

Isabella Basso do Amaral - 11810773

Prova 1 - Proteínas RAG-1 e RAG-2

São Paulo, Brasil

Isabella Basso do Amaral - 11810773

Prova 1 - Proteínas RAG-1 e RAG-2

Uma breve introdução às proteínas RAG-1 e RAG-2 e um método de purificação das mesmas.

Universidade de São Paulo – USP

Curso de Ciências Moleculares

Disciplina de Biologia I (CCM0111)

Professoras: Alicia Kowaltowski & Sayuri Miyamoto

São Paulo, Brasil

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema da recombinação V(D)J.	7
Figura 2 – Ensaio de clivagem.	13
Figura 3 – Estrutura da RAG-1.	17
Figura 4 – Estrutura da RAG-2.	17
Figura 5 – Estrutura da RAG-1 com resíduos de aminoácidos marcados.	18
Figura 6 – Estrutura da RAG-2 com resíduos de aminoácidos marcados, as linhas β estão marcadas em azul.	18

Lista de abreviaturas e siglas

D	<i>Diversity</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
J	<i>Joining</i>
LSB	<i>Laemmli Sample Buffer</i>
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RSB	<i>Resuspension Buffer</i>
RSS	<i>Recombination signal sequence</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate — Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
V	<i>Variable</i>
WB	<i>Western Blot</i>

Sumário

1	INTRODUÇÃO	7
2	METODOLOGIA	9
2.1	Motivação da metodologia utilizada	9
2.2	Vetores de expressão	9
2.3	Expressão das proteínas	10
2.4	Purificação das proteínas	11
2.5	Ensaio de clivagem <i>in vitro</i>	12
3	RESULTADOS	15
3.1	Introdução	15
3.2	Sequências de aminoácidos	15
3.2.1	RAG-1:	15
3.2.2	RAG-2:	16
3.3	pIs, cofatores e resíduos de aminoácidos notáveis	16
3.4	Características das cadeias laterais dos resíduos importantes das RAGs	19
3.5	Mudanças conformacionais conhecidas	19
4	CONCLUSÕES	21
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1 Introdução

As RAGs (*Recombination activating genes*) são proteínas responsáveis por parte do processo conhecido como **recombinação V(D)J** (explicado em Bassing, Swat e Alt (2002), Fugmann et al. (2000)), onde V, D e J são siglas para os termos *variable* (ou variável), *diversity* (ou diversidade) e *joining* (ou junção), respectivamente.

A recombinação V(D)J é um processo essencial para a imunidade humana, pois é ela a responsável pela diversidade no repertório de anticorpos, ocorrendo nas etapas iniciais de maturação de linfócitos B e T. Ela promove a formação de exons a partir dos segmentos gênicos V e J, podendo incluir um segmento D também.

A recombinação V(D)J requer ambos RAGs 1 e 2 (cujo conjunto é chamado de complexo RAG) para iniciar, sendo eles responsáveis pelo corte de seções de DNA que se encontram entre os segmentos gênicos (embora as funções específicas de cada RAG ainda não estejam esclarecidas). O complexo RAG vai se prender aos chamados RSSs (*Recombination signal sequences*), os quais sinalizam quais partes dos segmentos serão utilizados para a composição do exon final (BERGERON; ANDERSON; SWANSON, 2006). Cada RSS contém um heptâmero e um nonâmero conservados e um espaçamento entre eles. A sinalização promovida pelos RSSs se dá, também, pelo comprimento dos espaçamentos: em geral, os complexos RAG só atuam em pares de RSSs com espaçamentos distintos, especificamente entre os 12-RSS e 23-RSS (conhecida como “regra 12/23”, o que se dá por conta da eficiência dessa reação), onde o número indica a quantidade de pares de base no espaçamento da sequência.

A figura 1 ilustra as etapas descritas do processo de recombinação V(D)J em linhas gerais¹.

A motivação do estudo das RAGs e das RSSs é a compreensão desse mecanismo biológico que é essencial para o sistema imunológico adaptativo presente em diversos animais, incluindo os seres humanos.

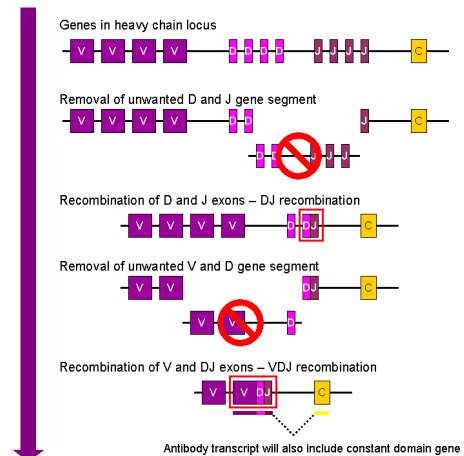


Figura 1 – Esquema da recombinação V(D)J (GUSTAVO-CARRA, 2008).

¹ A descrição completa da ação das proteínas RAG está além do escopo desse trabalho, mas a descrição dada justifica sua indispensabilidade para o processo de recombinação.

2 Metodologia

2.1 Motivação da metodologia utilizada

Alguns pesquisadores anteriores à [Bergeron, Anderson e Swanson \(2006\)](#), [Elkin, Matthews e Oettinger \(2003\)](#), [Jiang, Ross e Desiderio \(2004\)](#), [Swanson, Volkmer e Wang \(2004\)](#), [Tsai e Schatz \(2003\)](#) fizeram uso de métodos simplificados que aproveitaram a alta solubilidade da parte central das RAGs (*core RAG-1/2*) para estudar seu comportamento *in vitro*. Neste trabalho, no entanto, descreverei a metodologia utilizada para a purificação das RAGs em sua total extensão (*full-length RAG-1/2*) — especificamente, o método por [Bergeron, Anderson e Swanson \(2006\)](#), que foi o artigo mais completo que encontrei sobre o tópico. O método é mais complexo porém é necessário para o estudo efetivo dessas proteínas, como fora reconhecido por [Akamatsu et al. \(2003\)](#), [Dudley et al. \(2003\)](#), [Liang et al. \(2002\)](#), [Talukder et al. \(2004\)](#). De acordo com esses pesquisadores, as partes “não-centrais” das RAGs ajudam a regular a atividade do complexo *in vivo*, e por isso é essencial purificar as proteínas completas a fim de entender melhor seu comportamento.

2.2 Vetores de expressão

Para a produção de RAGs para esse estudo, os pesquisadores utilizaram um processo de múltiplas etapas para a geração de vetores de expressão apropriados:

- i. Primeiramente, temos o uso de baculovírus como vetores de expressão, os quais foram utilizados para conseguir as partes centrais das RAGs (fundidas à proteínas ligantes de maltose).
- ii. Depois, temos a subclonagem dos fragmentos de DNA dessas proteínas para o pcDNA1 como vetor de expressão mamífero.
- iii. Utilizando o DNA complementar preparado no laboratório de S. Desiderio, os pesquisadores conseguiram gerar as porções com as partes não centrais das RAGs.
- iv. Então, há a produção de diversas variantes mutantes das RAG-1/2 por PCR.
- v. Várias formas das RAGs foram inteiramente subclonadas em pcDNA1 e propagadas em estirpes de *Escherichia coli*.
- vi. Por fim, os plasmídeos foram purificados das colonias de bactérias.

2.3 Expressão das proteínas

Ainda seguindo a metodologia de Bergeron, Anderson e Swanson (2006), na etapa de expressão, os pesquisadores utilizaram culturas celulares de células HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293 para expressar as proteínas RAG transientemente, a fim de purificá-las depois.

As células foram mantidas sob condições normais úmidas (37 °C e 5% CO₂ — condições corporais) em um DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium* — meio de cultura artificial utilizado para manter as células de uma cultura), especificamente uma variante com alta glicose, L-glutamina e cloridrato de piridoxina (Invitrogen Life Technologies) suplementado com 50 unidades/mL de penicilina G e estreptomicina à 50 µg/mL (BioWhittaker, Walkersville, MD) e 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (HyClone, Logan, UT)¹.

O meio de cultura final foi filtrado esterilmente por uma membrana de acetato de celulose de 0,45 mm antes do uso (sistema de filtro de 500 mL da Corning). As células cresceram à confluência em placas de petri de 10 cm, foram resuspensas no mesmo meio e passadas para um meio fresco (diluídas em proporção 1:5) no dia anterior à transfecção.

Na manhã seguinte, aspiraram o meio e trocaram-no por 10 mL de um novo meio, retornando à incubadora por 3 h. Para transfecção transiente (onde não há integração do genoma externo), os pesquisadores recorreram ao procedimento de transfecção utilizando a PEI (*polyethylenimine* — Polysciences Inc., Warrington PA), que é o veículo para entrada na célula eucarionte. Eles prepararam uma solução aquosa padrão de PEI (1 µg/mL levada ao pH 7,0 por adição de HCl) e guardada em frações à -80 °C. A solução padrão foi preparada imediatamente após a abertura de uma nova garrafa de PEI.

O DNA do plasmídeo era adicionado ao NaCl à uma concentração de 0,9 % (m/v; filtrado esterilmente) numa concentração final de 10 µg/mL. Então adicionaram 5 µg do vetor de expressão de cada RAG, para que houvesse co-expressão.

O PEI foi então adicionado até uma concentração final de 30 µg/mL. Após agitar as amostras por vórtice brevemente, elas foram incubadas por 10 min à 25 °C e então 1 mL da mistura de DNA-PEI foi adicionada à cada prato de células HEK 293.

Para cada preparação de proteínas RAG, duas soluções de DNA-PEI foram montadas para transfecção de 14 placas de células 293. Após a incubação de 48 h, o meio foi aspirado e sete pratos foram colhidos em 5 mL de tampão estéril fosfato-salino (PBS) com EDTA (PBS-EDTA, 137 mM NaCl, 27 mM KH₂PO₄, 14 mM Na₂HPO₄, 2 mM EDTA) por placa e coletados em um tubo cônico de 50 mL sobre gelo. Os tubos foram centrifugados à 274g (*g* é a aceleração da gravidade) por 10 min à 4 °C (rotor Beckman GH3.8, 1300 rpm) e a sobrenadante foi aspirada. Aglomerados de células foram congelados em um banho de

¹ Os pesquisadores também usaram FBS de outras marcas, com resultados semelhantes.

gelo/etanol e guardados à -80°C até o uso.

2.4 Purificação das proteínas

Ambas MBP-RAG-1/2 coexpressas foram purificadas usando os mesmos procedimentos, todos feitos à 4°C :

- i. Brevemente, cada aglomerado de células foi derretido sobre gelo e resuspenso em 3,75 mL de um tampão A [10 mM de fosfato de sódio (pH 7,4), 0,5 M NaCl, 1 mM de ditioneitol (DTT), 0,25 % de polisorbato 20 (v/v)], carregado em um moedor de tecidos (Wheaton Science Products, Millville, NJ), e sujeito à 20 movimentos de um macerador de tipo A.
- ii. O lisado foi clarificado por centrifugação à 85 000g (rotor Beckman SW55Ti, 30 000 rpm) por 40 min à 4°C e os sobrenadantes coletados dos dois aglomerados foram passados por 1 mL de resina de amilose (New England Biolabs, Ipswich, MA) e colocados em uma coluna de cromatografia Poly-Prep (9 cm de altura, cônico $0,8 \times 4$ cm de polipropileno — Bio-Rad, Hercules, CA) equilibrada no tampão A pela gravidade.
- iii. A coluna foi lavada com 10 mL do tampão A contendo 10 mM de maltose (os últimos 5 mL sem o polisorbato 20) e as proteínas MBP-RAGs foram eluídas com o tampão A contendo 10 mM de maltose (também sem o polisorbato 20). As amostras contendo proteínas foram dialisadas (Spectra/Por 25 000 MWCO, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA) contra um tampão R [25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM KCl, 2 mM DTT, e glicerol à 10% (v/v)] por 3 h.
- iv. As frações foram ultracongeladas em nitrogênio líquido e guardadas à -80°C até o uso.
- v. Brevemente, cada aglomerado de células derretido (dois no total) foi resuspenso em 1,5 mL de um tampão de resuspensão (RSB) [10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0,5 % IGEPAL CA-630 (NP-40; v/v)], e deixado inchar por 5 min.
- vi. Então, 2,25 mL de tampão de amostras de Laemmli (LSB) frios [20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 M NaCl, 0,2 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, 0,2 % IGEPAL CA-630 (NP-40; v/v)] foram adicionados e a amostra foi balanceada à 4°C por 1 h.
- vii. O lisado então foi clarificado por centrifugação (como antes), e os sobrenadantes empocados são aplicados à uma coluna preenchida com resina de amilose equilibrada em uma proporção de 1:1,5 de tampões RSB:LSB (tampão RSB/LSB).

- viii. A coluna é lavada com 5 volumes do tampão RSB/LSB e então com 4 volumes de *Western Blot* (WB) [20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,5 M NaCl, 5 mM MgCl₂].

2.5 Ensaio de clivagem *in vitro*

Os autores de [Bergeron, Anderson e Swanson \(2006\)](#) fizeram ensaios de clivagem utilizando um ensaio desenvolvido no laboratório Gellert ([MCBLANE et al., 1995](#)). Nesse ensaio, há também partes com a proteína HMGB1 (*High mobility group box 1*), que faz parte do estudo do artigo original.

“Em nosso laboratório, reações de clivagem são tipicamente montadas misturando ~ 100 ng das proteínas RAG coexpressas (num total de 4 μ L de tampão de diálise [20 mM Tris-(pH 8,0), 150 mM KCl, glicerol à 10%, 2 mM DTT]) e substrato RSS ($\sim 0,02$ pmol) em uma reação de 10 μ L contendo um tampão de amostra (ácido morfolinepropanosulfônico 25 mM (MOPS)-KOH (pH 7,0), 60 mM glutamato de potássio, soro de albumina bovina 100 μ g/mL e 1 mM de MgCl₂ ou MnCl₂). (...) As reações foram incubadas por 1 h à 37 °C, resfriadas adicionando 2 volumes de solução de carregamento de amostras (formamida à 95%, 10 mM de EDTA), e aquecidas à 95 °C por 2 min. Uma fração da amostra (5 μ L) é fracionada em gel de sequenciamento de poliacrilamida à 15% [19:1 acrilamida:metileno(bis)acrilamida] contendo ureia à 7 M, e os produtos de clivagem são visualizados usando uma tela de fosforimagem (Storm 860; Molecular Dynamics-GE Healthcare, Piscataway, NJ).” (tradução livre)

A figura 2 foi retirada de [Bergeron, Anderson e Swanson \(2006\)](#). A legenda é uma tradução livre de trechos selecionados da legenda original.

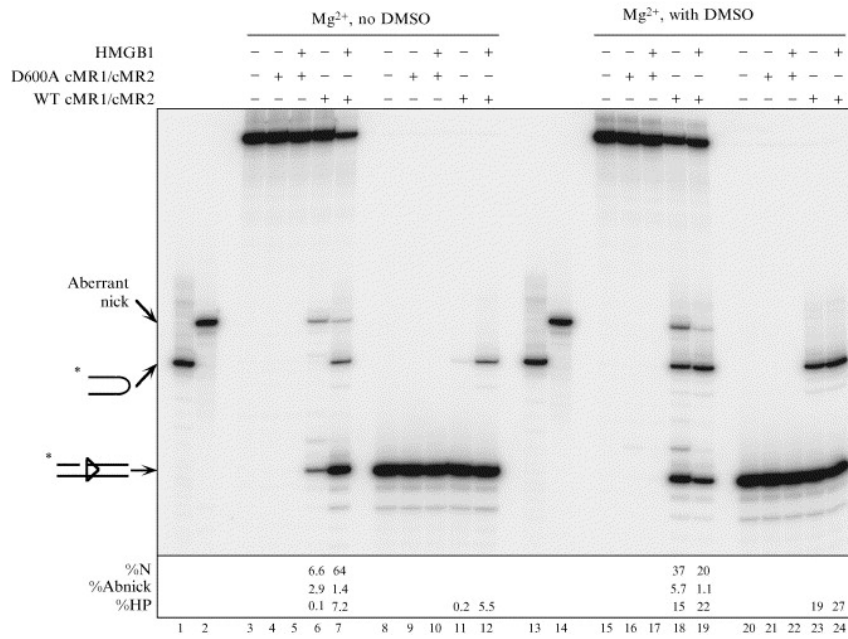


Figura 2 – Ensaio de clivagem *in vitro* usando proteínas *core* MBP-RAGs (MRs) purificadas e coexpressas e *full-length* HMGB1 purificado. Substratos de 23-RSS intactos (faixas 3–7 e 15–19) ou “nicked” (faixas 8–12 e 20–24) foram incubados com um complexo RAG selvagem cataliticamente inativo (D600A cMR1/cMR2 ou sem cMR1/cMR2, respectivamente) em reações de clivagem padrão *in vitro* contendo Mg₂⁺ na ausência (faixas 3–12) ou na presença (faixas 15–24) de dimetilsulfóxido à 20%, com ou sem HMGB1 adicionado (300 ng) como indicado acima do gel. (BERGERON; ANDERSON; SWANSON, 2006)

3 Resultados

3.1 Introdução

Utilizando dados do <[uniprot.org](https://www.uniprot.org/)>¹, temos que as massas das RAGs 1 e 2 são, respectivamente 119 097,05 Da e 59 241,02 Da. A RAG-1 possui 1043 aminoácidos em sua sequência, enquanto a RAG-2 possui 527. As proteínas são encontradas no núcleo celular, que possui um pH em torno de 7,3 (LLOPIS et al., 1998).

3.2 Sequências de aminoácidos

Abaixo, seguem as sequências de aminoácidos das proteínas:

3.2.1 RAG-1:

sp P15918 RAG1_HUMAN	MAASFPPTLGLSSAPDEIQHPHIKFSEWKFKLFRVRSFEKTPEEAQKEKK	50
sp P15918 RAG1_HUMAN	DSFEGKPSLEQSPAVIDKADGQKPVPQTPLLKAHPKFSKKFHDNEKARGK	100
sp P15918 RAG1_HUMAN	AIHQANLRHLCRICGNSFRADEHNRRYPVHGPVDGKTLGLLRKKEKRATS	150
sp P15918 RAG1_HUMAN	WPDLIAKVFRIDVKADVDSIHPTTEFCHNCWSIMHRKFSSAPCEVYFPRNV	200
sp P15918 RAG1_HUMAN	TMEWHPHTPSCDICNTARRGLKRKSLQPNLQLSKKLKTVLDQARQARQHK	250
sp P15918 RAG1_HUMAN	RRAQARISSKDVMKKIANCSKIHLSTKLLAVDFPEHFVKSISCQICEHIL	300
sp P15918 RAG1_HUMAN	ADPVETNCKHVFRCVCLRLKVMGSYCPSCRYPCFPTDLESPVKSFLSV	350
sp P15918 RAG1_HUMAN	LNSLMVKCPAKECNEEVSLEKYNHHISSHKESKEIFVHINKGGRPRQHLL	400
sp P15918 RAG1_HUMAN	SLTRRAQKHRLRELKLQVKAFADKEEGDVKSVCMTLFLALRARNEHRQ	450
sp P15918 RAG1_HUMAN	ADELEAIMQGKGSGLQPAVCLAIRVNTFLSCSQYHKMYRTVKAITGRQIF	500
sp P15918 RAG1_HUMAN	QPLHALRNAEKVLLPGYHHFEWQPPLKNVSSSTDVGIIDGLSGLSSSVDD	550
sp P15918 RAG1_HUMAN	YPVDTIAKRFRYDSALVSALMDMEEDILEGMRSQDLDDYLNGPFTVVVKE	600
sp P15918 RAG1_HUMAN	SCDGMGDVSEKHGSGPVVPEKAVRFSFTIMKITIAHSSQNVKVFEEAKPN	650
sp P15918 RAG1_HUMAN	SELCKPLCLMLADESDHETLTALISPLIAEREAMKSSELMLELGGILRT	700
sp P15918 RAG1_HUMAN	FKFIFRGTGYDEKLREVEGLEASGSVYICTLCDATRLEASQNLVFHSIT	750
sp P15918 RAG1_HUMAN	RSHAENLERYEVWRSNPYHESVEELRDRVKGVSAPFIETVPSIDALHCD	800
sp P15918 RAG1_HUMAN	IGNAAEFYKIFQLEIGEVYKNPNASKEERKRWQATLDKHLRKKMNLKPIM	850
sp P15918 RAG1_HUMAN	RMNGNFARKLMTKETVDAVCELIPSEERHEALRELMPLYLKMKPVWRSSC	900

¹ Dados retirados de <<https://www.uniprot.org/uniprot/P15918>> e <<https://www.uniprot.org/uniprot/P55895>>.

sp P15918 RAG1_HUMAN	PAKECPESLCQYSFNSQRFAELLSTKFKYRYEGKITNYFHKTLAHVPEII	950
sp P15918 RAG1_HUMAN	ERDGSIGAWASEGNESGNKLFRRFRKMNRQSKCYEMEDVLKHHWLYTSK	1000
sp P15918 RAG1_HUMAN	YLQKFMNAHNALKTSGFTMNPQASLGDPLGIEDSLESQDSMEF	1043

3.2.2 RAG-2:

sp P55895 RAG2_HUMAN	MSLQMVTVSNNIALIQPGFSLMNF DGQVFFFGQKGWPKRSCPTGVFHLDV	50
sp P55895 RAG2_HUMAN	KHNHVKLKPTIFSKDSCYLPPLRYPATCTFKGSLESEKHQYIIHGGKTPN	100
sp P55895 RAG2_HUMAN	NEVSDKIYVMSIVCKNNKKVTFRC TEKDLVGDVPEARYGHSINVVYSRGK	150
sp P55895 RAG2_HUMAN	SMGVLFGGRSYMPSTHRTTEKWN SVADCLPCVFLVD FEFGCATSYILPEL	200
sp P55895 RAG2_HUMAN	QDGLSFHVSI AKNDTIYILGGHSLANNIRPANLYRIRVDLPLGSPAVNCT	250
sp P55895 RAG2_HUMAN	VLPGGISVSSAILTQTNDEFVIVGGYQLENQKRMICNIISLEDNKIEIR	300
sp P55895 RAG2_HUMAN	EMETPDWTPDIKHSKIWF GSNMGN GTVFLGIPGDNKQVVSEG FYFYMLKC	350
sp P55895 RAG2_HUMAN	AEDDTNEEQTTFTNSQTSTEDPGDSTPFEDSEEF CFSAEANSFDGDDEFD	400
sp P55895 RAG2_HUMAN	TYNEDDEEDESETGYWITCCPTCDVDINTWVPFYSTELNKPAMIYCSHGD	450
sp P55895 RAG2_HUMAN	GHWVHAQCMDLAERTLIHLSAGSNKYCNEHVEIARALHTPQRVLPLKKP	500
sp P55895 RAG2_HUMAN	PMKSLRKKGSGKILTPAKKSFLRRLFD	527

3.3 pls, cofatores e resíduos de aminoácidos notáveis

As proteínas RAG-1 e RAG-2 possuem um pls teóricos calculados de 8.94 e 5.55,² respectivamente. A proteína RAG-1 possui dois cofatores não-orgânicos, nomeadamente o Mg^{2+} e o Mn^{2+} , os quais são responsáveis pela função de clivagem do complexo RAG (AKAMATSU; OETTINGER, 1998).

Para a RAG-1, temos que os resíduos D600 (aspartato na posição 600), D708 e E962 (glutamato na posição 962) são os mais importantes, sendo que suas funções ainda não foram bem determinadas, porém muitas evidências indicam que os resíduos D600 e D708 são responsáveis pela coordenação de um íon divalente (cofator), função essencial à catálise da proteína. De forma análoga, o E962 possui uma função essencial para a catálise, porém não é relacionada à ligação iônica (KO; KIM; KIM, 2004). Mais recentemente, há também estudos que mostram que os resíduos D546 e E547 são essenciais para a formação do complexo RAG (ZHANG et al., 2015).

Temos a estrutura da RAG-1 com os resíduos interessantes marcados por Zhang et al. (2015) na figura 5. Podemos notar que quase todos os resíduos (com exceção do D600) se encontram em alfa-hélices, em posições internas.

² Dados retirados de <<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P15918@noft@>>> e <<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P55895@noft@>>>.

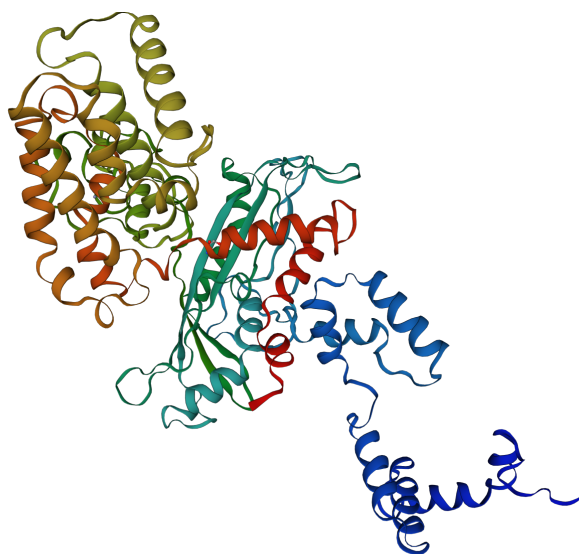


Figura 3 – Estrutura da RAG-1. Retirada de <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P15918?template=6oet.1.C&range=388-1010>

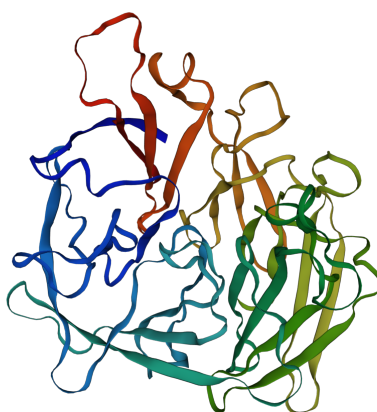


Figura 4 – Estrutura da RAG-2. Retirada de <https://swissmodel.expasy.org/assess/5f57c7d8b6a2947dd7379540/01>

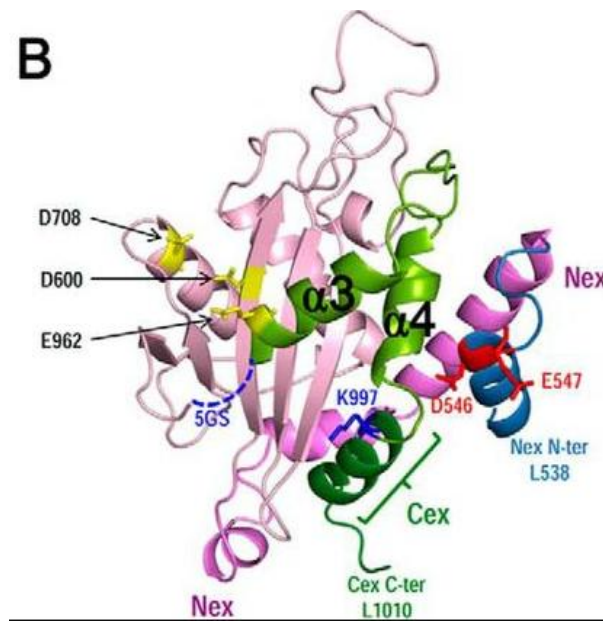


Figura 5 – Estrutura da RAG-1 com resíduos de aminoácidos marcados (ZHANG et al., 2015).

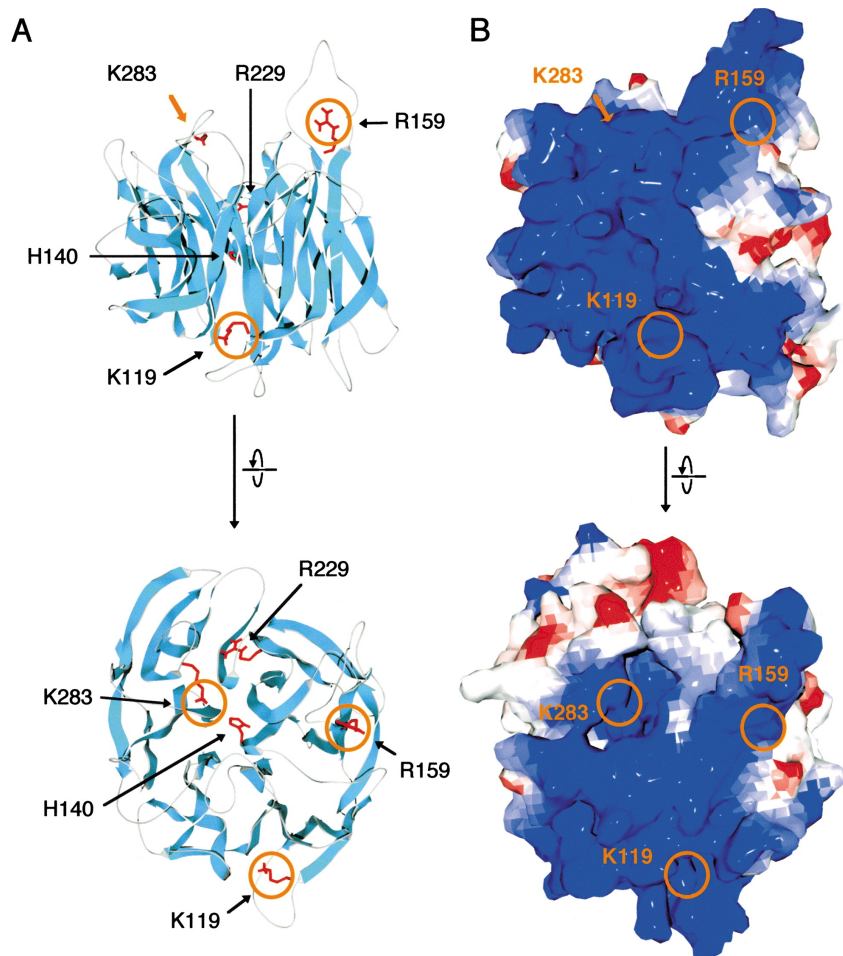


Figura 6 – Estrutura da RAG-2 com resíduos de aminoácidos marcados, as linhas β estão marcadas em azul (ZHANG et al., 2015).

Já na RAG-2, [Fugmann e Schatz \(2001\)](#) determinaram que os resíduos K119 (lisina na posição 119), H140 (histidina na posição 140), R159 (arginina na posição 159), R229 e K283 eram essenciais para a formação do complexo RAG *in vivo*, e os resíduos R73, K119, R137, H140, R159, R229 e K283 são essenciais para a catálise do complexo, e também para a formação de um complexo enzima-substrato estável, assim como os resíduos S104 (serina na posição 104) e Y108 (tirosina na posição 108). Esses últimos, porém, afetaram a catálise em menor escala.

Temos a estrutura da RAG-2 com os resíduos interessantes marcados por [Zhang et al. \(2015\)](#) na figura 6. Pela figura, é visível que os resíduos K119, R159 e K283 estão na superfície da proteína, enquanto os outros são encontrados internamente.

3.4 Características das cadeias laterais dos resíduos importantes das RAGs

Abaixo seguem algumas características importantes das cadeias laterais dos resíduos mencionados na subseção anterior:

Arginina: Básica e apolar, hidrofílica em pHs básico e neutro.

Aspartato: Ácida e apolar, hidrofílica em pHs básico e neutro.

Glutamina: Ácida e apolar, neutra em pH básico e hidrofílica em pH neutro.

Histidina: Básica e apolar, Neutra em pH básico e hidrofílica em pH neutro.

Lisina: Básica e apolar, hidrofílica em pHs básico e neutro.

3.5 Mudanças conformacionais conhecidas

Sabe-se que a trimetilação da histona H3 na lisina 4 (H3K4me3) produz uma mudança conformacional relacionada à atividade do complexo RAG (especificamente à atividade regulatória da RAG-2 — regulação alostérica) ([BETTRIDGE et al., 2017](#)).

4 Conclusões

Durante a realização desse trabalho compreendi melhor as conexões entre as diferentes partes de um estudo, e como se dá a exploração de uma proteína (expressão, purificação, produção de imagens, etc.).

Acredito que o aspecto mais interessante da minha exploração foi o estudo dos resíduos de aminoácidos. Os artigos desse tópico mostram como a estrutura da proteína afeta sua função na escala de uma única mutação, o que indica a robustez e a fragilidade (paradoxal) dos sistemas biológicos.

Também acho muito interessante a formação de vetores de expressão, pois há diversas formas de expressar uma mesma proteína por métodos que se assemelham a um “LEGO de DNA”.

Sobre as RAGs, fiquei fascinada desde o princípio, pois o mecanismo de produção de linfócitos é tomado como garantido no dia-a-dia, mas é bastante complexo e detalhado (além de ser muito eficiente), e num momento de pandemia conseguimos apreciar o valor de um sistema imunológico funcional. Mesmo assim, conhecemos o mecanismo a mais de três décadas (Nobel de 1987), e ele ainda tem aspectos mal compreendido (função específica das RAGs).

Referências Bibliográficas

- AKAMATSU, Y. et al. Deletion of the rag2 c terminus leads to impaired lymphoid development in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 100, n. 3, p. 1209–1214, 2003. Citado na página 9.
- AKAMATSU, Y.; OETTINGER, M. A. Distinct roles of rag1 and rag2 in binding the v(d) j recombination signal sequences. *Molecular and Cellular Biology*, Am Soc Microbiol, v. 18, n. 8, p. 4670–4678, 1998. Citado na página 16.
- BASSING, C. H.; SWAT, W.; ALT, F. W. The mechanism and regulation of chromosomal v(d)j recombination. *Cell*, v. 109, n. 2, Supplement 1, p. S45–S55, 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740200675X>>. Citado na página 7.
- BERGERON, S.; ANDERSON, D.; SWANSON, P. Rag and hmgb1 proteins: Purification and biochemical analysis of recombination signal complexes. *Methods in enzymology*, v. 408, p. 511–28, 02 2006. Citado 5 vezes nas páginas 7, 9, 10, 12 e 13.
- BETTRIDGE, J. et al. H3k4me3 induces allosteric conformational changes in the dna-binding and catalytic regions of the v(d)j recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Academy of Sciences, v. 114, n. 8, p. 1904–1909, 2017. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/114/8/1904>>. Citado na página 19.
- DUDLEY, D. D. et al. Impaired v(d) j recombination and lymphocyte development in core rag1-expressing mice. *The Journal of experimental medicine*, Rockefeller University Press, v. 198, n. 9, p. 1439–1450, 2003. Citado na página 9.
- ELKIN, S. K.; MATTHEWS, A. G.; OETTINGER, M. A. The c-terminal portion of rag2 protects against transposition in vitro. *The EMBO journal*, John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK, v. 22, n. 8, p. 1931–1938, 2003. Citado na página 9.
- FUGMANN, S. D. et al. The rag proteins and v(d)j recombination: Complexes, ends, and transposition. *Annual Review of Immunology*, v. 18, n. 1, p. 495–527, 2000. PMID: 10837067. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.495>>. Citado na página 7.
- FUGMANN, S. D.; SCHATZ, D. G. Identification of basic residues in rag2 critical for dna binding by the rag1-rag2 complex. *Molecular Cell*, v. 8, n. 4, p. 899–910, 2001. ISSN 1097-2765. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276501003525>>. Citado na página 19.
- GUSTAVOCARRA. *Simplistic overview of V(D)J recombination of immunoglobulin heavy chains*. [s.n.], 2008. Disponível em: <[https://en.wikipedia.org/wiki/V\(D\)J_recombination#/media/File:VDJ_recombination.png](https://en.wikipedia.org/wiki/V(D)J_recombination#/media/File:VDJ_recombination.png)>. Citado na página 7.
- JIANG, H.; ROSS, A. E.; DESIDERIO, S. Cell cycle-dependent accumulation in vivo of transposition-competent complexes between recombination signal ends and full-length

rag proteins. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 279, n. 9, p. 8478–8486, 2004. Citado na página 9.

KO, J. E.; KIM, C. W.; KIM, D. R. Amino acid residues in rag1 responsible for the interaction with rag2 during the v (d) j recombination process. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 279, n. 9, p. 7715–7720, 2004. Citado na página 16.

LIANG, H.-E. et al. The “dispensable” portion of rag2 is necessary for efficient v-to-dj rearrangement during b and t cell development. *Immunity*, v. 17, n. 5, p. 639–651, 2002. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107476130200448X>>. Citado na página 9.

LLOPIS, J. et al. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and golgi ph in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 95, n. 12, p. 6803–6808, 1998. Citado na página 15.

MCBLANE, J. et al. Cleavage at a v(d)j recombination signal requires only rag1 and rag2 proteins and occurs in two steps. *Cell*, v. 83, n. 3, p. 387–395, 1995. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867495901167>>. Citado na página 12.

SWANSON, P. C.; VOLKMER, D.; WANG, L. Full-length rag-2, and not full-length rag-1, specifically suppresses rag-mediated transposition but not hybrid joint formation or disintegration. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 279, n. 6, p. 4034–4044, 2004. Citado na página 9.

TALUKDER, S. R. et al. Increased frequency of aberrant v (d) j recombination products in core rag-expressing mice. *Nucleic acids research*, Oxford University Press, v. 32, n. 15, p. 4539–4549, 2004. Citado na página 9.

TSAI, C.-L.; SCHATZ, D. G. Regulation of rag1/rag2-mediated transposition by gtp and the c-terminal region of rag2. *The EMBO journal*, John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK, v. 22, n. 8, p. 1922–1930, 2003. Citado na página 9.

ZHANG, Y.-H. et al. Mapping and quantitation of the interaction between the recombination activating gene proteins rag1 and rag2. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 290, n. 19, p. 11802–11817, 2015. Citado 3 vezes nas páginas 16, 18 e 19.