UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica)

TATIANA COMPORTE STABELINI

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE FRAGMENTOS DO TROCADOR DE Na⁺/Ca²⁺ POR RMN EM SOLUÇÃO

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo

Data do depósito na SPG:

10/09/2018

TATIANA COMPORTE STABELINI

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE FRAGMENTOS DO TROCADOR DE Na⁺/Ca²⁺ POR RMN EM SOLUÇÃO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestra em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas

São Paulo 2018 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

> Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Stabelini, Tatiana Comporte Estudos Estruturais de Fragmentos do trocador Na+/Ca2+ por RMN em solução / Tatiana Comporte Stabelini. - São Paulo, 2018. 100 p.
Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica. Orientador: Salinas, Roberto Kopke
1. Ressonância Magnética Nuclear. 2. Trocador Na+/Ca2+. 3. CALX. 4. TMH5. 5. XIP. I. T. II. Salinas, Roberto Kopke, orientador.

Às pessoas que mais me apoiaram nessa trajetória, Minha mãe, Lucia Meu pai, Gentil E meu noivo, Murilo Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Lúcia, por sempre estar do meu lado para me dar um ombro para chorar, um ouvido para ouvir e palavras carinhosas para me acalmar. Por todo suporte e atenção durante a minha graduação e mestrado. Por todo o carinho e amor, incondicionais, dia após dia. Por todos os valores de vida que me foram passados e que me fizeram ser o que sou hoje.

Ao meu pai, Gentil, por sempre me incentivar nos estudos e me mostrar que nunca é tarde para começar. Por todos os beijinhos de "Boa noite". Por todas as conversas regadas por "laran-monadas" feitas com tanto carinho para mim. Por todos os valores de vida que me foram passados e que me fizeram ser o que sou hoje.

Ao meu irmão, Caio, por me mostrar que é bom e necessário aproveitar mais a vida. Por todo carinho, respeito, risadas e cervejas.

Ao meu noivo, Murilo, por acreditar em mim mesmo quando eu achava que não aguentaria mais. Por todas as discussões que me ajudaram com meu projeto. Por ouvir meus desabafos e frustrações. Pelo apoio imensurável que me deu, na etapa que, até o momento, foi a pior que passei. Por todo amor e carinho.

Aos meus sogros, Dona Lucy e Senhor Manoel, por todo o carinho e atenção que sempre tiveram comigo.

Aos meus primos, Claudio e Terezinha, que me ajudaram e incentivaram no início da minha vida profissional.

Ao meu orientador, Roberto, por ter aberto as portas do laboratório. Pelo projeto de pesquisa fornecido. Pela atenção e orientação despendidas.

Aos professores, Chuck e Iolanda, por disponibilizar o uso de equipamentos, espaço do laboratório e reagentes.

À todos os meus colegas de laboratório, aos que ainda estão e aos que já passaram. Pelas discussões, pelas risadas, pelas brigas e pelo carinho.

Às técnicas de laboratório, Sandrinha, Ilda e Camila, por toda a dedicação, conversas e atenção. O IQ precisa de mais técnicas como vocês!

Aos meus amigos de departamento, Dimi, Gabs, Valds, Ricardo (chato), Adauto e Ray, que estiveram comigo durante a cansativa jornada da disciplina Biologia Molecular do Gene. E na grande etapa da da minha vida que foi a pós-graduação. (Sentirei saudades de vocês!)

À todos do bloco zero, principalmente, Natalia, Edinho e German Sgro, pelas conversas no meio do dia, pelos convites de cafés e bolos, pelos ouvidos e atenção para me ajudar.

A minha amiga e companheira de bancada, Angie Liseth (Angelina), por todas as vezes que precisei de ajuda. Por ser a maior ouvinte das minhas reclamações da vida. Pelas viagens a congressos que foram muito mais divertidas e proveitosas com sua companhia. Por todos os convites para ir comer bolo.

À minha amiga muito querida, Layara, por toda a ajuda. Por todas as risadas, conversas, conselhos, confiança e carinho. Pela maravilhosa e gostosa amizade. (Sinto saudades!)

Aos meus amigos, Akihiro, Camilo e Louixs, pela companhia durante os bandejões, pelos finais de semana divertidos e das ótimas risadas. Pelos bolos com mais risadas ainda. Por todas as conversas e carinho. (Adoro vocês!)

Ao meu casal do coração, Claudio e Tatiana (ClauTati), pelos café e águas, que ajudaram a dar uma respirada e a seguir em frente. Pelas conversas e cervejas, que foram essenciais para minha sanidade. Pelos jogos do Palmeiras, que foram todos ótimos só por estarem ao lado de vocês, com Palmeiras ganhando ou perdendo (Vai Palmeiras!).

Ao Centro de Instrumentação Analítica do IQ-USP, por proporcionar a possibilidade de realizar meus experimentos. Em particular, ao técnico Márcio pela atenção, dedicação e paciência para explicar a manusear o aparelho de dicroísmo circular.

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado nos primeiros 8 meses (CAPES PROEX 33002010017P0).

A FAPESP pela concessão de bolsa de mestrado nos demais meses (2015/26356-1) e pelo financiamento de projeto para o laboratório (2016/07490-1).

RESUMO

Stabelini, T. C. – **Estudos estruturais de fragmentos do trocador de Na⁺/Ca²⁺ por RMN em solução**. 2018. 100 p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Proteínas de membrana estão envolvidas em processos fisiológicos essenciais como, por exemplo, a manutenção do equilíbrio iônico e sinalização intracelular. No entanto, apesar do envolvimento em inúmeros processos fisiológicos e de grande interesse farmacêutico, o estudo estrutural de proteínas de membrana ainda é um processo custoso e muito mais complexo do que o estudo estrutural de proteínas solúveis. Os trocadores de Na⁺/Ca²⁺ são proteínas de membrana que atuam na manutenção da homeostase de Ca²⁺ intracelular e estão envolvidos em processos patológicos como doenças cardíacas. Estes trocadores estão presentes em diversas espécies de mamíferos (NCX) e insetos, por exemplo, na mosca Drosophila melanogaster (CALX). A topologia destas proteínas é constituída de dois domínios. O domínio transmembranar, que contém dois segmentos de 5 hélices transmembranares (TMH) e é responsável por promover o transporte específico de íons Ca²⁺ e Na⁺ através da membrana, e o domínio citoplasmático, responsável por regular a atividade do trocador. O domínio citoplasmático consiste de uma alça que contém dois domínios sensores de Ca²⁺ intracelular (CBD1 e CBD2). Trabalhos mostraram que o trocador CALX é inibido pela ligação de Ca²⁺ em CBD1, enquanto que trocadores NCX são ativados. As regiões citosólicas que conectam CBD1 e CBD2 à TMH5 e TMH6 são conservadas e ainda não foram caracterizadas estruturalmente. Adjacente à TMH5 há um segmento anfipático, denominado exchanger inhibitory peptide (XIP), que está envolvido no mecanismo de regulação do trocador. Na ausência de dados estruturais do CALX completo, o estudo de TMH5-XIP poderá aumentar a compreensão sobre a estrutura e o funcionamento do trocador. A construção TMH5-XIP foi fusionada à MBP no N-terminal e a uma sequência de 8 histidinas no C-terminal. Apesar da expressão da proteína de fusão ter sido bem sucedida, problemas de precipitação e ineficiência durante a clivagem da conexão com a MBP impediram a conclusão dos estudos estruturais. Logo, uma construção menor, contendo apenas a região equivalente ao XIP, foi estudada por espectroscopia de RMN em solução e dicroísmo circular. XIP forma uma 310-hélice a baixa temperatura, 7 °C, que se desestabiliza a maior temperatura, 27 °C. Estes dados permitem a formulação de hipóteses sobre o papel de XIP no mecanismo de regulação do domínio transmembranar de CALX.

Palavras-chave: Ressonância Magnética Nuclear, Trocador Na⁺/Ca²⁺, CALX, TMH5, XIP.

ABSTRACT

Stabelini, T. C. – **Structural studies of fragments derived from the Na+/Ca2+ exchanger by solution NMR.** 2018. 100 p. Master Dissertation – Graduate Program in Biochemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Membrane proteins are involved in essential physiological processes such as maintenance of the ionic balance and intracellular signaling. However, despite their role in numerous physiological processes of well-recognized pharmaceutical relevance, structural studies of membrane proteins remain being more complex than structural studies of globular proteins. Na⁺/Ca²⁺ exchangers (NCX) are membrane proteins that play essential roles in the maintenance of the intracellular Ca²⁺ homeostasis. Not surprisingly, the NCXs are involved in pathologies such as heart diseases. These exchangers are present in several species of mammals (NCX) and insects, for example, in the fly Drosophila melanogaster (CALX). The topology of these proteins consists of a transmembrane and a hydrophilic domain. The transmembrane domain corresponds to two segments of 5 transmembrane helices (TMH) forming a 10-helix bundle that is responsible for the specific transport of Ca^{2+} and Na^+ across the cellular membrane. The hydrophilic domain is composed of a large cytoplasmic loop, which is associated with the regulation of the ion exchange activity of the transmembrane domain. The loop contains two Ca²⁺-sensors domains, CBD1 and CBD2, and uncharacterized regions. Studies showed that Ca^{2+} binding to CBD1 inhibits the CALX, whereas it activates the NCX. The juxtamembrane cytosolic regions linking the CBD1 and CBD2 domains to the TMH5 and TMH6, respectively, are highly conserved but have not yet been structurally characterized. The segment near TMH5 is amphipathic, and it is also called exchanger inhibitory peptide (XIP). In the absence of a three-dimensional structure of the complete CALX, the study of TMH5-XIP may contribute to our understanding of the structure and operation of the exchanger. In order to study TMH5-XIP, it was fused to an MBP tag at the N-terminus, and to a sequence of 8 histidines at the C-terminus. Although the expression of the fusion protein was successful, precipitation and inefficient MBP-tag cleavage prevented the isolation of pure TMH5-XIP for structural studies. Hence, a smaller construct, containing only the region equivalent to XIP, was studied by NMR spectroscopy in solution and circular dichroism. The structure assumed by XIP in solution is temperature dependent, being intrinsically disordered at 27 $^{\circ}$ C or a 3₁₀-helix at 7 $^{\circ}$ C, respectively. These findings allowed us to infer how XIP could participate in the CALX regulation mechanism.

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance, Na+/Ca2+ Exchanger, CALX, TMH5, XIP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E ESQUEMAS

Figura 1.1 - Topologia dos trocadores NCX 33
Esquema 1.1 - Estequiometria da reação catalisada pelos trocadores NCX em seu modo de transporte principal
Figura 1.2 - Motivos alpha-repeats (PDB 3V5U) 34
Figura 1.3 - Regulação iônica dos NCXs
Figura 1.4 - Alinhamento múltiplo das sequência de aminoácidos do trocador NCX de diversos organismos
Figura 1.5 - NCX-Mj na ausência de íons Na ⁺ e Ca ²⁺ (PDB 5HXH)
Figura 1.6 - Construção CBD12 do trocador NCX 1.4 (PDB 3US9) 39
Figura 1.7 - Esquema da topologia dos trocadores NCX
Figura 1.8 - Mecanismo proposto para regulação alostérica por Ca ²⁺ em CALX 42
Figura 1.9 - Mecanismos proposto para a auto-inibição do P1 em NCX1 43
Esquema 2.1 - Sequência de aa de CALX e região estudada 53
Figura 2.1 - Representação do endereçamento da proteína pela MBP-tag 54
Figura 2.2 - Western blotting anti-His para teste de expressão e localização 56
Figura 2.3 - Estruturas dos detergentes testados nos testes de solubilização 57
Figura 2.4 - SDS-PAGE do resultado para o screening de detergentes
Figura 2.5 - Expressão e purificação da construção MBP-CALX ₂₇₅₋₃₃₅ 59
Figura 2.6 - Teste de clivagem da construção MBP-CAL ₂₇₅₋₃₃ 5 com Fator-Xa 60
Figura 2.7 - Teste de expressão da construção MBP-CALX ₂₇₂₋₃₃₅
Figura 2.8 - Purificação da construção MBP-CALX ₂₇₂₋₃₃₅ com Triton X-100 63
Figura 2.9 - Purificação da construção MBP-CALX ₂₇₂₋₃₃₅ com LDAO
Figura 2.10 - Teste de clivagem da fusão MBP-CALX ₂₇₂₋₃₃₅ com Trombina
Figura 2.11 - Cromatografia por exclusão de tamanho para separar o fragmento CALX ₂₇₂₋₃₃₅ da fusão MBP-CALX ₂₇₂₋₃₃₅
Figura 2.12 - Purificação da construção MBP-CALX ₂₇₂₋₃₃₅ com 0,0015% de Triton X-100

Figura 2.13 - Cromatografia por exclusão de tamanho com 0,0015% de Triton X-100 para separar o fragmento CALX ₂₇₂₋₃₃₅
Figura 2.14 - Cromatografia por exclusão de tamanho com 0,1% de Triton X-100 para separar o fragmento CALX ₂₇₂₋₃₃₅ 70
Figura 2.15 - Purificações realizadas de forma isocrática na ausência de detergente 71
Figura 2.16 - Cinética de solubilização do precipitado formado após clivagem 72
Esquema 3.1 - Sequência e estrutura primária de XIP
Figura 3.1 - Perfis espectrais de dicroísmo circular de XIP e de referência
Figura 3.2 - Gráficos de Ramachandran de XIP e referência
Figura 3.3 - Diagrama das interações sequenciais e de médio alcance ¹ H- ¹ H dos NOEs
Figura 3.4 - Estruturas refinadas em água por HADDOCK
Figura 3.5 - Resultados da estrutura calculada para XIP a 27 °C
Figura 3.6 - Modelos propostos para conformação de XIP

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Tamanho, ponto isoelétrico e estabilidade das sequências de interesse	de
acordo com ProtParam	53
Tabela 2.2 - Características do detergentes testados	57
Tabela 3.1 - Assinalamento e estatística para estrutura de XIP refinada em água	83
Tabela 3.2 - Parâmetros estruturais médios para 3_{10} - e α -hélices	84

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

- ACE Acetilação do N-terminal AMI - Amidação no C-terminal ATP - Trifosfato de adenosina BCIP - Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo **Ca1** - Primeiro sítio de ligação a Ca²⁺ nos domínios CBDs **Ca2** - Segundo sítio de ligação a Ca²⁺ nos domínios CBDs **Ca3** - Terceiro sítio de ligação a Ca²⁺ nos domínios CBD1 **Ca4** - Quarto sítio de ligação a Ca²⁺ nos domínios CBD1 **CALX -** Trocador de Na⁺/Ca²⁺ em *Drosophila melanogaster* CALX₂₇₂₋₃₃₅ - Segmento do trocador CALX entre Thr272 e Gly335 CALX₂₇₅₋₃₃₅ - Segmento do trocador CALX entre Val275 e Gly335 CBD - Domínio ligante de cálcio (Calcium Binding Domain) CBD1 - Primeiro domínio ligante de cálcio CBD12 - Construção com o primeiro e o segundo domínios ligantes de Ca²⁺ CBD2 - Segundo domínio ligante de cálcio CD - Dicroísmo circular CMC - Concentração micelar crítica de detergentes CV - Volume de coluna Cyto1 - Região entre TMH5 e THB
 - Cyto2 Região entre TMH6 e CBD2
 - **DDM** n-Dodecil-β-D-Maltopiranosídeo
 - **DEER -** Double Electron-Electron Resonance
 - DO600 Densidade óptica a 600 nm
 - DPC n-Dodecilfosfocolina
 - **EPR -** Electron Paramagnetic Resonance
 - FID Free induced decay
 - FPLC Fast Protein Liquid Chromatography
 - **GPCRs -** G Protein Coupled Receptor
 - **HSQC -** Heteronuclear Single Quantum Chemistry
 - **IB -** Inclusion Bodies
 - IPTG Isopropil-b-D-galactosídeo
 - LDAO n-Dodecil-N,N-Dimetilamina-N-Oxido
 - M Membrana
 - MBP Maltose Binding Protein
 - NBT Nitroblue tetrazólio
 - NCX Trocador Na⁺/Ca²⁺ de mamíferos

NCX-Mj - Trocador Na⁺/Ca²⁺ de archaea

NOE - Nuclear Overhauser Effect

NOESY - Experimento Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY

P - Precipitado

P1 - Segmento regulatório no C-terminal de CBD2

PBS - Phosphate Buffered Saline

PDB - Protein Data Bank

pH - potencial hidrogeniônico

PMSF - fluoreto de fenil-metil-sulfonila

RDC - Residual Dipolar Coupling

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMSD - Root Mean Square Deviation

 ${\boldsymbol{\mathsf{S}}}$ - Sobrenadante

SAXS - Small Angle X-ray Scattering

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SFA - Substrato para Fosfatase Alcalina

TEV - Protease Tobacco Etch Virus

THB - Two-Helix Bundle

TMH - Hélice transmembranar

TMH5-XIP - Construção que contém TMH5, XIP e parte de Cyto1

TOCSY - TOtal Correlated SpectroscopY

USP - Universidade de São Paulo

XIP - eXchanger Inhibitory Peptide

1. INTRODUÇÃO 31 1.1. Controle da Homeostase de Íons Cálcio Intracelular 31 1.2. Trocadores Na⁺/Ca²⁺ - NCX 32 1.3. Trocador Na⁺/Ca²⁺ de Drosophila Melanogaster - CALX 36 1.4. Informações Estruturais 38 1.5. Mecanismos de Regulação Propostos e Regiões Potencialmente 41 1.6. Objetivos 44

2. PREPARAÇÃO DE TMH5-XIP PARA ESTUDOS

COTOUTUDATO

ESTRUTURAIS 4	43
2.1 Materiais e Métodos	45
2.1.1 Expressão e Solubilização	45
2.1.2 Screening de Detergentes	46
2.1.3 Primeira Etapa de Purificação: Cromatografia por Afinidade à Res	sina
Ni ²⁺ -NTA	46
2.1.3.1 Cromatografia no FPLC	46
2.1.3.2 Cromatografia por gravimetria	47
2.1.4 Clivagem da MBP-tag – Parametrização	47
2.1.4.1 Protease Fator-Xa	47
2.1.4.2 Protease Trombina	47
2.1.5 Tentativas de Separação da Construção Clivada e não Clivada	48
2.1.5.1 Separação com auxílio de LDAO	48
2.1.5.2 Separação com auxílio de Triton X-100	49
2.1.5.3 Separação na ausência de detergente	49
2.1.5.4 Separação com ureia	50
2.1.6 SDS-PAGE	50
2.1.7 Western-Blotting	51
2.2. Resultados e Discussão	52
2.2.1. Expressão e Purificação da Construção CALX ₂₇₅₋₃₃₅	55
2.2.1.1. Escolha da cepa de expressão	55
2.2.1.2. Screening de detergentes - solubilização da MBP-CALX ₂₇₅₋₃₃₅	56
2.2.1.3. Purificação por afinidade – Ni-NTA	58
2.2.1.4. Clivagem da MBP utilizando fator-Xa	60
2.2.2 Expressão e Purificação da Construção CALX ₂₇₂₋₃₃₅	61

2.2.2.1. Escolha da cepa de expressão	61
2.2.2.2. Solubilização e purificação da construção MBP-CALX ₂₇₂₋₃₃₅	62
2.2.2.3 Clivagem da MBP utilizando trombina	64
2.2.2.4 Tentativas de purificação do fragmento CALX ₂₇₂₋₃₃₅ após clivagem	66
2.2.2.4.1. Testes com LDAO	67
2.2.2.4.2. Testes com Triton X-100	68
2.2.2.4.3. Teste de purificação sem detergente	71
2.3. Conclusões Parciais e Perspectivas	73
3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE XIP 7	74
3.1. Materiais e Métodos	74
3.1.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	74
3.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	75
3.1.2.1. Aquisição e processamento dos espectros	75
3.1.2.2. Determinação dos deslocamentos químicos	76
3.1.2.2.1. Assinalamento da cadeia lateral	76
3.1.2.2.2. Assinalamento da cadeia principal	77
3.1.2.3. Assinalamento automático dos NOES - CYANA 2.1	78
3.1.3. Refinamento da Estrutura de XIP em água	79
3.2. Resultados e Discussão	80
3.3. Conclusões Parciais e Perspectivas	89

4. CONCLUSÕES ______ 90

5. REFERÊNCIAS 9	91
------------------	----

6. ANEXOS	_ 96
-----------	------

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTROLE DA HOMEOSTASE DE ÍONS CÁLCIO INTRACELULAR

Íons Ca²⁺ atuam como mensageiros em diversos processos de sinalização intracelular, desempenhando papel fundamental em mecanismos diversos tais como contração muscular, secreção de hormônios, liberação de neurotransmissores, ativação da degradação do glicogênio, indução de apoptose, entre outros ¹. Para que o Ca²⁺ possa atuar como sinalizador intracelular é necessário que a sua concentração seja bastante baixa, oscilando, na maioria das células, em torno de nanomolar ².

A manutenção da baixa concentração de cálcio intracelular é necessária não apenas devido ao seu papel de mensageiro, mas também devido à alta concentração intracelular de compostos fosforilados, que, quando degradados, fornecem energia e liberam fosfato inorgânico, incompatível com Ca²⁺ em altas quantidades ². Uma forma de controlar a concentração de Ca²⁺ intracelular é retirá-lo para o meio extracelular ou para reservatórios internos, por exemplo, o retículo endoplasmático, através de transportadores de membrana.

Proteínas de membrana como os trocadores Na^+/Ca^{2+} (NCX), as Ca^{2+} -ATPases³, e os canais de Ca²⁺ atuam para manter a homeostase celular dos íons Ca^{2+ 4}. Além de contribuir para a manutenção da homeostase de Ca²⁺, proteínas transmembranares estão envolvidas em outros processos fisiológicos importantes como regulação do pH intracelular, transdução de sinal e transporte de outros íons e metabólitos, como é o caso dos trocadores Na⁺/H^{+ 5}, bombas de sódio ⁶ e GPCRs ⁷. Apesar do envolvimento de proteínas de membrana em inúmeros processos fisiológicos relevantes e de grande interesse farmacêutico, o seu estudo estrutural ainda é um processo mais caro e 8. complexo do que estudos de proteínas globulares estruturais

1.2. TROCADORES NA⁺/CA²⁺ - NCX

Os NCXs, membros da família SLC8 (solute carrier 8) $^{9-11}$, são responsáveis pela manutenção da homeostase de Ca²⁺ em vários tipos de células. Os trocadores NCX são antiporters, que, por definição, realizam o transporte de dois solutos através da membrana em direções opostas ¹.

Uma vez que a concentração de Ca²⁺ no citosol (na ordem de nanomolar - nM) é muito menor do que fora da célula (na ordem de milimolar - mM), a remoção de Ca²⁺ do citosol requer que este processo seja acoplado a outro que forneça energia (transporte ativo). As Ca²⁺-ATPases acoplam o transporte de Ca²⁺ contra o gradiente à hidrólise de ATP. Os trocadores de Na⁺/Ca²⁺, por sua vez, utilizam o gradiente eletroquímico de íons Na⁺ para translocar Ca²⁺ intracelular para o exterior da célula. O processo reverso, geralmente associado a situações patológicas, também pode ser realizado dependendo dos gradientes de Na⁺ e Ca²⁺ e da diferença de potencial elétrico da membrana ¹¹⁻¹³. Consequentemente, os NCXs são muito importantes para a manutenção da homeostase de Ca²⁺ intracelular, e seu mau funcionamento está relacionado a doenças como: acidentes vascular cerebral, hipertensão, isquemia, esclerose múltipla ^{13,14}, infarto do miocárdio e arritimias ¹⁵.

Os NCXs são constituídos por duas porções bem distintas: uma porção transmembranar, responsável pelo transporte dos íons Na⁺ e Ca²⁺ pela membrana, e outra citoplasmática, responsável pela regulação do trocador ^{16,17}. O domínio transmembranar é composto por dois segmentos de 5 α -hélices transmembranares (TMH) cada um, separados pela porção citoplasmática, uma alça de aproximadamente 500 aminoácidos e que conecta as α -hélices TMH5 (primeiro segmento) e TMH6 (segundo segmento) ¹⁸ (**Figura 1.1**). Nessa alça citoplasmática há dois domínios de ligação a Ca²⁺, CBD1 e CBD2 (CBD – *Calcium Binding Domain*) ^{16,19}, e um pequeno segmento de 90 aminoácidos que forma um domínio de apenas duas α -hélices denominado *Two-Helix Bundle* (THB) ²⁰. Adjacente à TMH5, há um pequeno segmento citosólico denominado XIP, *exchanger inhibitory peptide* ²¹. As regiões que conectam o domínio THB à TMH5, e CBD2 à TMH6, estão potencialmente envolvidas no mecanismo de regulação dos NCX ²²⁻²⁴, porém ainda não foram caracterizadas estruturalmente.



Figura 1.1: *Topologia dos trocadores NCX*. As hélices transmembranares (TMHs) estão representadas em cilindros. Em azul são as que contém os motivos responsáveis pelo transporte de íons, em roxo as que conectam-se à alça citoplasmática e as demais são destacadas em vermelho. Na alça citoplasmática, em rosa, região conservada e rica em resíduos carregados positivamente denominada XIP, em amarelo domínio THB e domínios sensores de Ca²⁺ (CBD1 e CBD2), em laranja região denominada peptídeo P1 contida em CBD2, em verde região conservada e rica em resíduos hidrofóbicos denominada aqui por HP, e em ciano região conservada e rica em resíduos carregados negativamente denominada aqui por NP.

Em condições não patológicas, o transporte dos NCX envolve a troca de três íons sódio do meio extracelular por um íon cálcio intracelular (**Esquema 1.1**). Os sítios de ligação de íons Na⁺ e Ca²⁺ no domínio transmembranar envolvem dois motivos conservados, os *alpha-repeats*, distribuídos em quatro hélices (TMH2-3 e TMH7-8), duas de cada segmento do domínio transmembranar ²⁵; a coordenação de Na⁺ e Ca²⁺ envolve 12 resíduos (**Figura 1.2A**), sendo oito presentes na interface entre as α -hélices TMH2 e TMH7 (**Figura 1.2B**) e quatro entre a TMH3 e TMH8 ²⁶ (**Figura 1.2C**). Os *alpha-repeats* são altamente conservados na família de trocadores SLC8 ^{25,27} (**Figura 1.4**).

$$3Na^{+}_{(ext)} + 1Ca^{2+}_{(int)} \leftrightarrow 3Na^{+}_{(int)} + 1Ca^{2+}_{(ext)}$$

Esquema 1.1: Estequiometria da reação catalisada pelos trocadores NCX em seu modo de transporte principal. O trocador troca um íon de cálcio por três íons sódio. Os prefixos (*ext*) e (*int*) referem-se aos meios extracelular e intracelular, respectivamente.





Os trocadores são regulados por diversos fatores como pH (a ativação por Ca²⁺ é modulada pela concentração de H⁺) e os substratos, Na⁺ e Ca²⁺. Na maioria dos organismos o trocador assume uma conformação inativa em baixas concentrações de Ca²⁺ intracelular ¹¹⁻¹³. A ligação de Ca²⁺ aos CBDs ativa o trocador ^{19,29,30} (**Figura 1.3**). Está bem estabelecido que os íons Ca²⁺ que interagem com os domínios CBDs não são transportados ^{17,22,31}.

A regulação por íons Na⁺, conhecida como inativação dependente de Na⁺, deve-se ao aumento da concentração intracelular de Na⁺ que inibe os NCX (**Figura 1.3A**). O mecanismo da inativação dependente de Na⁺ não é compreendido. Acreditava-se que a inibição ocorria apenas por interação dos íons Na⁺ com os sítios transportadores ^{11,17,32} na membrana, deslocando o equilíbrio lentamente para um estado estacionário de baixa atividade (**Figura 1.3A**). Mostrou-se, ainda, que a elevação da concentração intracelular de Ca²⁺ alivia o efeito da inativação dependente de Na⁺ (**Figura 1.3B**) ^{32,33}. Foi sugerido que Na⁺ interage com outros domínios do trocador ^{17,23,33}, porém nenhuma evidência experimental foi encontrada. Posteriormente, foi demonstrado que os íons sódio não interagem com os sítios de ligação a Ca²⁺ presentes nos domínios CBDs ³⁴⁻³⁶.



Figura 1.3: Regulação iônica dos NCXs. **(A)** Adição de Na⁺ (100mM) intracelular inicia o transporte, sendo que o trocador lentamente converte-se para um estado inativo por um processo conhecido como "inativação dependente de Na⁺". **(B)** Alta concentração inicial de Ca²⁺ (15 μ M) e Na⁺ (100mM) mantêm o trocador ativo, eliminando a inativação dependente de Na⁺. A posterior remoção de Ca²⁺ (0 μ M) inativa o trocador. Reprodução de experimentos de eletrofisiologia ¹¹.

1.3. TROCADOR NA⁺/CA²⁺ DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* - CALX

Os trocadores Na⁺/Ca²⁺ estão presentes em organismos de diversas espécies, desde procarióticos, como archaea, a eucarióticos, como mamíferos e insetos. A topologia predita para todos esses trocadores é muito similar. Os NCXs consistem de 10 hélices transmembranares e uma grande alça citoplasmática. Os trocadores de archaea e de *Escherichia coli* são exceções, pois não apresentam a alça citoplasmática. A sequência de aminoácidos dos NCX é altamente conservada entre organismos diferentes, incluindo regiões dos domínios de regulação e transporte já caracterizadas (**Figura 1.4**).

Drosophila_melanogaster	MQLLLKSIFTCALFVIFVYATAQSLLKVQETEARQAYLNVTSSSSSNLSQDDGHFLS
Canis_lupus_familiaris	MLQLRLLPTFSMGCHLLAVVALLFS
Doryteuthis_opalescens	MNPFKISFSWGVPLFL-LGLFFD
Drosophila melanogaster	RRLRQVSHGEEGDEGAPSQMDDELEQMTKVHGEAPDAEDVRECSEGLVLPLWMPQRNISV
Canis lupus familiaris	HVDLISAETEMEGEGNETGECTGSYYCKKGVILPIWEPQD-PSF
Doryteuthis opalescens	FAHASEDSNDTCTTEAETCRNGLIVPRWNPVGNLSV
	.: * :*:::* * *.
Drosophila melanogaster	GDRLVRGFVYFVLLIYLFVGVSIIADRFMAAIEAITSIERAVVVKGPNNTKQVMHVRIWN
Canis lupus familiaris	GDKIARATVYFVAMVYMFLGVSIIADRFMSSIEVITSQEKEITIKKPNGETTKTTVRIWN
Doryteuthis_opalescens	GDKLARATVYFVLMFYLFLGVSIIADRFMAAIEVITSKEKDVVVKKPDGTTTVVNVRIWN
	::.*. ** :.*:*:********************
Drosophila_melanogaster	ETVANLTLMALGSSAPEILLSVIEIYAKDFESGDLGPGTIVGSAAYNLFMIIAVCMIWIP
Canis_lupus_familiaris	ETVSNLTLMALGSSAPEILLSVIEVCGHNFTAGDLGPSTIVGSAAFNMFIIIALCVYVVP
Doryteuthis_opalescens	ETVSNLTLMALGSSAPEILLSVIEVVGQKFEAGQLGPSTIVGSAAFNLFIITAICVTVIP
	:********************************
Drosophila_melanogaster	AGEVRRIRHLRVFFVTALFSVFAYVWLWLILSVFTPGVILVWEAIVTLLFFPLTVLWAYI
Canis_lupus_familiaris	DGETRKIKHLRVFFVTAAWSIFAYTWLYIILSVISPGVVEVWEGLLTFFFFPICVVFAWV
Doryteuthis_opalescens	NGEVRTIKHLGVFFITATWSVFAYLWLYFILAVSSYGVVDVWEGLLTFMFFPATVVTAYI
	.* *: ***:** :*:*** **::**:* : **: **
Drosophila_melanogaster	AERRLLVYKYMDKNYRVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris	AERRLLVYKYMDKNYRVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERKLLVYKYMDKNYKVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERKLLVYKYMDKNYKVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: *: :
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster	AERKLLVYKYMDKNYKVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: *: : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris	AERKLLVYKYMDKNYKVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: * : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERKLLVYKYMDKNYKVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.**.*: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRK
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERKLLVYKYMDKNYRVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRAGKQRGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: * : . : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRK . :: *:* :* *:::* * ::: * ::: : :********
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster	AERKLLVYKYMDKNYKNNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRK . :: *:* :* *::* * ::: * ::: * ::: : :******
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris	AERRLLVYKYMDKNYRVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGWIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRK . :: *:* :* *::* * ::: * :: * :: : : : ******
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERRLLVYKYMDKNYRVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGWIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRK . :: *:* :* *:* *:* *:: * :: * :: : : *:******
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERKLLVYKYMDKNYKNYKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRL . :: *:* :* *:::* :: * ::: * :: : : ******
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster	AERKLLVYKYMDKNYNVNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRL . :: *:* :* *::* * ::: * ::: : :********
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris	AERKLLVYKYMDKNYNNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRL . :: *:* :* *:::* :: * ::: * :: : : ******
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERKLLVYKYMDKNYNNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPKVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGMIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.***: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRL . :: *:* :* *::* * ::: * ::: : : *:******
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERKLLVYKYMDKNYKNNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGWIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.**.*: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRL . :: *:* :* *::: * ::: * :: : : : : : :
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster	AERKLLVYKYMDKNYKNYKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGWIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.**.*: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRL . :: *:* :* *::: * ::: * :: : : : : : :
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERKLLVYKYMDKNYKNKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGWIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.**.*: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRL . :: *:* :* *::* * ::: * :: * :: * :: *
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	AERKLLVYKYMDKNYKNYKRGTVVA-GEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSA ADRRLLFYKYVYKRYRAGKQRGWIIEHEGDRPSSKTEIEMDGKVVNSHVDNFLDGALVLE ADRRLL-NKYLSKKYRASKQKGVIVQCEGQDAEAGEGKSEDGALKEGGDDVE *:**** **: *.**.*: :: * : : RGNDAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRK VDERDQDDEEARREMARILKELKQKHPEKEIEQLIELANYQVLSQQQKSRAFYRIQATRL VREFEQHRKEYIEILREMRKKNPTLDMKTLEDMAESEAVNRGPKSRAFYRIQATRL . :: *:* :* *::* * ::: * :: * :: : : : :
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	TESVGRFELKVMRYSGARGTVIVPYWTENDTATE-SKDYEGARGELVFENNESEKFIDLF SESIGIMEVKVLRTSGARGNVIVPYKTIEGTARGGGEDFEDTCGELEFQNDEIVKTISVK TESSGEVEVRIIRTSGARGCVKVPFHSVDGTATY-GKDYELVDKDVIFDNDETEKFLRVR :** * .*:::: ***** * **: : :.** .:*:*: : *:*:*
---	--
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	ILEESSYEKDVSFKVHIGEPRLAPDDELAAKIKE VIDDEEYEKNKTFFLEIGEPRLVEMSEKKALLLNELGGFTITGKYLYGQPVFRKVHAREH VVDDEEYEKNETFFIWLDEPYLVKKPTGSS
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	VEKKPVQD-LTELDRILLLSKPRNGELTTAYVRIRESQEFKATVDKL PIPSTVITIAEEYDDKQPLTSKEEEERRIAEMGRPILGEHTKLEVIIEESYEFKSTVDKL SGSVVEDDDPVLAELGKPRRGENIKITVHIIESTEFKSVVDKL : : :::* ** . * * ** ***:.****
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	VAKANVSAVLGTSSWKEQFKDALTVIPADESEFDNDDEEEEVPSCFSYVSHFVCLFWKVL IKKTNLALVVGTNSWREQFIEAITVS-AGEDDDDDEGGEEKLPSCFDYVMHFLTVFWKVL LKKANLSLVVGTSSWREQFIEAITVN-AEGDDDDEEGEEEKLPSCMDYIMHFVCLFWKVL : *:*:: *:**.** ::*** ::*** ::****
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	FAFVPPTDICGGYVTFVVSIFVIGVITAIIGDAASYFGCALNIKDSVTAILFVALGTSIP FAFVPPTEYWNGWACFIVSILMIGILTAFIGDLASHFGCTIGLKDSVTAVVFVALGTSVP FAFVPPTDYWGGWACFTVSIILIGVLTAFIGDLATYFGCTIGLKDAVTAVSFVALGTSVP *******: .*:. * ***::**:*** *::**:::**:
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	DTFASMIAAKHDEGADNCIGNVTGSNAVNVFLGIGLAWTIAAVYHSSHGMTFNVEPGTIG DTFASKVAATQDQYADASIGNVTGSNAVNVFLGIGVAWSIAAIYHAANGEQFKVSPGTLA DTFASKVAAINDKYADSSIGNVTGSNAVNVFLGIGIAWSIAAIYHAANGTVFRVDPGTLA ***** :** :*: ** .*********************
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	FAVALFCGEALIAIMLIMFRRWHKGIGAELGGPKVSKYISAAILVFLWVFYVVICILEAY FSVTLFTIFAFINVGVLLYRR-RPEIGGELGGPRTAKLLTSCLFVLLWLLYIFFSSLEAY FSVTIFCVFAVCTIVLLVCRR-HHLVGGELGGPPRCKYITSGILGSFWVSYLLLTGLMSY *:*::* *. : ::: **: :*.**** .* ::: :: :*: *:: *:
Drosophila_melanogaster Canis_lupus_familiaris Doryteuthis_opalescens	DVIRV- CHIKGF CHIPGF

Figura 1.4: Alinhamento múltiplo das sequência de aminoácidos do trocador NCX de diversos organismos. Os organismos comparados foram *Canis lúpus familiaris* (P23685 – NCX 1.4), *Doryteuthis opalescens* (O02196 – NCX-SQ1) e *Drosophila melanogaster* (O18367 – CALX 1.1). O peptídeo sinal de CALX está destacado em laranja. As porções transmembranares estão destacadas em rosa claro. XIP está destacado em magenta. THB do NCX1 em roxo, CBDs em amarelo, NP em azul, e HP em verde. Sequência escrita em laranja, P1 ²⁴.

Apesar de apresentar alta identidade com outros trocadores ²⁵, o trocador encontrado em células sensoriais neuronais de *Drosophila melanogaster* (CALX) apresenta um fenótipo pouco usual. Enquanto Ca^{2+} ativa o trocador de mamíferos, a ligação de Ca^{2+} inativa o CALX. Dessa forma o trocador de *Drosophila* se revela constitutivamente ativo, sendo inibido pelo aumento de Ca^{2+} intracelular ^{37,38}.

1.4. INFORMAÇÕES ESTRUTURAIS

Com exceção dos CBDs, há pouca informação estrutural sobre as demais regiões dos trocadores NCXs. O único NCX que foi cristalizado é o trocador da archaea *Methanococcus jannaschii* (NCX-Mj)²⁶, que não possui a alça citoplasmática e dessa forma, ao contrário dos demais, não é regulado ²⁶. Estruturas cristalográficas deste trocador representativas de vários estágios de ocupação dos sítios de ligação a Na⁺ e Ca²⁺ dentro da membrana foram descritas ³⁹. Estas estruturas foram associadas às diferentes conformações assumidas pelo trocador durante a passagem dos íons pela membrana.

A mais recente estrutura cristalográfica do NCX-Mj mostra que os *alpha-repeats* encontram-se em um conjunto de 8 hélices, enquanto que as hélices TMH1 e TMH6 estão distantes e inclinadas em relação à bicamada fosfolipídica (**Figura 1.5**). Embora o NCX-Mj apresente baixa identidade com os demais NCXs de mamíferos, e apesar da ausência da alça citoplasmática, ele é considerado um bom modelo para o domínio transmembranar dos NCX eucarióticos ⁴⁰.



Figura 1.5: *NCX-Mj na ausência de íons Na*⁺ *e Ca*²⁺ (*PDB 5HXH*) ³⁹. As hélices destacadas em vermelho são TMH1 e TMH6, como indicado na figura. A representação com transparência indica o conjunto de oito hélices, em azul as hélices dos motivos dos *alpha-repeats* e em violeta as demais hélices componentes do conjunto.

Estruturas cristalográficas dos domínios sensores de cálcio da isoforma 1.4 do NCX canino mostraram que CBD1 possui quatro sítios de ligação a Ca^{2+ 16}, enquanto que CBD2 possui dois sítios ¹⁹. A estrutura cristalográfica de uma construção que contém CBD1 e CBD2, chamada de CBD12, mostrou que os dois domínios estão conectados por

um *linker* de 3 resíduos (**Figura 1.6**) ⁴¹. Estudos de calorimetria mostraram que a afinidade por Ca²⁺ não é a mesma para todos os sítios. CBD1 apresenta sítios com maior afinidade e é considerado o sensor primário dos NCX, enquanto que CBD2 apresenta sítios de menor afinidade, mas também é essencial para a regulação alostérica dos NCXs ^{19,42,43}. Dos 4 sítios em CBD1, dois deles apresentam alta afinidade por cálcio (Ca1 e Ca2 – Kd < 0,3 μ M) ³⁰, enquanto que os outros dois e um dos sítios de CBD2 apresentam baixa afinidade (Ca3 e Ca4, CBD1, e Ca1, CBD2 – Kd > 10 μ M) ³⁶. O sítio restante em CBD2 apresenta média afinidade (Ca2 – Kd ~ 2-10 μ M) ¹⁹. Acredita-se que a ligação de Ca²⁺ ao sítio de média afinidade de CBD2 sustente o NCX em um estado ativo, e reduza a contribuição da inativação por Na^{+ 19}. Giladi e Khananshvili também concluíram, em 2013, que o sítio de menor afinidade em CBD2 apresenta a capacidade de ligar Mg^{2+ 36}. Dessa forma, a ligação de Mg²⁺ contribui para ajustar a afinidade dos demais sítios (tanto de CBD1 quanto de CBD2) de modo a regular a sensibilidade dos CBDs à concentração de Ca²⁺ intracelular.



Figura 1.6: Construção CBD12 do trocador NCX 1.4 (PDB 3US9)⁴¹. Em verde estão mostrados os íons Ca²⁺. O domínio à esquerda, contendo quatro íons Ca²⁺, é CBD1, e o domínio à direita, contendo dois íons, é CBD2. O *linker* que conecta CBD1 a CBD2 é mostrado em vermelho. As posições dos íons Ca²⁺ foram retiradas das estruturas cristalográficas dos domínios isolados (PDBs 2DPK e 2QVM, para CBD1 e CBD2, respectivamente).

A região próxima à membrana, adjacente à TMH5, XIP, apresenta resíduos apolares - leucinas e valinas - e carregados positivamente - lisinas e argininas. Ensaios de eletrofisiologia com um peptídeo exógeno cuja sequência de aminoácidos é derivada dessa região demonstraram que ele é capaz de inibir o trocador ²¹ e está envolvido na

regulação dependente de Na^{+ 44}. O alinhamento de sequências de três NCX de diferentes organismos mostra que esta região é bem conservada (**Figura 1.4**).

As regiões entre TMH5 e CBD1, bem como entre CBD2 e TMH6, são denominadas "*linker domains*" e foram pouco ou não foram estudadas e caracterizadas estruturalmente. Entre THB e XIP há uma região que apresenta um segmento predito como desordenado ^{20,45} (**Figura 1.7A**).

O segmento da alça citosólica denominado Cyto2 (**Figura 1.7A**) apresenta predição para formar α -hélices na região N-terminal (**Figura 1.7B**), adjacente a essa região há um segmento rico em resíduos ácidos, particularmente ácidos glutâmicos. Na região próxima à membrana na porção citoplasmática, adjacente à TMH6, há outro segmento rico em resíduos hidrofóbicos, fenilalaninas, principalmente. Todas essas regiões são bem conservadas nesta família de trocadores (**Figura 1.4**). A conservação de resíduos ácidos e hidrofóbicos próximos à TMH6 e básicos próximos à TMH5 sugere que essas regiões poderiam desempenhar um papel no mecanismo de regulação do trocador.



Figura 1.7: (A) *Esquema da topologia dos trocadores NCX.* As hélices em azul contém os *alpha-repeats*, as hélices em roxo conectam o domínio transmembranar com a alça citoplasmática, e em vermelho temos as demais hélices transmembranares. Na porção citoplasmática, em amarelo, temos os domínios sensores de Ca²⁺ (CBD1 e CBD2), o domínio THB, além de regiões ainda não caracterizadas (Cyto1 e Cyto2). **(B)** *Sequência de aminoácidos das regiões Cyto 1 e Cyto 2 de CALX 1.1.* Em rosa XIP, sublinhado THB, em ciano região rica em aminoácidos carregados negativamente, em verde região rica em aminoácidos hidrofóbicos e em destaque violeta predição de estrutura secundária de hélice por JPred.

1.5. MECANISMOS DE REGULAÇÃO PROPOSTOS E REGIÕES POTENCIALMENTE ENVOLVIDAS

Apesar de haver muita informação a respeito do efeito da ligação de Ca²⁺ sobre a estrutura e dinâmica dos domínios CBDs ^{16,19,41}, o mecanismo de regulação dos NCXs por Ca²⁺ intracelular ainda não foi esclarecido.

Diversos modelos foram propostos para explicar a regulação alostérica dos NCX por Na⁺ e Ca²⁺. Sendo os domínios CBDs caracterizados como domínios C2 ⁴⁶, por analogia com a proteína quinase C, sugeriu-se que CBD2, ou outra região do trocador, fosse recrutado pela membrana plasmática de maneira dependente de Ca^{2+ 42}, porém nenhuma evidência experimental suporta essa proposta.

Estudos sugeriram que a ligação de Ca²⁺ em CBD1 induziria aproximação entre CBD1 e CBD2. Isto reduziria a tensão entre o N- e o C-terminal com relação a outras regiões da alça citosólica o que levaria, por sua vez, à transdução do sinal até a região transmembranar ²³. Em contraste com esta hipótese, dados de acoplamentos dipolares residuais de RMN (RDCs) e ressonância dupla elétron-elétron (DEER) de EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) mostraram que CBD12 assume uma conformação estendida tanto na presença quanto na ausência de Ca^{2+ 47,48}.

Foi proposto que o ângulo entre os domínios CBD1 e CBD2 do trocador de *Drosophila melanogaster* seria a explicação para o fenótipo distinto de CALX ⁴⁹. No entanto, estruturas cristalográficas mostraram que o ângulo formado entre os domínios CBD1 e CBD2 do trocador NCX canino isoforma 1.4 e do CALX de *Drosophila* isoforma 1.1 são similares ⁴¹. De forma que, tanto o ângulo quanto a distância entre CBDs não explica a diferença fenotípica entre esses homólogos.

Estudos de RMN mostraram que a construção CBD12 é flexível na ausência de Ca^{2+} , mas assume uma conformação rígida e alongada na presença de Ca^{2+} ^{45,47}. Estas observações foram confirmadas por estudos de SAXS com a construção NCX-CBD12, que apresenta alta flexibilidade na forma apo e menor flexibilidade na forma ligada a Ca^{2+} ³⁶. Estudos cristalográficos com o mutante E454K do NCX 1.4 mostraram que uma lisina na posição 454 do NCX 1.4 ocupa o lugar do Ca^{2+} no sítio Ca4 de CBD1, e favorece a formação de pontes salinas entre a K454 e os resíduos D421 e E451, mimetizando as pontes salinas entre o Ca^{2+} em Ca4 e os mesmos resíduos D421 e E451 na proteína selvagem. A diminuição da flexibilidade do mutante, comparado à proteína selvagem na ausência de Ca^{2+} , foi associada à manutenção dessas pontes salinas. Com base nestas informações, Giladi e colaboradores propuseram um modelo para o mecanismo de

41

regulação alostérica dos trocadores NCX. No modelo proposto, CBD12 é flexível na ausência de Ca^{2+} e perde flexibilidade gradualmente com a ocupação dos sítios de Ca^{2+} (Ca1-Ca4 em CBD1 e Ca1-Ca2 em CBD2), ativando o trocador ⁴¹.

Estudos de cristalografia e RMN de CBD12 mostraram que a alça de CBD2 que conecta as fitas-β F e G, alça-FG, localizada na interface com CBD1, não apresenta estrutura mesmo na presença de Ca^{2+ 41,47}. Entretanto, espectros de EPR indicaram alta imobilização desta alça e distâncias obtidas por DEER revelaram alterações significativas na presença de Ca²⁺. Sendo assim a ligação de Ca²⁺ em CBD1 afeta a dinâmica dessa pequena alça em CBD2 ⁴⁸. Ainda há a proposta de que a presença de Ca²⁺ nos domínios CBDs solicita o domínio THB (*two-helix bundle*), promovendo uma interação que poderia levar à mudança do posicionamento de CBD12 ocasionando transmissão de informação ao domínio transmembranar ⁴⁸.

Recentemente, um modelo proposto para justificar a regulação anômola de CALX sugeriu a possibilidade de ocorrer uma interação mais fraca entre XIP e Cyto2 que afetaria o ângulo e a proximidade entre as hélices TMH5 e TMH6 permitindo ao trocador experimentar a forma ativa mesmo na ausência de Ca²⁺. Na presença de Ca²⁺ a estabilização de um arranjo alongado entre os domínios CBD1 e CBD2 aumentaria a distância entre XIP e Cyto2, levando ao deslocamento de THM5 e TMH6 e convertendo o trocador ao estado inativo (**Figura 1.8**)⁴⁵.

CALX



Figura 1.8: *Mecanismo proposto para regulação alostérica por* Ca^{2+} *em CALX.* No topo é mostrado o trocador CALX ativo na ausência de Ca^{2+} . A interação entre XIP e NP é forte. Abaixo o trocador é apresentado na forma inativa devido a ligação de Ca^{2+} no domínio CBD1. A conformação entre os CBDs se mostra estendida como ocorre nos NCXs, porém causa a diminuição de interação entre XIP e NP, que altera o ângulo entre TMH5 e TMH6 inativando CALX. Reprodução do modelo proposto por Abiko, 2016⁴⁵. Molinaro e colaboradores 2015 identificaram um peptídeo regulatório, denominado P1. Este peptídeo está localizado na região próxima à porção C-terminal de CBD2 do trocador NCX1 e está envolvido na auto-inibição do trocador ²⁴. Ensaios de eletrofisiologia mostraram que o trocador é ativado em presença de P1 exógeno. E mostraram que o mutante NCX1K229Q, mutação na região do XIP, não foi ativado pelo peptídeo P1 exógeno, sugerindo que a interação da região P1 com XIP faz parte do mecanismo de auto-inibição dos NCX (**Figura 1.9**). De fato, ensaios de co-localização de P1 e do trocador NCX em células mostraram que o mutante NCX1K229Q não é co-localizado com o peptídeo P1 ²⁴.



Figura 1.9: *Mecanismos proposto para a auto-inibição do P1 em NCX1.* No topo é observada a auto-inibição de P1 pela mudança conformacional ocorrida devido a interação entre XIP (rosa) e P1 (laranja). **(A)** P1 exógeno (verde) compete com P1 do trocador (laranja) pelo XIP. Dessa forma o trocador permanece no estado ativo. **(B)** Mutante com parte da alça citoplasmática deletada, mas com a manutenção de XIP e P1 causa proximidade entre eles, induzindo a interação e tornando o estado auto-inibido persistente. Reprodução do modelo proposto por Molinaro, 2015²⁴.

1.6. OBJETIVOS

Tendo em vista a ausência de informações estruturais sobre os *linker domains* e o seu potencial envolvimento no mecanismo de regulação alostérica de CALX, propôs-se estudar a estrutura da região que corresponde à hélice transmembranar 5 e sua região próxima à membrana que corresponde ao motivo XIP (TMH5-XIP). A fim de comparar o efeito da membrana sobre a conformação do XIP, propomos estudar a conformação do XIP isolado por espectroscopia de RMN em solução e dicroísmo circular. O estudo das propriedades conformacionais desses segmentos poderá auxiliar a compreender a estrutura e o funcionamento do trocador CALX completo.

2. PREPARAÇÃO DE TMH5-XIP PARA ESTUDOS ESTRUTURAIS

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Expressão e solubilização

As cepas testadas para expressão foram BL21(DE3), BL21(DE3)RIL códon plus, C41(DE3) e C43(DE3). Para o teste de expressão, as bactérias transformadas com o vetor de expressão pMAL-c4x (GenScript) contendo o gene que codifica para CALX₂₇₂₋₃₃₅ ou CALX₂₇₅₋₃₃₅, foram cultivadas em placas de 96 poços em 1 mL de LB contendo os antibióticos adequados, sob agitação à temperatura de 37 °C até atingir DO₆₀₀ = 1. Assim, a expressão de TMH5-XIP (CALX₂₇₂₋₃₃₅ ou CALX₂₇₅₋₃₃₅) foi induzida pela adição de 0,5 mM de IPTG a 25 °C e sob agitação a 200 rpm *overnight*. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4500 xg por 20 min a 4 °C para separar as bactérias. O *pellet* de bactérias foi suspenso em 1 mL de água deionizada. Alíquotas de 20 μ L foram retiradas, misturadas com tampão de amostra 4x e submetidas a SDS-PAGE para corar com *Comassie blue* e/ou *Western blotting*. A cepa de *E. coli* escolhida para produzir TMH5-XIP (CALX₂₇₂₋₃₃₅ ou CALX₂₇₅₋₃₃₅) foi C41(DE3).

Para produção de TMH5-XIP (CALX₂₇₂₋₃₃₅ ou CALX₂₇₅₋₃₃₅) em larga escala as bactérias contendo o vetor de expressão foram cultivadas em 500 mL de meio *Terrific Broth* (TB – 12 g triptona; 24 g extrato de levedura; 4 mL glicerol 100 %; 2,3 g fosfato monobásico de potássio; 12,5 g fosfato dibásico de potássio – por litro) contendo os antibióticos adequados, sob agitação de 200 rpm à temperatura de 37 °C até DO₆₀₀ = 1. A partir deste momento a expressão da construção TMH5-XIP (CALX₂₇₂₋₃₃₅ ou CALX₂₇₅₋₃₃₅) foi induzida pela adição de 0,5 mM de IPTG, e as células foram incubadas a 25 °C overnight sob agitação de 200 rpm. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4500xg por 20 min a 4 °C, e o *pellet* de bactérias formado foi suspenso em tampão de lise (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCL; pH 8,3) com fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF – 2 mM concentração final) como inibidor de proteases e reservado em freezer a -20 °C até seu uso. Utilizou-se aproximadamente 100 mL de tampão de lise para cada 10 g de bactéria.

As bactérias foram lisadas por sonicação (10-15 minutos efetivos com ciclo de 20-40 segundos). Ao lisado adicionou-se 2 % (v/v) do detergente de interesse, manteve-se a 4 °C sob agitação por 4 horas. A amostra solubilizada foi, então, centrifugada a 4500 xg por 15 min a 4 °C para separação de células não lisadas e partículas não solubilizadas. O sobrenadante foi separado e submetido à primeira etapa de purificação conforme descrito na **Seção 2.1.3**.

2.1.2 Screening de detergentes

Após a lise, das bactérias expressando a construção CALX₂₇₅₋₃₃₅ realizou-se a separação das frações de corpos de inclusão e de membrana. Dessa forma, o lisado foi submetido a centrifugações seriadas: primeiro a 4500xg por 10 min para separação de células não lisadas, o sobrenadante foi em seguida centrifugado a 10000 xg por 20 min para separação de corpos de inclusão, e o sobrenadante desta segunda centrifugação foi, por sua vez, centrifugado a 116000 xg por 2 h para separação da fração de membrana. Foram preparadas amostras para SDS-PAGE com os pellets das frações de corpos de inclusão, membrana e sobrenadante (após última centrifugação). O gel foi analisado após incubação com Comassie blue e por Western blotting. A concentração total de todas as amostras das frações descritas foi determinada com o kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo), e ajustada para 10 mg/mL. À cada amostra adicionou-se 2% (w/v) dos detergentes testados, e incubou-se por 18 h a 4 °C. Após a solubilização, as amostras foram centrifugadas a 5000 xg por 15 min. Ao sobrenadante adicionou-se 10 mM de imidazol e, posteriormente, incubou-se com 10 μ L de resina (Qiagen) por 2 h sob agitação. A resina foi lavada 3 vezes com tampão A_{I} (tampão de lise + 10 mM imidazol) e ao final a proteína adsorvida na resina foi eluída com tampão B_I (tampão de lise + 500 mM imidazol).

2.1.3 Primeira etapa de purificação: Cromatografia por afinidade à resina Ni²⁺-NTA

2.1.3.1 Cromatografia no FPLC

Adicionou-se, à amostra já solubilizada conforme descrito na **seção 2.1.1**, imidazol a uma concentração final de 10 mM. A quantidade de proteína adsorvida à coluna de Ni²⁺-NTA foi maximizada por recirculação da amostra com auxílio de bomba peristáltica por 18 h a 4 °C com fluxo de 2 mL/min. Após a recirculação, a coluna carregada foi levada ao FPLC e submetida a lavagem com 10 volumes de coluna (CV) de tampão A_{II} (tampão de lise com 10 mM de imidazol e concentração de detergente dependente do teste realizado), seguida por gradiente 0-100% de tampão $B_{\rm II}$ (tampão $A_{\rm II}$ + 490 mM de imidazol), foram coletadas um total de 20 frações de 5 mL cada.

2.1.3.2 Cromatografia por gravimetria

Alternativamente, quando purificada em *batch*, a adsorção à resina Ni²⁺-NTA foi realizada por incubação a 4 °C por 18 h em tubo *Falcon* sob agitação leve. Após a incubação, a resina foi submetida a cromatografia por fluxo gravitacional com *Econo-Pac* (BioRad), sendo primeiro lavada com 10 CV de tampão A_{III} (para purificação com triton X-100: tampão de lise com 10 mM de imidazol e 0,0015 % triton X-100; para purificação com LDAO: tampão de lise com 10 mM de imidazol e 0,1 mM LDAO), seguida por lavagem com 10 CV de tampão A_{III} com 40 mM de imidazol) e posterior eluição com 3 CV de tampão A_{III} (tampão A_{III} com 490 mM de imidazol).

2.1.4 Clivagem da MBP-tag – parametrização

2.1.4.1 Protease fator-Xa

Para o teste de clivagem da MBP-*tag* da construção CALX₂₇₅₋₃₃₅ com fator-Xa escolheu-se diversas relações proteína:protease (w/w), sendo elas 1:100, 1:500 e 1:1000. Primeiramente, quantificou-se a concentração de proteína total com *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo). A quantidade de fator-Xa (Sigma) de cada amostra foi ajustada de forma a atingir as relações descritas acima. As amostras foram incubadas com a protease a 25 °C ou 37 °C por 24h, e na presença de 10 mM de CaCl₂.

2.1.4.2 Protease trombina

Para o teste de clivagem da MBP-*tag* da construção CALX₂₇₂₋₃₃₅ com trombina escolheu-se diversas relações proteína:protease (w/U), sendo elas: 2.3 mg/U (1x), 0.69 mg/U (5x) e 0.23 mg/U (10x). Primeiramente, quantificou-se a concentração de proteína total com *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo). A quantidade de trombina em cada amostra foi ajustada de forma a atingir as relações descritas acima (1x, 5x e 10x). As amostras contendo a protease e 10mM de CaCl₂ foram incubadas a 37 °C, retirou-se alíquotas de 100 μ L após 4, 5, 6, 18 e 72 horas de clivagem com trombina.

2.1.5 Tentativas de separação da construção clivada e não clivada

Os ensaios descritos abaixo foram realizados por gravimetria, sem o uso do FPLC e sem gradiente, **Seção 2.1.3.2**.

Após a solubilização e purificação por afinidade à resina de Ni²⁺-NTA na presença de 0,0015% de triton X-100 ou de 0,1 mM de LDAO, a proteína de fusão MBP-TMH5-XIP foi clivada com trombina (**Seção 2.1.4.2**) e diversas tentativas de separação do fragmento clivado foram efetuadas e são descritas abaixo.

Todas as amostras dos testes realizados foram preparadas para análise em SDS-PAGE para corar com *Comassie blue*. A preparação da amostra foi feita no momento de aplicação no gel, sem ferver, utilizou-se alíquotas de 10 μ L e adicionou-se tampão de amostra 4x.

2.1.5.1 Separação com auxílio de LDAO

O *pellet* de bactérias foi lisado e solubilizado com 2% (v/v) de LDAO (**Seção 2.1.1**), a amostra foi então submetida à primeira etapa de purificação como descrito na **Seção 2.1.3.2**. O eluído foi concentrado em *Amicon* com *cutoff* de 10 kDa (Millipore) e, para retirar o imidazol, o tampão foi trocado para o tampão de lise com 0,1 mM LDAO por ciclos de concentração e diluição ainda no *Amicon*. Ao final, o volume da amostra foi reduzido a 1 mL, adicionou-se CaCl₂ a uma concentração de 10 mM e trombina até 20 U totais. A clivagem na presença de LDAO foi realizada a 37 °C por 4 horas.

a) Estratégia 1 – Gel filtração na presença de 0,1 mM de LDAO

O produto da clivagem foi centrifugado a 16000xg por 5 minutos para separar o precipitado formado. O sobrenadante foi aplicado na coluna de exclusão por tamanho, Superdex 75 (GE - volume de 120 mL) previamente equilibrada com tampão de lise com 0,1 mM de LDAO. A corrida foi feita com fluxo de 1 mL/min e foram coletadas frações de 1 mL.

b) Estratégia 2 – MBP-Trap na presença de 13 mM de LDAO

Ao produto de clivagem adicionou-se maior quantidade de LDAO até a proporção final de 13 mM, após leve mistura, aplicou-se a amostra com fluxo de 5 mL/min na coluna MBP*trap* (GE) previamente equilibrada com tampão A_{IV} (tampão de lise com 0,1 mM LDAO). A eluição foi feita de forma isocrática em fluxo de 5 mL/min com tampão B_{IV} (tampão A_{IV} com 10 mM maltose). Foram coletadas frações de 5 mL.

2.1.5.2 Separação com auxílio de triton X-100

A solubilização do lisado foi feita com 33,1 mM (v/v) de triton X-100 (**Seção 2.1.1**). A amostra solubilizada foi submetida à primeira etapa de purificação como descrito acima na **Seção 2.1.3.2**. O volume eluído foi aplicado em uma coluna MBP-*trap* (GE) previamente equilibrada com tampão A_V (tampão de lise com 0,025 mM triton X-100) com fluxo de 1 mL/min com auxilio de bomba peristáltica. A eluição foi feita em fluxo de 5 mL/min com tampão A_V com 10 mM maltose) coletando-se frações de 5 mL em um total de 4 CV. O eluato da MBP-*trap* foi concentrado em Amicon de 10 kDa (Millipore) até volume final de 1mL. À amostra concentrada adicionou-se CaCl₂ até a concentração de 10 mM e trombina até 20 U totais. A clivagem foi realizada na presença de 0,025 mM de triton X-100 a 25 °C overnight.

a) Estratégia 1 – Gel filtração na presença de 0,025 mM de triton X-100

O produto de clivagem foi passado em filtro estéril de 0,22 µm (Millipore), o filtrado foi aplicado na coluna de exclusão por tamanho, Superdex 200 (GE – volume de 25 mL) previamente equilibrada com tampão de lise com 0,025 mM de triton X-100. A corrida foi feita sob fluxo de 0,75 mL/min, coletando-se frações de 1 mL.

b) Estratégia 2 – Gel filtração na presença de 1,65 mM de triton X-100

Antes da clivagem adicionou-se detergente para aumentar a concentração de triton X-100 de 0,025 mM para 1,65 mM. O produto de clivagem foi centrifugado a 16000 xg por 10 minutos para separar o precipitado formado. O sobrenadante foi aplicado na coluna de exclusão por tamanho, Superdex 200 (GE – volume de 25mL) previamente equilibrada com tampão de lise com 1,65 mM de triton X-100. A corrida foi feita com fluxo de 0,75 mL/min e foram coletadas frações de 1 mL.

2.1.5.3 Separação na ausência de detergente

Após a lise e a solubilização com 33,1 mM de triton X-100 como descrito na **Seção 2.1.1**, as etapas de purificação foram realizadas como descrito a seguir.

A primeira etapa de purificação foi realizada conforme **Seção 2.1.3.2** utilizando tampões sem de detergente. O eluato da resina de Ni²⁺-NTA com imidazol foi aplicado na MBP-*trap* (GE) (fluxo de 1 mL/min) previamente equilibrada com tampão A_{VI} (tampão de lise). A eluição foi feita de forma isocrática com 4 CV de tampão B_{VI} (tampão de lise com 10 mM de maltose) com fluxo de 5 mL/min. O eluído da MBP-*trap* foi concentrado em *Amicon* com *cutoff* de 10 kDa (Millipore) até volume final de 1 mL. Adicionou-se, em seguida, 10 mM de CaCl₂ e 20 U de trombina na ausência de detergente, e incubou-se a 25 °C *overnight*. O produto da clivagem foi centrifugado a 16000 xg por 10 minutos para separar o precipitado formado. O sobrenadante foi analisado em gel de SDS-PAGE e o

precipitado suspenso em 1 mL de tampão de lise. Retirou-se uma alíquota da suspensão (tempo 0 hora) e ao restante adicionou-se triton X-100 até uma concentração de 41,3 mM para solubilizar a construção TMH5 clivada e incubou-se à temperatura ambiente sob agitação para analisar a cinética de solubilização. Retirou-se alíquotas a cada hora (1, 2, 3 e 4 horas) para análise da solubilização ao longo do tempo. Cada alíquota retirada foi centrifugada a 16000 xg por 10 minutos separando-se o sobrenadante e o precipitado, este último suspenso em tampão de lise sem detergente.

2.1.5.4 Separação com ureia

O *pellet* foi lisado e solubilizado com 33,1 mM de triton X-100 (**Seção 2.1.1**), seguido de purificação por cromatografia de afinidade à resina Ni²⁺-NTA como na **Seção 2.1.3** em *batch* utilizando tampões sem detergente. A purificação com a MBP-*trap* (GE) e a clivagem com trombina foram realizadas como descrito na seção anterior (**Seção 2.1.5.3**). Após a clivagem com trombina, a amostra foi centrifugada a 16000 xg por 10 minutos para separar o precipitado formado. O sobrenadante foi analisado em gel de SDS-PAGE e o precipitado suspenso em 15 mL de tampão de lise contendo 7 M de ureia. O precipitado em tampão com ureia foi mantido sob agitação à temperatura ambiente *overnight* para solubilização. Após a solubilização, a amostra foi centrifugada a 16000 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi concentrado em *Amicon* de *cutoff* 3 kDa e, posteriormente, aplicado na coluna Superdex75 previamente equilibrada com tampão de lise contendo 7 M de ureia.

2.1.6 SDS-PAGE

Todas as amostras obtidas nos testes foram submetidas a SDS-PAGE. A preparação da amostra foi feita no momento da aplicação no gel sem ferver, utilizando-se 10 µL de cada amostra e adicionando-se tampão de amostra 4x. Foram usados gel de tris-tricina (empilhamento: 4 % acrilamida/bis acrilamida, gel *buffer* 3x, APS e TEMED; separação: 16 % acrilamida/bis acrilamida, gel *buffer* 3x, 3% de glicerol; gel buffer 3x: 3 M trisbase, 0,3 % SDS, pH 8,45). A corrida foi feita com tensão constante de 100 V no gel de empilhamento e 300 V no gel de separação. O sistema foi mantido em gelo durante toda a corrida. Os tampões de corrida foram preparados a partir dos tampões ânodo 10x (1 M tris-base, pH 8,9) e cátodo 10x (1 M tris-base, 1 M tricina, 1 % SDS, pH 8,25). Após a corrida eletroforética, o gel a ser revelado por *Comassie blue* foi retirado e colocado em solução corante – *Comassie Brilliant Blue R-250 staining solution* (BioRad) sob agitação, à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. O gel corado foi então colocado em solução descorante – *Comassie Brilliant Blue R-250 destaining solution* (BioRad) sob agitação, à temperatura ambiente por cerca de 1 hora, fotos do gel foram tiradas com fotodocumentador (MS MajorScience).

2.1.7 Western-blotting

Para ensaio de Western blotting, após a corrida de um gel SDS-PAGE as proteínas separadas pelo gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose por transferência semi-seca (TE 70 PWR - Amersham Biosciences) com tampão de transferência (30 g/L Tris, 144 g/L Glicina, 0,037 % (v/v) SDS; 20 % (v/v) metanol), à temperatura ambiente, com corrente constante a 60 mA por 1,5 horas. A membrana foi bloqueada sob agitação em solução de bloqueio contendo 5 % de leite em PBS com 0,1 % de Tween-20 à temperatura ambiente por 2 horas. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-cauda de histidinas acoplado à fosfatase alcalina (Sigma) à diluição de 1:4000 em 5 % de leite em tampão PBS com 0,1% Tween-20 por 18 h a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas 2 vezes sob agitação por 10 minutos cada com ~10 mL de solução de lavagem (PBS contendo 0,1 % de Tween 20) à temperatura ambiente, e 1 vez por 10 minutos com ~10 mL de PBS à temperatura ambiente. Feitas as lavagens do anticorpo, a membrana foi lavada por 10 minutos com 15 mL de tampão de substrato para fosfatase alcalina (SFA: 100 mM de Tris; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) à temperatura ambiente. Para revelar, a membrana foi incubada com 15 mL de SFA contendo 120 µL de BCIP (20 mg/mL fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo; 100 % dimetil formamida) e 90 µL de NBT (50 mg/mL nitroblue tetrazólio; 70 % di-metil formamida) a 37 °C até o aparecimento de bandas. Como controle positivo da eficiência do ensaio de Western blotting utilizamos uma amostra da proteína de fusão.

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de obter informações sobre a estrutura dos *linker domains*, em particular das regiões próximas à membrana, optou-se por produzir dois fragmentos correspondendo à hélice TMH5 e à região do XIP. A nomenclatura adotada para definir as regiões estudadas foi baseada no trocador CALX completo, cuja sequência de aminoácidos é mostrada no **Esquema 2.1A**. A primeira construção (CALX₂₇₅₋₃₃₅) (**Esquema 2.1B**), corresponde ao segmento entre a Val275 no domínio transmembranar e a Gly335 na alça citoplasmática. A segunda construção (CALX₂₇₂₋₃₃₅) (**Esquema 2.1C**) corresponde ao segmento entre a Thr272 e a Gly335. Ambas englobam a hélice transmembranar 5 (TMH5) e o início da alça citoplasmática incluindo o XIP e parte de cyto1. A determinação da região a ser estudada foi baseada em predições de estabilidade fornecidas pelo software e banco de dados do EXPASY ⁵⁰, predições de estrutura secundária (PSIPRED) ⁵¹, de desordem (DisMeta) ⁵² e de hélices transmembranares (OCTOPUS) ²⁸. As informações obtidas pela predição com o EXPASY estão resumidas na **Tabela 2.1**.

Como as construções TMH5-XIP (CALX₂₇₂₋₃₃₅ e CALX₂₇₅₋₃₃₅) correspondem a um segmento do trocador contendo uma hélice transmembranar, este fragmento apresentará características de uma proteína de membrana. Há diversas dificuldades envolvidas em se trabalhar com esse tipo de sistema. A necessidade de mimetizar o ambiente lipídico e o elevado peso molecular do agregado proteína-mimético de membrana dificultam a análise por métodos de RMN em solução. Além disso, é difícil obter amostras de proteínas de membrana em concentrações suficientes para estudos estruturais. A produção de proteínas de membrana em quantidades suficientes envolve: (i) expressão da proteína em um organismo heterólogo capaz de inseri-la corretamente enovelada na membrana e (ii) purificação de quantidades suficientes da proteína recombinante solubilizada com auxílio de detergentes.

(A) CALX completo:
 MQLILKSIFTCALFVIFVYATAQS
 LKVQETEARQAYLNVTSSSSSNLSQDDGHFLSRRLRQVSHGEEGDEGAPSQMDDELEQMTK
 VHGEAPDAEDVRECSEGLVLPLWMPQRNISVGDRLVRGFVYFVLLIYLFVGVSIIADRFMAAIEAITSIERAVVVKGPNNTKQVMHVR
 IWNETVANLTLMALGSSAPEILLSVIEIYAKDFESGDLGPGTIVGSAAYNLFMIIAVCMIWIPAGEVRRIRHLRVFFVTALFSVFAYVWL
 WLILSVFTPGVILVWEAIVTLLFFPLTVLWAYIAERRLLVYKYMDKNYRVNKRGTVVAGEHDQVEMDAEKGPKQPMVTSARGN
 DAEAFDEARREYITLLTELRQKYPDADLEQLEMMAQEQVLARSGRSRAFYRIQATRKMVGSGNLMRKIQERAHSDLT
 GVKAQLHAGDDEEADDPIRMYFEPGHYTVMENCGEFEVRVVRRGDISTYASVEYETQDGTASAGTDFVGRKGLLSFPPGVDEQR
 FRIEVIDDDVFEEDECFYIRLFNPSEGVKLAVPMIATVMILDDDHAGIFAFTDSVFEITESVGRFELKVMRYSGARGTVIVPYWTENDT
 ATESKDYEGARGELVFENNESEKFIDLFILEESSYEKDVSFKVHIGEPRLAPDDELAAKIKEVEKKPVQDLTELDRILLLSKPRNGELTT
 AYVRIRESQEFKATVDKLVAKANVSAVLGTSSWKEQFKDALTVIPADESEFDNDDEEEEVPSCFSYVSHFVCLFWKVLF
 AFVPPTDICGGYVTFVVSIFVIGVITAIIGDAASYFGCALNIKDSVTAILFVALGTSIPDTFASMIAAKHDEGADNCIGNVTGSNAVN
 VFLGIGLAWTIAAVYHSSHGMTFNVEPGTIGFAVALFCGEALIAIMLIMFRRWHKGIGAELGGPKVSKYISAAILVFLWVFYVVICILEA
 YDVIRV

(B) CALX₂₇₅₋₃₃₅:

VIL<mark>VWEAIVTLLFFPLTVLWAYIA</mark>ER<u>RLLVYK</u>YMDKNYRVNKRG<u>TVVAGEHDQVEMDAEKG</u>

(C) CALX₂₇₂₋₃₃₅:

TPGVIL<mark>VWEAIVTLLFFPLTVLWAYIA</mark>ER<u>RLLVYK</u>YMDKNYRVNKRG**TVVAGEHDQVEMDAEKG**

Esquema 2.1: Sequência de aa de CALX e região estudada. (A) Sequência de aminoácidos (aa) do trocador CALX completo. Em destaque: região que será estudada (azul), hélices transmembranares (verde), cyto1 (negrito), CBD1 (rosa), CBD2 (amarelo), cyto2 (negrito) e regiões preditas para serem desordenadas em cyto1 e cyto2 (sublinhado). (B) e (C) Construções estudadas, CALX₂₇₅₋₃₃₅ e CALX₂₇₂₋₃₃₅: hélice TMH5 (verde), XIP (magenta), parte de cyto1 (negrito). Regiões intrinsecamente desordenadas foram preditas com DisMeta ⁵² e hélices transmembranares com OCTOPUS ²⁸.

Região	n ^o aa	Peso molecular	Ponto isoelétrico	Estabilidade
CALX ₂₇₅₋₃₃₅	61	7172,4	6,75	Estável
CALX ₂₇₂₋₃₃₅	64	7427,7	6,46	Estável

Tabela 2.1: Tamanho, ponto isoelétrico e estabilidade calculados das sequências de interesse de acordo com ProtParam ⁵⁰.

Em face das dificuldades descritas acima, e para tentar evitar os problemas descritos, escolhemos trabalhar com a proteína em fusão com *Maltose Binding Protein* (MBP) ⁵³. A MBP é uma proteína periplasmática e, portanto, o uso do *tag* de MBP é especialmente interessante por facilitar o endereçamento da proteína de interesse para a membrana interna da bactéria (**Figura 2.1**). Dessa forma, os fragmentos foram clonados em fusão com MBP no N-terminal utilizando para isso o vetor de expressão pMAL-c4x.





Os vetores construídos para expressar cada uma das construções (CALX₂₇₂₋₃₃₅ ou CALX₂₇₅₋₃₃₅) estão mostrados no **Anexo 6.1**. As principais diferenças são os sítios de proteases para clivagem dos *tags* e o *linker* entre a MBP e a sequência de interesse. A construção CALX₂₇₅₋₃₃₅, (**Anexo 6.1AI**) contém um *linker* de 24 aminoácidos entre a MBP e a Val275 (sequência de interesse). Este *linker* contém um sítio de clivagem para fator-Xa (**Anexo 6.1B**) para separar o *tag* de MBP. A construção CALX₂₇₂₋₃₃₅ (**Anexo 6.1AII**) foi clonada com um *linker* de 30 aminoácidos entre a MBP e a Val272 (sequência de interesse) a fim de acomodar dois sítios de clivagem, um sítio para fator-Xa e outro para trombina (**Anexo 6.1C**). As duas construções possuem uma sequência de oito histidinas no C-terminal separadas da G335 por um sítio de clivagem para trombina (CALX₂₇₂₋₃₃₅) (**Anexo 6.1B e 6.1C**).

2.2.1. Expressão e purificação da construção CALX₂₇₅₋₃₃₅

A parametrização da obtenção da construção CALX₂₇₅₋₃₃₅, contendo apenas um sítio para a clivagem da MBP-*tag* foi realizada (**Seção 2.2.1**). O primeiro teste foi o de expressão, no qual seis cepas de E. coli foram utilizadas (**Seção 2.2.1.1**). Para a solubilização da proteína na membrana interna da bactéria foram testados cinco detergentes (**Seção 2.2.1.2**). Também foram realizados testes de purificação em coluna de afinidade (Ni-NTA) (**Seção 2.2.1.3**) e clivagem com a protease fator-Xa (**Seção 2.2.1.4**).

2.2.1.1. Escolha da cepa de expressão

Testes para a escolha da cepa para expressão são mostrados a seguir (**Figura 2.2A**). Além da escolha da cepa, realizou-se análise para determinação da fração de trabalho (membrana, corpos de inclusão ou lisado) (**Figura 2.2B**). Observa-se que todas as cepas testadas expressaram a construção proposta (**Figura 2.2A**). Contudo, o controle da expressão basal foi mais eficiente em três delas (BL21(DE3), BL21 códon plus-RIL, e C41(DE3)), enquanto que o vazamento de expressão foi nítido nas demais (**Figura 2.2A**). Como o controle de expressão é importante para que a proteína de interesse seja expressa nas melhores condições da bactéria, escolheu-se as cepas BL21(DE3), BL21 códon plus-RIL e C41(DE3).

Com as três cepas selecionadas, investigou-se se a proteína estaria na fração de membrana ou na de corpos de inclusão ⁵³. Observou-se que MBP-CALX₂₇₅₋₃₃₅ estava presente tanto nas frações de membrana (M) como nas de corpo de inclusão (IB) em todas as cepas testadas (**Figura 2.2B**). A alta quantidade da proteína em IB possivelmente se deve à alta taxa de produção, dificultando a assimilação pela membrana da bactéria. Em outras palavras, provavelmente, a bactéria sintetiza a proteína mais rapidamente do que a velocidade de inserção na membrana. A proteína expressa na cepa C41(DE3) também foi encontrada na fração do sobrenadante (S) (**Figura 2.2B**). Possivelmente, a presença da proteína na fração S deve-se à ultracentrifugação pouco eficiente para separar todos os fragmentos de membrana presentes em solução (**Seção 2.1.2**).

(A) Teste de Expressão



(B) Análise de Localização



Figura 2.2: Western blotting anti-His para teste de expressão e localização. (A) Teste de expressão da construção MBP-CALX₂₇₅₋₃₃₅: I – induzido e N – não induzido. (B) Análise da localização da proteína de fusão: IB – corpos de inclusão, S – sobrenadante e M – membrana. As setas azuis mostram a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa).

A obtenção da construção MBP-CALX₂₇₅₋₃₃₅ de IB provavelmente não afeta a aquisição do *folding* correto, pois esta construção deve conter apenas uma hélice transmembranar (**Esquema 2.1**). Admitindo-se isso, a cepa de trabalho escolhida foi BL21 códon plus-RIL, e decidiu-se não separar as frações IB e M, ou seja, optou-se por trabalhar com o lisado total para maximizar o rendimento da preparação.

2.2.1.2. Screening de detergentes para solubilizar a construção MBP-

CALX₂₇₅₋₃₃₅

Emprega-se na literatura diferentes sistemas miméticos de membrana como: micelas de detergente ⁵⁴, bicela ^{54,55}, nanodisco ⁵⁶ e amphipol ⁵⁷. Neste trabalho testou-se detergentes disponíveis que apresentam diferentes características estruturais, e que são amplamente utilizados para solubilizar ou para mimetizar o ambiente lipídico encontrado pelas proteínas de membrana formando micelas ao seu redor para sua estabilização. Na



Figura 2.3 e **Tabela 2.2** estão mostradas as estruturas e as características dos detergentes testados.

Figura 2.3: Estruturas dos detergentes testados nos testes de solubilização. (A) $a-[4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil]-<math>\omega$ -hidroxi-poli(oxi-1,2-etanediil) (triton X-100), (B) Lauril-dimetilamina N-Oxido (LDAO), (C) n-Dodecil- β -D-Maltopiranosídeo (DDM), (D) n-Dodecilfosfocolina (DPC) e (E) Dodecil sulfato de sódio (SDS).

Tabela 2.2: Características do detergentes testados.								
		Massa molecular	СМС	Tamanho da				
		(g/mol)	(mM)	micela (kDa)				
triton X-100 ⁵⁸	Neutro	647	0,16 - 0,25	50 - 100				
LDAO 59	Zwiteriônico	229,4	0,14* 1 - 2**	17 - 21,5				
DPC 60	Zwiteriônico	351,5	1,5*	~19				
DDM ⁶¹	Neutro	510,6	0,12* 0,17**	72				
SDS 62	Aniônico	288,5	6 - 8	18				

 Tabela 2.2: Características do detergentes testados.

* em H₂O

** em 0,1M NaCl

O resultado dos testes de solubilização da construção MBP-CALX₂₇₅₋₃₃₅ está mostrado na **Figura 2.4**. Após a solubilização, a proteína de fusão foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺ de forma isocrática (detalhes **Seção**

2.1.2), para ser possível inferir a eficiência de solubilização da proteína pelos detergentes testados.



Figura 2.4: *SDS-PAGE do resultado para o screening de detergentes*. Solubilização da construção MBP-CALX₂₇₅₋₃₃₅ presente em diferentes frações: membrana, corpos de inclusão e lisado. Detergentes utilizados: 1 – triton X-100, 2 – LDAO, 3 – DPC, 4 – DDM e 5 – SDS. Amostras após solubilização e primeira etapa de purificação por afinidade por Ni²⁺ (detalhes **seção 2.1.2**). Seta azul mostra a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa).

Poucas diferenças foram observadas para a eficiência de solubilização de cada detergente testado, exceto no caso do SDS que parece ser menos eficiente do que os demais (**Figura 2.4**). Dos resultados apresentados, LDAO se mostrou pouco mais eficiente para solubilizar o lisado, apresentando equivalente quantidade de proteína que triton X-100, porém com menos impurezas (ausência de banda expressiva na altura de ~75kDa). Sendo assim os testes posteriores foram realizados utilizando esses dois detergentes, triton X-100 e LDAO.

2.2.1.3. Purificação por afinidade – Ni-NTA

Os primeiros testes de purificação mostraram que a adsorção da construção MBP-CALX₂₇₅₋₃₃₅ à resina de níquel (Ni-NTA) não era eficiente (dados não mostrados) possivelmente devido à presença de 33,1 mM de detergente utilizado para a solubilização da proteína presente no lisado total (**Seção 2.1.1**). Esta concentração de detergente é significativamente maior do que a CMC do triton X-100 (33,1 mM de detergente versus 0,25 mM, **Tabela 2.2**), dessa forma as micelas livres em excesso poderiam dificultar a interação da his-*tag* com a resina. Além disso, muitos contaminantes co-eluíram com a proteína (dados não mostrados).

(A) Cromatograma



(B) SDS-PAGE



Figura 2.5: *Expressão e purificação da construção MBP-CALX*₂₇₅₋₃₃₅. Lavagem e eluição realizadas em presença de 0,5 mM de triton X-100. Frações coletadas durante o gradiente de 10 a 500 mM de imidazol. Eluição em ~300 mM de imidazol a temperatura ambiente. **(A)** Cromatograma de coluna por afinidade de Ni²⁺-NTA pós solubilização do lisado total com 33,1 mM de triton X-100. **(B)** SDS-page das frações correspondentes aos picos apresentados no cromatograma, (A) *Pellet* após solubilização, (B) sobrenadante após recirculação da amostra e (C) lavagem da coluna antes da eluição. Seta azul mostra a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa).

A fim de aumentar a eficiência de adsorção da amostra na resina, a amostra foi recirculada na coluna de afinidade por Ni²⁺ (Ni-NTA) a 4°C (**Seção 2.1.3.1**). A remoção dos contaminantes foi melhorada com extensa lavagem com no mínimo 10 volumes de coluna (CV) com tampão contendo apenas 10 mM de imidazol (**Seção 2.1.3.1**). A eluição da proteína de interesse foi realizada durante um gradiente de imidazol com tampão contendo triton X-100 em concentração duas vezes acima da CMC (0,5 mM), e realizada em FPLC, detalhes na **Seção 2.1.3.1**.

O cromatograma obtido é mostrado na Figura 2.5A e a análise das frações está

mostrada no gel de SDS-PAGE (**Figura 2.5B**), a fim de identificar em qual fração saiu a proteína de fusão, MBP-CALX₂₇₅₋₃₃₅. Observou-se que o último e maior pico corresponde à proteína de fusão com menos contaminantes, melhor purificada (frações 14-19). Este resultado confirma a vantagem de recircular a amostra para aumentar a eficiência da adsorção da proteína à resina, e também a necessidade de se realizar extensas lavagens a fim de remover proteínas adsorvidas de forma inespecífica.

2.2.1.4. Clivagem da MBP utilizando fator-Xa

Testes de clivagem da fusão MBP-CALX₂₇₅₋₃₃₅ com fator-Xa foram realizados em duas temperaturas, 25 e 37°C (**Figura 2.6**). A ação da enzima foi observada pelo desaparecimento da banda da proteína de fusão. Entretanto, uma banda devido ao segmento CALX₂₇₅₋₃₃₅ isolado não foi observada (ausência de banda com baixo peso molecular - **Figura 2.6**). E, ainda, a clivagem não se mostrou eficiente, pois nem toda a banda da proteína de fusão desapareceu. É possível que a alta concentração de detergente presente durante a clivagem tenha afetado a atividade da protease fator-Xa ⁶³.



Figura 2.6: *Teste de clivagem da construção MBP-CAL*₂₇₅₋₃₃₅ *com fator-Xa.* SDS-PAGE e seu negativo dos ensaios realizados em duas temperaturas diferentes, 25 e 37°C e com diferentes relações: 1:100, 1:500 e 1:1000 (w/w) de protease:proteína. Mais detalhes na **Seção 2.1.4.1**. As setas azuis mostram a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa), as vermelhas a altura para as bandas da MBP (~45 kDa) e as verdes a altura para as bandas da TMH5-XIP (~ 14 kDa).

2.2.2 Expressão e purificação da construção CALX₂₇₂₋₃₃₅

Diante da baixa eficiência da protease fator-Xa para clivar o tag de MBP (Figura 2.8), decidiu-se inserir um sítio para protease trombina entre a MBP e TMH5-XIP, pois trombina é mais resistente à presença de detergentes 63, além de ser mais barata. Dessa forma, desenhou-se a construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅, que apresenta sítio de clivagem para trombina conforme ilustrado no Anexo 6.1 II e 6.1C. Esta construção, contém, além do sítio de clivagem para trombina, um linker maior entre a MBP e o fragmento CALX₂₇₂₋ 335 (Anexo 6.1C, 30 aminoácidos de distância) o que pode tornar o sítio de clivagem mais exposto e facilitar o acesso à protease.

2.2.2.1. Escolha da cepa de expressão

O teste para escolha da melhor cepa de E. coli para expressar a construção MBP-CALX₂₇₂-₃₃₅ foi realizado com BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3) e BL21(DE3) códon plus-RIL. Dentre elas, as cepas C41(DE3) e BL21(DE3) códon plus-RIL se destacaram (Figura 2.7). A escolhida foi a cepa C41(DE3), que apresenta modificações para conferir resistência a proteínas tóxicas, e que já foi utilizada para expressar proteínas de membrana ⁶⁴. Uma vez que a topologia predita para a construção CALX₂₇₂₋₃₃₅ apresenta apenas uma hélice transmembranar (Esquema 2.1), optou-se por não repetir os testes de localização na fração de membrana ou em corpos de inclusão, e por trabalhar com o lisado total.



(B) Western blotting

(A) SDS-PAGE

Figura 2.7: Teste de expressão da construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅. (A) SDS-PAGE: N - não induzido e I - induzido. (B) Western blotting anti-his: N - não induzido e I - induzido. As setas azuis mostram a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa).

2.2.2.2. Solubilização e purificação da construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅

Para solubilizar a construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅ optou-se por testar a eficiência dos detergentes LDAO e triton X-100. O LDAO é um detergente com características estruturais muito distintas do triton X-100. Enquanto o LDAO se trata de um detergente zwitteriônico formando micelas menores, triton X-100 é um detergente não carregado que forma micelas muito grandes (**Seção 2.2.2** - **Figura 2.3** e **Tabela 2.2**). Utilizou-se 86,7 mM de LDAO ou 33,1 mM de triton X-100 para solubilização do lisado, mantendo-se a recirculação do lisado na coluna de afinidade por Ni²⁺ (Ni-NTA). As etapas de lavagem, gradiente de imidazol e eluição foram feitas com concentração 10x abaixo da CMC dos respectivos detergentes (**Tabela 2.2**), e em FPLC (detalhes **Seção 2.1.3.1**). Os resultados dos experimentos de solubilização e purificação da construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅ na presença de LDAO e triton X-100 estão mostrados na **Figura 2.8** e **2.9**.

Analisando os géis das frações dos cromatogramas mostrados em **2.8A** e **2.9A**, observou-se que tanto a etapa de solubilização quanto a de purificação foram bem sucedidas (**Figuras 2.8B** e **2.9B**, triton X-100 e LDAO, respectivamente). A proteína solubilizada com triton X-100 e a proteína solubilizada com LDAO eluem com aproximadamente a mesma concentração de imidazol em diversas frações (banda próximo a 50 kDa nas frações 12-20 (triton X-100) ou frações 12-15 (LDAO)) e apresentam um grau de pureza satisfatório para primeiro passo de purificação. Os dados indicam que os detergentes são comparáveis em termos de especificidade da interação entre o his-*tag* e a resina.

Triton X-100



Figura 2.8: *Purificação da construção MBP-CALX*₂₇₂₋₃₃₅ *com triton X-100.* Lavagem e eluição realizada em presença de triton X-100. Frações coletadas durante gradiente de 10 a 500 mM de imidazol. Eluição em ~300 mM de imidazol à temperatura ambiente. **(A)** Cromatograma da purificação por afinidade em resina Ni²⁺-NTA após solubilização com o detergente. **(B)** SDS-PAGE das frações correspondentes aos picos apresentados no cromatograma. A seta azul mostra a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa).

(A) Cromatograma



(B) SDS-PAGE



Figura 2.9: *Purificação da construção MBP-CALX*₂₇₂₋₃₃₅ *com LDAO.* Lavagem e eluição realizadas em presença de LDAO. Frações coletadas durante gradiente de 10 a 500 mM de imidazol. Eluição em ~300 mM de imidazol a temperatura ambiente. **(A)** Cromatograma da purificação por afinidade em resina Ni²⁺-NTA após solubilização com o detergente. **(B)** SDS-PAGE das frações correspondentes aos picos apresentados no cromatograma. A seta azul mostra a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa).

2.2.2.3 Clivagem da MBP utilizando trombina

O teste de clivagem do *tag* de MBP com trombina foi realizado na presença de 0,025 mM de triton X-100 (**Figura 2.10A** e **2.10B**), variou-se a relação proteína:protease e o tempo de incubação. Em todos os testes ocorreu leve formação de precipitado após incubação e ação da protease. Os detalhes da metodologia são descritos na **Seção 2.1.4.2**.

A **Figura 2.10A** apresenta claramente o desaparecimento da banda da proteína de fusão (~50 kDa) e o aparecimento de duas novas bandas (~45 kDa e ~14 kDa) em função do tempo de incubação e da concentração de trombina. Porém a clivagem completa só foi observada após 72 horas de incubação com trombina. Esses parâmetros, no entanto, não são ideais uma vez que é notado degradação da amostra incubada por 72h a 37°C na ausência de protease (**Figura 2.10B**). Observa-se ainda que até a banda da proteína clivada (~14 kDa) torna-se menos intensa após 72h de incubação (**Figura 2.10A** a 72h comparado aos demais tempos). Na **Figura 2.10C** é apresentado o ensaio de *Western blotting* que confirma a clivagem pela trombina e a liberação da proteína de interesse (banda em ~14 kDa). O peso esperado para CALX₂₇₂₋₃₃₅ é 8,1 kDa (TMH5-XIP + his-*tag*), no entanto a proteína clivada migrou como se fosse uma proteína de ~14 kDa. Esta migração anômala pode ser explicada pela presença de triton X-100 nas amostras utilizadas para SDS-PAGE. O detergente SDS presente no tampão de amostra pode não ter sido substituído completamente ⁶⁵, consequentemente a proteína pode migrar de forma não proporcional à sua massa molar.

Dentre as condições apresentadas, a relação 1:1 proteína:protease e incubação por 4 h se destacou (ver **Seção 2.1.4.2** para detalhes) pelo fato de ter resultado na mesma quantidade aparente de proteína clivada que as demais condições mas em menor quantidade de proteína degradada e/ou agregada (bandas acima de 17 kDa) (**Figura 2.10**).



(A) SDS-PAGE – Condições de clivagem

Figura 2.10: *Teste de clivagem da fusão MBP-CALX*₂₇₂₋₃₃₅ *com trombina.* Clivagem realizada na presença de 0,025 mM de tritonX-100. **(A)** SDS-PAGE para os ensaios realizados a 37°C: Relação proteína:protease: 1:1 (1x), 1:5 (5x) e 1:10 (10x) (w/w). Tempo de incubação para clivagem: 4h, 5h, 6h, 18 e 72h. **(B)** SDS-PAGE dos controles para os ensaios realizados a 37°C: Tempo de incubação em banho a 37°C: Ctrl (0h), 4h, 5h, 6h, 18h e 72h. **(C)** *Western blotting* anti-his: Tempo de incubação para relação proteína:protease 1:1 e controles. A banda da construção CALX₂₇₂₋₃₃₅ na ausência de MBP deve corresponder a aproximadamente 8,1 kDa. As setas azuis mostram a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa), as vermelhas a altura para as bandas da MBP (~45 kDa) e as verdes a altura para as bandas da TMH5-XIP (~ 14 kDa).

2.2.2.4 Tentativas de purificação do fragmento CALX₂₇₂₋₃₃₅ após clivagem

Devido à clivagem incompleta do *tag* de MBP foi necessário buscar formas de separar o fragmento CALX₂₇₂₋₃₃₅ (forma clivada) da MBP e da proteína de fusão. Todos os testes de purificação foram realizados de forma isocrática, sem o uso do FPLC. Essa abordagem foi escolhida devido às dificuldades como, por exemplo, entupimento da coluna e vazamento da bomba peristáltica ocorridas durante a recirculação *overnight* da amostra com auxílio da bomba peristáltica. Sendo assim, no lugar de recircular, a amostra foi incubada com a

resina por 18 horas sob agitação por inversão, e purificação por fluxo gravitacional (detalhes na **Seção 2.1.5**).

2.2.2.4.1. Testes com LDAO

Em ambos ensaios realizados com LDAO (detalhes na **Seção 2.1.5.1** itens a e b) ocorreu precipitação severa durante a clivagem. Mesmo assim, para o teste na presença de 0,1 mM de LDAO (**Seção 2.1.5.1** item a), o sobrenadante do produto de clivagem foi submetido a cromatografia por exclusão de tamanho, Superdex 75, para separar todas as espécies: MBP, micela vazia, micela com proteína de fusão e micela com a proteína clivada. No entanto, não se detectou o fragmento CALX₂₇₂₋₃₃₅ em nenhuma das frações coletadas (**Figura 2.11**) e não foi possível separar as demais espécies presentes. A dificuldade na observação das bandas pode ser associada à baixa concentração de proteína clivada.







No teste com LDAO na presença de 43,4 mM do detergente utilizando a MBP-*trap* (**Seção 2.1.5.1** item b), as espécies formadas após clivagem eluíram todas juntas durante a lavagem com tampão A_{IV} (detalhes **Seção 2.1.5.1** item b). Isso mostra que tanto MBP clivada quanto proteína de fusão não interagiram com a coluna, indicando que o excesso de detergente inibiu a adsorção à coluna (dados não mostrados).

2.2.2.4.2 Testes com triton X-100

Para tentar contornar a formação de precipitado durante a clivagem do *tag* de MBP com trombina (**Seção 2.2.2.3**), uma etapa de purificação com MBP-*trap* antes da clivagem foi realizada a fim de diminuir os contaminantes que poderiam estar induzindo a precipitação (**Seção 2.1.5.2**). Além dos contaminantes, a formação de precipitados durante a clivagem da construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅ com trombina também poderia ser explicada pela baixa relação detergente:proteína utilizadas no ensaio, 0,025 mM de triton X-100, ou seja, abaixo da CMC (**Tabela 2.2**). Dessa forma, para avaliar se a concentração de detergente poderia afetar a formação de precipitado durante a clivagem foi realizado na presença de 0,025 mM e 1,65 mM de triton X-100 (detalhes **Seção 2.1.5.2** itens a e b, respectivamente).

Na **Figura 2.12** são apresentadas as duas etapas de purificação por afinidade da construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅ solubilizada com triton X-100, A primeira etapa foi em resina de níquel, e a segunda em uma coluna MBP-*trap*. A MBP-*trap* separou de forma mais eficiente a proteína de fusão dos contaminantes (**Figura 2.12**).



Figura 2.12: Purificação da construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅ com 0,025 mM de triton X-100. Utilizou-se duas colunas de afinidade de forma isocrática a temperatura ambiente. A canaleta **FT** corresponde às frações que não adsorveram na coluna Ni-NTA ou MBP-Trap. Nas canaletas correspondentes à "purificação Ni-NTA" e "purificação MBP-trap" foram aplicadas frações eluídas durante as etapas de

lavagem e eluição com Imidazol (Ni-NTA) ou maltose (MBP-Trap). A seta azul mostra a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa).

A construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅ eluída da coluna MBP-trap (**Figura 2.12**) foi incubada com trombina na presença de 0,025 mM ou 1,65 mM de triton X-100 (**Seção 2.1.5.2**). A condição com 1,65 mM de triton X-100, apresentou menor formação de precipitado, porém não o extinguiu.

O sobrenadante do ensaio de clivagem na presença de 0,025 mM de triton X-100 foi aplicado em uma coluna de exclusão de tamanho, Superdex 200 (**Figura 2.13**). Observou-se que a proteína de fusão (**Figuras 2.13B** e **2.13C**, bandas em ~50 kDa nas frações 8-10) co-eluiu junto à construção CALX₂₇₂₋₃₃₅ clivada (**Figuras 2.13B** e **2.13C**, bandas em ~14 kDa nas frações 8-10). Além disso, a construção clivada e a proteína de fusão co-eluíram no volume morto da coluna (**Figura 2.13A**), indicando a formação de agregados de alto peso molecular. A MBP sozinha foi encontrada no segundo pico (**Figura 2.13A**, frações 15 e 16) enquanto que a construção CALX₂₇₂₋₃₃₅ não foi observada isolada.

(A) Cromatograma



(B) SDS-PAGE



(C) Western blotting



Figura 2.13: Cromatografia por exclusão de tamanho com 0,025 mM de triton X-100 para separar o fragmento CALX₂₇₂₋₃₃₅. (A) Cromatograma da corrida com Superdex 200 após clivagem com trombina. (B) SDS-PAGE das frações correspondentes aos picos apresentados no cromatograma: (A) amostra purificada antes da clivagem; (B) amostra A concentrada em Amicon; (C) amostra após a clivagem com trombina antes de ser filtrada; (D) amostra C após ser filtrada em filtro de 0,22 μ M, amostra aplicada na coluna Superdex 200 (sobrenadante). (C) Western blotting das amostras aplicadas no SDS-PAGE apresentado em (B). As setas azuis mostram a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa), a vermelha a altura para as bandas da MBP (~45 kDa) e as verdes a altura para as bandas da TMH5-XIP (~ 14 kDa).

O experimento análogo realizado na presença de 1,65 mM de triton X-100 (**Figura 2.14**), demonstrou que a proteína de fusão continua co-eluindo com a construção clivada no volume morto da coluna (**Figura 2.14A**, primeiro pico e **Figura 2.14B**, bandas ~50 kDa e ~14 kDa nas frações 8 – 10) e, mais uma vez a construção CALX₂₇₂₋₃₃₅ não foi isolada em nenhuma fração (**Figura 2.14B**, ausência de bandas em ~14 kDa nas demais frações). Estes resultados sugerem que as proteínas de fusão e clivada formam agregados de alto peso molecular.



(A) Cromatograma





Figura 2.14: Cromatografia por exclusão de tamanho com 1,65 mM de triton X-100 para separar o fragmento CALX₂₇₂₋₃₃₅ da fusão MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅. (A) Cromatograma da corrida com Superdex 200 após clivagem com trombina. (B) SDS-PAGE das frações correspondentes aos picos apresentados no cromatograma.

2.2.2.4.3. Teste de purificação sem detergente

Assumindo que a proteína de fusão MBP-CALX₂₇₂₋₃₅₅ permaneceria em solução mesmo na ausência de detergente devido à elevada solubilidade da MBP, realizou-se um teste aplicando detergente apenas para solubilizar a proteína da membrana após a lise das bactérias, e removendo-se o detergente durante a etapa de lavagem em resina de níquel.

A construção MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅ foi eluída da resina de níquel na ausência de detergente (**Seção 2.1.5.3**), e as etapas de purificação subsequentes foram realizadas na ausência de detergente. Em nenhuma dessas etapas foi observada precipitação e em todas observamos a presença da proteína de fusão (**Figura 2.15**), mostrando que MBP é um bom *tag* de solubilização. É interessante notar que a intensidade da banda devido à fusão MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅ observada em 50 kDa (**Figura 2.15**, canaleta A comparada à canaleta B) é a mesma que observada nas purificações anteriores (**Figura 2.12**).



Figura 2.15: Etapas de purificação da proteína de fusão na ausência de detergente. Todas as etapas foram realizadas de forma isocrática. **(A)** amostra do eluato da coluna Ni-NTA; **(B)** eluato da coluna MBP-*trap*; **(C)** amostra de **B** concentrada em Amicon. A seta azul mostra a altura esperada para a banda da proteína de fusão (~ 50 kDa).

Considerando-se que a purificação na ausência de detergente foi bem sucedida, a proteína purificada foi submetida à clivagem com a trombina, na ausência detergente. Nessa condição observou-se severa precipitação como esperado, visto que o *tag* de solubilização (MBP) foi separado da proteína de interesse. Amostras do precipitado foram solubilizadas com 41,3 mM de triton X-100 e submetidas a SDS-PAGE.

Conforme mostra a **Figura 2.16**, observou-se que o precipitado formado (faixa P - 0h) consistia predominantemente de proteína clivada (banda ~14 kDa), proteína de fusão (~50 kDa) e MBP (~45 kDa). Observou-se ainda que a cinética de solubilização com o detergente adicionado favoreceu a solubilização de todas as proteínas como um todo, não ocorrendo solubilização seletiva da proteína de interesse.

Um teste utilizando uréia ao invés de triton X-100 para solubilizar o precipitado e separar a proteína CALX₂₇₂₋₃₃₅ da fusão MBP-CALX₂₇₂₋₃₃₅ foi realizado (**Seção 2.1.5.4**), mas não foi conclusivo, possivelmente devido à baixa quantidade da construção CALX₂₇₂₋₃₃₅ isolada que não foi observável em gel SDS-PAGE (dados não mostrados).



Figura 2.16: *SDS-PAGE da cinética de solubilização do precipitado formado após clivagem.* **(A)** Proteína de fusão purificada após colunas de afinidade, Ni-NTA e MBP-*trap*, respectivamente; **(B)** Sobrenadante do produto de clivagem com trombina. As canaletas seguintes apresentam o padrão de migração de amostras de **P** (precipitado) e **S** (sobrenadante) durante 0 a 4 horas de solubilização do precipitado total (P – 0h) com 41,3 mM de triton X-100. A seta azul mostra a altura esperada para as bandas da proteína de fusão (~ 50 kDa), a vermelha a altura para as bandas da MBP (~45 kDa) e a verde a altura para as bandas da TMH5-XIP (~ 14 kDa).
2.3. CONCLUSÕES PARCIAIS E PERSPECTIVAS

O fragmento CALX₂₇₂₋₃₃₅ em fusão com MBP expressa bem. Para que a primeira etapa de purificação seja bem sucedida é essencial recircular a amostra na coluna de afinidade Ni²⁺-NTA, e realizar todas as etapas de cromatografia em sistema FPLC. A adição de uma segunda etapa de purificação com a coluna MBP-*trap* ajuda a retirar impurezas, mas não é essencial para a purificação. Esta coluna não foi eficiente para separar a proteína clivada da não clivada após a clivagem. Nitidamente, a trombina é mais eficiente do que a protease fator-Xa para clivar o *tag* de MBP, e a trombina é menos afetada pelo detergente utilizado, seja LDAO ou triton X-100. O *tag* de MBP auxiliou a solubilização e estabilização em solução da proteína alvo na ausência de detergente. De modo geral, há dificuldades marcantes para clivar o *tag* de MBP e isolar a construção CALX₂₇₂₋₃₃₅, principalmente devido à presença de contaminantes e formação de precipitado e agregado em solução.

O ensaio utilizando ureia para solubilização dos precipitados e agregados formados após a clivagem precisa ser repetido, corrigindo-se a concentração de proteína aplicada para visualização no SDS-PAGE. A utilização de outro desnaturante, como guanidina, também pode ser uma alternativa à ureia para a solubilização dos precipitados e agregados solúveis. Alternativamente, o fragmento CALX₂₇₂₋₃₃₅ poderia ser expresso sem *tag* de MBP, sendo retirado de corpos inclusão com auxilio de um desnaturante para posterior reconstituição em um sistema mimético de membrana.

3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE XIP

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

O peptídeo, XIP (**Esquema 3.1**), foi sintetizado pela empresa Biomatik com modificações de acetilação no N-terminal e amidação no C-terminal. O peptídeo foi analisado por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) e de ressonância magnética nuclear (RMN).

Como mencionado anteriormente (**Seção 2.2**), XIP é rico em resíduos carregados positivamente. A sequência e estrutura primária do peptídeo estão mostradas no **Esquema 3.1**.



Esquema 3.1: Sequência e estrutura primária de XIP.

3.1.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

As medidas de CD foram realizadas no equipamento Jasco J815 (Jasco) em duas temperaturas diferentes, 7 e 25 °C, utilizando cubeta de quartzo (Hellma) com caminho óptico de 1 mm. Os espectros foram adquiridos com velocidade de 20 nm/min de 190 a 300 nm, com resolução de 1 nm e um total de 3 acumulações por ponto. As amostras utilizadas continham 100 μ M do peptídeo (XIP) em tampão fosfato de sódio 2 mM em pH 6,3 com 0,1 % de azida de sódio para evitar o crescimento de bactérias. O espectro do tampão (branco) foi subtraído do espectro da amostra.

3.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os deslocamentos químicos, determinados por assinalamento manual das cadeias laterais nos espectros de 2D ¹H-¹H-TOCSY, ¹³C-HSQC e ¹⁵N-HSQC, e o assinalamento automático das correlações ¹H-¹H nos espectros de 2D ¹H-¹H-NOESY desempenhado por CYANA ⁶⁶, foram utilizados posteriormente no cálculo para determinação estrutural de XIP.

3.1.2.1. Aquisição e processamento dos espectros

As amostras para RMN foram preparadas contendo 1 mM de XIP em tampão fosfato de sódio 20 mM em pH 6,3 com 0,1 % de azida de sódio em água/D₂O (9:1) ou em água deuterada. Os experimentos foram realizados a 7 ºC no espectrômetro Bruker Avance III de 800 MHz equipado com sonda criogênica, e pertencente ao Centro Analítico de Instrumentação da USP. Os experimentos realizados foram 2D ¹H-¹H-TOCSY, 2D ¹H-¹H-NOESY e ¹⁵N-HSQC em H₂O, e ¹³C-HSQC em H₂O e D₂O. O espectro 2D ¹H-¹H NOESY foi adquirido como uma matriz de 1024x450 pontos complexos, com pré-saturação do sinal da água por um pulso de 50 Hz, e NOE mixing time de 250 ms. Os dados foram apodizados com uma função cosseno ao quadrado, e completados com zeros até formar uma matriz de 2048x2048 pontos. Os pontos devido ao filtro digital foram deslocados para o final do FID antes da realização da transformada de Fourier. O espectro de 2D TOCSY foi adquirido como uma matriz de 1024x191 pontos complexos utilizando excitation sculpting para remover o sinal da água, e um campo de spin-lock de 10417 Hz (24 µs) durante 70 ms para o período TOCSY. Os dados na dimensão indireta foram estendidos por predição linear de 128 pontos complexos, multiplicados nas duas dimensões por uma função cosseno e completados com zeros até uma matriz de 2048x2048 pontos. Assim como no caso do NOESY, os pontos devido ao filtro digital foram deslocados para o final de cada FID antes da transformada de Fourier. Os espectros de ¹⁵N-HSQC e ¹³C-HSQC foram adquiridos em abundância natural, utilizando uma sequência de pulsos com sensitivity-improvement e seleção de coerência por gradientes, como matrizes de 768x128 pontos complexos. Os dados foram multiplicados por uma função cosseno nas duas dimensões e preenchidos com zeros até 2048x256 pontos. O espectro de ¹³C-HSQC para observar sinais aromáticos foi adquirido da mesma forma, exceto pelo fato de que os pulsos em carbono foram posicionados em aproximadamente 112ppm. Os espectros obtidos foram processados utilizando o software NMRPipe ⁶⁷.

3.1.2.2. Determinação dos deslocamentos químicos

O assinalamento manual para determinação dos deslocamentos químicos (**Seção 3.1.2.1**) foi realizado através da análise de espectros ¹H-¹H TOCSY e ¹H-¹H 2D NOESY utilizando o software *CcpNmr Analysis* ⁶⁸. A numeração adotada para o peptídeo assume que o primeiro resíduo é a modificação Ac, assim, a Arginina foi considerada o segundo resíduo (**Esquema 3.1**). O assinalamento das frequências de ressonância dos núcleos de ¹³C (C α , C β , C γ , C δ e C ϵ) e ¹⁵N foi realizado a partir de análise dos espectros ¹³C-HSQC e ¹⁵N-HSQC, respectivamente.

3.1.2.2.1. Assinalamento da cadeia lateral

As regiões dos HN, hidrogênios amídicos da ligação peptídica (**A**), dos H ϵ de Argininas (**B**), dos H δ de Asparaginas (**C**), dos HN_{ami}, hidrogênios amídicos provenientes da modificação no C-terminal (**D**) e dos H δ e H ϵ , aromáticos, das Tirosinas (**E**) podem ser observadas na comparação entre os espectros de TOCSY e NOESY (**Anexo 6.2**). Apesar de haver intensa sobreposição de picos em diversas dessas regiões, os espectros estão bem resolvidos e é possível observar todas as regiões esperadas para os resíduos de XIP, exceto a metila da acetilação do N-terminal.

Os deslocamentos químicos das cadeia laterais na região (**A**) foram determinados, primeiramente, assinalando as metilas de Leucinas e Valinas que apresentam deslocamentos químicos característicos em torno de 0,9 - 1 ppm ⁶⁹. A diferenciação dos resíduos foi feita com base em NOEs com o resíduo vizinho, observados no espectro de NOESY (**Anexo 6.2 I** - NOEs do ¹HN da Val6 com ¹H β , ¹H γ e ¹H δ da Leu5). Após o assinalamento das correlações ¹H-¹H dos primeiros resíduos, os demais foram assinalados no espectro TOCSY com base nos deslocamentos químicos de referência ⁶⁹ e nos NOEs com resíduos vizinhos. Os principais NOEs observados foram de ¹H α _i-¹HN_{i+1} (**Anexo 6.2 II**) e ¹HN_i-¹HN_{i+1}, em que i é a posição do resíduo na sequência e i+1 é o resíduo seguinte (**Anexo 6.2 III**). A região próxima a 8,38 ppm bem como a região próxima a 7,98 ppm apresenta sobreposição de picos correspondentes aos resíduos Lys12, Asn13, Asn17, Arg19 e Gly20, e Tyr9, Met10, Arg15 e Val16, respectivamente (**Anexo 6.2A**). Porém conhecendo-se as correlações esperadas para cada sistema de spin e os deslocamentos químicos de referência ⁶⁹ foi possível distinguir a maioria dos picos sobrepostos.

Analisando os deslocamentos químicos na região dos ¹H α das Argininas, foi possível distinguir as correlações ¹H α -¹H ϵ das Argininas 2 e 15 com clareza. As correlações das Argininas 3 e 19 apresentaram maior sobreposição, porém a distinção pode ser feita pela análise das correlações ¹H β -¹H ϵ e ¹H γ -¹H ϵ (**B**). As correlações dos ¹H β -¹H δ das Asparaginas são bem claras e foram possíveis de serem assinaladas (**C**),

possibilitando determinar também os deslocamentos químicos dos ¹⁵N δ_2 das Asparaginas no espectro ¹⁵N-HSQC. Os deslocamentos dos hidrogênios aromáticos dos resíduos de tirosina foram assinalados diretamente no espectro NOESY (**E**). A distinção entre eles foi feita pelas correlações entre ¹H δ_i (**Anexo 6.2 IV**) e ¹H ϵ_i (**Anexo 6.2 V**) e ¹H α_i e ¹H β_i , respectivamente.

Os assinalamentos das correlações observadas nos espectros ¹⁵N-HSQC (**Anexo 6.3**) e ¹³C-HSQC (**Anexo 6.4**) foram realizados por transferência do assinalamento dos deslocamentos de hidrogênio dos espectros de TOCSY e NOESY. Correlações ¹⁵N ϵ -¹H ϵ das Argininas 2, 3 e 19 não foram assinaladas devido à sobreposição dos deslocamentos químicos do ¹⁵N ϵ (ω_1) (**Anexo 6.3 - I**). É importante notar que, como as ressonâncias do ¹⁵N ϵ das argininas normalmente situam-se na faixa de 80 ppm, estes sinais foram rebatidos dentro do espectro de ¹⁵N-HSQC (*aliasing*). Como mencionado, os N δ das Asparaginas foram possíveis de diferenciar e assinalar (**Anexo 6.3 - II**). Os deslocamentos obtidos a partir das correlações ¹HN_{ami}-¹HN_{ami} observadas nos espectros de TOCSY e NOESY (**Anexo 6.2 - D**) foram utilizados para assinalar os picos presentes no ¹⁵N-HSQC (**Anexo 6.3 - III**).

O pico correspondente à correlação ${}^{13}C^{-1}H$ da metila do grupo acetil adicionado ao N-terminal pode ser observado próximo a 2 ppm na dimensão de hidrogênio (ω_2) e 25 ppm na dimensão de carbono (ω_1). A sobreposição de picos correspondente às cadeias laterais das Argininas e Lisinas no espectro ${}^{13}C$ -HSQC dificultou o assinalamento concreto das ressonâncias de ${}^{13}C$ destas cadeias laterais (**Anexo 6.4B**). Correlações ${}^{13}C\delta^{-1}H\delta$ e ${}^{13}C\epsilon^{-1}H\epsilon$, aromáticos, da Tyr7 foram assinaladas no espectro de ${}^{13}C$ -HSQC, porém a sobreposição das correlações das Tirosinas 9 e 14 não permitiram o seu assinalamento (**Anexo 6.5**), indicando que suas cadeias laterais experimentam o mesmo ambiente químico.

3.1.2.2.2. Assinalamento da cadeia principal

Correlações de carbonos *alpha* no espectro ¹³C-HSQC foram assinaladas a partir dos deslocamentos dos H α assinalados no espectro TOCSY e com base nos deslocamentos químicos de referência para carbonos ⁶⁹ (**Anexo 6.4A**). Algumas sobreposições de picos foram observadas para os C α das leucinas e argininas. Os picos atribuídos aos ¹³C α das Asparaginas só foram assinalados no espectro do experimento de ¹³C-HSQC em D₂O, pois o sinal da água atrapalhou a observação desses picos nos experimentos em H₂O (**Anexo 6.4A**, destaque).

Foi possível assinalar todas as correlações ${}^{15}N{}^{-1}H$ da ligação peptídica no experimento de ${}^{15}N{}^{-H}SQC$. Sobreposição dos deslocamentos de ${}^{1}HN$ na região em torno de 8,4 ppm na dimensão de hidrogênio (ω_2) (TOCSY e ${}^{15}N{}^{-H}SQC$) dificultou a atribuição

de assinalamento dos picos, mas o assinalamento da correlação ¹⁵N-¹H da Gly20 é bastante claro devido ao deslocamento químico característico de ¹⁵N de glicinas ⁶⁹ (**Anexo 6.3B**).

3.1.2.3. Assinalamento automático dos NOEs - CYANA 2.1

O assinalamento dos NOEs foi realizado de forma automática com auxílio do software CYANA versão 2.1 ⁶⁶. O programa CYANA utiliza um algoritmo para automatizar o assinalamento dos NOEs observados no espectro NOESY. A automatização desses assinalamentos e o cálculo da estrutura são realizados em sete ciclos de iteração, em cada ciclo são calculadas 100 estruturas para o assinalamento corrente. A avaliação dos assinalamentos é realizada por uma pontuação P_{tot} ⁶⁶:

$$P_{tot} = P_{shift} x P_{structure} x P_{network}$$
 (Equação 3.1).

 P_{tot} é calculado com base em três subcritérios. P_{shift} é a probabilidade de que o assinalamento esteja correto com base em uma distribuição gaussiana de probabilidades dos deslocamentos químicos, calculada considerando-se o deslocamento químico fornecido e a tolerância permitida para cada pico. $P_{structure}$ é a probabilidade de que o NOE assinalado esteja de acordo com **n** estruturas dentre os **N** modelos de menor *target function* calculados no ciclo anterior ($P_{structure} = n/N$). $P_{network}$ é a probabilidade das possibilidades de assinalamento de cada pico concordarem com o assinalamento de todos os núcleos envolvidos direta ou indiretamente ao núcleo relacionado ao pico analisado, ou seja, é a probabilidade de concordância do assinalamento proposto com os demais sem violar nenhum deles dentro da tolerância estabelecida. Este conceito é conhecido como *network anchoring.* Ao final dos sete ciclos, são selecionadas os 20 modelos estruturais usando apenas os assinalamentos de restrição de distância não ambíguos.

Para calcular a estrutura, CYANA baseia-se em informações da sequência de aminoácidos do alvo em estudo, deslocamentos químicos, restrições de ângulos diedrais e na lista de picos coletados no espectro NOESY com informações de volume e intensidade de cada pico ⁶⁶. Os deslocamentos fornecidos foram os obtidos dos assinalamentos dos espectros TOCSY, NOESY, ¹⁵N-HSQC e ¹³C-HSQC (**Seção 3.1.2.2**), e exportados de *CcpNmr Analysis* ⁶⁸ no formato *XEasy* pelo *FormatConverter*. As restrições de ângulos diedrais ($\phi = \psi$) fornecidas foram determinadas por TALOS+ ⁷⁰. TALOS+ é um programa que prediz torções dos ângulos $\phi = \psi$ a partir de informações de deslocamentos químicos dos núcleos ¹HN, ¹⁵N, ¹³C α e ¹³C β e da sequência de aminoácidos do alvo em estudo. Os deslocamentos químicos fornecidos para TALOS+ foram exportados de

CcpNmr Analysis no formato TALOS pelo *FormatConverter*. Os volumes e as intensidades dos picos da lista de NOEs coletados do espectro NOESY foram previamente recalculados utilizando *Peak fit* e *Gaussian*, respectivamente, e posteriormente exportados no formato *NMRView*. Foram fornecidos para CYANA um total de 610 NOEs do espectro em H₂O. Devido às modificações, acetilação no N-terminal e amidação no C-terminal, em XIP, a biblioteca de topologia de CYANA (*cyana.lib*) foi modificada adicionando-se as terminações Ac e NH₂ como novos resíduos. As tolerâncias dos deslocamentos químicos foram estabelecidas em 0,010 e 0,020 na dimensão direta e indireta, respectivamente.

3.1.3. Refinamento da estrutura de XIP em água

Os 20 modelos estruturais calculados por CYANA foram refinados em solvente explícito com auxílio do programa HADDOCK versão 2.2⁷¹. HADDOCK é um programa que utiliza estruturas cristalográficas e de RMN para realizar cálculos de *docking* de complexos proteína-proteína em água. Aqui, HADDOCK foi utilizado para refinar em água os modelos gerados por CYANA. Além dos modelos, outro tipo de restrição fornecido ao HADDOCK são as de ângulos diedrais obtidos por TALOS+ no formato TBL.

O protocolo utilizado para o refinamento consiste em utilizar apenas a etapa final do protocolo comum de *docking* ⁷¹, que consiste em uma dinâmica molecular (MD) com campo de força OPLSX. Para cada modelo o programa adiciona uma camada de moléculas de água do tipo TIP3P com 8 Å de espessura em torno de XIP. A MD realizada apresenta três etapas, com tempo de integração de 2 fs em espaço cartesiano. A primeira é uma etapa de aquecimento de 2000 passos em que a temperatura é aumentada em degraus de 100, 200 e 300 K. Na segunda etapa, a temperatura se mantém constante em 300K durante os 5000 passos. Na terceira e última etapa, o sistema é resfriado de 300 a 100 K em 5000 passos. As estruturas refinadas por HADDOCK foram avaliadas quanto à estereoquímica utilizando *RamPage* ⁷², às violações de restrições de distância e ângulos diedrais. A convergência do cálculo foi avaliada pelo RMSD da cadeia principal e dos átomos pesados calculado com *Profit* ⁷³.

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anteriormente, a região correspondente ao XIP já foi representada por uma hélice ⁷⁴ e, como mencionado, acredita-se que esta região esteja envolvida na regulação do trocador ^{24,44}. A fim de obter informações sobre a estrutura dessa região para tentar esclarecer a sua forma de atuação na regulação do trocador, foram realizados ensaios de dicroísmo circular (CD) e ressonância magnética nuclear (RMN) para caracterizar a estrutura de um segmento peptídico correspondente ao XIP em solução aquosa.

Os espectros de CD de XIP em tampão fosfato adquiridos a 7 °C e 25 °C mostram uma banda positiva próxima a 195 nm, que é característica de formação de estrutura secundária do tipo α -hélice ou fita- β (**Figura 3.1A**). Porém, analisando o espectro como um todo, não é evidente qual estrutura secundária o peptídeo assume, uma vez que nenhum dos perfis de estruturas modelo são observados nos espectros obtidos (veja **Figura 3.1B**). Dessa forma, é difícil determinar a estrutura que o peptídeo assume a partir de uma interpretação qualitativa destes espectros. Servidores de análises para deconvolução de espectros de CD não apresentam bancos de dados suficientemente amplos para peptídeos, o que prejudica a confiabilidade da deconvolução espectral do espectro de CD neste caso.

Alternativamente, comparou-se os espectros adquiridos a outros presentes na literatura (**Figura 3.1B** e **3.1C**). Apesar da banda positiva em 195 nm também ser característica de folhas- β , esta estrutura foi descartada pois o espectro não apresenta uma banda negativa pronunciada em aproximadamente 216 nm. Portanto, frente às demais estruturas possíveis duas que chamam a atenção são α -hélice e 3₁₀-hélice. Tendo em vista que o espectro de CD de XIP não apresenta um perfil típico de α -hélice, esperase que seja uma estrutura 3₁₀-hélice ou uma composição das duas. Toniolo, Formaggio e Woody discorreram sobre a análise e interpretação de perfis de espectros de CD para diversos peptídeos ⁷⁵. Para a estrutura 3₁₀-hélice, evidenciaram bandas características em 195 nm (positiva), 203 nm (negativa) e ainda um ombro negativo em aproximadamente 222 nm ⁷⁶ (**Figura 3.1C**). A descrição do espectro para uma 3₁₀-hélice é consistente com o espectro de CD de XIP, indicando que o peptídeo poderia assumir uma conformação de 3₁₀-hélice em água a 7 °C.



Figura 3.1: Perfis espectrais de dicroísmo circular de XIP e de referência. (A) Sobreposição dos espectros dos adquiridos a 7 (azul) e a 25 °C (vermelho). (B) Perfil ideal para as estruturas secundária mais comuns. Reprodução de Corrêa, 2009 ⁷⁷. (C) Perfil esperado para peptídeo em conformação de 3_{10} -hélice. Retirado de Toniolo, 1996 ⁷⁶.

O aumento da temperatura para 25 °C causou a diminuição da intensidade da banda de CD em 195 nm, o que indica perda de estrutura com aumento da temperatura. Desse modo, pode-se dizer que a estrutura do peptídeo não é termicamente estável. Tendo em vista que peptídeos pequenos são, geralmente, flexíveis, a estabilização de uma estrutura a 7 °C e desestabilização com o aumento da temperatura é esperado. Conclui-se, a partir da análise destes espectros de CD, que o peptídeo é termicamente instável e assume uma estrutura de 3_{10} -hélice a 7 °C. De acordo com Formaggio e colaboradores 2000, peptídeos com até 8 resíduos podem assumir estrutura 3_{10} -hélice, porém peptídeos maiores tendem a formar α -hélices ⁷⁸. Sendo assim, para obter

informações sobre a estrutura de XIP em resolução atômica foi necessário resolver a sua estrutura por medidas de RMN.

A fim de resolver a estrutura do peptídeo por RMN, adquiriu-se espectros bidimensionais ¹H-¹H NOESY e ¹H-¹H TOCSY em água e em D₂O. O experimento 2D-¹H-¹H-NOESY em D₂O não apresentou nenhum pico adicional em relação ao espectro adquirido em água. Portanto apenas dados extraídos dos espectros NOESY em H_2O foram considerados e utilizados para o assinalamento dos NOEs e cálculo de estrutura. Os deslocamentos químicos fornecidos para o assinalamento automático e para a determinação de restrição de ângulos diedrais foram obtidos dos assinalamentos descritos na Seção 3.1.2.2. Do assinalamento automático obteve-se um total de 542 picos dos 610 picos NOE coletados. Dos 68 picos do espectro de NOESY em H_2O que não foram assinalados, dois correspondem a correlações 1H_{NH2}-1H_{NH2} devido à modificação de amidação do C-terminal. Os demais correspondem a picos que que foram assinalados em apenas um lado da diagonal ou a picos pouco definidos. A ausência de 68 correlações não assinaladas não prejudica a convergência do cálculo. As 20 estruturas calculadas a partir dos NOEs assinalados apresentaram target function médio de 0,50 ± 2,16.10⁻² e RMSD médio de 0,39 \pm 0,09 Å para a cadeia principal e 1,31 \pm 0,11 Å para átomos pesados (valores fornecidos por CYANA). Nenhuma violação de distância foi observada, porém ocorreu uma violação de ângulo, ψ da Val6. Dois *clashes* foram observados, ambos entre átomos da cadeia lateral com carbono alpha do mesmo resíduo. A fim de melhorar a estéreoquímica, as estruturas foram refinadas em água com dinâmicas moleculares curtas em solvente explicito como descrito na Seção 3.1.3. As estatísticas finais das 20 estruturas são mostradas na Tabela 3.1. O conjunto final de modelos apresenta RMSD 0,49 \pm 0,12 Å para a cadeia principal e 2,29 \pm 0,59 Å para átomos pesados. Os clashes observados nas estruturas iniciais foram resolvidos e nenhuma violação de distância foi observada, no entanto observou-se violações acima da tolerância de um ângulo diedral em três confôrmeros.

O gráfico de Ramachandran das estruturas refinadas é mostrado na **Figura 3.2A**. Apenas 0,3% dos resíduos encontram-se em região não permitida do diagrama de Ramachandran. O resíduo que se encontra em região não permitida é a Arg3 em 10 modelos. De fato, restrições de ângulos diedrais da Arg3 e Arg2, foram violadas em três e dez modelos respectivamente. A maior parte dos resíduos populam uma região do diagrama de Ramachandran que é típica de hélice corroborando com o espectro de CD a 7°C. Entretanto comparando-se os valores de ângulos referência para α -hélice e para 3₁₀hélice (**Figura 3.2B** e **Tabela 3.1**) com os valores observados no gráfico de Ramachandran, não fica claro se a estrutura formada é uma 3₁₀-hélice ou uma α -hélice.

Restrições de distância e diedral	
Restrições de distância	
NOEs totais	293
Intraresidual	127
Interresidual	166
Sequencial (i -j = 1)	103
Alcance médio (1 < $ i - j < 5$)	63
Alcance longo (i -j ≤ 5)	0
Intermolecular	0
Total de restrições de ângulo diedral	
φ	17
ψ	17
Assinalamentos	
Backbone (^{15}N , ^{1}H)(%)	89,2
Cadeias laterais (¹ H)(%)	96,8
Total (¹ H, ¹⁵ N, ¹³ C)(%)	97,7 47,2 56,7
Estatísticas das estruturas calculadas *	
Violações	
Distância (> 0,5 Å)	0
Ângulo diedral (> 50)	1**
<u>Média dos valores de RMSD (</u> Å)	
Átomos pesados	$2,29 \pm 0,59$
Backbone	$0,49 \pm 0,12$
Ramachandran plot	
Região favorável (%)	98,8
Região permitida	0,9
Região não permitida	0,3

 Tabela 3.1: Assinalamento e estatística para estrutura de XIP refinada em água

* Estatísticas foram calculadas do *ensemble* das 20 estruturas refinadas por HADDOCK, todos os valores calculadas são médios.

** Esta violação foi observada em 3 estruturas entre os resíduos Arg2 e Arg3 (N-terminal de XIP).



Figura 3.2: *Gráficos de Ramachandran de XIP e referência.* **(A)** Ramachandran das estruturas finais refinados por HADDOCK 2.2, *plot* realizado com RAMPAGE ⁷². **(B)** Destaque das regiões no Ramachandran para as estruturas secundárias conhecidas. Reproduzido de Lovell, 2003 ⁷².

Parâmetro	3 ₁₀ -hélice	α -hélice	
φ	-57°	-63°	
ψ	-30°	-42°	
NO=C H-bond angle	128°	156°	
Rotação (por resíduo)	111°	99°	
Translação axial (por resíduo)	1,94 Å	1,56 Å	
Resíduo por volta	3,24	3,63	
Distância	6,29 Å	5,67 Å	

Tabela 3.2: Parâmetros estruturais médios para 3₁₀- e α-hélices ⁷⁹

A análise de NOEs sequenciais e de médio alcance identificados após o assinalamento dos NOEs é mostrada na **Figura 3.3A.** Observa-se que entre os resíduos 12 e 14 há interações do tipo $H\alpha_i$ -HN_{i+2} que só é esperada para estruturas do tipo 3_{10} -hélice (**Figura 3.3B**) corroborando com os espectros de CD. Ainda, vê-se que não há, em nenhum segmento de XIP, interações do tipo $H\alpha_i$ -HN_{i+4} observadas apenas em estruturas tipo α -hélice (**Figura 3.3**). Dessa forma, os espectros de CD obtidos e o conjunto de estruturas calculado e refinado com dados de RMN (**Figura 3.4**) indicam que XIP pode compreender uma estrutura de 3_{10} -hélice. Análise das estruturas com *Procheck-nmr* também indicou a formação de uma hélice envolvendo os resíduos 3-5 e 7-18⁸⁰. Entretanto, *Procheck*, não distingue hélices α e 3_{10} .





(B)

	a-Helix	3 ₁₀ -Helix	Turn I	Turn II	Turn I ^I	Turn II ^I	Half-turn
$d_{\alpha N}(i, i+4)$							
$d_{\alpha\beta}(i,i+3)$							
σ _{αN} (i,i+3)							
d _{NN} (i, i+2)			—				
$d_{\alpha N}(i,i+2)$							
ď _{NN}				-		-	-
d _{αN} ³ / _{αN} (Hz)	4 4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6 7	4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6	4 9 1 2 3 4	4 5 1 2 3 4	75 1234	79 1234	49 1234

Figura 3.3: Diagrama das interações sequenciais e de médio alcance 1H-1H dos NOEs. **(A)** Diagrama para os dados obtidos após assinalamento automático dos NOEs de XIP em H₂O por CYANA **(B)** Diagrama referência retirado de Wagner, 1986 ⁸¹.



Figura 3.4: *Modelos refinados em água.* **(A)** Sobreposição dos 20 modelos refinados em água, **(B)** Primeiro modelo usado como base dos cálculos de RMSD, **(C)** Vista do N-terminal no modelo mostrado em B e **(D)** Vista do C-terminal no modelo mostrado em B.

Espectros de RMN a 27 °C (dados não mostrados) foram adquiridos para a determinação estrutural de XIP. No entanto, a predição de ângulos $\phi e \psi$ indicou uma estrutura dinâmica, e dessa forma o assinalamento automático foi realizado sem restrições de ângulos diedrais. Ao final do assinalamento, 481 picos foram assinalados dos 556 picos coletados, sendo que do total de picos fornecidos 9 estavam previamente assinalados (região dos hidrogênios aromáticos das Tirosinas). Alguns NOEs determinados eram ambíguos, porém todos envolvendo hidrogênios das cadeias laterais.

O target function médio foi de $1,95.10^{-4} \pm 3,70.10^{-4}$, porém os RMSDs médio se mostraram altos (2,23 ± 0,51 Å para cadeia principal e 3,12 ± 0,39 Å para átomos pesados) indicando que o cálculo não convergiu, o que é consistente com a predição dos ângulos diedrais que indicou que a estrutura é dinâmica. NOEs de médio alcance indicativos de estruturação não foram observados como pode ser analisado no diagrama (**Figura 3.5A**), evidenciando, também, a desestruturação de XIP nesta temperatura. Em todos os modelos calculados XIP mostrou-se em conformação estendida, com exceção a uma dobra entre os resíduos Met10 e Tyr14 (**Figura 3.5B**), que participam do conjunto de NOEs ambíguos. Estes dados não alteram a conclusão de que XIP é desordenado a 27°C. Como observado no espectro de CD a 25°C (**Figura 3.1A** - curva vermelha) XIP não é termicamente estável.



Figura3.5: Resultados das estruturas calculadas para XIP a 27 °C. (A) Diagrama para os dados obtidos após assinalamento automático dos NOEs de XIP em H_2O por CYANA. (B) Modelos calculados após assinalamento por CYANA. (C) Modelo apresentando os resíduos Met10 e Tyr14, mostrando a dobra em XIP.

Frente aos resultados de CD e RMN, bem como ao cálculo e refinamento da estrutura, XIP não assume estrutura secundária a temperatura mais alta. Porém o fato de apresentar estrutura a temperatura mais baixa pode indicar uma tendência de interconverter entre *random coil* e 3₁₀-hélice, que poderia ser estabilizada em determinada condição no contexto da proteína completa. Pode-se considerar, ainda, um efeito da membrana na estabilização de estrutura de XIP a temperaturas mais altas.

Estruturas de 3_{10} -hélices são observadas em composição com α -hélices ou em segmentos curtos em proteínas globulares ⁸². Ainda permitem a manutenção da forma helicoidal durante conversão para uma estrutura mais estável, α -hélice ⁸³. Essas características permitem especular sobre a conformação de XIP no contexto do trocador completo (**Figura 3.6A** e **3.6B**). Uma possibilidade é que TMH5-XIP seja uma hélice única atravessando a membrana para o citosol como mostrado no primeiro modelo (**Figura 3.6A**). Dessa forma, a estrutura dessa hélice única pode ser imaginada de algumas formas: uma mistura de 3_{10} - e α -hélice, ou XIP se enovelaria formando uma continuação da α -hélice TMH5, ou ainda, XIP poderia ser uma continuação da TMH5 em conformação de 3_{10} -hélice. Nesta situação, em que o segmento TMH5-XIP se mostra como hélice única, esta região poderia funcionar como uma alavanca e interferir na conformação do domínio transmembranar durante os estados ativo ou inativo do

trocador, o que explicaria seu papel na regulação alostérica do trocador.

Outro modelo pode ser levantado frente às características de 3₁₀-hélices em peptídeos. Estas estruturas são observadas em membros da família dos *peptaibiotics* que interagem com a membrana (peptídeos naturais com ação antibiótica ricos em resíduos Aib) ⁸⁴. Apesar de XIP não apresentar resíduos Aib e nem atividade antimicrobiana, ele se localiza próximo à membrana, sugerindo que XIP poderia interagir com a membrana. Uma análise da estrutura de XIP que mostra os aminoácidos carregados encontram-se em uma das faces do modelo (**Figura 3.6C**), contribuindo com a possibilidade de interação com a membrana conforme apresentado no segundo modelo (**Figura 3.6B**). Neste segundo modelo a face positiva interagiria com a membrana, escondendo esses resíduos. Porém em uma situação em que a face carregada positivamente esteja voltada para o citosol, permitiria sua interação com P1 como proposto por Molinaro, 2015 ou com NP como proposto por Abiko, 2016. Dessa forma, a interação de XIP com a membrana se mostraria determinante para a modulação da ação regulatória de XIP.



Figura 3.6: Modelos propostos para conformação de XIP. (A) Modelo proposto em que XIP corresponde à continuação da hélice TMH5, (B) Modelo proposto em que XIP interage com a membrana e (C) Distribuição de cargas na superfície de XIP o que justificaria a interação proposta na Figura 3.6B. A estrutura utilizada foi aquela calculada a 7 °C. Densidades de carga são mostradas em escala de vermelho (mais negativo) a azul (mais positivo). I e II mostram faces opostas de XIP.

3.3. CONCLUSÕES PARCIAIS E PERSPECTIVAS

Os dados obtidos a 25 °C e 27 °C mostraram o peptídeo representado por XIP não é estruturado. Porém XIP parece assumir uma estrutura de 3_{10} -hélice a 7 °C, indicando que este peptídeo tem tendência a assumir uma estrutura helicoidal. No contexto de CALX completo, interações com o domínio transmembranar (especificamente TMH5) ou com a membrana podem estabilizar e/ou desestabilizar a estrutura deste segmento.

Para investigar a influência da bicamada lipídica sobre a estruturação de XIP em temperaturas mais altas, poderão ser realizados experimentos de CD e RMN, similares aos já realizados, em presença de lipossomos (mimetizando a membrana) a 25 e 37 °C.

4. CONCLUSÕES

Muitas perguntas surgiram frente a estrutura de XIP resolvida por RMN a 7 °C. É razoável supor que a conformação de XIP poderia sofrer influência dos demais domínios de CALX e da membrana. Investigar a influência de lipossomos como miméticos de membrana sobre a estruturação e estabilização de XIP (**Seção 3.2** - **Figura 3.6C** e **Seção 3.3**) não é suficiente para responder as questões sobre a interferência dos demais domínios. Dessa forma é inquestionável a necessidade de produzir o segmento TMH5-XIP para estudos estruturais. Sendo assim, a região descrita e estudada na **Seção 2**, deverá ser retomada e resolvida para auxiliar na obtenção de respostas mais conclusivas sobre o seu papel no mecanismo de regulação.

5. REFERÊNCIAS

(1) Lodish, H. F. (2000) Molecular cell biology 4th ed. W.H. Freeman, New York.

(2) Carafoli, E., and Krebs, J. (2016) Why calcium? How calcium became the best communicator. J. Biol. Chem. 291, 20849–20857.

(3) Toyoshima, C. (2009) How Ca2+-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.

(4) Catterall, W. A. (2011) Voltage-gated calcium channels. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3, 1–23.

(5) Reshkin, S. J., Cardone, R. A., and Harguindey, S. (2013) Na+-H+ exchanger, pH regulation and cancer. Recent Pat Anticancer Drug Discov 8, 85–99.

(6) Rocafull, M. A., Thomas, L. E., and del Castillo, J. R. (2012) The second sodium pump: from the function to the gene. Pflugers Arch. J. Physiol. 463, 755–777.

(7) Kanazawa, T., Misawa, K., Misawa, Y., Uehara, T., Fukushima, H., Kusaka, G., Maruta, M., and Carey, T. E. (2015) G-Protein-Coupled Receptors: Next Generation Therapeutic Targets in Head and Neck Cancer? Toxins (Basel) 7, 2959–2984.

(8) Gautier, A. (2014) Structure determination of a-helical membrane proteins by solution-state NMR: Emphasis on retinal proteins. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1837, 578–588.

(9) Cai, X., and Lytton, J. (2004) The cation/Ca2+ exchanger superfamily: Phylogenetic analysis and structural implications. Mol. Biol. Evol. 21, 1692–1703.

(10) Lytton, J. (2007) Na+/Ca2+ exchangers: three mammalian gene families control Ca2+ transport. Biochem. J. 406, 365–82.

(11) Philipson, K. D., and Nicoll, D. a. (2000) Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. Annu. Rev. Physiol. 62, 111–33.

(12) Reeves, J. P., and Condrescu, M. (2008) Ionic regulation of the cardiac sodiumcalcium exchanger. Channels.

(13) Khananshvili, D. (2014) Sodium-calcium exchangers (NCX): Molecular hallmarks underlying the tissue-specific and systemic functions. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 466, 43–60.

(14) Craner, M. J., Newcombe, J., Black, J. A., Hartle, C., Cuzner, M. L., and Waxman, S. G. (2004) Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: Altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na+/Ca2+ exchanger. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 8168–8173.

(15) Reuter, H., Pott, C., Goldhaber, J. I., Henderson, S. A., Philipson, K. D., and Schwinger, R. H. G. (2005) Na+-Ca2+exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling. Cardiovasc. Res.

(16) Nicoll, D. a, Sawaya, M. R., Kwon, S., Cascio, D., Philipson, K. D., and Abramson, J. (2006) The crystal structure of the primary Ca2+ sensor of the Na+/Ca2+ exchanger reveals a novel Ca2+ binding motif. J. Biol. Chem. 281, 21577–81.

(17) Hilgemann, D. W. (1990) Regulation and deregulation of cardiac Na(+)-Ca2+ exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches. Nature 344, 242–5.

(18) Nicoll, D. A., Ottolia, M., Lu, L., Lu, Y., and Philipson, K. D. (1999) A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na+-Ca2+ exchanger. J. Biol. Chem. 274, 910–917.

(19) Besserer, G. M., Ottolia, M., Nicoll, D. A., Chaptal, V., Cascio, D., Philipson, K. D., and Abramson, J. (2007) The second Ca2+-binding domain of the Na+ Ca2+ exchanger is essential for regulation: crystal structures and mutational analysis. Proc. Natl. Acad.

Sci. U. S. A. 104, 18467-72.

(20) Yuan, J., Yuan, C., Xie, M., Yu, L., Bruschweiler-Li, L., and Bruschweiler, R. (2018) The Intracellular Loop of the Na+/Ca2+ Exchanger Contains an "awareness Ribbon" Shaped Two-helix Bundle Domain. Biochemistry.

(21) Li, Z., Nicoll, D. A., Collins, A., Hilgemann, D. W., Filoteo, A. G., Penniston, J. T., Weise, J. N., Tomich, J. M., and Philipson, K. D. (1991) Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal Na+-Ca2+ exchanger. J. Biol. Chem. 266, 1014–1020.

(22) Matsuoka, S., Nicoll, D. A., Reilly, R. F., Hilgemann, D. W., and Philipson, K. D. (1993) Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca2+ exchanger. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 3870–4.

(23) Hilge, M., Aelen, J., Foarce, A., Perrakis, A., and Vuister, G. W. (2009) Ca2+ regulation in the Na+/Ca2+ exchanger features a dual electrostatic switch mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 14333–14338.

(24) Molinaro, P., Pannaccione, A., Sisalli, M. J., Secondo, A., Cuomo, O., Sirabella, R., Cantile, M., Ciccone, R., Scorziello, A., Di Renzo, G., and Annunziato, L. (2015) A new cell-penetrating peptide that blocks the autoinhibitory XIP domain of NCX1 and enhances antiporter activity. Mol. Ther. 23, 465–476.

(25) Schwarz, E. M., and Benzer, S. (1997) Calx, a Na-Ca exchanger gene of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 10249–10254.

(26) Liao, J., Li, H., Zeng, W., Sauer, D. B., Belmares, R., and Jiang, Y. (2012) Structural insight into the ion-exchange mechanism of the Na+/Ca2+ exchanger. Science (80-.). 335, 686–90.

(27) Winkfein, R. J., Szerencsei, R. T., Kinjo, T. G., Kang, K., Perizzolo, M., Eisner, L., and Schnetkamp, P. P. M. (2003) Scanning mutagenesis of the alpha repeats and of the transmembrane acidic residues of the human retinal cone Na/Ca-K exchanger. Biochemistry 42, 543–552.

(28) Viklund, H., and Elofsson, A. (2008) OCTOPUS: Improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. Bioinformatics 24, 1662–1668.

(29) John, S. A., Ribalet, B., Weiss, J. N., Philipson, K. D., and Ottolia, M. (2011) Ca2+dependent structural rearrangements within Na+-Ca2+ exchanger dimers. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 1699–1704.

(30) Ottolia, M., Nicoll, D. A., and Philipson, K. D. (2009) Roles of two Ca2+-binding domains in regulation of the cardiac Na+-Ca2+exchanger. J. Biol. Chem. 284, 32735–32741.

(31) DiPolo, R., and Beaugé, L. (2006) Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. Physiol. Rev. 86, 155–203.

(32) Hilgemann, D. W., Matsuoka, S., Nagel, G. A., and Collins, A. (1992) Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. J. Gen. Physiol. 100, 905–32.

(33) Hryshko, L. (2008) What regulates Na+/Ca2+ exchange? Focus on "Sodiumdependent inactivation of sodium / calcium exchange in transfected Chinese hamster ovary cells " 869–871.

(34) Boyman, L., Mikhasenko, H., Hiller, R., and Khananshvili, D. (2009) Kinetic and equilibrium properties of regulatory calcium sensors of NCX1 protein. J. Biol. Chem. 284, 6185–6191.

(35) Giladi, M., Boyman, L., Mikhasenko, H., Hiller, R., and Khananshvili, D. (2010) Essential role of the CBD1-CBD2 linker in slow dissociation of Ca2+from the regulatory

two-domain tandem of NCX1. J. Biol. Chem. 285, 28117-28125.

(36) Giladi, M., and Khananshvili, D. (2013) Molecular determinants of allosteric regulation in NCX proteins, in Advances in Experimental Medicine and Biology, pp 35–48.

(37) HRYSHKO, L. V., MATSUOKA, S., NICOLL, D. A., WEISS, J. N., SCHWARZ, E. M., BENZER, S., and PHILIPSON, K. D. (1996) Anomalous Regulation of the Drosophila Na + -Ca 2 + Exchanger by C a 2 +. Regulation 108.

(38) Omelchenko, a, Dyck, C., Hnatowich, M., Buchko, J., Nicoll, D. a, Philipson, K. D., and Hryshko, L. V. (1998) Functional differences in ionic regulation between alternatively spliced isoforms of the Na+-Ca2+ exchanger from Drosophila melanogaster. J. Gen. Physiol. 111, 691–702.

(39) Liao, J., Marinelli, F., Lee, C., Huang, Y., Faraldo-gómez, J. D., and Jiang, Y. (2016) Mechanism of extracellular ion exchange and binding-site occlusion in a sodium / calcium exchanger.

(40) Ren, X., and Philipson, K. D. (2013) The topology of the cardiac Na+/Ca2+ exchanger, NCX1. J. Mol. Cell. Cardiol. 57, 68–71.

(41) Giladi, M., Sasson, Y., Fang, X., Hiller, R., Buki, T., Wang, Y. X., Hirsch, J. A., and Khananshvili, D. (2012) A common CA2+-driven interdomain module governs eukaryotic NCX regulation. PLoS One 7.

(42) Chaptal, V., Besserer, G. M., Ottolia, M., Nicoll, D. A., Cascio, D., Philipson, K. D., and Abramson, J. (2007) How does regulatory Ca2+ regulate the Na+-Ca2+ exchanger? Channels (Austin). 1, 397–399.

(43) Chaptal, V., Ottolia, M., Mercado-Besserer, G., Nicoll, D. a., Philipson, K. D., and Abramson, J. (2009) Structure and functional analysis of a Ca2+ sensor mutant of the Na+/Ca2+ exchanger. J. Biol. Chem. 284, 14688–14692.

(44) Matsuoka, S., Nicoll, D. a, He, Z., and Philipson, K. D. (1997) Regulation of cardiac Na(+)-Ca2+ exchanger by the endogenous XIP region. J. Gen. Physiol. 109, 273–86.

(45) Abiko, L. A., Vitale, P. M., Favaro, D. C., Hauk, P., Li, D. W., Yuan, J., Bruschweiler-Li, L., Salinas, R. K., and Brüschweiler, R. (2016) Model for the allosteric regulation of the Na+/Ca2+ exchanger NCX. Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 84, 580–590.

(46) Rizo, J., and Su, T. C. Ca 2 z -binding Domain *.

(47) Salinas, R. K., Bruschweiler-Li, L., Johnson, E., and Bruschweiler, R. (2011) Ca2+binding alters the interdomain flexibility between the two cytoplasmic calciumbinding domains in the Na+/Ca2+exchanger. J. Biol. Chem. 286, 32123–32131.

(48) Dixit, M., Kim, S., Matthews, G. F., Erreger, K., Galli, A., Cobb, C. E., Hustedt, E. J., and Beth, A. H. (2013) Structural arrangement of the intracellular Ca2+ binding domains of the cardiac Na+/Ca2+ exchanger (NCX1.1): Effects of Ca2+ binding. J. Biol. Chem. 288, 4194–4207.

(49) Wu, M., Tong, S., Gonzalez, J., Jayaraman, V., Spudich, J. L., and Zheng, L. (2011) Structural basis of the Ca2+ inhibitory mechanism of Drosophila Na+/Ca2+ exchanger CALX and its modification by alternative splicing. Structure 19, 1509–1517.

(50) Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in The Proteomics Protocols Handbook, pp 571–607.

(51) McGuffin, L. J., Bryson, K., and Jones, D. T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics 16, 404–405.

(52) Huang, Y. J., Acton, T. B., and Montelione, G. T. (2014) DisMeta: A meta server for construct design and optimization. Methods Mol. Biol. 1091, 3–16.

(53) Hu, J., Qin, H., Gao, F. P., and Cross, T. A. (2011) A systematic assessment of

mature MBP in membrane protein production: Overexpression, membrane targeting and purification. Protein Expr. Purif. 80, *34–40.*

(54) Poget, S. F., and Girvin, M. E. (2007) Solution NMR of membrane proteins in bilayer mimics: Small is beautiful, but sometimes bigger is better. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.

(55) Das, B. B., Park, S. H., and Opella, S. J. (2015) Membrane protein structure from rotational diffusion. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1848, 229–245.

(56) Hagn, F., Etzkorn, M., Raschle, T., and Wagner, G. (2013) Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. J. Am. Chem. Soc. 135, 1919–1925.

(57) Tribet, C., Audebert, R., and Popot, J.-L. (1996) Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 15047–15050.

(58) Disponível em: <https://www.anatrace.com/Products/General-Purpose-Laboratory-Detergents/MB-REAGENTS/T1001>. Acessado em 22 de fevereiro de 2018.

(59) Disponível em: <https://www.anatrace.com/Products/Detergents/AMINE-OXIDES/D360>. Acessado em: 22 de fevereiro de 2018.

(60) Disponível em: <https://www.anatrace.com/Products/Lipids/FOS-CHOLINE/F308S>. Acessado em 22 de fevereiro de 2018.

(61) Disponível em: <https://www.anatrace.com/Products/Detergents/MALTOSIDES/D310>. Acessado em 22 de fevereiro de 2018.

(62) Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/28364>. Acessado em 22 de fevereiro de 2018.

(63) Vergis, J. M., and Wiener, M. C. (2011) The variable detergent sensitivity of proteases that are utilized for recombinant protein affinity tag removal. Protein Expr. Purif. 78, 139–142.

(64) Miroux, B., and Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J. Mol. Biol. 260, 289–298.

(65) Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., and Deber, C. M. (2009) Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 1760–1765.

(66) Güntert, P., and Buchner, L. (2015) Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA. J. Biomol. NMR 62, 453–471.

(67) Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR 6, 277–293.

(68) Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., and Laue, E. D. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. Proteins Struct. Funct. Genet. 59, 687–696.

(69) Biological Magnetic Resonance Data Bank Disponível em: http://www.bmrb.wisc.edu/referenc/> Acessado em: 01 de fevereiro de 2018.

(70) Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., and Bax, A. (2009) TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. J. Biomol. NMR 44, 213–223.

(71) Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A. M. J. J. (2003) HADDOCK: A proteinprotein docking approach based on biochemical or biophysical information. J. Am. Chem. Soc. 125, 1731-1737.

(72) Lovell, S. C., Davis, I. W., Adrendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2003) Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. Proteins-Structure Funct. Genet. 50, 437–450.

(73) *McLachlan, A. (1982) Rapid comparison of protein structures.* Acta Crystallogr. Sect. A Cryst. Physics, ... 1980–1982.

(74) Plain, F., Congreve, S. D., Yee, R. S. Z., Kennedy, J., Howie, J., Kuo, C. W., Fraser, N. J., and Fuller, W. (2017) An amphipathic -helix directs palmitoylation of the large intracellular loop of the sodium/calcium exchanger. J. Biol. Chem. 292, 10745–10752.

(75) Zsila, F. (2012) Electronic Circular Dichroism Spectroscopy, in Comprehensive Chiroptical Spectroscopy, Volume 2: Applications in Stereochemical Analysis of Synthetic Compounds, Natural Products, and Biomolecules (N. Berova, Polavarapu, P. L., Nakanishi, K., and Woody, R., Eds.) 1a edição., pp 499–544.

(76) Toniolo, C., Polese, A., Formaggio, F., Crisma, M., and Kamphuis, J. (1996) Circular Dichroism Spectrum of a Peptide 3 ₁₀ -Helix. J. Am. Chem. Soc. 118, 2744–2745.

(77) Corrêa, D., Henrique, C., Ramos, I., Corrêa, D. H. A., and Ramos, C. H. I. (2009) The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. African J. Biochem. Res. 3, 164–173.

(78) Formaggio, F., Crisma, M., Rossi, P., Scrimin, P., Kaptein, B., Broxterman, Q. B., Kamphuis, J., and Toniolo, C. (2000) The First Water-Soluble 3 10 -Helical Peptides. Chem. Eur. J. 6, 4498–4504.

(79) Toniolo, C., and Benedetti, E. (1991) The polypeptide 3_{10}-helix. Trends Biochem. Sci. 16, 350–353.

(80) Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. J. Biomol. NMR 8, 477–486.

(81) Wagner, G., Neuhaus, D., Worgotter, E., Vasak M., Kagi, J. R. H., and Wuthrich, K. (1986) Nuclear Magnetic Resonance Identification of and 3 I, -Helix Secondary Structure in Rabbit Liver Metallothionein-2. J Mol Biol 187, 131–135.

(82) Barlow, D. J., and Thornton, J. M. (1988) Helix geometry in proteins. J. Mol. Biol. 201, 601–619.

(83) Bolin, K. A., and Millhauser, G. L. (1999) a and 310: The split personality of polypeptide helices. Acc. Chem. Res. 32, 1027–1033.

(84) Toniolo, C., and Bruckner, H. (2009) Peptaibiotics: Fungal Peptides Containing a-Dialkyl a-Amino Acids. Wiley-VCH, Weinheim.

6. ANEXOS



Anexo 6.1: Representação esquemática dos vetores e sequências das construções de interesse. (A) Vetores de expressão contendo o gene de interesse – I. pMAL-c4x_CALX275-335 (CALX₂₇₅₋₃₃₅) e II. pMAL-c4x_CALX272-335 (CALX₂₇₂₋₃₃₅). (B) e (C) Sequências de aminoácidos de CALX₂₇₅₋₃₃₅ e CALX₂₇₂₋₃₃₅, respectivamente, em que são mostrados os respectivos *linkers* entre a MBP e a TMH5 contendo os sítios de clivagem.



Anexo 6.2: Espectros dos Experimentos TOCSY (azul) e NOESY (salmão) em H₂O. As regiões em destaque estão mostradas em (A) HN, hidrogênios amídicos da ligação peptídica, (B) H ϵ das Argininas, (C) H δ de Asparaginas, (D) HN_{ami}, hidrogênios amídicos proveniente da modificação no C-terminal, (E) H δ e H ϵ , aromáticos, das Tirosinas. Abaixo ampliações correspondentes a: (I) picos caracteristicos para Leucinas e Valinas, assinalamento de Leu5 e Val6 com base nos NOEs observados, (II) correlações observadas na região dos H α , (III) correlações na região dos HN, (IV) correlações entre os H δ -H α das Tirosinas e (V) correlações entre os H ϵ -H β das Tirosinas.



Anexo 6.3: Espectro de ¹⁵N-HSQC em H₂O. (A) Picos para as correlações HN-N da cadeia principal. (B) Picos para as demais correlações H-N. Em (I) é destacado as correlações entre H ϵ -N ϵ das Argininas, em (II) as correlações entre H δ -N δ das Asparaginas e (III) as correlações HN_{ami}-HN_{ami} para a modificação no C-terminal.



Anexo 6.4: Espectro de ¹³C-HSQC em H_2O . (A) Picos para as correlações $H\alpha$ -C α da cadeia principal. Em destaque está mostrado o assinalamento dos carbonos alfa das Asparaginas no espectro em D_2O (roxo). (B) Picos para as demais correlações H-C.



Anexo 6.5: Espectro da região dos aromáticos do ¹³C-HSQC em D_2O . Correlações devido aos H δ estão mostradas a esquerda do espectro e aos H ϵ à direita.