Universidade de São Paulo

Instituto de Química de São Carlos

Francisco Edvan Rodrigues Gomes

Clonagem, expressão e estudo de 3 co-chaperonas de *Leishmania braziliensis*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Analítica e Inorgânica).

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Borges

São Carlos

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Clonagem, expressão e estudo de 3 co-chaperonas de *Leishmania braziliensis*

São Carlos2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Gomes, Francisco Edvan Rodrigues
Clonagem, expressão e estudo de 3 co-chaperonas de *Leishmania braziliensis*. / Francisco Edvan Rodrigues Gomes.. -- São Carlos, 2011.
81 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2011.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Borges

1. Proteínas. I.Título.

Referências Bibliográficas conferidas pelo SBI/IQSC

A palavra é o princípio de qualquer obra e antes de agir é preciso refletir.

(Pedro Oliveira Gomes)

À minha avó, Joana Maria (In memoriam) por me ensinar desde cedo o valor e a importância da educação.

À minha família, por simplesmente tudo.

Agradecimentos

À Deus, pela graça de ter chegado até aqui.

À minha linda e maravilhosa família pelo carinho, ajuda e compreensão. Ao meu Pai Pedro, minha Mãe Edinê, às minhas irmãs Sid, Wal, Neide, Caco e aos meus lindos e maravilhosos sobrinhos, beijos, amuuuuuuu todos vocês. Ah... já ia esquecendo dos meus cunhadinhos, obrigado pelo incentivo de todos vocês.

À Leila, minha namorada, pelo amor, carinho e companheirismo.

Ao meu querido amigo e irmão Rogerinho pela ajuda e apoio em todos os momentos. Obrigado por tudo mano, Deus te abençoe cada vez mais.

Ao Professor Júlio César Borges pela oportunidade e orientação.

À Professora Fernanda pelo auxílio, sugestão e boa vontade em ajudar nos momentos em que à procurei, ao Murilo, esposo da Profa Fernanda, que sempre se prontificou em ajudar, à Patrícia, aluna de pós-doc do Prof. Tabak e ao Ezér Biazim sempre dispostos a ajudar.

Ao Professor Marcel Tabak por ter se mostrado sempre disponível e por ter permitido a realização dos experimentos de fluorescência em seu laboratório.

Ao Laboratório LEC/LNBio/Campinas e ao Laboratório de Biofísica do IFSC e as técnicas Bel e Andressa. Bel muuuuito obrigada por tudo.

Aos meus colegas de Laboratório Anderson, Eliane, Glesler, Pedro, Paulo, Tiago, Nathália (cansada), Vanda, Sabrina (amiga e companheira de luta), Érica, Kelly pela ajuda constante, principalmente nos primeiros meses, a Indy pela obtenção dos clones de expressão e a doce e querida Camilinha sempre disponível em ajudar a todos.

Quero agradecer também aos amigos Ana, Chico, Karen, Odilon, Messias, Eliene, Baxim (tranquêra), Magão, Zevaldo (Zé luiz), Itapira, Filipão, Ulisses, Edjane e em especial aos amigos Adriano, Wilson e Tipão (esposo da Nara e pai da Melissa) sempre prontos e disponíveis para ajudar e ainda todos os colegas que ajudaram a tornar os dias e as noites mais agradáveis em São Carlos. Quero agradecer também aos meus amigos de graduação David Anderson e Lécia Maria e aos amigos de Bacabal, Anderson Trigueiro, João da Asdebal, Minervina, Michael e Rodolfo. Por fim agradeço à FAPESP pelo auxílio financeiro do projeto e ao CNPq pela bolsa concedida. Muuuuito obrigado a todos vocês.

RESUMO

A leishmaniose é uma enfermidade infecciosa causada por várias espécies de parasitas do gênero *Leishmania* e representa um dos principais problemas de saúde pública nos países subdesenvolvidos. No hospedeiro, a sobrevivência do protozoário causador dessa doença depende de uma classe especial de proteínas, as chaperonas moleculares ou proteínas de choque térmico como também são conhecidas. A função dessas proteínas é auxiliar no processo de enovelamento protéico, no transporte de proteínas entre as membranas e em muitas outras importantes funções celulares. Neste processo, as chaperonas moleculares são auxiliadas pelas suas co-chaperonas que desempenham função de destaque. Dentre as principais famílias de chaperonas moleculares temos as *Hsp70* e as *Hsp90* com suas respectivas co-chaperonas, as *Hsp40* e a *Aha1*. O presente trabalho pretendeu inicialmente expressar e purificar as co-chaperonas moleculares *Hsp40I* e *Hsp40II* de *L. braziliensis* para realizar estudos de caracterização estrutural por meio das técnicas de dicroísmo circular e fluorescência. Contudo, a insolubilidade dessas proteínas, que pode ter sido causada pela presença de mutações nas sequências de DNA, motivou a caracterização de outra co-chaperona, a *Aha1* de *L. braziliensis* (*LbAha1*). A *LbAha1* foi expressa no sobrenadante celular e purificada por três etapas cromatográficas (troca aniônica, afinidade por íons cálcio e gel filtração). A análise da sequência de aminoácidos dessa proteína mostra que ela possui 9 resíduos de triptofano distribuídos nos dois domínios característicos da *LbAha1*. Estudos de desnaturação química por uréia, monitorados pelas técnicas de dicroísmo circular e fluorescência, mostram que os dois domínios da *LbAha1* apresentam estabilidades diferentes. Os estudos estruturais realizados permitiram identificar as transições com o respectivo domínio.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease caused by several species of Leishmania species and represents major public health problems in developing countries. In the harborer, the survival of the parasite that cause this disease depends on a special class of proteins, molecular chaperones or heat shock proteins as they are also known. The function of these proteins is to assist in protein folding, transport of proteins and many other important cellular functions. In this process the molecular chaperones are helped by their co-chaperones that play a prominent role. Among the main families of molecular chaperones, there are *Hsp70* and *Hsp90* with their respective co-chaperones, *Hsp40* and the *Aha1*. The present work, initially pretended to express and purify the molecular co-chaperones *Hsp40I* and *Hsp40II* of the *L. braziliensis* for structural characterization by spectroscopic techniques like fluorescence and circular dichroism. However, the insolubility of these proteins, possibly caused by the presence of mutations in their DNA sequences, led to the characterization of another co-chaperone, the *Aha1* of the *L. braziliensis.* These proteins were expressed in the cell supernatant and purified by three chromatographic steps (anion exchange, affinity for calcium ions and gel filtration). The analysis of the DNA sequence of this protein shows that it has nine Trp residues distributed between the two domains and by urea denaturation studies monitored by fluorescence techniques and circular dichroism show that they have different stabilities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos domínios estruturais das subfamílias da *Hsp40*, A, B e C.	**6**
Figura 2	Modelo de estrutura do domínio J da subfamília A da *Hsp40* de *E. coli.*	**7**
Figura 3	Ciclo funcional das *Hsp40* com as *Hsp70*.	**8**
Figura 4	Ciclo ATPase da HSp90.	**10**
Figura 5	Estrutura do domínio N-terminal da *Aha1.*	**11**
Figura 6	Alinhamento das sequências de aminoácidos de levedura Np_014335.1 com a sequência de aminoácido de *Hsp40* do tipo *I* de *L. braziliensis,* XP_001566014.1.	**33**
Figura 7	Alinhamento das sequências de aminoácidos de levedura Np_014335.1 com a sequência de aminoácido de *Hsp40* do tipo *II* de *L. braziliensis,* XP_001569271.1.	**33**
Figura 8	Amplificação das sequências de DNA das *Hsp40*I e *Hsp40*II.	**34**
Figura 9	Quantificação de DNA das *Hsp40*I e *Hsp40*II por comparação.com o padrão.	**35**
Figura 10	PCR e análise de restrição dos recombinantes *pET23::LbHsp40I* e *pET23::LbHsp40II* com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*.	**36**
Figura 11	Teste de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40I* em *E. coli BL21(DE3).*	**37**
Figura 12	Teste de indução e solubilidade da proteína *LbHsp40I* em *E. coli BL21(DE3)PlysS.*	**38**
Figura 13	Teste de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40I* em *E. coli BL21(DE3) Codon Plus RP.*	**39**
Figura 14	Expressão da proteína *LbHsp40I* em *E. coli BL21(DE3) Codon Plus RP.*	**40**
Figura 15	Ensaio de reenovelamento da proteína *LbHsp40I.*	**41**
Figura 16	Análise de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40II* em *E. coli BL21(DE3).*	**42**
Figura 17	Análise de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40II* em *E. coli BL21(DE3) pLysS.*	**43**
Figura 18	Análise de expressão da proteína *LbHsp40II* em *E. coli BL21(DE3) Codon Plus RP.*	**44**
Figura 19	Ensaio de reenovelamento da proteína *LbHsp40II.*	**45**
Figura 20	Sequenciamento do recombinante de expressão *pET23a::LbHsp40II* com iniciador T7 terminator do vetor.	**46**
Figura 21	Análise de expressão e solubilidade da proteína *LbAha1* em *E. coli BL21(DE3) pLysS.*	**48**
Figura 22	Análise da purificação por cromatografia de troca aniônica em gel de poliacrilamida 12%.	**49**
Figura 23	Análise da purificação por cromatografia de afinidade ao Ca^{2+} (CHT) em gel de poliacrilamida 12%.	**49**
Figura 24	Análise da purificação por cromatografia de gel filtração (CEM) em gel de poliacrilamida 12%.	**50**
Figura 25	Espectro de dicroísmo circular da *LbAha1* nativa.	**51**
Figura 26	Isoterma de desnaturação da *LbAha1* induzida por uréia após duas horas de incubação.	**52**

Figura 27	Alinhamento das sequências de aminoácidos *LbAha1, HsAha1* e *yAha1*.	**53**
Figura 28	Espectro de emissão de fluorescência do Trp da proteína *LbAha1* na presença de diferentes concentrações de uréia.	**54**
Figura 29	Ensaio de desenovelamento químico da *LbAha1* induzido por uréia. (A) Intensidade máxima de emissão de fluorescência do Trp da *LbAha1* e (B) comprimento de onda máxima de emissão de fluorescência do Trp da proteína *LbAha1*.	**55**
Figura 30	Centro de massa espectral do desenovelamento químico da *LbAha1* em função da concentração de uréia monitorado por fluorescência.	**56**
Figura 31	Ensaio de reenovelamento química da proteína *LbAha1* na presença de uréia e analisado por fluorescência.	**58**
Figura 32	Estrutura geral da Aha1.	**59**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos desenhados para as sequências de DNA alvo.	**18**
Tabela 2	Concentrações médias de uréia observada nas transições nos experimentos de desenovelamento químico acompanhado por fluorescência e dicroísmo circular.	**57**

LISTA DE ABREVIAÇÕES

$\sum$	Somatório
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{máx}$	Comprimento de onda máximo de fluorescência
<λ>	Centro de massa espectral de fluorescência
Θ	Elipticidade
[θ]	Elipticidade molar residual
Aha1	*Activator of Hsp90 ATPase*
Å	Angströn (1×10^{-10} metros)
ADP	Adenosina 5' di-fosfato
ATP	Adenosina 5' tri-fosfato
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
^{o}C	Unidade de temperatura - graus Celsius
CD	Dicroísmo circular
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
cDNA	DNA complementar
Cm	Concentração média de transição
Deg	Degree
DLN	Domínio de ligação ao nucleotídeo da *Hsp70*
DLS	Domínio de ligação ao substrato da *Hsp70*
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dna_J	Domínio carboxi-terminal das *Hsp40*
DIF	Ácidos aspártico, isoleucina e fenilalanina
DN	Domínio N-terminal da Hsp90
DM	Domínio intermediário da Hsp90
DC	Domínio C-terminal da Hsp90
EMR	Elipticidade molar residual
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G/F	Região rica em glicinas e fenilalanina das *Hsp40*
GrpE	Proteína que auxilia a troca de nucleotídeos das *Hsp70* (*GroP-like gene E*)

HPD	Seqüência composta de histidina-prolina-ácido aspártico conservada no domínio J das *Hsp40*
Hsp	Proteína de choque térmico (*Heat Shock Protein*)
Hsp40	Proteína de choque térmico de 40 kDa
Hsp60	Proteína de choque térmico de 60 kDa
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
Hsp90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
Hsp100	Proteína de choque térmico de 100 kDa
IPTG	Isopropiltiol-β-D-galactosídeo
IF	Intensidade de fluorescência em um determinado comprimento de onda
kDa	QuiloDalton
L	Comprimento do caminho óptico
LB	Luria-Bertani
Lb*Hsp40*I	*Hsp40* tipo I de *Leishmania brasiliensis*
Lb*Hsp40*II	*Hsp40* tipo II de *Leishmania brasiliensis*
MM	Massa molecular
N	Número de resíduos de aminoácidos da proteína
Nm	Nanômetro (10^{-9} metros)
NCBI	*National Center of Biotechnology Information*
NEF	Fatores de troca de nucleotídeos
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase (*DNA Polimerase Chain Reaction*)
Pi	Fosfato inorganic
PAHO	Pan American Health Organization
Pb	Par de bases
S	Segundos
SDS	Duodecil-sulfato de sódio (*sodium duodecyl-sulphate*)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
sHsp	Proteína de choque-térmico da família das small
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS iv
LISTA DE ABREVIAÇÕES v
1 – INTRODUÇÃO 1
1.1 – Enovelamento protéico e as chaperonas moleculares 2
1.1.1 – *Hsp70* 3
1.1.2 – *Hsp40* 5
1.1.3 – Hsp90 9
1.1.4 – Aha1 11
1.2 – Expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* 12
1.3 – Dicroísmo circular 14
1.4 – Fluorescência 15
2 – Objetivos 16
3 – MATERIAIS E MÉTODOS 17
3.1 – *Data mining* e bioinformática 17
3.2 – Oligonucleotídeos para a reação em cadeia da polimerase (PCR) 17
3.3 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) 18
3.4 – Purificação do produto de PCR 18
3.5 – Gel de Agarose e Determinação da concentração de DNA 18
3.6 – Vetores 19
3.6.1 – Vetor de Transferência 19
3.6.2 – Vetor de expressão 19
3.7 – Linhagens de bactérias *Escherichia coli* 20
3.8 – Meios de Cultura 21
3.9 – Manutenção dos microorganismos 21
3.10 – Clonagem 21
3.10.1 – Clonagem em pGEM-T 21
3.10.2 – Subclonagem em vetores de expressão 22
3.11 – Preparação das bactérias $CaCl_2$ competentes 22
3.12 – Transformação das bactérias competentes e seleção dos clones transformados 23
3.13 – Seleção dos clones recombinantes 23
3.13.1 – PCR de colônia 23
3.13.2 – Análise de restrição 24
3.13.3 – Seqüenciamento 24
3.14 – Extração de DNA 24
3.15 – Expressão de proteínas 24
3.16 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 25
3.17 – Lise bacteriana e avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes 25
3.18 – Reenovelamento de proteínas 26
3.19 – Purificação das proteínas recombinantes 27
3.19.1 – Cromatografia de troca aniônica 27
3.19.2 – Cromatografia de afinidade 27
3.19.3 – Cromatografia de exclusão molecular 28

3.20 – Processo de concentração de proteínas 28
3.21 – Determinação da concentração de proteínas 28
3.22 – Espectros de dicroísmo circular (CD) 29
3.23 – Emissão de fluorescência 30
3.23.1 – Ensaios de Desnaturação química analisado por fluorescência 30
3.24 – Análise de Reversibilidade Química 31
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES 32
4.1 – Pesquisa em bancos de dados para obtenção das seqüências das *LbHsp40* tipo *I* e tipo *II* 32
4.2 – Amplificação e determinação da concentração de DNA das *LbHsp40I* e *LbHsp40II* 34
4.3 – Subclonagem em vetor de expressão e análise de restrição 35
4.4 – Expressão das proteínas de interesse 36
4.5 – Expressão da proteína *LbHsp40I* 36
4.5.1 – Expressão da *LbHsp40I* em linhagem de *E. coli BL21(DE3)* 36
4.5.2 – Expressão da Lb*Hsp40*I em linhagem de E. coli BL21(DE3) pLysS 37
4.5.3 – Expressão da *LbHsp40I* em linhagem de *E. coli BL21(DE3) PLysS Códon Plus RP* e testes de reenovelamento 38
4.6 – Expressão da proteína *LbHsp40II* 42
4.6.1 – Expressão da *LbHsp40II* em linhagem de *E. coli BL21(DE3)*` 42
4.6.2 – Expressão da *LbHsp40II* em linhagem de *E. coli BL21(DE3) pLysS* 42
4.6.3 – Expressão da *LbHsp40II* em linhagem de *E. coli BL21(DE3) PLysS Códon Plus RP* 44
4.7 – Expressão da proteína *LbAha1* 47
4.8 – Purificação 48
4.9 – Desenovelamento químico monitorado por dicroísmo circular e fluorescência 50
4.9.1 Dicroísmo circular 50
4.9.2 – Fluorescência 52
4.9.2.1 – Espectro de emissão de fluorescência 54
4.9.2.2 – Intensidade máxima e comprimento de emissão de onda máxima de fluorescência 55
4.9.2.3 – Centro de massa espectral 56
4.10 – Reversibilidade da *LbAha1* 57
4.11 – Considerações finais acerca da proteína *LbAha1* 58
5 – CONCLUSÕES 60
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61

1 – INTRODUÇÃO

As enfermidades parasitárias causadas por helmintos e protozoários são as principais causas de doenças e mortes na maioria dos países tropicais. Mundialmente bilhões de pessoas são infectadas e milhões morrem em decorrência dessas doenças que atacam uma em cada quatro pessoas em 149 países e territórios (WHO, 2011). Dentre essas doenças existem as leishmanioses, uma denominação genérica para um grupo de enfermidades infecciosas causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Essa doença ameaça cerca de 350 milhões de homens, mulheres e crianças em 88 países ao redor do mundo e cerca de 1-2 milhões de casos são estimados a cada ano (WHO, 2011). Entre as várias espécies que podem afetar os seres humanos é possível destacar três formas principais: a *Leishmania donovani* que causa a leishmaniose visceral, a *Leishmania tropica* que causa a leishmaniose cutânea e a *Leishmania braziliensis* que provoca a leishmaniose mucocutânea.

Essas doenças são transmitidas ao homem pela picada do mosquito flebótomos ou mosquito palha como é popularmente conhecido, e caso não seja diagnosticada e tratada a tempo pode levar o indivíduo a morte. Após a picada do mosquito as manifestações das formas cutânea e mucocutânea aparecem entre 3 ou 4 semanas enquanto a forma visceral, só após 4 a 6 meses. As formas cutâneas e mucocutâneas atacam principalmente a pele e as mucosas nasais causando inclusive lesões destrutivas e desfigurantes na face. A forma visceral ataca, sobretudo, o fígado e o baço. Cerca de 13 mil novos casos da forma mucocutânea são registrados no Brasil, principalmente na região nordeste. Essa forma também é endêmica no México, América central e em todos os países da América do sul, exceto Chile (PAHO, 2011). Por ser uma doença típica dos países subdesenvolvidos as multinacionais farmacêuticas abnegam investimentos em pesquisa nessa área, por acreditarem não haver retorno financeiro, fazendo com que as doenças parasitárias em geral fiquem conhecidas como doenças tropicais negligenciadas. Nesse sentido, vários esforços têm sido feito por parte das autoridades com o objetivo de desenvolver novas formas de controle e combate dessas doenças, inclusive com o sequenciamento dos genomas destes protozoários (IVENS et Al., 2005.; PEACOCK et al., 2007).

A análise do genoma do parasita *Leishmania braziliensis* revelou genes para uma classe especial de proteínas, as chaperonas moleculares ou proteínas de choque térmico (PEACOCK et al., 2007). O termo “chaperona molecular” foi primeiramente usado para descrever a função da nucleoplasmina, uma proteína que promove a correta oligomerização da histona prevenindo sua agregação durante o enovelamento da cromoseatina (LASKEY et al., 1978; BORGES; RAMOS, 2005). Hoje o termo chaperona molecular é aplicado a proteínas que se ligam a qualquer estrutura protéica incorretamente enovelada para promover sua estabilização e a sua correta função dentro do organismo (HENDRICK; HARTL, 1993). Tais proteínas são consideradas bons alvos terapêuticos para o tratamento de diversos tipos de doença, inclusive alguns tipos de câncer (SOTI et al., 2005; POWERS M.V.; WORKMAN, 2007).

1.1 – Enovelamento protéico e as chaperonas moleculares

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes e diversificadas das células. Elas pertencem à classe dos polipeptídeos, pois são formadas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas possuindo diferentes estruturas e inúmeras funções. Contudo, a atividade biológica das proteínas está intimamente relacionada com sua estrutura nativa que é obtida através de um processo conhecido como enovelamento protéico. O primeiro estágio desse processo envolve o colapso hidrofóbico que parece ser um evento precoce na via de enovelamento que é essencial para estabilização da estrutura nativa da proteína. O enovelamento protéico é guiado por várias propriedades físico-químicas tais como: energia livre, temperatura, força iônica, acidez, concentração de proteínas, pontes dissulfeto, glicolisação, etc (BORGES, 2004). A compreensão parcial desse processo é um obstáculo ao entendimento das várias doenças (principalmente as neurodegenerativas) ocasionadas pela deposição de proteínas mal enoveladas nas células.

Uma maneira da célula se proteger e evitar o acúmulo de agregados protéicos é através de uma classe especial de proteínas conhecidas como chaperonas moleculares ou proteínas de choque térmico (*Hsp, do inglês “Heat shock proteins*) que são classificadas com base na sua Massa Molecular (MM) e mecanismo funcional. Essas proteínas são divididas em cinco famílias principais, a saber:

Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e as sm*Hsps* e as várias co-chaperonas com papel de destaque em cada uma dessas famílias. As co-chaperonas atuam modulando a ação das chaperonas moleculares. As chaperonas moleculares agem de forma a contornar o problema da agregação, do mal enovelamento e atuam em diversos processos que envolvem o metabolismo protéico (POWERS; CLARK; WORKMAN, 2009). Elas são filogeneticamente conservadas e são expressas em níveis basais nas células, entretanto quando submetidas a alguma situação estressante como variação de temperatura ou pH as células intensificam sua expressão. Assim, a principal função dessa classe de proteínas é proteger a célula de agentes estressantes – com destaque para o choque térmico, que deu nome a essa classe de proteínas (PAES, 2009). De forma geral, as chaperonas moleculares atuam como um sistema de controle de qualidade celular auxiliando no correto enovelamento das proteínas e eliminação dos agregados protéicos a fim de manter a homeostase protéica que é essencial para saúde e manutenção da vida (TIROLI-CEPEDA; RAMOS, 2011).

Neste trabalho são apresentados estudos referentes as co-chaperonas das *Hsp70* e *Hsp90* de *Leishmania braziliensis,* sendo estas as *Hsp40* e a *Aha1 (*do inglês: *activator of Hsp90 ATPase),* respectivamente. Desta forma, estas famílias serão descritas em mais detalhes abaixo.

1.1.1 – *Hsp70*

As *Hsp70* (do inglês – *70 kDa heat shock protein*) é uma família de chaperonas moleculares expressa tanto em procariotos (chamada DnaK) como em eucariotos (chamadas *Ssa, SSb, SSc* em leveduras e *Hsp70, Hsc70* e *Bip* em mamíferos). Esse sistema é essencial em muitos processos celulares. Sob condições de crescimento normais das células, as *Hsp70* atuam como um sistema de controle de qualidade das proteínas auxiliando no enovelamento, no reenovelamento, no transporte de proteínas e em muitas outras funções celulares o que as tornam uma das mais importantes famílias de chaperonas moleculares (REVINGTON et al., 2005; HARTL, 1996; BUKAU;, HORWICH, 1998; BORGES; RAMOS, 2005; SILVA ;BORGES, 2011). Nesse processo ela é auxiliada por outras proteínas, co-chaperonas, como as *Hsp40* (*DnaJ* em *E. Coli*) e os fatores de troca de nucleotídeos. Sob condições de stress as células aumentam o nível de expressão

dessas proteínas o que aumenta ainda mais sua participação nos processos celulares e sua importância para os organismos **(**GENEVAUX, GEORGOPOULOS, KELLEY, 2007).

O sequenciamento do genoma de vários organismos tem revelado genes para os vários membros da família das *Hsp70* e suas co-chaperonas o que denota a importância dessa classe de proteína e explica sua conservação ao longo do processo evolutivo **(**GENEVAUX, GEORGOPOULOS, KELLEY, 2007).

Estima-se que as *Hsp70* auxiliam no enovelamento de 10-20% de todas as proteínas bacterianas, entretanto a eficiência desse processo depende do tamanho das proteínas. Essa porcentagem pode aumentar ainda mais em eucariotos já que o tamanho médio de suas proteínas é maior (52 kDa em seres humanos) em comparação com as bactérias (35 kDa em *E. coli*) (DEUERLING et al., 2000; HARTL, HAYER, 2002; MAYER; BUKAU, 2005).

As *Hsp70* são encontradas em todos os compartimentos celulares e seus membros apresentam elevada identidade estrutural e funcional, mas as proteínas codificadas pelos vários genes homólogos não têm a mesma função na célula (SILVA, BORGES; 2011). Assim cabe destacar as suas várias funções que são: 1) ligação em polipeptídeos recém sintetizado para ajudar no seu enovelamento; 2) transporte de proteínas através de membranas; 3) prevenção de agregação; 4) recuperação de agregados protéicos; 5) estabilização de fatores de transcrição celular; 6) exocitose e 7) interação com proteínas de sinalização intramolecular. Muitas das funções atribuídas as *Hsp70* ocorre graças a sua capacidade de ligar-se tanto a substratos quanto a ATP e hidrolisá-lo em ADP e fosfato inorgânico. Nesse processo as *Hsp70* funcionam como um centro intermediário recebendo e distribuindo proteínas instáveis e/ou parcialmente enoveladas entre as demais famílias de chaperonas moleculares como, por exemplo, as chaperonas das famílias Hsp60 e Hsp90 (BORGES; RAMOS, 2005).

As *Hsp70* são divididas em dois grandes domínios, sendo estes: domínio de ligação de nucleotídeo (DLN) de aproximadamente 45 kDa onde se liga o ATP que sofrerá hidrólise e o domínio de ligação de substrato (DLS), de aproximadamente 25 kDa, que interage com as seqüências de aminoácidos hidrofóbicos das proteínas “defeituosas” (BORGES; RAMOS, 2005; SILVA; BORGES, 2011). A afinidade dos substratos pelo DLS é controlada pela presença do nucleotídeo adenosina no DLN. Assim, o DLS apresenta alta afinidade pelo substrato quando o DLN está com ADP

ligado (o substrato pode se ligar ao DLS a partir do meio ou ser transportado pela *Hsp40*), agora quando o DLN apresenta ADP a taxa de ligação de substrato diminui e a afinidade pelo substrato aumenta (MAYER et al., 2000; BREHMER et al., 2001).

Tanto o DLN quanto o DLS pode ser divididos em dois subdomínios, DLN1 e DLN2; DLS1 e DLS2 respectivamente. O DLS1 parece funcionar como uma cama para o substrato enquanto o DLS2 funciona como uma tampa. A presença de substratos no DLS provoca mudanças conformacionais na estrutura da proteína que causa o fechamento da tampa sobre o polipeptídeo, enquanto a sua ausência desloca o equilíbrio da proteína para a conformação aberta. Assim, existem duas principais conformações possíveis para as *Hsp70* que é ditada pela presença do nucleotídeo ATP ou ADP no DLN. O ciclo de ligação ATP/ADP no DLN é controlado pelos fatores de troca de nucleotídeos (NEF) e *Hsp40* (SILVA; BORGES 2011). Esta ultima será discutida a seguir.

1.1.2 – *Hsp40*

As proteínas *Hsp40* (do inglês – *40 kDa heat shock protein*) são consideradas co-chaperonas das *Hsp70s* pela sua capacidade de selecionar e transferir substratos às *Hsp70* bem como estimular a sua atividade ATPásica. Esta família de proteína é bastante diversa e se apresentam principalmente na forma de dímeros e se caracterizam pela presença de um domínio rico em α-hélice chamado de domínio J, devido a sua identificação na *DnaJ*, a *Hsp40* de *E. coli* (BORGES, 2005; SUMMERS et al., 2009; SILVA; BORGES, 2011). Análise por sequenciamento revelou 6 homólogos para *DnaJ* em *E. coli*, 22 em *Sacchamomyces cerevisiae* e 41 membros *DnaJ/Hsp40* em humanos (QIU et al., 2006).

As proteínas *Hsp40* apresentam diferentes estruturas e localizações de domínios, o que faz com que elas sejam classificadas dentro de 3 subfamílias (A,B e C ou tipo I, III e III) (CHEETHAM, CAPLAN, 1988), como se vê na Figura 1.

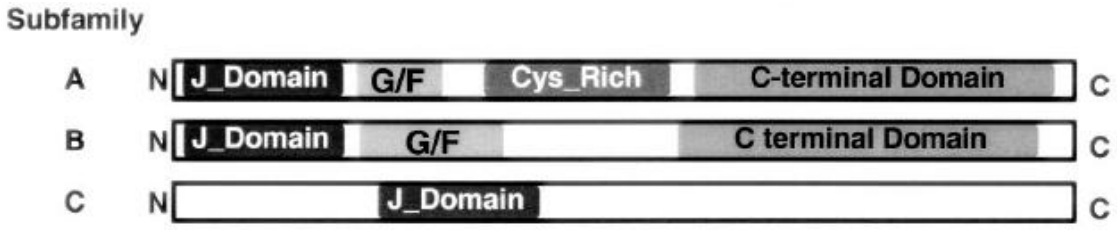

FIGURA 1: Representação esquemática dos domínios estruturais das subfamílias da *Hsp40*, A, B e C. As *Hsp40* tipo A são similares à DnaJ de *E. coli*, apresentando todos os domínios. As do tipo B não apresentam o domínio rico em cisteína. As *Hsp40* do tipo C possuem apenas o domínio J (retirado de BORGES et al., 2005).

Essas 3 subfamílias são separadas com base na *DnaJ* de *E. coli.* A primeira subfamília *(DnaJA)* contém as *Hsp40* que possuem estrutura e localização de domínios semelhante a *DnaJ* de *E. coli* (MITRA; SHEVDE; SAMANT, 2009.). As *DnaJA* podem ser divididas em 4 regiões conservadas, a saber: o domínio J, localizado na região N-terminal, uma região rica em resíduos de glicina e fenilalanina (G/F) e mais dois domínios, um de ligação de zinco rico em cisteína formado por 4 repetições do motivo CXXCXGXG (onde X é um aminoácido qualquer) e o domínio C-terminal. A segunda subfamília, *(DnaJB)* contém o domínio J, a região rica em G/F e o domínio C-terminal. Por fim a terceira subfamília *(DnaJC)* que possuem apenas o domínio J que pode estar localizado em qualquer região dentro das *Hsp40* (BORGES, 2005.; MITRA, SHEVDE SAMANT, 2009).

As proteínas das subfamílias A e B são chaperonas que funcionam de maneira independente de ATP e ligam-se a polipeptídios não nativos ou incorretamente enovelados (MITRA; SHEVDE; SAMANT, 2009). Essas subfamílias auxiliam outras chaperonas inibindo a agregação protéica causada pelo estresse celular. Membros das subfamílias A, graças à presença do domínio de ligação ao zinco, tem habilidade para prevenir a agregação de proteínas independente das *Hsp70* enquanto as subfamílias B até conseguem se ligar aos polipeptídeos, porém precisam interagir com as *Hsp70* para prevenir a agregação (FAN et al., 2004; CEPEDA, 2007). As subfamílias C possuem domínio de ligação especializado que reconhece apenas um tipo específico de substrato o que faz com que estas transportem apenas um tipo de proteínas clientes para as *Hsp70* (FAN et al., 2004; BOTHA, PESCE, BLATCH, 2007; MITRA, SHEVDE, SAMANT, 2009;).

O domínio J, bem conservado entre as *Hsp40*, é de extrema importância para interação com o DLN das *Hsp70* e assim estimular a atividade ATPásica das *Hsp70*.

Ele é composto por aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos, e estrutura resolvida por RMN revela que ele é constituído por 4 α-hélice (I-IV) e um motivo tripeptídeo, His-Pro-Asp (HPD) evolutivamente bem conservado entre as hélices II e III e vital para o domínio J, conforme Figura 2 (BOTHA, PESCE, BLATCH, 2007; LI, QIAN, SHA, 2009).

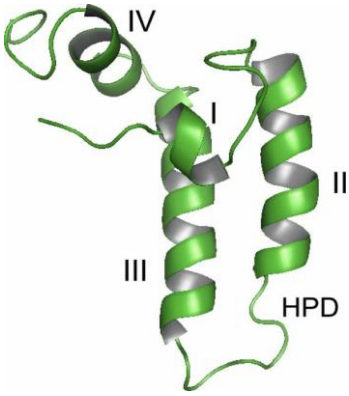

FIGURA 2: Modelo de estrutura do domínio J da subfamília A da *Hsp40* de *E. coli.* Representação das hélices I-IV e do motivo tripeptídeo resolvido por RMN (retirado de LI; QIAN; SHA, 2009).

Essas hélices (II e III) são conhecidas por mediar à interação do motivo HPD com o DLN das *Hsp70* enquanto a hélice IV é responsável por modular essa relação (BOTHA, PESCE, BLATCH, 2007).

A região G/F apresenta entre 30 a 70 resíduos de aminoácidos e pode funcionar como um espaçador entre o domínio J e o restante da *Hsp40*. Essa região é extremamente importante para o ciclo do sistema *Hsp40-Hsp70* uma vez que ela atua facilitando a transferência de substratos de uma proteína para outra (BORGES, 2005; BOTHA, PESCE, BLATCH, 2007). Um motivo conservado, Asp-lle-Phe (DIF) tem sido observado nessa região e ele parece ter um significativo papel estrutural e funcional no ciclo das *Hsp70* após hidrólise do ATP (BOTHA; PESCE; BLATCH, 2007).

O domínio de ligação de zinco, presente na região central de algumas *Hsp40* e caracterizado pela presença de 4 repetições da seqüência (CXXCXGXG), coordena a ligação em dois íons zinco o que sugere uma possível participação dessa região na estabilização da estrutura terciária das *Hsp40* (GREENE, MASKOS, LANDRY, 199; MARTINEZ et al. 2000). Algumas evidências sugerem ainda que a presença do domínio de ligação de zinco junto ao domínio C-terminal é essencial para ligação do substrato (HAN; CHRISTEN, 2003).

O domínio C-terminal das *Hsp40* é o menos conservado dentre os demais e está envolvido principalmente na ligação de substratos (BANECKI et al., 1996). Alguns autores sugerem que a interação entre as proteínas *Hsp40-Hsp70* é devido às características comuns que existem entre os dois domínios de ligação de substratos das duas famílias de proteínas (RUDIGER, SCHNEIDER, BUKAU, 2001). Além da captura de substratos, o domínio C-terminal está envolvido também na dimerização da *Hsp40*, o que é fundamental para sua função (BORGES et al., 2005; SHA et al., 2000).

Como discutido acima, algumas *Hsp40* podem funcionar como chaperonas moleculares e isso ocorre por interação hidrofóbica entre os substratos e as *Hsp40* no mesmo sítio onde as *Hsp70* se ligariam ao substrato (BORGES, 2004; MITRA, SHEVDE, SAMANT, 2009). Quanto ao ciclo funcional das *Hsp40* com as *Hsp70* alguns autores sugerem que elas interagiriam através de diferentes sítios hidrofóbicos nas proteínas não enoveladas, permanecendo ligadas pelo substrato por algum tempo formando um complexo transiente *Hsp40-Hsp70-substrato* ocorrendo em várias etapas conforme mostrado na Figura 3.

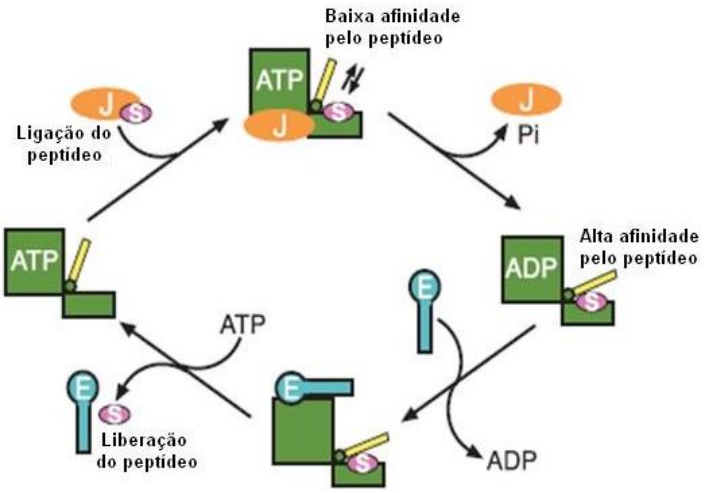

FIGURA 3: Ciclo funcional das *Hsp40* com as *Hsp70*. Em verde a proteína *Hsp70* e seus respectivos domínios, em laranja a *Hsp40*, em rosa o substrato e em azul a proteína *GrpE* que auxilia a *Hsp70* na troca de ADP pelo ATP (adaptado de HAYER-HARTL, 2002)

As várias etapas mostradas na Figura 3 são: 1) ligação do domínio J ao domínio N-terminal das *Hsp70* no estado ligado ao ATP; 2) transferência do polipeptídeo para o DLS das *Hsp70*; 3) comunicação da ligação do polipeptídeo transmitido pelo DLS ao DLN, o que estimula a hidrólise do ATP seguida pelo

fechamento do DLS2 sobre o substrato e 4) dissociação da *Hsp40* do complexo *Hsp70-ADP-substrato* (LAUFEN et al., 1999; SCHNEIDER, BUKAU, 2001).

A família das *Hsp40* é muito mais numerosa e diversa em estrutura e função do que a família das *Hsp70* (CHEETHAM; CAPLAN, 1998). Soma-se a isso o fato de tais proteínas estarem localizadas em diferentes compartimentos e organelas celulares tais como mitocôndria, retículo endoplasmático, citosol e núcleo. Diante das variedades e diferentes localizações na célula parece redundante as funções realizadas por essa classe de proteínas (CEPEDA, 2007; MITRA, SHEVDE, SAMANT, 2009.). Assim sendo, acredita-se que o verdadeiro papel para os muitos membros dessa família de chaperonas ainda permanece desconhecido e que muitos estudos ainda precisam ser realizados para esclarecer de fato as suas verdadeiras funções.

1.1.3 – Hsp90

A *Hsp90* é uma proteína altamente conservada e uma das mais abundantes nos organismos eucariotos alcançado aproximadamente 2% do conteúdo protéico de uma célula (YOUNG, MOAREFI, HARTL, 2001; PRATT; TOFT, 2003). Estas proteínas estão envolvidas no crescimento e na diferenciação celular, entre muitas outras importantes funções (YOUNG, MOAREFI, HARTL, 2001; WEGELE, MÜLLER, BUCHNER, 2004). Quando as células são submetidas a algum tipo de estresse, as *Hsp90* têm sua expressão aumentada em um curto intervalo de tempo onde permanecem elevadas por várias horas interagindo com proteínas que não estão em seu estado nativo, promovendo assim a estabilização conformacional de várias proteínas-cliente (YOUNG, MOAREFI, HARTL, 2001; WEGELE, MÜLLER, BUCHNER, 2004; MITRA, SHEVDE, SAMANT, 2009). As *Hsp90* juntamente com outras famílias de chaperonas são essenciais para o ciclo de vida dos protozoários parasitas *Plasmodium falciparum e Leishmania donovani* onde atuam como sensor térmico para a diferenciação celular nestes organismos (WIESGIGL, CLOS, 2001; PAVITHRA et al., 2004).

A *Hsp90* é um dímero flexível, onde cada monômero consiste de três domínios: o domínio N-terminal (DN) que detêm atividade ATPásica, uma longa seqüência carregada negativamente chamada de *linker* (em eucariotos), um domínio intermediário (DM) onde se ligam várias co-chaperonas e um domínio C-terminal

responsável pela dimerização (DC) das *Hsp90*. (WANDINGER; RICHTER; BUCHNER, 2008). A figura 4 mostra o ciclo ATPase das proteínas Hsp90.

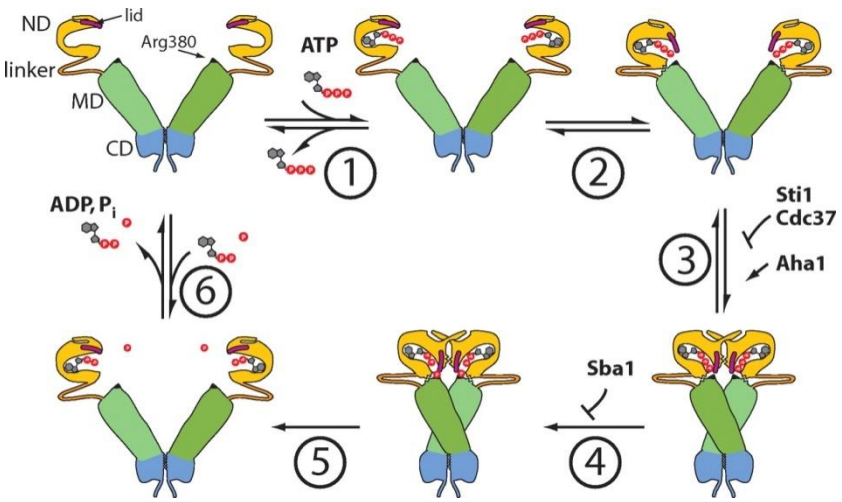

Figura 4: Ciclo ATPase da HSp90. ND (domínio N-terminal), MD (domínio intermediário M), CD (domínio C-terminal). 1) Ligação do ATP; 2) Fechamento da tampa do ATP; 3) Dimerização; 4) Hidrólise do ATP; 5) abertura da "tampa" do sítio de ligação e do ADP e Pi; 6) Retorno da Hsp90 ao estado inicial. (Retirado de WANDINGER; RICHTER; BUCHNER, 2008)

Observa-se na Figura 4 o ciclo ATPase das proteínas Hsp90, onde inicialmente ocorre a ligação do ATP ao DN (etapa 1) e posteriormente o DN da Hsp90 sofre uma mudança conformacional que conduz ao fechamento da tampa sobre o ATP (etapa 2). Após o fechamento da tampa, os primeiros 24 aminoácidos de cada monômero da Hsp90 dimerizam-se, e a primeira folha-β e hélice-α se trocam para interagir com o domínio DN do outro monômero (etapa 3). Além disso, em cada monômero, o DN contata-se com o DM correspondente ao seu monômero. Esta conformação metaestável auxilia na hidrólise de ATP (etapa 4). O contato entre o DN e DM posiciona a Arg380 localizada no DM próximo ao fosfato gama do ATP de forma a coordená-lo e ativá-lo como grupo abandonador na reação de hidrólise do ATP. Tudo isso leva a compactação do dímero da Hsp90, no qual os monômeros individuais se torcem em torno de si. Após a hidrólise de ATP, os DNs se dissociam e ambos se separam e a "tampa" do sítio de ligação de nucleotídeos adenosina se abre; logo após ocorre a liberação do ADP e Pi a Hsp90 retorna estado inicial (etapa 5 e 6) (WANDINGER; RICHTER; BUCHNER, 2008; SILVA, 2010).

Como se pode observar o ciclo ATPásico das Hsp90 envolve a participação de várias co-chaperonas dentre elas a Aha1 que foi alvo de estudo neste trabalho.

1.1.4 – Aha1

A atividade ATPásica da *Hsp90* humana é relativamente baixa comparada a atividade da *Hsp90* de outros organismos (MCLAUGHLIN; SMITH; JACKSON, 2002) tal como levedura e *P. falciparum* por exemplo (PALLAVI et al., 2010). Seu mecanismo de ação é bastante complexo e envolve a participação de várias co-chaperonas (LOTZ et al., 2003). Um membro das co-chaperonas da *Hsp90* recentemente descrita em humanos é a *Aha1* (do inglês: *activator of Hsp90 ATPase*). Ensaios bioquímicos realizados com essa proteína mostram que ela interage com o domínio M das *Hsp90* aumentando a atividade ATPásica, o que sugere que ela assume papel significativo no ciclo chaperone das *Hsp90* na célula (HOLMES et al., 2008). O sequenciamento do genoma de *L. braziliensis* revelou um gene para uma proteína ortóloga da *Aha1* humana, aqui nomeada como *LbAha1* . Comparação entre essas proteínas mostram que as mesmas apresentam 30% e 50% de identidade e similaridade, respectivamente. Apesar da baixa identidade, essas proteínas apresentam um grande número de resíduos de aminoácidos Triptofano sendo 9 para a *LbAha1* e 10 para *Aha1* humana onde 7 destes apresentam posição conservada na seqüência (MEYER et al., 2004; SILVA, 2010).

A proteína *Aha1* pode ser dividida em duas regiões ou domínios (LOTZ et al., 2003; MEYER et al., 2004; KOULOV et al., 2010) o N-terminal que interage com a *Hsp90* e o C-terminal com função não bem definida ainda. O domínio N-terminal (1-153) possui uma estrutura alongada de aproximadamente 65 Å de comprimento e 25 Å de diâmetro orientado em meandro β (estrutura super-secundária formada por uma hélice, 4 fitas β antiparalela e outra hélice) (Figura 5).

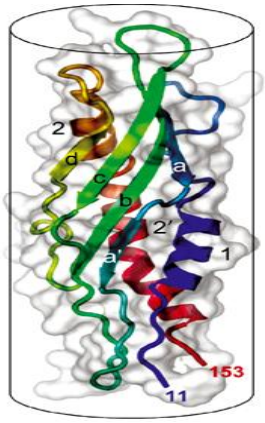

FIGURA 5: Estrutura do domínio N-terminal da *Aha1*. A imagem mostra a estrutura cilíndrica do domínio N-terminal da *Aha1* de levedura (resíduos 1-153) colorido do azul para o vermelho (retirado de MEYER et al., 2004).

O domínio C-terminal da Aha1 apresenta um enovelamento similar ao domínio N-terminal, sendo constituído de 1 fita β amino-terminal seguida por uma hélice α, um meandro β e uma hélice α carboxi-terminal (MEYER et al.,2004).

A estimulação máxima da atividade ATPásica das *Hsp90* é provocada pela *Aha1* inteira, entretanto já se mostrou que um grau substancial de estimulação pode ser obtido com altas concentrações do segmento N-terminal (resíduos 1-153), sugerindo que esta região é a responsável pela estimulação da atividade ATPase das *Hsp90* (PANARETOU; MEYER; SILIGARDI; 2002; LOTZ et al., 2003; MEYER et al 2004). Apesar de estudos mostrarem que o N-terminal da Aha1 humana se liga ao DM da Hsp90 para estimular a atividade ATPase, outros estudos também mostram que o domínio C-terminal da *Aha1* também é necessário para esta estimulação, e que ambos domínios se ligam cooperativamente à interface do dímero da *Hsp90* (KOULOV et al., 2010). Estudos também apontam que a função ATPase das *Hsp90* é fornecida pela Arg380 no *loop* (370-390) do DM da *Hsp90* e a ligação da *Aha1* ao DM ajuda a estabilizar a Arg380 na coordenação do fosfato gama do ATP (MEYER *et al*., 2004).

A *Aha1* é uma co-chaperona que surgiu recentemente na evolução. Por exemplo, bactérias não possuem proteínas ortólogas à *Aha1*. Tem sido proposto que as *Hsp90* evolutivamente vêm perdendo atividade ATPase basal e daí a necessidade de uma proteína estimuladora de sua atividade ATPase (PANARETOU; MEYER; SILIGARDI; 2002; LOTZ et al., 2003). Esta informação sugere a importância desta co-chaperone para o funcionamento das *Hsp90* em organismos superiores na escala evolutiva.

1.2 – Expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

A expressão de proteínas recombinantes pode ser obtida por uma variedade de sistemas de expressão comercialmente disponíveis. A escolha correta do sistema depende de uma serie de fatores, tais como: necessidade de grande quantidade de proteínas, facilitação no processo de purificação e toxicidade da proteína alvo para a célula hospedeira (CORREA, 2004).

A princípio a clonagem do DNA parece ser uma tarefa relativamente simples, entretanto a expressão dos DNAs clonados ainda é uma tarefa árdua. As razões do

porque disto, infelizmente não são totalmente compreendidas (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

O uso de *E. coli* geneticamente modificada como sistema de expressão tem permitido a obtenção de grandes quantidades de proteínas para diversas finalidades como por exemplo caracterização bioquímica, produção de anticorpos, determinação da estrutura tridimensional, entre outros (RUCKER et al., 2001). A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* algumas vezes são obtidas como agregados protéicos, denominados corpos de inclusão, ou são prematuramente degradadas e/ou desnaturadas (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Em vista disto e na ausência de um motivo único ou de um guia prático que resolva todos os problemas de indução foi que os experimentos de expressão utilizados neste trabalho foram realizados em três linhagens de *E. coli* BL21(DE3), uma linhagem que cresce bem em meio *LB,* com intenção de eliminar os problemas inerentes a estes processos.

Na literatura existem muitas informações referentes à otimização das condições de indução em *E. coli* para proteínas especificas. Entretanto, as proteínas freqüentemente possuem propriedades físicas e químicas bastantes peculiares e, portanto as condições ideais de expressa para uma dada proteína não é igual para outra (BRAUN et al., 2002). Assim sendo, triagens empíricas devem ser realizadas afim de se determinar o melhor protocolo de expressão para cada proteína individualmente.

A vantagem da *E. coli* como sistema de expressão é que sua maquinaria está baseada no sistema de expressão T7 (STUDIER et al., 1990) o que permite uma expressão em larga escala de proteínas recombinantes tanto de bactérias (TABOR, RICHARDSON, 1985; STUDIER, MOFFATT, 1996) quanto de células eucarióticas

(FUERST et al., 1986; DUNN et al 1988). Esse sistema faz uso da enzima T7 RNA polimerase que é uma enzima altamente ativa, alongando a cadeia de RNA oito vezes mais rápido do que a RNA polimerase da *E . coli* (BONNER et al., 1994). Além disso, a enzima é altamente específica e seletiva transcrevendo os genes cuja expressão depende apenas do promotor T7 (CHAMBERLIN et al., 1970).

Apesar de seus méritos e ampla utilização, este poderoso sistema de expressão pode causar problemas consideráveis. Os problemas mais comumente encontrados são inconsistência nos níveis de expressão, formação de corpos de

inclusão (HOANG et al., 1999; JEONG;LEE, 1999) e instabilidade dos clones (HATTMAN et al., 1985). Inconsistência nos níveis de expressão dos genes-alvo tem sido atribuída à perda da expressão da T7 RNA polimerase, embora o gene esteja sob o controle de um forte promotor de indução. Os baixos níveis de T7 RNA polimerase foram detectadas nos casos em que o gene para a enzima T7 foi clonado sob o lacUV5 (DENG; NOEL; TSAI, 1990), caso das cepas usadas neste trabalho.

1.3 – Dicroísmo circular

O dicroísmo circular é uma técnica de espectroscopia de absorção eletrônica baseado na mudança de configuração de um estado fundamental para um estado excitado, quando a luz circularmente polarizada interage com um cromóforo opticamente ativo (assimétrico). Os principais cromóforos nas proteínas são as estruturas aromáticas e as ligações amídicas. As primeiras são responsáveis pelo sinal no ultravioleta próximo (entre 250-300 nm) e são utilizadas para avaliar a estrutura terciária de proteínas enquanto que a segunda são responsáveis pelo sinal característico no comprimento de onda (λ) do ultravioleta distante (abaixo de 250 nm) sendo então utilizadas como sondas para estruturas secundárias das proteínas. Considerando estas características, a técnica de CD é utilizada para estimar a quantidade de estrutura secundária de proteínas e avaliar as mudanças conformacionais ocasionadas por ligantes, agentes desnaturantes (acidez, uréia, cloridrato de guanidina, etc), temperatura e assim obter informações sobre a presença de domínios e suas diferentes estabilidades (WOODY, 1995; KELLY, PRICE, 1997).

1.4 – Fluorescência

Algumas moléculas após absorverem determinada quantidade de energia promovem a transição de alguns elétrons de um estado fundamental para um estado excitado e estes, ao retornarem ao seu estado fundamental emitem parte da energia absorvida na forma de luz. Esta emissão é chamada de fluorescência e é bastante utilizada no estudo de macromoléculas para se obter informações sobre, conformações da molécula, sítios de ligação, grau de flexibilidade, interações com solventes, etc. Naturalmente, existem 3 aminoácidos aromáticos susceptíveis ao

processo de fluorescência, sendo estes: principalmente triptofano, tirosina e em menor escala fenilalanina. A fluorescência de cada um deles pode ser distinguida pelas características de seus espectros de absorção. Em solução a fluorescência desses cromóforos pode ser afetada por fatores relacionado ao meio como, pH, polaridade do solvente, presença de um inibidor ou moléculas vizinhas. Os principais comprimentos de onda de excitação para estes aminoácidos fluorescentes estão no intervalo de 260 nm a 295 nm. Contudo é possível separar bem a contribuição dos espectros de excitação e emissão de cada um deles em solução. O triptofano, por exemplo, é preferencialmente excitado em 295 nm e emite em 350 nm, a tirosina se excita em 275 nm e decai em 300 nm já a fenilalanina apresenta espectros de excitação e emissão em 260 nm e 280 nm respectivamente. Assim, dependendo da proporção destes fluoróforos e da proximidade entre eles, é possível observar comportamentos diferenciados do espectro de emissão de fluorescência, tais como, supressão de fluorescência, deslocamento do máximo de emissão ou mudanças no centro de massa espectral de fluorescência (LAKOWICZ, 1983).

2 – Objetivos

O objetivo desta dissertação de mestrado foi a expressão e a caracterização de duas proteínas, uma do tipo I e a outra do tipo II, da família das *Hsp40* oriundas de *Leishmania braziliensis.* A *Hsp40* do tipo I alvo é a proteína XP_001566014.1 e a do tipo II é a XP_001569271.1. Para isso fez-se necessário:

1 - clonar o cDNA de ambas as proteínas;

2 - expressar e purificar *Hsp40* do tipo I e outro do tipo II de *L. braziliensis*;

A Aha1 de *L. braziliensis* também foi foco de estudo deste trabalho na caracterização da sua estabilidade frente à desnaturação química.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – *Data mining* e bioinformática

O DNA que codifica as proteínas de interesse *LbHsp40I* e *LbHsp40II* foi gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto). Estas sequências foram previamente identificadas através de pesquisa em banco de dados genômico *da L. braziliensis* onde usou se como modelo as proteínas *Hsp40* tipo *I* (Np_014335.1) e tipo *II* (NP_014391.1) da levedura *Sacchamomyces cerevisiae* identificadas no *GenBank* do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI - site: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/GenbankSearch.html). A identificação foi realizada através da ferramenta de bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* (t*BLASTn)* que usa sequência de aminoácidos da proteína de referência para encontrar, por identidade e similaridade, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da proteína de interesse.

3.2 – Oligonucleotídeos para a reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação dos DNAs foram construídos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) com o auxílio das ferramentas de bioinformática, como o programa *Gene Runner* e *LALIGN* (www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) onde se usou como molde as sequências dos nucleotídeos correspondentes as *LbHsp40I* e *LbHsp40II*. Para facilitar a transferência das sequências de interesse do vetor de propagação para o vetor de expressão, inseriu-se nos oligonucleotídeos sítios para as enzimas de restrição *NdeI* no iniciador 5’ e *EcoRI* no iniciador 3’ do códon de terminação em cada uma das seqüencias codificantes como se pode observar na Tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos desenhados para as sequências de DNA alvo

Proteína	Nome	Direção	Enzima	Seqüência 5'→3'
Lb*Hsp40*I	Lb-*Hsp40*I F	Sence	NdeI	AATCATATGGTGAAGGAGACCGGC
	Lb-*Hsp40*I R	Antisence	EcoRI	CGACGCGCGTTGTCACTTAAGATA
Lb*Hsp40*II	Lb-*Hsp40*II F	Sence	NdeI	ATACATATGGGCGTGGACTATTAT
	Lb*Hsp40*II R	Antisence	EcoRI	TCGTCACGTTTAAGATCTTAAGATA

3.3 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os experimentos de PCR foram realizados em um termociclador (*MyCycler Thermal Cycler* – BioRad) usando a seqüência de DNA alvo, a enzima Taq DNA polimerase (New England Biolabs), as bases nitrogenadas e os oligonucleotídeos específicos sintetizados.

A amplificação das sequências de interesse foram realizadas utilizando o seguinte programa: 95 °C durante 5 minutos seguido por uma etapa de 36 ciclos que inclui um passo a 95 °C durante 1 minuto (desnaturação) mais um passo de 1 minuto com temperatura variando entre 50 a 60 °C (anelamento dos iniciadores) e mais um passo de 1 minuto e meio a 72 °C para a polimerização da sequência. Por fim, mais uma etapa a 72 °C durante 10 minutos seguidos por uma de 4 °C por tempo indeterminado.

3.4 – Purificação do produto de PCR

A Purificação do produto de PCR foi feita após separação dos fragmentos de DNA em gel de agarose usando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante para posterior ligação no vetor de propagação *pGEM-T Easy Vector* (Promega).

3.5 – Gel de Agarose e Determinação da concentração de DNA

Para análise do produto de PCR realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 8 mg/ml em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, pH 8,0 e EDTA – ácido etilenodiaminotetracético – 1 mM). Após aplicação do DNA e do

marcador de massa molecular no gel, submeteu-os a uma corrente elétrica de 120 volts durante um tempo de aproximadamente 25 minutos. Com o término da eletroforese o gel foi incubado durante 15 minutos em solução de brometo de etídio a 0,1 µg/mL. O brometo de etídio é um corante fluorescente que se intercala entre as bases dos ácidos nucléicos facilitando sua observação em géis de agarose sob luz ultravioleta preparada no tampão descrito acima. Em seguida o gel foi visualizado sob luz ultravioleta no transluminador *Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro* acoplado a um computador para registro das imagens e comparação com o padrão.

Após purificação do produto de PCR e de uma nova eletroforese, a concentração do DNA foi determinada comparando a intensidade da banda do gel corada com brometo de etídio com a intensidade das bandas do marcador de massa molecular de DNA (*Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder* – Fermentas).

3.6 – Vetores

3.6.1 – Vetor de Transferência

Os produtos de PCR dos DNAs de interesse foram clonados em vetores de transferência visando facilitar sua extração com as enzimas de restrição e posterior ligação nos vetores de expressão. O vetor de propagação utilizado foi o *pGEM-T Easy Vector* (Promega) que se baseia no sistema operon Lac. Este sistema possui o gene lacZ que produz a enzima beta-galactosidase que degrada o composto X-gal (5-bromo-1-cloro-3-indoil-D-galactosídeo) ocasionando o surgimento de colônias azul. Quando a seqüência alvo de DNA é inserida no vetor, ela inativa o gene que codifica a β-galactosidase fazendo com que as colônias recombinantes que possuem o DNA alvo tenham coloração branca enquanto as demais (não recombinantes) apresentam coloração azul. Assim, este sistema é importante para informar se o experimento de ligação do DNA no plasmídeo funcionou ou não.

3.6.2 – Vetor de expressão

Visando a expressão das proteínas de interesse os DNAs alvo foram subclonados no vetor de expressão *pET23a*(+) (Novagen, Alemanha). Este vetor de expressão esta sob controle do sistema T7 no qual o DNA alvo é clonado sob o

controle do promotor do gene 10 do bacteriófago T7 (STUDIER *et al.*, 1990). A expressão do DNA ocorre somente na presença da enzima T7 RNA polimerase. Essa enzima é altamente ativa, alongando a cadeia de RNA oito vezes mais rápido do que a RNA polimerase da *Escherichia coli* (BONNER et al., 1994; VOLKER et. al, 2000). Além disso, a enzima é altamente específica e seletiva transcrevendo os genes cuja expressão depende dos promotores T7 (CHAMBERLIN et al., 1970; VOLKER et. Al, 2000). Esse sistema de expressão é amplamente usado para expressão em larga escala de proteínas recombinantes tanto em bactérias quanto em células eucarióticas (FUERST et al.,1986; DUNN et al. 1988).

As cepas de bactérias *E. coli BL21(DE3)* possuem, integrado ao seu genoma, o prófago do bacteriófago T7. Neste prófago, a expressão da T7 RNA polimerase está sob o controle do promotor *lacUV5* do operon *lac I*, que é mantido reprimido na presença de glicose e na ausência de seu indutor natural, a 1,6 aldolactose, um derivado da galactose (STUDIER *et al.*, 1990). O produto do gene *lac I* representa o repressor que, quando ligado ao operador O (presente no prófago do T7), impede a expressão da T7 RNA polimerase, não ocorrendo à transcrição do DNA alvo. Porém, na presença de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo), que é um análogo do indutor natural (a 1,6-aldolactose), o repressor se desliga do operador liberando a expressão da T7 RNA polimerase do bacteriófago T7. Esta, por sua vez, atua na transcrição do DNA alvo clonado no vetor do sistema pET produzindo em seguida grandes quantidades da proteína de interesse.

3.7 – Linhagens de bactérias *Escherichia coli*

A linhagem de *E. coli DH5α* foi usada para clonagem e manutenção de todos os plasmídeos uma vez que esta apresenta características apropriadas para tal fim como por exemplo ausência de endonuclease que poderia causar digestão no recombinante, capacidade de capturar grandes plasmídeos e deleção da porção alfa do gene da beta-galactosidase (*lacZ deltaM15*) que permite uma seleção prévia na busca de colônias com os recombinantes nos ensaios de “azul e brancos” – degradação do X-gal.

A cepa de bactérias *E. coli BL21(DE3)*® (Stratagene) foi utilizada para expressar as proteínas de interesse. Esta cepa possui baixos níveis de produção de proteases, que poderiam degradar a proteína alvo, e possui ainda o gene *DE3*

responsável pela síntese da enzima T7 RNA polimerase controlado pelo promotor *lacUV5* e ativado pela adição de IPTG.

A linhagem de bactérias *E. coli BL21(DE3)pLysS*® (Stratagene), além das características acima descritas, apresenta expressão aumentada de lisozima que inibe a T7 RNA polimerase, regulando a expressão da proteína de interesse clonada no vetor do sistema pET. Esta linhagem pode ser utilizada quando a proteína alvo se apresenta tóxica para a bactéria.

A cepa de bactérias *E. coli BL21(DE3) Códon Plus RP*® (Stratagene), também apresenta as características descritas acima para a cepa *E. coli BL21(DE3)*, porém possui suplementação de RNA transportadores para códons raros de arginina e prolina. Estes códons raros são aqueles pouco freqüentes nas bactérias, sendo que estas não possuem RNA transportadores que os reconhecem.

3.8 – Meios de Cultura

O meio de cultura Lb (Luria Bertani) contendo triptofano 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10g/L em pH 7.0 foi utilizado para preparação das células competentes, crescimento de bactérias, expressão de proteínas e manutenção de bactéria contendo o vetor de interesse. Ao meio sólido foi adicionado 15 g/L de ágar. A fim de selecionar as bactérias contendo os DNAs de interesse os seguintes antibióticos foram adicionados: ampicilina 50 µg/mL e clorafenicol 25 µg/mL.

3.9 – Manutenção dos microorganismos

Os microrganismos foram mantidos a -20 °C e/ou em meio sólido (adição de 15 g/L de ágar no meio LB) a 4 °C.

3.10 – Clonagem

3.10.1 – Clonagem em pGEM-T

As clonagens no vetor *pGEM-T* foram realizadas com o kit de clonagem *pGEM-T easy*® (Promega).

Esse vetor é linearizado e possui uma timina em cada extremidade o que facilita a ligação do produto de PCR proveniente da reação com a Taq DNA polimerase que adiciona adenina nas extremidades. A ligação do fragmento de

interesse no vetor de transferência foi feita utilizando a enzima *T4 DNA ligase* durante 16 h a 4 °C, seguida por transformação por meio de choque térmico em células de *E. coli DH5α* $CaCl_2$ competentes, das quais foram selecionadas os clones contendo o plasmídeo recombinante. A seleção foi feita utilizando 0,1 mg/mL de X-Gal, 0,5 mM de IPTG e 0,1 mg/mL de ampicilina nas placas para identificação dos clones recombinantes pois o vetor *pGEM-T*, que se baseia no sistema *operon lac*, interrompe o gene que codifica a beta-galactosidase e impede a degradação do composto químico X-Gal o que resulta no aparecimento de colônias brancas.

3.10.2 – Subclonagem em vetores de expressão

Os vetores de transferência que continham o DNA de interesse e os vetores de expressão, *pET23a* foi clivado com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI* conforme protocolo do manufaturador.

A clivagem do vetor intermediário (pGEM-T) foi para liberar os fragmento de DNA enquanto a clivagem dos vetores de expressão foi para capacitá-los a receber esses fragmentos. Após a extração do DNA do vetor de transferência e preparação dos vetores de expressão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8 % e coradas em brometo de etídio. As bandas correspondentes ao fragmento de DNA e aos vetores de expressão foram extraídas do gel e purificadas usando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) conforme o protocolo do fabricante. Após purificação, 120 ng do inserto de interesse e 50 ng do vetor de expressão foram incubados com a enzima *T4 DNA Ligase* (Promega), de acordo com o protocolo do manufaturador, por 16 horas à 4 °C. Após crescimento das colônias estas foram submetidas a PCR e análise de restrição.

3.11 – Preparação das bactérias $CaCl_2$ competentes

A cepa de interesse, *DH5α*, foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB sem antibiótico e mantida sob agitação durante aproximadamente 16 h a 37 °C e 200 rpm. O pré-inóculo foi diluído em 100 mL de meio LB sem antibiótico e mantido nas mesmas condições acima descrito até atingir a densidade ótica (DO) em 600 nm de 0,4-0,6 unidades de absorbância. Em seguida a cultura foi centrifugada durante 7 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspendido em 35

mL de $CaCl_2$ gelado e estéril. As células foram mantidas em banho de gelo por 20 minutos e centrifugadas novamente por 7 minutos a 3500 rpm e 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido. Esse processo foi repetido para os volumes 8 mL e finalmente 2 mL quando o precipitado foi ressuspendido em $CaCl_2$ e glicerol 50 % gelado e estéril. Por fim alíquotas de 200 de µL das células foram congeladas em nitrogênio liquido e armazena a -80 °C.

3.12 – Transformação das bactérias competentes e seleção dos clones transformados

Após a ligação do fragmento de DNA no vetor de interesse, transformou-se 200 µL da cepa com 2 µL do recombinante (~150 ng). A cepa *DH5α*, congelada em solução de glicerol 50 % e armazenada a -80 °C foi descongelada em banho de gelo por um tempo de aproximadamente de 15 minutos. O produto de transformação foi mantido em banho de gelo por 20 minutos seguido por choque térmico (90 segundos a 42 °C, 3 minutos a 4 °C seguidos por 45 minutos a 37 °C em 800 mL de meio Lb para reanimar as células transformadas). As bactérias transformadas com os clones de transferências foram espalhadas em meio Lb sólido contendo 0,1 mg/mL de X-gal, 0,5 mM de IPTG e 0,1 mg/mL de ampicilina para seleção e identificação dos clones recombinantes. As cepas transformadas com os recombinantes de expressão foram semeadas em meio Lb sólido contendo 30 µg/mL de ampicilina e 25 µg/mL de clorafenicol. As placas foram mantidas a 37 °C por 16 horas. Após este período escolheu-se as colônias nas placas de cultura e fez-se PCR e os clones que deram positivos foram inoculado em meio liquido para multiplicação e extração do DNA plasmidial.

3.13 – Seleção dos clones recombinantes

3.13.1 – PCR de colônia

A análise dos clones recombinantes selecionados pelo plaqueamento em meio seletivo foi feita por PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos *SP6* (TACGATTTAGGTGACACTATAG) e *T7 promoter* (TAATACGACTCACTATAGGG), que se anelam ao vetor. As colônias que apresentaram a amplificação do fragmento, e se mostraram de tamanho compatível na eletroforese, foram crescidas em meio LB

e os plasmídeos recombinantes foram extraídos e submetidos à análise de restrição para clonagem no vetor de expressão. A análise dos recombinantes de expressão também foi realizada por PCR, com os oligonucleotídeos específicos, e clivagem com as enzimas de restrição.

3.13.2 – Análise de restrição

As enzimas usadas para análise de restrição foram *NdeI* e *EcoRI* (*New England BioLabs*), cujos sítios foram inseridos nos oligonucleotídeos das seqüencias das *LbHsp40I* e *LbHsp40II.* 100 ng dos vetores de transferência e expressão com as sequências codificantes para as proteínas foram incubados com 5 unidades das enzimas *Nde*I e *Eco*RI durante um tempo de aproximadamente 2 horas a uma temperatura de aproximadamente 37 °C. Após esse tempo foi feito eletroforese para averiguação da liberação do fragmento.

3.13.3 – Sequenciamento

O sequenciamento automático foi realizado no Instituto de Física de São Carlos no aparelho 3130 Genetic Analises Applied Biosystem (Hitachi), utilizando o método de dideoxi nucleotídeos.

3.14 – Extração de DNA

A extração da seqüência do DNA de interesse foi feita através da lise alcalina com o kit de extração de DNA plasmidial, *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.15 – Expressão de proteínas.

Para expressão das proteínas de interesse, os plasmideos recombinantes *pET23::LbHsp40I*, *pET23::LbHsp40II* e *pET23a::LbAha1* foram transformados (conforme item 2.12) nas cepas *BL21(DE3)*®, *BL21(DE3) pLysS*® e *BL21(DE3) Códon Plus RP*®. Após transformação e crescimento das colônias, fez-se um pré-cultivo (crescimento de uma colônia em 5 mL de meio Lb contendo os antibióticos

ampicilina e clorafenicol nas concentrações de 30 µg/mL e 25 µg/mL respectivamente durante 16 horas). Esse cultivo foi crescido em 500 mL de meio Lb, mantendo as concentrações dos antibióticos e sob agitação constante de 200 rpm e temperatura de 37 °C. Esse crescimento foi monitorado até atingir a densidade ótica em 600 nm de 0,4-0,6 unidades de absorbância. Atingida essa fase de crescimento as cepas bacterianas foram induzidas a expressar as proteínas pela adição de IPTG na concentração final de 0,1 mmol L^{-1} ou 0,2 mmol L^{-1} durante tempos diferentes conforme o teste realizado. O tempo e a temperatura de indução foram determinados em ensaios de pequena escala com 100 mL de meio onde as cepas foram induzidas nas mesmas condições e alíquotas retiradas de hora em hora visando determinar as melhores condições para produção das proteínas recombinantes. Após verificação do nível de indução por eletroforese em SDS – PAGE 12 %, a cultura foi centrifugada a 10000 rpm durante 15 minutos a 4 °C e o sedimento bacteriano foi armazenado a -80 °C para posterior lise e purificação das proteínas de interesse.

3.16 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

A avaliação dos testes de expressão e solubilidade bem como das várias etapas de purificação foram acompanhados pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH 6,8; DTT 100 mmol L^{-1}; SDS 2 %; azul de bromofenol 0,1 % e glicerol 10 % e fervidas quando necessário para depois, juntamente com um marcador de massa molecular (*PageRuler*^{TM} *Unstained Protein Ladde* - Fermentas) serem aplicadas no gel e então submetidas a uma voltagem constante de 150 volts durante aproximadamente 80 minutos. A eletroforese foi realizada em um equipamento *Mini-Protean II Dual Slab Cell* (Bio-Rad), com gel de empacotamento 5 % e gel de separação 12 % (para proteínas de massa molecular de 20 a 50 kDa).

3.17 – Lise bacteriana e avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes

As cepas bacterianas que expressaram as proteínas recombinantes foram centrifugadas (8000 rpm por 15 minutos) e o sedimento ressuspendidos em tampão

de lise contendo Tris-HCl 50 mmol L^{-1} (pH 8,0), KCl 100 mmol L^{-1} e EDTA 5 mmol L^{-1} (15 mL/L de cultura). As células foram lisadas em 2 etapas: (1) etapa química com adição de lisozima na concentração de 30 µg/µL para digestão da parede bacteriana e 5 unidade de DNAse para degradação de possíveis DNA presente no meio que atrapalha no processo de purificação seguida de banho de gelo por 20 minutos; (2) etapa física onde a amostra é lisada com auxilio de um sonicador modelo Sonifier 250 da marca Branson em banho de gelo com tempo suficiente para obter o maior número de células lisadas e uma maior concentração de proteínas na fração solúvel. Em seguida a amostra foi centrifugada a 18000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Ambas as frações, sobrenadante e precipitado, foram analisadas por SDS-PAGE a 12 % para averiguação da solubilidade das proteínas recombinantes. A solubilidade das proteínas determinou o protocolo de purificação que foi adotado em cada caso.

3.18 – Reenovelamento de proteínas

Os corpos de inclusão foram dispersos em tampão de lise (sem adição de lisozima) com auxilio de um sonicador (1 pulso de 12 segundos) e centrifugado a 18000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Esta operação foi repetida 3 vezes sempre adicionando 25 mL de tampão por litro de cultura. Após cada lavagem coletou-se alíquotas de 50 µL para posterior análise por SDS-PAGE a 12 %. Por último os corpos de inclusão foram ressuspendidos em tampão de solubilização (Tris-HCl 100 mM em pH 8,0 e Guanidina-HCl 6 M) com auxilio de um agitador magnético a temperatura ambiente durante 90 minutos e centrifugado a 15000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Em seguida o sobrenadante foi dialisado lentamente contra um volume de tampão (fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} e cloreto de sódio a 100 mmol L^{-1} em pH 7,2) que corresponde a 4 vezes o volume da amostra durante uma hora sob agitação lenta e a 4 °C. Após esse período o volume do tampão foi aumentado para oito vezes do volume da amostra e mantido por 2 horas. Após esse tempo a amostra foi dializada durante aproximadamente 16 horas contra um volume novo do mesmo tampão equivalente a dez vezes o volume da amostra. No dia seguinte a amostra foi centrifugada para remoção da parte insolúvel. O sobrenadante e o precipitado foram analisado por SDS-PAGE para averiguação do reenovelamento.

3.19 – Purificação das proteínas recombinantes

A proteína recombinante *LbAha1* foi purificada conforme protocolo estabelecido por (SILVA, 2010).

3.19.1 – Cromatografia de troca aniônica

A cromatografia de troca aniônica foi a primeira etapa no processo de purificação da proteína recombinante. Para isso foi utilizado uma coluna XK-16/20 (GE Healthcare) empacotada com a resina *Macro-prep(R) High Q Support resin (*BioRad) acoplada ao sistema *ÄKTA Prime Plus device* (GE Healthcare). Nesse processo foram utilizados dois tampões, o tampão A (10 mmol L^{-1} de Tris-HCl e 20 mmol L^{-1} de NaCl em pH 8,0) e o tampão B de eluição (10 mM deTris-HCl e 500 mmol L^{-1} de NaCl em pH 8,0). O gradiente realizado foi de 100 mL e alvo de 100 % do tampão B. A eluição foi realizada em um fluxo médio de 5 mL/minutos e as frações coletadas foram de 6 mL. Após identificação dos tubos com a proteína *LbAha1* e verificação da pureza por SDS-PAGE 12 %, os frascos foram misturados.

3.19.2 – Cromatografia de afinidade

As amostras recolhidas da cromatografia de troca iônica contento da *LbAha1* foram dialisadas 16 horas contra o tampão fosfato de sódio 10 mmol L^{-1} em pH 7,4 e submetidos a uma nova etapa de purificação por cromatografia de afinidade ao Ca^{2+}. Uma coluna XK16/20 (GE Healthcare) foi empacotada com resina *CHT™ Ceramic Hydroxyapatite Type II resin* (BioRad) acoplada ao *ÄKTA Prime Plus device* (GE Healthcare) foi utilizada nesse processo. Após a etapa de adsorção da amostra na resina foi realizado a eluição com um gradiente de 100 mL com alvo de 100 % do tampão B (fosfato de sódio 500 mmol L^{-1} em pH 7,4). A eluição foi realizada em um fluxo de 5 mL/minuto com coleta de 5 mL por fração. Identificado os tubos com a proteína de interesse e verificado sua pureza por eletroforese em SDS-PAGE, os frascos foram misturados e submetidos a uma etapa adicional de purificação para eliminação de contaminantes e possíveis agregados presentes na amostra.

3.19.3 – Cromatografia de exclusão molecular

A última etapa no processo de purificação da proteína recombinante foi através da cromatografia de exclusão molecular (CEM) onde foi usado a coluna *HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade* (GE Heathcare) acoplada ao equipamento AKTA Purifier (GE Heathcare). A coluna foi lavada com 1 volume de coluna de água milli-Q previamente degaseificada e equilibrada com 1 volume de coluna do tampão Tris-HCl 25 mmol L^{-1} (pH 7.5) contendo NaCl 100 mmol L^{-1} previamente filtrado em filtro Millipore 0,45 µmol L^{-1} e degaseificado. Foi aplicado um volume de amostra de 5 % do volume da coluna e o fluxo de trabalho foi de 1 mL/minuto com coleta de 5 mL por fração. O volume do pico correspondente a *LbAha1* foi concentrado para 1,5 mg/mL e mantido a 4 °C.

3.20 – Processo de concentração de proteínas

Para obter a proteína na concentração desejada esta foi centrifugada a 4000 rpm durante um tempo necessário à temperatura de 4 °C. Nesse processo foi utilizado o concentrador *Amicon Ultra–15* com faixa de corte de 10000 Da (Millipore) previamente lavado em água, álcool e no tampão da respectiva proteína.

3.21 – Determinação da concentração de proteínas

Para determinar a concentração da proteína de interesse, utilizou-se técnicas espectroscópicas onde se desenovela a proteína em presença de fosfato de sódio 20 mmol L^{-1} (pH 6,5) e clorohidrato de guanidina 6 mol L^{-1} como descrito por Edelhock (1967). Em seguida calcula-se os coeficientes de absortividade molar (ε) nos comprimentos de onda de 282, 280, 279 e 278 nm de acordo com a Equação 1:

$$\varepsilon(\lambda) = n_{Trp}.\varepsilon_{Trp} + n_{Tyr}.\varepsilon_{Tyr} + n_{Cys}.\varepsilon_{Cys} \qquad \text{Equação 1}$$

Onde, ε(λ) é o coeficiente de absortividade molar (mol/L cm^{-1}) da proteína de interesse em um determinado λ; n_{Trp} número de triptofanos da proteína; n_{Tyr} - número de tirosinas e n_{Cys} é o número de cisteínas. ε_{Trp}, ε_{Tyr} e ε_{Cys} são os coeficientes de absortividade molar do triptofano, da tirosina e da cisteína, respectivamente. Os valores dos ε destes aminoácidos variam de acordo com o λ e

foram calculados pelo programa Sednterp (http://jphilo.mailway.com/download.htm). O coeficiente de absortividade molar, em 280 nm, para as proteínas na sua forma nativa, foi obtido a partir da sequência de aminoácidos da proteína utilizando o programa ProtParam Tool (ca.expasy.org/tools/protparam.html) de acordo com (PACE *et al*. 1995).

As proteínas purificadas foram diluídas 5 vezes em um volume final de 200 µL no tampão de desnaturação (fosfato de sódio 20 mmol L^{-1} e clorohidrato de guanidina 6 mol L^{-1} em pH 6,5) e então coletados os espectros de absorção entre os λ de 250-300 nm após 15 minutos de incubação. Após subtração do branco, as leituras nos λ descrito acima foram utilizadas para estimar a concentração da proteína pela equação de Beer-Lambert:

$$Abs = \varepsilon.l.c \qquad \text{Equação 2}$$

Onde *Abs* é a absorbância; *l*, comprimento do caminho ótico em centímetros e *C*, concentração em mol L^{-1}. A concentração molar determinada correspondeu à média das concentrações encontradas para cada λ entre 276 e 282 nm e multiplicado pelo fator de diluição. As leituras de absorbância, para cada λ relacionado, foram realizadas em triplicada.

3.22 – Espectros de dicroísmo circular

Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados com o objetivo monitorar a desnaturação química da proteína *LbAha1* na presença de uréia em concentrações crescentes. Os ensaios foram realizados com a proteína em concentração constante de 250 µg/mL em tampão fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} (pH 7,0) contendo 1 mmol L^{-1} de β-mercaptoetanol e NaCl à 25 mmol L^{-1} em cubeta de quartzo com passo ótico de 1 mm. Os espectros foram coletados no laboratório de biofísica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) em um espectropolarímetro JASCO J-720 acoplado a um controlador de temperatura "*peltier*" que permite controlar a temperatura da amostra. Os dados foram obtidos com 200 µL da amostra em duplicatas a 20 °C e a 220 nm com 6 cumulativas em tempo de 12 segundos após 2 horas de incubação com o agente desnaturante. Os programas utilizados para registro e tratamento dos dados foram Spectra Manager (JASCO 32) e o

Origin® 8.0, respectivamente. Os espectros de CD foram normalizados em elipticidade molar residual (EMR ou [θ]) pela aplicação da Equação 3.

$$EMR = \frac{(\theta).MM}{(c_g.l.n)}$$

Equação 3

Onde θ é a elipticidade (em mDeg), *MM* é a massa molecular (em g/mol), *C* é a concentração da proteína (mg/mL), *l* é o comprimento do caminho ótico (cm) e *n* o número de resíduos de aminoácidos da proteína. Os dados de *EMR* foram representados em relação ao λ (nm) e em relação ao centro de massa espectral em função da concentração do agente desnaturante.

3.23 – Emissão de fluorescência

3.23.1 – Ensaios de Desnaturação química analisado por fluorescência

Os ensaios de desnaturação química analisado por fluorescência foram realizados em um fluorímetro *F4500 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer* do laboratório de Biofísica Molecular coordenado pelo prof. Dr. Marcel Tabak (IQSC-USP). Os testes foram feitos com 200 µL da proteína (em tampão fosfato de sódio a 25 mmol L^{-1}, contendo 1 mmol L^{-1} de β- mercaptoetanol e NaCl à 25 mmol L^{-1} em pH 8,0 ver acima) na concentração de 2 µmol L^{-1} e temperatura de 20 °C em cubeta de quartzo de 1cm x 1cm de passo ótico na presença de uréia em diferentes concentrações. A uréia foi preparada no mesmo dia do experimento (no tampão da proteína) e sua concentração foi determinada por refratometria (método de PACE). Os espectros de fluorescência foram obtidos dentro do intervalo de 300 a 420 nm utilizando o comprimento de onda (λ) de excitação de 280 nm com fenda de excitação e emissão de 5 nm. Os dados foram coletados em duplicatas e o tratamento realizado com auxilio do software Oringin® 8.0. O espectro de emissão de fluorescência do tampão foi subtraído do espectro de emissão de fluorescência da proteína. Os dados foram analisados pelo perfil do espectro de emissão obtido em função da intensidade de fluorescência pela aplicação da integral da área espectral na faixa de 320 a 380 nm (calculado pelo programa Origin® 8.0) e pelo cálculo do centro de massa espectral (<λ>) considerando a Equação 4.

$$<\lambda>=\sum \lambda_i F_i / \sum F_i$$ Equação 4

Onde λ_i corresponde aos comprimentos de onda utilizados para a aquisição do espectro de fluorescência, Fi é a intensidade de fluorescência em λ_i e ΣF_i é a somatória de F_i. O espectro de emissão de fluorescência da proteína alvo também foi analisado pela interpretação por duas curvas Gaussianas (Origin® 8.0) para estimar o máximo de emissão de fluorescência para cada resíduo de triptofano.

3.24 – Análise de Reversibilidade Química

Os ensaios de reversibilidade da *LbAha1* foi realizado pela técnica de fluorescência, onde a proteína à 2 µ mol L^{-1} em tampão fosfato de sódio a 25 mmol L^{-1} (pH 7), contendo 1 mmol L^{-1} de β-mercaptoetanol e NaCl à 25 mmol L^{-1} foi submetida a concentração de 1 M e 6 mol L^{-1} de uréia por um período de 2 horas. Em seguida coletou-se os espectros da proteína nativa e das amostras presentes nas 2 concentrações do desnaturante. Por fim a amostra submetida a 6 mol L^{-1} de uréia foi diluída no tampão da proteína para 1 mol L^{-1} de uréia e seu espectro coletado novamente. Os dados foram analisados pelo programa Origin® 8.0.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse capítulo tem como objetivo apresentar os resultados referentes aos experimentos realizados com todas as proteínas que compõe este trabalho. Na primeira parte são apresentados os resultados de amplificação de DNA, clonagem, subclonagem e expressão das proteínas *LbHsp40I* e *LbHsp40II.* Na seção seguinte deste capítulo e para complementação deste trabalho apresenta-se os resultados da proteína *LbAha1*. Na parte referente a esta proteína são mostrados os resultados de expressão, purificação e caracterização por técnicas biofísicas tais como dicroísmo circular e fluorescência.

4.1 – Pesquisa em bancos de dados para obtenção das seqüências das *LbHsp40* tipo *I* e tipo *II*

As seqüências de aminoácidos das proteínas *Hsp40* tipo *I* (NP_014335.1) e tipo *II* (NP_014391.1) da levedura *Sacchamomyces cerevisiae* foram utilizadas como modelo para buscar, por identidade e similaridade em bancos de dados do GenBank, as sequências de aminoácidos das proteínas Lb*Hsp40I* (XP_001565604.1) e Lb*Hsp40II* (001569271.1). Alinhamento realizado pelo programa t*BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool*) entre as sequências dos aminoácidos das proteínas *Hsp40* de levedura com as sequências de aminoácidos das *Hsp40* de *L. braziliensis* revelou identidade de 32% e 39% e similaridade de 53% e 54% entre as do tipo *I* e as do tipo *II* respectivamente conforme mostrado nas Figuras 7 e 8. E a comparação entre a *LbHsp40I* e a *LbHsp40II* mostrou 28% identidade e 51% de similaridade. Estas informações mostram que as *Hsp40* de parasitas são pouco conservadas evolutivamente entre si e também em relação às proteínas modelo.

```
Np_014335.1|_Pr ------------------------------------------------MVKETKFYDILG 12
XP_001565604.1  MLGPRTTRVVVALLVLAWVVTLLAEVPLVAADAADPRDEDVKAVNALLQLPEDDFYALLG 60
                                                                 : *. ** :**
Np_014335.1|_Pr VPVT---ATDVEIKKAYRKCALKYHPDKNPSEE--AAEKFKEASAAYEILSDPEKRDIYD 67
XP_001565604.1  LGEAREDSTERDIKNAFRRLSKKYHPDVATGDQDSYRLVYQRVQRAYGVLGDRRKRKVYD 120
                :  :   :*: :**:*:*: : *****  ..::      ::... ** :*.* .**.:**
Np_014335.1|_Pr QFGEDGLSGAGGAGGFPGGGFGFGDDIFSQFFGAGGAQRPRGPQRGKDIKHEISASLEEL 127
XP_001565604.1  ILGVDGVAKMEKPQ---------QEQHVNPFFAFFGVGQDTNGERGKDMELLMVVPLEDI 171
                 :* **::    .            :: .. **.  *. :   . :****::  : ..**::
Np_014335.1|_Pr YKGRTAKLALNKQILCKECEGRGGK-KGAVKKCTSCNGQGIKFVTRQMGP-MIQRFQTEC 185
XP_001565604.1  YRGAAHTSRFAKRRICRACKGTGARSAEDVVKCPHCQGHGRLVQRVQIAPGFVQQVEQAC 231
                *:* : .  : *: :*: *:* *.:    * **. *:*:*  .   *:.* ::*:.:  *
Np_014335.1|_Pr DVCHGTGDIIDPKDRCKSCNGKKVENERKILEVHVEPGMKDGQRIVFKGEADQAPDVIPG 245
XP_001565604.1  PHCQGKGTHVAY--MCPVCGGKMVRPGEAVLSVDIEEGLPEGHVLTYELEADQTPGQVPG 289
                  *:*.*  :     *  *.** *.  . :*.*.:* *: :*: :.:: ****:*. :**
Np_014335.1|_Pr DVVFIVSERPHKSFKRDGDDLVYEAEIDLLTAIAGGEFALEHVSGDWLKVGIVPGEVIAP 305
XP_001565604.1  DVLVTVVSAPHPLFRRSGNDLYANVSITLKEALLGFEKTLAHLDG--HEVELHWDGVIQN 347
                **:.  * . **  *:*.*:**  :..* *  *: * * :* *:.*   :* :  .**
Np_014335.1|_Pr GMRKVIEGKGMPIPKYGG-YGNLIIKFTIKFPENHFTSEENLKKLEEILPPRIVPAIPKK 364
XP_001565604.1  TQQVRITGEGMPRHHVPSERGDLYITYNVVLPS-ELTAEQRAFFQEHFA----------- 395
                  :  * *:***  :  .  *:* *.:.: :*. .:*:*:.    *.:
Np_014335.1|_Pr ATVDECVLADFDPAKYNRTRASRGGANYDSDEEEQGGEGVQCASQ 409
XP_001565604.1  ---------------------------------------------
```

FIGURA 6: Alinhamento das sequências de aminoácidos da *Hsp40* Ydj1 de levedura Np_014335.1 com a sequência de aminoácido de *Hsp40* do tipo *I* de *L. braziliensis*, XP_001566014.1. Os aminoácidos em vermelhos corresponde o Domínio J, em azul a região rica em resíduos cisteína e em verde o Domínio C_terminal. A *LbHsp40I* possui 395 aminoácidos sendo 2 Triptofano, 12 tirosina e 8 fenilalanina com peso molecular de 43820 Da. Os asteriscos representam aminoácidos idênticos na proteína modelo e na proteína parasitária, os dois pontos são os aminoácidos pertencentes à mesma classe e o ponto se refere a aminoácidos de classes diferentes.

```
Np_014335.1     MVKETKLYDLLGVSPSANEQELKKGYRKAALKYHPDKPTGDTE----KFKEISEAFEILN 56
Xp_001565604.1  --MGVDYYKVLGVSRNAKPNEIKKAYHQLALKYHPDKNTDNREKAERKFKEVSEAYDVLS 58
                    .. *.:**** .*: :*:**.*:: ******** *.: *    ****:***:::*.
Np_014335.1     DPQKREIYDQYGLEAARSGGPSFGPGGPGGAGG-AGGFPGGAGGFSGGHAFSNEDAFNIF 115
Xp_001565604.1  DEKKKKIYDLYGEEGLKGGVPEDGGAGMGGAGMPTGGMPGGFHGTT--YHFSSTDAFKIF 116
                * :*::*** ** *. :.* *. * .* ****  :**:***  * :  : **. ***:**
Np_014335.1     SQFFGGSSPFGGADDSGFSFSSYPSGGGAGMGGMPGGMGGMHGGMGGMPGGFRSASSSPT 175
Xp_001565604.1  NQFFGSSDPFAGGEAFG--------GGGPGLHRVFRGYGGPEG----FTTGFGTPQASPT 164
                .****.*.**.*.:  *        ***.*:  :  * ** .*    :. ** :..:***
Np_014335.1     YPEEETVQVNLPVSLEDLFVGKKKSFKIGRKGPHGASEKTQIDIQLKPGWKAGTKITYKN 235
Xp_001565604.1  C-DVPPMEYTFACTLEEIYTGCTKKFSVSRNMPSGA-EKKMFEVKVLPGYKKGTKIRFER 222
                  :  .:: .:. :**:::.* .*.*.:.*: * ** **. ::::: **:* **** ::.
Np_014335.1     QGDYNP--QTGRRKTLQFVIQEKSHPNFKRDGDDLIYTLPLSFKESLLGFSKTIQTIDGR 293
Xp_001565604.1  EGGRVEGYPPNVLADMVFILDERPHPRFERRNADLHTTLHINLKQALLGSTVFVKGIDGQ 282
                :*.      ..    : *:::*:.**.*:* . **  ** :.:*::*** :  :: ***:
Np_014335.1     TLPLSRVQPVQPSQTSTYPGQGMPTPKNPSQRGNLIVKYKVDYPISLNDAQKRAIDEN-F 352
Xp_001565604.1  TISLPLNGVSKSGRKLRVSGSGLPDRK-TNRKGDLYVTIAVDFPDVLTEDTKRLIEQCKF 341
                *:.*.     :..:.   .*.*:*  * ..::*:* *.  **:*  *.:  ** *::  *
```

FIGURA 7: Alinhamento das sequências de aminoácidos da *Hsp40* Sis1 de levedura Np_014335.1 com a sequência de aminoácido de *Hsp40* do tipo *II* de *L. braziliensis*, XP_001569271.1. Os aminoácidos em vermelho correspondem ao domínio J e em verde o Domínio C-terminal. A *LbHsp40II* tem 341 aminoácidos sendo14 tirosina e 4 fenilalanina e peso molecular de 37423 kDa. Os asteriscos representam aminoácidos idênticos na proteína modelo e na proteína parasitária, os dois pontos são os aminoácidos pertencentes à mesma classe e o ponto se refere a aminoácidos de classes diferentes.

4.2 – Amplificação e determinação da concentração de DNA das *LbHsp40I* e *LbHsp40II*

As seqüências de DNA correspondentes as proteínas *LbHsp40I* e *LbHsp40II* foram amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase e visualizado num transluminador após eletroforese em gel de agarose onde apresentou uma banda correspondente ao tamanho esperado de 1185 pares de base conforme Figura 8:

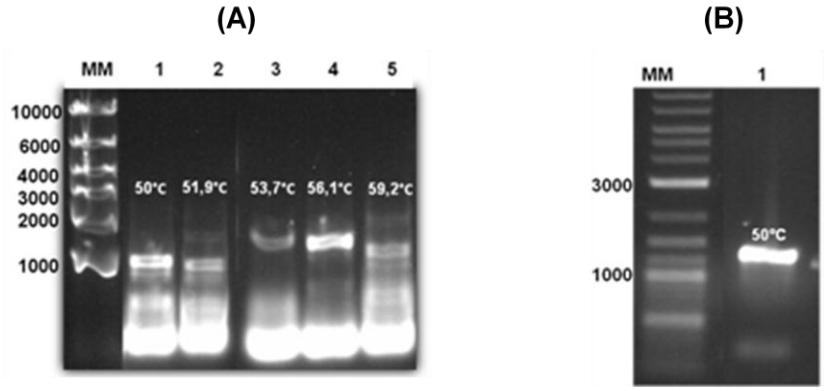

FIGURA 8: Amplificação dos DNAs de interesse por PCR. (A): 1-5 amplificação do DNA correspondente a *LbHsp40I* (1185 pb) em diferentes temperaturas. **(B):** 1- amplificação da *LbHsp40II* (1025pb). MM-Padrão de peso molecular. Gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

A amplificação da *LbHsp40I* foi feita em um gradiente de temperatura onde constatou-se amplificação positiva em diferentes temperaturas, sendo mais especifica em 50°C e 56,1°C como se pode observar na figura 9-A. Para *LbHsp40II*, após realizar gradiente de temperatura, constatou-se que a melhor temperatura de amplificação foi de 50°C, figura 9-B.

As bandas das caneletas de 1 a 5 da figura 9-A, (*LbHsp40I*) foram cortadas e purificadas como descrito em materiais e métodos. O mesmo foi feito para a caneleta 1 da figura 9- B correspondente a *LbHsp40II*. A quantificação foi feita comparando-se as bandas das respectivas amostras com o padrão conforme item 2.5 onde se concluiu que a concentração foi de aproximadamente 20 ng/µL e 10 ng/µL respectivamente para as *LbHsp40I* e *LbHsp40II*, conforme se pode inferir na Figura 9.

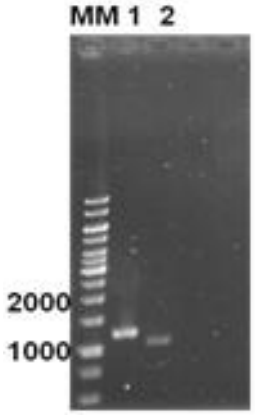

FIGURA 9: Quantificação de DNA por comparação. MM – padrão de peso molecular; 1 - DNA *LbHsp40I* ; 2 - DNA *LbHsp40II*. Gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

4.3 – Subclonagem em vetor de expressão e análise de restrição

Após a quantificação do DNA correspondentes as proteínas de interesse estes foram clonados no vetor de propagação, *pGEM-T* (Promega), onde foi observado o crescimento de colônias em meio seletivo (resistência a ampicilina) e sem coloração azul (sem clivagem do X-gal presente na placa). Das colônias crescidas, duas eram referentes ao recombinante *pGEM-T::LbHsp40I* e uma referente ao clone *pGEM-T:: LbHsp40II*. Estes clones foram crescidos *overnight* em meio LB liquido e depois centrifugado. Descartado o sobrenadante, o sedimento foi purificado com auxilio do kit *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega) e depois submetido à presença das enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*, durante 4 horas e 2 horas respectivamente,para liberação dos respectivos fragmentos codificantes, (dados não mostrados). Purificados, os fragmentos foram subclonados no vetor de expressão *pET23a*, previamente clivado com as mesmas enzimas de restrição.

A subclonagem no vetor de expressão foi confirmada por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos específicos e por análise de restrição com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*. A amplificação e a liberação das bandas de aproximadamente 1200 pb e 1020 pb (*Hpsp40I* e *Hsp40II,* respectivamente) sugerem o sucesso da clonagem conforme se vê nas Figuras 10.

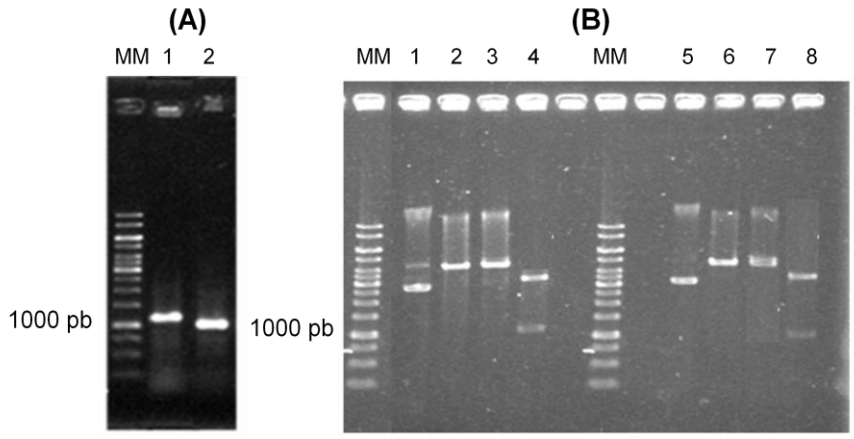

FIGURA 10: PCR e análise de restrição dos recombinantes *pET23::LbHsp40I* e *pET23::LbHsp40II* com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*. (A) – PCR dos clones. MM – Padrao de peso molecular; 1 - PCR do clone *pET23::LbHsp40I* e 2 - PCR do clone *pET23::LbHsp40II*. Reação realizada a 50 °C. **(B) Análise de restrição.** MM – Padrao de peso molecular; 1 - *pET23::LbHsp40I*; 2 - *pET23::LbHsp40I* + *NdeI*; 3 - *pET23::LbHsp40I* + *EcoR;* 4 - *pET23::LbHsp40I* + *NdeI-EcoRI;* 5 - padrão de massa molecular; 6 - *pET23::LbHsp40II*'; 7 - *pET23::LbHsp40II* + *NdeI* e 8 - *pET23::LbHsp40II* + *EcoRI* e *pET23::LbHsp40II* + *NdeI-EcoRI*.

Baseado nos resultados de PCR e análise de restrição dos recombinantes de expressão partiu-se para a etapa seguinte que foi a expressão das proteínas de interesse. Cabe salientar contudo, que outras tentativas de subclonagem foram feitas no vetor de expressão *pET28a*, todavia sem sucesso uma vez que não se obteve o crescimento de colônias recombinantes.

4.4 – Expressão das proteínas de interesse

A expressão das proteínas de interesse, *LbHsp40I* e *LbHsp40II*, foram testadas em diferentes linhagens de *E. coli* e com diferentes características de indução. Não existe, portanto, um protocolo específico para a expressão de proteínas recombinantes o que torna necessário buscar as melhores condições para cada proteína. Neste sentido, diferentes cepas, temperatura e tempo de indução foram testados. Abaixo estão apresentados os resultados mais representativos.

4.5 – Expressão da proteína *LbHsp40I*

4.5.1 – Expressão da *LbHsp40I* em linhagem de *E. coli BL21(DE3)*

O plasmídeo recombinante *pET23a::LbHsp40I* quando submetido à presença das enzimas que flanqueiam o inserto, liberou um fragmento de aproximadamente 1200 pb confirmando o sucesso da clonagem e portanto a aptidão do clone para

expressar a proteína alvo. Assim, teste de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40I* na cepa *BL21(DE3)* foi realizado, e após 5 horas de indução na presença de 0,2 mmol L^{-1} de IPTG a 20 °C, não se observou quantidade expressiva da proteína recombinante, de peso 43820 Da, quando comparada com a bactéria não induzida, conforme se pode observar na Figura 11.

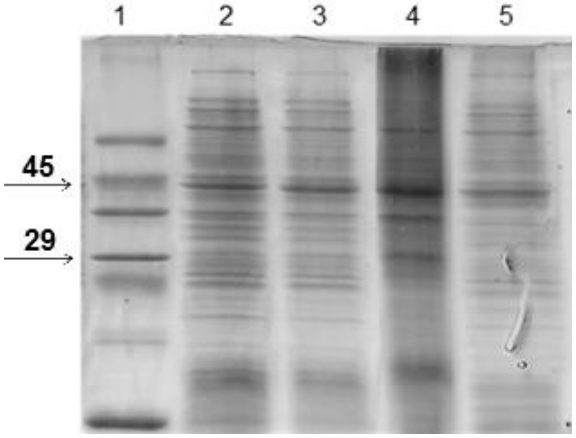

FIGURA 11: teste de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40I* em *E. coli BL21(DE3)*. 1 – padrão de peso molecular em kDa, 2 – não induzido, 3 – induzido 4 – sedimento de proteína e 5 – sobrenadante.

O baixo nível de expressão de uma proteína recombinante numa cepa bacteriana pode ser ocasionado por diversos fatores. Os problemas que mais contribuem para o baixo nível de expressão da proteína de interesse é a perda do plasmídeo durante o crescimento da bactéria, instabilidade ou toxidade da proteína recombinante para o vetor. Outro fator que pode contribuir para o baixo nível de expressão é a ausência nas bactérias de uma proteção para o RNAm o que faz com que este seja rapidamente degradado durante o processo de transcrição e tradução. Quanto a estabilidade do RNAm, isso esta intimamente relacionado ao seu tamanho, assim sendo, quanto maior o tamanho maior será a sua estabilidade e portanto maior será a quantidade de molde para a tradução da proteína de interesse. (DABROWSKI, BRILLOWSKA; KUR 1999).

4.5.2 – Expressão da *LbHsp40I* em linhagem de *E. coli* BL21(DE3) pLysS

No teste de expressão e solubilidade realizado com a cepa *E. coli BL21(DE3)pLysS* não foi observado quantidade expressiva da proteína recombinante, todavia foi observado uma coloração azul intensa da proteína no gel

de poliacrilaminda na caneleta correspondente ao precipitado, dando um indicativo de que quando expressa, a mesma pode ir para corpos de inclusão, Figura 12. No experimento de indução, a célula foi submetida a temperatura de 25 °C na presença de 0,2mmol L^{-1} de IPTG durante um tempo de 5 horas.

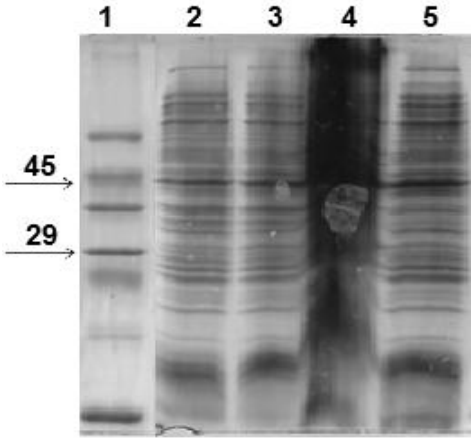

FIGURA 12: teste de indução e solubilidade da proteína *LbHsp40I* em *E. coli BL21(DE3)pLysS*. 1 – não induzido, 2 – induzido, 3 – sedimento de proteína ,4 – sobrenadante e 5 – padrão de peso molecular em kDa.

4.5.3 – Expressão da *LbHsp40I* em linhagem de *E. coli BL21(DE3) Codon Plus RP* e testes de reenovelamento

Após algumas tentativas de expressão não muito bem sucedidas nas bactérias acima apresentadas, utilizou-se cepa *BL21(DE3) Códon Plus RP.* Nesta cepa, o teste foi realizado a 30 °C durante 4 horas na presença de 0,2 mmol L^{-1} de IPTG. O resultado, ainda que não tão expressivo, foi a obtenção da proteína de interesse.

Após confirmação da expressão, submeteu-se as células bacterianas ao processo de lise. Assim, após adição de lisozima e sonicação, para rompimento da parede bacteriana e posterior centrifugação, as frações solúvel e insolúvel foram analisadas por SDS-PAGE como descrito no item 3.16 em material e métodos. O resultado indicou a presença da proteína no precipitado, indicando que a mesma estava sendo expressa, porém na forma insolúvel, como mostra a Figura 13.

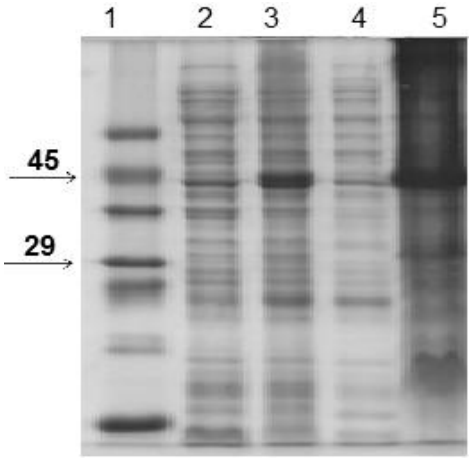

FIGURA 13: teste de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40I* em *E. coli BL21(DE3) Codon Plus RP.* 1 – padrão de peso molecular em kDa, 2 – não induzido, 3 – induzido, 4 – sobrenadante e 5 – sedimento de proteína

A expressão de proteínas em corpos de inclusão (agregados protéicos insolúveis) pode não ser tão desvantajosa a primeira vista como parece. Primeiro porque o produto expresso é menos tóxico para a bactéria e depois porque a proteína obtida desta forma está em sua maior parte protegida da digestão proteolítica o que poderia até facilitar no processo de purificação já que os agregados protéicos insolúveis são facilmente isolados por centrifugação e em geral são formados por agregados parcialmente puros da proteína superexpressa (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Contudo, o lado negativo desse aspecto é que nem sempre é possível conseguir o reenovelamento da proteína nativa a partir dos corpos de inclusão.

Diante desse resultado e com intuito de melhorar a eficiência no nível de expressão e encaminhar o máximo possível de proteínas para corpos de inclusão para depois tentar o reenovelamento, mesmo sabendo que nem sempre isso é possível, um novo protocolo de indução foi testado para esta mesma cepa. Assim sendo, ela foi submetida à temperatura de 37 °C durante 5 horas na presença de 0,2 mmol L^{-1} de IPTG. O resultado foi um aumento expressivo na quantidade de proteínas produzidas, todavia, como esperado, presente principalmente em forma de agregados insolúveis como se pode observar na Figura 14.

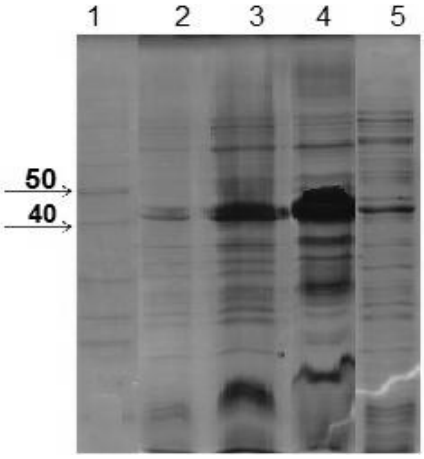

FIGURA 14: expressão da proteína *LbHsp40I* em *E. coli BL21(DE3) Códon Plus RP.*1 – padrão de peso molecular em kDa, 2 – não induzido, 3 – induzido, 4 – sedimento de proteína e 6 – sobrenadante.

Com o objetivo de contornar o problema da insolubilidade partiu-se para o processo de reenovelamento. Assim sendo, após o rompimento das células por sonicação e lisozima, descartou-se a fração solúvel enquanto a fração insolúvel, com a proteína, foi ressuspensa em tampão Tris-HCl e submetida a 3 processos lavagem em tampão Tris-HCl 50 mmol L^{-1} (pH 8,0), KCl 100 mmol L^{-1} e EDTA 5 mmol L^{-1} sem adição de lisozima, como descrito no item 3.18 em materiais e métodos para a eliminação de grande parte de proteínas que não são de interesse. Ao final desse processo ressuspendeu-se a fração celular insolúvel em tampão Tris-HCl 100 mmol L^{-1} (pH 8,0) contendo agente desnaturante guanidina 6 mol L^{-1} para a solubilização das proteínas de interesse. Sendo a guanidina um composto desnaturante, ela atua no sentido de desestabilizar a estrutura protéica, provocando o desenovelamento do precipitado. Assim, após a ressuspensão do precipitado protéico fez-se a retirada desse composto por diálise para posterior processo de enovelamento e reconstituição da estrutura protéica. O método de enovelamento foi o da diálise gradual onde solução protéica foi colocada em membrana de diálise e mantida sob baixa temperatura em tampão contendo fosfato de sódio a 50 mmol L^{-1} e cloreto de sódio a 100 mmol L^{-1} em pH 7,2 como descrito em materiais e métodos.

O resultado, após várias tentativas de reenovelamento e alterações no protocolo tais como mudanças no volume do tampão de lavagem (de 25 mL/L de cultura para 15 mL), no tempo de diálise e no próprio tampão de lavagem (de Tris-HCl 50 mmol L^{-1}, KCl 100 mmol L^{-1} e EDTA 5 mmol L^{-1} para $NaPO_4$ 20 mmol L^{-1}, NaCl 20 mmol L^{-1} e β-mercaptoetanol a 1 mmol L^{-1}) foi a permanência da proteína no precipitado e portanto na forma insolúvel, Figura 15.

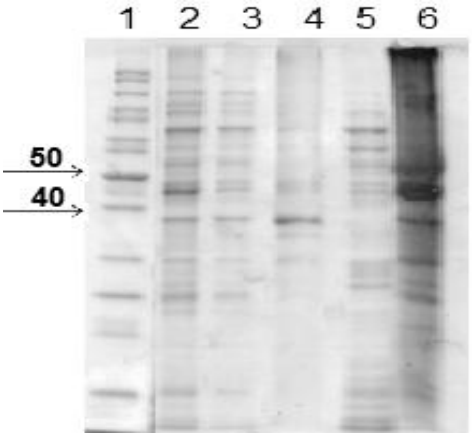

FIGURA 15: Ensaio de reenovelamento da proteína *LbHsp40I*: 1 – Padrão de peso molecular em kDa, 2 - primeira lavagem, 3 – segunda lavagem, 4 – terceira lavagem, 5 – sobrenadante e 6 – precipitado das lavagens mostrando a permanência da proteína em corpúsculos de inclusão.

Os vários testes de expressão e diferentes alterações no protocolo de reenovelamento não foram suficientes para obtenção da proteína na sua forma solúvel, o que levantou a possibilidade de haver mutações na seqüência codificante. Para dirimir essa dúvida foi feito o sequenciamento do vetor recombinante de expressão *pET23a::LbHsp40I onde* foi observado que em relação ao oligonucleotídeo T7 promoter, oligonucleotídeo do vetor, a junção inserto-vetor estava correta e em fase de leitura, entretanto no lado correspondente ao T7 terminator, apesar de estar em fase de leitura, foi observado que na posição 769 da seqüência original tem um G enquanto na amostra seqüenciada tem um A, (dados não mostrado). Essa mutação causa a troca do aminoácido GLUTAMATO, aminoácido ácido envolvidos nas ligações de metais e pontes salinas, pela LISINA, aminoácido básico, flexível e que pode formar pontes salinas.

O sequenciamento só foi realizado após os vários testes de expressão e reenovelamento porque o laboratório onde foi desenvolvido este trabalho não dispõe de um sequenciador de DNA e o equipamento do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), colaborador do grupo, estava em manutenção e, portanto fora de operação quando o clone de expressão foi obtido. Entretanto, cabe ressaltar mais uma vez que os testes de expressão e solubilidade só foram realizados após análise do recombinante por PCR de colônia e clivagem que mostrou a disposição do clone para expressar a proteína alvo.

Diante das várias possibilidades de causas da insolubilidade da proteína *LbHsp40I (*comentado melhor na seção 3.13) tem-se ainda essa mutação que pode ser uma das causas do não reenovelamento da proteína de interesse.

4.6 – Expressão da proteína *LbHsp40II*

4.6.1 – Expressão da *LbHsp40II* em linhagem de *E. coli BL21(DE3)*

Para dar inicio aos testes de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40II*, fez-se uso de todos os meios disponíveis no Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica (BMB) para certificar-se de que a ligação inseto-vetor foi de fato bem sucedida. Após realizar PCR de colônia e analise de restrição que confirmaram a princípio o sucesso dessa etapa foi que se partiu concretamente para os testes de indução da proteína.

O primeiro teste de expressão da proteína recombinante *LbHsp40II* foi realizado na bactéria *E. coli BL21 (DE3)* a 25 °C durante 4 horas em 0,2 mmol L^{-1} de IPTG a 200 rpm. O resultado dessa expressão não foi satisfatório e conseqüentemente não foi detectada nenhuma banda de indução em SDS-PAGE correspondente a proteína de interesse conforme se pode observar na Figura 16.

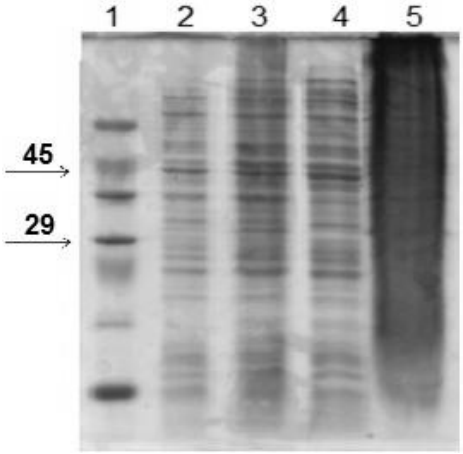

FIGURA 16: Análise de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40II* em *E. coli BL21(DE3).* 1 – padrão de peso molecular em kDa, 2 – não induzido, 3 – induzido, 4 – sobrenadante e 5 – sedimento de proteína.

4.6.2 – Expressão da *LbHsp40II* em linhagem de *E. coli BL21(DE3) pLysS*

A análise de expressão da proteína de interesse na cepa *BL21(DE3) pLysS*, mostrou um baixo nível de expressão quando comparada a parte não induzido

conforme Figura 17. Teste de solubilidade feito com o sobrenadante e com o precipitado celular indicou que a proteína foi principalmente para corpos de inclusão assim como a recombinante *LbHsp40I.*

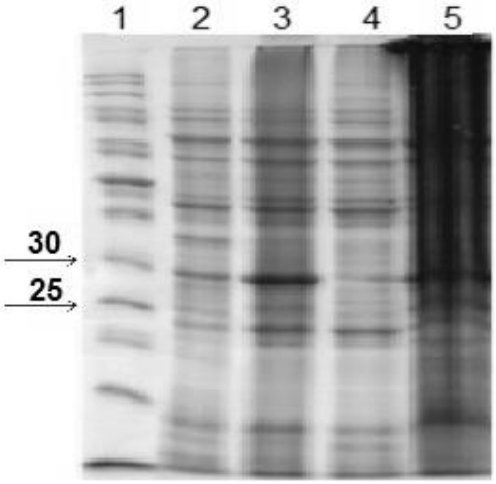

FIGURA 17: Análise de expressão e solubilidade da proteína *LbHsp40II* em *E. coli BL21(DE3) pLysS.* 1 – padrão de peso molecular em kDa, 2 – não induzido, 3 – induzido, 4 – sobrenadante e 5 – sedimento de proteína.

Outro fato interessante observado no gel foi que a proteína apresentou um perfil de migração em torno de 29 kDa quando o esperado seria 37423 Da. A princípio acreditou-se que este poderia apresentar um padrão de migração alterado justificando a diferença. Assim prosseguiu-se com os trabalhos, por acreditar, conforme mostrou a PCR de colônia e a análise de restrição, que se trabalhara com a seqüência correta da proteína alvo.

Esse teste de expressão foi realizado com a cepa a 30 °C durante 5 horas com 0,2 mmol L^{-1} de IPTG a 200 rpm. O aumento da temperatura bem como a mudança da célula hospedeira contribuiu ainda que de forma não tão expressiva, para indução da proteína *LbHsp40II.*

Perante esses resultados e com base na experiência obtida junto a expressão da *LbHsp40I* na bactéria *E. coli BL21(DE3) Codon Plus RP* alterou-se novamente o protocolo e a cepa de expressão visando obter uma maior quantidade de proteínas, ainda que em corpos de inclusão.

4.6.3 – Expressão da *LbHsp40II* em linhagem de *E. coli BL21(DE3) Codon Plus RP*

O resultado do teste de expressão da proteína *LbHsp40II* na bactéria *BL21(DE3) Codon Plus RP* foi confirmado pela visualização em SDS-PAGE(12%) de uma forte banda de expressão quando comparada a bactéria não induzida. A migração da proteína induzida no gel de poliacrilamida tangenciou a altura de 29 kDa quando o esperado era em torno de 37400 Da. Esse resultado foi o mesmo observado na baixa indução realizado com cepa anterior. Após o processo de lise e centrifugação, foi constado, como esperado, que a proteína está insolúvel e completamente em corpos de inclusão, segundo Figura 18. Esta análise de indução foi feita a 37 °C com 0,2 mmol L^{-1} de IPTG a 200 rpm.

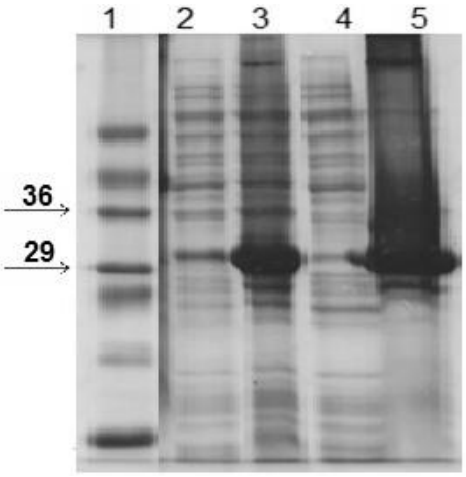

FIGURA 18: Análise de expressão da proteína *LbHsp40II* em *E. coli BL21(DE3) Códon Plus RP.* 1 – padrão de peso molecular em kDa, 2 – não induzido, 3 – induzido, 4 – sobrenadante e 5 – sedimento de proteína .

Diante desse resultado partiu-se para o processo de reenovelamento da proteína recombinante. O resultado após várias tentativas e alterações no protocolo de reenovelamento (como para a *LbHsp40I*) foi a presença da proteína no precipitado celular e portanto em corpúsculos de inclusão, como se observa na Figura 19.

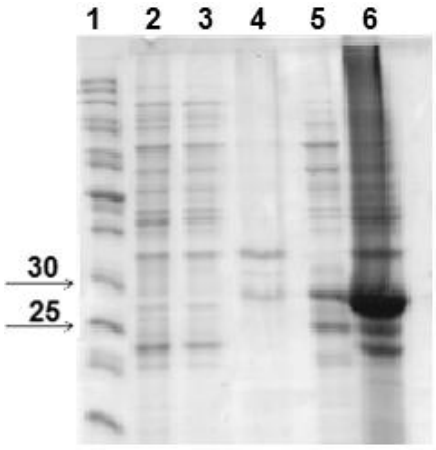

FIGURA 19: Ensaio de reenovelamento da proteína *LbHsp40II*: 1 - Padrão de peso molecular em kDa, 2 - primeira lavagem, 3 – segunda lavagem, 4 – terceira lavagem, 5 – sobrenadante e 6 – precipitado das lavagens mostrando a permanência da proteína em corpúsculos de inclusão.

Da mesma forma que para a proteína *LbHsp40I*, o sequenciamento para análise de possíveis mutações na sequência da proteína *LbHsp40II* só foi realizada após vários de testes de indução e reenovelamento, isso porque, como já comentado antes, o laboratório onde foi realizado este trabalho não dispõe de um seqüenciador de DNA e na ocasião em que se obteve o recombinante de expressão, o equipamento do IFSC, parceiro do grupo, estava inoperante.

O resultado do sequenciamento do recombinante de indução com os iniciadores T7 do vetor, mostrou que em relação ao T7 promoter a sequência esta relativamente correta, exceto no inicio que aparecem algumas discordâncias em relação à original (dados não mostrados), todavia acredita-se que isto possa ser falha no próprio seqüenciamento, já que falha no inicio é comum. Quanto ao oligonucleotídeo T7 terminator, este apresentou um códon de terminação e em fase de leitura na posição 416 (destacado em vermelho) da seqüência, Figura 20. A mutação e a inserção de um códon de terminação na fase de leitura presente praticamente no meio da sequência não impediu a expressão da proteína, entretanto a truncou fazendo com que ela apresentasse um tamanho de aproximadamente 29 kDa conforme observado nos testes de expressão heteróloga. Essa mesma mutação também foi observada no plasmídio recombinante de propagação o que imperava reiniciar todo o trabalho fazendo uma nova PCR e descartar todos os resultados até então obtidos para *LbHsp40II.*

```
         610       620       630       640       650       660
origin AAGAAAATGTTCGAGGTGAAGGTGCTTCCCGGGTACAAAAAAGGCACGAAGATCCGCTTT
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sequen AAGAAAATGTTCGAGGTGAAGGTGCTTCCCGGGTACAAAAAAGGCACGAAGATCCGCTTT
        190       200       210       220       230       240

               670       680       690       700       710       720
origin GAGCGCGAGGGCGGGCGGGTGGAGGGGTACCCGCCAAACGTGCTGGCAGACATGGTCTTT
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sequen GAGCGCGAGGGCGGGCGGGTGGAGGGGTACCCGCCAAACGTGCTGGCAGACATGGTCTTT
        250       260       270       280       290       300

               730       740       750       760       770       780
origin ATCTTGGATGAGCGGCCACACCCACGGTTTGAGCGACGTAACGCTGATCTCCACACCACG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sequen ATCTTGGATGAGCGGCCACACCCACGGTTTGAGCGACGTAACGCTGATCTCCACACCACG
        310       320       330       340       350       360

               790       800       810       820       830       840
origin TTGCACATCAATCTCAAACAGGCTCTGCTTGGCAGCACAGTATTCGTGAAGGGCATCGAC
       :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::::
sequen TTGCACATCAATCTCAAACAGGCTCTGCTTGGCAGCACAGTATTCGTGTAGGGCATCGAC
        370       380       390       400       410       420

               850       860       870       880       890       900
origin GGCCAGACGATCTCCTTGCCTCTTAATGGCGTCAGCAAAAGTGGTCGCAAGCTGCGCGTG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sequen GGCCAGACGATCTCCTTGCCTCTTAATGGCGTCAGCAAAAGTGGTCGCAAGCTGCGCGTG
        430       440       450       460       470       480

               910       920       930       940       950       960
origin TCGGGATCTGGCTTGCCGGATCGCAAGACGAACCGCAAAGGCGATTTGTACGTGACCATT
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sequen TCGGGATCTGGCTTGCCGGATCGCAAGACGAACCGCAAAGGCGATTTGTACGTGACCATT
        490       500       510       520       530       540

               970       980       990      1000      1010
origin GCAGTTGATTTTCCCGACGTGTTGACCGAAGACACGAAACGCTTGATTGAGCAGTGCAA-
       :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sequen GCAGTTGATTTTCCCGACGTGTTGACCGAAGACACGAAACGCTTGATTGAGCAGTGCAAT
        550       560       570       580       590       600

    1020
origin ATTC--TAG--------------------------------------------------
       : ::  :::
sequen AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAAACGCG
        610       620       630       640       650       660
```

FIGURA 20: Sequenciamento do recombinante de expressão *pET23a::LbHsp40II* com iniciador T7 terminator do vetor.

Diante dos resultados de insolubilidade obtidos para as duas proteínas, causados possivelmente pela presença de mutações em suas sequências de DNA, o ideal seria que se reiniciassem todos os trabalhos a partir da clonagem de seus respectivos DNAs, contudo o tempo para a realização deste trabalho já estava bastante adiantado (18 meses já tinham passado) o que tornou inviável reiniciá-lo, pois o tempo de bolsa auxilio para a realização de um trabalho de mestrado são de apenas 24 meses, e há que se considerar ainda que os trabalhos de clonagem e obtenção do recombinante de expressão as vezes levam até 12 meses, fato observado ao longo deste trabalho. Frente a essa realidade e na busca por

resultados mais adequados frente ao tempo disponível (6 meses), partiu-se para um novo alvo de estudo, a proteína *Aha1* também de *L. braziliensis.*

Esta nova proteína foi alvo de estudos de uma aluna de iniciação científica do grupo, a qual clonou o DNA e obteve o recombinante de expressão *pET23a::LbAha1*. Esta mesma aluna padronizou o protocolo de purificação e calculou o raio de Stokes da proteína por meio da cromatografia de exclusão molecular analítica e ainda predisse o conteúdo de estrutura secundária por meio da técnica de dicroísmo circular (SILVA, 2010). Estudos estruturais de baixa resolução visando ampliar o conhecimento acerca desta proteína são mostrados logo após apresentação de sua obtenção e purificação.

4.7 – Discussão acerca dos resultados para a obtenção das LbHsp40

Como apresentado no item 1.2 da Introdução, apesar dos inúmeros benefícios da expressão heteróloga de proteínas, nem sempre é possível obter a expressão das proteínas alvo. Outro fator limitante é a produção das proteínas na fração insolúvel ou em corpos de inclusão. Os motivos para a não expressão ou expressão em corpos de inclusão das *LbHsp40*, os manuais do sistema pET e da Qiagen (2001) sugerem ainda alguns outros motivos tais como: (1) a proteína alvo pode ser instável ou tóxica para a bactéria hospedeira, ou o sistema de expressão pode ser perdido durante o crescimento da célula; 2) a indução de proteínas heterólogas pode diminuir o crescimento do hospedeiro (ser tóxico) comprometendo a tradução da proteína alvo; 3) proteínas recombinantes com regiões hidrofóbicas frequentemente possuem um efeito tóxico sobre o hospedeiro devido à associação ou interação dessa proteína com o sistema de membrana da bactéria, 4) presença de mutações como é o caso das sequências de *LbHsp40* obtidas e 5) códons raros que são aqueles códons que requerem tRNAs que não se encontram em abundância na célula.

Apesar dessas limitações, a bactéria *E. coli* é o sistema de expressão mais freqüentemente utilizado para obtenção de proteína recombinante uma vez que este é um método rápido e mais barato. As causas acima enumeradas sugerem razões que podem ser evidentes para a proteína *LbHsp40II,* entretanto muito pouco provavelmente explica o não reenovelamento da recombinante *LbHsp40I.*

4.7 – Expressão da proteína *LbAha1*

Para dar continuidade aos estudos de caracterização desta nova proteína alvo, certificou-se primeiro da integridade do recombinante *pET23::Aha1* por análise de sequenciamento, o que confirmou que a junção inserto-vetor está correto e em fase de leitura, descartando portanto qualquer tipo de mutação que porventura pudesse inviabilizar sua caracterização.

A expressão da proteína recombinante *LbAha1* foi feita utilizando a cepa de bactéria *BL21(DE3)pLysS* na presença de 0,1 mmol L^{-1} de IPTG a temperatura de 30 °C durante 4 horas. Foi possível observar, após processo de lise e análise em SDS-PAGE que a maquinaria celular operou corretamente produzindo a proteína recombinante em larga escala e que a mesma está presente principalmente na fração solúvel do lisado celular, conforme Figura 21.

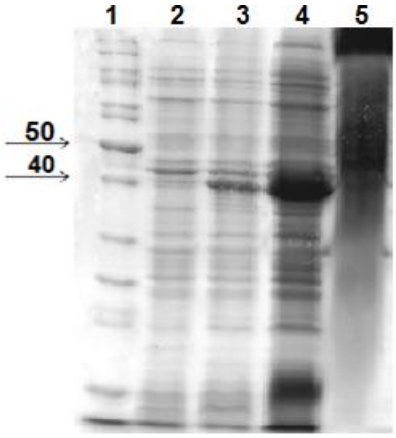

FIGURA 21: Análise de expressão e solubilidade da proteína *LbAha1* em *E. coli BL21(DE3) pLysS*. 1 – padrão de peso molecular em kDa, 2 – não induzido, 3 – induzido, 4 – sobrenadante e 5 – sedimento de proteínas

4.8 – Purificação

Para obter a *LbAha1* pura ela foi submetida a três etapas de purificação conforme descrito em materiais e métodos. Primeiramente a proteína foi submetida a uma cromatografia de troca aniônica onde a mesma por meio de um tampão A (10 mmol L^{-1} de Tris-HCl e 20 mmol L^{-1} de NaCl em pH 8,0) percolou a coluna e devido a atração eletrostática ficou retida na resina. Em seguida com auxilio de um segundo tampão B (10 mmol L^{-1} deTris-HCl e 500 mmol L^{-1} de NaCl em pH 8,0) ela foi eluída e coletada para posterior análise em SDS-PAGE. O resultado mostra a proteína livre

de vários contaminantes, porém ainda impura e carente de outras etapas de purificação, Figura 22.

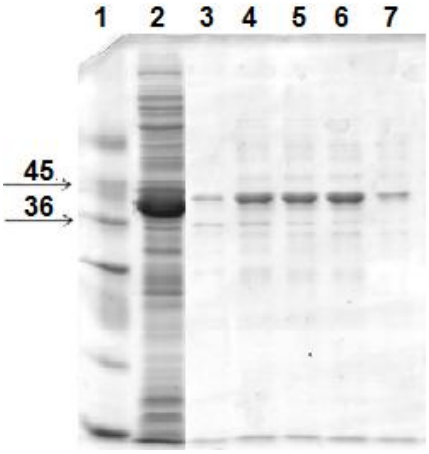

FIGURA 22: Análise da purificação por cromatografia de troca aniônica em gel de poliacrilamida 12 %: 1 – padrão de peso molecular em kDa**,** 2 amostra que foi aplicada e 3-7 referem-se as amostras recolhidas após cromatografia.

Após misturar as frações (3-7) provenientes dessa primeira etapa cromatográfica e dializá-las overnight contra tampão fosfato a 10 mmol L^{-1}, uma outra cromatografia foi realizada utilizando-se uma coluna de afinidade ao Ca^{2+}. O resultado desse novo processo foi a obtenção da *LbAha1* quase pura entretanto a presenças de uns poucos contaminantes sugeriu uma nova e última etapa cromatográfica, Figura 23.

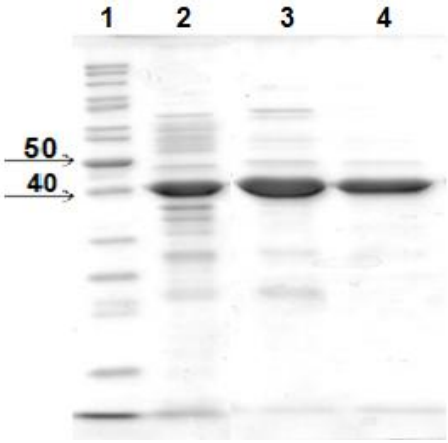

FIGURA 23: Análise da purificação por cromatografia de afinidade ao Ca^{2+} (CHT) em gel de poliacrilamida 12 %. 1 - padrão de peso molecular em kDa, 2 amostra que foi aplicada e 3-4 referem-se as amostras recolhidas após cromatografia.

A última cromatografia, no processo de purificação da proteína *LbAha1* foi a gel filtração. Após análise dessa etapa por SDS-PAGE pode-se concluir que a

proteína encontra-se em alto grau de pureza e, portanto adequada para dar continuidade aos experimentos, conforme se pode observar na Figura 24.

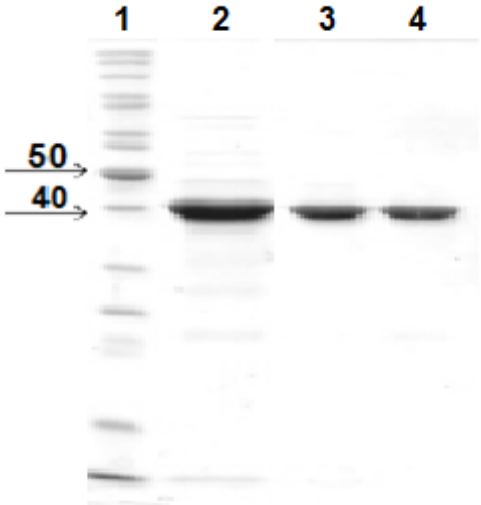

FIGURA 24: Análise da purificação por cromatografia de gel filtração (CEM) em gel de poliacrilamida 12 %. 1 - padrão de peso molecular em kDa e 2-4 referem-se as amostras purificadas.

A proteína purificada foi dialisada contra tampão fosfato e concentrada para aproximadamente 2 mg/mL para os experimentos de dicroísmo circular e fluorescência.

4.9 – Desenovelamento químico monitorado pelas técnicas de dicroísmo circular e fluorescência

4.9.1 – Dicroísmo circular

Os experimentos de CD em geral são usados para estimar o conteúdo de estrutura secundária de uma proteína. Contudo, neste trabalho ele foi usado para avaliar o comportamento da proteína frente a crescentes concentrações de uréia bem como a estabilidade dos diferentes domínios. O conteúdo de estrutura secundária da *LbAha1* apresentado em Silva (2010) revelou que esta é constituída por 20% de α-hélice, 28% de folhas-β antiparalelas, 7% de folhas-β paralelas 15% de voltas e 30% de estrutura randômica. Um espectro de CD da proteína nativa é apresentado na Figura 25 onde se pode observar um ombro em 210 nm e um mínimo em 220 nm, o que é característico de proteína com essa fração de estrutura secundária.

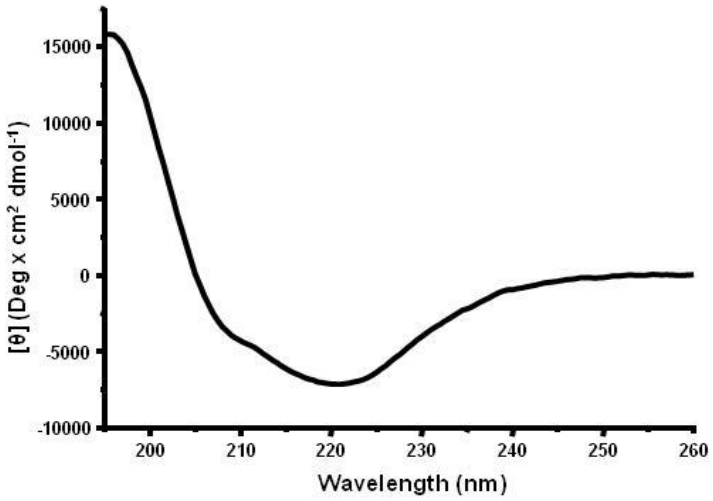

FIGURA 25: Espectro de dicroísmo circular da *LbAha1* nativa. A *LbAha1* foi incubada em tampão fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} (pH 7,0) contendo 1 mmol L^{-1} de β-mercaptoetanol e NaCl à 25 mmol L^{-1}. A medida foi realizada a 20 °C com a proteína a 250 µg/mL em cubeta de quartzo com passo ótico de 1 mm.

A avaliação da estabilidade da estrutura secundaria da *LbAha1* realizado pela técnica de CD foi feita com os dados coletados do *time corse* por considerar que as isotermas obtida por esse tipo de análise é suficiente para prever o comportamento da proteína frente ao desnaturante. O agente caotrópico usado na avaliação da estabilidade das estruturas secundárias foi a uréia e sua concentração foi variada de 0 a 8 mol L^{-1} enquanto a concentração da proteína foi mantida constante a 250 µg/mL.

A análise da isoterma obtida pelos experimentos de CD mostra duas transições, sendo uma em 2,9 ± 0,2 mol L^{-1} de uréia e a outra em 5,7 ± 0,2 mol L^{-1} de uréia como se pode ver na Figura 26. Esse resultado sugere que os dois domínios da proteína possuem diferente estabilidade e, portanto a presença de intermediários na via de desenovelamento químico da proteína nas condições estudadas.

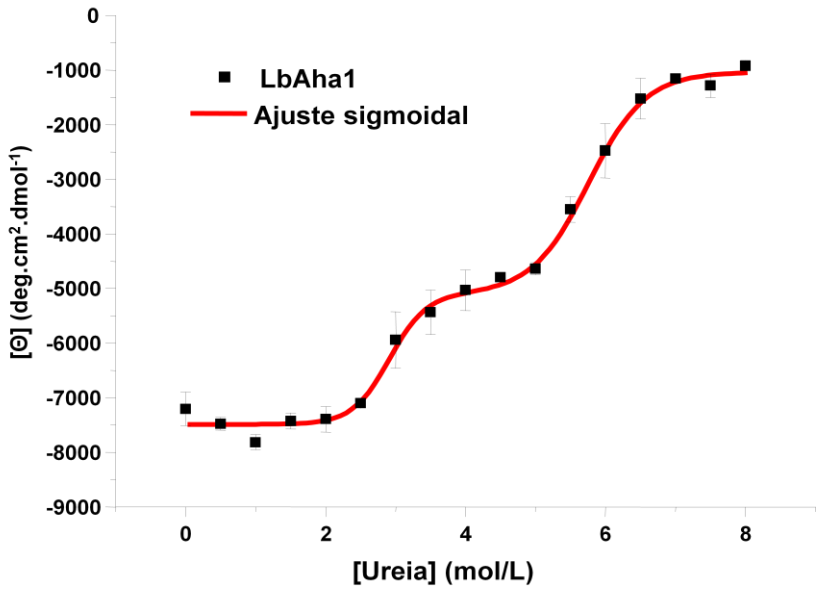

FIGURA 26: Isoterma de desnaturação da *LbAha1* induzida por uréia após duas horas de incubação. A curva foi monitorada a 220 nm e expressa em termos de fração de proteínas desnaturadas em função da concentração do agente desnaturante. A proteína foi mantida a uma concentração constante de 250 µg/mL enquanto a concentração da uréia foi variada de 0 a 8 mol L^{-1}. Isoterma obtida a partir de dois experimentos obtidos individualmente.

4.9.2 – Fluorescência

A emissão de fluorescência intrínseca de uma proteína é dominada principalmente pela contribuição dos resíduos de triptofano que ela apresenta. Esta propriedade tem sido largamente empregada para detectar mudanças conformacionais em sua estrutura terciária e a micro região em que se encontram os triptofanos. Assim sendo, um alinhamento entre as sequências de aminoácidos da *LbAha1* com as sequências de aminoácidos da *Aha1* humana (HsAha1) e de levedura (yAha1) foi realizada afim de se determinar a posição relativa em que se encontram esses aminoácidos cromóforos, conforme se pode observar na Figura 27.

```
LbAha1          MAKVGEGDPRWIVSERTDGANVNSWHWEERDLSQHTHDKLKSVFAEHAIPVPADMATSVE
HsAha1          MAKWGEGDPRWIVEERADATNVNNWHWTERDASNWSTDKLKTLFLAVQVQN------EEG
yAha1           ----------------MVVNNPNNWHWVDKNCIGWAKEYFKQKLVGVEAGSVK----DKK
                                     * *.*** :::    : : :*  :             .

LbAha1          YLKIEEVSEISGDVTVAQRKGKMMCYFELKMSLRWVGKMS---GADQVIRGKMEVAEVDH
HsAha1          KCEVTEVSKLDGEASINNRKGKLIFFYEWSVKLNWTG-TS---KSGVQYKGHVEIPNLSD
yAha1           YAKIKSVSSIEGDCEVNQRKGKVISLFDLKITVLIEGHVDSKDGSALPFEGSINVPEVAF
                  :: .**.:.*:  : :****::  :: .:.:   *  .    :    .* :::.::

LbAha1          DGFKDEYDIAVTCQENDSAAQLLESVVQVAGRSTVRQGIATFFDALFAEYHIGKQLKSGA
HsAha1          ENSVDEVEISVSLAK-DEPDTNLVALMKEEGVKLLREAMGIYISTLKTEFTQGMILPTMN
yAha1           DSEASSYQFDISIFKETSELSEAKPLIRSELLPKLRQIFQQFGKDLLATHGNDIQVPESQ
                :.  .. :: ::  :  .      .:::      :*: :  : . * : .  .  :

LbAha1          ALPPPPPPLSASASTTLATNAAAGKKSVTPSKSSSGSGDE------------NTSFSWKM
HsAha1          GESVDPVGQPALKTEERKAKPAPSKTQARP----VGVKIP------------TCKITLKE
yAha1           VKSNYTRGNQKSSFTEIKDSASKPKKNALPSSTSTSAPVSSTNRVPQNGSGNSTSIYLEP
                  .  .             ..:  *... *     .                . .:  :

LbAha1          RWGAPVAELYAAMTDPSRVSVYTRSPASMDVK----AGGLFSFLGGVISGYYVDVQPSTL
HsAha1          TFLTSPEELYRVFTTQELVQAFTHAPATLEAD----RGGKFHMVDGNVSGEFTDLVPEKH
yAha1           TFNVPSSELYETFLDKQRILAWTRSAQFFNSGPKLETKEKFELFGGNVISELVSCEKDKK
                 : ..  *** .:   . : .:*::.  ::          * :..* : .  ..   ..

LbAha1          IRQQWRLSSWPVGVHSSVVLQLVK-EEPGVTTLEFTQSGIPAGQLQSVQEGWKANFFEAI
HsAha1          IVMKWRFKSWPEGHFATITLTFID-KN-GETELCMEGRGIPAPEEERTRQGWQRYYFEGI
yAha1           LVFHWKLKDWSAAFNSTIEMTFHESQEFHETKLQVKWTGIPVGEEDRVRANFEEYYVRSI
                :  :*::..*. .  ::: : : . ::   * * .   ***. : : .: .::  :...*

LbAha1          KVVFGYSLEYI
HsAha1          KQTFGYGARLF
yAha1           KLTFGFGAVL-
                * .**:.
```

FIGURA 27: Alinhamento das sequências de aminoácidos *LbAha1, HsAha1* e *yAha1*. O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas *LbAha1* (código GenBank número gi|154335419), *HsAha1* (gi|6912280) e *yAha1* (gi|256269991) foi realizado utilizando o programa ClustalW (http://align.genome.jp/).

Analisando o alinhamento entre as sequências da *LbAha1* com a sequência da *HsAha1* observou que estas apresentam 30% e 50% de identidade e similaridade, respectivamente. Apesar desta identidade relativamente baixa observou se que a Lb*Aha1* e a *Aha1* humana apresentam um alto número de resíduos de triptofanos (9 e 10 respectivamente) sendo que 7 deles ocupam posições conservadas na sequência o que sugere que estes aminoácidos devam ter importantes contribuições para a funcionalidade da proteína.

Os resíduos de triptofanos da *LbAha1,* que foram utilizados como sonda para monitorar o desenovelamento e a estabilidade da proteína, encontram-se distribuídos nos dois domínios que a proteína apresenta, sendo quatro no N-terminal e cinco no C-terminal. Diante da quantidade relativamente alta de triptofanos e com vistas a reproduzir os resultados dos experimentos de CD quanto à integridade e a

estabilidade da proteína, acreditou-se ser necessária uma análise pela técnica de fluorescência.

3.9.2.1 – Espectro de emissão de fluorescência

Analisando os espectros de emissão de fluorescência da *LbAha1,* com excitação em 280 nm, observa-se que os espectros já começam emitindo em aproximadamente 340 nm o que sugere a presença, ainda que parcialmente, de triptofanos em contato com o meio. Com o aumento da concentração de uréia na solução protéica, observa-se um deslocamento progressivo no máximo de emissão atingindo 350 nm a partir de 6 mol L^{-1} de uréia, como se constata evidenciado na linha mais escura da Figura 28 do espectro, o que pode indicar a exposição total dos triptofanos ao ambiente polar. Este resultado é característico de proteína que sofreu total desnaturação de sua forma, ou seja, os resíduos de Trps que antes estavam no interior do núcleo hidrofóbico da proteína agora estão diretamente em contato com o solvente após a perda da sua estrutura terciária causada pela ação do agente desnaturante, o que justifica a supressão da sua fluorescência.

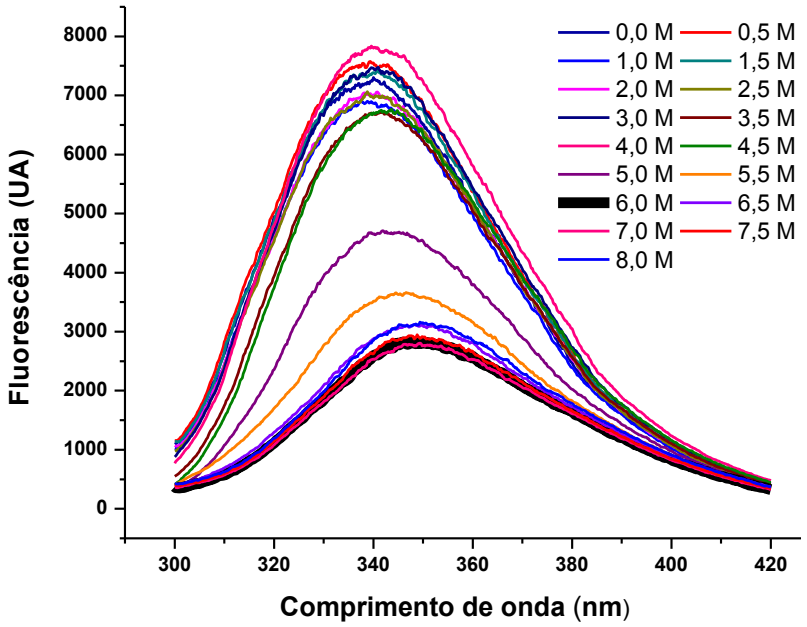

FIGURA 28: Espectro de emissão de fluorescência do Trp da proteína *LbAha1.* Experimento realizado com a proteína a uma concentração constante de 2 µmol L^{-1} na presença de uréia em diferentes concentrações (0 a 8 mol L^{-1}) após duas horas de incubação e a uma temperatura constante de 20 °C.

4.9.2.2 – Intensidade máxima e comprimento de emissão de onda máxima de fluorescência

A intensidade máxima e o comprimento de onda máximo de fluorescência descreve comportamento dos dois domínios da proteína quando a mesma é colocada na presença de diferentes concentrações de uréia.

Pela análise dos gráficos observa-se para a intensidade máxima de fluorescência uma transição em 3,4 mol L^{-1} de uréia enquanto que para o comprimento de onda máxima nota-se uma transição em 4,9 mol L^{-1} como mostra a Figura 29.

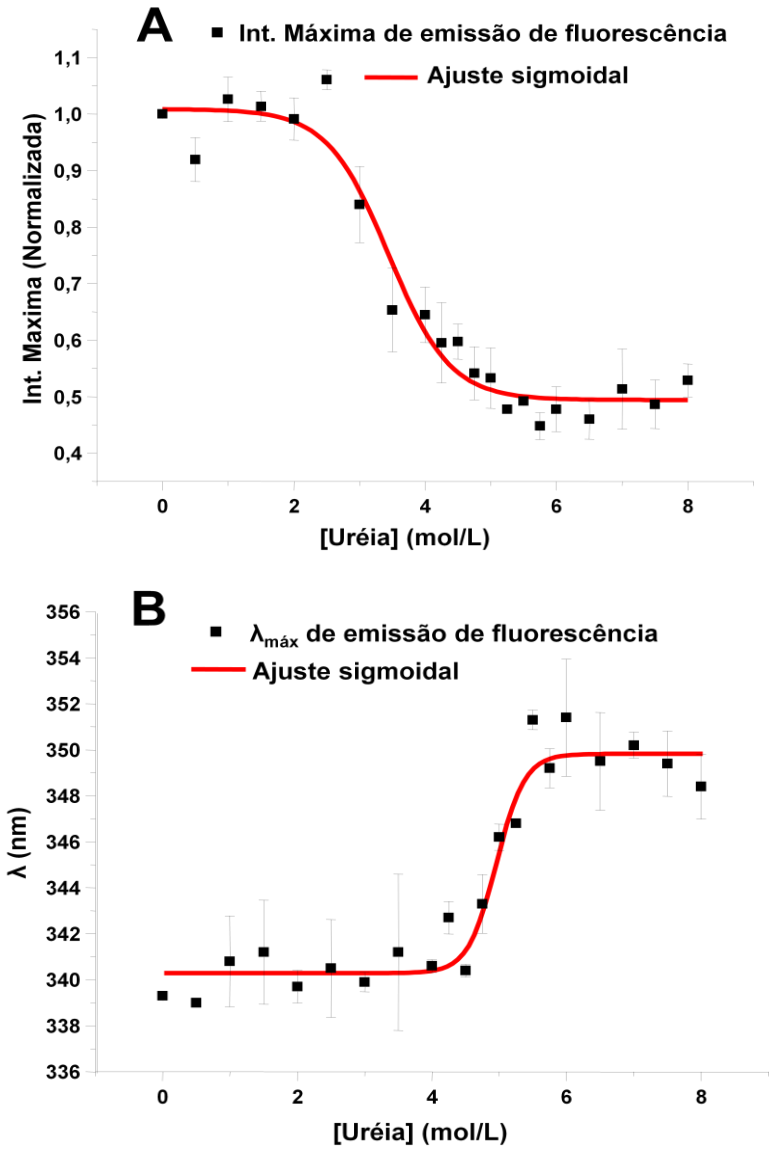

FIGURA 29: Ensaio de desenovelamento químico da *LbAha1* induzido por uréia. A) Intensidade máxima de emissão de fluorescência do Trp da *LbAha1* e, **B)** comprimento de onda máxima de emissão de fluorescência do Trp da proteína *LbAha1*. Curvas obtidas a partir de dois experimentos independentes.

Esses resultados sugerem que em ambas as formas de análise os domínios sofrem uma única transição cooperativa. Pela concentração relativamente baixa do agente desnaturante em que ocorre a transição monitorada pela intensidade máxima de emissão de fluorescência, acredita-se que ela possa estar relacionada a um evento com pouca mudança na estrutura da proteína e que esta esteja acontecendo principalmente em um dos dois domínios da proteína que muito provavelmente já possui alguns dos seus resíduos de triptofanos parcialmente expostos. Quanto à transição observada na curva do comprimento de onda máxima de fluorescência, acredita-se, pela concentração de uréia em que se dá esse evento, que tenha ocorrido principalmente em um domínio que tenha seus triptofanos bem escondidos no núcleo hidrofóbico. Esses resultados sugerem que a proteína possui um domínio com triptofanos parcialmente expostos e outro com esses aminoácidos bem protegidos do solvente.

4.9.2.3 – Centro de massa espectral

A emissão de fluorescência dos triptofanos quando avaliada pelas mudanças ocorridas no centro de massa espectral, média ponderada dos espectros, mostra um perfil de desenovelamento semelhante ao observado por CD, Figura 30. A presença de duas transições também observada aqui corrobora com a idéia de que os dois domínios da proteína possuem diferentes estabilidades.

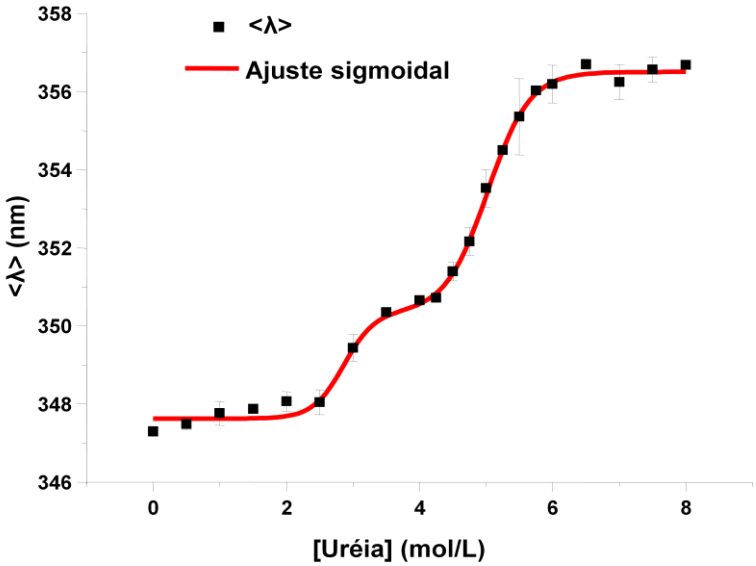

FIGURA 30: Centro de massa espectral do desenovelamento químico da *LbAha1* em função da concentração de uréia monitorado por fluorescência. Curva obtida a partir de 2 experimentos independentes.

Como a emissão de fluorescência fornece uma medida da mudança da estrutura terciária, e a primeira transição observada na curva do centro de massa espectral coincide com o perfil da curva da espectrospolarimetria de CD, acredita-se que as modificações na estrutura terciária e secundária da proteína ocorram que de forma paralela. Ainda comparando as curvas desse desenovelamento químico observa-se que a segunda transição do centro de massa espectral ocorreu com um Cm em 5 mol L^{-1} de uréia, enquanto esta, na isoterma de CD, ocorreu com um Cm de 5,7 mol L^{-1} de uréia. Essa pequena diferença observada na segunda transição leva-nos a crer que neste segundo domínio, a desnaturação da estrutura terciária ocorre ligeiramente antes da estrutura secundária, porém como essa diferença é bem pequena acredita-se que esse resultado reforça a idéia de que as desnaturações da estrutura terciária e secundária ocorram quase que de forma simultânea.

Segundo MEYER et al (2004) e LOTZ et al (2002) os dois domínios da *LbAha1* tem importâncias diferentes no estímulo da atividade ATPásica das Hsp90, sendo o N-terminal o principal responsável por essa função enquanto o verdadeiro papel do C-terminal permanece desconhecido.

Um resumo dos dados de concentração média de transição obtidas pelas análises de CD e fluorescência estão apresentados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2: **Concentrações médias de uréia observada nas transições dos respectivos experimentos de dicroísmo circular e fluorescência**. Cm1, concentração média de uréia em mol L^{-1} para primeira transição e Cm2, concentração média de uréia em mol L^{-1} para a segunda transição.

Metodologia	Método de análise	$Cm1_{uréia}$ (mol/L)	$Cm2_{uréia}$ (mol/L)
Dicroísmo Circular	Isoterma de desnaturação	2,9 ± 0,2	5,7 ± 0,2
Fluorescência	Intensidade Máxima de emissão	3,4 ± 0,3	Não observado
	Comprimento de onda máximo de emissão	Não observado	4,9 ± 0,2
	Centro de massa espectral	2,9 ± 0,2	5,0 ± 0,2

4.10 – Reversibilidade da *LbAha1*

O ensaio de reversibilidade química da proteína *LbAha1* foi realizado na presença de uréia e monitorado pela técnica de fluorescência (ver item 2.24 de material e métodos). Pela análise do gráfico na Figura 31 pode se dizer que o

desenovelamento químico da mesma é irreversível, pois o perfil do espectro da proteína a 6 mol L^{-1} é semelhante ao espectro da mesma amostra protéica quando esta tem sua concentração de uréia diluída para 1 mol L^{-1} .

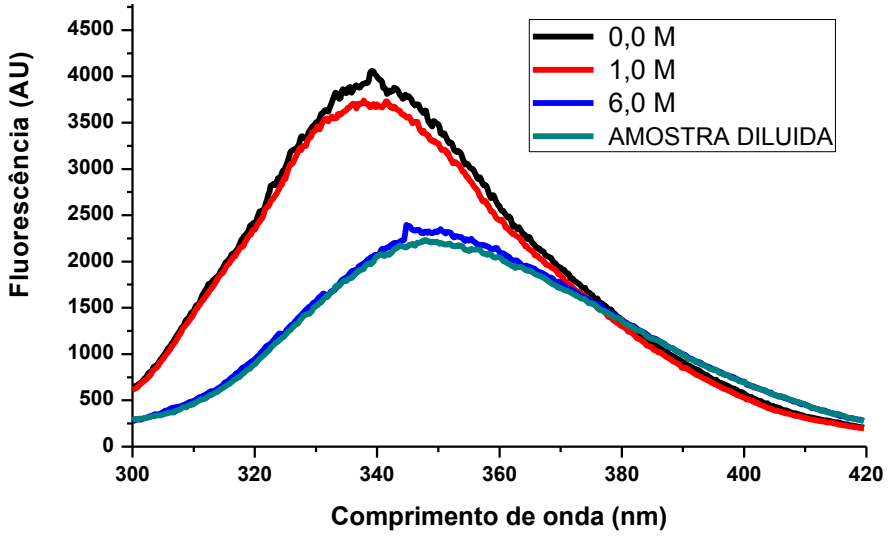

FIGURA 31: Ensaio de reenovelamento químico da proteína *LbAha1.* Experimento realizado com a proteína a uma concentração constante de 2 µmol L^{-1} na presença de uréia após duas horas de incubação e a uma temperatura constante de 20 °C.

4.11 – Considerações finais acerca da proteína *LbAha1*

De maneira geral os experimentos de CD e emissão intrínseca de fluorescência reportaram comportamentos similares para a mesma proteína em concentrações crescentes de uréia. Para os dados de Intensidade Máxima de Emissão de Fluorescência que apresenta uma única transição ocorrendo com Cm em 3,4 mol L^{-1} de uréia, acredita-se que esta seja uma transição cooperativa com predominância de participação do domínio que tem triptofanos parcialmente expostos ao solvente. Conforme predito pela estrutura da Figura 32 infere-se que este domínio seja o N-terminal já que seus resíduos de Trps cromóforos encontram-se ligeiramente expostos ao solvente enquanto os Trps do domínio C-terminal estão bem enterrados na estrutura da proteína e, portanto protegidos do solvente.

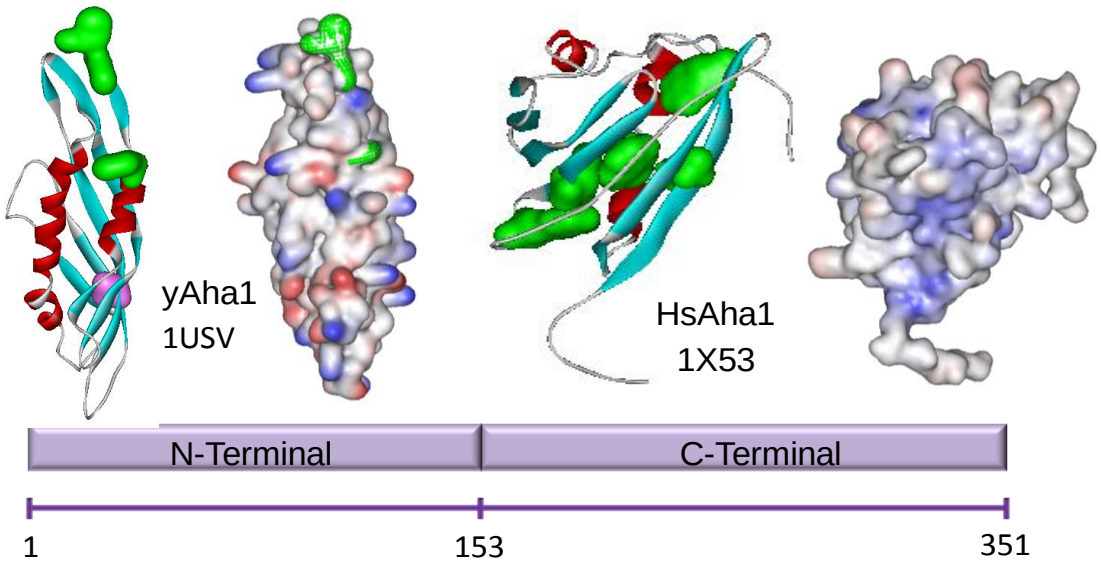

FIGURA 32: Estrutura Geral da Aha1. Estrutura dos domínios N-terminal e C-terminal da *Aha1*, sendo o primeiro da proteína de levedura *(yAha1)* e o segundo da proteína humana *(HsAha1)*. Em ambos os domínios encontram-se em destaque (em verde) os triptofanos que possuem posição conservada na estrutura da *LbAha1* e, em lilás, está destacada a localização de um triptofano existente na *LbAha1* mas que não existe na *yAha1*.

Quanto ao comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência observa-se uma transição com Cm em 4,9 mol L^{-1} de uréia o que também sugere uma transição cooperativa, entretanto como este evento ocorre com uma concentração de uréia maior do que o anterior, acredita-se que os cromóforos do domínio C-terminal têm uma participação mais efetiva na emissão deste sinal, o que sugere diferentes estabilidade para os dois domínios da proteína.

Na isoterma do desenovelamento químico acompanhado por CD e na curva do centro de massa espectral da fluorescência distingue-se claramente duas transições o que confirma as diferentes estabilidades para os dois domínios da proteína. Na primeira transição observou-se um Cm de 2,9 mol L^{-1} de uréia para ambas as técnicas, entretanto, a segunda transição apresentou Cms em 5,7 mol L^{-1} e 5,0 mol L^{-1} de uréia para CD e fluorescência, respectivamente. A partir da última figura apresentada pode se inferir que a primeira e a segunda transição é devida principalmente aos domínios N e C-terminal, respectivamente, e que estes são relativamente independentes por apresentarem diferentes estabilidades químicas frente às concentrações distintas de uréia.

5 – CONCLUSÕES

Os DNAs das proteínas *LbHsp40I* e *LbHsp40II* foram clonados em vetores de expressão e as proteínas expressas em corpos de inclusão e não responderam ao processo de solubilização e reenovelamento. Ambos os clones recombinantes apresentam mutações em suas sequências de DNA o que pode ter dificultado a solubilidade das proteínas expressas a partir deles. A *LbHsp40I* apresentou a troca do aminoácido glutamato pela lisina enquanto que a *LbHsp40II* apresentou um códon de terminação no meio da sua sequência resultando na expressão de uma proteína truncada que pode ter sido a causa da expressão em corpos de inclusão.

A proteína *LbAha1* foi expressa no sobrenadante possibilitando a sua purificação. A análise dos dados de desenovelamento química acompanhados por fluorescência e dicroísmo circular mostrou que os seus dois domínios preditos apresentam diferentes estabilidades.

Os resultados referentes às *LbHsp40* não foram satisfatórios e novos estudos precisam ser realizados a fim de dirimir as dúvidas sobre o fato das mutações serem as causas da insolubilidade. Quanto a *LbAha1* os resultados obtidos foram bons, entretanto mais estudos são necessários como a interação com a *Hsp90* a fim de compreender melhor seu mecanismo de ação e sua importância dentro do sistema chaperone.

6 Referências Bibliográficas

BANECKI, B.; LIBEREK, K.; WALLS, D.; WAWRZYNOW, A.; GEORGOPOULOS, C.; BERTOLI, E.; TANFANI, F.; ZYLICZ, M. Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 14840–14848, 1996.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein Pept. Lett***.,* v.*12, n.* 3, p. 257-261, 2005.

BORGES, J. C. **Estudos estruturais do sistema chaperone molecular *HSP70* humano.** 2004. 250 f.Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular na Área de Bioquímica) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BONNER, G.; LAFER, E.M.; SOUSA, R. Characterization of a set of T7 RNA polymerase active site mutants**. J. Biol. Chem**., v. 269, p. 25120–25128, 1994.

BORGES, J.C.; SILVA, K. P. The Molecular chaperone *Hsp70* family members function by a bidirectional heterotrophic allosteric mechanism. **Protein Pept. Lett.**, v. 18, n. 2, p. 132-42, 2011.

BOTHA, M.; PESCE, E.-R.; BLATCH, G.L**.** The *Hsp40* proteins of *Plasmodium falciparum* and other apicomplexa: Regulating chaperone power in the parasite and the host. **Int. J. Biochem. Cell Biol**., v. 39, p. 1781–1803, 2007.

BORGES, J. C.; FISCHER, H.; CRAIEVICH, A. F.; RAMOS, C. H. I. Low resolution structural study of two human *Hsp40* chaperones in solution. **J. Biol. Chem**.,v. *280*, p. 13671–13681, 2005.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The *Hsp70* and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, p. 351-366, 1998.

BUKAU, B.; DEUERLING, E.; PFUND, C.; CRAIG E. A. Getting newly synthesized proteins into shape. **Cell,** v**.** 101, p. 119–122, 2000.

BRAUN, P.; HU, Y.; SHEN, B.; HALLECK, A.; KOUNDINYA, M.; HARLOW, H.; LABAER, J. Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. **PNAS, v**. 99, p**.** 2654-2659, 2002.

CORREA, E. M. **Expressão heterologa, purificação e caracterização das proteínas humanas DCRA (Down Syndrome Critical Region Gene A) e DSCR8 (Down Syndrome Critical Region Gene 8)**. 2004. 143 f. Tese (Doutorado em Genética Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

CEPEDA, A. O. T**. Caracterização da relação entre estabilidade, estrutura e função de duas sHsps de cana-de-açúcar e da *Hsp40* da subfamília A humana, chaperones envolvidos com o reconhecimento e apresentação de proteínas parcialmente enoveladas**. 2007.161 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular na Área de Bioquímica) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CEPEDA-TIROLI, A. O.; RAMOS, C. H. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis . **Protein Pept. Lett.**, v. 18, n. 2, p. 101-109., 2011.

CHAMBERLIN, M.; MCGRATH, J.; WASKELL, L**.** New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. **Nature,** v**.** 228, p. 227–231, 1970.

CHEETHAM, M.E.; CAPLAN, A.J. *Structure,* function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. **Cell Stress Chap.***, v. 3, p.* 28-36, 1998.

DABROWSKI, S.; BRILLOWSKA, A.; KUR, J. Use of the green fluorescent protein variant (YFP) to monitor MetArg human proinsulin production in *Escherichia coli*. **Prot. Expre. Pprotein,** v.16, p. 315-323, 1999.

DENG, T.L.; NOEL, J.P.; TSAI, M.D. A novel expression vector for high-level synthesis and secretion of foreign proteins in *Escherichia coli*: overproduction of bovine pancreatic phospholipase A2. **Gene,** v. 93, p. 229–234, 1990.

DUNN, J.J.; KRIPPL, B.; BERNSTEIN, K.E.; WESTPHAL, H.; STUDIER, F.W. Targeting bacteriophage T7 RNA polymerase to the mammalian cell nucleus. **Gene,** v. 68, p. 259–266, 1988.

EDELHOCK, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, p. 1948-1954, 1967.

FAN, C.Y.; LEE, S.; CYR D.M. Mechanisms for regulation of *Hsp70* function by *Hsp40*. **Cell Stress Chap**., v. 8, p. 309–316, 2003.

FAN, C.Y.; LEE, S.; REN, H.Y; CYR, D.M. Exchangeable chaperone modules contribute to specification of type I and type II *Hsp40*. cellular function. **Mol. Biol. Cell**, v. 15, p. 761–773, 2004.

FUERST, T.R.; NILES, E.G.; STUDIER, F.W.; MOSS, B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccine virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci**., v. 83, p. 8122–8126, 1986.

GENEVAUX, P.; GEORGOPOULOS, C.; KELLEY, W. L. MicroReview - The *Hsp70* chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. **Mol. Microb.**, v. 66, p. 840-857, 2007.

GREENE, M. K.; MASKOS, K.; LANDRY, S. J. Role of the J domain in the cooperation of *Hsp40* and *Hsp70*. **Proc. of the Nat. Acad. of Sci.***,* v. *95*, p. 6108–6113, 1998.

HARTL, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, p. 571-580, 1996.

HARST, A.; LIN, H.; OBERMANN, W. M Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. **Biochem. J.**, v. 387, p. 789–796, 2005.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science,** v. 295,p. 1852–1858, 2002.

HATTMAN, S.; IVES, J., MARGOLIN, W., HOWE, MM. Regulation and expression of the bacteriophage Mu *mom* gene: mapping of the transactivation (*dad*) function to the C region. **Gene**, v. 39, p. 71–76, 1985.

HAN, W.; CHRISTEN, P**.** Mechanism of the targeting action of DnaJ in the DnaK molecular chaperone system. **J. Biol. Chem.**, v. *278*, p. 19038–19043, 2003.

HENDRICK, J. P.; HARTL, F.U**.** Molecular chaperone functions of heat-shock proteins**. Annu. Rev. Biochem**., v. 62, p. 349-384, 1993.

HOANG, T.T.; MA, Y.; STERN, R.J.; MCNEIL, M.R.; SCHWEIZER, H.P. Construction and use of low-copy number T7 expression vectors for purification of problem proteins: purification of *Mycobacterium tuberculosis* RmlD and *Pseudomonas aeruginosa* LasI and RhlI proteins, and functional analysis of purified RhlI. **Gene,** v. 237, p. 361–371, 1999.

HOLMES, J. L.; SHARP, S. Y.; HOBBS, S.; WORKMAN, P. Silencing of HSP90 co-chaperone Aha1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin. **Cancer Res**., v. 68, p. 1187–96, 2008.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; SISK, E.; MYLER, J.; ADLEM, E. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science**, v. 309, p. 436-442, 2005.

YOUNG, J.C.; MOAREFI, I.; HARTL, F.U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. **J. Cell. Biol.**, v.154, p. 267-273, 2001.

JEONG, K.J.; LEE, S.Y. High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 65, p. 3027–3032, 1999.

LAUFEN, T.; MAYER, M.P.; BEISEL, C.; KLOSTERMEIER, D.; MOGK, A.; REISTEIN, J.; BUKAU, B. Mechanism of regulation of *Hsp70* chaperones by DnaJ co-chaperones. **Proc. Natl. Acad. Sci**. ,v. 96, p. 5452-5457, 1999.

LAKOWICZ, J. R. Protein fluorescence. In: LAKOWICZ, J. R. (Ed.). **Principles of fluorescence spectroscopy.** New York **:** Plenum Press**,** 1982**.** p. 341–389.

LI, J.; QIAN, X.; SHA, B. Heat shock protein 40: Structural studies and their functional implications. **Protein Pept. lett**. v.16, p. 606-612, 2009.

LOTZ, G. P.; LIN, H.; HARST, A.; OBERMANN, W. M. Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 17228–17235, 2003.

MAYER, M.P.; SCHRÖDER, H.; RÜDIGER, S.; LAUFEN, T.; BUKAU, B. Multispet mechanism of substrate binding determines chaperone activity of *Hsp70*. **Nature Struct. Biol**.,v. 7, p. 586-593, 2000.

MAYER, M.P.; BREHMER, D.; GÄSSLER, C.S.; BUKAU, B. *Hsp70* Chaperone Machines. **Adv. Protein Chem**., v. 59, p. 1-45, 2001.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. *Hsp70* chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cell. Mol. Life Sci**., v. *62*, p. 670-684, 2005.

MARTINEZ-YAMOUT, M., LEGGE, G. B., ZHANG, O., WRIGHT, P. E.; DYSON, H. J. Solution structure of the cysteine-rich domain of the *Escherichia coli* chaperone protein DnaJ. **J. Mol. Biology**, v. *300*, p. 805–818, 2000.

MEYER, T. F.; SPEHR, V.; FRAHM, D. Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme. **Gene,** v. 257, p. 259-267, 2000.

MEYER, P**.;** LIAO, C.; HU, B.; ROE, S.M.; VAUGHAN, C. K.; VLASIC, I.; PANARETOU, B.; PIPER, P.W.; PEARL, L. H. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. **EMBO J.**, v. 23, p. 1402–1410, 2004.

MITRA, A.; SHEVDE, L. A.; SAMANT, R. S. Multi-faceted role of *Hsp40* in cancer. review. **Clin. Exp. Metastasis,** v. 26, p. 559–567, 2009.

MCLAUGHLIN, S.H.; SMITH, H. W.; JACKSON, S. E. Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. **J. Mol. Biol***.,v.* 315, p. 787–98, 2002.

PALLAVI, R.; ROY, N.; NAGESHAN, R. K.; TALUKDAR, P.; PAVITHRA, S. R.; REDDY, R.; VENKETESH, S.; GOEL, R. K.; GUPTA, A. K.; SINGH, R. K.; YADAV, S.;, TATU, U. Heat shock protein 90 as a drug target againstprotozoan infections: Biochemical characterization of Hsp90 from Plasmodium falciparum, Trypanosoma evansi and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **J. Biol. Chem**., v. 283, p. 37964-37975, 2010.

PAES, H. C. **Isolamento e caracterização funcional do fator de choque térmico (Hsf) do patógeno termodimórfico *Paracoccidiodes brasiliensis.*** 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Disponível em: <www.**paho**.org>. Acesso em: 15 fev. 2011.

PAVITHRA, S.R.; BANUMATHY, G.; JOY, O.; SINGH, V.; TATU, U**.** Recurrent fever promotes plasmodium falciparum development in human erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 46692-46699, 2004.

PANARETOU, B.; SILIGARDI, G.; MEYER, P. Activation of the ATPase activity of the function of Hsp90 by the stress regulated co-chaperone Aha1. **Mol. Cell**., v.10, p. 1307-1318, 2002.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M, KERHORNOU, A.;IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M. A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S.L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D.P.; OYOLA, S.O.; HILLEY, J. D.; BRITO L.O.; TOSI, L. R.; BARRELL, B.; CRUZ, A. K.; MOTTRAM, J. C.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. **Nat. Genet**., v. 39, p. 839-847, 2007.

POWERS, M. V.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Death by chaperone. **Cell Cycle,** v. 8, p. 518-526, 2009.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/*Hsp70*-based chaperone machinery. **Exp. Biol. Med**., v. 228, p. 111-133, 2003.

POWERS M.V.; WORKMAN, P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. **FEBS Lett**., v. 581, p. 3758-3769, 2007.

QIU, X. ; SHAO, Y. ; MIAO, S.; WANG, L. The diversity of the DnaJ/*Hsp40* family, the crucial partners for *Hsp70* chaperones. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, n. 22, p. 2560-2570, 2006.

KOULOV, A. V.; LAPOINTE, P.; BINGWEN, L.; RAZVI, A.; COPPINGER, J.; DONG, M.; MATTESON, J.; LAISTER, R.; ARROWSMITH, C.; YATES III, J. R.; BALCH, W. E. Biological and structural basis for Aha1 regulation of Hsp90 ATPase activity in maintaining proteostasis in the human disease cystic fibrosis. **Mol. Biol. Cell**., v. 21, p. 871–884, 2010.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochim. Biophys***.,* v. 1338, p. 161-185, 1997.

REVINGTON, M.; ZHANG, Y. B.; YIP, G. N. B.; KUROCHKIN, A. V.;ZUIDERWEG. E. R. P. NMR investigations of allosteric processes in a two-domain Thermus thermophilus *Hsp70* molecular chaperone. **J.Mol. Biol**., v. *349*, p. 163-183, 2000.

RUCKER, E.; **SCHNEIDER, G.; STEINHÄUSER, K.; LÖWER, R.; HAUBER, J.; STAUBER, R. H.** Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. **Prot. Expression Purif.**, v. 21, p.220-223, 2001.

RUDIGER, S.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; BUKAU, B**.** Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. **Eur. Mol. Biol. Org. J**., v. *20*, p. 1042–1050, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory , 2001. 3v.

SOTI, C.; NAGY, E.; GIRICZ, Z.; VIGH, L.; CSERMELY, P.; FERDINANDY, P. . Hsp as emerging therapeutic targets. **Brit. J. Pharm**., v. 146, p. 769–780, 2005.

SILVA, I. M. **Obtenção e caracterização da Aha1 de L. braziliensis.** 2010. 35 f. Monografia (Bacharelado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J. Mol. Biol**., v.189, p. 113–130, 1986.

STUDIER, W.F.; ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Met. Enzymol**., v.185, p. 60-89, 1990.

SUMMERS, D. W.; DOUGLAS, P. M.; RAMOS, C. R.; CYR, D. M. Polypeptide transfer from *Hsp40* to *Hsp70* molecular chaperones. **Trends Biochem. Sci**., v. 34, p. 230-233, 2009.

TABOR, S.; RICHARDSON, C.C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proc. Natl. Acad. Sci**. , v. 82, p. 1074–1078, 1985.

WANDINGER, S. K.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. The Hsp90 Chaperone Machinery. **J. Biol. Chem.,** v. 283, p. 18473–18477, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**.** Disponível em:<www.who.int>. Acesso em: 15 fev. 2011.

WEGELE, H.; MÜLLER, L.; BUCHNER, J. *Hsp70* and Hsp90 - a relay team for protein folding. Rev. Physiol. **Biochem. Pharmacol.**, v. 151, p. 1-44, 2004.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in Leishmania donovani. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, p. 3307-3316, 2001.

WOODY, R.W. Circular dichroism. **Met. Enzymol**., v. 246, p. 34-71, 1995.