



Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**Clonagem, expressão heteróloga e caracterização da
proteína de escolta da Hsp70 de *Leishmania braziliensis***

Sabrina Matos de Oliveira da Silva

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química de São Carlos,
como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências:
Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Borges

São Carlos/SP

2011

Edição revisada sob a responsabilidade da
autora, Sabrina Matos de Oliveira da Silva.

Sabrina Matos de Oliveira da Silva



Sabrina Matos de Oliveira da Silva

São Carlos, 26 de Outubro de 2011

Dedicatória

Dedico este trabalho as minhas mães, Isabel Cristina Matos e Romanilta Matos por toda força e estímulo para a conclusão deste trabalho. Obrigado por sempre poder contar com vocês.

Aos meus irmãos Raphael, Renato, Antônio e Cristiano pela amizade, companheirismo e apoio incondicional. Muito obrigado por todo o amor de vocês.

E finalmente dedico este trabalho ao meu amor maior, minha filha Beatriz Matos, primeiramente por ter me acompanhado durante nove meses desse mestrado e também por toda lição de vida e amadurecimento como mulher e ser humano.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida;

Ao Prof. Dr. Júlio César Borges pela oportunidade e orientação.

Ao Prof. Dr. Nougá Cardoso Batista, pela amizade e por sempre ter me incentivado a galgar vãos mais altas na vida. Agradeço de coração!

A Profa. Dra. Fernanda Canduri pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre que foi preciso. Agradeço de coração!

Aos meus amigos do Piauí que me receberam José Wilson, Orlando e principalmente ao Francisco Adriano por todo o ensinamento e apoio para que esse trabalho se concluísse. Agradeço imensamente.

As minhas amigas do Piauí Janete Almeida e Adriana Coêlho pela amizade e companheirismo.

A Kelly (loirão) primeiramente pela amizade e carinho que sempre demonstrou por mim. Agradeço por todos os ensinamentos científicos transmitidos, pelas boas risadas, choros e demonstração de carinho durante esses dois anos. Agradeço de coração.

A técnica do laboratório, minha inestimável Camila Rocha. Agradeço pela ajuda na realização do trabalho, pelo seu cuidado e principalmente pela amizade e cumplicidade construída. Amo.

A Nathalia Campos (minha Doula e/ou chaperone), amiga que se fez presente no momento mais importante e inesquecível de minha vida: o nascimento da minha filha Beatriz. Simplesmente você se fez inesquecível. Amo você cansadinha.

A Juliana Chelesk (ilha) e Helton José Wiggers (montanha) pela amizade construída, pelos cuidados para comigo e a Beatriz, pelo carinho e demonstração de seres humanos maravilhosos que vocês são. Os cansadinhos do meu coração.

A Francisco Edvan (companheiro de luta) pela amizade e demonstração de carinho que sempre demonstrou. Amigo e tanto. Amo cansado!

A Geraldo Rodrigues pela amizade, colaboração com o trabalho, admiração e pela tolerância para comigo. Muito, muito obrigado!

As técnicas da Biofísica IFSC-USP, Andressa e Isabel (Bel) por toda a ajuda e que me deram durante a realização deste trabalho.

A minha filha Beatriz (Babi) por tornar a minha vida mais alegre.

Aos meus pais Isabel Cristina e Pedro Silva.

As meninas da pós-graduação Silvia e Andréia que sempre se mostraram carinhosas e prestativas. Muito obrigado.

Aos meus amigos Igor, Jean, Josmar, Drica, Guiga. Cansados gente boa demais. Obrigado pela amizade!

Ao CNPq pela bolsa concedida nestes dois anos de trabalho.

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Os parasitas como a *Leishmania braziliensis*, sofrem várias mudanças morfológicas durante seu ciclo de vida, incluindo a troca de organismo hospedeiro. Durante essas mudanças, proteínas de choque térmico ou chaperones moleculares, como, por exemplo, a Hsp70, são expressas em grande quantidade. A função da Hsp70 é auxiliar no processo de enovelamento protéico, no transporte de proteínas entre as membranas e em muitas outras importantes funções celulares. A Hsp70 é auxiliada por várias proteínas denominadas como co-chaperone e a Hep1 (do inglês *Hsp70-escort protein 1*) é uma delas. Essa co-chaperone tem seu papel descrito principalmente em mitocôndrias como estabilizadoras da Hsp70 capazes de prevenir a sua agregação. O objetivo deste trabalho foi clonar, expressar, purificar e caracterizar as proteínas Hsp70 e Hep1 de *L. braziliensis* (LbHsp70 e LbHep1). Os ensaios preliminares mostraram que a LbHsp70 foi expressa de forma insolúvel, sendo necessário expressar a proteína em corpos de inclusão para tentativas de reenovelamento, afim de obter a mesma na fração solúvel. Apesar da LbHsp70 se apresentar na fração solúvel após o reenovelamento, a mesma foi purificada como agregado. Ainda na tentativa de obter a LbHsp70 na forma solúvel, a mesma foi co-expressa com a LbHep1 (expressa na forma solúvel), porém a LbHsp70 continuou na fração insolúvel do lisado bacteriano. Como a LbHep1 não apresentou a atividade esperada quando co-expressa com a LbHsp70 citoplasmática, foram feitos ensaios de co-expressão da LbHep1 com a Hsp70 mitocondrial humana, que é heterologamente expressa na forma de agregados, com o intuito de confirmar a atividade estabilizadora das Hep1 sobre as Hsp70 mitocondriais. Este experimento possibilitou a obtenção de ambas proteínas na fração solúvel, de acordo com dados apresentados na literatura para este sistema em outros organismos. Uma vez mostrada a funcionalidade da LbHep1, foi feita a caracterização desta proteína por métodos biofísicos como dicróismo circular, espectrometria de fluorescência, cromatografia de exclusão molecular analítica e ultracentrifugação analítica. Os experimentos mostraram que a LbHep1 apresenta estrutura secundária composta principalmente de folhas- β pregueadas e que o único triptofano está parcialmente exposto ao solvente. As análises hidrodinâmicas mostraram que a LbHep1 é assimétrica e em equilíbrio entre monômeros e dímeros. Por fim, dados de ultracentrifugação analítica indicam que a LbHep1 está em equilíbrio monômero-dímero.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease caused by flagellate protozoa of the genus *Leishmania*. The parasites such as *Leishmania braziliensis* undergo various morphological changes during its life cycle, including the exchange of the host organism. During these changes, heat shock proteins or molecular chaperones like Hsp70, for example, are expressed in large amounts. The function of Hsp70 is to assist in the process of protein folding, protein transport between the membranes and many other important cellular functions. The Hsp70 is assisted by several proteins called co-chaperones and the Hsp70-escort protein (Hep1) is one of them. This co-chaperone has been described based on its role as a stabilizer of mitochondrial Hsp70 preventing their aggregation. The objective of this study was to clone, express, purify and characterize the Hsp70 and Hep1 orthologues of *Leishmania braziliensis* (LbHsp70 and LbHep1). The preliminary tests showed that LbHsp70 was expressed in the insoluble form, being necessary to express the protein in inclusion bodies to attempt its refolding in order to get it in the soluble fraction. Despite LbHsp70 was obtained in the soluble fraction after refolding, it was purified as aggregates. Still trying to get the LbHsp70 in the soluble form, it was co-expressed with LbHep1 (always expressed in the soluble form), but LbHsp70 remained in the insoluble fraction of the bacterial lysate. As LbHep1 showed no expected activity when co-expressed with LbHsp70, which is cytoplasmatic, we tested if LbHep1 was able to act on human mitochondrial Hsp70 which is expressed as aggregates in bacterial heterologous systems. Then, we co-expressed LbHep1 with human mitochondrial Hsp70 which allowed obtaining both proteins in the soluble fraction, in accordance to data presented in the literature. Once the functionality of LbHep1 was showed, we characterize this protein by biophysical methods such as circular dichroism, fluorescence spectrometry, molecular exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation analysis. The experiments showed that the secondary structure features LbHep1 composed mainly of β -sheets and that the only tryptophan is partially exposed to solvent. Hydrodynamic analysis showed that the protein is asymmetric and in equilibrium between monomers and dimers. Finally, analytical ultracentrifugation data indicate that LbHep1 is a system in equilibrium monomer-dimer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	2
Figura 2: Ciclo do mecanismo da Hsp70..	7
Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das reações de PCR.....	25
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das reações de PCR de colônia.	26
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das reações de PCR de clivagens.....	27
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das reações de PCR de clivagens.....	29
Figura 7:Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da proteína LbHsp70 e LbHep1.....	30
Figura 8: Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da proteína LbHsp70 após reenovelamento.	31
Figura 9: Cromatografia de afinidade ao níquel.	32
Figura 10: SDS-PAGE 12% contendo amostra da proteína LbHsp70 após reenovelamento e a fração solúvel da LbHsp70 da cromatografia de afinidade.	32
Figura 11: Cromatografia de Exclusão Molecular da LbHsp70 após reenovelamento.	33
Figura 12: Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da expressão da proteína LbHsp70 e da co-expressão da LbHsp70 com a LbHep1..	34
Figura 13: SDS-PAGE 12% contendo amostra da expressão da proteína mtHsp70 e da co- expressão da mtHsp70 com a LbHep1.....	35
Figura 14: Cromatografia de Exclusão Molecular.	36
Figura 15: Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da proteína mtHsp70.....	36
Figura 16: Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da proteína LbHep1	38
Figura 17: Cromatografia de Exclusão Molecular	38
Figura 18: Espectro de dicroísmo circular da LbHep1 nativa.	39
Figura 19: Alinhamento da sequência de aminoácidos da Hep1 de levedura, Hep1 humana e Hep1 <i>L. braziliensis</i>	40
Figura 20: Emissão de fluorescência.....	41
Figura 21: Modelo para o domínio dedo de Zinco da Hep1.	42
Figura 22: GeL Filtração Analítica.	43
Figura 23: Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da LbHep1	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene da LbHsp70 e LbHep1 de <i>L. braziliensis</i> através de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os sítios de restrição encontram-se sobrescrito.	13
Tabela 2: Reações de ligação para o vetor pET 28a(+)	16
Tabela 3: Reações de ligação para o vetor pET 23a(+)	16
Tabela 4: Tentativas de teste de expressão realizado para a proteína LbHsp70	32
Tabela 5: Composição de estrutura secundária da LbHep1. Os valores são dados em porcentagem (%). Erro estimado em <5%	40

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo de fluorescência
f/f_0	Razão friccional
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
Å	Angström (1×10^{-10} metros)
ADP	Adenosina 5' di-fosfato
ATP	Adenosina 5' tri-fosfato
AUC	Ultracentrifugação Analítica
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
°C	Unidade de temperatura - graus Celsius
CEM	Cromatografia de exclusão molecular
DLN	Domínio de ligação ao nucleotídeo da Hsp70
DLS	Domínio de ligação ao substrato da Hsp70
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERM	Elipticidade molar residual
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
H	Histidina
Hsp	Proteína de choque térmico (<i>Heat Shock Protein</i>)
Hep	Hsp70-escort protein
Hsp40	Proteína de choque térmico de 40 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
kDa	QuiloDalton
L	Comprimento do caminho óptico
LB	Luria-Bertani
LC	Leishmania cutânea
LCD	Leishmania cutânea difusa
LMC	Leishmania muco-cutânea
LV	Leishmania visceral
MM	Massa molecular
mtHsp70	Hsp70 mitocondrial
Nm	Nanômetro (10^{-9} metros)
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
PCR	Reação em cadeia da DNA polimerase (<i>DNA Polymerase Chain Reaction</i>)

OD	Densidade óptica
PDB	Protein Data Bank
Pb	Par de bases
RMN	Ressonância magnética nuclear
R_H	Raio Hidrodinâmico
R₀	Raio de uma partícula esférica, compacta e lisa
S	Segundos
SDS	Duodecil-sulfato de sódio (<i>sodium duodecyl-sulphate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida de SDS
SE	Sedimentação em equilíbrio
SV	Velocidade de sedimentação
smHsp	Proteína de choque-térmico da família das small
WHO	World Health Organization
ZIM17	Motido Dedo de Zinco
ZIM15	Translocase de membrana interna mitocondrial

Sumário

Conteúdo

1.	Introdução	1
1.1.	Leishmaniose	1
1.2.	Chaperonas Moleculares.....	3
1.3.	Sistema Hsp70	5
1.4.	Hep1	7
2.	Objetivos	11
3.	Materiais e Métodos.....	12
3.1.	Bioinformática.....	12
3.2.	DNA genômico(gDNA)	12
3.3.	Construção dos oligonucleotídeos (Primers).....	12
3.4.	Amplificação do DNA de interesse	13
3.5.	Clonagem dos Produtos de PCR nos Vetores de Clonagem pTZ56R/T e pGEMT Reação de Ligação	14
3.6.	Transformação da bactéria <i>Echerichia. coli</i> DH5 α	14
3.7.	Análise e isolamento dos plasmídeos recombinantes	15
3.8.	Subclonagem dos plasmídeos de expressão pET28a e pET23a	16
3.9.	Expressão Heteróloga das Proteínas Recombinantes	17
3.10.	Co-expressão Heteróloga das proteínas recombinates	18
3.11.	Lise de bactérias	18
3.12.	Reenovelamento da LbHsp70	19
3.13.	Purificação das proteínas	19
3.13.1.	Cromatografia de afinidade	20
3.13.2.	Cromatografia de exclusão molecular (CEM).....	20
3.13.3.	Cromatografia de troca aniônica	21

3.13.4.	Cromatografia de afinidade por Ca^{2+} (CHT).....	21
3.14.	Determinação da concentração da proteína.....	21
3.15.	Espectrometria de Emissão de Fluorescência	22
3.16.	Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular	22
3.17.	Cromatografia de Gel Filtração Analítica ou CEM analítica.....	22
3.18.	Ultracentrifugação analítica	23
4.	Resultados e Discussão	24
4.1.	Amplificação e clonagem no vetor de propagação pTZ56R/T.....	24
4.2.	Análise de restrição e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes. .	27
4.3.	Subclonagem no Vetor de Expressão e Análise de Restrição dos Plasmídeos Recombinantes.....	28
4.4.	Expressão heteróloga das proteínas LbHsp70 e LbHep1	29
4.5.	Reenovelamento e purificação da LbHsp70.....	31
4.6.	Co-expressão da LbHsp70 com a LbHep1 e mtHsp70 com a LbHep1	33
4.7.	Purificação da LbHep1	37
4.8.	Dicroísmo Circular.....	39
4.9.	Fluorescência	41
4.10.	Cromatografia de Gel Filtração Analítica ou CEM analítica.....	43
4.11.	Dados preliminares de Ultracentrifugação Analítica	44
5.	Conclusão.....	46
6.	Referências bibliográficas	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

As leishmanioses são causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, transmitidos principalmente pela picada das fêmeas dos insetos *Lutzomyia migonei*, *L. fischerie* e *L. whitmani*, na região Sudeste do Brasil (HERWALDT, 1999; WHO, 2011). São catalogados atualmente mais de 500 espécies de insetos flebotomíneos, porém é conhecido que somente cerca de 30 destas espécies são capazes de transmitir a leishmaniose (NEVES, 2000).

Os parasitas do gênero *Leishmania* ao invadirem o hospedeiro mamífero, infectam e causam a lise de macrófagos, que geralmente são encontradas no tecido conjuntivo, no qual estes parasitas causam grande destruição (SANTOS, COUTINHO *et al.*, 2008). A leishmaniose afeta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e está presente em 88 países. Por ano estima-se que ocorra 1 a 2 milhões de novos infectados pela doença em todo o mundo.

O ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania* é constituído por dois estágios: um chamado promastigota flagelado extracelular e o outro chamado amastigota intracelular, os quais podem ser discriminados morfológicamente como demonstra a Figura 1. O inseto vetor inicia o ciclo de vida ao se alimentar de sangue de mamífero infectado, como roedores, cachorros ou o homem. Dentro do intestino do inseto ocorrem vários estágios de desenvolvimento das formas promastigotas, após se proliferarem, sendo então transmitidas ao homem no ato da picada. Após sua entrada no mamífero hospedeiro, os macrófagos rapidamente fagocitam as formas promastigotas. No interior do macrófago o parasito passa por diferenciação para o estado amastigota (LEIFSO, COHEN-FREUE *et al.*, 2007). Os macrófagos então se rompem, liberando as formas amastigotas que infectam outras células incluindo novos macrófagos. Assim, quando o inseto pica o mamífero infectado, ingere macrófagos contendo formas amastigotas do parasito, que no intestino do flebotomíneos se diferenciam em promastigotas, completando o ciclo de vida do parasito (Figura 1).

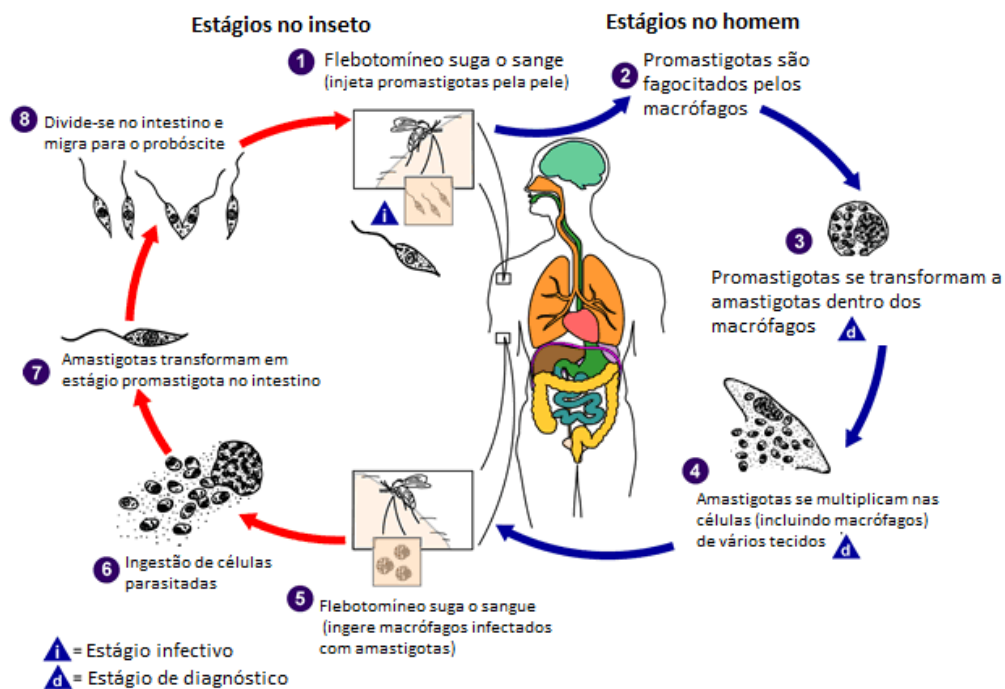


Figura 1: Ciclo de vida do parasito *Leishmania*. Figura adaptada de <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>.

A leishmaniose apresenta diferentes formas clínicas: **leishmaniose cutânea (LC)**, a forma mais comum da doença, caracterizada por úlceras únicas ou múltiplas na pele, especificamente no rosto, braço e pernas, deixando cicatrizes permanentes; **leishmaniose muco-cutânea (LMC)**, que causa úlceras na pele causando lesões destrutivas na mucosa e cartilagens, sendo as regiões mais afetadas o nariz, faringe, boca e laringe; **leishmaniose cutânea difusa (LCD)**, caracterizada pela formação de lesões difusas não ulceradas por toda a pele. Essa é a forma mais difícil de tratar, pois produzem lesões crônicas e progressivas por toda vida do paciente, não respondendo aos tratamentos convencionais; e **leishmaniose visceral (LV)**, também chamada de calazar, é a forma mais agressiva da doença, sendo fatal quando não tratada. Os principais sintomas relacionados com a calazar é a hipertrofia do baço e fígado, febre, anemia e perda de peso (NEVES, 2000).

A **LMC** tem como agente etiológico a *Leishmania braziliensis*. Um dos aspectos mais típicos da doença causada pela *L. braziliensis* é a frequência com que o parasito produz novas lesões (lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens), meses ou anos após a lesão inicial primária. Cerca de 70% dos casos com lesão de

mucosa aparecem dentro dos primeiros cinco anos após a lesão cutânea primária. Atualmente a **LMC** nas Américas está presente principalmente nos países localizados entre os trópicos.

Atualmente, o tratamento para a **LMC** é realizado com fármacos desenvolvidos na década de 40, como a glucantima e a pentamidina, mas com considerável sucesso (AMATO, TUON *et al.*, 2007; GONZALEZ, PINART *et al.*, 2009). No entanto, novos fármacos têm sido desenvolvidos, com menor índice de efeitos colaterais e contra-indicações, mas sem um ensaio padronizado aleatório para confirmar a eficiência. Esse panorama tem promovido, não só um grande número de publicações de estudos de caso, mas também tratamentos que não são baseados em evidências. Essa abordagem populariza tratamentos que podem ser inúteis para o público, pacientes, instituições educacionais e centro de treinamento médicos. Infelizmente, poucos estudos têm poder estatístico para determinar um tratamento ideal para a LMC, e uma grande parte destes é projetada para encontrar doses apropriadas dos fármacos em teste (AMATO, TUON *et al.*, 2007).

Assim, faz-se necessário o estudo de proteínas relacionadas com a leishmaniose, uma vez que a caracterização e validação de novos alvos terapêuticos se torna importante para o desenvolvimento de futuros fármacos contra a doença devido a ineficiência e limitada forma atual de tratamento da leishmaniose.

1.2. Chaperonas Moleculares

A função de uma proteína depende da estrutura nativa obtida a partir de sua sequência de aminoácidos por um processo denominado de enovelamento protéico (JAENICKE, 1999). Entretanto, algumas proteínas podem interagir umas com as outras em condições de estresse (alta concentração ou choque térmico), através de regiões hidrofóbicas expostas e formar agregados protéicos, que tendem a precipitar *in vivo* e *in vitro* (BEISSINGER e BUCHNER, 1998). As células têm desenvolvido, durante a evolução, mecanismos de prevenção e controle de qualidade para evitar a agregação de proteínas como a síntese de proteínas de choque térmico (Hsp do inglês *Heat Shock Proteins*) e/ou chaperonas moleculares. As chaperonas moleculares e seus mecanismos de regulação têm sido considerados bons alvos terapêuticos para tratamentos de diversos tipos de doenças (WESTERHEIDE e MORIMOTO, 2005).

As Hsps pertencem a várias famílias que são classificadas de acordo com sua massa molecular mensurada em kilodalton (kDa), como por exemplo as pequenas Hsp (smHsp), Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp100 (NEUER, 2000; BORGES e RAMOS, 2005). As Hsp receberam esse nome, pois em sua descoberta acreditava-se que eram preferencialmente expressas sob condições de estresse térmico.

Essa classe de proteínas auxilia o enovelamento e mantêm a função de outras proteínas. Atuam na prevenção da agregação, transporte de proteínas por membranas, em vias de degradação de proteínas, entre outro (MAYER, BREHMER *et al.*, 2001; HARTL e HAYER-HARTL, 2002; WEGELE, MULLER *et al.*, 2004). O enovelamento incorreto ou formação de agregados protéicos induz a morte celular e causas doenças degenerativas como mal de Huntington, Alzheimer, esclerose amiotrófica lateral e mal de Parkinson (HISHIYA e TAKAYAMA, 2008).

Chaperonas moleculares fazem o reconhecimento de estruturas não nativas pela identificação de regiões hidrofóbicas expostas nas mesmas. Desta forma, ela atua se ligando a essas regiões, evitando que as mesmas realizem interações intra e intermoleculares incorretas, o que levaria, por exemplo, à agregação (HARTL, 1996).

O enovelamento estável para se iniciar corretamente, requer pelo menos o polipeptídeo linear completo de um domínio da proteína. Como o C-terminal (~30 aminoácidos) está estruturalmente coberto pelo ribossomo durante a sua síntese, a cadeia nascente deve permanecer desenovelada até que o domínio inteiro seja traduzido. Um início de enovelamento nessa etapa pode levar à formação de estruturas secundárias instáveis. Desta forma, células em crescimento precisam manter a grande população de cadeias nascentes, particularmente sensíveis à agregação, em uma conformação susceptível ao enovelamento. Isso é alcançado pela ligação de chaperones durante a construção dos polipeptídeos (HARTL, 1996).

Na tentativa de desenvolver novas formas de controle de doenças como malária, *leishmaníase* e Doenças de Chagas, foram feitos o sequenciamento dos genomas de alguns destes agentes etiológicos como *Leishmania major* (IVENS, PEACOCK *et al.*, 2005), *Trypanosoma cruzi* (EL-SAYED, MYLER *et al.*, 2005), *Plasmodium falciparum* (HALL, PAIN *et al.*, 2002) entre outros. Devido à grande importância das chaperonas no processo de enovelamento das proteínas *in vivo*, foram localizados nestes genomas, genes codificantes para as várias chaperonas moleculares (ACHARYA, KUMAR *et al.*, 2007), ressaltando assim, a relevância de estudar tais proteínas destes microorganismos,

uma vez que poucos estudos estruturais e funcionais têm sido desenvolvidos com proteínas destes microorganismos (PAVITHRA, BANUMATHY *et al.*, 2004; PAVITHRA, KUMAR *et al.*, 2007).

1.3. Sistema Hsp70

Dentre as várias chaperonas moleculares, está a proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70) que tem posição de destaque, pois desempenha funções essenciais no metabolismo de proteínas. As Hsp70 agem como pivô, recebendo e distribuindo proteínas desenoveladas (ou substratos) entre as demais chaperonas moleculares (BORGES e RAMOS, 2005). O sistema Hsp70 e suas co-chaperonas (Hsp40 e fatores de troca de nucleotídeos) formam uma das famílias de chaperonas moleculares mais importantes, participando de funções essenciais para o metabolismo protéico (DA SILVA e BORGES, 2011). Elas estão envolvidas no enovelamento de proteínas pela ligação a polipeptídeos recém-sintetizados auxiliando seu enovelamento, na prevenção da agregação induzida por diferentes tipos de estresses e na recuperação de proteínas de agregados (MAYER, BREHMER *et al.*, 2001; WEGELE, MULLER *et al.*, 2004).

Além das funções previamente citadas, as Hsp70 estão envolvidas em outras funções, nas quais o enovelamento de proteínas não está necessariamente envolvido, como o transporte de proteínas por membranas para a degradação protéica, na estabilização de fatores de transcrição celular, entre outras (HARTL e HAYER-HARTL, 2002; WEGELE, MULLER *et al.*, 2004).

Os protozoários *Tritryps*, como a *L. brasiliensis*, sofrem várias mudanças morfológicas durante seu ciclo de vida, incluindo o processo de troca de organismo hospedeiro (inseto vetor e o mamífero hospedeiro). Durante essas mudanças, proteínas de choque térmico, como, por exemplo, a Hsp70 são expressas em grande quantidade, um indício de que são fundamentais para modificações morfológicas do parasita (LOUW, LUDEWIG *et al.*, 2010).

As Hsp70 apresentam massa molecular de aproximadamente 70 kDa e pode ser separada em dois domínios: domínio de ligação do nucleotídeo (DLN) e domínio de ligação do substrato (DLS). O DLN apresenta uma região N-terminal, com cerca de 45 kDa, o qual apresenta fraca atividade ATPase (Figura 2). Este é ligado ao domínio de ligação do substrato (DLS) de massa molecular de 25 kDa, onde o substrato se liga efetivamente. Estes dois domínios são interligados por uma ponte de cerca de oito resíduos de

aminoácidos, sendo quatro resíduos de leucina sequenciais. O DLS é subdividido em uma região (concha) contendo predominantemente fitas- β , onde se localiza o sítio de ligação do substrato, e uma longa hélice- α , que funciona como uma tampa, prendendo o substrato à concha. É importante ressaltar o caráter monomérico das Hsp70, que difere das demais chaperonas, que são oligoméricas. As diferentes funções desenvolvidas pelas Hsp70 são resultado do mecanismo alostérico heterotrópico bidirecional entre o domínio DLN e DLS (DA SILVA e BORGES, 2011).

Os nucleotídeos ATP e ADP induzem mudanças conformacionais no DLN, que são transmitidos para o DLS. Por outro lado, a ligação de um polipeptídeo no DLS também induz mudanças conformacionais no sentido inverso. Quando o ATP se encontra ligado ao DLN, os domínios encontram-se acoplados uns aos outros, ao contrário de quando o ADP está ligado. O resultado final desta troca de informações entre os domínios é uma mudança na constante de associação e dissociação do substrato no DLS. A ligação do ATP induz mudanças conformacional no DLS que resultam em um aumento na taxa de troca do substrato, indicando um afastamento da tampa em relação à concha. O substrato se liga a esse sistema preferencialmente quando o ADP está ligado ao DLN ou não existe nenhum nucleotídeo ligado a este domínio (DA SILVA e BORGES, 2011).

As Hsp70 são capazes de se ligar a polipeptídeos contendo de 5 a 8 aminoácidos hidrofóbicos em sequência. A cadeia principal desses aminoácidos faz ligações de hidrogênio com o sítio de ligação do substrato enquanto a cadeia lateral hidrofóbica ocupa uma cavidade hidrofóbica no mesmo sítio. Como dito anteriormente a afinidade do DLS pelo substrato é diretamente influenciada pelo nucleotídeo ligado ao DLN. A ligação do substrato ao DLS induz hidrólise do ATP no DLN sugerindo um alosterismo recíproco entre os dois domínios (Figura 2) (DA SILVA e BORGES, 2011).

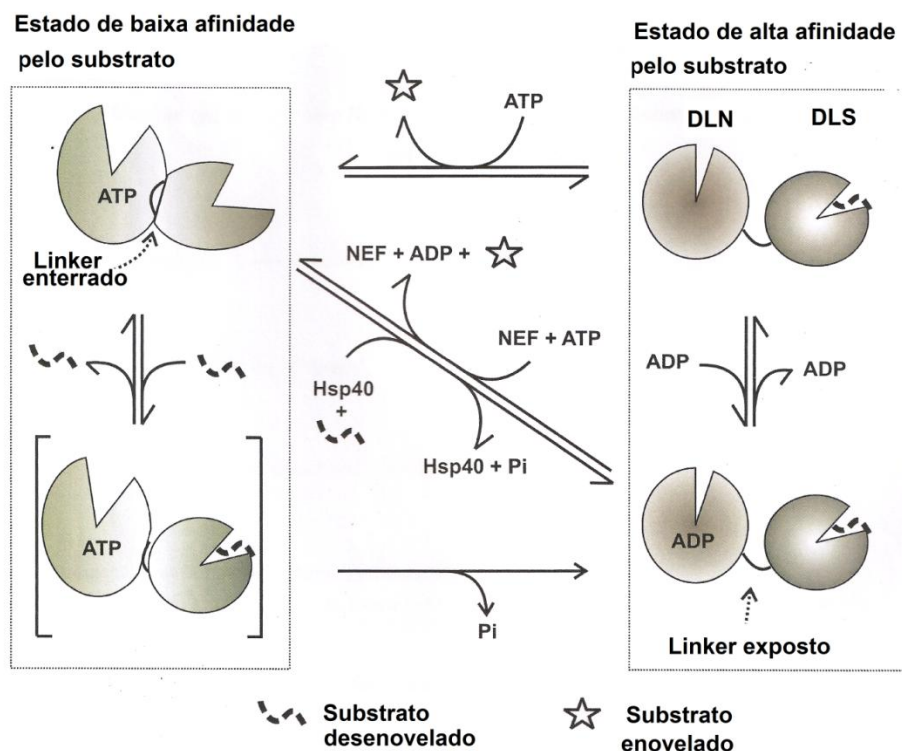


Figura 2: Ciclo do mecanismo da Hsp70. Ilustração de seu comportamento alostérico adaptada de DA SILVA, K. P.; BORGES, J. C. (2011).

1.4. Hep1

Dentre as várias co-chaperonas moleculares da Hsp70, destaca-se a Hep1 (do inglês *Hsp70-escort protein 1*). A Hep1 tem sido apontada como essencial para a manutenção da solubilidade e da função das Hsp70 mitocondriais (mtHsp70), pelo menos em levedura e humano (BURRI, VASCOTTO *et al.*, 2004).

A Hep1, também denominada de motivo dedo de zinco (ZIM17) ou translocase de membrana interna mitocondrial (TIM15), é caracterizada pela presença de *zinc-finger*, essencial para a sua função. Esse dedo de zinco é caracterizado nessa proteína por quatro resíduos de cisteína que coordenam um íon de zinco, formando uma estrutura tetraédrica. O zinco foi mostrado como tendo um papel estrutural importante para a atividade da proteína, sendo que a sua retirada leva a uma desestruturação e inativação da mesma (MOMOSE, OHSHIMA *et al.*, 2007; ZHAI, STANWORTH *et al.*, 2008).

Atualmente existe somente uma estrutura tridimensional de proteínas do tipo Hep1 depositada no PDB, que é a de *Saccharomyces cerevisiae*, resolvida por ressonância

magnética nuclear (RMN) (MOMOSE, OHSHIMA *et al.*, 2007). Essa estrutura de RMN mostrou o núcleo da proteína no formato de um L com o *Zinc-finger* em uma das pontas (MOMOSE, OHSHIMA *et al.*, 2007). Devido ao fato de o N-terminal dessa proteína ser bastante flexível e desestruturado, essa região foi retirada por mutação durante os ensaios, de modo que a estrutura da proteína com todos os aminoácidos continua desconhecida. Testes *in vivo* mostram que a yHep1, sem esses aminoácidos, apresentam-se ativa e funcional, sem perda de atividade quando comparado com a atividade da proteína selvagem.

A mtHsp70, em mamíferos, também é conhecida como mortalina, nomenclatura esta que se deve ao fato desta proteína ter sua atividade associada à morte celular e senescência em células de rato, quando descrita pela primeira vez em sistemas *in vivo* (WADHWA, KAUL *et al.*, 1993). Neste estudo foi observada a presença da mortalina tipo 1 (MOT1) no lisado celular. Estudos subsequentes demonstraram a existência da mortalina tipo 2 (MOT2), que exibe mutação de dois aminoácidos em relação a MOT1, suficiente para ter sua função associada a imortalidade das células. No ser humano, a mortalina encontrada tem a sua função descrita semelhante a MOT2, não sendo observada a presença da MOT1 (KAUL, DEOCARIS *et al.*, 2007).

A mtHsp70 é de grande interesse científico por estar relacionada com um possível alvo para o tratamento do câncer (SOTI, 2000), pelo fato de esta proteína estar envolvida em diversos processos celulares. Alguns estudos apontam que as mesmas podem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças como mal de Parkinson e Alzheimer, as quais estão relacionadas com agregação de proteínas no interior das células (SOTI, 2002; KAUL, DEOCARIS *et al.*, 2007).

A mtHsp70 possui, dentre outras, a função de importação de proteínas para o interior da mitocôndria, geração de energia para o processo de importação e auxílio no reenovelamento de proteínas (BURRI, VASCOTTO *et al.*, 2004). A maioria das proteínas mitocondriais é sintetizada no citosol onde, os polipeptídeos hidrofóbicos devem permanecer desenovelados ou parcialmente enovelados, para atravessar as membranas que constitui a mitocôndria e só posteriormente alcançar sua estrutura final enovelada, já no interior da mitocôndria (YAMAMOTO, MOMOSE *et al.*, 2005).

A mitocôndria possui duas membranas (membrana externa e membrana interna), que divide a organela em quatro compartimentos diferentes: membrana externa, espaço inter-membrana, membrana interna e matriz, onde cada um destes espaços possui seu

próprio conjunto de proteínas (BOHNERT, PFANNER *et al.*, 2007). O portão de entrada inicial para praticamente todas as proteínas mitocondriais é o translocase de membrana externa (complexo TOM). A partir daí, a proteína de entrada pode ir para outras maquinarias de transporte como o complexo importador e montador para espaço intermembrana mitocondrial (MIA), translocador de membrana interna (TIM23, TIM22), motor associado a translocase de pré-sequência (PAM), e maquinaria de ordenamento e montagem (SAM).

Proteínas de membrana com múltiplas sequências-sinal interna, como carreadores de metabólitos, são transferidas do complexo TOM, com ajuda do complexo de chaperonas TIM para o complexo TIM23, também denominado translocador de carreadores, que é responsável por integrar essas proteínas na membrana interna (BOHNERT, PFANNER *et al.*, 2007).

A grande maioria das proteínas portadoras de pre-sequências são importadas através da membrana interna para a matriz. Assim que a pre-proteína é separada da TOM22 com ajuda da proteína 21 do complexo TIM (Tim21), é inserida no canal formado pela proteína 23 do mesmo complexo (Tim23). A travessia pela membrana é dependente de uma associação com um motor movido a ATP, denominado complexo PAM, cujo componente central é a mtHsp70, responsável por transportar pre-proteínas para a matriz mitocondrial às custas de hidrólise de ATP.

Como se trata de um processo de elevado custo energético, é necessário que esse processo seja regulado por um grande número de proteínas regulatórias, neste caso, também denominadas de co-chaperonas. Algumas dessas co-chaperonas são denominadas fatores de troca de nucleotídeos da mtHsp70, como a Mge1, proteína encontrada na matriz da mitocôndria. Além dessa, existe também a Pam18 que foi mais tarde reconhecida como uma estimulante da atividade ATPásica da mtHsp70, e é regulada pela presença da Pam16, com a qual forma complexo e se torna inativa. A proteína Hep1 (Zim17/Tim15) também foi proposta que estivesse envolvida diretamente na importação de proteínas para a matriz, porém dois estudos subsequentes (SICHTING, MOKRANJAC *et al.*, 2005; SZKLARZ, GUIARD *et al.*, 2005) mostraram que essa proteína age indiretamente nesse processo, na prevenção de agregação da mtHsp70.

É sabido que na mitocôndria das células que são deficientes em Hep1 ocorre o acúmulo de agregados insolúveis de mtHsp70. Assim, pode-se dizer que a Hep1 atua como uma chaperona de uma chaperona molecular, sendo necessária e suficiente para

prevenir a auto agregação e, assim, manter a função das chaperonas mtHsp70 (SICHTING, MOKRANJAC et al., 2005). No entanto, há controvérsia com relação a real localidade dessa interação entre as duas proteínas. Alguns estudos citam que a Hep1 interage com o DLN em qualquer um dos estados conformacionais da mtHsp70, com ou sem nucleotídeo ligado, em especial na ausência de nucleotídeo, (conformação na qual existe uma alta tendência de agregação) (MOMOSE, OHSHIMA et al., 2007)(ZHAI, STANWORTH et al., 2008), inibindo assim, a agregação da mtHsp70 tanto *in vitro* como *in vivo*. Essa interação ocorre por meio do arco menor (interno) do L, que possui dois resíduos carregados positivamente, nas proximidades do dedo de zinco (MOMOSE, OHSHIMA et al., 2007).

Porém, outros autores enfatizam a importância do *linker* da mtHsp70 que liga os dois domínios (DLN ao DLS). Esse linker executa um importante papel na comunicação dos dois domínios, como exercer efeitos no DLN estimulando a atividade ATPásica. Além disso, essa interação do linker com o domínio DLN induz a mtHsp70 a uma conformação susceptível a agregação proteica, sendo com essa conformação que a Hep1 interagiria prevenindo assim a agregação da mtHsp70 (BLAMOWSKA, SICHTING et al., 2010).

2. OBJETIVOS

Baseando-se na pouca eficiência dos tratamentos atuais para a Leishmaniose, faz-se necessário o estudo de proteínas relacionadas com esta doença, uma vez que a caracterização e validação de novos alvos terapêuticos se torna importante para o desenvolvimento de futuros fármacos contra a doença devido à ineficiência e limitada forma atual de tratamento da leishmaniose. Assim os objetivos propostos foram:

- i)** Clonar o DNA das chaperonas moleculares Hsp70 e Hep1 de *L. braziliensis* a partir do DNA genômico (gDNA) em vetores de expressão;
- ii)** Expressar heterologamente e purificar as chaperonas moleculares LbHsp70 e LbHep1;
- iii)** Avaliar as propriedades de estrutura secundária e terciária da proteína LbHsp70 e da LbHep1 através das técnicas de dicroísmo circular, fluorescência e cromatografia de exclusão molecular;
- iv)** Avaliar a funcionalidade da LbHep1 em solubilizar e estabilizar a LbHsp70 e a mortalina

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Bioinformática

As ferramentas de bioinformática foram usadas para identificar a sequência de DNA molde para as proteínas de interesse, dentre elas o banco de dados GenBank do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) e o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Para selecionar as sequências de DNA das proteínas alvo do projeto, foi feito um alinhamento entre as sequências de DNA dos parasitas de *L. braziliensis* e as correspondentes em humanos, utilizando a ferramenta de bioinformática LALIGN para avaliar a identidade entre diferentes sequências de aminoácidos. Para calcular o coeficiente de absorvidade e algumas propriedades físico-química das proteínas em estudo, foi utilizado a sequência de aminoácidos das proteínas pelo programa ProtParam Tool (ca.expasy.org/tools/protparam.html).

3.2. DNA genômico(gDNA)

O gDNA de *L. braziliensis* foi gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Ângela Kaysel Cruz (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP).

3.3. Construção dos oligonucleotídeos (Primers)

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados com base na sequência de nucleotídeos das proteínas-alvo do protozoário (código de acesso GenBank: MHOM/BR/75/M2904 para LbHsp70 e XM_001565523 para a LbHep1), nos quais foram inseridos sítios para as enzimas de restrição (Tabela 1). A escolha dos sítios de restrição foi baseada na ausência dos mesmos no DNA codificante de interesse e na utilização dos sítios de restrição comuns aos vetores de expressão pET23a(+) para a LbHep1 e pET28a(+) para a LbHsp70. Porém a LbHep1 que é uma proteína mitocondrial, apresenta em sua sequência de aminoácido, peptídeos sinal, os quais são responsáveis pela sinalização celular e seu transporte para o interior da mitocôndria. Para a expressão heteróloga da Hep1, essa região de peptídeo sinal foi clivada da sequência de nucleotídeos, obtendo assim a sequência codificante para a estrutura madura da proteína, a qual foi utilizada para desenhar os primers.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene da LbHsp70 e LbHep1 de *L. braziliensis* através de PCR. Os sítios de restrição encontram-se sobrescrito.

Oligonucleotídeos	Enzimas de restrição	Sequências dos oligos 5'-3'
Lb-Hsp70F_Fw	<i>Nde</i> I	AATCATATGACGTTTCGAGGGCGCCAT
Lb-Hsp70R_Rv	<i>Hind</i> III	TATAAGCTTAGTCAACGTCTTCAGCGTG
Lb-HspHep1F_Fw	<i>Nde</i> I	TCCCGCCATATGTGCTCAACTG
Lb-HspHep1R_Rv	<i>Eco</i> R I	TAGAATTCACGGAGAGGATGCACCC

3.4. Amplificação do DNA de interesse

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada no equipamento *MyCycler Thermal Cycler* (BioRad) com a enzima *Taq DNA polymerase High Fidelity* (Fermentas) que apresenta atividade corretiva. A amplificação do DNA codificante da LbHsp70 que possui 2000 pb foi realizada utilizando-se 10 μ M de cada oligonucleotídeo, 20 ng de gDNA da *L. braziliensis*, dNTP-mix (*New England BioLabs*) e tampão (10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl e 1,5 mM de $MgCl_2$), resultando em um volume final de 50 μ L. A reação de PCR se iniciou com a desnaturação das fitas de DNA que se encontrava incubada a 95 °C por 5 minutos, seguida por 36 ciclos de 95 °C por 1 minuto para a desnaturação. Em seguida, diferentes temperaturas de anelamento (50-60,2 °C) foram testadas por 1 minuto seguido pela incubação da reação a 72 °C por 2 minutos para a etapa de extensão. O ensaio terminou com uma incubação a 72 °C por 10 minutos para a terminação. Um protocolo similar foi utilizado para amplificar o DNA da LbHep1, que possui 530 pb com o tempo de extensão de 1 minuto devido ao tamanho do inserto. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0.8% (m/v) preparado com tampão TAE: Tris-Acetato 40 mmolL⁻¹ e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 1 mmol/L (pH 8,0). Após a aplicação do DNA no gel, este foi submetido a uma diferença de potencial de 110 Volts, por aproximadamente 30 minutos. Em seguida o gel foi incubado em tampão descrito acima, contendo 0,1 μ g/mL de brometo de etídio, por 20 minutos, e visualizado no *Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro* acoplado a um computador, para permitir o registro das imagens dos géis. A determinação da concentração de DNA foi feita através da comparação entre a intensidade da banda de DNA marcado com brometo de etídio e a intensidade de bandas padrão de DNA (*GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder* – Fermentas). O produto de PCR foi extraído do gel e purificado usando o *QIAGEN Quick Gel Extraction Kit* (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante.

3.5. Clonagem dos Produtos de PCR nos Vetores de Clonagem pTZ56R/T e pGEMT Reação de Ligação

O sistema pTZ57R/T (Fermentas) e pGEMT Easy vector (Promega) é um kit que contém um plasmídeo linear que possui uma deoxitimidina (T) em cada uma de suas extremidades, permitindo assim a inserção direta do produto de PCR adenilado, pela enzima T4 DNA ligase. A circularização do DNA pela inserção do produto de PCR é denominada plasmídeo recombinante o qual será posteriormente introduzido dentro da bactéria *E. coli* visando a propagação plasmidial. A reação de ligação do inserto referente a LbHep1 foi preparada empregando-se um volume final de 30 μL constituídos de 2 μL de produto de PCR a 22 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 1 μL da enzima T4 DNA ligase (1 U/ μL), 6 μL do tampão de ligação (5X) e 1 μL da solução contendo o vetor pTZ57R/T a 50 $\text{ng} \mu\text{L}^{-1}$. Um protocolo semelhante foi utilizado para realizar a ligação do inserto LbHsp70, porém utilizando o vetor pGEMT. Utilizou-se água Milli-Q para completar o volume total. Estas reações foram incubadas a 4°C por 20 horas. As misturas de ligação foram utilizadas na transformação por choque térmico de células competentes *E.coli* DH5 α por tratamento com CaCl_2 .

3.6. Transformação da bactéria *Echerichia. coli* DH5 α

A transformação das células competentes de *E. coli* DH5 α foi realizada por choque térmico. As suspensões de células competentes DH5 α encontravam-se estocadas no freezer a -80°C. As mesmas foram retiradas e deixadas em repouso no gelo por 20 minutos para descongelar. Para cada alíquota de 100 μL de célula competente DH5 α foram adicionadas 15 μL de reação de ligação. Cuidadosamente as misturas foram homogeneizadas e mantidas em repouso no gelo por 30 minutos. Em seguida, foram submetidas a choque térmico em banho de água a 42 °C por 2 minutos e subsequente banho de gelo por 3 minutos. Após este período 400 μL de meio Luria-Bertani (LB) foram adicionados nos tubos contendo as células transformadas com as reações de ligação. A suspensão de bactérias foi agitada a 225 rpm por 45 minutos a 37 °C e plaqueadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio seletivo LB sólido contendo 100 μM de ampicilina, 100 μM de X-Gal e 0,5 μM de IPTG; e incubadas na estufa a 37 °C por 16 horas.

3.7. Análise e isolamento dos plasmídeos recombinantes

Após o período de incubação, algumas colônias brancas que seriam possíveis recombinantes ou clones positivos, foram selecionadas para realizar a extração de seus DNAs plasmidiais. Para analisar e confirmar a presença dos plasmídeos contendo o inserto de interesse, as colônias foram submetidas a PCR de colônia, análise de restrição e sequenciamento automático. A técnica de PCR de colônia consiste na realização de uma reação de PCR utilizando uma colônia como molde para a amplificação do gene. As colônias brancas selecionadas foram diluídas em 20 μ L de água e aquecidas a 95 °C para a extração do DNA plasmidial, obtendo assim, material para realizar a PCR de colônia. Em seguida, estas mesma colônia foram utilizadas para inocular meio LB líquido contendo 100 μ g/mL de ampicilina, processo esse denominado pré-inóculo. Todas estas etapas foram realizadas em meio estéril.

As reações de PCR foram montadas contendo: tampão da enzima (10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl e 1,5 mM de $MgCl_2$), 0,5 unidade de enzima *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), dNTP mix 0,2 Mm (Promega), os primers do vetor pTZ57R/T M13F e M13R e os primers do vetor pGEMT T7_{PROM} e SP6 e água Milli-Q para completar o volume de 10 μ L. O ciclo da reação de PCR é o mesmo descrito no item 4.4 com temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos igual a 50 °C. Para checar a presença dos clones positivos as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% (m/v). Os plasmídeos recombinantes foram purificados com GeneJET TM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, os mesmos foram submetidos a uma análise de restrição onde os recombinantes referentes à LbHsp70 foram digeridos com as enzimas *Nde* I e *Hind* III na presença do tampão que apresenta máxima eficiência para as duas enzimas e os recombinantes referentes à LbHep1 foram digeridos com *Nde* I e *EcoR* I na presença do tampão eficiente para as duas enzimas. Estas reações foram mantidas em banho térmico de água a 37 °C por 4 horas. Os insertos das reações de digestão referentes à LbHep1 e LbHsp70 foram purificadas utilizando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Os produtos de digestão foram analisados em gel de agarose preparativo 0,8% e visualizados sob luz UV. Este procedimento foi necessário para a obtenção de quantidade suficiente dos insertos de interesse com extremidades coesivas adequadas para subclonagem nos vetores de expressão, previamente digeridos com as mesmas endonucleases de restrição.

O sequenciamento de DNA foi realizado no Laboratório de Biofísica no Instituto de Física de São Carlos (IFSC), utilizando-se o método do didesoxinucleotídeo marcado (*dideoxy chain termination method*) com auxílio de um sequenciador automático 3130 *Genetic Analyzer Applied Biosystems*, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.8. Subclonagem dos plasmídeos de expressão pET28a e pET23a

Para a subclonagem no sistema pET, os vetores pET23a(+) e pET28a(+) foram clivados com as enzimas de restrição adequadas. O pET23a(+) foi clivado com *NdeI* e *EcoRI* que foram usadas para a digestão do plasmídeo recombinante pTZ57R/T::LbHep1 e o pET28a(+) foi clivado com *NdeI* e *HindIII* que corresponde as enzimas de restrição usadas na digestão do plasmídeo pGEMT::LbHsp70. Após a digestão os vetores e os insertos apresentam extremidades coesivas que se ligam através de uma reação de ligação na presença da enzima T4 DNA ligase (Fermentas). As ligações foram preparadas no volume final de 30 µL utilizando 100 ng de cada vetor e o inserto na proporção 3:1 (inserto: vetor) de acordo com a equação 1. As reações de ligação referentes à LbHsp70 e LbHep1 estão apresentadas nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

$$\frac{ng\ vetor \times kb\ inserto}{kb\ vetor} \times \frac{3}{1} = ng\ de\ inserto \quad \text{Equação 1}$$

Tabela 2: Reações de ligação para o vetor pET 28a(+)

	Ligação controle	Ligação (3:1)*
pET 28a(+)(~100 ng/µL)	10 µL	10 µL
Insert <i>LbHsp70</i> (~112ng/µL)	-	11 µL
T4 DNA ligase (1U/µL)	1 µL	1µL
Tampão T4 (10x)	3 µL	3 µL
H ₂ O	5 µL	5 µL
Volume total	30 µL	30 µL

*Proporção inserto:vetor

Tabela 3: Reações de ligação para o vetor pET 23a(+)

	Ligação controle	Ligação (3:1)*
pET 23a(+)(~100 ng/µL)	10 µL	10 µL
insert <i>LbHep1</i> (~27ng/µL)	-	2,7µL
T4 DNA ligase (1U/µL)	1 µL	1µL
Tampão T4 (10x)	3 µL	3 µL
H ₂ O	5 µL	5 µL
Volume total	30 µL	30 µL

*Proporção inserto:vetor

Estas reações foram mantidas a 16 °C por 12 horas. As novas misturas de ligação foram utilizadas na transformação por choque térmico de células competentes de *E. coli* DH5α para nova propagação plasmidial como descrito no item 4.6, porém com algumas modificações. Foram utilizados para transformar as células competentes por choque térmico os volumes totais referentes às misturas de ligação. As células transformadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo 50 µg/mL do antibiótico de seleção canamicina para a construção pET28a(+):LbHsp70 e 100 µg/mL do antibiótico ampicilina para a construção pET23a(+):LbHep1 e incubados durante toda a noite a 37 °C em estufa. Uma vez confirmada a presença dos DNAs plasmidiais nestas células e análise dos novos recombinantes pET23a(+):LbHep1 e pET28a(+):LbHsp70 feita de acordo com o procedimento descrito no item 4.7, os mesmos foram utilizados na transformação por choque térmico de células competentes de *E. coli*/BL21(DE3) para expressão heteróloga.

3.9. Expressão Heteróloga das Proteínas Recombinantes

Para os ensaios de expressão das construções pET23a(+):LbHep1 e pET28a(+):LbHsp70 foram feitos pré-inóculos das colônias resultantes das transformações de células *E. coli* BL21(DE3). Algumas colônias isoladas contendo cada uma destas construções foram escolhidas aleatoriamente e em seguida foram inoculadas, individualmente, em 5 mL de meio LB líquido contendo canamicina (50 µg/mL) para a construção pET28a(+):LbHsp70 e ampicilina (100 µg/mL) para a construção pET23a(+):LbHep1. Os inóculos referentes às duas construções foram crescidas durante toda a noite sob agitação constante de 250 rpm a 37 °C. Os pré-inóculos foram diluídos na proporção 1:100 em 1L de meio LB líquido contendo canamicina para a construção contendo o pET28a e ampicilina para a construção do pET23a e incubados sob agitação de 250 rpm a 37°C até atingir a OD₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. Depois de atingido este crescimento celular, alíquotas de 1mL foram retirados de cada frasco, representando os controles não induzidos. Em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 40 µL de água Milli-Q e congeladas a -20 °C. O restante das culturas de células foram induzidos com IPTG. Foi adicionado 0,1 mM de IPTG na indução da LbHsp70 e 0,3 mM para a indução LbHep1 e o crescimento foi mantido por um período de 5 horas a 30 °C. Após esse período novamente alíquotas de 1mL foram retiradas de cada frasco representando a fração induzida. As culturas induzidas restantes foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 min a 4 °C em centrífuga *High-Speed*

Refrigerated Centrifuge (HITACHI). Os sedimentos bacterianos obtidos de cada 1 L de cultura induzida foram congelados a -80 °C e descongelados antes do uso.

3.10. Co-expressão Heteróloga das proteínas recombinates

A co-expressão das proteínas foi realizada com construções contendo vetores diferentes, sendo necessário o uso de antibióticos diferentes. Primeiramente 4 µL (~100 ng/µL) de cada construção pET28a(+):LbHsp70 (vetor resistente ao antibiótico canamicina) e pET23a(+):LbHep1 (vetor resistente ao antibiótico ampicilina) foram transformadas por choque térmico na mesma célula *E. coli* BL21(DE3) em um protocolo semelhante ao descrito no item 4.6, porém com algumas modificações. As células transformadas foram plaqueadas, neste caso, em placas de Petri contendo 50 µg/mL do antibiótico de seleção canamicina e 100 µg/mL do antibiótico ampicilina. Em seguida foi usado mesmo protocolo descrito no item 4.9, porém sempre colocando os dois antibióticos, ampicilina e canamicina. Um protocolo igual foi utilizado para realizar a co-expressão da pET28a(+):mtHsp70 com a pET23a(+):LbHep1.

3.11. Lise de bactérias

O sedimento bacteriano contendo as proteínas LbHsp70 e LbHep1 foram lisados com auxílio de sonicador *Sonifier 450* (Branson) em tampão de lise distintos para cada plasmídeo recombinante. Para a construção pET28a(+):LbHsp70 foi utilizado tampão contendo Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, KCl 100 mmol/L e para a construção pET23a(+):LbHep1 foi utilizando tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, KCl 100 mmol/L e EDTA 1 mmol/L (15 mL/L de cultura). Em seguida foram incubados durante 30 minutos em gelo com 5U de DNase RQ1 RNase-Free DNase (Promega) e 30 µg/mL de lisozima (Sigma). A seguir, foram lisadas com o sonicador *Sonifier 250* (Branson) por meio de 6 pulsos de 20 segundos com intervalos de 2 minutos e as frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação à 24.100xg, por 30 min, à 4°C usando a centrífuga *High-Speed Refrigerated Centrifuge* (HITACHI). O sobrenadante referente a LbHep1 foi submetido à diálise contra tampão contendo 10 mM Tris-HCl e 20 mM NaCl (pH 8,0). O dialisado foi filtrado em filtro Millipore 0,45 µm. O sobrenadante referente à LbHsp70 foi filtrado para a cromatografia de afinidade. As amostras referentes a indução, fração solúvel e insolúvel separados pela centrifugação foram analisados em SDS-PAGE 12%.

3.12. Renovelamento da LbHsp70

A proteína LbHsp70 foi expressa à 42°C por 5 h com adição de 0.1mM de IPTG. Após o período de indução as bactérias foram lisadas e homogeneizada com tampão Tris-HCl 50 mM, KCl mM e EDTA 1Mm pH 8,0 e adição de lisozima (1 mg/mL). Em seguida à reação, as bactérias foram incubadas por 30 min e após esse tempo o rompimento das mesmas foi feito pelo método de congelamento e descongelamento (“Freeze-thaw”) e sonicação. Foram realizados cinco ciclos de sonicação de 10’ (com intervalos de 2 min) à 40 Htz. O isolamento dos corpos de inclusão foi realizado através de múltiplos passos de lavagem até se obter um sedimento com características de cor branca a bege. Uma vez isolado os corpos de inclusão os mesmos foram solubilizados com tampão de solubilização contendo Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 e cloridrato de guanidina 6 M. Essa mistura foi mantida sob agitação branda à temperatura ambiente durante 90 mim e depois, centrifugadas a 20.000 x g por 15 min para a sedimentação do material insolúvel precipitado. O sobrenadante foi então acondicionado em saco de diálise e dialisado contra tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,2) e NaCl 100 mM. Inicialmente a diálise foi realizada contra um volume de tampão equivalente a quatro vezes o volume inicial da amostra que era de 20 mL, durante 1h sob agitação lenta a 4°C. Após esse período aumentou-se o volume do tampão para oito vezes o volume inicial da amostra mantendo a diálise por mais 2h. Transcorrido esse tempo, foi adicionado mais tampão equivalente a 10 vezes o volume inicial da amostra e prosseguiu a diálise durante toda a noite (“*overnight*”). No dia seguinte a amostra contida no saco de diálise foi centrifugada a 24.000 x g por 15 min a 4 °C para a remoção do material insolúvel.

3.13. Purificação das proteínas

Para identificar e isolar proteínas faz-se uso de métodos cromatográficos através de sucessivos fracionamentos de acordo com algumas propriedades físico-químicas da proteína como: solubilidade, carga iônica (pI) e MM. A cromatografia é um método físico-químico de separação, fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações feitas com as fases móvel e a fase estacionária. A fase móvel corresponde ao solvente e a fase estacionária é constituída de um material imóvel acondicionado na coluna cromatográfica (como resinas carregadas, camadas porosas entre outros).

3.13.1. Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade em metal foi a primeira etapa de purificação para a construção pET28a(+):LbHsp70 que foi expressa em fusão com um peptídeo de 20 aminoácidos, contendo 6 aminoácidos de Histidina, denominado cauda de poli-histidina (His-Tag). Essa cauda confere à proteína, em pH apropriado, afinidade por íons bivalentes carregados positivamente. Os íons metálicos são imobilizados pelo uso de um agente quelante capaz de disponibilizar o metal para ligação com a proteína.

Para essa etapa foi utilizada a coluna *Hitrap Chelating* de 5 mL (*Amersham Biosciences*) acoplada ao sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) utilizando o equipamento AKTA Purifier (GE). Inicialmente foi feita uma preparação na coluna por meio de lavagem correspondentes a dois volumes de coluna com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, pH 7,4. Após a injeção da amostra a ser purificada, foi feita uma nova lavagem como descrito acima para eluição da fração não ligante. A eluição da proteína foi feita através da lavagem com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, pH 7,4. O imidazol que também possui afinidade pelo níquel, compete com os aminoácidos histidina pela ligação à resina, possibilitando a eluição da proteína. As frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE 12%.

3.13.2. Cromatografia de exclusão molecular (CEM)

Após a primeira etapa de purificação, as frações coletadas e analisadas no gel SDS-PAGE correspondentes a um volume de 10 mL foram concentradas em um concentrador Millipore 10 Mw para um volume final de 2 mL e submetidas a uma segunda etapa de purificação denominada cromatografia de exclusão molecular (CEM). Esta técnica de separação utiliza colunas empacotadas com polímeros contendo esferas de tamanho específico que formam uma rede tridimensional de poros proporcionando assim, a separação das moléculas em solução de acordo com seu tamanho (MM). As matrizes destas colunas permitem que as proteínas que apresentam maior MM migrem mais rapidamente do que proteínas com menor MM. Isso ocorre devido a não interação destas com os poros, enquanto as proteínas de MM menor permeiam por entre os poros da matriz e são eluídas mais lentamente.

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada a temperatura ambiente utilizando a coluna HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade (*Amersham Biosciences*) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento AKTA Purifier (GE). O tampão

utilizado foi o Tris-HCl 25 mM contendo 100 mM de NaCl, pH 7,5. Essa técnica cromatográfica foi utilizada para purificar as duas proteínas LbHsp70 e LbHep1.

3.13.3. Cromatografia de troca aniônica

Para a construção pET23a(+):LbHep1 que foi expressa sem uma cauda de polihistidina fusionada, a primeira etapa de purificação foi a técnica de cromatografia de troca aniônica. Essa técnica cromatográfica baseia-se no pI da LbHep1 (5,15) que possui cargas negativas em pH 7,5 permitindo assim a ligação da proteína em resinas constituídas por grupos funcionais de cargas positivas. Para a realização desta técnica cromatográfica utilizou-se a coluna Macro-prep(R) High Q Support resin (BioRad) acoplada ao sistema ÄKTA Prime Plus device (GE Healthcare). Foi realizada uma eluição por gradiente salino, sendo para isso utilizado dois tampões, tampão A (10 mM Tris-HCl, 20 mM tampão NaCl, pH 8,0) e tampão B (10 mM Tris-HCl, 500 mM tampão NaCl, pH 8,0). O gradiente realizado foi de 0 a 100% de tampão B em um volume de 100 mL. Após a identificação dos tubos que continham a LbHep1 por meio de gel SDS-PAGE 12%, o conteúdo destes dos tubos foi reunido e submetido a uma diálise contra tampão 10 mM de fosfato (pH 7,4).

3.13.4. Cromatografia de afinidade por Ca^{2+} (CHT)

A segunda etapa de purificação da LbHep1 foi realizada em uma resina CHTTM Ceramic Hydroxyapatite Type II resin (BioRad) acoplada ao ÄKTA Prime Plus device (GE Healthcare). Realizou-se novamente um gradiente 0 à 100% de tampão B em 100 mL, sendo que o tampão A continha 10 mM e o tampão B, 500 mM de fosfato (pH 7,4).

3.14. Determinação da concentração da proteína

A concentração da proteína foi determinada por espectrofotometria. A medida foi feita em uma faixa de comprimento de onda λ que variou de 250 a 320 nm, para a determinação da absorbância da proteína em 280 nm. Após a subtração do branco a leitura foi utilizada para estimar a concentração de proteínas pela equação de Beer-Lambert (equação 2).

$$A = \varepsilon \times l \times C \quad (\text{Equação 2})$$

Onde A é a leitura de absorbância; l , comprimento do caminho ótico em centímetros e C , concentração em mol/L. A concentração molar determinada foi multiplicada pelo fator

de diluição. O valor encontrado de ϵ à 280 nm foi $9970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, sendo determinado a partir da sequência de aminoácidos da LbHep1 pelo programa Sednterp (www.jphilo.mailway.com/download.htm). A concentração molar determinada foi multiplicada pelo fator de diluição.

3.15. Espectrometria de Emissão de Fluorescência

O experimento de emissão de fluorescência foi realizado no F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (HITACHI) do Laboratório de Biofísica Molecular do IQSC do Prof. Dr. Marcel Tabak. O comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) foi de 280 nm e 295 nm. A LbHep1 encontrava-se numa concentração de $22 \mu\text{molL}^{-1}$ em tampão fosfato 25 mmolL^{-1} (pH 7,0) contendo 50 mM de NaCl e 1 mM β -Mercaptoetanol.

3.16. Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular

Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). O equipamento utilizado para realização dos experimentos foi um Jasco J-810 com uma cubeta com 1 mm de passo óptico. A concentração da proteína variou de 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato 25 mM (pH 7,0), contendo 50 mM NaCl e 1 mM β -mercaptoetanol. A predição da estrutura secundária da LbHep1 foi feita utilizando o programa CDNN Deconvolution (BOHM, MUHR *et al.*, 1992).

Os valores obtidos na leitura de CD (mdeg) foram convertidos para elipticidade molar residual (EMR) definida pela equação 3.

$$EMR = (\theta \times MM)/(c \times l \times n): \quad (\text{equação 3})$$

Onde θ é a elipticidade em graus (Deg), MM é a massa molecular da proteína (g/mol), c é a concentração da proteína (mg/mL), l é o comprimento do caminho óptico (cm) e n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína.

3.17. Cromatografia de Gel Filtração Analítica ou CEM analítica

Para realizar o experimento de CEM analítica, foi usada a coluna *Superdex 200 GL 10/300* (Amersham Biosciences) acoplada ao sistema de FPLC, utilizando o equipamento *AKTA Purifier* (GE). O padrão de proteínas utilizado continha as proteínas: apoferritina (480 kDa), λ -globulina (160 kDa), albumina de soro bovino (BSA 67 kDa), ovoalbumina (45

kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e citocromo c (12,3 kDa). As cromatografias foram feitas no tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM e β-mercaptoetanol 5 mM.

Em seguida foram realizados os ensaios de Gel Filtração Analítica, tais ensaios são baseados na migração de um padrão de proteínas, onde através dos volumes de eluição do padrão é possível se construir curvas que seguem um modelo matemático linear e, assim, determinar a MM aparente a partir de um gráfico de K_{av} (equação 4) versus $\log MM_{padr\tilde{a}o}$ e o R_H versus $-\log K_{av}^{1/2}$.

$$K_{av} = \frac{(V_{elui\tilde{c}a}o - V_0)}{(V_{total} - V_0)} \quad \text{Equa\tilde{c}a\~{o} 4}$$

Onde V_e é o volume de eluição de cada proteína, V_0 é o volume da fase móvel e V_t é o volume de coluna total.

3.18. Ultracentrifugação analítica

As análises de velocidade de sedimentação utilizando a técnica de AUC, foram realizadas em um equipamento *Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge* (Beckman Coulter) no LNBio, em temperatura constante de 20°C, utilizando o rotor AN- 60Ti (Beckman Coulter) e a varredura da absorbância em função do raio foi realizada em comprimentos de onda de 230 a 238 nm dependendo da concentração de proteína. A velocidade do rotor foi de 32.000 rpm, temperatura de 20 °C, tampão Tris 25 mM (pH 8,0) NaCl 100 mM e foram coletadas 120 curvas.

Os programas utilizados para análise dos resultados foi primeiramente o SedFit (SCHUCK, 1998; SCHUCK, 2000) para determinação do coeficiente de sedimentação. Os dados de V_{bar} , densidade e viscosidade do tampão foram estimados através da sequência de aminoácidos da LbHep1 feito pelo programa SednTerp.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amplificação e clonagem no vetor de propagação pTZ56R/T

Para a amplificação dos DNAs referentes às proteínas LbHsp70 e LbHep1 foi utilizado o gDNA do protozoário. Inicialmente foi feita uma análise da qualidade do gDNA através de leitura em espectrofotômetro (A_{260}/A_{280}), onde foi observado que o mesmo apresentava rendimento adequado para realizar os experimentos.

Os oligonucleotídeos desenhados com base nas sequências de nucleotídeos da LbHsp70 e LbHep1 foram utilizados para amplificação dos genes de interesse. Nesses oligonucleotídeos também denominados de primers foram inseridos sítios de restrição que permitem sua subclonagem nos vetores de expressão. Contudo, vale ressaltar que estes sítios de restrição inseridos nos oligonucleotídeos preservam seus códons originais de iniciação e terminação garantindo assim, a amplificação correta do DNA que codifica a proteína. A temperatura de anelamento do par iniciador (F_w e R_v) foi calculada teoricamente através do programa *Gene Runner* a fim de garantir que esses iniciadores apresentassem temperaturas próximas. Isso evita a formação de estruturas como dímeros e grampos que podem tanto acarretar em suas auto-complementariedade, resultando na obtenção de subprodutos, como também diminuir a perda da eficiência da reação. A temperatura ótima determinada pelo programa ficou em torno de 55°C para LbHsp70 e 65° para a LbHep1.

Determinada a temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos foi montado um protocolo para a realização de PCR, onde foi feito um gradiente de temperatura tanto para a LbHsp70 quanto para a LbHep1 como descrito na metodologia.

A Figura 3 ilustra as amplificações referentes a LbHsp70 e LbHep1 e seus respectivos produtos de 2000 e 530 pb.

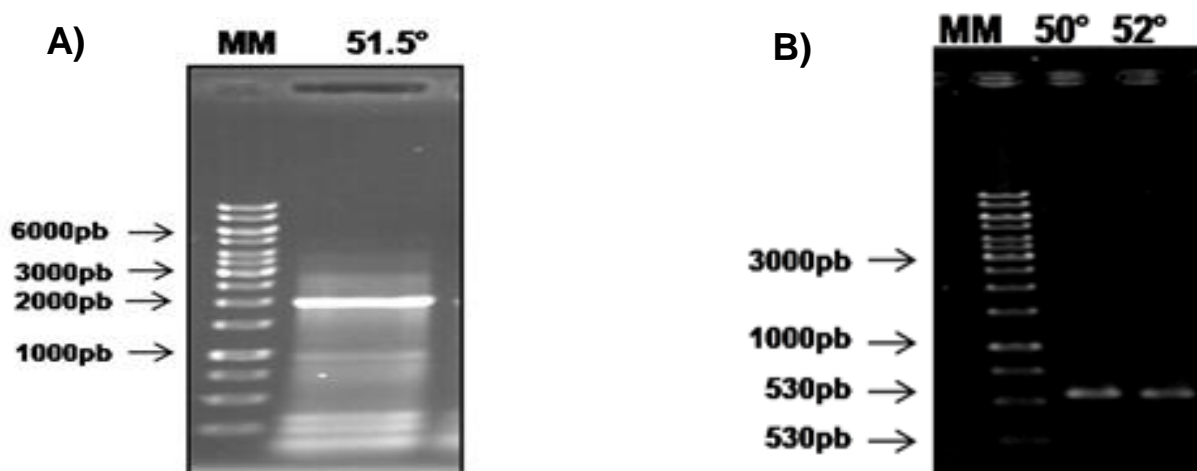


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das reações de PCR. A) Amplificação do inserto referente a LbHsp70 (~2000pb) com temperatura de anelamento de 51,5°C. **B)** Amplificação do inserto referente a LbHep1 (~530pb) com temperatura de anelamento de 50° e 52°C. Os fragmentos de DNA no gel foram visualizados em transiluminador UV a 365 nm. Padrão de massa molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas).

Os produtos referentes às amplificações da LbHsp70 e LbHep1 foram cuidadosamente cortados, purificados e quantificados como descrito no item 4.4 de Materiais e Métodos. Foram obtidas concentrações de produtos que variaram de 10 a 25 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Estes produtos devidamente adenilados durante a reação de PCR foram inseridos no vetor de clonagem pTZ56R/T e pGEMT obtendo assim, as construções pGEMT::LbHsp70 e pTZ57R/T::LbHep1. Este sistema é muito empregado para clonar produtos de PCR por facilitar a seleção dos clones. O vetor pTZ57R/T e pGEMT apresenta duas marcas de seleção ao longo de sua sequência: 1) um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina; 2) um outro gene que codifica para a proteína β -galactosidase localizada no sítio múltiplo de clonagem.

Os plasmídeos recombinantes pGEMT::LbHsp70 e pTZ57R/T::LbHep1 foram inseridos em cepas competentes DH5 α de *E. coli* competentes por choque térmico. As bactérias foram transformadas e devidamente cultivadas em placa de Petri contendo meio LB Agar.

Diversas colônias brancas e azuis cresceram na placa contendo o meio seletivo. A seleção dos transformantes foi baseada na capacidade que tiveram em crescer na presença do antibiótico ampicilina e na coloração das colônias, onde algumas apresentaram coloração branca indicando a presença do inserto dentro da região codificadora da β -galactosidase.

Dentre todas as colônias brancas resistentes quatro referentes à construção pTZ57R/T::LbHep1 e quatro referentes à construção pGEMT::LbHsp70 foram escolhidas para análise dos recombinantes, realizada por meio de PCR de colônia (Figura 4). Para isso, foram utilizados os oligonucleotídeos M13F (GTAAAACGACGGCCAGTG) e M13R (GGAAACAGCTATGACCATG) para a construção pTZ57R/T::LbHep1 e os oligonucleotídeos T7_{PROM} (TAATACGACTCACTATAGGG) e SP6 (TACGATTTAGGTGACACTATAG) para a construção pGEMT::LbHsp7.0. Esses primers se anelam nos respectivos vetores. Em seguida os clones confirmados por PCR foram inoculados com o antibiótico ampicilina e incubados *overnight* sob agitação constante de 250 rpm. Após o crescimento destas colônias os DNAs plasmidiais foram extraídos, purificados e quantificados para posterior análise de restrição e confirmação da presença do inserto. Após confirmação da liberação do inserto os plasmídeos recombinantes foram sequenciados.

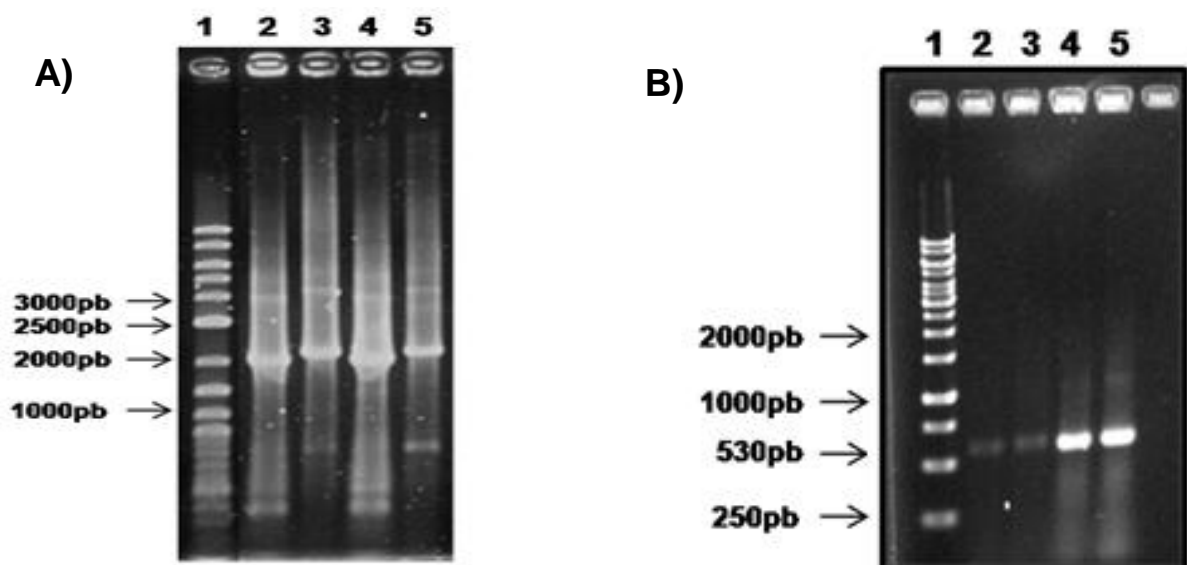


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das reações de PCR de colônia. A) PCR de colônia referente a LbHsp70 (~2000pb). **B)** PCR de colônia referente a LbHep1 (~530pb). A temperatura de anelamento foi de 50 °C para ambas as reações. **1)** Padrão de massa molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); **2)** colônia 1; **3)** colônia 2; **4)** colônia 3; **5)** colônia 4. Os fragmentos de DNA no gel foram visualizados em transiluminador UV a 365 nm.

Observa-se na figura 4A, que a amplificação do inserto referente à LbHsp70 amplificou fragmentos inespecíficos como na primeira amplificação apresentada na figura 3. Contudo, novamente a banda referente a LbHsp70 foi a que apresentou maior

intensidade quando comparada com as demais. Já os plasmídeos recombinantes referente à LbHep1 (Figura 4B), foram amplificados com sucesso, assim como na primeira PCR realizada.

4.2. Análise de restrição e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes.

Os DNAs plasmidiais referentes às construções pGEMT::LbHsp70 e pTZ57R/T::LbHep1, após serem purificados e quantificados apresentaram concentrações de $115 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e $98 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ respectivamente. Os plasmídeos purificados foram submetidos a uma análise de restrição, a fim de confirmar a liberação do inserto dos clones selecionados. A Figura 5 mostra os testes de clivagem com liberação dos insertos desejados.

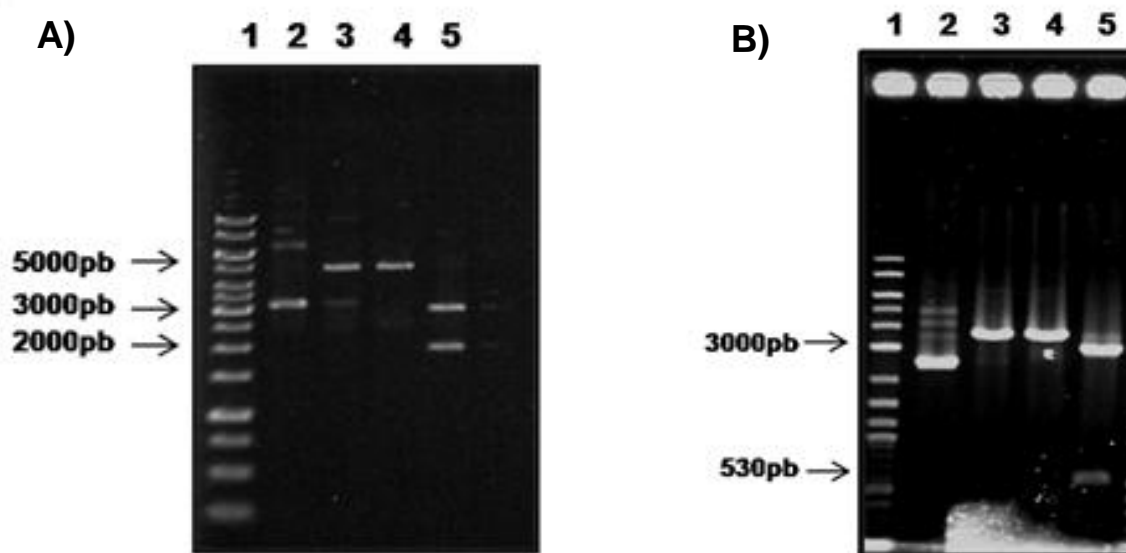


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das reações de PCR de clivagens. A) Clivagem do plasmídeo recombinante pGEMT::LbHsp70. **1)** padrão de massa molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); **2)** plasmídeo recombinante pTZ57R/T::LbHsp70 fechado; **3)** plasmídeo clivado com *Nde* I; **4)** plasmídeo clivado com *Hind* III; **5)** plasmídeo clivado com *Nde* I e *Hind* III. **B)** Clivagem do plasmídeo recombinante pTZ57R/T::LbHep1. **2)** plasmídeo recombinante pTZ57R/T::LbHep1 fechado; **3)** plasmídeo clivado com *Nde* I; **4)** plasmídeo clivado com *Eco*R I; **5)** plasmídeo clivado com *Nde* I e *Eco*R I.

O tamanho dos insertos liberados confirmou o sucesso das etapas de clonagem e transformação das bactérias para ambos os genes que foram então devidamente preparados para o sequenciamento. Os produtos da digestão de 2000 pb corresponde a LbHsp70 e o de 530 pb à LbHep1, foram retirados do gel, purificados utilizando novamente o *kit* QIAgen quick Gel Extraction Kit (Qiagen), quantificados e utilizados na etapa de

subclonagem nos vetores de expressão. Estas amostras de DNA após serem quantificadas, apresentaram em geral concentrações de $150 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para a LbHsp70 e de $220 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para a LbHep1.

As sequências resultantes do sequenciamento foram alinhadas com a sequência original de nucleotídeos referente a LbHep1 e LbHsp70 através do programa *Lalign Serve* (www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html). Os plasmídeos recombinantes pGEMT::LbHsp70 e pTZ57R/T::LbHep1 apresentaram os DNAs de interesse inseridos com orientação e fase de leitura corretas dentro dos vetores pTZ57R/T e pGEMT garantindo assim a integridade destes clones e a posterior leitura eficiente de todas as bases dos fragmentos na etapa de expressão proteica.

4.3. Subclonagem no Vetor de Expressão e Análise de Restrição dos Plasmídeos Recombinantes

Os fragmentos de DNA que codificam para a proteína LbHsp70 e LbHep1 foram subclonados em vetores de expressão. O DNA da LbHsp70 foi subclonado no vetor de expressão pET28a(+) que expressa as proteínas de interesse fusionadas com uma cauda de seis histidinas (His-Tag) para facilitar na purificação. Já a LbHep1 foi estrategicamente subclonado no vetor de expressão pET23a(+) que possui resistência a um antibiótico diferente do vetor pET28a(+), possibilitando assim realizar testes de co-expressão com as duas proteínas. Os plasmídeos recombinantes recém- construídos, foram novamente inseridos por choque térmico em bactérias de *E coli* DH5 α competentes, semeadas em placas semelhante ao processo anterior, porém com antibióticos distintos para cada construção. No caso da construção pET28a(+):LbHsp70 foi utilizado o antibiótico canamicina e para a construção pET23a(+):LbHep foi utilizado a ampicilina. Finalmente foram incubados a 37 °C para crescimento. As colônias formadas foram avaliadas através da análise de restrição.

Após o crescimento individual dos recombinantes pET28a(+):LbHsp70 e pET23a(+):LbHep1 na presença dos seus respectivos antibióticos canamicina e ampicilina, seus DNAs foram extraídos, purificados e quantificados. Para análise de restrição uma alíquota referente a cada plasmídeo recombinante foi retirada para clivagem através das enzimas de restrição (Figura 6).

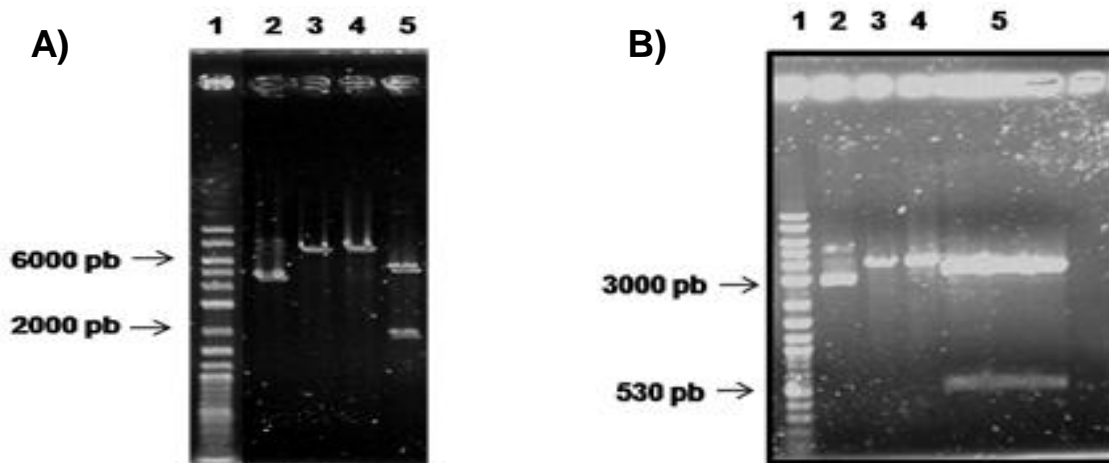


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) das reações de PCR de clivagens. A) Clivagem do plasmídeo recombinante pET28a(+):LbHsp70; 1) padrão de massa molecular 1kb DNA Ladder (Fermentas); 2) plasmídeo recombinante pET28a(+):LbHsp70 fechado; 3) plasmídeo clivado com *Nde* I; 4) plasmídeo clivado com *Hind* III; 5) plasmídeo clivado com *Nde* I e *Hind* III. **B)** Clivagem do plasmídeo recombinante pET23a(+):LbHep1; 2) plasmídeo recombinante pET23a(+):LbHep1 fechado; 3) plasmídeo clivado com *Nde* I; 4) plasmídeo clivado com *Eco*R I; 5) plasmídeo clivado com *Nde* I e *Eco*R I.

A liberação dos insertos confirmaram o sucesso da subclonagem e transformação das bactérias e os genes foram então novamente preparados para sequenciamento. Os plasmídeos recombinantes LbHsp70::pET28a(+) e LbHep1::pET23a(+) foram transformados em bactérias *E. coli* BL21(DE3) para os ensaios de expressão subsequentes.

4.4. Expressão heteróloga das proteínas LbHsp70 e LbHep1

Inicialmente foram realizados testes de expressão para as duas proteínas LbHsp70 e LbHep1 utilizando a temperatura de 30 °C e variando o tempo de indução e concentração de IPTG, com o intuito de encontrar a melhor condição para expressão das proteínas. Para a LbHep1 a melhor condição foi utilizando 0,3 mM de IPTG já para a LbHsp70 foi utilizado 0,1 mM de IPTG. A melhor temperatura para a indução das duas proteínas foi de 30 °C.

Passado o período de indução de 5 horas, as células bacterianas resultantes foram recuperadas por centrifugação e lisadas na presença de tampão de lise Tris-HCl e DNase (Promega). Os extratos protéicos referentes a LbHep1 e LbHsp70 foram avaliados quanto a sua solubilidade em SDS-PAGE. A Figura 7 mostra o gel de SDS-PAGE de 12% obtidas após submeter as amostras a condições desnaturantes.

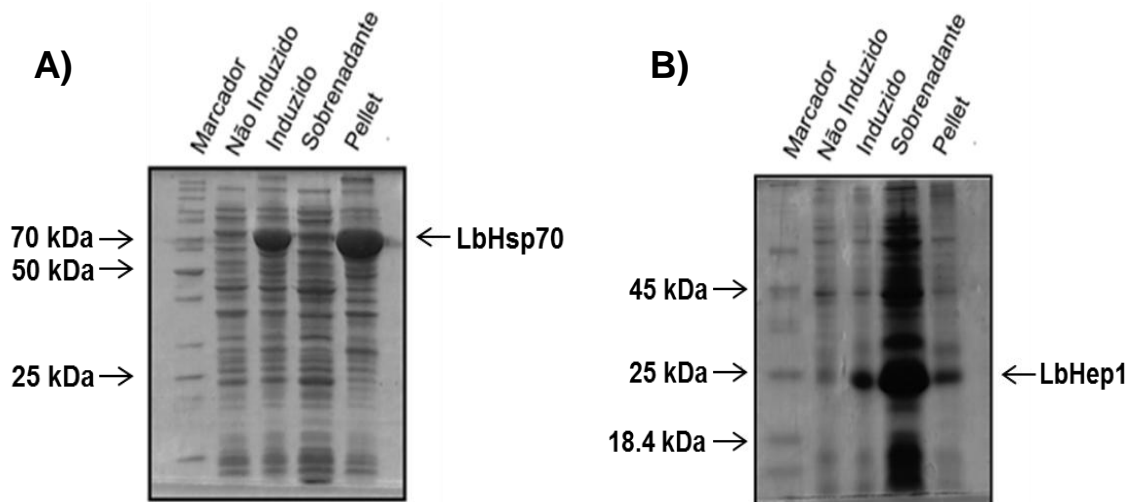


Figura 7:Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da proteína LbHsp70 e LbHep1. A) Indução da proteína LbHsp70 com 0,1 mM de IPTG a 30 °C durante 5h. **B)** Indução da LbHep1 com 0,3 mM de IPTG a 30 °C durante 5h. Marcador: MM *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Fermentas);

Como apresentado na figura 7 o nível de indução foi avaliado por SDS-PAGE. A LbHep1, que apresenta massa molecular teórica de 19 kDa migrou como uma banda de ~25 kDa, comportamento também observado com proteínas da mesma classe já produzidas. A proteína LbHep1 foi expressa de forma solúvel e em grande quantidade, com apenas uma pequena quantidade aparecendo na fração insolúvel inferindo o sucesso da clonagem e expressão da proteína. Já a LbHsp70, que apresenta massa molecular de ~70 kDa, foi induzida de forma insolúvel. Mesmo depois de testar diferentes protocolos de expressão como apresentado na tabela 4, a proteína não apresentou perfil diferente da primeira expressão, se mantendo em grande parte insolúvel.

Tabela 4: Tentativas de teste de expressão realizado para a proteína LbHsp70.

Estratégia	Condição experimental
Cepas	BL21(DE3), BL21(DE3) plysS e BL21(DE3) Rp
Concentração de IPTG	0,1 mM, 0,2 mM e 0,3 mM
Temperatura de expressão	16° C overnight, 30° C durante 5h e 42° C durante 5h
Lise de células	Lise química (30 µg/mL) e Lise física (6 pulsos de 15'' com intervalo de 2') Lise por congelamento-descongelamento (“Freeze-thaw”)
Tampão de Lise	Tris-HCl 50 mM; KCl 100 mM; EDTA 50 Mm; pH 8,0 Tris-HCl 25 mM; KCl 100 mM pH 8,0 Tris-HCl 20 mM; KCl 250 mM; 5% de Glicerol; pH 8,5

4.5. Reenovelamento e purificação da LbHsp70

Na tentativa de obter a LbHsp70 solúvel, a proteína foi expressa em corpos de inclusão a uma temperatura de 42 °C por 5h, para posterior solubilização por meio de um agente desnaturante (cloridrato de guanidina) e reenovelamento por diálise.

O isolamento e solubilização dos corpos de inclusão foi feito por um processo de múltiplos passos de lise e lavagens sendo possível assim, obter a proteína de forma solúvel (Figura 8).

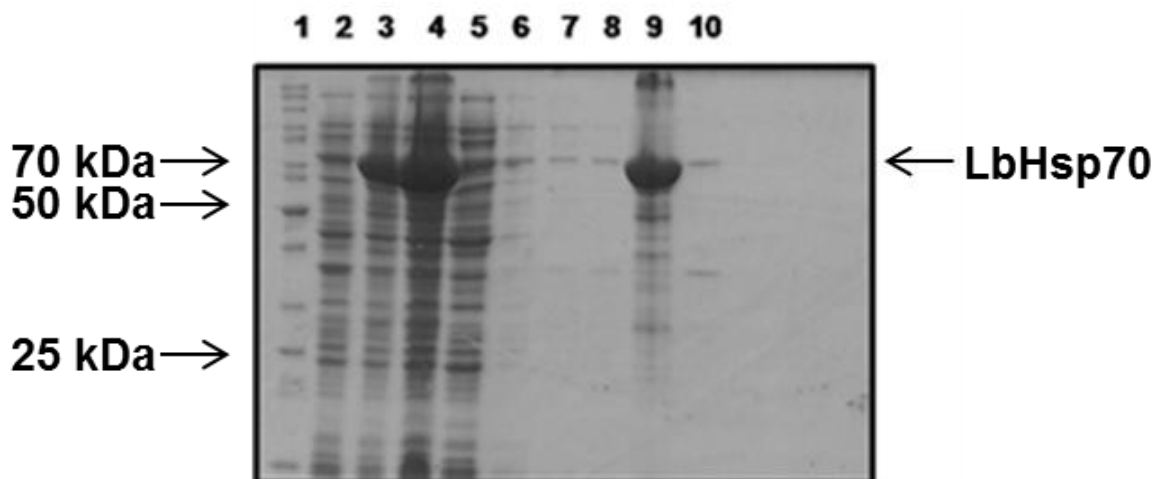


Figura 8: Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da proteína LbHsp70 após reenovelamento. 1) Marcador: MM PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); 2) Fração não indução; 3) Fração induzida; 4) Fração do lisado; 5) Fração da 1º lavagem; 6) Fração da 2º lavagem. 7) Fração da 3º lavagem; 8) Fração da 4º lavagem; 9) Fração solúvel e 10) Fração insolúvel.

Como apresentado na figura 8 após o reenovelamento por diálise a proteína LbHsp70 se encontra na fração solúvel, permitindo assim dar início a purificação da mesma. A fração solúvel foi submetida ao primeiro passo de purificação através da cromatografia de afinidade ao níquel (Figura 9).

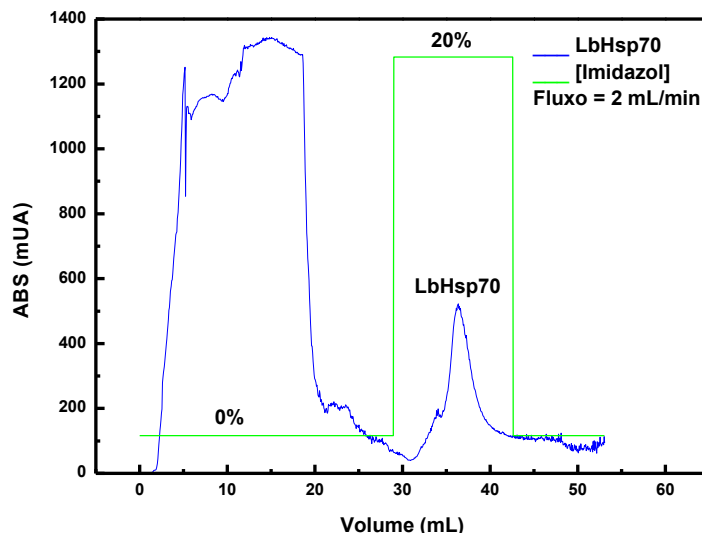


Figura 9: Cromatografia de afinidade ao níquel. Foi utilizada a coluna HiTrap de 5mL previamente carregada com níquel e acoplada ao AKTA Purifier. A proteína foi eluída pelo tampão Fosfato de Sódio 20 mM, Cloreto de Sódio 0,50 mM e Imidazol 126 mM.

A fração eluída durante o processo de cromatografia referente à LbHsp70 foi analisada em SDS-PAGE (Figura 10)

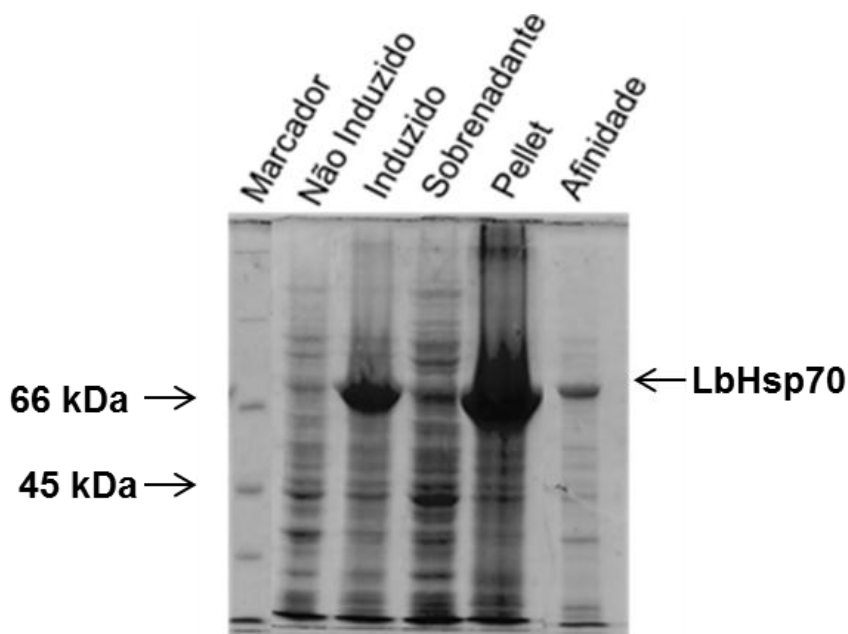


Figura 10: SDS-PAGE 12% contendo amostra da proteína LbHsp70 após reenovelamento e a fração solúvel da LbHsp70 da cromatografia de afinidade. A fração da LbHsp70 referente a cromatografia de afinidade foi eluída com 20% do tampão: Fosfato de Sódio 20 mM, NaCl 0,5 M e Imidazol 500 mM. Marcador: MM PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas).

Estes resultados mostram que a primeira etapa de purificação foi realizada com sucesso, uma vez que a proteína se ligou ao níquel e foi eluída com o tampão contendo 500 mM de Imidazol dado este identificado na SDS-PAGE. Assim, foi possível dar início a uma nova etapa de purificação. A fração da proteína LbHsp70 purificada da cromatografia de afinidade foi então concentrada utilizando o concentrador Amicon Ultra 10.000 MWCO (Millipore) e aplicada na CEM, cujo resultado está apresentado na figura 11.

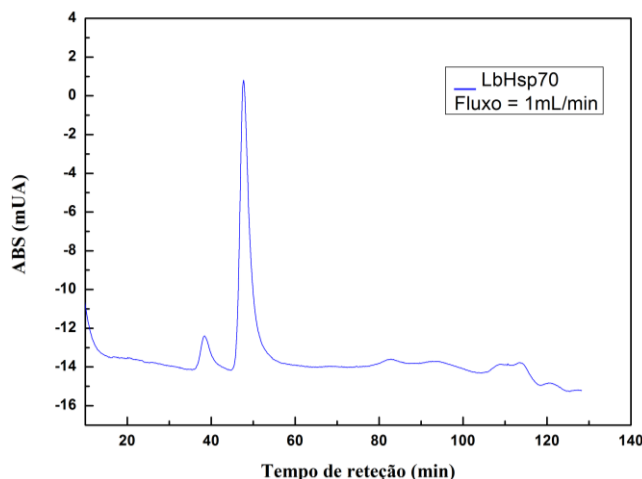


Figura 11: Cromatografia de Exclusão Molecular da LbHsp70 após reenovelamento. CEM preparativa para a proteína LbHsp70 em coluna HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade acoplada ao AKTA Purifier. Tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM; pH 7,5.

Verificando o cromatograma e analisando o perfil de eluição da LbHsp70 pode-se concluir que, embora tenha sido possível purificar, ela se encontrava sob a forma de agregados, pois saiu no volume próximo ao V_0 da coluna, que é de aproximadamente 40 mL.

Ainda na tentativa de obter a LbHsp70 solúvel foram feitos testes de co-expressão juntamente com a LbHep1.

4.6. Co-expressão da LbHsp70 com a LbHep1 e mtHsp70 com a LbHep1

A princípio as duas construções pET28::LbHsp70 e pET23::LbHep1 foram co-expressas na mesma bactéria BL21(DE3). Alíquotas de cada plasmídeo foram misturadas na cepa *E.coli* BL21(DE3) para co-expressão. A indução foi feita com 0,3 mM de IPTG durante 5 h a fim de testar se a LbHep1 interage com a LbHsp70 solubilizando a mesma. Os dados de co-expressão estão apresentados na Figura 12.

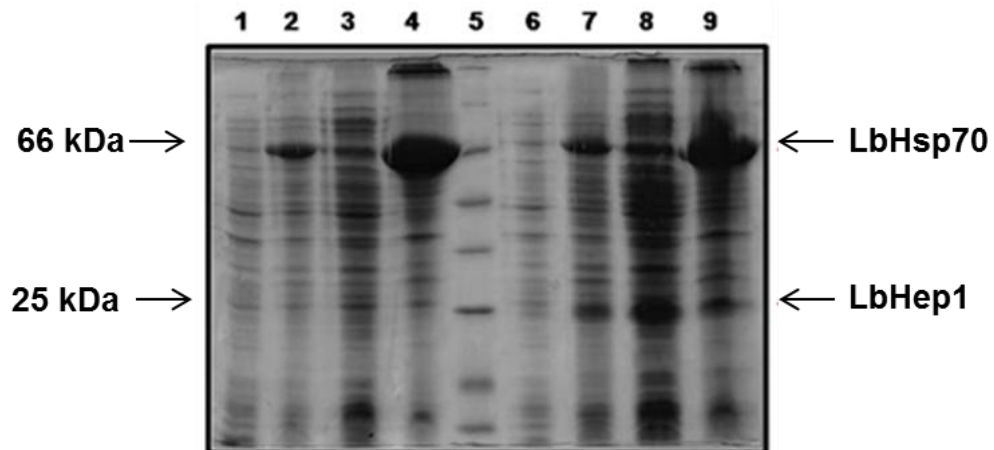


Figura 12: Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da expressão da proteína LbHsp70 e da co-expressão da LbHsp70 com a LbHep1. 1) Fração não indução da LbHsp70; 2) Fração induzida da LbHsp70; 3) Fração solúvel da LbHsp70; 4) Fração insolúvel da LbHsp70; 5) Padrão de Massa Molecular: MM *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Fermentas); 6) Fração não indução da co-expressão (LbHep+Lb70); 7) Fração induzida da co-expressão (LbHep+Lb70); 8) Fração solúvel da co-expressão (LbHep+LbHsp70); 9) Fração insolúvel da co-expressão (LbHep+LbHsp70).

Analisando o resultado do gel podemos concluir que a co-expressão foi realizada com sucesso, com as duas proteínas expressas. Porém, a LbHsp70 continua principalmente na fração insolúvel mesmo depois da co-expressão com a LbHep1. Este resultado mostra que a LbHep1 não é capaz de solubilizar a LbHsp70. Uma das possíveis explicações se dá pelo fato de a LbHsp70 não ser uma proteína Hsp70 mitocondrial, que é o tipo de proteína com a qual proteínas da classe Hep1 interage e solubiliza, como mostra dados na literatura.

Com o intuito de mostrar a funcionalidade da LbHep1 em solubilizar uma Hsp70 mitocondrial e obter a mtHsp70 humana (mortalina) na forma solúvel, foi realizada uma co-expressão heteróloga com ambas as proteínas. A mtHsp70 usada para realizar o experimento foi obtida pelo Prof. Dr. Júlio C. Borges durante o seu doutorado (BORGES, 2004). Essa proteína é de grande importância celular e de difícil obtenção por técnicas de expressão heteróloga pois ela sofre um processo de auto-agregação (PENG ZHAI, 2011).

As construções pET23::LbHep1 e pET28::mtHsp70 foram então co-expressas para analisar possível interação entre as duas. A Figura 18 mostra o resultado da co-expressão da mtHsp70 e LbHep1.

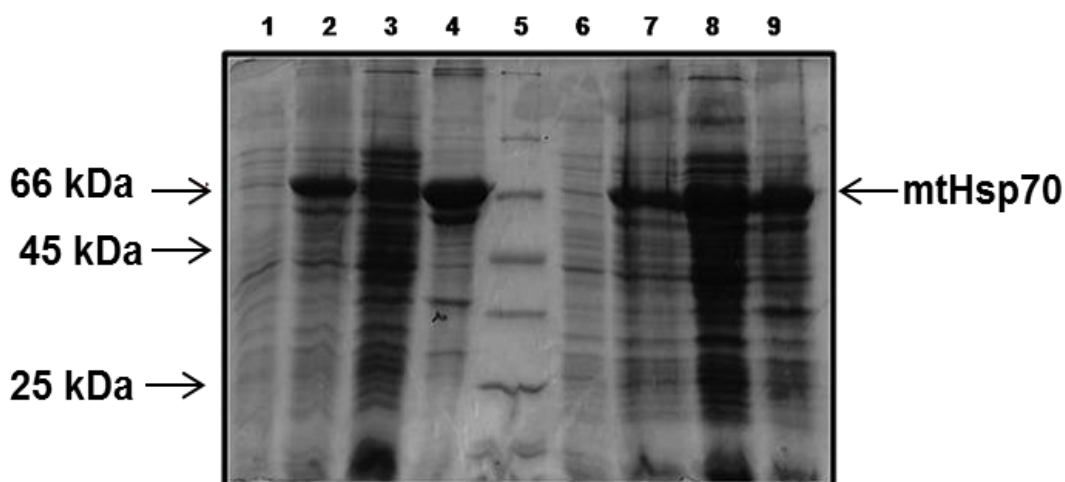


Figura 13: SDS-PAGE 12% contendo amostra da expressão da proteína mtHsp70 e da co-expressão da mtHsp70 com a LbHep1. 1) Fração não indução da mtHsp70; 2) Fração induzida da mtHsp70 3) Fração solúvel da mtHsp70; 4) Fração insolúvel da mtHsp70; 5) Padrão de Massa Molecular: MM PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); 6) Fração não indução da co-expressão (LbHep+mtHsp70); 7) Fração induzida da co-expressão (LbHep+mtHsp70); 8) Fração solúvel da co-expressão (LbHep1+mtHsp70); 9) Fração insolúvel da co-expressão (LbHep+mtHsp70).

Como apresentado no gel acima uma maior quantidade da mtHsp70 foi expressa na fração solúvel após a co-expressão. Este resultado leva a crer, que a LbHep1 interagiu com a mtHsp70 solubilizando a mesma, apesar de serem de organismos diferentes. Este resultado reforça a idéia que a LbHep1 interage com Hsp70 mitocondriais. O fato de a LbHep1 ter conseguido solubilizar a mtHsp70 indica que a região de reconhecimento tanto da mtHsp70 pela LbHep1 quanto da HsHep1 pela mtHsp70 são conservados o suficiente para possibilitar o reconhecimento cruzado, da LbHep1 pela mtHsp70 e da mtHsp70 pela LbHep1.

Obtendo então a mtHsp70 solúvel foi dado início ao processo de purificação da mesma. A proteína mtHsp70 foi submetida primeiramente a uma cromatografia de afinidade ao níquel e depois a cromatografia de exclusão molecular para avaliar seu perfil de eluição, dado este mostrado na Figura 14.

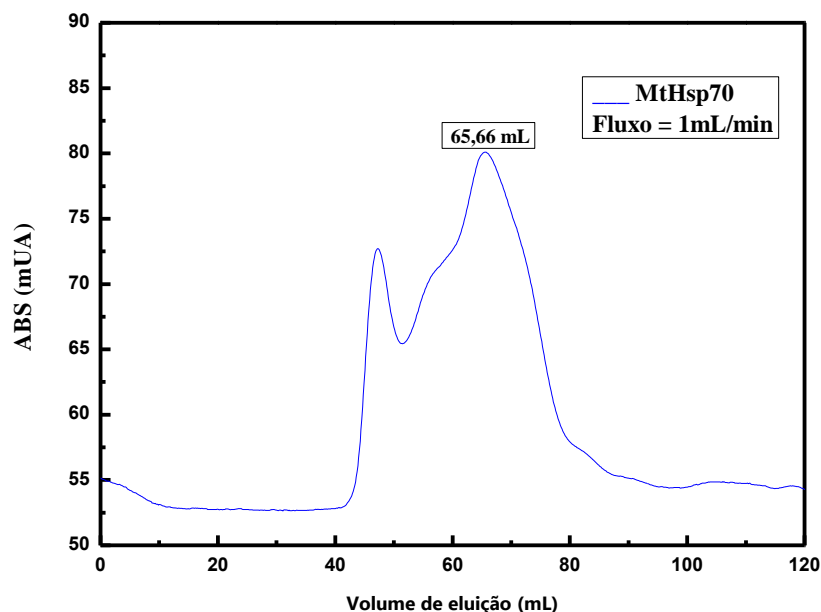


Figura 14: Cromatografia de Exclusão Molecular. CEM preparativa para a proteína mtHsp70 em coluna HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade acoplada ao AKTA Purifier. Tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM; pH 7,5.

As frações coletadas das cromatografias foram analisadas em SDS-PAGE que estão apresentadas na figura 15.

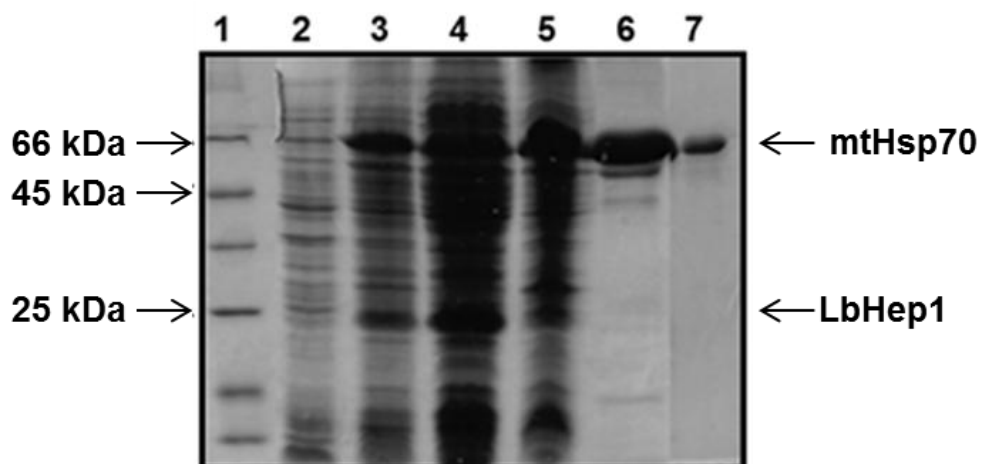


Figura 15: Gel de poliacrilamida 12% contendo amostra da proteína mtHsp70. 1) Padrão de massa molecular: MM PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); 2) Fração não indução; 3) Fração induzida; 4) Fração solúvel; 5) Fração insolúvel; 6) Fração da mtHsp70 eluída na cromatografia de afinidade ao níquel; 7) Fração da mtHsp70 eluída na cromatografia de exclusão molecular.

O resultado da cromatografia mostra a presença de dois picos, onde o primeiro mostra que uma parte da proteína encontra-se sob a forma de agregados, pois eluiu no V_0 da coluna, e o segundo pico mostra a proteína mtHsp70 eluindo com tempo de retenção de 65,66 mL. Uma vez que a mtHsp70 apresenta massa molecular de 70 kDa e que já era sabido da literatura que as Hsp70 se apresentam como um monômero (BORGES e RAMOS, 2006; 2009; DA SILVA e BORGES, 2011), era esperado que a mesma tivesse este perfil de eluição.

Mostrado a funcionalidade da LbHep1 sobre a mtHsp70, passou-se então a purificar e caracterizar a LbHep1 para conhecer melhor a estrutura dessa proteína

4.7. Purificação da LbHep1

Obtida a LbHep1 na fração solúvel a mesma foi purificada para posterior ensaios biofísicos. Primeiramente foi realizada uma cromatografia de troca aniônica baseando-se no ponto isoelétrico da proteína (pI) que é de 5,15 possuindo assim cargas negativas em pH 7,5 o que permitiu a ligação da proteína em resinas constituídas por grupos funcionais de carga positivas. As amostras eluídas na cromatografia de troca aniônica foram analisada em gel de SDS-PAGE (Figura 16). Como mostra a figura, a LbHep1 eluiu com algumas impurezas, o que faz-se necessário o uso de uma nova cromatografia para obter a proteína sem contaminantes. Subsequente, à cromatografia de troca aniônica foi realizada a cromatografia de afinidade ao Ca^{2+} , obtendo assim a LbHep1 com uma menor quantidade de contaminantes. As amostras eluídas na cromatografia de afinidade ao Ca^{2+} , também foram analisadas em SDS-PAGE apresentado também na figura 16. Em seguida, a proteína foi concentrada e submetida a uma cromatografia de exclusão molecular e a amostra referente à LbHep1 foi analisada em gel SDS-PAGE (Figura 16).

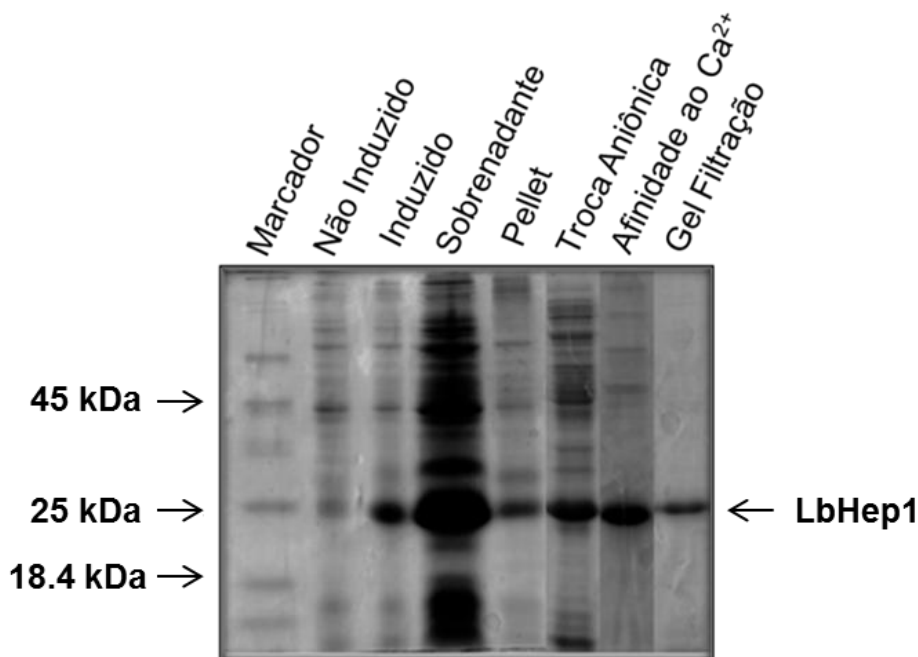


Figura 16: Gel de poliácridamida 12% contendo amostra da proteína LbHep1. Na figura 21 é apresentada as amostras da LbHep1 referente a indução assim como as amostras eluídas nas cromatografias de Troca aniônica, Afinidade ao Ca²⁺ e Exclusão Molecular (Gel Filtração). Marcador: MM PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas);

A cromatografia de exclusão molecular apresentada na figura 17 foi realizada em duas concentrações diferentes da proteína LbHep1. A primeira estava a uma concentração de 0,65 mg/mL e segunda apresentava concentração de 3,4 mg/mL.

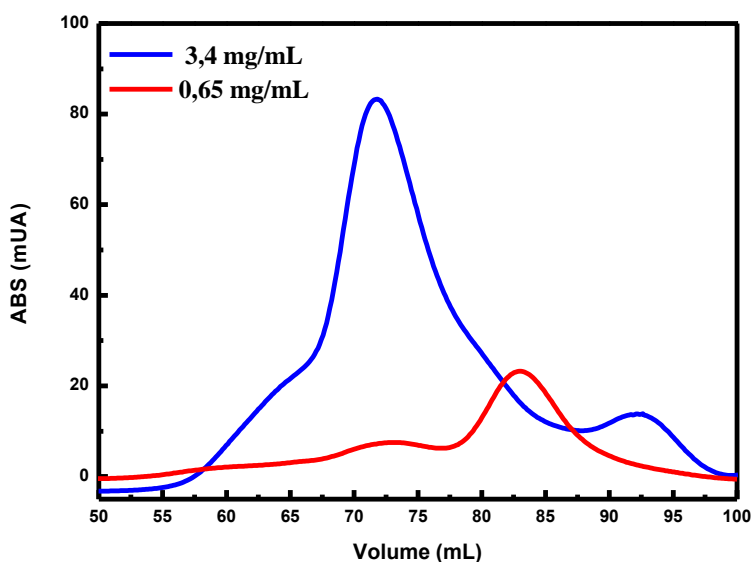


Figura 17: Cromatografia de Exclusão Molecular. CEM preparativa para a proteína LbHep1 em coluna HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade acoplada ao AKTA Purifier. Tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM; pH 7,5.

O resultado da CEM sugere que a proteína sofre oligomerização dependendo da concentração, uma vez que o perfil de eluição apresentou-se bem distintos. Este dado é muito importante para as análises Biofísicas posteriores, uma vez que o estado oligomérico funcional da LbHep1 é o foco de interesse de estudo, ainda mais com dados na literatura mostrando que a yHep1 apresenta-se funcional na forma monomérica (MOMOSE, OHSHIMA *et al.*, 2007).

4.8. Dicroísmo Circular

Com o objetivo de verificar o padrão de estrutura secundária exibido pela LbHep1 após expressão heteróloga e purificação foi realizado o ensaio de CD. Essas medidas fornecem informações importantes a respeito da estrutura secundária da proteína.

O espectro de CD da proteína Lbhep1 obtido experimentalmente está apresentado na figura 18. Esse experimento foi realizado conforme descrito no item 4.15 de Materiais e Métodos e retornou um gráfico que é caracterizado por mínimos em aproximadamente 202 e 220 nm, indicando que a proteína exibe um enovelamento com estrutura secundária composta, tipicamente, por fitas- β e estrutura randômica.

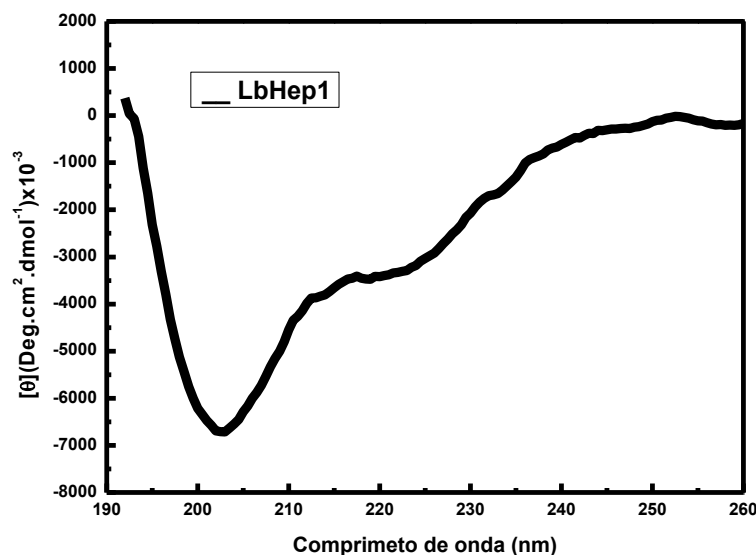


Figura 18: Espectro de dicroísmo circular da LbHep1 nativa. A LbHep1 foi incubada em tampão fosfato 25 mM (pH 7,0), contendo 50 mM NaCl e 1 mM β -mercaptoetanol. A medida foi realizada a 20 °C com a proteína a 630 μ g/mL em cubeta de quartzo com passo ótico de 1 mm.

Foi realizada uma análise quantitativa do conteúdo de estrutura secundária da proteína, apresentando a porcentagem de cada tipo de estrutura secundária predita, utilizando o programa *CDNN deconvolution* (BOHM, MUHR *et al.*, 1992). A predição está apresentada na tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Composição de estrutura secundária da LbHep1. Os valores são dados em porcentagem (%). Erro estimado em <5%.

Estrutura secundária	
Tipo	Predição CDNN Deconvolution
α -hélice	8 %
Fita β -Antiparalela	30 %
Fita β -paralela	5 %
β -pregueada	21 %
Estrutura randômica	36 %
Soma total	100 %

Na figura 19 está apresentado o alinhamento dos aminoácidos da Hep de levedura com os aminoácidos da LbHep1 realizado pelo programa *BLASTp* (*Basic Local Alignment Search Tool*). Como se pode observar o núcleo das proteínas, principalmente na região do dedo de zinco, é bem conservado, com a LbHep1 e a yHep1 apresentando 41% identidade e 61% de similaridade na região em que houve alinhamento. Além disso, alguns aminoácidos como histidina (H), arginina (R) e aspartato (D) que responsáveis pela interação com a mtHsp70 também são conservados, pelo menos em suas características.

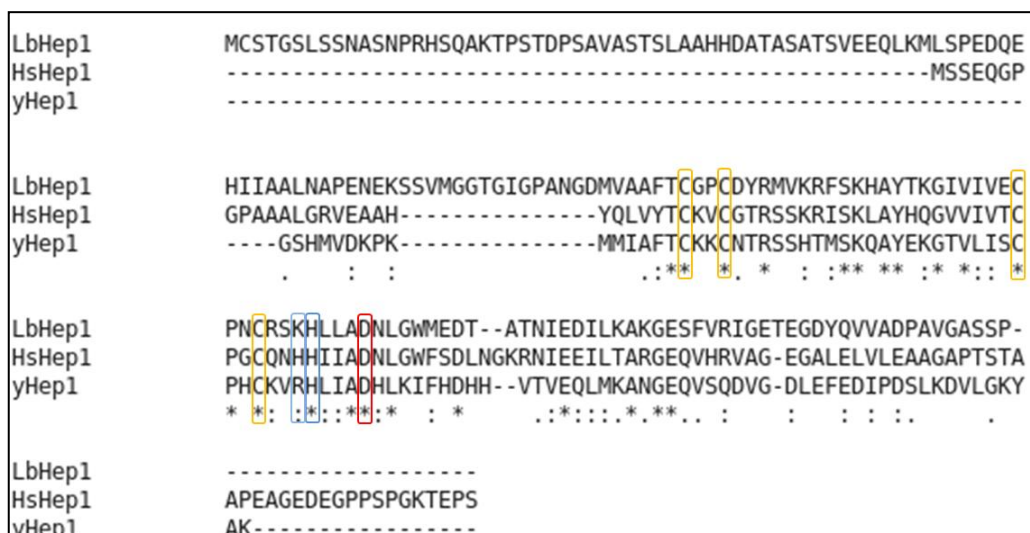


Figura 19: Alinhamento da sequência de aminoácidos da Hep1 de levedura, Hep1 humana e Hep1 *L. braziliensis*. Esse alinhamento foi gerado pelo programa ClustalW. Na figura estão indicados os aminoácidos arginina, histidina e aspartato, responsáveis pela interação interproteínas, e cisteína, presente no dedo de zinco, respectivamente nas cores ciano, azul, vermelho e amarelo (ZHAI, STANWORTH *et al.*, 2008).

A estrutura tridimensional da yHep resolvida por RMN (Figura 19.a) mostra que ela é uma molécula em forma de L, onde em uma das suas extremidades está localizada o dedo de zinco que é constituído por fitas- β antiparalelas. Já na outra extremidade do L é constituída de duas α -hélices (MOMOSE, OHSHIMA *et al.*, 2007). Observa-se então que assim como a LbHep1, a yHep1 apresenta folha-beta como principal tipo de estrutura secundária.

4.9. Fluorescência

Experimentos de emissão intrínseca de fluorescência foram realizados, com o objetivo de obter informações sobre a localização do único resíduo de triptofano na estrutura terciária da LbHep1.

Os espectros de emissão de fluorescência de triptofano da LbHep1, para excitação em 295 e 280 nm estão apresentados na figura 20. A LbHep1 encontrava-se no tampão fosfato 25 mmolL⁻¹ (pH 7,0) contendo 50 mM de NaCl e 1 mM β -mercaptoetanol.

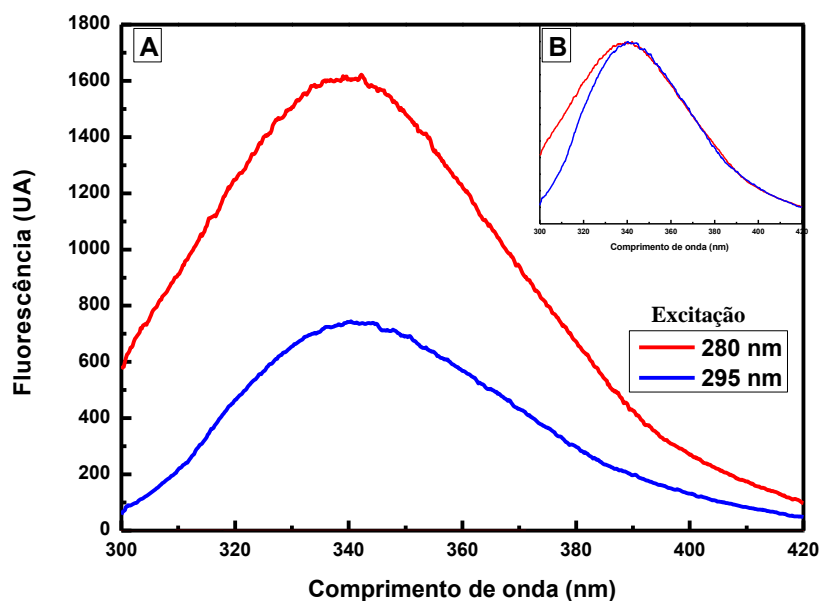


Figura 20: Emissão de fluorescência. O comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) foi de 280 nm e 295 nm. A LbHep1 possui 1 triptofanos. A) As curvas indicam que eles podem estar parcialmente expostos, já que o λ_{max} observado foi de 341 nm. B) Normalização do gráfico A para avaliar sobreposição dos picos. Tampão fosfato 25 mmolL⁻¹ (pH 7,0) contendo 50 mM de NaCl e 1 mM β -Mercaptoetanol.

A análise do espectro de emissão de fluorescência da figura 20 indicam que a proteína encontra-se enovelada e que o único resíduo de triptofano apresenta-se pouco acessível ao solvente, ou seja o triptofano pode estar parcialmente expostos. A presença do pico de máximo de emissão na faixa de 335 a 345 nm, constitui uma evidência de que o resíduo de triptofano apresenta pouca acessibilidade ao solvente.

O comprimento de onda máximo (λ_{MAX}) para a LbHep1 excitada em 295 nm é de 341 ± 1 nm e apresenta centro de massa espectral ($\langle\lambda\rangle$) igual a ~ 350 nm. Já para a excitação em 280 nm o centro de massa espectral é equivalente a 346 nm e o comprimento de onda máximo é de 341 ± 1 nm. Essa diferença no centro de massa pode está relacionada a influência do aminoácido Y (três na sequência da LbHep1) durante a excitação em 280 nm, deslocando assim, o centro de massa. Este resultado pode ser observando na figura 20B onde normalizou-se os espectros para verificar se ocorria sobreposição dos mesmos.

Na figura 21 está representado o modelo gerado por homologia, pelo aluno de mestrado Geraldo Rodrigues Sartori do grupo NEQUIMED-IQSC para o domínio dedo de Zinco da LbHep1.

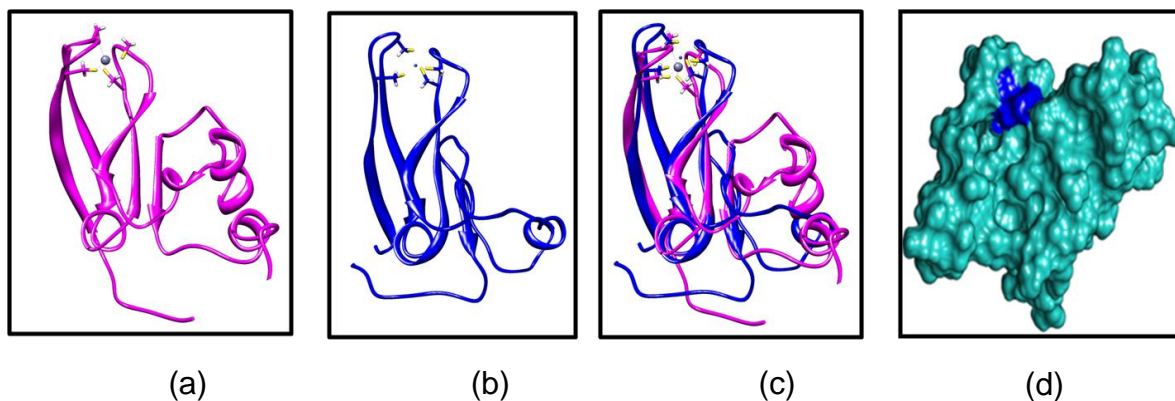


Figura 21: Modelo para o domínio dedo de Zinco da Hep1. (a) RMN da Hep1 de levedura. (b) Modelagem do monômero da LbHep1, sem o N-terminal; (c) Sobreposição das estruturas da yHep1 com a LbHep1; (d) Modelo em superfície da LbHep, destacando em azul o aminoácido Triptofano (W).

Na figura 21(d) o modelo destaca o triptofano em azul, parcialmente exposto ao solvente, o que vai de acordo com os resultados obtidos em fluorescência.

Como observado no modelo da LbHep gerada para um monômero (figura 21b), a representação da estrutura é constituída principalmente de fitas- β e estrutura randômica,

dado este condizente com os dados experimentais de CD. O percentual de cada estrutura secundária ainda não é quantitativamente comparável devido à presença de uma extensa região da proteína com predição para ser desestruturada. Como se trata de um dímero, essa predição é um limitante para gerar o modelo completo.

4.10. Cromatografia de Gel Filtração Analítica ou CEM analítica

A Figura 22 apresenta o perfil de eluição bem como a curva para a determinação do raio de R_H da LbHep1 em relação aos padrões utilizados no experimento.

Para verificar o perfil de eluição da proteína pura, foi feita uma cromatografia de gel filtração analítica, em que o perfil de eluição foi comparado com o perfil de um padrão de proteínas globulares de MM conhecidas. Foi utilizada a coluna Superdex 200 GL10/300 acoplada ao ÄKTA FPLC (GE Healthcare).

A Figura 22 apresenta o perfil de eluição e a curva para a determinação do raio hidrodinâmico da LbHep1 em relação aos padrões utilizados no experimento. Nota-se que a proteína LbHep1 eluiu entre as proteínas Ovalbumina (45 kDa) e Anidrase Carbônica (30 kDa) como pode ser vista na figura 22 abaixo.

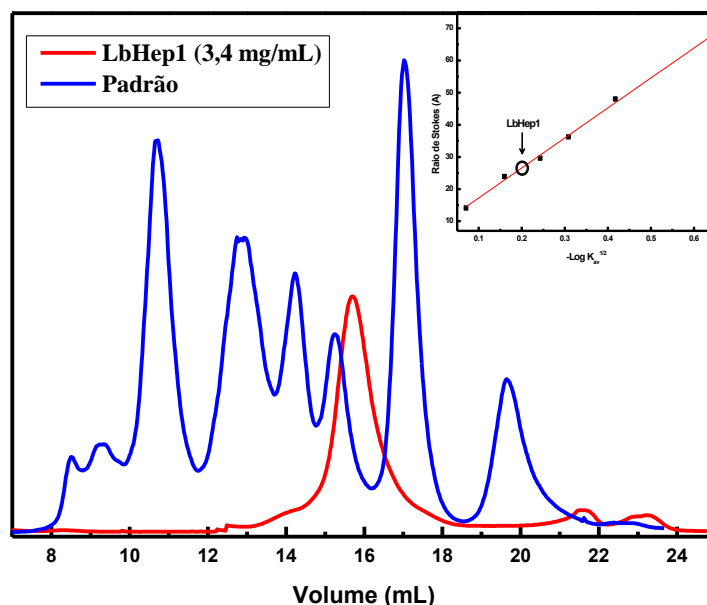


Figura 22: GeL Filtração Analítica. Os experimentos foram realizados em 200 SuperdexGL10/300 usando um dispositivo AKTA Padrão de massa molecular: **1)** Apoferritina (480 kDa e R_H 67,1 Å), **2)** λ -globulina (160 kDa e R_H 48 Å), **3)** BSA (67 kDa e R_H 36,2 Å), **4)** Ovalbumina (45 kDa e R_H 29,6 Å), **5)** anidrase carbônica (29 kDa e R_H 23,9 Å) e **6)** Citocromo (12,3 kDa e R_H 14,1 Å).

Através das expressões obtidas pelas curvas matemáticas para a determinação da MM aparente e do R_H foi possível determinar que a LbHep1, possui uma MM aparente de 40 kDa e um R_H de 29 ± 2 Å. A MM teórica calculada a partir da sequência de aminoácidos para a LbHep1 foi de aproximadamente 19 kDa.

Há de se ressaltar que essa técnica considera as proteínas como sendo esféricas para o cálculo de massa e raio hidrodinâmico, o que não ocorre em muitos casos, uma vez que são conhecidas várias proteínas de forma assimétrica. Experimentalmente, isso implica em diferenças na MM encontrada pela gel filtração analítica, quando comparado com a MM real do sistema protéico, efeito também observado para o R_H .

Essa diferença na massa obtida por gel filtração analítica poderia então, ser causada pelo fato de a proteína ser assimétrica. Porém, o fato de o experimento ter acusado uma MM de mais que o dobro do tamanho esperado leva a crer que a LbHep1 se apresenta na forma de dímero.

O valor experimental de R_H pode ser comparado ao valor teórico calculado a partir da sequência de aminoácidos pelo programa Sednterp. A razão entre o R_H experimental e o teórico resulta na razão friccional (f/f_0), a qual diz respeito à assimetria da proteína-alvo, sendo que quanto maior que 1, mais assimétrica é a proteína. Fazendo esse cálculo para a LbHep1 e usando R_H teórico de um monômero obtivemos um valor de 1,66, inferindo que a proteína não é globular.

4.11. Dados preliminares de Ultracentrifugação Analítica

A Figura 23 apresenta as curvas de sedimentação para as varias concentrações de LbHep1 (50, 100, 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$) bem como a curva de s_{20w} que é o coeficiente de sedimentação observado em água a 20 °C, tais dados foram obtidos a partir do programa SedFit.

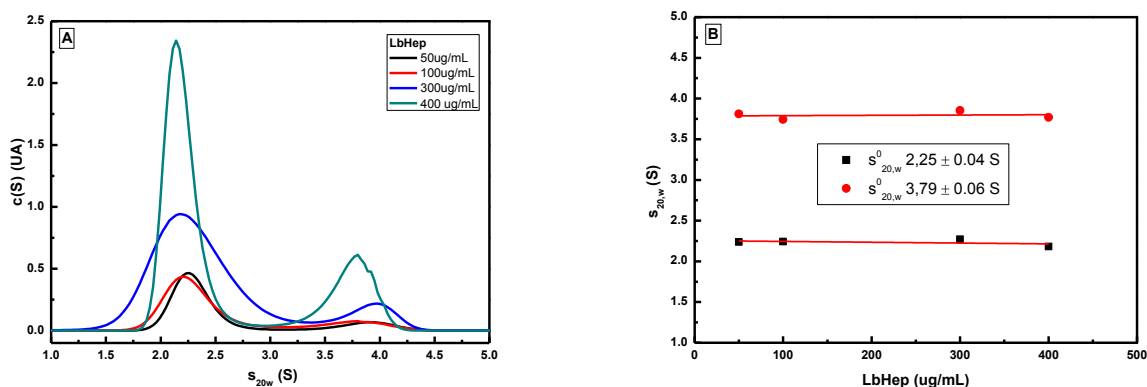


Figura 23: Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da LbHep1. Feito para as concentrações distintas de 50, 100, 300 e 400 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em tampão Tris 25 mM (pH 8,0) e NaCl 100 mM. B) Representação do $s_{20,w}$ em função da concentração da proteína.

Os dados de ultracentrifugação analítica tratados no SedFit mostram que ocorre sedimentação de duas partículas com $s_{20,w}^0$ de $2,25 \pm 0,04$ S para a primeira espécie e $3,81 \pm 0,06$ S para a segunda espécie (Figura A).

Os resultado do experimento de ultracentrifugação analítica sugerem que a LbHep1 é um equilíbrio entre duas fases oligoméricas, possivelmente um Monômero-Dímero. Porém, os dados coletados não foram precisos o suficiente para uma determinação segura da forma oligomérica predominante da LbHep1. Comparando o $s_{20,w}^0$ experimental com o teórico para um monômero (2,25 S e 2,63 S, respectivamente), notamos que o valor experimental é menor sugerindo a sedimentação de uma partícula assimétrica. Observa-se na figura B que a concentração da proteína não influencia na sedimentação da mesma.

Com o intuito de entender melhor o sistema planeja-se fazer sedimentação em equilíbrio, a fim de determinar com melhor precisão as características oligoméricas da partícula.

5. CONCLUSÃO

A proteína LbHsp70 foi clonada com sucesso, dado este confirmado pelo sequenciamento. Porém a proteína foi expressa de forma insolúvel, característica das Hsp70 que tendem a se agregar *in vivo* e *in vitro*. Após expressão em corpos de inclusão e solubilização dos mesmos, a proteína apresentou-se na forma de agregado protéico nas condições experimentais, impedindo assim, dar continuidade ao trabalho com a LbHsp70 que objetiva caracterizar a proteína.

A clonagem e expressão da LbHep1 foi realizada com sucesso, podendo obter a proteína de forma solúvel para caracterização estrutural e funcional.

A LbHep1 apresentou-se ativa, sendo capaz de manter solúvel em condições *in vitro* a mtHsp70. A mtHsp70 quando expressa sozinha encontra-se em grande parte insolúvel (PENG ZHAI, 2011) e este trabalho mostrou que a co-expressão com a LbHep1 recuperou a proteína solúvel apesar de serem de organismos diferentes, inferindo que uma conservação na região de interação entre ambas as proteínas existe. Essa interação possivelmente ocorre entre o arco inferior da Hep1 e o domínio de ligação de nucleotídeo da mortalina, conforme mostrado na literatura. As proteínas LbHep1 e HsHep1 apresentam 41% de identidade e 61% de similaridade, sendo observada uma grande conservação no seu sítio de interação. Essa similaridade explicaria a solubilização da mtHsp70 humana pela Hep1 de *L. braziliensis*.

Os experimentos de CD mostraram que a LbHep1 apresenta estrutura secundária composta principalmente de folhas- β . O único triptofano que constitui a estrutura de aminoácidos da proteína está parcialmente exposto ao solvente, como pode ser visto através dos resultados de fluorescência.

Análises de sua estrutura terciária, obtidas a partir de experimento de gel filtração analítica mostraram que a proteína é assimétrica ou não monomérica. Dados de ultracentrifugação analítica indicam que a LbHep1 é um oligômero, constituída de duas formas oligoméricas distintas.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram comparar a LbHep1 com proteínas da classe Hep1. Dados da literatura reportam que a Hep1 de levedura e humana são monoméricas enquanto que a LbHep1 clonada e caracterizada neste trabalho é oligomérica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, P.; KUMAR, R.; TATU, U. Chaperoning a cellular upheaval in malaria: Heat shock proteins in *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 153, n. 2, p. 85-94. 2007.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; SIQUEIRA, A. M.; NICODEMO, A. C.; NETO, V. A. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin america: Systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266-274. 2007.

BEISSINGER, M.; BUCHNER, J. How chaperones fold proteins. **Biological Chemistry**, v. 379, n. 3, p. 245-259. 1998.

BOHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative-analysis of protein far uv circular-dichroism spectra by neural networks. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p.191-195. 1992.

BOHNERT, M.; PFANNER, N.; VAN DER LAAN, M. A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. **Fabs Letters**, v. 581, n. 15, p. 2802-2810. 2007.

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

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

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 452, n. 1, p. 46-54. 2006.

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Characterization of nucleotide-induced changes on the quaternary structure of human 70 kDa heat shock protein Hsp70.1 by analytical ultracentrifugation. **Bmb Reports**, v. 42, n. 3, p. 166-171. 2009.

BURRI, L.; VASCOTTO, K.; FREDERSDORF, S.; TIEDT, R.; HALL, M. N.; LITHGOW, T. Zim17, a novel zinc finger protein essential for protein import into mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 48, p. 50243-50249. 2004.

DA SILVA, K. P.; BORGES, J. C. The molecular chaperone Hsp70 family members function by a bidirectional heterotropic allosteric mechanism. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, n. 2, p. 132-142. 2011.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L. H.; HUANG, Y. T.; KINDLUND, E.; KTINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARTETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415. 2005.

GONZALEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J. A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.2. 2009. Não paginado.

HALL, N.; PAIN, A.; BERRIMAN, M.; CHURCHER, C.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BOWMAN, S.; ATKIN, R.; BAKER, S.; BARRON, A.; BROOKS, K.; BUCKEE, C. O.; BURROWS, C.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, C.; CHILLINGWORTH, T.; CHRISTODOULOU, Z.; CLARK, L.; CLARK, R.; CORTON, C.; CRONIN, A.; DAVIES, R.; DAVIS, P.; DEAR, P.; DEARDEN, F.; DOGGETT, J.; FELTWELL, T.; GOBLE, A.; GOODHEAD, I.; GWILLIAM, R.; HAMLIN, N.; HANCE, Z.; HARPER, D.; HAUSER, H.; HORNSBY, T.; HOLROYD, S.; HORROCKS, P.; HUMPHRAY, S.; JAGELS, K.; JAMES, K. D.; JOHNSON, D.; KERHORNOU, A.; KNIGHTS, A.; KONFORTOV, B.; KYES, S.; LARKE, N.; LAWSON, D.; LENNARD, N.; LINE, A.; MADDISON, M.; MCLEAN, J.; MOONEY, P.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; ORMOND, D.; PRICE, C.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; RUTTER, S.; RUTHERFORD, K. M.; SANDERS, M.; SIMMONDS, M.; SEEGER, K.; SHARP, S.; SMITH, R.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; TIVEY, A.; UNWIN, L.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J.; SULSTON, J. E.; CRAIG, A.; NEWBOLD, C.; BARRELL, B. G. Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3-9 and 13. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 527-531. 2002.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, n. 6583, p. 571-580. 1996.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Protein folding - Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, n. 5561, p. 1852-1858. 2002.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199. 1999.

HISHIYA, A.; TAKAYAMA, S. Molecular chaperones as regulators of cell death. **Oncogene**, v.27, n.50, Oct, p. 6489-6506. 2008.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E.; AL., E. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, p. 436-442. 2005.

JAENICKE, R. Stability and folding of domain proteins. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 71, n. 2, p. 155-241. 1999.

KAUL, S. C.; DEOCARIS, C. C.; WADHWA, R. Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer. **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 4, p. 263-274. 2007.

- LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, N.; MURRAY, A.; MCMASTER, W. R. Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: The Leishmania genome is constitutively expressed. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 35-46. 2007.
- LOUW, C. A.; LUDEWIG, M. H.; MAYER, J.; BLATCH, G. L. The Hsp70 chaperones of the Trityps are characterized by unusual features and novel members. **Parasitology International**, v. 59, n. 4, p. 497-505. 2010.
- MAYER, M. P.; BREHMER, D.; GÄSSLER, C. S.; BUKAU, B. Hsp70 chaperone machines. **Protein Folding in the Cell**, v. 59, p. 1-44. 2001.
- MOMOSE, T.; OHSHIMA, C.; MAEDA, M.; ENDO, T. Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70. **EMBO Reports**, v. 8, n. 7, p. 664-670. 2007.
- NEUER, A.; SPANDORFER, S.D.; GIRALDO, P.; DIETERLE, S.; ROSENWALKS, Z.; WITKIN, S.S. The role of heat shock protein in reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 6, p. 149-159. 2000.
- NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. v. 2, p. 422.
- PAVITHRA, S. R.; BANUMATHY, G.; JOY, O.; SINGH, V.; TATU, U. Recurrent fever promotes Plasmodium falciparum development in human erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46692-46699. 2004.
- PAVITHRA, S. R.; KUMAR, R.; TATU, U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite Plasmodium falciparum. **Plos Computational Biology**, v. 3, n. 9, p. 1701-1715. 2007.
- PENG ZHAI, M. A. T. V.; HOFF, K. G. HOFF.; SILBERG, J. J. A conserved histidine in human DNLZ/HEP is required for stimulation of HSPA9 ATPase activity. **Biochemical and Biophysical**, p. 589-594. 2011.
- SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10. 2008.
- SCHUCK, P. Sedimentation analysis of noninteracting and self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation. **Biophysical Journal**, v.75, n.3, Sep, p. 1503-1512. 1998.
- SCHUCK, P.; PERUGINI, M.A.; GONZALES, N.R.; HOWLETT, G.J.; SCHUBERT, D. Size distribution analyses of proteins by analytical ultracentrifugation strategies and application to model systems. **Biophysical Journal**, v. 8, p. 1096. 2000.
- SICHTING, M.; MOKRANJAC, D.; AZEM, A.; NEUPERT, W.; HELL, K. Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1. **Embo Journal**, v. 24, n. 5, p. 1046-1056. 2005.
- SOTI, C. C.; CSERMELY, P. Molecular chaperones and the aging process. **Biogerontology**, v. 1, n. 3, p. 225-233. 2000.

SOTI, C. C.; CSERMELY, P. Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. **Neurochemistry International**, v. 41, n. 6, p. 383-389. 2002.

SZKLARZ, L. K. S.; GUIARD, B.; RISSLER, M.; WIEDEMANN, N.; KOZJAK, V.; VAN DER LAAN, M.; LOHAUS, C.; MARCUS, K.; MEYER, H. E.; CHACINSKA, A.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. Inactivation of the mitochondrial heat shock protein Zim17 leads to aggregation of matrix Hsp70s followed by pleiotropic effects on morphology and protein biogenesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 351, n. 1, p. 206-218. 2005.

WADHWA, R.; KAUL, S. C.; IKAWA, Y.; SUGIMOTO, Y. Identification of a novel member of mouse Hsp70 family - its association with cellular mortal phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 9, p. 6615-6621. 1993.

WEGELE, H.; MULLER, L.; BUCHNER, J. Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 151, 2004, p.1-44. 2004.

WESTERHEIDE, S. D.; MORIMOTO, R. I. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33097-33100. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Tropical diases**: Leishmania muco-cutânea, 2011. Genebra,1991. p. 27-31.

YAMAMOTO, H.; MOMOSE, T.; YATSUKAWA, Y.; OHSHIMA, C.; ISHIKAWA, D.; SATO, T.; TAMURA, Y.; OHWA, Y.; ENDO, T. Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane. **Febs Letters**, v. 579, n. 2, p. 507-511. 2005.

ZHAI, P.; STANWORTH, C.; LIU, S.; SILBERG, J. J. The human escort protein Hep binds to the ATPase domain of mitochondrial Hsp70 and regulates ATP hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 38, p. 26098-26106. 2008.