadeia peptídica única e massa molecular variando entre 26 e 67 kDa de acordo com a quantidade de sítios de glicosilação que permitem a associação de carboidratos a sua estrutura. Tais proteases estão presentes principalmente em peçonhas de serpentes terrestres, como as famílias Crotalidae, Elapidae, Colubridae e Viperidae, sendo que nesta última a quantidade de serinoproteases corresponde a cerca de 20% do total de proteínas presentes na peçonha bruta. As SVSPs apresentam a região catalítica (His57, Asp102 e Ser195) altamente conservada e em geral, são caracterizadas por sua capacidade de gerar desordens hemostáticas, interferindo em diversos pontos da cascata de coagulação sanguínea, tanto por proteólise quanto por ativação ou inibição de fatores envolvidos no processo de coagulação e fibrinólise (BRAUD et al., 2000; SERRANO & MAROUN, 2005; SERRANO, 2013).

Análises por meio da determinação da estrutura primária ou do sequenciamento do cDNA, forneceram informações úteis para a compreensão da estrutura das SVSPs evidenciando uma grande homologia entre elas. Em comum, todas apresentam um mecanismo catalítico que envolve um resíduo de Ser altamente reativo fundamental para a formação do complexo intermediário acil-enzima, o qual é estabilizado pela presença de resíduos de His e Asp no sítio ativo. Estas proteases apresentam também 12 resíduos de Cys na sua cadeia, sendo que 10 destes estão envolvidos em ligações dissulfeto essenciais para a manutenção da estrutura tridimensional e são sensíveis a compostos organofosforados como DIFP e PMSF (BARRET & RAWLINGS, 1995; ITOH et al., 1987; SERRANO, 2013).

THROMBIN-LIKE

Algumas serinoproteases de peçonhas ofídicas apresentam funções semelhantes a trombina, portanto tais toxinas passaram a ser chamadas de *Snake Venom Thrombin-Like Enzymes* (SVTLEs) ou apenas “*thrombin-like*”. Apesar da semelhança e do alto grau de conservação da sequência de aminoácidos no sítio ativo das SVTLEs em relação a trombina, existem algumas diferenças entre a especificidade da atividade catalítica sobre o fibrinogênio. Apenas algumas SVTLEs são capazes de clivar as cadeias A α e B β do fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeos A (FpA) e fibrinopeptídeos B (FpB) respectivamente, como demonstrado na figura 2. A maioria das SVTLEs cliva preferencialmente uma das cadeias do fibrinogênio (PIRKLE, 1998; MARKLAND, 1998; MATSUI et al., 2000; BORTOLETO et al., 2002).

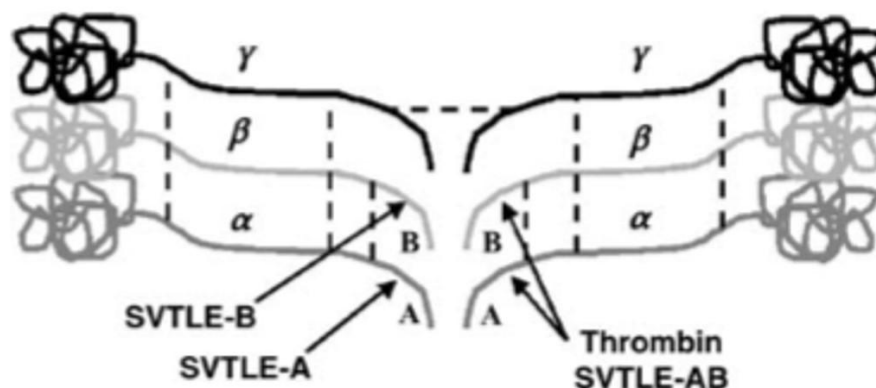


Figura 2: Comparação dos padrões catalíticos das SVTLEs e da trombina sobre o fibrinogênio. Os símbolos α , β e γ representam as cadeias do fibrinogênio, enquanto que as letras A e B representam os fibrinopeptídeos liberados pela hidrólise. **Fonte:** Castro et al., 2004.

A degradação das cadeias do fibrinogênio desencadeia a formação de um coágulo “frouxo”, que é rapidamente degradado por fibrinólise *in vivo*. O aumento da fibrinólise leva a uma redução no estoque de fibrinogênio endógeno, o que torna as SVTLEs ideais como agentes antitrombóticos e anticoagulantes (BRAUD et al., 2000; DA ROCHA & FURTADO, 2005). As SVTLEs são capazes de atuar de diversas maneiras sobre o sistema hemostático (Figura 3), podendo também

Callosellasma rhodostoma e a Batroxobina (Reptilase, Pentapharm, Basel, Suíça) isolada da peçonha de *Bothrops atrox*. Ambas as enzimas têm sido usadas em pacientes com trombose de veias profundas, infarto do miocárdio e trombose arterial periférica (STOCKER & BARLOW, 1976; YU et al., 2007).

Um exemplo de aplicação das SVTLEs é a “cola de fibrina”, que atua como um selante para tecidos. A “cola de fibrina” é constituída a partir de fibrinogênio, trombina e íons cálcio, sendo que o seu mecanismo de ação é simular a coagulação interrompendo o extravasamento sanguíneo. Em presença de trombina e íons cálcio, as moléculas de fibrinogênio sofrem proteólise e são convertidas em monômeros de fibrina. A “cola de fibrina” pode ser utilizada como agente hemostático em vários procedimentos, tais como em cirurgias cardiotorácicas, reconstituição de tecidos em cirurgias plásticas, em cirurgias ortopédicas, em neurocirurgias e em técnicas de cirurgias oftalmológicas, além de muitos outros procedimentos cirúrgicos. Uma vez aplicado no paciente, a cola é aos poucos reabsorvida por fibrinólise. (WANG, 1995).

BIOLOGIA MOLECULAR

Em função do significativo crescimento da demanda por tais proteínas com potencial terapêutico, se tornou necessário que fossem criados métodos mais eficazes de obtenção destas moléculas de interesse. Com isso, houve um significativo crescimento na área de expressão de proteínas heterólogas, reduzindo assim a necessidade de se atravessar os difíceis passos da purificação dessas biomoléculas em sua forma nativa. Diversos avanços foram alcançados na engenharia de bioprocessos no decorrer dos anos, sempre buscando sistemas de produção de alto rendimento e que fossem economicamente viáveis quando comparados com os métodos de obtenção tradicionais. No ano de 2004, o mercado global para proteínas recombinantes com fins terapêuticos estava avaliado em 44 bilhões de dólares com a expectativa de atingir a marca de 70 bilhões até o fim de 2010 (PAVLOU, 2004).

Por muito tempo a espécie de bactéria *Escherichia coli* foi usada como o principal organismo hospedeiro em sistemas de expressão de proteínas heterólogas, fato atribuído principalmente pela simplicidade de manipulação de tal organismo. Porém, proteínas derivadas de genomas eucarióticos, não eram devidamente expressas neste sistema, já que tal organismo não apresenta as estruturas celulares necessárias para o correto processamento de proteínas que necessitem de modificações pós-traducionais. Uma grande variedade de proteínas que não são corretamente expressas em *E.coli*, foram subsequentemente expressas na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* com resultados satisfatórios tanto em rendimento quanto em funcionalidade da proteína recombinante expressa (DALY & HEARN, 2005).

O sistema de expressão de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris* é um dos mais amplamente estudados e utilizados para o uso industrial. Dentre as diversas vantagens em se utilizar esse sistema podemos citar a alta capacidade de regulação pelo promotor induzido por metanol (álcool oxidase 1 (pAOX1)), a sua capacidade de secretar proteínas, a habilidade de promover modificações pós-traducionais e a preferência pelo crescimento respiratório ao invés do fermentativo (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; COS et al., 2006). O genoma da *P. pastoris* é relativamente fácil de manipular devido à diversidade de kits de expressão disponíveis no mercado, sendo possível até mesmo direcionar a região de secreção das proteínas através de peptídeos sinais, facilitando assim a recuperação das proteínas nos passos de purificação (IDIRIS et al., 2010) (Figura 4).

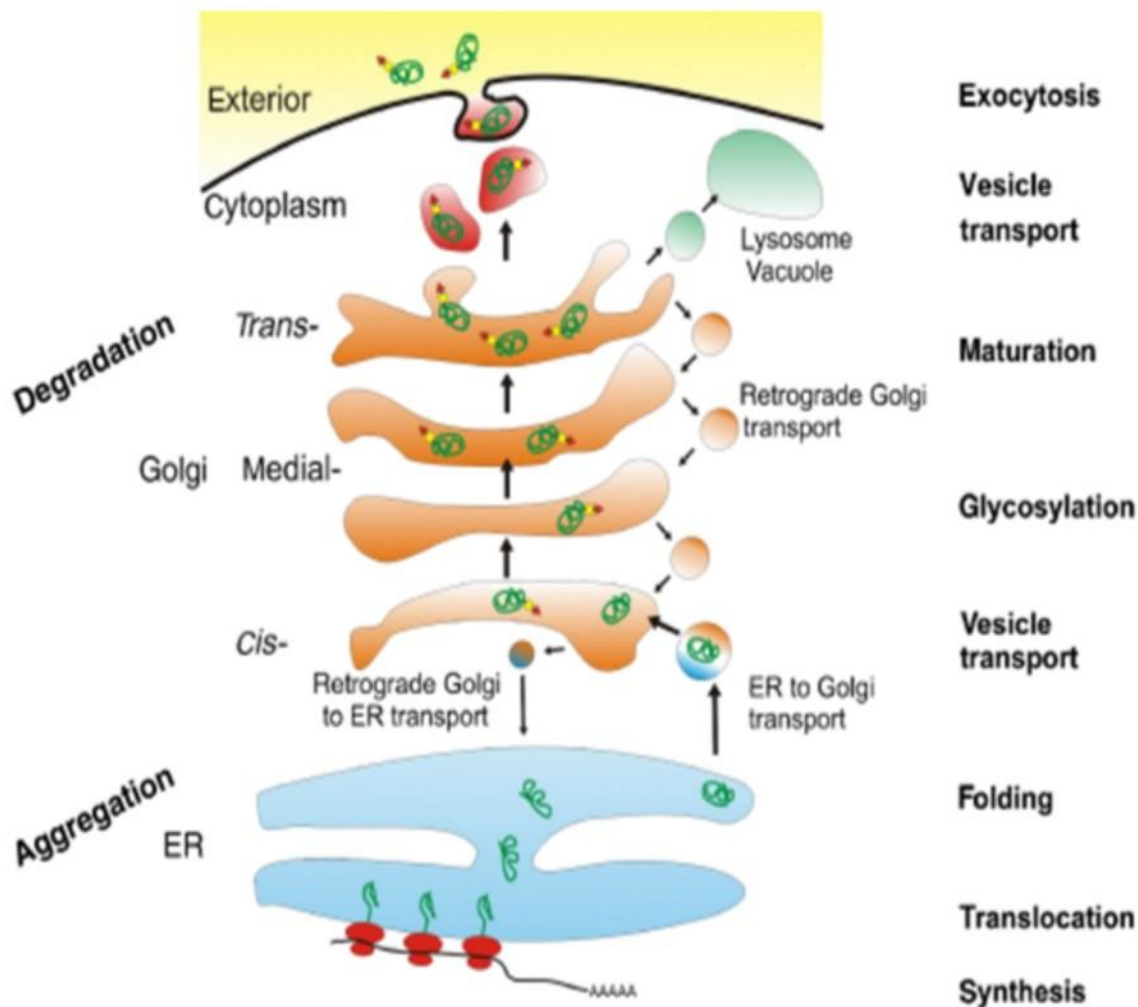


Figura 4: Síntese e secreção proteica em células de organismos eucariontes. As vias e os principais processos metabólicos das proteínas secretadas estão demonstrados, incluindo passos não produtivos como degradação e agregação. **Fonte:** Graf et al., 2009.

No entanto, o rendimento na produção de proteínas heterólogas pode ser afetado por diversos fatores. A análise do gene a ser inserido no novo organismo é crucial, uma vez que os códons utilizados, bem como a quantidade de guanina e citosina presentes na sequência gênica a ser inserida, podem interferir no rendimento da indução proteica. A presença de sítios de clivagem ou glicosilação na proteína a ser expressa também se mostrou um interferente no rendimento final. Para um melhor resultado, hoje são utilizadas otimizações na sequência de nucleotídeos a ser sintetizada, utilizando códons com melhor eficácia (GUSTAFSSON et al., 2004; SINCLAIR et al., 2002). Alguns fatores relacionados

à linhagem de levedura utilizada para a expressão, promotores e número de cópias do gene também influenciam no nível de expressão (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). As condições físico-químicas da cultura são importantes fatores interferentes do rendimento da expressão, sendo fundamental o controle da temperatura e do pH do meio de indução (COS et al., 2006).

Em geral, culturas de expressão em *P. pastoris* são realizadas em meio com pH variando entre 3 a 7, pois valores de pH diferentes podem afetar a estabilidade da proteína a ser expressa e causar a precipitação dos sais presentes no meio de indução, embora não interfiram na capacidade de crescimento celular da levedura (JAHIC, 2003). Além disso, apesar do organismo *P. pastoris* possuir uma temperatura ótima de crescimento de 30 °C, temperaturas mais baixas na fase de indução, variando até 15 °C, ainda se mostram eficientes na expressão da proteína heteróloga sem afetar significativamente o crescimento celular. A realização da fase de indução com temperaturas mais baixas se mostrou ainda mais eficiente ao proporcionar o aumento do rendimento final de proteínas recombinantes expressas e a redução da atividade proteolítica das enzimas de *Pichia pastoris* (WU, 2008; POTVIN et al., 2010).

Sendo assim, as técnicas de biologia molecular, como a de expressão heteróloga em leveduras, se mostram promissoras em estudos de obtenção em larga escala de proteínas modelo com potencial terapêutico. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi a clonagem, expressão e caracterização bioquímica parcial de uma serinoprotease *thrombin-like* recombinante da glândula de peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*.

Referências Bibliográficas.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Archives of Biochemistry Biophysics**. v.318, p.247–250, 1995.

BELLO, C. A.; HERMOGENES, A. L. N.; MAGALHÃES, A.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie** v.88, p.189–200, 2006.

BLOW, D. M.; BIRKTOFT, J. J.; HARTLEY, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. **Nature**. v.221, p.337–340, 1969.

BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M. T.; WATANABE, L.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification, characterization and crystallization of jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v.40, p.1307-1312, 2002.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**. v. 82, p. 851-859, 2000.

CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**. v.40, p.501–509, 2002.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.61, p. 843-856, 2004.

COS, O.; RAMÓN, R.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microbial Cell Factories**. v.5, p.17, 2006.

CRAIK, C. S.; ROCZNAK, S.; LARGMAN, C.; RUTTER, W. J. The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. **Science**. v.237, p.909–913, 1987.

DA ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 22, n. 2, p. 383-393, Junho 2005.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**. v.18, p.119-138, 2005.

GOMES M. S. R.; QUEIROZ M. R.; MAMEDE C. C. N.; MENDES M. M.; HAMAGUCHI A.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; SOUZA M. V.; AQUINO E. N.;

CASTRO M. S.; OLIVEIRA F., RODRIGUES V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.** v.153, p.290-300, 2011.

GRAF, A.; DRAGOSITS, M.; GASSER, B.; MATTANOVICH, D. Yeast systems biotechnology for the production of heterologous. **FEMS Yeast Research.** v.9, p.335-348, 2009.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends Biotechnol.** v.22, p.346–353, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Memórias do Instituto Butantan.** v.51, p.211–223, 1989.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews.** v.102, p.4501–4524, 2002.

HENRIQUES, E. S.; FONSECA, N.; RAMOS, M. J. On the modeling of snake venom proteinase interactions with benzamidine-based thrombin inhibitors. **Protein Science.** v.13, p.2355-2369, 2004.

HIGUCHI D. A.; BARBOSA C. M. V.; BINCOLETTO C.; CHAGAS J. R.; MAGALHÃES A.; RICHARDSON M.; SANCHEZ E. F.; PESQUERO J. B.; ARAÚJO R. C.; PESQUERO J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie.** v.89, p.319-328, 2007.

IDIRIS, A.; TOHDA, H.; KUMAGAI, H.; TAKEGAWA, K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. **Applied Microbiology Biotechnology.** v.86, p.403–417, 2010.

ITOH, N.; TANAKA, N.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **The Journal Biological Chemistry.** v.262, p.3132–3135, 1987.

JAHIC, M.; GUSTAVSSON, M.; JANSEN, A. K.; MARTINELLE, M.; ENFORS, S.O. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Journal of Biotechnology.** v. 102, p. 45-53, 2003.

JIANG, W.; MA, T.; SU, X.; QIU, P.; YAN, G. Enzymatic activities and functional characterization of a novel recombinant snake venom proteinase from *Agkistrodon acutus*. **Biochimie.** v. 91, p. 277-287, 2009.

KORNALIK, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. **Pharmacology and Therapeutics.** v.29, p.353-405, 1985.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast** v.22, p.249–270, 2005.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**. v.36, p.1749-1800, 1998.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**. v. 45, p. 1171-1181, 2005.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1477, p. 146-156, 2000.

NEURATH, H.; DIXON, G. H. Structure and activation of trypsinogen and chymotrypsinogen. **Federation Proceedings**. v.16, p.791– 801, 1957.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**. v.224, p.350–357, 1984.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.65, p.1220-1236, 2008.

PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. Recombinant protein therapeutics: success rates, market trends and values to 2010. **Nature Biotechnology**. v. 22, p.1513–1519, 2004.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 79, p. 675-683, 1998.

POLGAR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.62, p.2161–2172, 2005.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**. v.64, p.91-105, 2012.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Review: snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.142, p.328–346, 2006.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**. v.40, p.343-350, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2^ªed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHEZ E. F.; GABRIEL L. M.; GONTIJO S.; GREMSKI L. H.; VEIGA S. S.; EVANGELISTA K. S.; EBLE J. A.; RICHARDSON M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B , from *Bothrops leucurus* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.468, p.193-204, 2007.

SANCHEZ, F. E.; SWENSON, S. Proteases from South American Snake Venoms Affecting Fibrinolysis. **Current Pharmaceutical Analysis**. v. 3, p. 147-157, 2007.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**. *In press*, p. 1-18, 2005.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**. v.62, p.19-26, 2013.

SINCLAIR, G.; CHOY, F. Y. M. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v.26, p.96–105, 2002.

SPRANG, S.; STANDING, T.; FLETTERICK, R. J.; STROUD, R. M.; FINER-MOORE, J.; XUONG, N. H.; HAMLIN, R.; RUTTER, W. J.; CRAIK, C. S. The three-dimensional structure of Asn102 mutant of trypsin: Role of Asp102 in serine protease catalysis. **Science**. v.237, p.905–909, 1987.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Methods in Enzymology**, v. 45, p. 214-223, 1976.

SWENSON, S.; MARKLAND Jr., F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon** v.45, p.1021–1039, 2005.

TORRENT, R. M. R.; BONGIOVANNI, B.; LEIVA, L. C.; DUFFARD, A. M. E.; RODRÍGUEZ, J. P.; PÉREZ, O. C. A.; DUFFARD, R. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study). **Toxicon**, v.50, p.144-152, 2007.

WANG, M-C; PINS, G. D.; SILVER, F. H. Preparation of fibrin glue: the effects of calcium chloride and sodium chloride. **Materials Science and Engineering C**, v.3, p.131-135, 1995.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**. v.45, p.951–967, 2005.

WU, D.; HAO, Y. Y.; CHU, J.; ZHUANG, Y. P.; ZHANG, S. L. Inhibition of degradation and aggregation of recombinant human consensus interferon-alpha mutant expressed in *Pichia pastoris* with complex medium in bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.80, p.1063-1071, 2008.

YU, X.; LI, Z.; XIA, X.; FANG, H.; ZHOU, C.; CHEN, H. Expression and purification of ancrod, an anticoagulant drug, in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v. 55, p. 257-261, 2007.

Capítulo 2

RESUMO

A peçonha de serpente é composta por uma diversidade de biomoléculas com inúmeras ações sobre os processos fisiológicos. As serinoproteases são um grupo de proteases presentes na constituição da peçonha, capazes de interferir em diversos pontos da hemostasia. Algumas serinoproteases possuem atividade semelhante à trombina, o que as tornam alvos de interesse no desenvolvimento de agentes terapêuticos no tratamento de desordens hemostáticas. Neste estudo, uma serinoprotease *thrombin-like* recombinante denominada rBpSP-II foi obtida a partir do cDNA da glândula da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* e caracterizada bioquimicamente. O cDNA correspondente à rBpSP-II foi clonado no vetor pPICZ α A e inserido na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* KM71H para a realização da expressão heteróloga. Esta enzima apresentou banda única quando analisada em SDS-PAGE com massa molecular aproximada de 44.5 kDa sob condições redutoras. A rBpSP-II apresentou atividade coagulante sobre plasma bovino e atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, clivando preferencialmente a cadeia A α . A avaliação da atividade da rBpSP-II sobre substratos cromogênicos demonstrou que a enzima possui atividade *thrombin-like* devido a sua capacidade de hidrolisar o substrato da trombina.

Palavras-Chave: *Bothrops pauloensis*, peçonha de serpente, *thrombin-like*, serinoprotease, expressão heteróloga.

ABSTRACT

The snake venom is composed by a diversity of biomolecules with many actions on physiological processes. The serine peptidases are a group of proteases present in the constitution of the venom, capable of interfering on several points of hemostasis. Some serine peptidases has thrombin-like activity, what makes them targets on the development of therapeutics agentes on the treatment of many hemostatic disorders. In this study, a recombinant thrombin-like serine peptidase called rBpSP-II was obtained from the cDNA of the venom gland of the snake *Bothrops pauloensis* and biochemically characterized. The cDNA correspondent to rBpSP-II was cloned on the pPICZ α A vector and inserted on the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* KM71H for the heterologous expression. This enzyme showed single band when analised on SDS-PAGE with approximated molecular mass of 44,5 kDa under reducing conditions. The enzyme rBpSP-II showed clotting activity on bovine plasma and proteolytic activity on fibrinogen, cleaving exclusively the A α chain. The evaluation of rBpSP-II activity on chromogenic substrates showed that the enzyme has thrombin-like activity due to its capacity to hydrolyze the thrombin substrate.

Keywords: *Bothrops pauloensis*, snake venom, *thrombin-like*, serine peptidase, heterologous expression.

1. Introdução.

As peçonhas ofídicas são constituídas por uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas, com a função de matar ou enfraquecer a presa. As serpentes da família Viperidae apresentam a peçonha constituída por grandes quantidades de toxinas proteolíticas, capazes de executar as mais variadas ações sobre inúmeros processos metabólicos, incluindo os mecanismos hemostáticos (MARKLAND, 1998; HIGUCHI et al., 2007; SANCHEZ & SWENSON, 2007).

As enzimas proteolíticas presentes nas peçonhas ofídicas participam de diversos processos biológicos, tanto como catalisadores inespecíficos de degradação quanto como agentes altamente específicos para o controle de eventos fisiológicos (NEURATH, 1984). A classe das serinoproteases é uma das principais classes de enzimas proteolíticas presentes na peçonha de serpente. Estudos proteômicos com a peçonha de *B. pauloensis* revelaram que 10% das proteínas correspondem à classe das serinoproteases (RODRIGUES, 2012).

As serinoproteases de peçonha de serpente (SVSPs – *Snake Venom Serine Proteases*) são classificadas no banco de dados MEROPS como integrantes do clã PA, família S1 (quimotripsina) e pertencentes à subfamília A (RAWLINGS & BARRET, 2012). Estas enzimas são glicoproteínas sintetizadas como zimogênios e apresentam uma cadeia peptídica única e massa molecular variando entre 26 e 67 kDa de acordo com a quantidade de sítios de glicosilação em sua estrutura. Tais proteases apresentam a região catalítica (His57, Asp102 e Ser195) altamente conservada e se destacam pela capacidade de causar desordens hemostáticas, interferindo em diversos pontos da cascata de coagulação sanguínea (BRAUD et al., 2000; SERRANO & MAROUN, 2005; SERRANO, 2013).

A partir de análises de cDNA estruturais foi possível constatar que todas as SVSPs apresentam um mecanismo catalítico que envolve um resíduo de Ser altamente reativo fundamental para a formação do complexo intermediário acil-enzima, o qual é estabilizado pela presença dos resíduos de His e Asp no sítio ativo. As SVSPs apresentam 12 resíduos de Cys na sua cadeia, essenciais para a manutenção da estrutura tridimensional por realizarem ligações dissulfetos e tem a sua atividade proteolítica inibida por compostos organofosforados como

DIFP e PMSF (BARRET & RAWLINGS, 1995; ITOH et al., 1987; SERRANO, 2013).

Algumas destas SVSPs apresentar funções semelhantes a da trombina e por esse motivo tais toxinas são denominadas *snake venom thrombin like enzymes* (SVTLEs). As SVTLEs são modelos moleculares importantes no desenvolvimento de fármacos e agentes terapêuticos, pois além de possuírem as principais funções da trombina, como a capacidade de coagular fibrinogênio, elas são resistentes a inibidores fisiológicos (KORNALIK, 1985; PIRKLE, 1998; MATSUI et al., 2000; SERRANO & MAROUN, 2005).

A obtenção destas proteínas por muitos anos foram realizados por meio de métodos tradicionais de purificação a partir da peçonha bruta, o que nem sempre resultava em quantidades suficientes de proteína para atender a demanda. Porém, com os avanços nas técnicas de biologia molecular, diversos trabalhos foram publicados apresentando vantagens na expressão heteróloga de proteínas (MAEDA et al., 1991; YU et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo a clonagem, expressão e caracterização bioquímica parcial de uma serinoprotease *thrombin-like* recombinante a partir da biblioteca de cDNA da glândula venenífera da serpente *Bothrops pauloensis*.

2. Material e Métodos.

2.1. Obtenção do gene da serinoprotease da biblioteca de cDNA de *B. pauloensis*.

O cDNA utilizado neste trabalho possui a sequência codificante de uma serinoprotease *thrombin-like* denominada rBpSP-II. O clone que codifica esta enzima foi isolado a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula da peçonha de *Bothrops pauloensis* armazenada a -80 °C no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais da Universidade Federal de Uberlândia (RODRIGUES et al., 2012). A sequência de nucleotídeos do cDNA da rBpSP-II (BP041) está

depositada no *GenBank* sob número de acesso GR955260 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/GR955260.1> (RODRIGUES et al., 2012).

2.2. Sequenciamento e análise de nucleotídeos da rBpSP-II.

Os clones correspondentes à rBpSP-II obtidos da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2012) foram sequenciados utilizando um oligonucleotídeo *sense* específico (5'-AAACTCGAGAAAAGACAAAAGTCTTCTGAACTGG – 3') desenhado a partir da sequência de nucleotídeos de uma serinoprotease encontrada na biblioteca de cDNA de *B. insularis* (depositada no *GenBank* sob o número de acesso AF490536.1) para obtenção da sequência completa da proteína de interesse. O sequenciamento automático foi realizado no MEGA-BACE 1000 automated DNA sequencer (GE Healthcare), utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare), a partir de 250 ng de cDNA modelo. A sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos da rBpSP-II foi avaliada quanto à identidade em relação às sequências depositadas no banco de dados internacional *GenBank* por meio do algoritmo BLAST (ALTSCHUL, et al., 1997).

2.3. Clonagem e expressão da rBpSP-II.

2.3.1. Eletroforese em gel de agarose.

A eletroforese em gel de agarose a 1% foi realizada seguindo a metodologia de Sambrook (1989), contendo brometo de etídeo (0,5 g/ml) em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8,3). À amostra foi adicionado tampão de carregamento 6x (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% azul de bromofenol, 0.03% xileno cianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA) (Thermo Scientific), sendo em seguida aplicada uma tensão de 90 V em tampão TAE 1X. Após o término da corrida, os géis eram analisados em um transluminador de luz ultravioleta (UV).

2.3.2. Amplificação do gene da serinoprotease rBpSP-II.

O gene que codifica a rBpSP-II foi amplificado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir do vetor pDONR-rBpSP-II, previamente obtido da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2012). A amplificação gênica foi realizada utilizando oligonucleotídeos específicos contendo sítios de clivagem para a enzima *XhoI* no *sense* (5'- AAAC TCGAGAAAAGACAAAAGTCTTCTGAACTGG – 3') e para a enzima *Sall* no *antisense* (5'- AAAGTCGACCGGGGGGCAAGTCGCAGTTTT – 3').

Em um microtubo de 0,2 mL foram adicionados: cDNA como molde; tampão de PCR 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP mix 0,2 mM, 10 pM oligonucleotídeo *sense*, 10 pM oligonucleotídeo *antisense*, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen) e quantidade de água ultrapura suficiente para completar o volume final de 25 µL. As reações foram realizadas em um termociclador sob as condições padronizadas: 94 °C por 3 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de: 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 52 °C por 1 minuto e 30 segundos para anelamento e 72 °C por 4 minutos para extensão, 7 minutos à 72 °C para completar a extensão final. Ao final das reações as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% e armazenadas à -20 °C até o momento do uso.

Os produtos de PCR amplificados de interesse foram recortados do gel e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), conforme as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop) e posteriormente armazenadas em freezer a -20 °C até o momento do uso.

2.3.3. Clonagem da rBpSP-II em pTZ57R/T.

O produto de PCR purificado foi ligado no vetor de clonagem pTZ57R/T, utilizando para isto o *InsTAclone™ PCR Cloning Kit* (Fermentas) conforme as especificações do fabricante. A figura abaixo mostra o mapa de restrição e a sequência da região MCS (múltiplos sítios de clonagem) do pTZ57R/T:

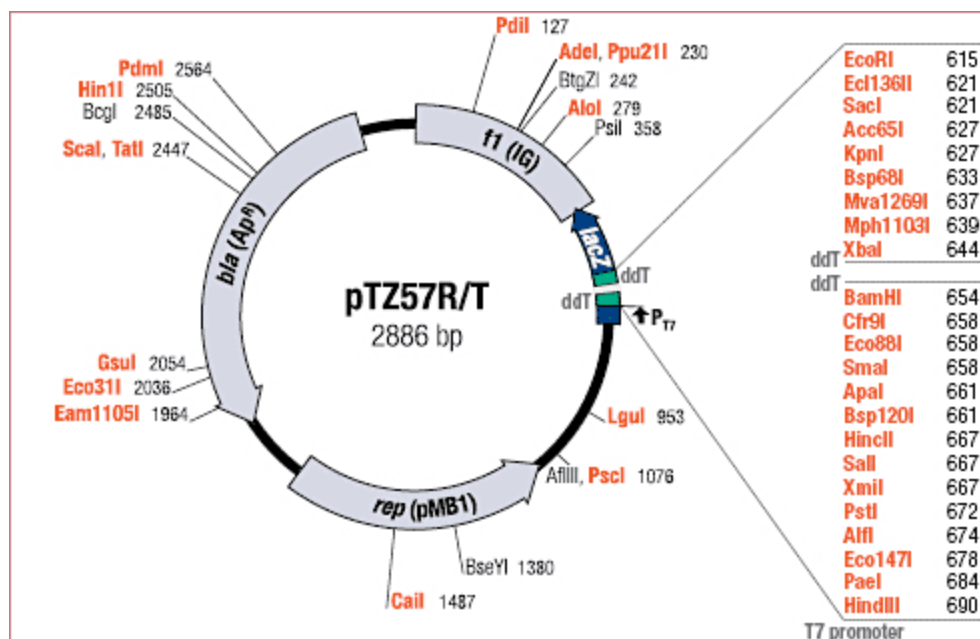


Figura 1: Diagrama do vetor de clonagem pTZ57R/T (Fermentas) contendo os sítios de restrição e a região MCS.

Em um microtubo estéril de 1,5 mL foram adicionados para a reação de ligação: 2X tampão (10x), 1 U/μL de enzima T4 DNA ligase, 55 ng/μL de pTZ57R/T, 130 ng/μL de produto de PCR purificado e quantidade de água ultrapura suficiente para completar 10 μL. A reação foi homogeneizada e incubada a 16 °C por 16 horas.

A reação de ligação foi utilizada para transformar células de *E. coli* DH5α CaCl₂ competentes pelo método do choque térmico (SAMBROOK e RUSSELL, 2001) onde, adicionou-se 5 μL da reação de ligação aos 200 μL de bactérias DH5α competentes, seguido de choque térmico a 42 °C por 90 segundos, transferindo-se imediatamente a suspensão bacteriana para o gelo por 60 segundos. Em seguida, foram adicionados 800 μL de meio LB para

restabelecimento das células por 45 minutos a 37 °C a 250 rpm. Após este período, o material foi plaqueado em meio LB ágar contendo o antibiótico ampicilina (100 mg/mL), IPTG (200 mM) e X-gal (2% m/v), incubadas por 24 horas a 37 °C para seleção das colônias transformantes.

2.3.4. PCR das colônias transformantes.

Foram selecionadas cinco colônias brancas aleatoriamente de cada uma das placas. Estas colônias foram transferidas da placa para um tubo falcon contendo 5 mL de meio LB e 5 µL de ampicilina (100 mg/mL) e colocados na incubadora com agitação a 300 rpm por 5 horas a uma temperatura de 37 °C. Após crescimento das colônias selecionadas, foi realizada uma reação de PCR para confirmação do inserto (rBpSP-II) ligado ao vetor pTZ57R/T. Na reação foram adicionados: 1 µL de suspensão celular, tampão de PCR 1x, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP mix 0,2 mM, 10 pM dos oligonucleotídeos *sense* e *antisense*, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen) e quantidade de água ultrapura suficiente para completar o volume final de 25 µL.

O controle negativo da reação também foi realizado contendo todas as soluções com exceção da suspensão celular. As reações foram realizadas em termociclador, sob as mesmas condições de amplificação utilizada na obtenção do fragmento de interesse (item 2.3.2). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta (UV).

Após a confirmação das colônias transformantes, foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o kit Wizard Plus SV minipreps – DNA purification System (Promega), segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

2.3.5. Clivagem enzimática do DNA plasmidial (PTZ57R/T - rBpSP-II).

O DNA plasmidial, obtido por miniprep, foi clivado com as enzimas de restrição *XhoI* (Fermentas) e *Sall* (Fermentas), conforme protocolo estabelecido

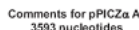
pelo fabricante. A reação foi preparada em microtubo estéril 1,5 mL contendo 2X tampão Tango™ (10x), 1,5 µL de enzima *Xho*I (10 U/µL), 1,5 µL de enzima *Sal*I (10 U/µL), 3 µg/µL do produto de miniprep e água ultrapura autoclavada o suficiente para completar 40 µL. A reação foi brevemente centrifugada (*spin*) e incubada em banho de água a 37°C por 3 horas e em seguida, a reação foi inativada por 20 minutos, a 80 °C.

2.3.6. Obtenção e clivagem enzimática do vetor pPICZαA.

Em um tubo do tipo falcon de 50 mL, foi adicionado uma porção de bactérias *E. coli* linhagem DH5α CaCl₂ transformadas que continham o vetor pPICZαA (Figura 2) em 10 mL de meio LB Low Salt e 25 µg/mL do antibiótico Zeocina™. Os tubos foram então levados a incubadora com agitação a temperatura de 37°C e a 250 rpm por 16 horas.

Posteriormente, o material contendo o vetor pPICZαA foi submetido à miniprep e em seguida clivado com as enzimas de restrição *Xho*I (Fermentas) e *Sal*I (Fermentas), conforme instruções do fabricante. A reação foi preparada em microtubo estéril de 1,5 mL contendo tampão Tango™ (10x) concentração final de 2x, 1,5 µL de enzima *Xho*I (10 U/µL), 1,5 µL de enzima *Sal*I (10 U/µL), 3 µg/µL do vetor pPICZαA e água ultrapura autoclavada o suficiente para completar 40 µL. A reação foi brevemente centrifugada (*spin*) e incubada em banho de água a 37 °C por 3 horas e em seguida foi inativada por 20 minutos, a 80 °C.

Para confirmar a digestão, uma alíquota contendo 2 µL da amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% e a amostra foi analisada em um transluminador de luz ultravioleta (UV). Após a confirmação da digestão, um novo gel de agarose 1% foi realizado no qual o restante da amostra foi aplicado e posteriormente purificado utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) segundo as especificações do fabricante. Em seguida, o material purificado foi quantificado em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop).



5' AOX1 promoter region: bases 1-941
5' AOX1 priming site: bases 855-875
α-factor signal sequence: bases 941-1207
α-factor priming site: bases 1144-1164
Multiple cloning site: bases 1208-1276
c-myc epitope: bases 1275-1304
Polyhistidine (6xHis) tag: bases 1320-1337
3' AOX1 priming site: bases 1423-1443
AOX1 transcription termination region: bases 1341-1682
TEF1 promoter: bases 1683-2093
Sh ble ORF: bases 2095-2162
5b ble ORF: bases 2163-2537
CYC1 transcription termination region: bases 2538-2855
cYC1 origin: bases 2866-3539 (complementary strand)

[†]The two Xho I sites in the vector allow the user to clone their gene in frame with the Kex2 cleavage site, resulting in expression of their native gene without additional amino acids at the N-terminus.

2.3.7. Ligação do inserto rBpSP-II no vetor pPICZ α A.

Para a reação de ligação do inserto rBpSP-II ao vetor pPICZ α A foram adicionados em um microtubo estéril de 1,5 mL: 2 μ L de tampão da enzima 5x (*Fermentas*), 1 U/ μ L de enzima T4 DNA ligase, 50 ng/ μ L do vetor pPICZ α A, 200 ng/ μ L do inserto rBpSP-II e água ultrapura autoclavada o suficiente para completar 10 μ L. A reação foi brevemente centrifugada (*spin*) e incubada a 16 °C

por 24 horas.

O produto de ligação (pPICZ α A + inserto rBpSP-II) foi transformado por choque térmico em bactérias *E. coli* linhagem DH5 α CaCl₂ competentes. A transformação foi realizada adicionando-se 5 μ L do produto de ligação às bactérias competentes, seguido por uma suave homogeneização e descanso por 10 minutos no gelo. Em seguida, a amostra foi submetida a 42 °C por 90 segundos e imediatamente colocada no gelo por 1 minuto. Foram adicionados a esta amostra 800 μ L de meio de cultura líquido LB Low Salt para restabelecimento das células a 37 °C por 45 minutos sob agitação de 300 rpm.

As bactérias transformadas foram plaqueadas em placas de petri contendo 20 mL de meio LB Low Salt ágar e 25 μ g/mL de ZeocinaTM. As placas foram incubadas à temperatura de 37 °C em estufa por 24 horas.

2.3.8. PCR para confirmação das colônias transformantes.

Foi realizada uma PCR para confirmação das colônias transformantes. A cada reação foi adicionada uma colônia em um microtubo estéril de 0,2 mL onde o mix de reação era composto de: tampão da enzima (1x), 2,5 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTP mix, 10 pM de oligonucleotídeo *sense*, 1 U/ μ L de enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) e água ultrapura estéril suficiente para completar 20 μ L. O controle negativo também foi realizado.

Foram realizadas outras PCRs para confirmar a orientação do inserto, com diferentes oligonucleotídeo, sendo eles o oligonucleotídeo *sense* α Factor (10 pM) (5'- TACTATTGCCAGCATTGCTGC - 3') e o oligonucleotídeo *antisense* específico da serinoprotease; oligonucleotídeo *sense* específico e o oligonucleotídeo *antisense* AOX3' (10 pM) (5' - AATGGCATTCTGACATCC – 3').

As reações foram realizadas em gelo sob as seguintes condições: 94 °C por 10 minutos, 29 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, seguidos de 7 minutos a 72 °C para completar a extensão final. Ao final da reação as amostras foram mantidas no termociclador a 4 °C. Após a amplificação, uma eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para confirmar a orientação dos clones recombinantes.

2.3.9. Extração do DNA plasmidial por lise alcalina (Miniprep).

Das colônias positivas, algumas foram selecionadas e transferidas para um pré-inóculo em 10 mL de meio LB Low Salt contendo 25 µg/µL de ZeocinaTM e incubados por 16 horas a 37 °C e 250 rpm. Após esta etapa o material foi submetido à miniprep (lise alcalina) para extração do DNA plasmidial, segundo metodologia de Sambrook et al. (2001). A cultura foi centrifugada por 5 minutos a 4 °C e 3800 g, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado em 600 µL da solução I (50 mM dextrose, 25 mM Tris HCl, 10 mM EDTA) gelada. A essa solução foram adicionados 10 µg de RNase 20 mg/mL e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução de II (0,2 M NaOH, 1% (m/v) SDS) e 350 µL da solução III (5 M de acetato de potássio, 23% ácido acético) gelada, homogeneizando e posteriormente incubando por 5 minutos. Posteriormente, a cultura foi incubada por 3 minutos no gelo e centrifugada a 16.000 g por 10 minutos a 4 °C. Após esta etapa, foram realizadas adições sequenciais de etanol 100% e 70% seguidos de centrifugação a 16.000 g a 4 °C e deixados secar a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 20 µL de água ultrapura autoclavada e incubado por 30 minutos a 42 °C. Após esse procedimento, o material foi quantificado em espectrofotômetro ND-1000 Nanodrop.

2.3.10. Sequenciamento dos clones recombinantes.

A confirmação da sequência e orientação correta dos plasmídeos recombinantes (rBpSP-II + pPICZαA) foram realizados pelo método de terminação da cadeia de sequenciamento de DNA (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977), em sequenciador automático — DNA Sequencer ABI Prism 377 (Applied Biosystem), utilizando *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem), conforme orientação do fabricante. Para o sequenciamento foram utilizados como

amostra os plasmídeos recombinantes e o oligonucleotídeo *sense* AOX5' (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAG – 3').

2.3.11. Linearização do plasmídeo recombinante.

A reação de linearização do plasmídeo recombinante (rBpSP-II + pPICZαA) foi preparada utilizando 1x tampão 4, 10 mg/mL de BSA, 20 U/μL de enzima *PmeI*, 5 μg do plasmídeo recombinante e água ultrapura autoclavada o suficiente para completar 100 μL. A reação foi incubada a 37 °C por quatro horas e analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Posteriormente à confirmação da linearização, a reação foi inativada a 65 °C por 20 minutos.

À amostra linearizada foram adicionados 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M, homogeneizou-se por inversão e adicionou-se 2,5 vezes o volume de etanol 100% e novamente homogeneizou-se. O material foi levado à temperatura de -80 °C por 30 minutos e em seguida centrifugado a 13.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e então centrifugado novamente a 13.000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. A amostra foi deixada a temperatura ambiente por 10 minutos e então ressuspensa em 10 μL de água ultrapura estéril e quantificada em espectrofotômetro ND-1000 Nanodrop.

2.3.12. Preparação das células competentes de *P. pastoris*.

O preparo das células *P. pastoris*, linhagem KM71H competentes foi realizado segundo protocolo descrito por Cregg, (2007). Foi realizado um pré-inóculo da célula original de *P. pastoris*, em 5 mL de meio YPD e incubado por 9 horas a 30 °C e 250 rpm. Desse pré-inóculo, 50 μL foram retirados e adicionados em erlenmeyer de 500 mL, contendo 50 mL de meio YPD. Esse material foi incubado a 30 °C e 250 rpm até atingir densidade óptica (D.O. 600 nm) de 1,2. A seguir, a cultura foi centrifugada a 1500 g, 4 °C por 5 minutos e ressuspensa em 10 mL de YPD acrescido de 170 mM de HEPES.

Posteriormente, foram adicionados a essa solução 250 µL de ditioneitol. Esse material foi incubado a 30 °C por 15 minutos sem agitação. Após, foi adicionado água destilada estéril até volume final de 50 mL e centrifugado a 1500 g, por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e 25 mL de água destilada estéril foram adicionados ao precipitado e repetido o passo de centrifugação. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 2 mL de sorbitol 1 M estéril, centrifugando as células a 1500 g, por 5 minutos a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscendido em 100 µL de sorbitol 1 M estéril e aliqotado em microtubos contendo 40 µL cada e mantidos a -80 °C.

2.3.13. Transformação das células competentes de *P. pastoris* por eletroporação e plaqueamento.

A transformação foi realizada em um microtubo de 1,5 mL contendo 1 µg de DNA (pPICZαA + rBpSP-II) linearizado mais 40 µL de células competentes de *P. pastoris*. A amostra foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm (BioRad) e incubada em gelo por 5 minutos. Este material recebeu um pulso de elétrico nas seguintes condições: 1500 V, 25 µF e 200 W, em aparelho GenePulser II (BioRad). Imediatamente após o choque, foi adicionado às células 1 mL de sorbitol 1M na cubeta e o conteúdo transferido para um tubo de 50 mL. As células foram incubadas a 30 °C por 2 horas sem agitação. Posteriormente 50, 100 e 200 µL das células transformadas foram plaqueadas em placas de petri contendo YPDS ágar contendo 100 ou 500 µg/µL de ZeocinaTM. As placas foram incubadas a 30 °C por 4 a 5 dias. Ao final deste período, as colônias que cresceram nas placas foram numeradas (começando pela placa que continha 500 µg de ZeocinaTM).

2.3.14. PCR de colônia dos transformantes de *P. pastoris*.

Para o PCR de colônia, a reação foi preparada utilizando tampão 10X, 10 pM do oligonucleotídeo *sense* específico; 10 pM do oligonucleotídeo *antisense* AOX3'; 25 mM de MgCl₂; 10 mM dNTP's mix; 1 U da enzima Taq polimerase; 20%

de triton X-100 e água ultrapura estéril suficiente para completar o volume final de 25 µl de reação.

A reação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: 94 °C por 10 minutos, 29 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, seguidos de 7 minutos a 72 °C para extensão final e posteriormente a 4 °C. Após o término da PCR os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 1% para confirmar a presença do insertos recombinantes.

2.3.15. Indução em larga escala da rBpSP-II em *P. pastoris*.

A indução foi realizada utilizando um pré-inóculo contendo 10 mL de meio BMGY e uma colônia positiva em erlenmeyer de 125 mL (volume 10 vezes maior que o volume do pré-inóculo). A colônia foi crescida em meio BMGY a 30 °C, 250 rpm, por 24 horas. Decorrido o tempo, o pré-inóculo foi vertido totalmente (10 mL) em erlenmeyer contendo 500 mL de meio BMGY acrescido de antibiótico ZeocinaTM e colocado sob agitação de 200 rpm até atingir a D.O. de 5 a 6 a 600 nm lido em espectrofotômetro. A suspensão celular foi centrifugada a 1500 g por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante descartado por inversão e o precipitado ressuspendido em 100 mL de meio BMMY em um novo erlenmeyer de 1 L e incubado a 26 °C, 250 rpm por 24 horas.

Para a manutenção da indução, foi realizada reposição de metanol 100% em uma concentração final de 0,75% a cada 24 horas. Alíquotas da indução foram coletadas nos tempos de 0 h a 144 h e centrifugadas a 1500 g por 5 minutos e os sobrenadantes foram analisados em gel SDS-PAGE 12,5% corado com *Coomassie Brilliant Blue* e descorados para análise de determinação dos níveis de expressão da rBpSP-II.

2.4. Purificação e Diálise.

Colunas plásticas de polipropileno com capacidade para 25 mL foram preenchidas com 5 mL de resina carregada com níquel $/\text{Ni}^{2+}$ (*NI-NTA Superflow*, Qiagen®) para a realização da cromatografia de afinidade para a purificação da proteína recombinante serinoprotease rBpSP-II.

A resina foi lavada com água e equilibrada com o tampão lise. A seguir foi adicionado a coluna o sobrenadante do extrato proteico de *Pichia pastoris* recombinante. O eluato que passou pela coluna foi recuperado em tubo falcon. A coluna foi então lavada com 3 vezes o volume da resina com tampão de lise (Tris-base 10 mM; NaH_2PO_4 50 mM e NaCl 100 mM) e essa lavagem foi armazenada em tubo falcon. A seguir, foi realizado o gradiente de imidazol no tampão de lise com 2 volumes de resina para cada concentração (10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM e 250 mM) para a recuperação da proteína recombinante.

Para análise da purificação da proteína recombinante foi realizado um gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5%. Ao final da corrida eletroforética, os géis foram corados com *Coomassie Blue* e descorados em solução descorante para a revelação.

Após a purificação, a proteína recombinante recuperada nos gradientes do tampão de lise com imidazol (confirmados em gel de poliacrilamida), foi adicionada à membrana de diálise (*Snake Skin pleated Dialysis Tubing* 7,000 MWCO, 22 mm dry diameter - Thermo Scientific). A membrana de diálise contendo a proteína recombinante foi mergulhada em um béquer contendo água ultrapura. A cada 24 horas a água foi trocada completando três trocas. Após a diálise, a proteína dentro da membrana de diálise foi recuperada e liofilizada em Liofilizador de bancada (Terroni®). A proteína foi recuperada adicionando água ultrapura autoclavada e quantificada através do método de Bradford (1976), a leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE).

A eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5%, de acordo com Laemmli (1970), em tampão Tris-HCl, pH 8,4, após correr duas horas a 10 mA e 200 V, foi utilizada para o monitoramento da expressão da proteína recombinante, determinação da atividade fibrinogenolítica e estimativa da massa molecular.

O tampão do eletrodo continha Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v) pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8, azul de bromofenol 0,001% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 10% (v/v). As eletroforeses foram realizadas em sistema de eletroforese Hoefer SE260 Mighty Small Mini Vertical. Após a corrida os géis foram corados com solução Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) em água e metanol proporção 1:1 (v/v) e descorados em solução de ácido acético 7%. Foi utilizado o padrão de massa molecular Thermo Scientific, contendo as seguintes proteínas: β -galactosidase (116 kDa), Soroalbumina bovina (66.2 kDa), Ovoalbumina (45.0 kDa), Lactato desidrogenase (35.0 kDa), Enzima de Restrição Bsp98I (25.0 kDa), β -lactoglobulina (18.4 kDa), Lisozima (14.4 kDa).

2.6. Imunodetecção da serinoprotease recombinante rBpSP-II.

A imunodetecção da rBpSP-II pura foi realizada através de um ensaio de *Western Blotting*. Neste, foram utilizados anticorpos primários que se ligam a cauda de histidina produzidos em camundongos (*anti-his antibody - GE*) e anticorpos secundários anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina (*anti-mouse IgG – whole molecule – alkaline phosphatase conjugate antibody developed in goat – SIGMA*).

A rBpSP-II foi transferida para uma membrana de PVDF (*PVDF Transfer Membrane 0,45 μ M – Thermo Scientific*). Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi mergulhado juntamente com dois papéis de filtro e duas esponjas no tampão de transferência (Tris 200 mM, glicina 50 mM) sem metanol, enquanto a membrana ficou mergulhada no metanol a 15%. Transcorridos cinco minutos, a

membrana e o metanol foram misturados ao tampão de transferência, e deixados por mais 5 minutos. O sanduiche foi montado colocando-se entre as esponjas e o papel de filtro, a membrana face-a-face com o gel, e aplicada uma corrente elétrica de 150 V (150 mA) por duas horas, fazendo com que as proteínas carregadas fossem transferidas do gel para a membrana mantendo a mesma disposição que apresentavam no gel. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de *Ponceau* (*Ponceau* 0,5%, ácido acético 0,1%), marcadas as bandas de interesse com agulha e descoradas com água destilada.

A membrana foi então incubada por uma hora em solução de bloqueio (0,05% leite desnatado em pó e TBS (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 8,0) sob agitação suave para impedir ligações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para detectar a proteína alvo. Transcorrido o bloqueio, lavou-se a membrana com TBS, 3 vezes por 5 minutos cada lavagem sob agitação suave. A membrana foi então incubada por uma hora sob agitação suave com anticorpo primário anti-His diluído em TBS, lavada como descrito anteriormente e incubada novamente por 1 hora com anticorpo secundário anti-Mouse e lavada novamente como descrito. A revelação das proteínas de interesse foi realizada com solução reveladora Step™ NBT/BCIP (*Pierce*) até o aparecimento das bandas de interesse e posteriormente lavada com água destilada para parar a reação.

2.7. Caracterização bioquímica.

2.7.1. Atividade coagulante.

A atividade coagulante foi realizada com o intuito de estimar a dose coagulante mínima (DMC) que é definida como sendo a quantidade de enzima capaz de coagular o plasma bovino citratado a 37 °C em 60 segundos (SELISTRE et al., 1990). Os testes coagulantes da enzima recombinante foram realizados segundo Assakura e colaboradores (1992), com algumas modificações. Para essas reações foram utilizados 200 µL de plasma bovino citratado e diferentes quantidades de enzima (1-30 µg), em ordem para determinar a dose mínima

coagulante (DMC). A atividade foi realizada em triplicata, utilizando a peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* como controle positivo.

2.7.2. Atividade fibrinogenolítica.

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi realizada segundo Rodrigues et al. (2000) com modificações, como descrito a seguir. Diferentes doses da amostra (1 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg e 20 µg) foram incubadas a 37 °C por 1 hora com 50 µL de solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL) dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,8. A reação foi parada com a adição de 25 µL de solução STOP (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 2% (m/v), glicerol 10% (v/v), β-mercaptoenol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,05% (m/v)). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos e submetidas a eletroforese SDS-PAGE 12,5%.

2.7.3. Atividade sobre substratos cromogênicos.

A capacidade da rBpSP-II de hidrolisar substratos cromogênicos foi avaliada de acordo com a metodologia de Rodríguez-Acosta et al. (2010) com modificações. Em uma placa de poliestireno de 96 poços foram incubados 150 µL dos substratos S-2222 (substrato para fator Xa, N-Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNa), S-2238 (substrato para trombina, H-D-Phe-Pip-Arg-pNa) e S-2251 (substrato para plasmina, H-D-Val-Leu-Lys-pNa), preparados de acordo com as especificações do fabricante (Chromogenix), com diferentes quantidades da enzima (0,5 µg, 1 µg, 2,5 µg, 5 µg, 10 µg), diluídos em 50 µL de Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM pH 7,4, a 37 °C. A atividade foi realizada em triplicata e monitorada na leitora de placas MultiSkan GO (Thermo Scientific) a 405 nm a cada 5 minutos até o tempo máximo de 45 minutos.

3. Resultados.

3.1. Avaliação e sequenciamento dos clones codificantes de serinoprotease presentes na biblioteca de cDNA da glândula da serpente *B. pauloensis*.

A partir da biblioteca de cDNA da glândula de *B. pauloensis*, as sequências codificantes de serinoproteases geraram dois clusters identificados como BP041 e BP042, sendo que o cluster BP041 (GR955260) apresentou uma cobertura de 94% e 88% de identidade com a sequência de nucleotídeos de uma serinoprotease encontrada na biblioteca de cDNA de *B. insularis* (depositada no *GenBank* sob o número de acesso AF490536.1) (Figura 3). As porcentagens de cobertura e identidade entre as sequências de serinoproteases foram avaliadas por alinhamentos através das ferramentas BLASTn e BLASTx. Dessa forma, após a avaliação e validação da sequência da serinoprotease, esta foi por inúmeras vezes sequenciada, porém não foi possível a obtenção da sequência completa, mas sim o sequenciamento parcial apresentado na figura 4.


```

Query 41 CAGCGTTCAGATTGTTGGCCACCCAGCTGCTTAATTTTCGGTCAAATAAAGTGCTGCTTG 100
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3 CAGCGTTCAGATTGTTGGCCACCCAGCTGCTTAATTT-GATCAAATAAAGTGCTGCTTG 61

Query 101 ATCAAGAAGTCTCCGCTTGGGTTTCATCTGATTAGGTTGATACGGTATCTCAGTTTTAAAG 160
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 62 ATCAAGAAGTCTCCGCTTGGGTT-ATCTGATTAGGTTGATACGGTATCTCAGTTTTAA-G 119

Query 161 TAAGGGACTGGGATCTTGCAGGCAAACAGCTTGCCGTGCACAGTTGAAGCTATGGTGCTG 220
        |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 120 TAAGGGACTGGGATCTTGCAGGCAAACAGCTTGCCGTGCACAGTTGAAGCTATGGTGCTG 179

Query 221 ATCAGAGTGATATCAAACCTTCTGATACTACAGCTTTCTTACGCACAAAAGTCTTCTGAA 280
        ||||||||||| ||||||| ||||| |||||||
Sbjct 180 ATCAGAGTGATAGCAAACCTTCTGATATTACAGGTTTCTTACGCACAAAAGTCTTCTGAA 239

Query 281 CTGGTCGTCCGAGGTAGATGAATGTGACATAAATGAACATCCTTTCTTGCATTCTGTGA 340
        ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 240 CTGGTCGTTCGAGGT-GATGAATGTGACATAAATGAACATCCTTTCTTGCATTCTGTGA 298

Query 341 CTCTCAGGGTATTTCTGTGGTGGGACTTTGATCAACAAGGAATGGGTGCTGACCGCTGC 400
        ||||||||||||||||||| ||||||||||| |||||||
Sbjct 299 CTCTCAGGGTATTTCTGTGGTTTACTTTGATCAACCAGGAATGGGTGCTGACCGCTGC 358

Query 401 AACTGTGACAGTAAAAATTTCAAGATGAAGCTTGGTGTGCATAGCATAAAGGTACAAAA 460
        ||||||||| || ||| || ||| ||||| ||| ||| |||
Sbjct 359 AACTGTGACAGGAGATTTATGCGCATATACCTTGGTATACATGCCCGAAGTGTAGCAAA 418

Query 461 TAAGGATGAGCAGACAAGAGTCCCAAAGGAGAAGTTCATTTGTCCCAATAGGAAAAAAGA 520
        || ||||||| || ||||| ||||||||||||||||||| |||
Sbjct 419 TGATGATGAGGTGATAAGATACCCAAAGGAGAAGTTCATTTGTCCCAATAAGAATATGAG 478

Query 521 TGACGTAGTGGACAAGGACATCATGTTGATCAGGCTGAACAGACCTGTTAGGAAGAGTGC 580
        ||||| | ||||||| ||||||| ||||||| ||||| |||||
Sbjct 479 TGACGAAAAGGACAAGGACATTATGTTGATCAGGCTGAACAGACCTGTCAAAAACAGCAC 538

Query 581 ACTCATCGCGCCTCTCCGTTTGCCCTTCCCGCCCTCCCAGTGTGGGTTTCAGTTTGCCGTGT 640
        || ||||||| || || ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 539 ACACATCGCACCTATCAGCTTGCCCTTCCAACCCTCCCAGTGTGGGCTCAGTTTGCCGTGT 598

Query 641 TATCGGATGGGGCGCAATCACATCTCTAAAGTGTCTTATCCTGATGTCCTTCATTGTGC 700
        ||| ||||||| ||||||| ||||| | ||||||| |||||||
Sbjct 599 TATGGGATGGGGCTCAATCACAATTCTAACGACACTTATCCCGATGTCCTTCATTGTGC 658

Query 701 TAAATAAATACTCGATCATGCGGTGTGTGAGCAGCTTACCCATGGTGGCCGCGAC 760
        ||| ||||||| || || || ||||||| ||||||| |||
Sbjct 659 TAACATTAACCTGGTCAATGATACGGTGTGTGCGTGGAGCTTACAAGAGGTTTCCGCGCAA 718

Query 761 AAGCACAACATTGTGTGCAGGTATC 785
        ||||| |||||||
Sbjct 719 AAGCAGAACATTGTGTGCAGGTGTC 743

```

Figura 3: Blastn da sequência nucleotídica da serinoprotease da biblioteca de cDNA de *Bothrops pauloensis* contra a sequência de cDNA da serinoprotease da biblioteca de cDNA de *B. insularis* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

ATAATGCCAACTTTGTACAAAATAGTTGGCATAACTCTGTCAGCGTTCCAGATTGTTGGCCACCCAGCTGCTTAATTTTCG
 GTCAAATAAAGTGCTGCTTGATCAAGAAGTCTCCGCTTGGGTTCATCTGATTAGGTTGATACGGTATCTCAGTTTTAAAG
 TAAGGGACTGGGATCTTGCAGGCAAAACAGCTTGCCGTGCACAGTTGAAGCTATGGTGCTGATCAGAGTGATATCAAACCT
 TCTGATACTACAGCTTCTTACGCACAAAAGTCTTCTGAAGTGGTCGTCGGAGGTAGATGAATGTGACATAAATGAACAT
 CCTTTCCTTGCAATTCCTGTACTCTCACGGGTATTTCTGTGGTGGGACTTTGATCAACAAGGAATGGGTGCTGACCGCTGC
 AACTGTGACAGTAAAAATTTCAAGATGAAGCTTGGTGTGCATAGCATAAAGGTACAAAATAAGGATGAGCAGACAAGAG
 TCCCAAAGGAGAAGTTCATTTGTCCCAATAGGAAAAAAGATGACGTAGTGGACAAGGACATCATGTTGATCAGGCTGAAC
 AGACCTGTTAGGAAGAGTGCATCATCGCGCTCTCCGTTTGCCCTCCCGCCCTCCAGTGTGGGTTTCAGTTTGCCGTGT
 TATCGGATGGGGCGCAATCACATCTCCTAAAGTGTCTTATCTGATGTCCCTCATTGTGCTAAAATTAACATACTCGATC
 ATGCGGTGTGTCGAGCAGCTTACCCATGGTGGCCGGCGACAAGCACAAACATTGTGTGCAGGTATC

Figura 4: Sequência parcial de nucleotídeos da serinoprotease de *B. pauloensis*.

3.2. Amplificação do cDNA da serinoprotease rBpSP-II.

O cDNA correspondente à serinoprotease de interesse (rBpSP-II) foi amplificado a partir da técnica de PCR do material da biblioteca de *Bothrops pauloensis*. A análise do produto de PCR em gel de agarose permitiu a visualização de uma banda com tamanho em média de 720 pares de bases conforme o esperado, como está demonstrado na (Figura 5). A quantificação do produto purificado indicou a concentração de 260 ng/μL.

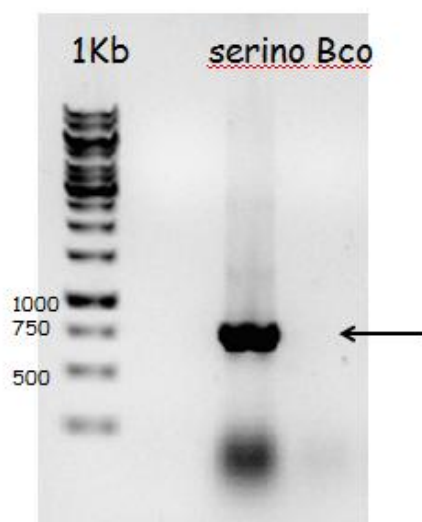


Figura 5: Análise do produto de amplificação do cDNA da serinoprotease de interesse por eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo como mostrado pela seta. 1 kb: padrão de pares de base (1 kb Gene Ruller, Fermentas); serino: cDNA da serinoprotease de *Bothrops pauloensis* (260 ng/μL); Bco: controle negativo.

3.3. Clonagem do vetor pTZ57R/T-rBpSP-II em *E. coli* DH5α competentes.

O material de interesse amplificado e purificado (rBpSP-II), foi clonado diretamente no vetor pTZ57R/T e posteriormente transformados em células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes e plaqueadas para a obtenção de colônias transformadas. Após 24 horas de crescimento das colônias transformadas, cinco destas resistentes ao antibiótico ampicilina foram selecionadas para confirmar a presença dos plasmídeos recombinantes. Foi realizada uma PCR diretamente das colônias utilizando os mesmos oligonucleotídeos *sense* e *antisense*, conforme mostra a figura 6. Todos os clones recombinantes foram positivos para o inserto da serinoprotease (rBpSP-II).

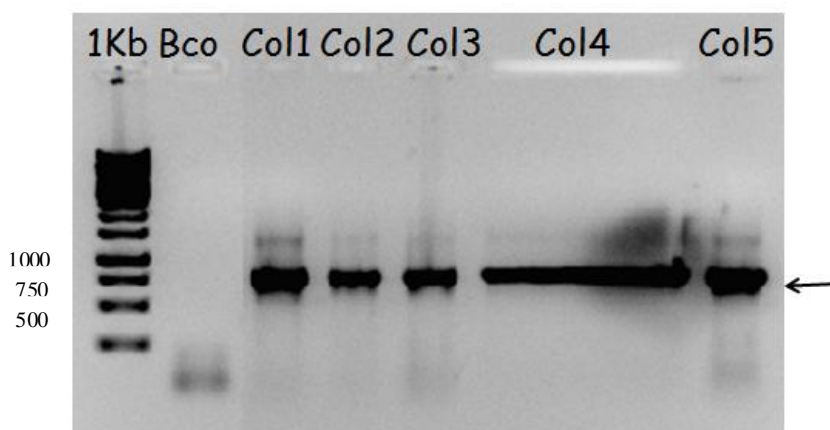


Figura 6: Amplificação dos clones recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1 kb: padrão de pares de base (1 kb Gene Ruller, Fermentas); Bco - controle negativo; Col 1, 2, 3, 4 e 5 – Colônias recombinantes (pTZ57R/T-rBpSP-II).

Após a confirmação dos clones recombinantes positivos (pTZ57R/T-rBpSP-II), as colônias foram crescidas em meio LB utilizando o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C e mantidos a uma rotação a 250 rpm, por 24 horas. Após o crescimento do inoculo, foi realizada lise alcalina para extração do plasmídeo pTZ57R/T-rBpSP-II do interior das bactérias e as amostras de interesse foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 7). As amostras de

cDNA plasmidial de interesse foram quantificadas, apresentando em média 100 ng/ μ L.

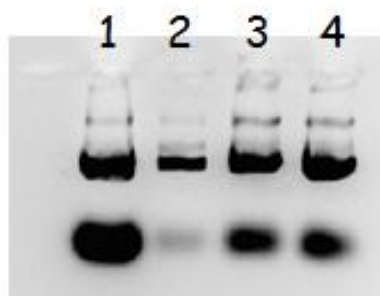


Figura 7: Miniprep dos clones recombinantes pTZ57R/T-rBpSP-II, inseridos nas colônias 1 a 4. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo.

Uma das amostras de cDNA plasmidial foi selecionada aleatoriamente para a digestão com as enzimas de restrição *Xho*I e *Sal*I para a remoção do inserto clonado no vetor de propagação pTZ57R/T. Paralelamente, o vetor de expressão pPICZ α A foi digerido com as mesmas enzimas de restrição presentes no inserto a ser clonado.

Após o preparo do inserto e do vetor com as enzimas de restrição *Xho*I e *Sal*I, as amostras foram ligadas usando a enzima T4 ligase e o material ligado foi transformado em *E. coli* da linhagem DH5 α através de choque térmico. Após a transformação, o material foi plaqueado contendo o meio LB Low Salt agar e 25 μ g/mL de antibiótico ZeocinaTM.

Dentre as diversas colônias que cresceram nas placas, 44 foram selecionadas aleatoriamente e a amplificação do cDNA de interesse foi realizada a fim de encontrar quais dessas colônias eram positivas para o vetor com o inserto (pPicZ α A-rBpSP-II). Das 44 colônias selecionadas, apenas seis foram positivas quando analisadas por PCR. A figura 8 apresenta os clones recombinantes.

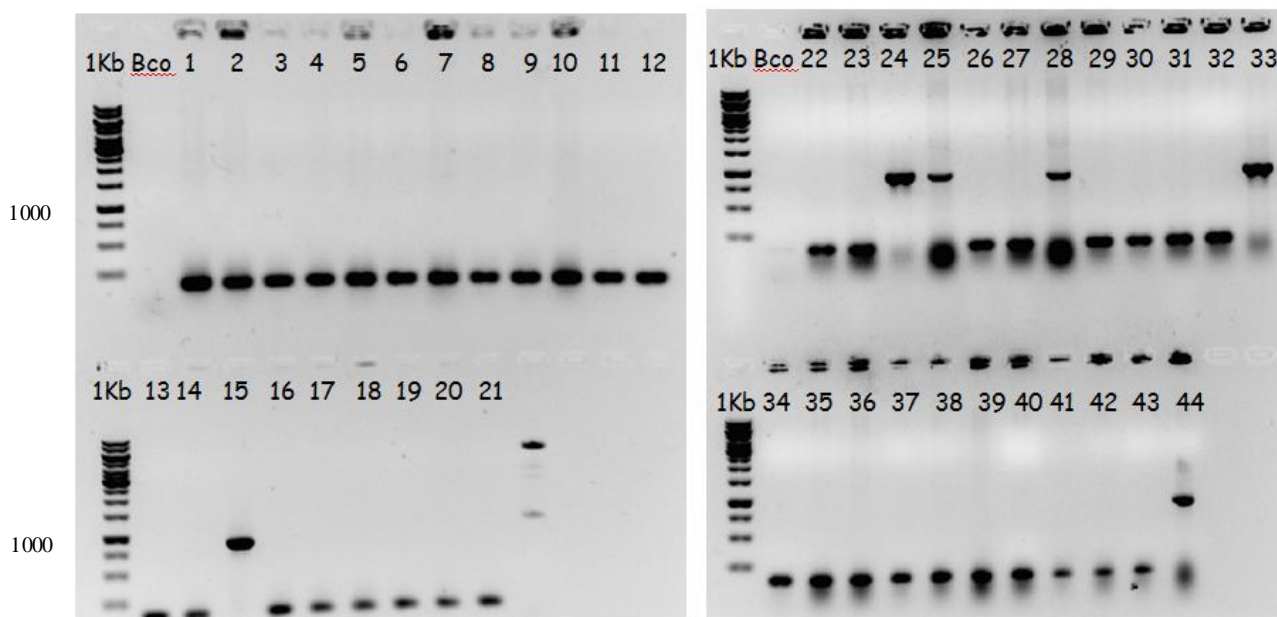


Figura 8: PCR de colônia para confirmação dos clones recombinantes em vetor pPICZαA-rBpSP-II. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1 kb: padrão de pares de base (1 kb Gene Ruller, Fermentas); Bco – controle negativo; 1 – 44 – número das colônias.

Os clones recombinantes positivos foram testados por PCRs para confirmação da orientação do inserto (rBpSP-II). Três combinações de reações foram realizadas, onde os oligonucleotídeos utilizados variaram para confirmação correta do inserto. Na primeira reação, os oligonucleotídeos utilizados foram: *αFactor* na orientação 5' e o reverso específico da serinoprotease na orientação 3'. Para a segunda reação, os oligonucleotídeo *sense* específico da serinoprotease e o AOX3' na orientação 3' e na terceira reação os oligonucleotídeos específicos *sense* e *antisense*. A figura 9 apresenta as análises das orientações dos clones recombinantes. Para a primeira reação esperava-se um tamanho de 759 nucleotídeos, ou seja, 39 nucleotídeos a partir do oligonucleotídeo *α-factor* até o sítio de restrição para a enzima *XhoI* somados aos 720 nucleotídeos do inserto serinoprotease (rBpSP-II). Na segunda reação esperava-se um tamanho de 847 nucleotídeos, ou seja, 720 nucleotídeos do inserto somados a 127 nucleotídeos até o oligonucleotídeo AOX3'.

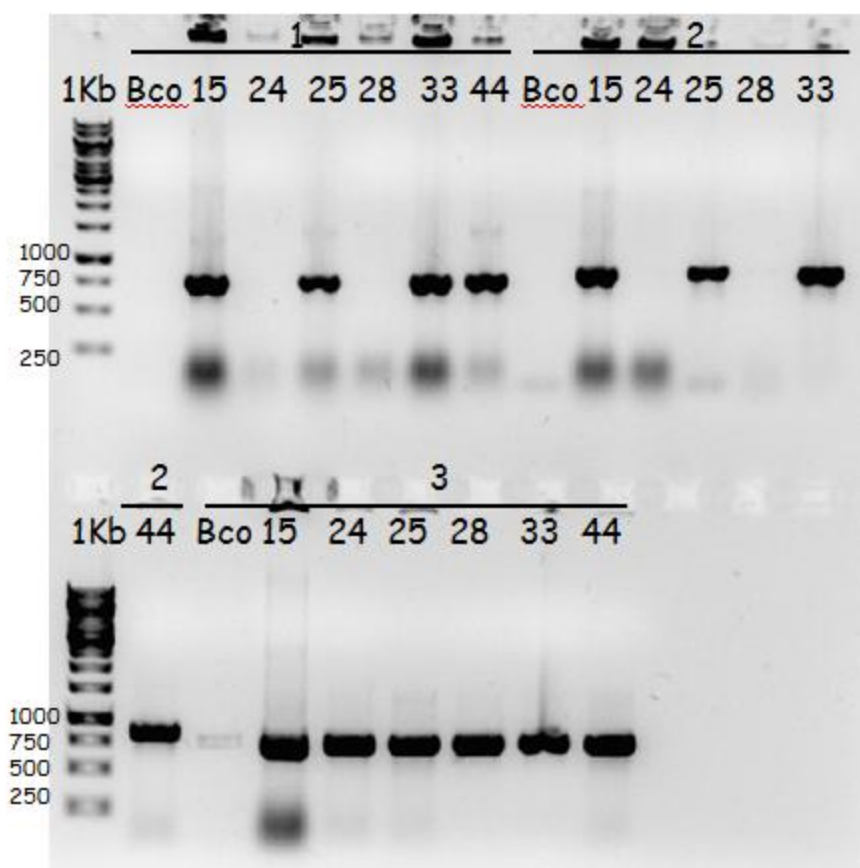


Figura 9: PCR de colônia para confirmação da orientação dos clones recombinantes em vetor pPICZαA-rBpSP-II. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1 kb: padrão de pares de base (1 kb Gene Ruller, Fermentas); Bco – controle negativo; 15, 24, 25, 28, 33 e 44 – número das colônias positivos. 1 – PCR com oligonucleotídeos *α-factor* e *antisense* específico; 2 – oligonucleotídeos *sense* específico e AOX3'; 3 – oligonucleotídeos *sense* e *antisense* específicos.

Os clones positivos e confirmados na orientação correta foram crescidos em meio LB Low Salt com antibiótico ZeocinaTM (25 µg/mL) e posteriormente foi realizada a lise alcalina para extração de DNA plasmidial. Os clones 15 e 33 apresentaram uma concentração de 80 ng/µL de DNA plasmidial enquanto os clones 25 e 44 apresentaram 200 e 170 ng/µL respectivamente. Esses clones positivos foram sequenciados para confirmar a orientação e a sequência correta do inserto da rBpSP-II. O clone escolhido após sequenciamento foi o clone 33 (Figura 10).

Binsularis	MVLIRVIANLLILQVSYAQKSELVVGDECDINEHPFLAFLYSHGYFCGLTLINQEWVL	60
SerinoRec	-----IVGGDECNINEHPFLAFLYSHGYFCGLTLINQEWVL	36
	:*****:*****	
Binsularis	TAAHCDRRFMRIYLGIHARSVANDDEVIRYPKEKFCPNKNMSDEKDKDIMLIRLNRPVK	120
SerinoRec	TAAHCDRRFMRIYLGIHARSVANDDEVIRYPKEKFCPNKNMSDEKDKDIMLIRLNRPVK	96

Binsularis	NSTHIAPISLPSNPPSVGSCRVMGWGSITIPNDTYPDVPHCANINLVNDTVCRGAYKRF	180
SerinoRec	NSTHIAPISLPSNPPSVGSCRVMGWGSITISNDTYPDVPHCANINLVNDTVCRGAYKRF	156

Binsularis	PAKSRTLCAVLQGGKDTCVGDSGGPLICNGTFQGI VSWGGKVCARPRKPALYTKVFDYL	240
SerinoRec	PAKSRTLCAVLQGGIDTCVGDSSGGPLICNGQFQGI VSWGSDPCAKPRKPALYTKVFDYL	216

Binsularis	PWISIIAGNKTATCPP-----	257
SerinoRec	PWISIIAGNKTATCPPVDHHHHH	241

Figura 10: Análise do sequenciamento da serinoprotease recombinante. Binsularis - *Bothrops insularis* cluster BITS01A (GenBank: AF490536.1); SerinoRec: rBpSP-II – serinoprotease recombinante sequenciada pelo sequenciador automático DNA Sequencer ABI Prism 377 (Applied Biosystem). Em amarelo – tríade catalítica da serinoprotease - rBpSP-II; Em vermelho – resíduos de cisteína; Em cinza – cauda de histidina.

O material obtido a partir da lise alcalina foi linearizado com a enzima *PmeI* conforme especificado na metodologia no item 2.3.10 e mostrado na figura 11.

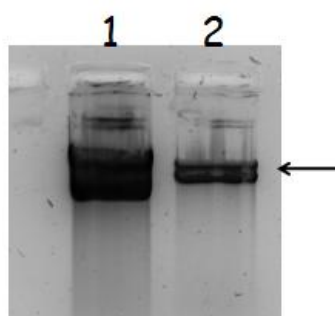


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% da linearização do material de interesse com a enzima de restrição *PmeI*, corado com brometo de etídeo. 1 - Não linearizado; 2- Linearizado.

A amostra linearizada e precipitada foi transformada por eletroporação em leveduras *P. pastoris* competentes linhagem KM71H, preparadas conforme metodologia descrita no item 2.3.11. Após restabelecimento das células com sorbitol 1 M por duas horas a 30 °C, as leveduras foram plaqueadas em meio YPDS (meio YPD + sorbitol) com antibiótico Zeocina™ em placas de 100 e 500 µg/mL. Após quatro dias de incubação a 30 °C em estufa, as placas foram repicadas em uma nova placa de petri para a realização da varredura em placa de 24 poços.

Na placa contendo 500 µg/mL de Zeocina™, cresceram sete colônias recombinantes e nas outras placas contendo 100 µg/mL de Zeocina™, cresceram diversas colônias. Todas as colônias recombinantes da placa de 500 µg/mL foram repicadas e mais 20 colônias escolhidas aleatoriamente das outras placas contendo 100 µg/mL de Zeocina™. As colônias (sete da placa contendo 500 µg/mL de Zeocina™ e três das placas contendo 100 µg/mL de Zeocina™) foram amplificadas pelo método de PCR para confirmação do inserto.

3.4. Indução em larga escala da rBpSP-II em *P. pastoris*.

Um clone positivo foi selecionado para indução em larga escala da serinoprotease recombinante rBpSP-II. Após os tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de indução, o sobrenadante das culturas foi analisado em gel SDS-PAGE a 12,5%, corado com *Coomassie Brilliant Blue* para determinação dos níveis de expressão. A análise da expressão da serinoprotease recombinante rBpSP-II foi realizada pelo *website* de livre acesso GelAnalyser para confirmação da banda correspondente ao extrato celular de *P. pastoris* antes da indução e após indução com metanol 0,75% por 144 horas (Figura 12).

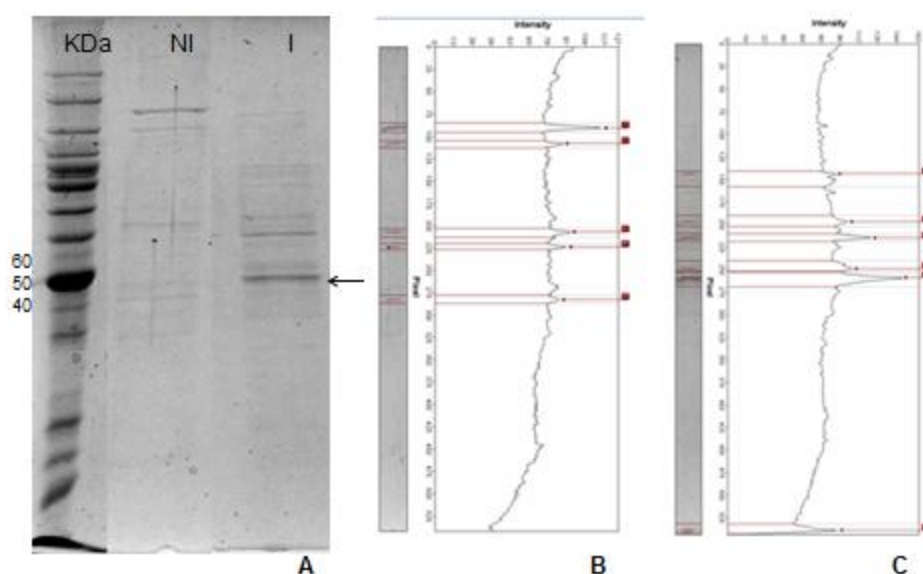


Figura 12: Análise da expressão da proteína recombinante em *P. pastoris* a 26 °C por 144 horas. **(A):** SDS-PAGE 12,5%, corado com *Comassie Brilliant blue*. kDa – Bench Marker Protein Ladder (Invitrogen), NI – 0h e I – 144h. **(B):** Análise das bandas do extrato celular de *P.pastoris* antes da indução com metanol pelo programa GelAnalyser. **(C):** Análise das bandas do extrato celular de *P.pastoris* após a indução com metanol a 26 °C por 144 horas pelo programa GelAnalyser.

3.5. Purificação da rBpSP-II.

Decorridas as 144 horas, a suspensão celular foi centrifugada a 1700 g por 5 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro 0,45 µm. Após, a purificação da rBpSP-II foi realizada conforme metodologia descrita no 2.4 por cromatografia de afinidade. A figura 13 mostra os resultados obtidos na purificação da rBpSP-II analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida.

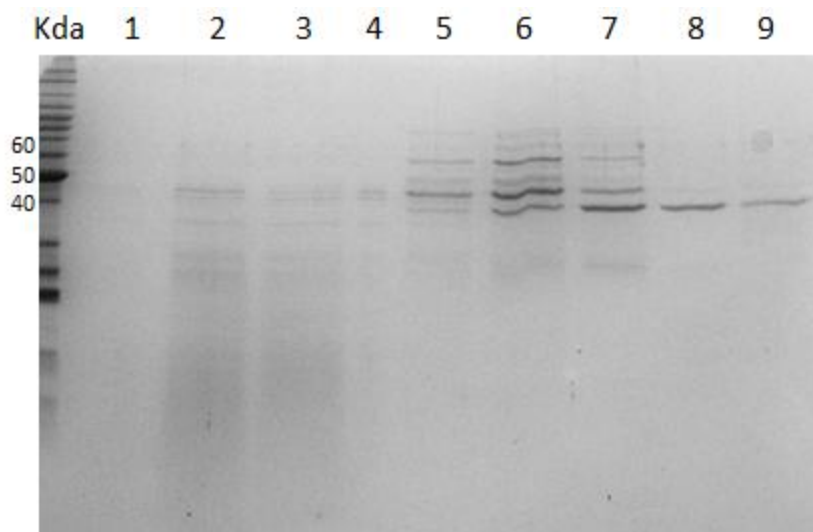


Figura 13: Eletroforese em gel de acrilamida 12,5% das frações obtidas no processo de purificação da rBpSP-II em resina de Níquel. kDa: Bench Marker Protein Ladder (Invitrogen); 1 – Suspensão de células de levedura antes da indução da expressão gênica; 2 – Eluato; 3 – Lavagem; 4 – Concentração de imidazol 10 mM; 5 – Concentração de imidazol 25 mM; 6 – Concentração de imidazol 50 mM; 7 – Concentração de imidazol 75 mM; 8 - Concentração de imidazol 100 mM; 9 – Concentração de imidazol 250 mM.

Como pode ser observado, a rBpSP-II começou a ser eluída a partir da concentração de 25 mM de imidazol, mas ainda com muitos contaminantes. Somente nas concentrações de 100 mM e 250 mM de imidazol foi possível observar banda única no gel, indicando uma purificação mais eficiente. Após diálisar, liofilizar e ressuspender a proteína em água ultrapura, a quantificação foi realizada pelo método de Bradford (1976), apresentando um rendimento total máximo de 0,83 mg/L de proteína. Entretanto, nas demais induções realizadas nas mesmas condições, o rendimento total máximo de proteína foi 1,34 mg/L.

3.6. Imunodetecção da rBpSP-II.

Para detecção da proteína recombinante foi realizada a técnica de *Western Blotting* utilizando anticorpo anti-His (*anti-his antibody* - GE) (Figura 14). Os anticorpos anti-His foram capazes de detectar a banda da proteína esperada no peso molecular de aproximadamente 40 kDa.

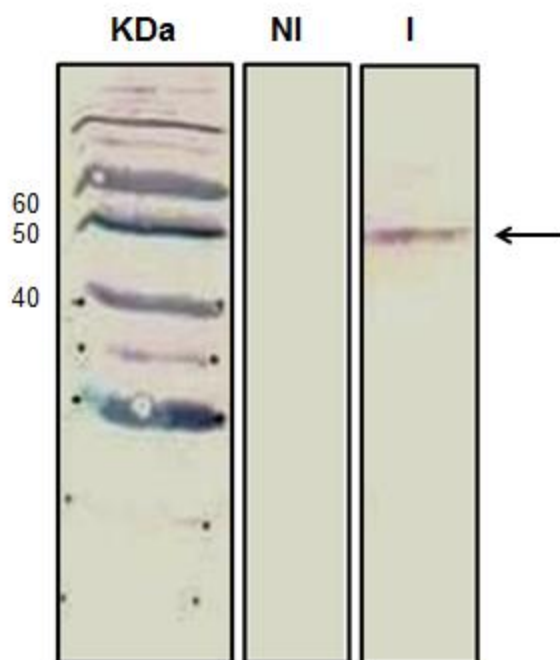


Figura 14: Western blotting da serinoprotease recombinante utilizando anticorpo primário anti-His (GE). SDS-PAGE 12,5%, corado por *Comassie blue*. Proteína recombinante pura com massa molecular esperada de 40 kDa. Marcador de massa molecular *Bench Marker Protein Ladder*, 1 e 2 – rBpSP-II (em duplicata). Seta indica a proteína recombinante.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

A estimativa de massa molecular da rBpSP-II foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% como mostra a figura 15. Pode-se observar uma única banda com massa aproximada de 44,5 kDa.

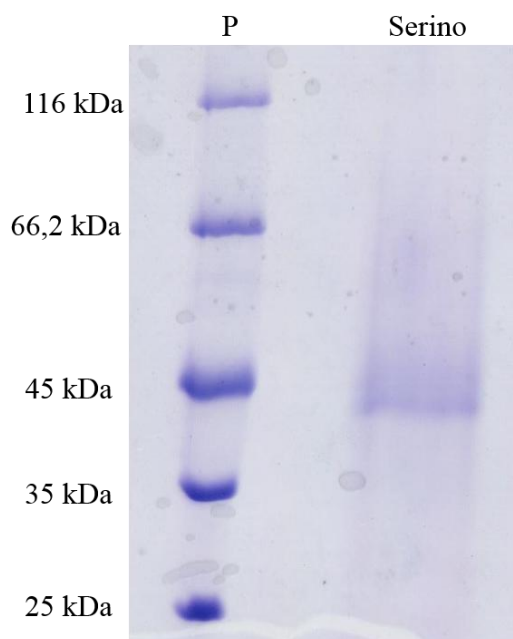


Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12.5% na presença de agentes desnaturantes (SDS-PAGE) da rBpSP-II. P – Padrão de massa molecular Thermo scientific: β -galactosidase (116 kDa), Soroalbumina bovina (66.2 kDa), Ovoalbumina (45.0 kDa), lactato desidrogenase (35.0 kDa), Enzima de Restrição Bsp98I (25.0 kDa), β -lactoglobulina (18.4 kDa), lisozima (14.4 kDa). Serino – rBpSP-II.

3.8. Caracterização bioquímica.

3.8.1. Atividade coagulante.

A atividade coagulante realizada para a determinação da DMC foi realizada segundo a metodologia descrita no item 2.7.1. Foram aplicados 5 μ g de peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em 200 μ L de plasma bovino para o controle positivo, tendo como tempo controle de 77 segundos.

A DMC foi realizada testando diversas doses da enzima recombinante a partir de 1 μ g até a dose final de 48 μ g. A dose mínima coagulante capaz de coagular o plasma bovino em 60 segundos foi determinada a partir da reta por regressão linear como apresentado abaixo na figura 16, sendo 48 μ g de rBpSP-II. O grau de confiabilidade dos resultados apresentados na regressão linear (R^2) foi de 93%.

Tabela 1: Valores encontrados nos testes utilizados na determinação da DMC.

Amostra	Dose (μg)	Tempo (s)
Controle	5	77
rBpSP-II	24	89,8
rBpSP-II	25,6	95,5
rBpSP-II	27,2	87,4
rBpSP-II	28,8	83,4
rBpSP-II	33,2	83,3
rBpSP-II	48	60,6

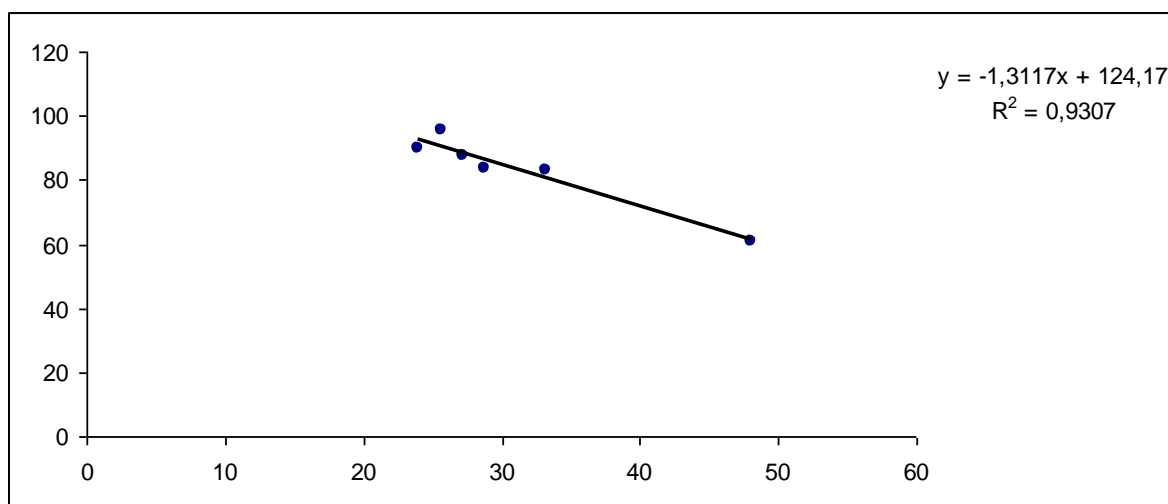


Figura 16: Gráfico de regressão linear utilizado na determinação da DMC. Sendo que o eixo **X** representa a concentração da proteína em μg e o eixo **Y** representa o tempo em segundos. A partir desta construção gráfica, foi determinado o valor da Dose Mínima Coagulante (DMC).

3.8.2. Atividade Fibrinogenolítica.

A atividade proteolítica da rBpSP-II sobre o fibrinogênio, realizada conforme item 2.7.2, está apresentada na eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% com agentes desnaturantes, como mostrado na figura 17.

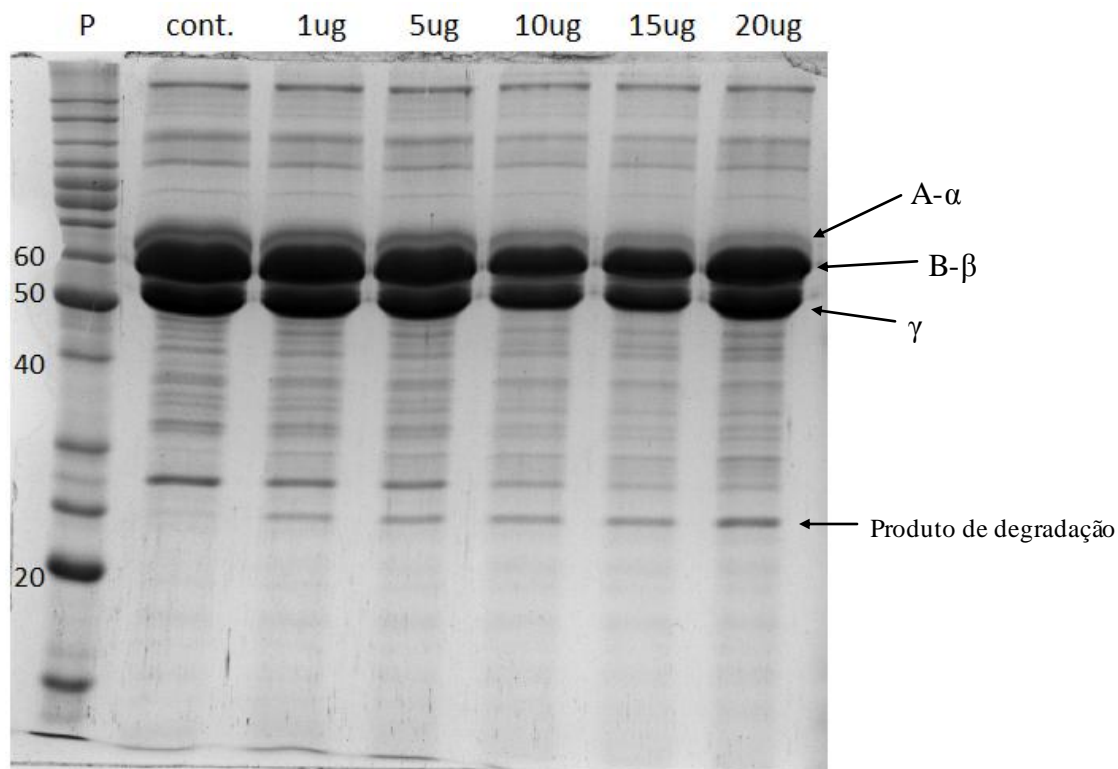


Figura 17: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de agentes desnaturantes dos produtos de proteólise do fibrinogênio pela rBpSP-II. Em cada teste foram incubados 50 μ L de fibrinogênio com diferentes doses da proteína (0 μ g, 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g e 20 μ g) a 37 °C por uma hora.

Analizando o gel após uma hora de incubação da rBpSP-II com o fibrinogênio foi possível perceber a degradação parcial da cadeia A- α . Entretanto, observando o perfil eletroforético, não há efeito proteolítico aparente sobre a cadeia B- β e sobre a cadeia γ .

3.8.3. Atividade sobre substratos cromogênicos.

A rBpSP-II apresentou atividade proteolítica dose dependente sobre os substratos S-2222 (substrato para o fator Xa), S-2238 (substrato para trombina) e S-2251 (substrato para plasmina), como mostra a figura 18.

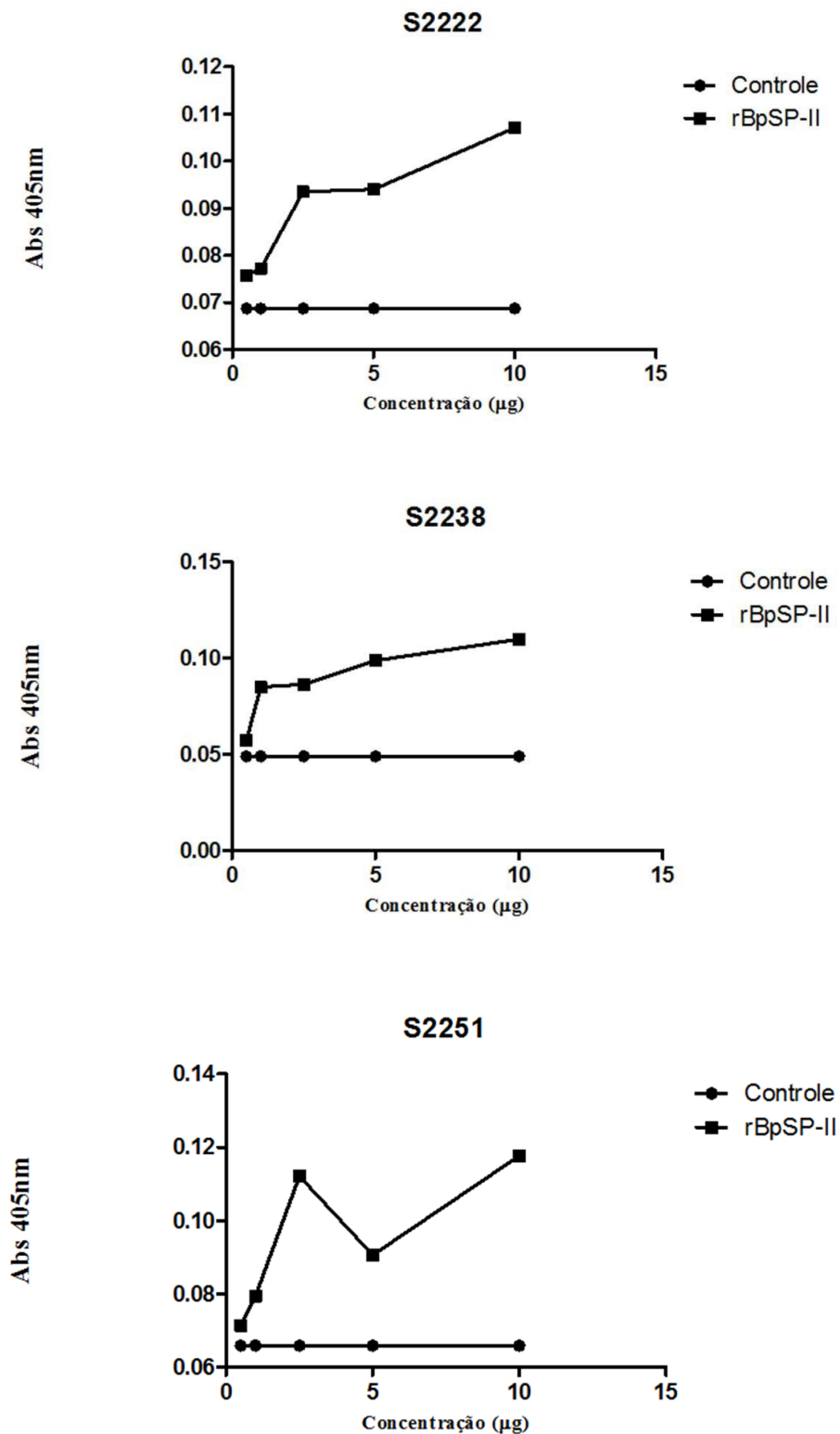


Figura 18: Atividade proteolítica da rBpSP-II sobre diferentes substratos cromogênicos. A determinação da atividade proteolítica foi realizada com diferentes doses da enzima sobre os substratos S-2222, S-2238 e S-2251 incubados por 45 minutos a 37 °C. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm.

Discussão e Conclusão

As proteínas presentes na peçonha ofídica são há muito tempo alvo de estudo devido a sua potencialidade como novos agentes terapêuticos, não apenas no tratamento de acidentes ofídicos, mas também no tratamento de outras patologias (SWENSON E MARKLAND, 2005)

Dentre tais proteínas, as serinoproteases se destacam na área de estudos relacionados com os mecanismos de coagulação sanguínea com diversas aplicações atribuídas a elas no desenvolvimento de tratamentos de desordens hemostáticas. Nesta classe, as SVTLEs merecem um enfoque especial, uma vez que são utilizadas não apenas em pesquisa básica, mas também na aplicação clínica (BRAUD et al., 2000; HENRIQUES et al., 2004; MARKLAND, 1998).

Com base nisto, este trabalho teve como objetivo clonar e expressar uma serinoprotease *trombin-like* da peçonha de *B. pauloensis*, com o intuito de padronizar uma nova forma de obtenção destas enzimas através da tecnologia de expressão heteróloga, evitando assim o árduo processo de purificação das proteínas a partir de sua fonte natural, a peçonha ofídica. Diversos trabalhos apresentam inúmeras vantagens em se obter uma proteína por técnicas de biologia molecular, em detrimento das metodologias tradicionais de purificação da proteína nativa (MAEDA et al., 1991; SELISTRE-DE-ARAÚJO et al., 2000; YU et al., 2007; IDIRIS et al., 2010).

Os primeiros estudos de expressão heteróloga de proteínas tinham as bactérias como hospedeiro mais utilizado. A produção em larga escala de proteínas em bactérias se mostrou uma técnica eficaz, porém as bactérias não são capazes de realizar modificações pós-traducionais que são essenciais para algumas proteínas. Com isso em mente, alguns tipos de leveduras se tornaram hospedeiros mais apropriados, visto que também são de manipulação simples e possuem as organelas de uma célula eucarionte. A levedura *Pichia pastoris* apresenta muitas das vantagens mostradas pelos eucariontes superiores que são utilizados como sistemas de expressão, tais como processamento de proteínas, enovelamento e modificações pós-traducionais. Além disso, *Pichia pastoris* é tão fácil de ser manipulada quanto *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, além de ser mais rápida e mais barata do que outros sistemas de expressão eucarióticos,

geralmente produzindo altos níveis de expressão proteica em temperatura de crescimento ótima que varia de 26 à 30°C (DALY & HEARN, 2005; LI et al., 2007).

As serinoproteases são enzimas que dependem de modificações pós-traducionais para exercerem a sua função (NEURATH, 1957; PAGE & DI CERA, 2008); por este motivo foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho um sistema de expressão em *Pichia pastoris*. Para tanto, o gene de interesse foi clonado em um vetor de expressão pPICZ α A e inserido no organismo hospedeiro. Este vetor apresenta o gene AOX1, responsável por codificar a enzima álcool oxidase, sendo regulado e induzido por metanol. Tal característica permite que este gene seja utilizado como promotor da expressão do gene de interesse que codifica a proteína heteróloga. O vetor pPICZ α A possui uma sequência sinal (fator α) que permite que a proteína de interesse seja secretada, além de também possuir 3 *frames* de leitura para facilitar a clonagem no sentido correto, com a cauda de poli-histidina na porção C-terminal e o gene que confere resistência ao antibiótico ZeocinaTM.

A primeira indução da expressão da proteína recombinante, apresentou o rendimento de 0,83 mg/L, porém tal rendimento apresentou grandes variações nas demais induções, indo desde 0,7 mg/L até o rendimento máximo de 1,34 mg/L. Alguns trabalhos publicados citam que o rendimento final de proteína recombinante obtida tende a variar significativamente dependendo da proteína a ser expressa, do vetor escolhido e das condições de indução (ANANGI et al, 2007), porém nenhum deles citou variações no rendimento final de um sistema ao tentar reproduzir as induções.

Em geral, os trabalhos publicados que realizaram a expressão de SVTLEs em sistema *Pichia pastoris*, obtiveram alto rendimento final médio. Exemplos disso são a Batroxobina, com um rendimento de 7 mg/L (YOU et al., 2004) e a Gussurobina com um rendimento de 3,5 mg/L (YANG et al., 2002). Contudo, a proteína Batroxobina é encontrada em quantidades abundantes na peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e *Bothrops atrox*. A peçonha de *Bothrops pauloensis* tem sido estudada há vários anos por nosso grupo de pesquisa e a serinoprotease rBpSP-II nunca teve a sua forma nativa isolada por meio dos procedimentos de purificação tradicionais, o que leva a crer que se trata de uma proteína pouco expressa na glândula venenífera de tal serpente. Observando o gráfico do

proteoma da peçonha de *B. pauloensis* (Figura 19), podemos verificar que as serinoproteases representam em torno de 10% da composição proteica desta peçonha (RODRIGUES, 2012). Até o momento, a única serinoprotease isolada da peçonha de *B. pauloensis* foi a enzima BpSP-I, com uma recuperação de 3,1% do total proteico da peçonha bruta (COSTA et al, 2009).

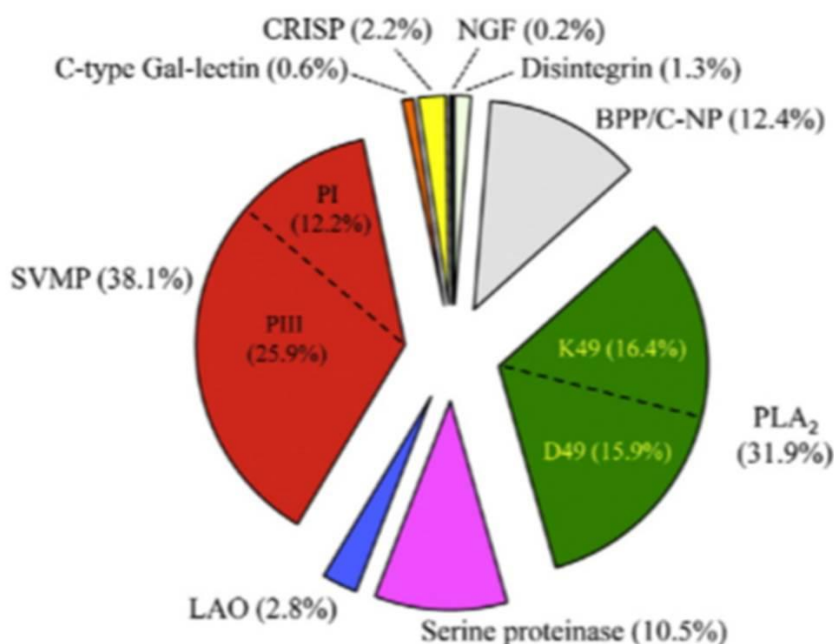


Figura 19: Perfil proteômico da peçonha de *B. pauloensis* exibindo a ocorrência das diferentes classes de toxinas identificadas na sua constituição. A ocorrência relativa, expressa em porcentagem, está exibida entre parênteses. Abreviações: CRISP – Proteína secretória rica em cisteína; SVMP – Metaloproteases de peçonha ofídica; PLA₂ - Fosfolipases A₂; BPP/C-NP – Peptídeos potencializadores de bradicinina; LAO - ácido L-amino-oxidase; NGF – fator de crescimento neural. **Fonte:** Rodrigues, 2012.

A proteína recombinante obtida foi denominada rBpSP-II e apresentou massa molecular aproximada estimada em SDS-PAGE foi de 44,5 kDa, massa correspondente a 28 kDa da proteína recombinante, com a adição de aminoácidos provenientes da transcrição de parte do vetor de expressão e possíveis sítios de glicosilação. A proteína Batroxobina recombinante apresentou massa molecular de 33 kDa, em contraste com os 37 kDa da proteína nativa, quando analisada em SDS-PAGE. A diferença na migração das proteínas foi atribuída as diferentes glicosilações realizadas nas células da levedura e das

serpentes, já que as glicosilações costumam variar significativamente até mesmo entre serpentes (YOU, 2004).

No teste de atividade coagulante foram necessários 48 µg de rBpSP-II para se atingir a dose mínima coagulante. Uma vez comparada com a BpirSP41 de *B. pirajai* que apresentou uma DMC de 3,5 µg, a proteína recombinante apresentou baixa eficiência. Porém, a rBpSP-II se aproximou mais em eficiência em comparação com a BpirSP27, outra serinoprotease isolada de *B. pirajai*, que apresentou a DMC de 20 µg (MENALDO et al, 2012). Além disso, estudos mostram que existem diferenças no tempo de coagulação de enzimas nativas e recombinantes, como evidenciado no teste de coagulação da Batroxobina (YOU et al, 2004)

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio mostrou que a rBpSP-II é capaz de clivar preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio, sem efeito aparente sobre a cadeia B β mesmo após uma hora de incubação. A enzima *thrombin-like* BpSP-I apresentou atividade similar, ao clivar a cadeia A α do fibrinogênio. Contudo, a partir do tempo de uma hora de incubação a BpSP-I foi capaz de clivar parcialmente a cadeia B β do fibrinogênio (COSTA, 2009). Em geral, as SVTLEs são capazes de clivar tanto a cadeias A α quanto a B β do fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeos A (FpA) e fibrinopeptídeos B (FpB) respectivamente, porém a maioria delas cliva preferencialmente uma destas cadeias do fibrinogênio (PIRKLE, 1998; MARKLAND, 1998; MATSUI et al., 2000; BORTOLETO et al., 2002).

Na análise da atividade da rBpSP-II sobre substratos cromogênicos foi possível observar que a enzima possui atividade proteolítica sobre os substratos S-2222 (substrato para o fator Xa), S-2238 (substrato para trombina) e S-2251 (substrato para plasmina). A capacidade de catalisar a hidrólise do substrato cromogênico S-2238 demonstra que a rBpSP-II apresentou ação esperada de uma SVTLE. Em comparação, a proteína BpSP-I foi capaz de hidrolisar o substrato para trombina, porém não apresentou efeito algum sobre o substrato para a plasmina (COSTA, 2009).

Estes resultados indicam que a rBpSP-II apresentou as funções esperadas de uma enzima *thrombin-like*, sendo capaz de coagular o plasma, clivar o fibrinogênio e catalisar a hidrólise de substratos cromogênicos para trombina,

fator Xa e plasmina. Tais características tornam a enzima rBpSP-II uma molécula atrativa para estudos adicionais buscando uma melhor elucidação das características funcionais desta molécula, verificando a possibilidade de utilização da rBpSP-II como possível molde na síntese de agentes terapêuticos em tratamentos de patologias hemostáticas.

Agradecimentos.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Declaro não haver conflito de interesses.

Referências Bibliográficas

ALSTCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v. 25 (17), p. 3389–3402, 1997.

ANANGI, R.; CHEN, C. Y.; CHENG, C. H.; CHEN, Y. C.; CHEN, C. C.; CHU, Y. P.; CHANG, C. C.; JENG, W. Y.; SHIU, J. H.; CHUANG W. J. Expression of snake venom toxins in *Pichia pastoris*. **Toxin Reviews**. v. 26, p. 169-187, 2007

ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAU, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Compedium Biochemistry and Physiology**. v. 102, p. 727-732, 1992.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Archives of Biochemistry Biophysics**. v.318, p.247–250, 1995.

BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M. T.; WATANABE, L.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification, characterization and crystallization of jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v.40, p.1307-1312, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**. v. 82, p. 851-859, 2000.

CREGG, J. M. Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols, Second Edition. v. 389. **Humana Press**, Totowa, NJ, 2007.

COSTA, F. L. S.; RODRIGUES, R. S.; Izidoro, L. F. M; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of a new thrombin-like enzyme isolated of *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 54, p. 725-735, 2008.

DA ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 22, n. 2, p. 383-393, Junho 2005.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**. v.18, p.119-138, 2005.

HENRIQUES, E. S.; FONSECA, N.; RAMOS, M. J. On the modeling of snake venom proteinase interactions with benzamidine-based thrombin inhibitors. **Protein Science**. v.13, p.2355-2369, 2004.

HIGUCHI D. A.; BARBOSA C. M. V.; BINCOLETTO C.; CHAGAS J. R.; MAGALHÃES A.; RICHARDSON M.; SANCHEZ E. F.; PESQUERO J. B.; ARAÚJO R. C.; PESQUERO J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**. v.89, p.319-328, 2007.

IDIRIS, A.; TOHDA, H.; KUMAGAI, H.; TAKEGAWA, K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.86, p.403–417, 2010.

ITOH, N.; TANAKA, N.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **The Journal Biological Chemistry**. v.262, p.3132–3135, 1987.

KORNALIK, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. **Pharmacology and Therapeutics**. v.29, p.353-405, 1985.

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

LI, P.; ANUMANTHAN, A.; GAO, X.; ILANGO VAN, K.; SUZARA, V. V.; DÜZGÜNEŞ, N.; RENUGOPALAKRISHNAN, V. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 142, p. 105-124, 2007.

MAEDA, M.; SATOH, S.; SUZUKI, S.; NIWA, M.; ITOH, N.; YAMASHINA, I. Expression of cDNA for Batroxobin, a Thrombin-Like Snake Venom Enzyme. **The Journal of Biochemistry**. v.109, p. 632-637, 1991.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**. v.36, p.1749-1800, 1998.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1477, p. 146-156, 2000.

MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P., SANTOS-FILHO, N. A.; MOURA, L. D. E. A.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biochimie**. v. 94 (12), p. 2545-2558, 2012.

NEURATH, H.; DIXON, G. H. Structure and activation of trypsinogen and chymotrypsinogen. **Fed. Proc.** v.16, p.791– 801, 1957.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**. v.224, p.350–357, 1984.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.65, p.1220-1236, 2008.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thromb. Haemost.** v. 79, p. 675-683, 1998.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**. v.40, p.343-350, 2012.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a non hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake venom. **Archives Biochemistry Biophysics**. v. 381, p. 213-224, 2000.

RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; RODRIGUES, V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**. v. 75 (9), p. 2707-2720, 2012.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SANCHEZ, E. E.; MÁRQUEZ, A.; CARVAJAL, Z.; SALAZAR, A. M.; GIRON, M. E.; ESTRELLA, A.; GIL, A.; GUERRERO, B.

Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venom with special reference in *Bothrops isabelae* venom. **Toxicon**. v. 56, p. 926-935, 2010.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, NY, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press. v. 3, 2001.

SANCHEZ, F. E.; SWENSON, S. Proteases from South American Snake Venoms Affecting Fibrinolysis. **Current Pharmaceutical Analysis**. v. 3, p. 147-157, 2007.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.74, p.5463-5467, 1977.

SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; SOUZA, G. E. P.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon** v. 28, p. 261-273, 1990.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; SOUZA, E. L.; BELTRAMINI, L. M.; OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. F. Expression, Refolding, and Activity of a Recombinant Nonhemorrhagic Snake Venom Metalloprotease. **Protein Expression and Purification**. v. 19, p. 41-47, 2000.

SERRANO, S. M. T.; MATOS, N. F. C.; MANDELBAUM, F. R.; SAMPAIO, C. A. M. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom. Isolation and activity of two serine proteinases MSPI e MSPII on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**. v.31, p.471, 1993.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**. *In press*, p. 1-18, 2005.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**. v.62, p.19-26, 2013.

SWENSON, S.; MARKLAND Jr., F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon** v.45, p.1021–1039, 2005.

YANG, Q.; HU, X. J.; XU, X. M.; AN, L. J.; YUAN, X. D.; SU, Z. G. Cloning, expression and purification of gussurobin, a thrombin-like enzyme from the snake venom of *Gloydius ussuriensis*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. v. 34, p. 6-10, 2002.

YOU, W. K.; CHOI, W. S.; KOH, Y. S.; SHIN, H. C.; JANG, Y.; CHUNG, K. H. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-

like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Letters**. v. 571, p. 67-73, 2004.

YU, X.; LI, Z.; XIA, X.; FANG, H.; ZHOU, C.; CHEN, H. Expression and purification of ancrod, an anticoagulant drug, in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v. 55, p. 257-261, 2007.