

Flávia Barboza Camargo

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDOS ESTRUTURAIS DA
CHAPERONA MOLECULAR HSP65 DE *Mycobacterium leprae***

&

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA NUDEL – *NUCLEAR
DISTRIBUTION ELEMENT-LIKE***

São José do Rio Preto
2008

FLÁVIA BARBOZA CAMARGO

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDOS ESTRUTURAIS DA
CHAPERONA MOLECULAR HSP65 DE *Mycobacterium leprae*
&
CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA NUDEL – *NUCLEAR
DISTRIBUTION ELEMENT-LIKE***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy
Arni

Co-orientadora: Mirian Akemi Furue Hayashi

São José do Rio Preto
2008

Camargo, Flávia Barboza.

Expressão, purificação e estudos estruturais da chaperona molecular Hsp65 de *Mycobacterium leprae* e caracterização da proteína NUDEL – nuclear distribution element-like/ Flávia Barboza Camargo. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

79 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Raghuvir Krishnaswamy Arni

Co-orientador: Mirian Akemi Furue Hayashi

Dissertação (mestrado – Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Proteínas - Estrutura. 2. Proteínas - Purificação. 3. Chaperona. I. Arni, Raghuvir Krishnaswamy. II. Hayashi, Mirian Akemi Furue. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 577.112

FLÁVIA BARBOZA CAMARGO

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDOS ESTRUTURAIS DA
CHAPERONA MOLECULAR HSP65 DE *Mycobacterium leprae***

&

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA NUDEL – *NUCLEAR
DISTRIBUTION ELEMENT-LIKE***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Andréa Regina Baptista Rossit
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer
IPEN – São Paulo

São José do Rio Preto, 18 de abril de 2008.

DADOS CURRICULARES

A autora desse trabalho, Flávia Barboza Camargo, nasceu em Catanduva – SP, no ano de 1982. No ano de 2002, ingressou na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP IBILCE, campus de São José do Rio Preto, no curso de Ciências Biológicas. Ao final de cinco anos concluiu a Licenciatura e o Bacharelado em Ciências Biológicas. Durante a graduação, realizou vários estágios em diferentes laboratórios do IBILCE até que no ano de 2005 apresentou a monografia de conclusão do Bacharelado sob orientação do Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni e, nesse mesmo ano, ingressou no curso de Pós-Graduação de Mestrado em Microbiologia na Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, com o auxílio financeiro da FAPESP. Nesse período, realizou estágio no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (CAT/CEPID - Instituto Butantan), sob a co-orientação da Prof^a. Dr^a. Mirian Akemi Furue Hayashi. Vários projetos paralelos foram executados durante os dois anos de mestrado, além dos dois trabalhos que são apresentados nessa dissertação.

Dedico esse trabalho à quatro pessoas essenciais na minha formação pessoal e profissional. Pra vocês, com todo meu amor:

*Meu Pai: Sebastião J.V. Camargo
Minha Mãe: Marta Clarete B. Camargo
Minhas duas irmãs: Karen e Marina*

AGRADECIMENTOS

Início os meus agradecimentos começando por uma pessoa que muito me ensinou, e que hoje, muito do que eu aprendi durante os dois anos de mestrado eu vou levar para vida toda. Ao Prof. Arni agradeço a paciência e seriedade com que sempre lidou comigo e às grandes oportunidades que ele me proporcionou nesse período...

A um amigo mais que especial, Lars Redecke, que só quem o conhece pode saber o tamanho da sua generosidade e inteligência... "just be yourself... just believe in you..."

Á Prof^a. Mirian pelos milhões de esclarecimentos e paciência em me ensinar que os "problemas" que eu achava que eram problemas, não passavam de simples más interpretações...

Ao Prof. Camargo pela confiança, carinho e atenção que sempre demonstrou!

Karine e Mário, sempre... todo o meu agradecimento pelos ensinamentos, momentos de descontração, almoços, discussões de laboratório que fortaleceram minha bagagem científica e todo o carinho que me trataram e que me tornou uma pessoa mais doce, mais calma...

Aos novos e antigos companheiros de laboratório: Sá, Tomada, Renato, Joice, Lili, Paty e Dani sempre companheiros, prestativos e atenciosos... e aos amigos de todos os outros laboratórios da UNESP/IBILCE.. .aos amigos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – Instituto Butantan - pela ótima convivência.

Às eternas amigas de infância.. .minha turma linda: Ana Luiza, Ana, Renata, Mari, Ce, Larissa, Livia Maria, Lívia, Suzana, Karime, Mariana. E às antigas companheiras de faculdade: Aline, Fer, Simone e Lívia, por todos os bons momentos da graduação, pelas risadas... pelos momentos juntas que me fizeram tão feliz!!!

À Fran e em especial, á Pri... minhas amigas de república... todos os dias foram especiais e cada um, com seu valor diferente... inesquecível...

A uma nova e inesquecível amiga: Fatiminha, que esteve presente em vários momentos durante esse dois anos e à Prof^a Paula Rahal pelos conselhos e ajudas infundáveis...

À FAPESP pelo auxílio financeiro sem o qual não seria possível a execução desse trabalho...

Aos professores da Pós Graduação em Microbiologia que me proporcionaram uma excelente formação, formação essa que se reflete de maneira consistente pela base sólida construída pelos professores da graduação do IBILCE... à todos, o meu muito obrigada...

Em especial gostaria de agradecer à minha família... base sólida de toda a minha formação, como ser humano, como amiga, como estudante, como filha, como irmã..... Que eu nunca esqueça a concepção de humildade, seriedade, dignidade, sinceridade e amor que vocês me ensinaram... Que eu nunca esqueça que vocês me ensinaram que tem um Ser Superior em algum lugar olhando por nós... e que eu nunca esqueça de agradecer-Lo todos os dias pela minha vida, pela força e guarra para vencer obstáculos. Obrigada!!!!!!!!!!!!

“O que for a profundidade do teu ser, assim será teu desejo.

O que for o teu desejo, assim será tua vontade.

O que for a tua vontade, assim serão teus atos.

O que foram teus atos, assim será teu destino“

- Brihadarnyaka Upanishad IV, 4.5

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa que representa um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública do mundo. Muitos antígenos potentes demonstraram proteção contra tuberculose nos modelos experimentais e o mais recentemente estudado é a *heat shock protein* Hsp65 kDa de *Mycobacterium leprae*. Situações como altas temperaturas, presença de radicais livres e deficiências nutricionais levam ao aumento da produção das *Heat Shock Proteins* (Hsp's). A principal função das Hsp's é manter a estrutura e função das proteínas e, conseqüentemente, preservar as funções celulares essenciais, agindo como chaperonas moleculares. A Hsp65 de *Mycobacterium leprae* é altamente imunogênica, acarretando em infecções micobacterianas, reações humorais e celulares por parte do hospedeiro. Além disso, foi evidenciada que a Hsp65 de *M. leprae* apresenta uma possível atividade de oligopeptidase. Dessa forma, esse projeto teve como alvo principal a expressão e purificação da Hsp65 de *M. leprae* em grau de pureza e quantidade adequada para realizar estudos estruturais. Devido ao uso de condições desnaturantes para a solubilização da proteína, o espectro de Dicroísmo Circular (CD) foi utilizado para analisar a presença de estrutura secundária. Com o objetivo de investigar a estrutura terciária da Hsp65 (Cpn 60-2), a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi realizada tendo sido observado que a solução apresenta-se monodispersa com um raio hidrodinâmico médio de 10 nm, caracterizando um estado trimérico. A tentativa de cristalização dessa amostra está em andamento e sob intensa observação. Algumas outras condições estão em fase de refinamento na tentativa de se conseguir cristais difratáveis para os estudos estruturais. Além do projeto principal, trabalhos paralelos com a proteína NUDEL (do inglês *nuclear distribution element-like*) foram realizados com o objetivo de estabelecer um procedimento de expressão e purificação com alto rendimento e pureza para estudos estruturais. A proteína foi altamente expressa, purificada a partir de corpos de inclusão e renaturada pelo método da diluição. Como agente estabilizador dos estados intermediários para renaturação utilizou-se a L-arginina. Estudos de espalhamento dinâmico de luz mostraram que, na presença de 0,1 mM de zinco e 1 mM de DTT, a proteína apresenta-se monomérica e monodispersa. Análises de dicroísmo circular mostraram a presença de estrutura secundária com predominância de folhas- β , o que indica que a proteína está enovelada após o processo de renaturação. Ensaio de cristalização dessa proteína com o uso dos aditivos DTT e zinco estão em andamento com o objetivo de conseguir cristais difratáveis para os posteriores estudos estruturais.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease that represents one of the most important social, economic and health problems in the world. Many antigens have demonstrated strong protection against tuberculosis in experimental models and the most recent antigen studied for the development of a vaccine against tuberculosis is the Hsp65 kDa heat shock protein from *Mycobacterium leprae*. The production of heat shock proteins (Hsp) is greatly enhanced by stress stimuli such as high temperatures, presence of free radicals and nutritional deficiencies. The main function of Hsp's is to preserve the structure and function of proteins and, consequently, the essential cellular functions, acting as molecular chaperones. The *M. leprae* Hsp65 has been identified as a remarkable immunodominant antigen, since it stimulates humoral immune response and activation of T cells in the host during this bacterial infection. In addition, it was demonstrated that this protein presents a possible enzymatic activity. This project aims at expression, purification and further structural studies of the *M. leprae* Hsp65. During this project, pure protein was obtained in high amounts. Due to the use of chaotropic agent for resolubilization of the protein present in inclusion bodies far-UV CD studies were accomplished aiming to observe the presence of secondary structures. DLS studies were also carried out to determine the oligomeric state of this Hsp65 (Cpn 60-2), showing that the protein solution was monodisperse with an approximate radius of 10 nm (trimer). Attempts to obtain mono crystals of this sample are currently in progress and under intense observation. Some other refinement conditions are in process in order to obtain crystals suitable for structural studies. The work conducted in parallel with the NUDEL protein (*nuclear distribution element-like*) was carried out with the aim of establishing an experimental procedure for obtaining high amounts of pure protein for crystallization studies. The protein was over expressed, purified from inclusion bodies and refolded by the dilution method using L-arginine as a stabilizing agent for the intermediary steps of the refolding process. Dynamic light scattering studies demonstrated that the protein was monomeric and monodisperse in the presence of 0.1 mM of zinc and 1 mM of DTT. Circular dichroism analysis showed the presence of secondary structure composed mainly of β -sheets indicating that the protein was folded after the process. Crystallization assays of the protein in the presence and absence of the additives DTT and zinc are currently being carried out in order to obtain crystals suitable for X-ray diffraction analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Alinhamento apresentado por Portaro et al, 2002	6
Figura 02: Esquema simplificado do resultado do processo de duplicação do gene que codifica para a Hsp65 de <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. leprae</i>	7
Figura 03: Gel SDS-PAGE 10% mostrando (1) fração não induzida, (2) fração induzida com 0,5 mM de IPTG após 4 horas.....	28
Figura 04: Gel SDS-PAGE 10% representando o marcador de peso molecular (1), a fração de proteínas insolúveis (2) e a fração solúvel (3) que corresponde às proteínas que remaneceram em solução após o processo de rompimento das células.....	29
Figura 05: Gel SDS-PAGE 10% mostrando a Hsp65 <i>M. leprae</i> , após o processo de envelhecimento protéico, indicada pela seta e o marcador de peso molecular usado como referência.....	30
Figura 06: Espectros de CD no UV distante da proteína Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> à 0,1 mg/ml em tampão 15 mM Tris HCl em temperatura ambiente.....	31
Figura 07: Medidas de DLS da Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> à 12 mg/ml em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 contendo 20 mM de NaCl.....	34
Figura 8: Alinhamento das seqüências das proteínas Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> e Hsp65 de <i>M. tuberculosis</i> mostrando alto grau de similaridade.....	36
Figura 9: Figura gerada, pelo programa PyMol, utilizando o modelo do pdb da Hsp65 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (1sjp).....	38
Figura 10: Gel SDS-PAGE 12,5 % . (1) fração não induzida (0 horas – sem IPTG), (2) a fração induzida após 4 horas da adição de 1 mM de IPTG e o (3) representa o marcador de peso molecular usado como referência para checar o peso da proteína.....	39
Figura 11: Gel SDS-PAGE 12,5 % que representa a purificação da NUDEL-HUM feita da fração protéica insolúvel.....	40
Figura 12: Gel SDS-PAGE 12,5 % apresentado a proteína NUDEL-HUM em alto grau de pureza e concentrada a 10 mg/ml.....	41
Figura 13: Medidas de DLS da proteína NUDEL a 1 mg/ml em diferentes pHs, pH 9,5 (a); pH 8,5 (b); pH 7,5 (c) e pH 6,0 (d).....	42
Figura 14: Medidas de DLS da proteína NUDEL a 10 mg/ml em pH 7,5 contendo 100 mM de NaCl.....	44

- Figura 15:** Espectros de CD no UV distante da proteína NUDEL na ausência de aditivos (preto), presença de Zinco (vermelho) e DTT+Zinco (verde).....45
- Figura 16:** Espectro de emissão de fluorescência da proteína NUDEL na ausência de aditivos (preto), presença de Zinco (vermelho) e presença de Zinco e DTT.....47
- Figura 17:** Comparação da seqüência de aminoácidos da proteína NUDEL de *Homo sapiens* (código de acesso no GenBankTM NP110435), *Pan troglodytes* (código de acesso no GenBankTM XP001166739), *Canis familiaris* (código de acesso no GenBankTM XP850046) e *Bos taurus* (código de acesso no GenBankTM XP5879).....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de estrutura secundária da Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. Os valores são dados em porcentagem (%) e o erro é de 5,9% para as medidas adquiridas de 190 a 260 nm.....32

Tabela 2: Composição de estrutura secundária da proteína nudel na ausência e presença de aditivos. Os valores são dados em porcentagem (%) e o erro é de 6,20 % para as medidas adquiridas de 195 a 260 nm.....46

LISTA DE ABREVIACÕES

- **BCG** - Bacilo de Calmette-Guérin
- **CAT/CEPID** - Center of Applied Toxinology/Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão
- **CD** – Dicroísmo Circular
- **Cpn** - Chaperona
- **DISC1** - *disrupted-in-schizophrenia 1*
- **DLS** – *Dynamic light scattering*/Espalhamento Dinâmico de Luz
- ***E. coli*** - *Escherichia coli*
- **Hsp** – *Heat shock protein*
- **IPTG** - *Isopropylthio-B-D-galactoside*
- **LIS1** - *lissencephaly isolated sequence 1*
- ***M. leprae*** – *Mycobacterium leprae*
- ***M. tuberculosis*** – *Mycobacterium tuberculosis*
- **NBT** - Nitroblue terazolium
- **Ni-NTA** - ácido níquel-nitrilotriacético
- **NUDEL** - *Nuclear Distribution Element-like*
- **nudE** – *Nuclear distribution protein E*
- **O.D.** – *Optical density*
- **O.N.** – *Over night*
- **SDS** - Dodecil sulfato de sódio
- **SDS-PAGE** - *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*
- **T.B.** - Tuberculose
- **TEMED** - N, N, N', N'-tetrametiletilediamina
- **vc** – volume de coluna

Índice

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	2
1.1.1 Tuberculose	2
1.1.2 Heat shock proteins	3
1.1.3 Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	4
1.1.4 Estudo Filogenético da Hsp65.....	7
1.2 NUDEL (<i>nuclear distribution element-like</i>)	9
1.2.1 Esquizofrenia e doenças neurológicas relacionadas.....	9
1.2.2 Nudel	10
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	13
CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	14
3.1 Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	15
3.1.1 Preparação de células competentes (HANAHAN 1983)	15
3.1.2 Transformação por choque térmico.....	16
3.1.3 Expressão-Teste da Proteína Recombinante	17
3.1.4 Maxi-Expressão da Proteína Recombinante	17
3.1.5 Extração da Proteína na Fração Insolúvel	18
3.1.6 Diálise.....	19
3.1.7 Gel de poliacrilamida desnaturante (Soduim dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - SDS-PAGE).....	20
3.1.8 Concentração	21
3.1.9 Quantificação	21
3.1.10 Dicroísmo Circular (CD).....	22
3.1.11 Espalhamento Dinâmico de Luz (DynamicLight Scattering - DLS)	22
3.1.12 Ensaios de Cristalização.....	23
3.2 NUDEL (<i>nuclear distribution element-like</i>)	24
3.2.1 Isolamento e purificação de corpos de inclusão.....	24
3.2.2 Experimentos de Renaturação	25
3.2.3 Emissão intrínseca de fluorescência.....	25
3.2.4 Cristalização	26
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	28
4.1.1 Expressão e Purificação da Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	28
4.1.2 Dicroísmo Circular	31
4.1.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	33
4.1.4 Cristalização	35

4.1.5 Estudo comparativo da Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i> com a Hsp65 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36
4.2 NUDEL (<i>nuclear distribution element-like</i>)	39
4.2.1 Expressão e Purificação da proteína NUDEL-HUM	39
4.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	42
4.2.3 Dicroísmo Circular	45
4.2.4 Fluorescência	47
4.2.5 Ensaios de Cristalização	49
4.2.6 Alinhamento múltiplo de seqüências da NUDEL	50
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO	52
5.1 Hsp65 de <i>Mycobacterium leprae</i>	53
5.2 NUDEL (<i>nuclear distribution element-like</i>)	54
CAPÍTULO 6 – RECONHECIMENTO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Essa dissertação de mestrado apresenta, em paralelo, o estudo de duas proteínas não-correlacionadas que são de grande importância para a saúde pública. Uma está relacionada com a produção de uma nova vacina contra tuberculose, atuando como um possível adjuvante - Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. A Hsp65 de *Mycobacterium leprae* apresenta as funções básicas de chaperona molecular e atua como um potente antígeno altamente estudado para o desenvolvimento de uma possível vacina contra tuberculose que seja mais eficiente que a BCG. A outra proteína, NUDEL (do inglês *Nuclear Distribution Element like*), isolada do cérebro de humano está relacionada com o desenvolvimento neural em mamíferos e sua interação com outras proteínas citosólicas possivelmente implica na relação dessa proteína com a etiologia da esquizofrenia. Nas seções seguintes desse capítulo será feita uma descrição mais detalhada de cada uma das proteínas estudadas.

O capítulo 2 apresenta, de maneira clara e direta, os objetivos do trabalho. O capítulo 3 descreve os procedimentos experimentais, em forma de protocolo, usados para o desenvolvimento dos projetos. Os resultados e discussões são abordados no capítulo 4 e, finalmente, as conclusões são apresentadas no capítulo 5.

1.1 Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

1.1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que representa um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública do mundo (WHO, 2000). Considerando sua marcha desafiadora, estima-se que dois bilhões de pessoas (1/3 da população mundial) estão infectadas com o bacilo causador da doença, e que, desses, um em cada 10 adoecerá. Em 2005, 1,6 milhões de pessoas morreram de tuberculose, o que significa 4 400 mortes por dia (WHO, 2007)

O conhecimento sobre a dinâmica dessa doença tem como marco a identificação do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) por Robert Koch, em 1882. A TB é causada primeiramente pelo *M. tuberculosis* (bacilo de Koch), entretanto, em muitas partes do mundo, uma quantidade significativa da doença ocorre devido à infecção por microrganismos altamente relacionados como *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium bovis*. Juntamente com espécies de menor importância, esses microrganismos são coletivamente referidos como complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Estudos genômicos têm demonstrado que a vasta maioria de genes dessas espécies é idêntica, ou muito similar, e que diferenças mais intensas entre espécies e linhagens são inserções e deleções de DNA codificando um pequeno número de proteínas (COLE et al., 1998). Embora o significado funcional dessas diferenças, bem como as diversas substituições de nucleotídeos ocorridas entre espécies ainda não tenham sido esclarecidas, muitas dessas podem resultar em alterações na patogenicidade observadas entre espécies e linhagens distintas (FLEISCHMANN et al., 2002).

O tratamento da tuberculose é realizado com o uso de diferentes antibióticos por no mínimo seis meses. O longo período de tratamento e os efeitos colaterais dos medicamentos utilizados resultam no abandono do mesmo. Por outro lado, a profilaxia da TB é realizada pela administração da vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin) que foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin no Instituto Pasteur entre 1906 e 1919 (CHUNG & BIGGERS, 2001; BANNON, 1999). Essa vacina consiste de uma cepa atenuada de *M. bovis* por meio do cultivo do bacilo *in vitro* por vários anos. Estima-se que mais de três bilhões de doses da vacina BCG já foram administradas em todo o mundo (FINE, 1989).

Apesar da relativa segurança e baixo custo da vacina BCG, sua eficácia é altamente variável (FINE, 1989). A variabilidade na proteção conferida pela BCG está associada a vários fatores, tais como o contato prévio com micobactérias ambientais (principalmente nas regiões tropicais), características genéticas na população vacinada, inexistência de padronização na produção da vacina e a perda de segmentos gênicos durante as sucessivas culturas do bacilo (HESS & KAUFMANN, 1999).

Embora exista a vacina BCG e também medicamentos para a terapia de indivíduos doentes, alguns fatores estão associados ao elevado número de casos de TB, como o abandono da quimioterapia, o surgimento de novas cepas e a eficácia variável da BCG. Esse contexto levou à necessidade do desenvolvimento de uma nova vacina contra a TB, mais eficiente e segura que a BCG e que possa ser empregada em indivíduos imunocomprometidos. Nos últimos anos, foram testadas mais de 170 vacinas experimentais contra a TB, baseadas em microrganismos vivos recombinantes ou proteínas, em diferentes modelos animais, muitas das quais estão em fase de ensaio clínico (REED & LOBET 2005; GINSBERG, 2002).

1.1.2 Heat shock proteins

As proteínas do choque térmico ou, como são chamadas no Inglês *heat shock proteins* (Hsp), pertencem a várias famílias classificadas de acordo com seu peso molecular mensurado em kilodalton (kDa). Essas famílias são: pequenas Hsp's de 27 kDa, Hsp60 kDa, Hsp70 kDa, Hsp90 kDa entre outras (NEUER et al., 2000). Devido à alta homologia entre as seqüências das Hsp's de vários grupos de organismos, as mesmas são consideradas proteínas altamente conservadas filogeneticamente (POCKLEY et al., 1999).

Elas recebem esse nome pois são proteínas cuja expressão é induzida por altas temperaturas, ou seja, sob estresse térmico. Porém, uma variedade de estímulos estressantes elevam a produção das Hsp's como, por exemplo, estímulos do meio ambiente (variação brusca de temperatura, radiação ultravioleta, metais pesados), patológicos (vírus, bactérias, infecções parasitárias, febre, inflamação, auto-imunidade) ou estímulos fisiológicos (fatores de crescimento, diferenciação celular, estímulo hormonal ou desenvolvimento tecidual) (ASEA et al., 2000).

As Hsp's possuem várias funções: fazem o transporte de peptídeos, previnem a agregação protéica, auxiliam na preservação da estrutura/função de proteínas celulares em condições de estresse e, como chaperonas moleculares, auxiliam no enovelamento de outras proteínas sem alterar sua função final (VAN ÉDEN, 2000; NEUER et al., 1998). Atuam também na síntese protéica e no transporte entre compartimentos intracelulares (VAN ÉDEN et al., 1998). O termo “chaperona molecular” foi primeiramente descrito devido à função especializada de uma proteína nuclear denominada nucleoplasmina, que promove a união da cromatina (HARTL, 1996).

Uma forma particular de estresse é presenciada quando um microrganismo patogênico invade o hospedeiro. A alteração no ambiente celular do patógeno acarreta um aumento da produção de Hsp's. É nesse contexto que se destaca a principal função das Hsp's que atuam na ativação do sistema imune do hospedeiro, operando como um alarme, sinalizando as células do sistema imune a um perigo potencial e não usual nos tecidos (ZUGEL & KAUFMANN, 1999).

Essas Hsp's são consideradas importantes antígenos imunodominantes, visto que induzem uma forte resposta imunológica celular e humoral por parte do hospedeiro. De fato, estudos recentes demonstram que as Hsp's, principalmente das famílias Hsp60 e 70 kDa, são potentes desencadeadoras de resposta imune (ASEA et al., 2000).

1.1.3 Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

Nos últimos 10 anos, a comunidade científica tem explorado os estudos para melhorar as pesquisas em relação a uma possível vacina contra tuberculose. Uma vacina com benefícios clínicos deve preencher no mínimo dois benefícios ou dois componentes: codificar o antígeno de interesse e, os adjuvantes, que aumentam a resposta imune através do recrutamento e da ativação das células apresentadoras de antígenos. Muitos antígenos potentes e estratégias imunogênicas demonstraram proteção contra tuberculose em modelos experimentais e o mais recentemente estudado é a *heat shock protein* Hsp65 kDa da *Mycobacterium leprae* (LIMA et al., 2003a).

A Hsp65 de *Mycobacterium leprae* pertence à família Hsp60 kDa e tem sido identificada como um antígeno imunodominante notório, dado que provoca resposta imune humoral e ativação de células T no hospedeiro durante a infecção micobacteriana

(NAGABHUSHANAM et al., 2001). Silva et al. 1999 revelaram uma proteção importante conferida pela Hsp65 de *M. leprae*, a qual estimula o hospedeiro mamífero a resistir a uma infecção causada por *M. tuberculosis*. O mecanismo exato pelo qual essa particular Hsp, e não outra, regula a resposta imune gerando proteção contra a tuberculose não está elucidado, mas sua eficiência é impressionante e reprodutível (LIMA et al., 2003b). Sendo assim, uma importante aplicação para a Hsp65 de *M. leprae* é seu uso como adjuvante ou vacina contra tuberculose devido ao seu alto poder imunogênico (PORTARO et al., 2002).

A partir dos estudos q objetivaram determinar o mecanismo molecular que acarreta a eficiência da vacina de cDNA de Hsp65 de *M. leprae* contra tuberculose, notou-se que o citosol de macrófagos de camundongos expressando Hsp65 de *M. leprae* exibia uma alta atividade oligopeptidásica em relação ao controle (SILVA et al., 1999; LOWRIE et al., 1999). Cogitou-se, então, que essa elevada atividade seja, provavelmente, devido à própria Hsp 65. Portaro et al., 2002 caracterizaram a Hsp65 de *M. leprae* recombinante como sendo a responsável por essa atividade. O teste de atividade, que identificou a presença de fragmentos gerados a partir dos polipeptídeos usados como substratos, foi o estudo que evidenciou a provável atividade oligopeptidase. Um alinhamento entre as seqüências de resíduos de aminoácidos de Hsp65 e da protease Hs1VU, também uma *heat shock protein*, de *Escherichia coli* sugeriu os prováveis resíduos catalíticos responsáveis pela possível atividade proteolítica de Hsp65 de *M. leprae* (Figura 01) (PORTARO et al., 2002).

HSP65	MPGRDGETQP	ASCGRPSRAL	HPASVSNGGC	RHPVTLASFL	IRRNHFAMAK	TIAYDEEARR	60
HSP65	GLERGLNSLA	DAVKVTLGPK	GRNVVLEKKW	GAPTITNDGV	SIAKEIELED	PYEKIGAEVLV	120
HSP65	KEVAKKTDVV	AGDGT ^T TATV	LAQALVKEGL	RNVAAGANPL	GLKRGIE ^K KAV	DKVTETLLKD	180
Hs1VU		^T TIVS	VRRNGHVVIA	GDGQATLGNT	VMKGNV ^K KVR	RLYNDKVIAG	45
		**			*		
HSP65	AKEVETKEQI	AATAAISAGD	QSIGDLIAEA	MDKVGNEGVI	TVEESNTFGL	QLELTEGMRF	240
Hs1VU	FAGGTADAFT	LFELFERKLE	MHQGHLVCAA	VELAKDWRTD	RMLRKLEALL	AVADETASLI	105
HSP65	DKGYISGYFV	TDAERQEAVL	EEP ^Y ILLVSS	KVSTVKDLLP	LLEKVIQAGK	SLLIIAEDVE	300
Hs1VU	ITGNGDVVQP	ENDLIAIG ^S G	GPYAQAARA	LLENTELSAR	EIAEKALDIA	GDICIYTNHF	165
HSP65	GEALSTLVVN	KIRGTFKSVA	VKAPGFGDRR	KAMLQDMAIL	TGAQVISEEV	GLTLENTDLS	360
Hs1VU	HTIEELSYKA	EFHHHHHH					183
HSP65	LLGKARKVVM	TKDE ^T TIVEG	AGDTDAIAGR	VAQIRTEIEN	SDSDYD ^R REKL	QERLAKLAGG	420
Hs1VU		^T TIVSV	RRNGHVVIAG	DGQATLGNTV	MKGNV ^K KVRR	LYNDKVIAGF	46

HSP65	VAVIKAGAAAT	EVELKERKHR	IEDAVRNAKA	AVEEGIVAGG	GVTLLQAAPA	LDKCLKLTGDE	480
Hs1VU	AGGTADAFTL	FELFERKLEM	HQGHLVKAAY	ELAKDWRTR	MLRKLEALLA	VADETASLII	106
HSP65	ATGANIVKVA	LEAPLKQIAF	NSGMEPGVVA	EKVRNLSVGH	GLNAATGEYE	DLLKAGVADP	540
Hs1VU	TGNGDVVQPE	NDLIAIG ^S GG	PYAQAARAL	LENTELSARE	IAEKALDIAG	DICIYTNHFH	166
HSP65	VKVTRSALQN	AASIAGLFLT	TEAVVADKPE	KTAAPASDPT	GGMGGMDF		588
Hs1VU	TIEELSYKAE	FHHHHHH					183

Figura 01: Alinhamento apresentado por Portaro et al., 2002 entre a Hsp65 de *Mycobacterium leprae* e a protease Hs1VU apresentando a indicação da suposta tríade catalítica.

A tríade catalítica dessa protease consiste do resíduo nucleofílico T¹, ativado pelo aminácido básico K³³ e do resíduo responsável pela formação de ligação de hidrogênio S¹²⁴ (BOCHTLER et al., 1997). Embora a Hs1VU e Hsp65 de *M. leprae* apresentem baixa similaridade de seqüência de resíduos de aminoácidos (20 %), os resíduos reativos de Hs1VU (T¹, K³³ e S¹²⁴) alinham-se com T^{136,137}, K¹⁶⁸ e Y²⁶⁴ no N-terminal e com T^{375,376}, R⁴⁰⁷ ou K⁴⁰⁹ e S⁵⁰² no C-terminal da molécula de Hsp65 de *M. leprae* (Figura 01). Esses dois prováveis sítios catalíticos da Hsp65 foram alvos de estudos de mutagênese sítio-dirigida e os melhores resultados foram obtidos com mutações dirigidas à tríade catalítica do C-terminal. Nenhuma mutação foi dirigida aos resíduos de treonina, pois, como demonstrado para Hs1VU, substituições T¹/A e T²/A causaram pouca redução na atividade enzimática (MISSIAKAS et al., 1996).

A substituição K⁴⁰⁹/A, no C-terminal, acarretou uma perda completa de atividade proteolítica, enquanto a substituição R⁴⁰⁷/A foi menos efetiva (72% de perda de atividade). Contrariamente, a substituição K¹⁶⁸/A, na tríade hipotética do N-terminal, foi muito menos efetiva (25% da perda de atividade). Assim, esses resultados sugerem que os aminoácidos T³⁷⁵, K⁴⁰⁹ e S⁵⁰² formam a tríade responsável pela possível atividade proteolítica de Hsp65 de *M. leprae* (PORTARO et al., 2002).

1.1.4 Estudo Filogenético da Hsp65

Durante um estudo filogenético, realizado por Hughes 1993, revelou-se que a Hsp65 kDa de *M. tuberculosis* é codificada por dois genes diferentes provenientes de uma duplicação gênica no ancestral comum entre *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* e *Streptomyces albus*. Um dos genes, que codifica a proteína, está localizado em um cromossomo no mesmo operon que codifica a Hsp10 kDa (ou, também chamada de Cpn 10). Essa Hsp65 (ou também chamada de Cpn 60-1), na atuação do mesmo operon que a Cpn 10, forma um complexo similar ao complexo GroEL/ES de *E. coli* que se trata de chaperona molecular típica. O outro gene que codifica para a Hsp65 (chamada Cpn 60-2) se localiza em outro cromossomo (Figura 02) (modificado de KONG et al., 1993).

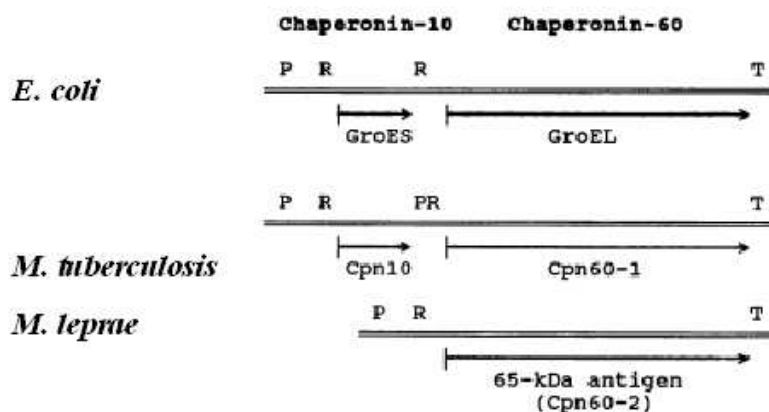


Figura 02: Esquema simplificado do resultado do processo de duplicação do gene que codifica para a Hsp65 de *M. tuberculosis* e *M. leprae*. No gene ancestral, a Hsp65 (ou Cpn 60-1) está sob atuação do mesmo operon que a Cpn10 codificando uma proteína similar à GroEL/ES. O produto da duplicação do gene que codifica para a Hsp65 (ou Cpn 60-2) não está sob atuação desse operon, localizando-se em outro cromossomo.

A proteína Hsp65 kDa (Cpn 60-2) é o maior alvo de estudo para a resposta imune do hospedeiro vertebrado durante infecção por patógenos como a *Mycobacterium tuberculosis* e a *M. leprae* (Young et al., 1988). Nesse sentido, o gene que codifica a Hsp65 (Cpn 60-2) de *Mycobacterium leprae*, está sob extensivo estudo na tentativa de se caracterizar novas funções, como a já relatada de possível oligopeptidase, mas nenhum estudo da estrutura tridimensional foi feito até o momento, a fim de que se confirmem os determinantes estruturais dessa função.

1.2 NUDEL (nuclear distribution element-like)

1.2.1 Esquizofrenia e doenças neurológicas relacionadas

A esquizofrenia é uma desordem psíquica que afeta cerca de 1 % da população mundial (BRANDON et al., 2004) sendo caracterizada por distúrbios do funcionamento emocional e social. É considerada também uma doença genética complexa, com herdabilidade consideravelmente alta, que se relaciona às más formações do hipocampo e do córtex dorsolateral (LIPSKA et al., 2006). A doença se manifesta, na maioria das vezes, na adolescência e início da fase adulta, mas raramente na infância. Recentemente, vários genes foram identificados como genes candidatos à susceptibilidade para a esquizofrenia, incluindo *neuregulin 1* (STEFANSSON et al., 2002), *dysbindin* (STRAUB et al., 2002), *G72* (CHUMAKOV et al., 2002), *catechol-O-methyltransferase* (EGAN et al., 2001; BILDER et al., 2002; SHIFMAN et al., 2002), e outros (CRADDOCK et al., 2005; HARRISON & WEINBERGER, 2005). Embora esses genes candidatos tenham sido identificados, os mecanismos moleculares nos quais se baseia a doença são desconhecidos.

O *DISC1* é um dos genes candidatos mais prováveis para a suscetibilidade à esquizofrenia e doenças relacionadas (MILLAR et al., 2000; BLACKWOOD et al., 2001; CRADDOCK et al., 2005). Em uma família escocesa, a translocação cromossômica (1;11)(q42.1;q14.3) foi associada com doenças psíquicas graves, como a esquizofrenia, a desordem bipolar e a depressão recorrente, porém com predominância da sintomatologia da esquizofrenia (BLACKWOOD et al., 2001). Essa translocação interrompe a seqüência que codifica a proteína DISC1, acarretando diminuição na expressão da mesma ou na deleção de 257 resíduos de aminoácidos da região C-terminal da mesma (MILLAR et al., 2005). Análises usando polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) da região 1q42 indicaram que o gene *DISC1* tem um papel importante na etiologia da esquizofrenia (HENNAH et al., 2003; HODGKINSON et al., 2004; CALLICOTT et al., 2005).

O gene *DISC1* codifica uma proteína de 854 aminoácidos que não apresenta homologia com outras proteínas conhecidas e pouca homologia entre espécies (MILLAR et al., 2005). A seqüência de aminoácidos da DISC1 prediz que esta pode atuar como uma “plataforma” de interação com múltiplos motivos de ligação, facilitando a formação de complexos com outras proteínas. O domínio N-terminal, supostamente globular,

(aminoácidos 1-347) contém sinais de localização nuclear, enquanto o C-terminal (aminoácidos 348-854) é formado por *coiled coil*, o que sugere um papel de interação com outras proteínas, além de ser importante para o endereçamento de complexos para os microtúbulos. Em culturas celulares, mutantes da DISC1 que possuem o C-terminal truncado (como predito pela translocação no cromossomo 1q42) dificultam ou impedem o transporte intracelular, a arquitetura e migração neural. A hipótese de que a forma patológica da DISC1 encontrada na família escocesa seja incapaz de interagir com proteínas parceiras recebeu suporte em estudos de duplo-híbrido em levedura que confirmaram as proteínas NUDEL (OZEKI et al., 2003; MILLAR et al., 2003; MORRIS et al., 2003), *Fasciculation and elongation protein zeta 1* (FEZ1) (MIYOSHI et al., 2003), *lissencephaly isolated sequence 1* (LIS1) (BRANDON et al., 2004) e fosfodiesterase 4B (PD4B) (MILLAR et al., 2005) como ligantes da DISC1.

O complexo DISC1/NUDEL existe no cérebro de camundongo e é regulado de acordo com os estágios do desenvolvimento neural. O complexo é expresso no córtex cerebral e está, majoritariamente, presente na embriogênese tardia, quando ocorre o desenvolvimento do córtex no embrião, apresentando-se em nível bem reduzido na vida pós-natal. Importantes evidências que relacionam a translocação em DISC1 com anormalidades corticais provêm de estudos que mostram que a DISC1 mutante afeta a migração neural.

1.2.2 Nudel

A proteína NUDEL recebeu esse nome devido à homologia com a proteína nudE de *Aspergillus*, a qual é produto do gene *nudE*, membro de um grupo de genes importantes na migração nuclear em fungos (EFIMOV & MORRIS, 2000; KITAGAWA et al., 2000). Ela foi, primeiramente, isolada devido à sua habilidade em inativar peptídeos bioativos, como a bradicinina e neurotensina e, também, em converter peptídeos opióides em encefalinas (OLIVEIRA et al., 1976, CAMARGO et al., 1979). A NUDEL é responsável por cerca de 70% da atividade peptidásica encontrada no cérebro de rato e coelho, sendo essa atividade enzimática maior no cérebro de rato e do coelho do que em qualquer tecido periférico, o que foi confirmado por análises imunológicas, por *Western* e *Northern blotting* e por hibridização *in situ* (HAYASHI et al., 2000).

Originalmente descrita como conversora de encefalinas e metabolizadora de neuropeptídeos, a NUDEL interage com proteínas neuronais sendo essencial no desenvolvimento e organização do córtex cerebral durante a embriogênese (GUERREIRO et al., 2005). Recentemente, estudos mostraram evidências de seu possível envolvimento em processos como rotas metabólicas, sinalização celular e mudança do citoesqueleto, além da modulação de processos fisiopatológicos, de desordens neurológicas e neuroespecíficas como a Esquizofrenia e a Lisencefalia.

A NUDEL é uma oligopeptidase ativada por tiol que cliva oligopeptídeos de 7 a 13 resíduos de aminoácido. O resíduo C273 é essencial para a atividade enzimática, sugerindo que a proteína pertença à família das cisteíno-peptidases. A NUDEL está, possivelmente, envolvida na modulação da atividade neuropeptídica, uma vez que essa enzima não está confinada apenas ao citosol de neurônios, sendo encontrada também fora da célula (HAYASHI et al., 2005).

A relação da NUDEL com a gênese da esquizofrenia deve-se a interação dessa proteína com produto do gene *DISC1*. Um zíper de leucina na região C-terminal da *DISC1* é essencial para a interação com NUDEL. Essa região seria inexistente em uma proteína afetada pela translocação descrita anteriormente, o que impediria as funções celulares dependentes do complexo *DISC1*/NUDEL. O sítio de ligação da *DISC1* na NUDEL é altamente conservado entre espécies, sendo os resíduos L266 e E267, essenciais para a interação *DISC1*/NUDEL, conservados em todos os homólogos conhecidos (SWEENEY et al., 2001). Esse domínio de ligação da NUDEL com a *DISC1* é compartilhado com a cadeia pesada da dineína (proteína motora) (SASAKI et al., 2000), sugerindo que a *DISC1* pode inibir ou modular a interação da NUDEL com a dineína e, conseqüentemente, interferir na localização celular do complexo.

A atividade de oligopeptidase da NUDEL é exercida pela sua forma monomérica, sugerindo que, quando presente em complexos, como *DISC1*/NUDEL, não apresenta atividade enzimática. A inibição da atividade enzimática perante ligação com *DISC1* é explicada pela proximidade entre o sítio de ligação da *DISC1* na NUDEL (L266 e E267) e o sítio catalítico situado próximo ao resíduo 273 (HAYASHI et al., 2005). Dessa forma, a translocação em *DISC1* produz uma proteína mutante incapaz de ligar à NUDEL e, conseqüentemente, de inibir sua atividade, acarretando em um aumento da atividade

oligopeptidásica da NUDEL e em alterações no nível de seus substratos. Sabe-se que, dentre os substratos da NUDEL, existem alguns neuropetídeos que estão implicados na patofisiologia da esquizofrenia, como a neurotensina (HAYASHI et al., 2005).

Além de seu papel na migração neural, o complexo DISC1/NUDEL também está envolvido nos mecanismos que acarretam o crescimento neural (alongamento axonal), uma vez que a NUDEL foi, primeiramente, identificada como uma proteína de ligação à LIS1 (*lissencephaly isolated sequence 1*) (NIETHAMMER et al., 2000; SASAKI et al., 2000) por meio de sua porção amino-terminal, uma região de *coiled coil* que compreende o sítio de ligação para a LIS1. Mutações em LIS1 acarretam lisencefalia tipo 1, que é caracterizada por má formação do cérebro humano devido a uma redução ou ausência das convoluções do córtex cerebral devido à interrupção na migração e crescimento cerebral (REINER et al., 1993; HATTORI et al., 1994, KHOLMANSKIKH et al., 2003). Essas mesmas mutações impedem a interação entre LIS1 e NUDEL, correlacionando a não formação do complexo DISC1/NUDEL/LIS1 com a doença (FENG et al., 2000; SASAKI et al., 2000; SWEENEY et al., 2001).

Assim, pode-se concluir que a NUDEL possui dois papéis fisiológicos fortemente entrelaçados. O primeiro relaciona-se a sua associação com proteínas citosólicas como DISC1 e LIS1 essencial para o funcionamento normal do cérebro devido ao envolvimento em processos como crescimento e migração neural. O segundo diz respeito à sua atividade peptidásica, sugerindo sua participação na regulação da ação de neuropetídeos do sistema nervoso central. Esses dois papéis desempenhados pela NUDEL associam-na a duas doenças relacionadas ao desenvolvimento do córtex cerebral: esquizofrenia e lisencefalia. Portanto, estudos estruturais da proteína NUDEL podem confirmar as predições sobre a disposição e organização dos motivos importantes para interação com DISC1 e LIS1 além de desvendar seu mecanismo catalítico. Essas informações estruturais podem complementar os dados funcionais da proteína e ajudar no entendimento da dinâmica neural responsável pela etiologia de doenças mentais.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

Nesse projeto de mestrado, os alvos principais foram a expressão e a purificação em grande escala e alta pureza da proteína recombinante Hsp65 (Cpn 60-2) de *M. leprae* e da proteína NUDEL *Homo sapiens* (NUDEL-HUM) para estudos estruturais.

Como objetivo paralelo, um dos alvos do projeto de mestrado foi treinar a aluna a trabalhar com as mais variadas técnicas que estão descritas no Capítulo 3 – Procedimentos Experimentais. Com isso, a aluna pôde trazer esses conhecimentos e aplicá-los no laboratório de Biologia Molecular da UNESP/IBILCE que não possuía estudantes bem treinados e preparados para trabalhar nessa área de pesquisa.

CAPÍTULO 3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Esse capítulo descreve, de maneira detalhada, os materiais e os métodos descritos como protocolos, usados para a execução dos projetos apresentados nessa dissertação de mestrado.

3.1 Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

3.1.1 Preparação de células competentes (HANAHAN 1983)

Materiais:

- tubos de cultivo estéreis com capacidade para 15 ml,
- meio de cultivo Luria Broth (LB): 1,0% triptona, 1% de extrato de levedura e 0,5% de NaCl,
- incubadora com temperatura (37 °C) e agitação controladas,
- banho de gelo,
- espectrofotômetro para leitura da densidade óptica (D.O.) em 600nm,
- centrífuga *Sorval* modelo RC 5B Plus,
- solução 1: 100 mM de MgCl₂ estéril,
- solução 2: 100 mM de CaCl₂ estéril,
- solução 3: 15% (v/v) de glicerol 100% e 85% (v/v) de 100 mM de CaCl₂,
- tubos estéreis com capacidade de 1,7 ml,
- nitrogênio líquido,
- freezer - 80°C

Métodos:

Transferir 100 µl de um estoque de célula competente BL21 (DE3) para um tubo de cultura contendo 3 ml de meio LB. Essa cultura foi mantida por 16 horas em incubadora. A seguir transferiu-se esse conteúdo para um frasco contendo 200 ml de meio LB que foi incubado até atingir um valor de densidade ótica - D.O._(600 nm) em torno de 0,3. Nesse instante, interrompeu-se o crescimento celular colocando o frasco em banho de gelo. Centrifugou-se a cultura a 4000 x g por 15 minutos à 4 °C para decantar as células. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 50,75 ml da solução 1, onde permaneceu no gelo por 5 minutos e, a seguir, centrifugou-se a suspensão nas mesmas condições. As células foram ressobilizadas em 10,15 ml da solução 2, em banho de gelo, assim permanecendo por 20 minutos sendo então centrifugada nas mesmas condições. Novamente o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1,5 ml da solução 3.

Aliquotou 100 µl em tubos com capacidade de 1,7 ml que foram congeladas e estocadas em freezer – 80 °C.

3.1.2 Transformação por choque térmico

Materiais:

- 200 ng de DNA plasmidial,
- linhagem BL21 (DE3) competentes de *Escherichia coli*,
- banho de gelo,
- banho térmico à 42°C,
- SOC (0,5% extrato de levedura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glicose),
- tubos de cultivo estéreis,
- incubadora com temperatura (37 °C) e agitação controladas,
- centrífuga *ependorf* modelo 5415D,
- placas de petri estéreis,
- LB-ágar (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7,5 e 1,8% ágar p/v,
- antibióticos: ampicilina na concentração de 100 µg/ml e cloranfenicol a 34 µg/ml,
- estufa de incubação com temperatura controlada à 37°C,

Métodos:

O vetor pUC19 contendo o gene codificante foi utilizado para transformar, por choque térmico, linhagens BL21 (DE3) competentes de *Escherichia coli* com o fim de expressar a proteína. Para tanto, 2 µl de cada DNA plasmidial foram incubados com 100 µl de bactérias competentes no gelo por trinta minutos seguidos de um minuto em banho à 42°C e, por fim, mais três minutos no gelo. Após o choque térmico, 950 µl de SOC foram adicionados às células e essas foram incubadas por uma hora. A seguir, centrifugou-se a amostra por três minutos a 4000 x g com a finalidade de precipitar as células bacterianas, descartou-se o sobrenadante deixando apenas 100 µl para ressuspender as células. Esse material foi plaqueado em meio LB-ágar contendo ampicilina e cloranfenicol e incubado em estufa por 12 horas.

3.1.3 Expressão-Teste da Proteína Recombinante

Essa etapa foi feita com o objetivo de verificar a expressão da proteína recombinante por análise em SDS-PAGE 10% da fração não-induzida e induzida com isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) e para analisar a quantidade de proteína na fração solúvel e insolúvel.

Materiais:

- alça estéril,
- tubos de cultivo estéreis,
- meio de cultivo LB,
- antibióticos: ampicilina na concentração de 100 µg/ml e cloranfenicol a 34 µg/ml,
- incubadora com temperatura (37 °C) e agitação controladas,
- espectrofotômetro para leitura da densidade óptica (D.O.) em 600nm,
- solução de IPTG (Isopropylthio-B-D-galactoside – Invitrogen) a 1 M.

Métodos:

Uma colônia da placa transformada foi transferida, com o auxílio de uma alça, estéril, para um inóculo de 3 ml de LB contendo ampicilina e cloranfenicol. O crescimento foi feito em incubadora por um período de 12 horas. Posteriormente, uma alíquota de 100 µl desse inóculo foi usado para inocular 20 ml de meio LB, contendo ampicilina e cloranfenicol e deixado em incubadora até que se atingisse um valor de D.O. em torno de 0,6-0,8. Nesse instante, adicionou-se IPTG a uma concentração final de 0,5 mM e incubou-se a cultura por quatro horas, à 37 °C, sob agitação.

3.1.4 Maxi-Expressão da Proteína Recombinante

A maxi-expressão da proteína recombinante iniciou-se partindo do mesmo inóculo que foi usado para fazer a expressão-teste.

Materiais:

- meio de cultivo LB,
- tubos de cultivo estéreis,
- antibióticos: ampicilina na concentração de 100 µg/ml e cloranfenicol a 34 µg/ml,
- incubadora com temperatura (37 °C) e agitação controladas,
- centrífuga *Sorval* modelo RC 5B Plus,
- solução salina (0,9% de NaCl),
- freezer - 20°C

Métodos:

Uma alíquota de 100 µl, do pré-inóculo da expressão-teste, foi usada para inocular um meio de 20 ml de LB, contendo ampicilina e cloranfenicol, para ser incubada por 12 horas. Esse meio foi usado para inocular a maxi-expressão que se deu em um litro de LB contendo os mesmos antibióticos. A cultura foi mantida na incubadora por aproximadamente 3 horas até que a D.O. (600nm) atingisse valor próximo de 0,6-0,8 seguindo-se, então, a adição IPTG. Todos os parâmetros foram mantidos iguais para garantir que a proteína alvo fosse expressa nas mesmas condições.

Após a indução por quatro horas, a cultura foi centrifugada a 4000 x g, por quinze minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e a fração celular foi ressuspensa em 15 ml de solução salina e transferida para um tubo de centrifugação. Foi feita uma nova centrifugação a 4000 x g, por vinte minutos para descartar o sobrenadante e congelar a fração celular.

3.1.5 Extração da Proteína na Fração Insolúvel

Materiais:

- tampão A: Tris-HCl 20 mM pH 7,5
- tubos com capacidade de 50 ml,
- sonicador: VirSonic
- banho de gelo
- centrífuga *Sorval* modelo RC 5B Plus,
- tampão B (4 M guanidina, 50 mM citrato de sódio e 20 mM EDTA, pH 7,0);

Métodos:

O primeiro passo foi ressuspender a fração celular em 20 ml de tampão A e transferir para um tubo com capacidade de 50 ml. A seguir as células foram sonicadas em aparelho VirSonic no gelo em 10 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos. Centrifugou-se a amostra por quinze minutos a 6000 x g à 4°C. O sobrenadante foi descartado e a fração celular insolúvel foi lavada com o mesmo tampão A por mais três vezes. Seguiu-se a solubilização da proteína do corpúsculo de inclusão adicionando-se 20 ml de tampão B. Centrifugou-se por dez minutos a 6000 x g à 4°C e reservou-se o sobrenadante.

3.1.6 Diálise

Matérias:

- membrana de diálise: MWCO 6,000 – 8,000 *Fisherbrand*
- tampão A: 2,5 M guanidina, 50mM de Tris HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 50 mM glicina, 20 mM NaCl,
- tampão B: 1,5 M guanidina, 50mM de Tris HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 20 mM NaCl,
- tampão C: 0,5 M guanidina, 50mM de Tris HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 20 mM NaCl,
- tampão D: 50 mM de Tris HCl pH 7,5, 20 mM de NaCl, 3 % de glicerol

Método:

A solução protéica foi colocada em membrana de diálise para a retirada do agente desnaturante de maneira gradual. Assim sendo, de 12 em 12 horas foi feita a troca do tampão A ao D, mantida sempre, a 4 °C.

3.1.7 Gel de poliacrilamida desnaturante (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - SDS-PAGE)

Usou-se a eletroforese como ferramenta metodológica essencial não só para avaliação da expressão heteróloga como também para a análise da homogeneidade das várias preparações obtidas após a etapa de purificação usada. Nesse trabalho, usou-se o protocolo descrito por Laemmli (com modificações), U.K., 1970 para a confecção de SDS-PAGE 10%.

Materiais:

- aparato de eletroforese da Bio-Rad (cuba, fonte, placas de vidro),
- solução de gel separador 10%: 3,45 ml de 30% acrilamida/0,8% bis-acrilamida, 5 ml de Tris-HCl/SDS pH 8.8 (1,5 M Tris-Cl contendo 0,4% de SDS), 1,5 ml de água, 50 ul de persulfato de amônio a 10% e 15 ul de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina)
- solução do gel concentrador 4%: 0,75 ml de 30% acrilamida/0,8% bis-acrilamida, 2,5 ml de Tris-Cl/SDS pH 6.8 (0,5 M Tris-Cl contendo 0,4% de SDS), 1,83 ml de água, 30 ul de persulfato de amônio a 10% e 6 ul de TEMED,
- tampão de amostra 3X: 25 ml de Tris-HCl/SDS pH 6.8 (0,5 M Tris-Cl contendo 0,4% de SDS), 20 ml de glicerol, 4 g de SDS, 1 mg de azul de bromofenol. Adicionar água para um volume de 100 ml,
- tampão de corrida: 5 g de Tris, 15 g de Glicina, 10 ml de SDS 10%, completar para 1 L de água
- solução de *Comassie Blue* R-250: 0.25g coomassie brilliant blue R-250 em 100 ml de uma solução 45% metanol e 10% ácido acético,
- Solução descorante: 5% (v/v) de metanol, 7% (v/v) ácido acético, 88% água.

Métodos:

A corrida de eletroforese foi realizada por aproximadamente duas horas, à temperatura ambiente, em corrente de 30 mA e voltagem 120 V. Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi colocado em uma solução de *coomassie-blue* R-250 para coloração por

5 horas à temperatura ambiente. A remoção do excesso de corante foi obtida em solução descorante até o aparecimento nítido das bandas de proteínas.

3.1.8 Concentração

Métodos:

Após a diálise, a amostra foi concentrada a 4 °C utilizando o concentrador Amicon Ultra –15 de 10000 Da (Millipore) a uma rotação de 5000 x g.

3.1.9 Quantificação

Métodos:

A concentração da proteína foi determinada através da medida de absorvância da mesma a 280 nm. Os espectros de absorvância foram obtidos em um espectrofotômetro *Spectronic Genesys 2*, com varredura de comprimento de onda de 340-200 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico. O espectro de absorvância da proteína foi corrigido com a subtração do espectro de absorvância do tampão correspondente (“branco”) contendo 50 mM de Tris HCl pH 7,5, 20 mM de NaCl, 3 % de glicerol. A partir dos valores dos coeficientes de extinção molar (ϵ) obtidos através do programa *ProtParam* (<http://ca.expasy.org>) e dos valores de absorvância a 280 nm, determinou-se a concentração molar da proteína de acordo com a equação de Beer-Lambert:

$$A^{280} = \epsilon \times L \times C$$

onde A^{280} é a absorvância medida a 280 nm, ϵ é o coeficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$), L é o caminho ótico em centímetros (cm) e C é a concentração molar da amostra de proteína. A amostra de proteína foi centrifugada a 5000 x g por 10 minutos antes de ser utilizada para medir a concentração.

3.1.10 Dicroísmo Circular (CD)

Materiais:

- proteína a 0,1 mg/ml.

Métodos:

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro *JASCO J-810* (JASCO), com um controlador de temperatura *Peltier type control system* PFD 425S. O programa utilizado para registro dos dados foi o *Spectra manager*[®] (JASCO). Os espectros de dicroísmo circular no UV distante (260-190 nm) foram adquiridos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 2 mm de caminho ótico, em temperatura ambiente, com velocidade de varredura de 20 nm/minuto, tempo de resposta de 1 segundo. O espectro final foi obtido pela acumulação de 6 varreduras. A contribuição do solvente foi eliminada subtraindo seu espectro daquele da proteína.

Os valores obtidos na leitura de CD (mili graus) foram convertidos em elipticidade molar residual $[\theta]$ através da expressão (ADLER *et al.*, 1973):

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 L C N}$$

onde θ é a elipticidade medida (graus), L é o caminho ótico em centímetros (cm), C é a concentração molar (M) e N é o número de aminoácidos da proteína. Os dados convertidos foram graficados utilizando-se o programa *ORIGIN 7.1*. Para determinar a porcentagem de estrutura secundária da proteína de fusão, utilizou-se o programa *CDNN deconvolution* (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdn/>). Os erros intrínsecos ao cálculo de porcentagem de estrutura secundária foram indicados em cada tabela.

3.1.11 Espalhamento Dinâmico de Luz (DynamicLight Scattering - DLS)

Materiais:

- solução protéica, em tampão 50 mM Tris HCl pH 7,5 contendo 20 mM NaCl e 3 % glicerol, à 12 mg/ml,

Métodos:

As medidas de DLS foram realizadas em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico a 20 °C utilizando-se o equipamento ProteinSolutions Dynapro 99 (Dynapro *Molecular Sizing Instrument*), portando um controlador de temperatura, em comprimento de onda de 781,2 nm e ângulo de detecção do espalhamento de 90° . O programa usado para a execução das medidas do raio hidrodinâmico foi o Dynamics V6.3.4.

3.1.12 Ensaio de Cristalização

Materiais:

- solução protéica, em tampão 50 mM Tris HCl pH 7,5 contendo 20 mM NaCl e 3 % glicerol, a 12 mg/ml,
- Kits comerciais da Hampton Research (Crystal Screen 1 e 2) totalizando 96 condições diferentes,

Métodos:

Os ensaios iniciais de cristalização foram realizados a 14 °C, testando-se 96 condições de cristalização obtidas dos Kits comerciais da Hampton Research (Crystal Screen 1 e 2), pelo o método de difusão de vapor em gota pendurada em placas de cultura Linbro de 24 poços, sendo o volume de proteína usado por poço de 1 µl e 1 µl de solução saturante e o volume da solução saturante, no poço, foi de 500 µl.

3.2 NUDEL (*nuclear distribution element-like*)

Os protocolos de preparação de células competentes, transformação por choque térmico, maxi-expressão da proteína recombinante (com mudança apenas na temperatura de indução que foi de 30 °C), gel de poliacrilamida desnaturante (12,5%), concentração, quantificação, dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz são os mesmos descritos nas seções anteriores.

3.2.1 Isolamento e purificação de corpos de inclusão

Materiais:

- Tampão de Lise: 20 mM de Tris-HCl pH 7.5
- Tampão A: 100 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 8 M de uréia e 5 mM de β -mercaptoetanol.
- Tampão B: 100 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 8 M de uréia e 5 mM de β -mercaptoetanol.

Métodos:

O protocolo de isolamento e purificação de corpos de inclusão foi elaborado com base em outros protocolos descritos na literatura (CHOW et al., 2006, LIU et al. 2007, WARNER et al., 2007, MARK et al., 2007, ARAKAWA et al., 2007), e adaptado para a purificação da proteína NUDEL. As bactérias coletadas por centrifugação após o período de 4 horas de indução por IPTG foram ressuspensas em tampão de lise. A amostra foi, então, sonicada no aparelho VirSonic e centrifugada por 15 minutos a 18600 x g, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 30 ml de tampão de lise, repetindo o mesmo procedimento de centrifugação e lavagem por mais três vezes. Depois da última lavagem com o tampão de lise, o precipitado foi resuspendido em tampão de extração (tampão A) e a amostra foi centrifugada a 13700 x g, 4 °C, por 20 minutos. O sobrenadante contendo a proteína NUDEL em fusão com a cauda de poli-histidina foi, então, purificado por cromatografia de afinidade utilizando-se a resina comercial *Ni-NTA* (Nitrilo triacetato) *Agarose Beads* (Quiagen), sob condições desnaturantes.

Em 1 ml de resina Ni-NTA, sendo essa equilibrada com 10 volumes de coluna (vc) com tampão A, acrescentou-se a amostra da proteína NUDEL desnaturada e a fração da mesma não retida na matriz foi coletada e reservada. Lavou-se a coluna com 30 vc de tampão A sem imidazol e, em seguida, com 20 vc de tampão A. Eluiu-se a proteína com 10 ml de tampão B em frações de 1 ml para posterior análise em SDS-PAGE.

3.2.2 Experimentos de Renaturação

Materiais:

- Tampão de Diluição: 100 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 30 % de glicerol, 1 mM de Glutathione Reduzida, 1 mM de EDTA, 500 mM de l-arginina.
- Tampão de Diálise: 100 mM de NaCl e 50 mM de Tris-HCl pH 7,5

Métodos:

Após purificação da NUDEL sob condições desnaturantes e análise da pureza por SDS-PAGE, as frações puras da eluição foram diluídas 60 vezes, gota a gota, em tampão de diluição por 24 horas a 4 °C sob agitação. A solução de diluição foi, então, dialisada contra 2 L de tampão de diálise por 12 horas, seguidos de mais 2 L de tampão por 12 horas, a 4 °C.

3.2.3 Emissão intrínseca de fluorescência

Materiais:

- proteína concentrada à 0,05 mg/ml em tampão 15 mM de Tris-HCl pH 7,5 contendo 30 mM de NaCl, na presença e ausência de 0,1 mM de ZnCl₂ e 1 mM de DTT.

Métodos

Os estudos de emissão intrínseca de fluorescência foram realizados no espectrômetro de fluorescência *AMINCO-Bowman Series 2*, utilizando-se uma cubeta de quartzo 1 x 0,4 cm em temperatura ambiente.

A proteína foi excitada com uma radiação incidente de 295 nm (excitação do aminoácido triptofano, de forma majoritária) e os espectros de emissão foram coletados em

um intervalo de comprimento de onda de 300 e 500 nm, com velocidade de varredura de 1 nm/segundo e tempo de resposta automático. A contribuição do solvente foi eliminada subtraindo seu espectro daquele da proteína. Os dados foram graficados utilizando-se o programa *ORIGIN 7.1*. Os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão foram obtidos dos espectros de emissão de fluorescência.

3.2.4 Cristalização

Materiais:

- As concentrações da proteína utilizadas para os experimentos foram de 8,5 mg/ml (em tampão 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mM de NaCl) e 10,0 mg/ml (em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM de NaCl e 0,1 mM de ZnCl) e 10,0 mg (em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM de NaCl, 0,1 mM de ZnCl e 1 mM de DTT).
- Kits comerciais da Hampton Research (Crystal Screen 1 e 2) totalizando 96 condições diferentes,

Métodos

Os ensaios iniciais de cristalização foram realizados a 14 °C, testando-se 96 condições de cristalização obtidas dos Kits comerciais da Hampton Research (Crystal Screen 1 e 2), pelo o método de difusão de vapor em gota pendurada em placas de cultura Linbro de 24 poços, sendo o volume de proteína usado por poço de 1 μ l e 1 μ l de solução saturante e o volume da solução saturante, no poço, foi de 500 μ l.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse capítulo tem como objetivo apresentar os resultados dos experimentos realizados tanto da proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae* quanto da proteína NUDEL-HUM. Na primeira parte da apresentação dos resultados, destaca-se a expressão, purificação e solubilização da proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae* e os experimentos que foram realizados com a amostra protéica em alto grau de pureza e concentração. Para a complementação dos experimentos práticos, várias consultas bibliográficas foram feitas, paralelamente, com o firme propósito de se enriquecer a discussão dos resultados. Essa etapa, na execução do projeto, foi extremamente importante para o entendimento do processo e conclusão do experimento.

Na seção seguinte do capítulo, descrevemos de maneira mais direta e objetiva, os experimentos realizados para a obtenção da proteína NUDEL-HUM em altas quantidades e pureza para a realização dos estudos estruturais. As discussões desses resultados enriquecem os dados literários, uma vez que, muito dessa proteína ainda está sob intensa investigação.

4.1 Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

4.1.1 Expressão e Purificação da Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

A primeira etapa, na execução do projeto de pesquisa, foi a obtenção da proteína recombinante por expressão heteróloga. Para isso, linhagem competente de *Escherichia coli*, BL21 (DE3), foi usada como hospedeiro para a produção da proteína. Após a inserção do plasmídeo, que contém o gene codificante da Hsp65 de *Mycobacterium leprae*, por um processo chamado de transformação, foi possível o cultivo dessas células. Assim que uma população celular bacteriana apropriada foi alcançada, a indução da proteína foi feita com o uso de IPTG e a presença da proteína foi analisada em gel de poliacrilamida 10%.

A figura 3 mostra a fração celular não-induzida, usada como padrão de produção de proteínas bacteriana, e a fração induzida, que caracteriza as proteínas produzidas após a adição de IPTG no meio de cultivo. Foi possível observar, que após um período de 4 horas da adição do indutor, a maquinaria celular operou no sentido de produzir a proteína recombinante em alta escala. Com isso, obteve-se um sucesso na produção da proteína por expressão heteróloga.

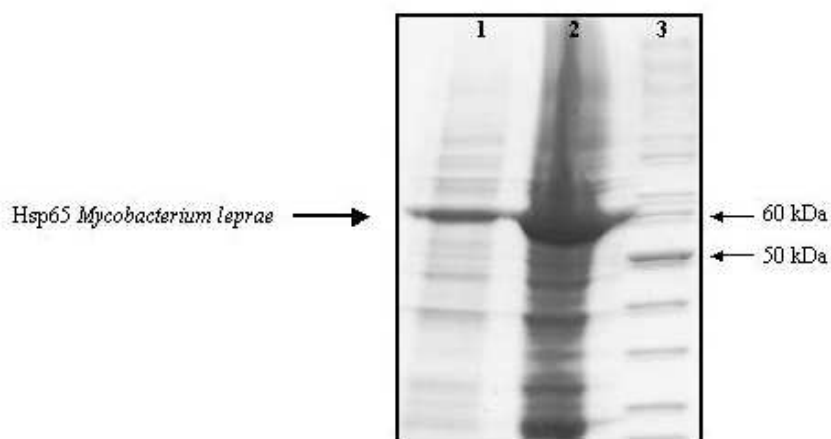


Figura 03: Gel SDS-PAGE 10% mostrando (1) fração não induzida, (2) fração induzida com 0,5 mM de IPTG após 4 horas e (3) o marcador de peso molecular usado como referência.

Com a presença da proteína, após a indução, fez-se necessário checagem da solubilidade da mesma. Para isso, foram analisadas a fração celular solúvel e a insolúvel. Esse teste consistiu em analisar os componentes protéicos que ficam em solução, após o processo de rompimento das

células bacterianas por sonicação, formando a fração solúvel e as que ficam precipitadas, na forma de corpúsculos de inclusão formando a fração insolúvel.

A figura 4 mostra que, em sua totalidade, a proteína se encontra na fração celular insolúvel, ou seja, na forma de corpúsculos de inclusão.

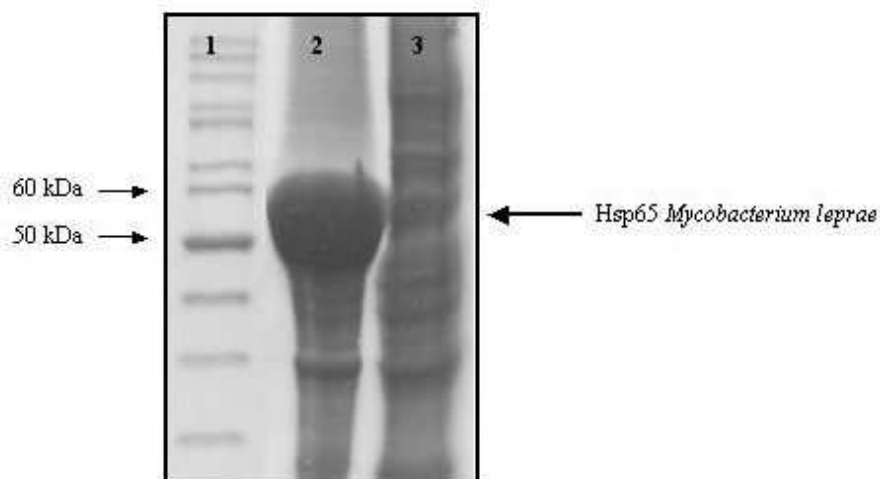


Figura 04: Gel SDS-PAGE 10% representando o marcador de peso molecular (1), a fração de proteínas insolúveis (2) e a fração solúvel (3) que corresponde às proteínas que remaneceram em solução após o processo de rompimento das células.

Com esses experimentos iniciais, observou-se que a proteína Hsp65 de *M. leprae* foi obtida por expressão heteróloga e que se encontra na forma de corpúsculos de inclusão. Sabe-se que, quando se trabalha com proteínas que são insolúveis, uma etapa importante no processo de extração da proteína alvo é a lavagem da fração celular insolúvel. Essa lavagem se torna extremamente importante, pois elimina as proteínas que não são de interesse e, quando bem sucedida, elimina a etapa de purificação por métodos tradicionais.

A maxi-expressão deu-se da mesma maneira como feito pelo teste-expressão, inclusive utilizando-se do mesmo pré-inóculo para garantir a reprodutibilidade do experimento. Como citado anteriormente, a lavagem da fração celular insolúvel se torna uma etapa imprescindível no processo de extração da proteína. Assim sendo, após o rompimento das células e descarte da fração solúvel, a fração insolúvel foi ressuspensa várias vezes em tampão de lavagem, descrito nos procedimentos experimentais, para a eliminação de grande parte de proteínas que não são de interesse. Ao final desse processo, ressuspendeu-se a fração celular insolúvel em tampão contendo agente desnaturante guanidina para a solubilização da proteína.

Como a guanidina é um composto desnaturante, ela age no sentido de desestabilizar a estrutura da proteína, provocando seu desenovelamento. Para dar continuidade aos estudos, foi necessário realizar a retirada desse composto, para posterior processo de enovelamento e reconstituição da sua estrutura protéica. O método de enovelamento testado foi o da diálise gradual. A solução protéica foi colocada em membrana de diálise, mantida sob baixa temperatura, em tampão contendo vários componentes, descritos nos procedimentos experimentais. Esse tampão foi trocado de 12 em 12 horas até a retirada gradual e completa da guanidina.

A diálise em tampão final, ou seja, sem agente desnaturante, foi mantida por 12 horas e nenhum padrão de precipitação protéica foi observado, o que pode nos indicar um sucesso na etapa de enovelamento protéico.

A figura 5 apresenta a análise da proteína após o processo de diálise e conseqüente enovelamento protéico. Pode-se assim, concluir que a proteína se encontra em alto grau de pureza e adequada para dar continuidade aos experimentos.

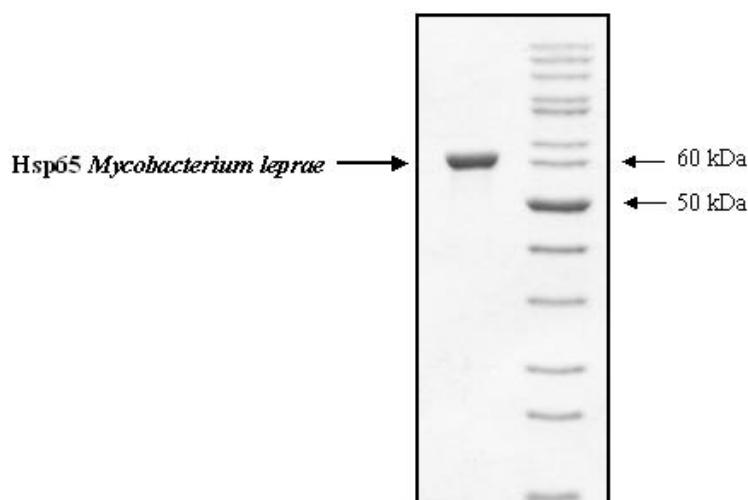


Figura 05: Gel SDS-PAGE 10% mostrando a Hsp65 *M. leprae*, após o processo de enovelamento protéico, indicada pela seta, e o marcador de peso molecular usado como referência.

4.1.2 Dicroísmo Circular

O experimento de dicroísmo circular (CD) no UV distante (190-260 nm) foi realizado com o objetivo de verificar se a proteína exibe algum padrão de estrutura secundária após expressão heteróloga e, principalmente, após o processo de renaturação. Essas medidas fornecem informações estruturais úteis, uma vez que, mostram se a proteína recombinante apresenta estrutura secundária, que seria um indício da presença de proteína enovelada em solução permitindo, assim, o prosseguimento dos experimentos.

O espectro de CD da proteína recombinante está apresentado na figura 6, esse experimento foi realizado com proteína à 0,1 mg/ml em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo 20 mM de NaCl. Uma análise qualitativa do espectro (figura 06) indica que a proteína exibe um enovelamento com estrutura secundária composta, tipicamente, por α -hélices e folhas β .

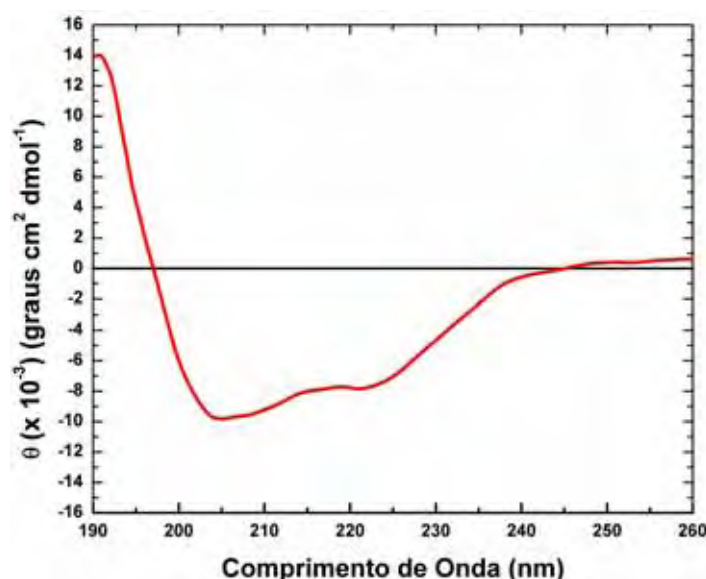


Figura 06: Espectros de CD no UV distante da proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae* à 0,1 mg/ml em tampão 15 mM Tris HCl em temperatura ambiente.

Para compreender melhor os espectros, uma análise quantitativa do conteúdo de estrutura secundária da proteína, apresentando a porcentagem de cada tipo de estrutura secundária predita, foi feita utilizando o programa *CDNN deconvolution* (<http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>) e é apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Composição de estrutura secundária da Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. Os valores são dados em porcentagem (%) e o erro é de 5,9% para as medidas adquiridas de 190 a 260 nm.

Proteínas Recombinantes	Alfa-Hélice	Folha Beta Antiparalela	Folha Beta Paralela	Beta-turn	Random Coil
Hsp65	15,0	27,2	5,1	20,4	32,3

Para enriquecer os dados que foram obtidos com a análise quantitativa dos constituintes secundários da Hsp65 de *Mycobacterium leprae* foi feita uma análise comparativa com uma outra proteína da mesma família e que apresenta alto grau de similaridade com a Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis* (QAMRA et al., 2004a). Os espectros de CD das proteínas são similares apesar de que, uma análise da estrutura terciária da Hsp65 de *M. tuberculosis* mostra que a proteína apresenta uma predominância de α -hélices (QAMRA et al., 2004b).

4.1.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Recentemente, esta técnica não-destrutiva tem obtido popularidade por explorar algumas propriedades, como tamanho e forma, de moléculas em solução (MURPHY 1997). O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica que mede o seu raio hidrodinâmico, o qual é geralmente calculado baseado em modelos esféricos. A maior vantagem do espalhamento de luz, além de fornecer informações estruturais, é o curto tempo necessário para a obtenção dos dados, a modesta quantidade de proteína utilizada (de 1 a 10 mg/ml), os pequenos volumes de amostra requeridos (30 µl), e a relativa simplicidade de manipulação.

Assim sendo, o DLS é uma técnica muito usada como diagnóstico para determinar se uma amostra de proteína é adequada para cristalização pelo fornecimento de informações sobre a distribuição de tamanhos e estado de agregação da proteína em solução. Essas informações são importantes, pois estão intimamente relacionadas ao processo de cristalização, já que quanto mais homogênea (monodispersa) for a amostra, maior é a probabilidade de nucleação e crescimento dos cristais.

O mesmo tampão do experimento de CD foi mantido para os experimentos de DLS. A proteína foi usada em uma concentração de 12 mg/ml que seria a condição inicial para realizar os experimentos de cristalização.

A figura 7 apresenta os resultados obtidos em termos do percentual de massa em função do raio hidrodinâmico médio das distribuições de tamanho. A distribuição de tamanho obtida indica que a proteína apresenta-se, majoritariamente, em estado oligomérico monodisperso. Observa-se que a proteína apresenta um raio hidrodinâmico em torno de 10 nm (agregados da ordem de 180 kDa) o que representaria uma forma trimérica da Hsp65 de *Mycobacterium leprae*.

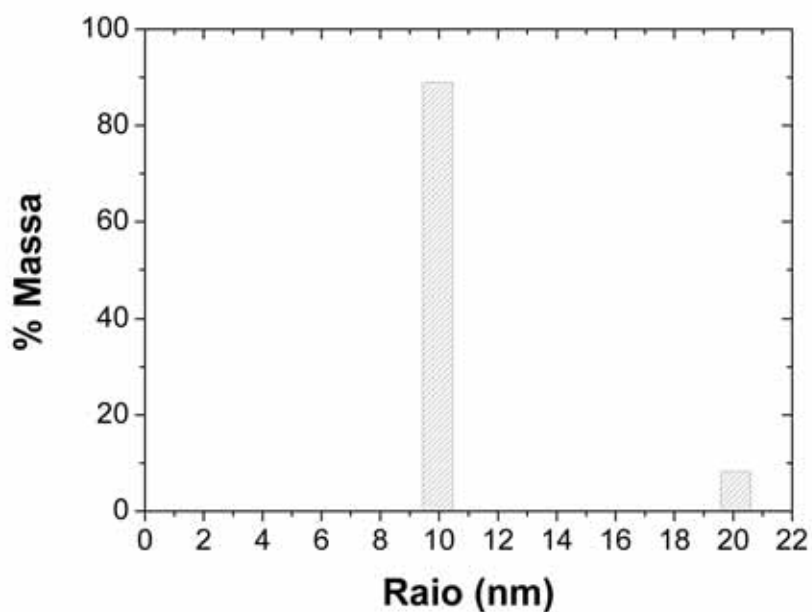


Figura 07: Medidas de DLS da Hsp65 de *Mycobacterium leprae* à 12 mg/ml em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 contendo 20 mM de NaCl. A figura apresenta os resultados obtidos em termos do percentual de massa (eixo Y) em função do raio hidrodinâmico médio (eixo X).

Este resultado sugere que a amostra Hsp65 de *Mycobacterium leprae* a uma concentração de 12 mg/ml é ideal para dar início aos ensaios de cristalização, apesar não se encontrar monomérica, apresenta-se em solução como única entidade estrutural trimérica (monodispersa) que é favorável à cristalização.

4.1.4 Cristalização

Como os dados obtidos a partir dos experimentos de dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz demonstraram que a proteína se encontra devidamente enovelada e em uma condição monodispersa, deu-se continuidade aos experimentos. Assim sendo, a primeira tentativa de cristalização foi feita com a proteína concentrada à 12 mg/ml em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 contendo 20 mM de NaCl e 3 % de glicerol usando-se dois diferentes screens comerciais. As placas foram incubadas em sala refrigerada a uma temperatura constante de 14 °C e, após uma semana, pôde-se perceber a presença de precipitados cristalinos e alguns precipitados escuros, além da presença de pequenos cristais em forma de agulha.

Essas placas estão sob intensa observação e algumas condições de refinamento estão em andamento com o objetivo de se conseguir cristais difratáveis para os futuros estudos estruturais.

4.1.5 Estudo comparativo da Hsp65 de *Mycobacterium leprae* com a Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis*

Paralelamente aos experimentos realizados para alcançar o objetivo final do projeto de mestrado, foi realizado um estudo comparativo entre a Hsp65 de *Mycobacterium leprae* e a Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis* com o objetivo de complementar e dar suporte aos resultados dos experimentos práticos.

A partir de um alinhamento das seqüências das proteínas Hsp65 de *Mycobacterium leprae* e *M. tuberculosis* realizado pelo ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), foi possível checar a similaridade apresentada por elas. Observou-se que a Hsp65 de *Mycobacterium leprae* apresenta 95 % de similaridade com a Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis* (figura 8).

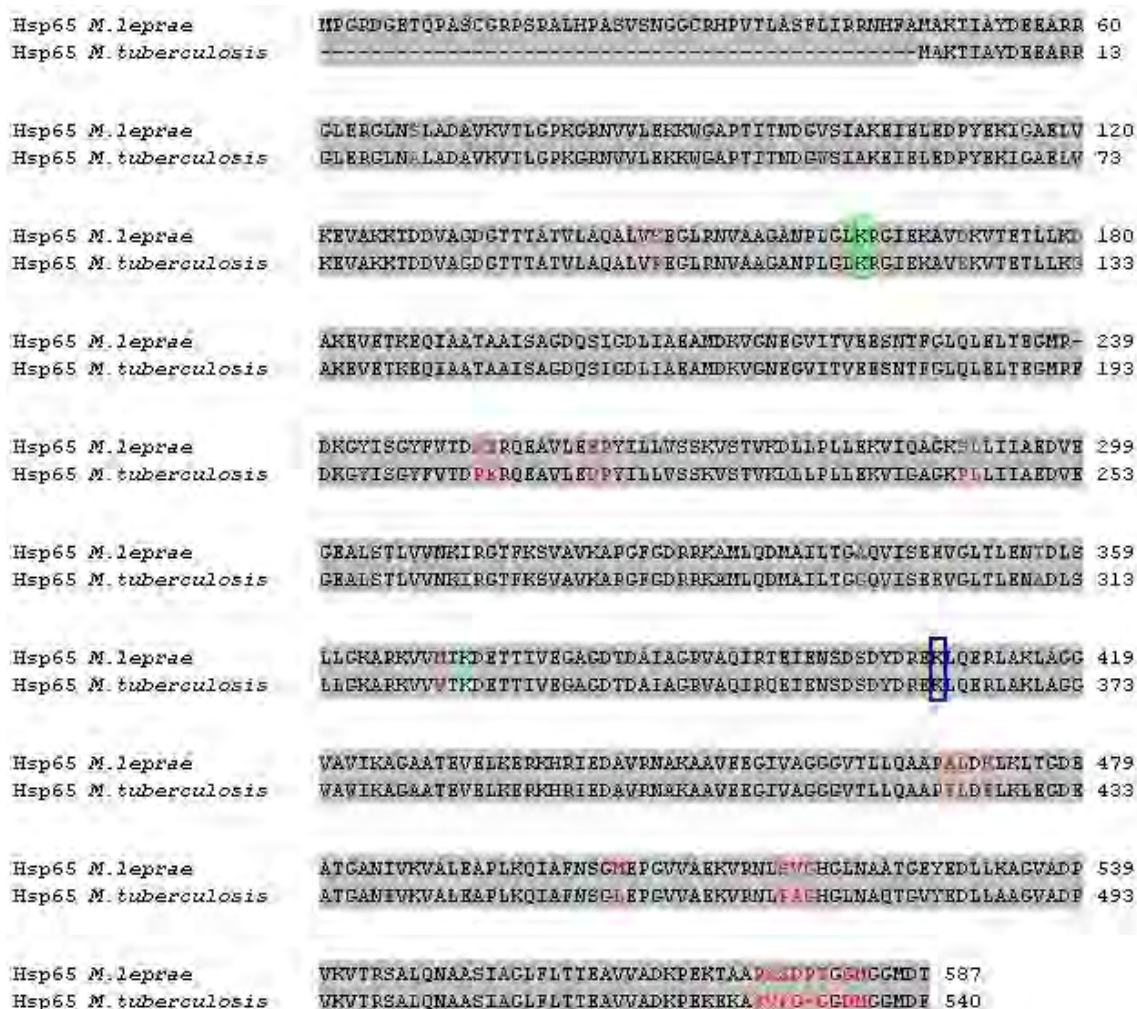


Figura 8: Alinhamento das seqüências das proteínas Hsp65 de *Mycobacterium leprae* e Hsp65 de *M. tuberculosis* mostrando alto grau de similaridade. Em destaque a caixa verde corresponde ao resíduo catalítico K¹⁶⁸ e a caixa azul ao resíduo K⁴⁰⁹.

Considerando essa alta similaridade pôde-se fazer uma análise da estrutura tridimensional da Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis*, já resolvida por Qamra *et al* 2004b e, com isso, inferir algumas informações relevantes no que diz respeito à provável atividade oligopeptidásica da Hsp65 de *Mycobacterium leprae*.

Como mencionado, Portaro *et al* 2002, com base em 20 % de similaridade com a protease Hs1VU, sugeririam duas tríades catalíticas, uma localizada no N-terminal que consiste em T¹³⁶, K¹⁶⁸ e Y²⁶⁴ e outra no C-terminal que corresponde à T³⁷⁵, K⁴⁰⁹ e S⁵⁰² como sendo as responsáveis pela possível atividade proteolítica da Hsp65 de *Mycobacterium leprae*. Segundo Qamra *et al* 2004b, as tríades correspondente em Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis* são respectivamente T⁸⁸, K¹²⁰ e Y²¹⁶ e T³²⁷, K³⁶¹ e S⁴⁵⁴.

Em relação suposta tríade, localizada no N-terminal, os resíduos sugeridos como sendo os responsáveis pela atividade proteolítica estão muito distantes espacialmente. Os resíduos T⁸⁸ e K¹²⁰ estão localizados no domínio equatorial a 23 Å de distância, enquanto que o resíduo Y²¹⁶ está localizado no domínio apical a 44 Å e 54 Å de distância dos resíduos T⁸⁸ e K¹²⁰ respectivamente. Analisando-se a tríade do C-terminal, Qamra *et al* 2004b discute, com base na estrutura cristalográfica, que os resíduos T³²⁷ e K³⁶¹ estão localizados no domínio apical a uma distância de 18 Å e que o resíduo S⁴⁵⁴ está localizado no domínio equatorial e está distante 42 Å e 50 Å dos resíduos T³²⁷ e K³⁶¹ respectivamente.

Em ambas supostas tríades, os resíduos estão espacialmente muito distantes, localizados em domínios diferentes (Figura 09) e a estrutura não parece sugerir nenhuma movimentação conformacional que possa promover uma proximidade entre esses resíduos. Isso indica que esses resíduos sugeridos não formam uma tríade catalítica em Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis*, mas que, podem ter outros resíduos que contribuem para essa possível função.

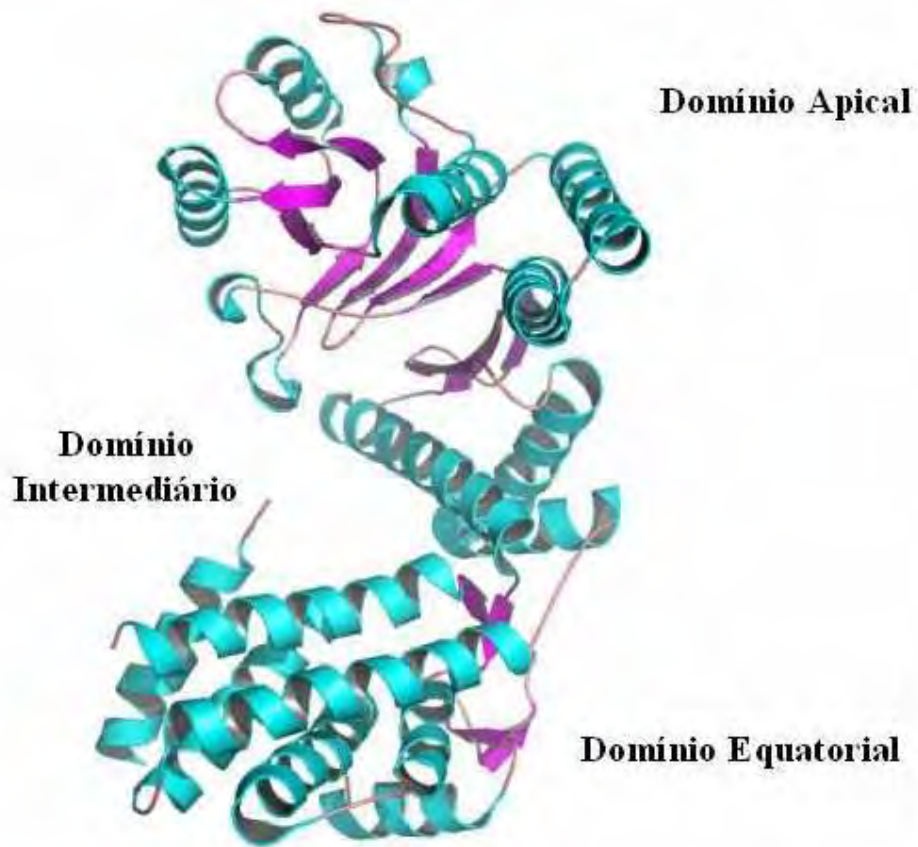


Figura 9: Figura gerada, pelo programa PyMol, utilizando o modelo do pdb da Hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis* (1sjp). O modelo mostra o monômero com destaque para os domínios apical, intermediário e equatorial.

4.2 NUDEL (*nuclear distribution element-like*)

4.2.1 Expressão e Purificação da proteína NUDEL-HUM

As mesmas condições de expressão e indução realizadas para a obtenção da proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae* foram mantidas para a produção da proteína NUDEL-HUM. Apenas pequenas modificações na temperatura de indução e na quantidade de IPTG foram testadas. Assim sendo, para a produção da proteína NUDEL-HUM em altas quantidades, realizou-se a expressão em BL21 (DE3) em densidades óticas de 0,8 a 37 °C por 4 horas. A indução foi otimizada e, deu-se com 1 mM de IPTG a 30 °C. Pela análise do SDS-PAGE (figura 10), fica evidente a produção da proteína por expressão heteróloga após a indução.

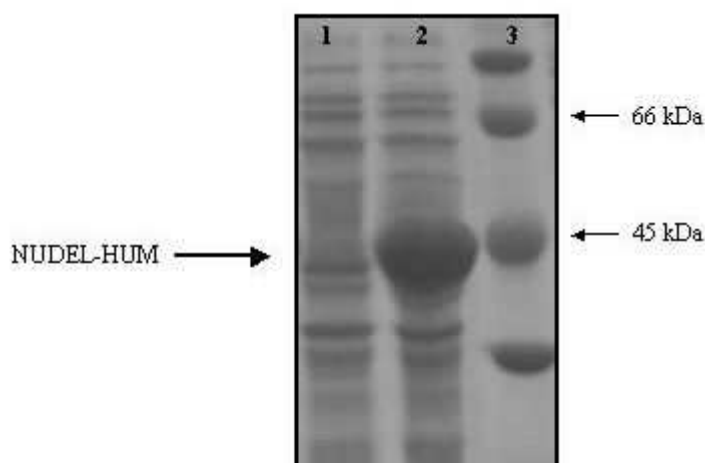


Figura 10: Gel SDS-PAGE 12,5 % . (1) fração não induzida (0 horas – sem IPTG), (2) a fração induzida após 4 horas da adição de 1 mM de IPTG e o (3) representa o marcador de peso molecular usado como referência para checar o peso da proteína.

Os experimentos prosseguiram no sentido de checar a solubilidade da proteína e iniciar os testes de purificação. Assim sendo, após lise celular por sonicação para determinação da solubilidade da proteína, observou-se que a NUDEL-HUM está presente tanto na fração solúvel quanto na fração insolúvel. Nesse sentido, vários testes de purificação, por cromatografia de

afinidade de Ni-NTA, foram executados com o objetivo de se conseguir maior rendimento em relação à pureza e quantidade de proteína.

Ao final de todos os testes realizados a melhor condição de purificação foi obtida com a proteína proveniente da fração celular insolúvel. A figura 11 representa as eluições feitas com 500 mM de imidazol. As eluições foram coletadas de 1 em 1 ml e analisadas em gel de poliacrilamida, separadamente. Após a análise, as proteínas foram reunidas e concentrada para dar continuidade aos experimentos.

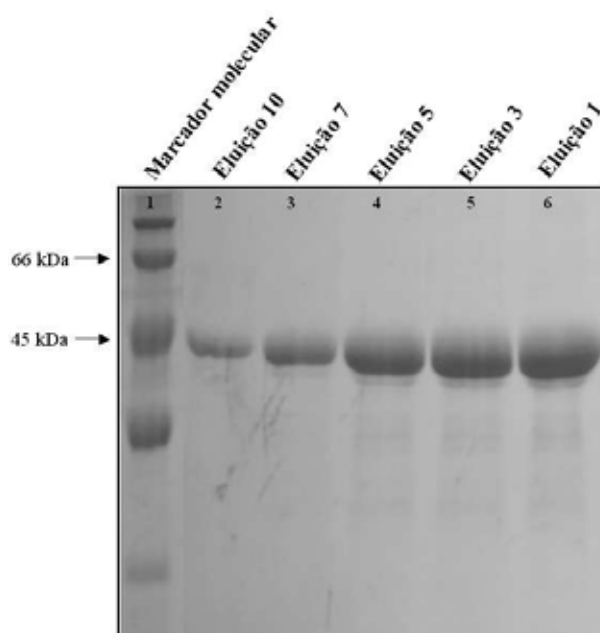


Figura 11: Gel SDS-PAGE 12,5% que representa a purificação da NUDEL-HUM feita da fração protéica insolúvel. No gel estão representadas as eluições de 1, 3, 5, 7 e 10 além do marcador de peso molecular usado como referência para analisar o peso molecular da proteína.

Com a obtenção da proteína pura e em quantidade suficiente, a próxima etapa na execução do projeto foi conseguir a proteína no seu estado enovelado, uma vez que foi necessário o uso de agente desnaturante para a solubilização da proteína. O método para a renaturação protéica usado foi o da diluição, em tampão descrito nos procedimentos experimentais, seguido de diálise para a retirada dos aditivos usados nesse tampão. Não se observou qualquer indicativo de precipitação protéica durante a diluição da amostra, no tampão de renaturação, nem na posterior diálise, para a retirada dos aditivos.

O sucesso da etapa de renaturação da proteína deve-se, particularmente, à presença de um aditivo chamado de l-arginina. Esse aditivo é considerado um estabilizador dos estágios

intermediários do processo de renovelamento e está sendo amplamente utilizado em experimentos de renaturação (LIU et al., 2007, ARAKAWA et al., 2007).

A proteína proveniente da diálise foi concentrada a 10 mg/ml (Figura 12) e essas amostras submetidas a ensaios espalhamento dinâmico de luz (DLS), dicroísmo circular (CD) e fluorescência.

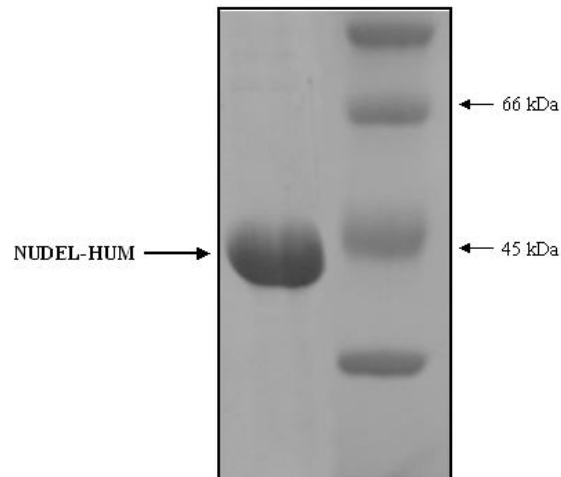


Figura 12: Gel SDS-PAGE 12,5 % apresentado a proteína NUDEL-HUM em alto grau de pureza e concentrada à 10 mg/ml e adequada para dar início aos estudos estruturais.

4.2.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Primeiramente, medidas com a proteína em baixa concentração foram realizadas para determinar os efeitos do pH na distribuição de tamanhos da proteína (presença de monômeros e/ou oligômeros). A proteína foi diluída para 1 mg/ml, a partir da solução da proteína concentrada a 10 mg/ml, em tampões com 100 mM de NaCl e diferentes pHs (pH 4,5, 6,0, 7,5, 8,5 e 9,5). Observou-se que no pH 4,5, a proteína precipita da solução, indicando a proximidade desse pH ao pI da proteína (pI teórico de 5,3).

A figura 13 apresenta os resultados obtidos em termos do percentual de massa em função do raio hidrodinâmico médio das distribuições de tamanho. As distribuições de tamanho obtidas para os diferentes pHs testados indicam que a proteína apresenta-se, majoritariamente, em estado polidisperso, na forma de grandes oligômeros e em tamanhos de agregação diferente, nos pHs 9,5, 8,5 e 6,0 (Figura 13a, b e d respectivamente). Em pH 7,5 apresenta-se em condição monodispersa, formada por oligômeros de mesmo peso molecular (Figura 13c).

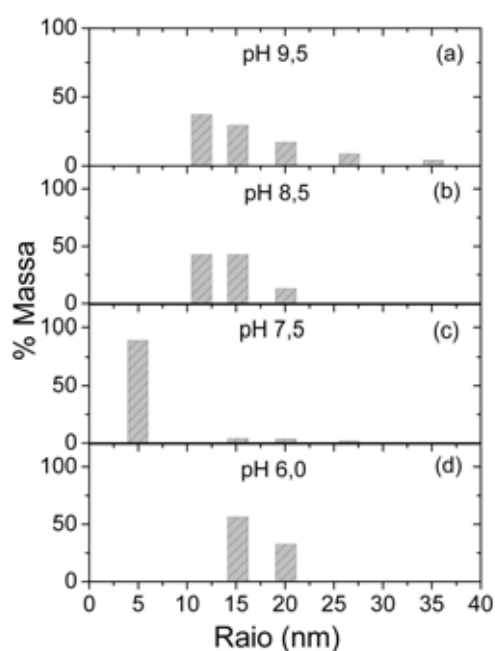


Figura 13: Medidas de DLS da proteína NUDEL a 1 mg/ml em diferentes pHs, pH 9,5 (a); pH 8,5 (b); pH 7,5 (c) e pH 6,0 (d). O gráfico exemplifica a porcentagem (eixo Y) da proteína que apresenta determinado raio hidrodinâmico (eixo X).

Para os ensaios de cristalização são, geralmente, utilizadas concentrações de proteínas acima de 1 mg/ml. Condições de alta concentração protéica favorecem a interação entre as proteínas o que pode levar a uma diferente distribuição de tamanho da amostra em solução. Assim, a caracterização da proteína em alta concentração se fez necessária. Para esses estudos, a condição de pH 7,5 foi escolhida, pois apresentou agregados menores (em torno de 5 nm) e monodispersos. Além disso, estudos de atividade da NUDEL indicam que a proteína encontra-se em sua forma ativa em pH 7,4 (HAYASHI et al., 2005) e 7,5 (HAYASHI et al., 2000).

Assim sendo, a curva de distribuição de tamanhos, para proteína em alta concentração (10,0 mg/ml) é mostrada na figura 14a. Como pode ser visto, aproximadamente 92,5 % da proteína em solução, em tampão pH 7,5 com 100 mM de NaCl, apresentou-se na forma de agregados com raio hidrodinâmico de 15,7 nm mostrando que ocorre agregação perante aumento da concentração da NUDEL.

Uma alternativa para reduzir a formação de múltiplos oligômeros em solução foi a aplicação de aditivos que interagem com a proteína. Sabendo-se que a NUDEL possui um sítio predito de ligação a zinco em sua seqüência e que essa proteína é ativada na presença de DTT, ambos aditivos foram testados. Dessa forma, experimentos em alta concentração (10 mg/ml) foram realizados nas mesmas condições (pH 7,5 e 100mM NaCl) na presença de cloreto de zinco (0,1 mM) e DTT (1 mM). Os resultados estão apresentados na figuras 14b e 14c.

Observou-se que a presença de cloreto de zinco no tampão de diálise, após renaturação da proteína, reduziu o raio hidrodinâmico para 3,7 nm (peso molecular calculado 74 kDa) (Figura 14b). A proteína na presença de zinco mostrou-se relativamente homogênea de forma que 90,0% apresentou-se com raio hidrodinâmico de 3,7 nm. Os outros 10 % consistem de 7% do total de proteínas portando um raio de 15 nm e 3 % com raio de 20 nm.

A adição de 1 mM de DTT na amostra concentrada a 10 mg/ml proveniente da diálise com tampão contendo zinco (incubada por 24 horas a 4 °C após adição de DTT) forneceu a medida de 2,8 nm do raio hidrodinâmico, correspondente ao peso molecular calculado de 39 kDa, aproximadamente o peso molecular predito para o monômero da NUDEL com cauda de 6 histinas (39,187 kDa). A proteína nessa condição demonstrou-se monodispersa, pois 89,9 % da amostra apresentou um raio hidrodinâmico de 2,8 nm, 6,8 % com raio de 11,5 nm e 4,3 % com raio de 15 nm (Figura 14c). Acredita-se que essa seja a melhor condição para os ensaios de cristalização, uma vez que é a proteína monomérica que apresenta atividade em pH 7,5 na presença de 0,5 ou 1 mM de DTT (HAYASHI et al., 2000, HAYASHI et al., 2005).

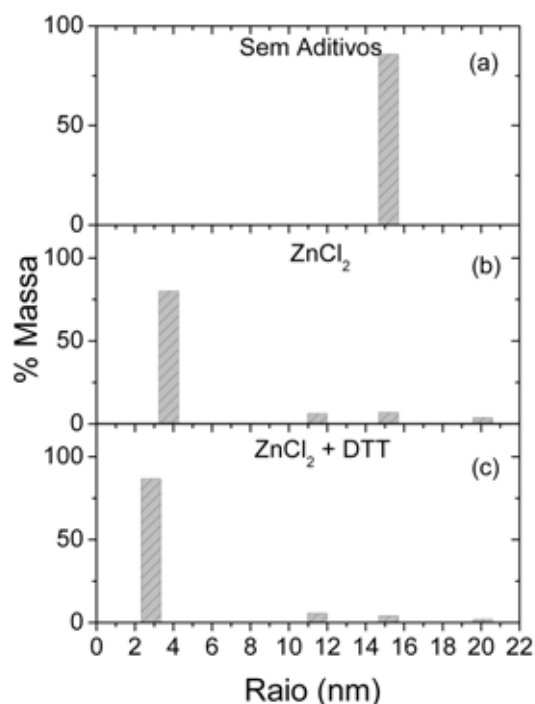


Figura 14: Medidas de DLS da proteína NUDEL a 10 mg/ml em pH 7,5 contendo 100 mM de NaCl na ausência de aditivos (a); presença de zinco a 0,1 mM (b) e presença de zinco e DTT (c). O gráfico exemplifica a porcentagem (eixo Y) da proteína que apresenta determinado raio hidrodinâmico (eixo X).

É importante ressaltar que a NUDEL possui outras funções, além da atividade oligopeptidásica, que se relacionam à formação de complexos macromoleculares, tais como os formados com LIS1 e DISC1. Assim, na condição em que a NUDEL apresenta-se em estado oligomérico monodisperso, as interações entre os monômeros podem favorecer a estabilização de possíveis regiões mais flexíveis de associação com outras proteínas citoplasmáticas. Isto faz com que a NUDEL em estados oligoméricos monodispersos seja, também, um bom candidato para ensaios de cristalização.

4.2.3 Dicroísmo Circular

Os espectros de CD no UV distante (195 a 260 nm) foram realizados para analisar a condição estrutural apresentada pela proteína após o processo de enovelamento, visto que foi necessário o uso de condição desnaturante para o processo de solubilização protéico. Para a análise da presença de estrutura secundária após renaturação, foi feito o uso do espectro protéico por dicroísmo circular (Figura 15 – curva preta). Pode-se observar que a proteína apresenta estruturas secundárias típicas como α -hélices e folhas β o que é um indício da estruturação protéica e renovelamento. Esses resultados foram usados em programas de deconvolução de dados para analisar quantitativamente as porcentagens das estruturas secundárias (tabela 2).

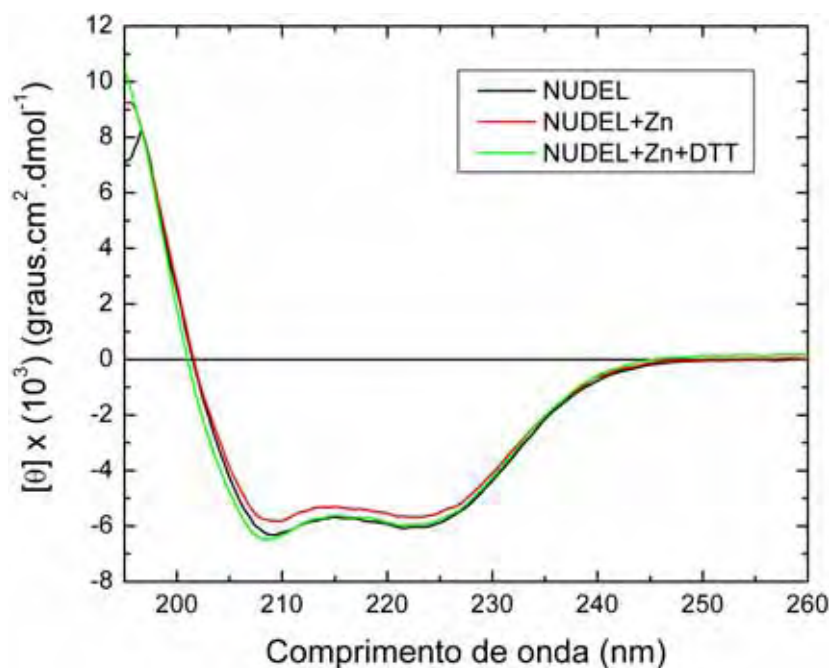


Figura 15: Espectros de CD no UV distante da proteína NUDEL na ausência de aditivos (preto), presença de Zinco (vermelho) e DTT+Zinco (verde) em 15 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 30 mM de NaCl em temperatura ambiente.

Tabela 2: Composição de estrutura secundária da proteína nudel na ausência e presença de aditivos. Os valores são dados em porcentagem (%) e o erro é de 6,20 % para as medidas adquiridas de 195 a 260 nm.

Proteínas Recombinantes	Alfa-Hélice	Folha Beta Antiparalela	Folha Beta Paralela	Beta-turn	Random Coil
Nudel	17,7	23,2	6,1	18,4	33,8
Nudel+Zn	17,5	24,6	6,2	18,7	32,6
Nudel+Zn+DTT	19,3	23,8	6,7	16,4	33,1

A figura 15 apresenta duas outras condições que foram testadas (curvas em vermelho e verde). A intenção de se analisar os espectros com o uso de dois aditivos diferentes foi analisar se eles interferem na estruturação da proteína. Foi importante observar esses dados, pois mesmo com o uso de um agente precipitante (zinco) a proteína apresentou o mesmo padrão de estruturas secundárias. Os espectros apresentam picos negativos bem definidos próximos a 206 e 224 nm e o pico máximo em 195 nm indicando que a proteína é composta tipicamente de α -hélices e folhas- β .

Para compreender melhor a influência do DTT e do zinco, análises quantitativas do conteúdo de estrutura secundária das proteínas foram realizadas. Os resultados da quantificação, apresentados na Tabela 2, mostram que o conteúdo de estrutura secundária da proteína NUDEL na ausência e presença dos aditivos zinco e DTT é bem similar. Assim, infere-se que os aditivos não estão envolvidos na estruturação, mas sim na estabilidade na proteína.

4.2.4 Fluorescência

Experimentos de emissão intrínseca de fluorescência também foram realizados nas mesmas condições do CD, ou seja, na ausência/presença de aditivos, com o objetivo de obter informações sobre a localização do resíduo de triptofano na estrutura terciária. Os espectros apresentados na figura 16 ilustram que a adição de aditivos causa um pequeno deslocamento do máximo de emissão, o que pode estar relacionado à mudança do estado oligomérico da amostra. Um pico em 333 nm é observado na ausência de aditivos, enquanto picos em 335 e 337 nm, são observados na presença de zinco e zinco e DTT, respectivamente.

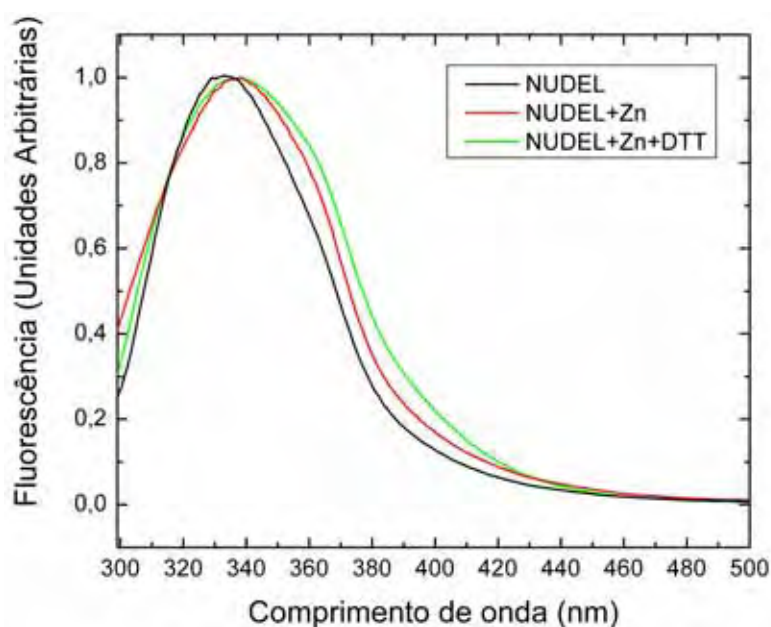


Figura 16: Espectro de emissão de fluorescência da proteína NUDEL na ausência de aditivos (preto), presença de Zinco (vermelho) e presença de Zinco e DTT (verde) em 15 mM de Tris-HCl pH 7,3 e 30 mM de NaCl em temperatura ambiente. Os máximos de emissão observados para a proteína na ausência de aditivos é 333 nm, na presença de Zinco e Zinco/DTT é 335 e 337 nm, respectivamente.

Esses dados indicam que a proteína encontra-se enovelada e que o resíduo de triptofano apresentam-se pouco acessível ao solvente, já que seus espectros não mostram um pico a 350 nm, típico de proteína desnaturada ou da presença de aromáticos na superfície da proteína. Dessa forma, a presença do pico de máximo de emissão na faixa de 330 a 340 nm, constitui uma evidência de que o resíduo de triptofano apresenta pouca acessibilidade ao solvente, ou seja, apresenta-se enterrado no núcleo hidrofóbico da proteína (Figura 16).

De maneira geral, os experimentos de CD e emissão intrínseca de fluorescência mostram que a proteína apresenta uma estrutura secundária definida composta, majoritariamente, de folhas- β , e o resíduo de triptofano pouco acessível ao solvente, sendo que o conteúdo de estrutura secundária e a localização do resíduo de triptofano permanecem pouco alterados na presença de aditivos. Isto indica que as mudanças na distribuição de tamanhos da proteína em solução induzidas pelos aditivos, como observado pelos experimentos de DLS (Figura 14), não são acompanhadas por mudanças expressivas na composição de estrutura secundária da proteína.

Dessa forma, as medidas de CD e fluorescência forneceram informações estruturais úteis da proteína nas condições testadas que favorecem o prosseguimento dos experimentos de cristalização.

4.2.5 Ensaios de Cristalização

Após a análise conjunta dos experimentos de DLS, CD e fluorescência, concluiu-se que a proteína NUDEL na ausência de aditivos, presença de zinco e zinco + DTT em pH 7,5 apresenta-se estruturada e monodispersa. Assim, as três amostras constituem soluções protéicas com potencial de cristalização. Os testes iniciais de cristalização foram feitos com a proteína nas seguintes condições:

- 8,5 mg/ml em 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 100 mM de NaCl.
- 10,0 mg/ml em 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 100 mM de NaCl e 0,1 mM de cloreto de zinco.
- 10,0 mg/ml em 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 100 mM de NaCl, 0,1 mM de cloreto de zinco e 1 mM de DTT.

Os ensaios de cristalização foram feitos em placas de 24 poços utilizando-se os kits comerciais da Hampton Research Crystal Screen e Crystal Screen 2.

Os experimentos de cristalização estão em andamento com o objetivo de conseguir cristais difratáveis para os futuros estudo estruturais.

4.2.6 Alinhamento múltiplo de seqüências da NUDEL

Com o intuito de enriquecer as informações coletadas com os experimentos práticos foi feita uma análise da seqüência da proteína NUDEL de outros organismos. Esse alinhamento foi feito com base nas seqüências encontradas pelo PSI-Blast (ALTSCHUL et al., 1990) que demonstrou uma alta homologia da proteína em estudo. As espécies, em análise na figura 17, foram escolhidas devido a alta similaridade de seqüências. Em particular, NUDEL-RAT e HUM compartilham 95% de aminoácidos que são idênticos.

A figura 17 ilustra uma região do N-terminal altamente conservada da NUDEL em *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Pan troglodytes* e *Canis familiaris*. De acordo com estudos de duplo híbrido realizados (NIETHAMMER et al., 2000; SASAKI et al., 2000) a região N-terminal da NUDEL inclui o sítio de ligação da LIS1 (Figura 17 – região grifada), assim sendo, considera-se que a função do complexo LIS1-NUDEL é altamente conservada durante a evolução.

Uma outra análise, usando o Programa *Coils* (Lupas et al., 1991), demonstrou que o N-terminal conservado contém uma região *coiled-coil* entre os resíduos 20 e 180. Essa região é também chamada de super estrutura secundária sendo formada por duas fitas α -hélices que estão altamente interligadas resultando em uma estrutura altamente reforçada.

O C-terminal da NUDEL mostra algumas substituições de aminoácido e contém o sítio de ligação da DISC1. Nessa região, todos os aminoácidos são conservados, em especial, os principais resíduos envolvidos na ligação da DISC1, que são L266 e E267 (Figura 17 – caixa preta). Outro resíduo conservado é a cisteína catalítica C273 o que também é um indício da sua importância evolutiva (Figura 17 – caixa amarela).

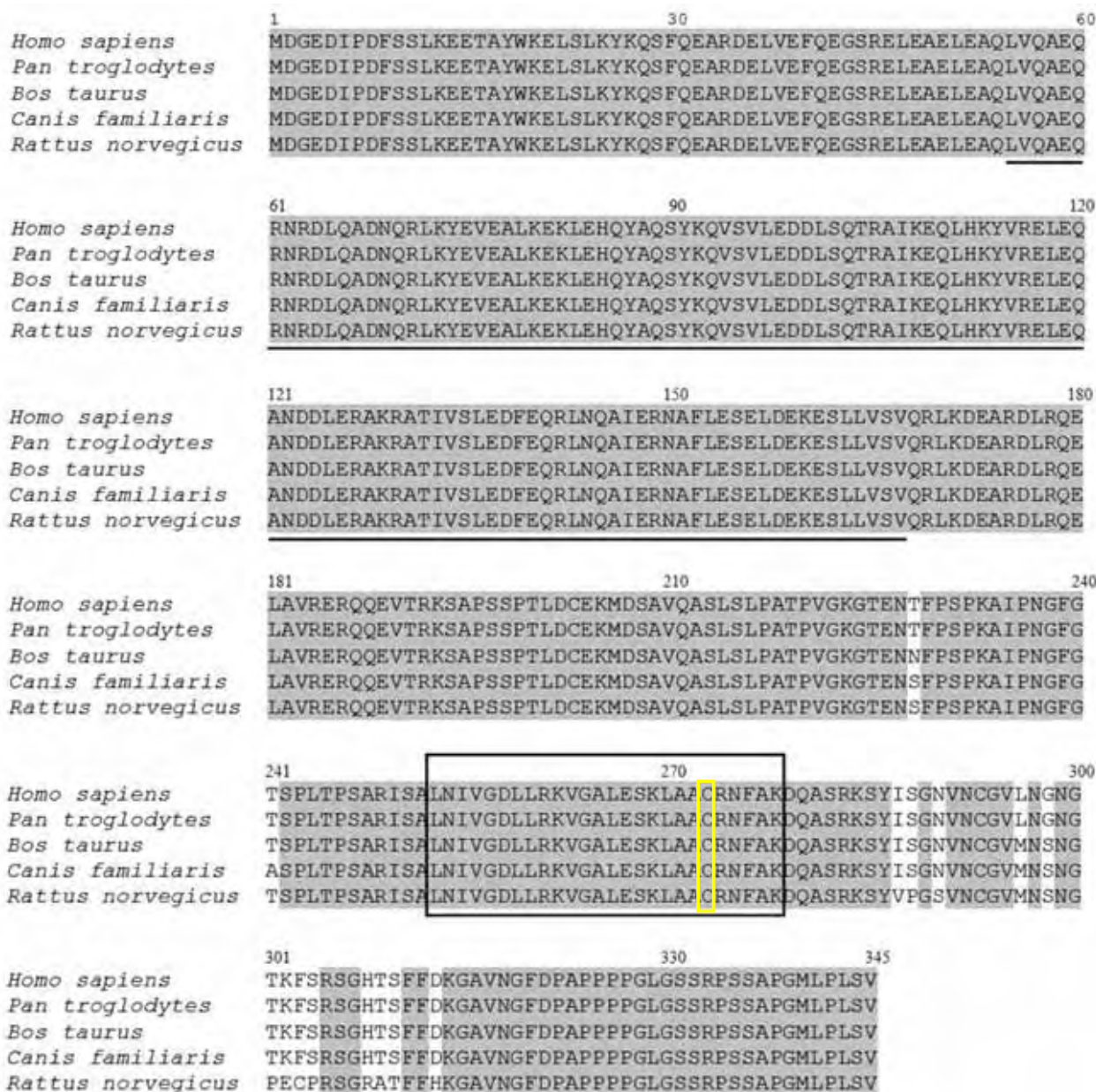


Figura 17: Comparação da seqüência de aminoácidos da proteína NUDEL de *Homo sapiens* (código de acesso no GenBankTM NP110435), *Pan troglodytes* (código de acesso no GenBankTM XP001166739), *Canis familiaris* (código de acesso no GenBankTM XP850046) e *Bos taurus* (código de acesso no GenBankTM XP587963). Os resíduos idênticos estão em cinza claro. O sítio de ligação da DISC1 está representado pela caixa em preto e o domínio de interação com a LIS1 está grifado. Em amarelo destaca-se a cisteína catalítica. O alinhamento foi gerado o ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO

Esse capítulo apresenta um resumo de todas as atividades executadas no decorrer desse trabalho com destaque para os resultados mais relevantes. Como demonstrado em todo o trabalho, a conclusão também se divide em duas, a primeira parte refere-se à proteína Hsp65 de *Mycobacterium leprae* e a segunda conclui os resultados da caracterização da proteína NUDEL-HUM. Além disso, ao final de cada conclusão são sugeridos o andamento e a perspectiva futura dos trabalhos.

5.1 Hsp65 de *Mycobacterium leprae*

Os protocolos de expressão e purificação foram estabelecidos e acertados durante a execução do projeto. A Hsp65 de *Mycobacterium leprae* é passível de obtenção por expressão heteróloga em *E.coli* em corpúsculos de inclusão.

A etapa de lavagem dos corpúsculos de inclusão antes da solubilização proteica garantiu a eliminação da purificação por métodos tradicionais. A figura 05 ilustra a proteína, alvo do estudo, com alto grau de pureza.

Devido ao uso de agente desnaturante para a solubilização proteica, foi necessário experimento de renovelamento. A forma enovelada da proteína, foi assegurada pelos experimentos de CD que confirmaram uma estruturação secundária tipicamente formada por α -hélices e folhas β (Figura 06). Estudos de espalhamento dinâmico de luz contribuíram para observar a presença de uma solução monodispersa formada de trímeros (Figura 07). Essa amostra foi concentrada até o ponto máximo de saturação para dar início aos testes de cristalização.

Os experimentos de cristalização, até o momento, não resultaram em cristais difratáveis, sendo apenas possível observar a presença de precipitados cristalinos e a formação de pequenos cristais em forma de agulha. As placas estão sob intensa observação e algumas condições de refinamento estão em andamento com o objetivo de obter cristais difratáveis para os estudos estruturais.

5.2 NUDEL (*nuclear distribution element-like*)

A metodologia aplicada para a expressão da proteína NUDEL em sistema heterólogo foi bem sucedida na obtenção de altas quantidades da proteína na fração insolúvel.

A purificação da NUDEL foi realizada sob condições desnaturantes a partir da proteína presente no corpo de inclusão e foi possível a obtenção de grande quantidade de proteína purificada e um alto grau de pureza.

Não houve precipitação da proteína durante a renaturação pelo método da diluição usando-se L-arginina ou diálise na presença e ausência de cloreto de níquel. A proteína foi concentrada a 10 mg/ml para os experimentos de DLS que mostraram que a proteína apresenta-se monomérica e monodispersa (89,9%) na presença de zinco e DTT. Os espectros de CD e fluorescência indicaram que a proteína apresenta-se estruturada após a renaturação nas condições testadas e que os aditivos usados não influenciam nas porcentagens dos constituintes secundários da proteína e nem no enovelamento da mesma, respectivamente.

Tentativas de cristalização na ausência de aditivos, na presença de 0,1 mM de cloreto de zinco ou cloreto de zinco e 1 mM de DTT estão em andamento, a condição mais promissora para formação dos cristais, é a placa que contém solução protéica com cloreto de zinco e 1 mM de DTT. Uma possibilidade para futuros experimentos seria a prévia caracterização espectroscópica da solução protéica na presença de inibidores e posteriores ensaios de cristalização com a adição dos mesmos.

CAPÍTULO 6 - RECONHECIMENTO

Para a realização desse trabalho, o apoio e a orientação do Prof. Dr. Camargo do CAT/CEPID – Instituto Butantan e da Prof^a. Dr^a. Mirian Hayashi UNIFESP-CAT/CEPID foram de fundamental importância, além da contribuição de vários pesquisadores que enriqueceram a discussão científica e deram uma base sólida para o entendimento e conclusão dos experimentos. Finalmente, agradecemos à FAPESP pelo apoio financeiro (Processo: 2006/01839-0).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, A. J., Greenfield, N. J., Fasman, G. D. 1973. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol.*, **27**, 675-735.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.

Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., Timasheff, N. 2007. Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects. *Protein Expr. Purif.*, **127**, 1-8.

Asea, A., Kraeft, S., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C., Calderwood, K.S. 2000. HSP 70 stimulates cytokine production through a CD 14-dependent pathway, demonstrating its dual role as chaperone and cytokine. *Natural Medicine*, **6**, 435-442.

Bannon, M.J. 1999. BCG and tuberculosis. *Arch. Dis. Child.*, **80**, 80-83.

Bilder, R. M., Volavka, J., Czobor, P., Malhotra, A.K., Kennedy, J.L., Ni, X., Goldman, R.S., Hoptman, M.J., Sheitman, B., Lindenmayer, J.P., Citrome, L., McEvoy, J.P., Kunz, M., Chakos, M., Cooper, T.B., Lieberman, J.A. 2002. Neurocognitive correlates of the COMT Val(158)Met polymorphism in chronic schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, **52**, 701-707.

Blackwood, D. H., Muir, W. J., Porteous, D. J. 2005. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science*, **310**, 1187-1191.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Huber, R. 1997. Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6070-6074.

Brandon, N.J., Hanford, E.J., Schurov, I., Rain, J.-C., Pelling, M., Duran- Jimenez, B., Camargo, M., Oliver, K.R., Beher, D., Shearman, M.S., Whiting, P.J., 2004. Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders. *Mol. Cell. Neurosci.*, **25**, 42-55.

Callicott, J. H., Straub, R. E., Pezawas, L., Egan, M. F., Mattay, V. S., Hariri, A. R., Verchinski, B. A., Meyer-Lindenberg, A., Balkissoon, R., Kolachana, B., Goldberg, T. E., Weinberger, D. R. 2005. Variation in DISC1 affects hippocampal structure function and increases risk for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8627-8632.

Camargo, A. C., Reis, M. L., Caldo, H. 1979. Susceptibility of a peptide derived from bradykinin to hydrolysis by brain endo-oligopeptidases and pancreatic proteinases. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5304-5307.

CDNN deconvolution – Program for Circular Dichroism data deconvolution. Disponível em: <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdmn/> Acesso em 20 Jul. 2007.

Chow, M.K.M., Amin, A.A., Fulton, K.F., Whisstock, J.C. 2006. Refold: An analytical database of protein refolding methods. *Protein Expr. Purif.*, **46**, 166-171.

Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guerassimenko, O., Cavarec, L., Palicio, M., Abderrahim, H., Bougueleret, L., Barry, C., Tanaka, H., La Rosa, P., Puech, A., Tahri, N., Cohen-Akenine, A., Delabrosse, S., Lissarrague, S., Picard, F.P., Maurice, K., Essioux, L., Millasseau, P., Grel, P. 2002. Genetic and physiological data implicating the new human gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13675-13680.

Chung, K.T., Biggers, C.J. 2001. Albert Léon Charles Calmette (1893-1933) and the antituberculous BCG vaccination. *Perspect. Biol. Med.*, **44**, 379-389.

ClustalW - EBI server for multiple sequence alignment on the web. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> Acesso em 12 jan 2008.

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eigimeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., Mclaen, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrel, B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**, 537-544.

Craddock, N., O'Donovan, M. C., Owen, M J. 2005. The genetics of schizophreni bipolar disorder: dissecting psychosis. *J. Med. Genet.*, **42**, 193-204.

Egan, M. F., Goldberg, T. E., Kolachana, B. S., Callicott, J. H., Mazzanti, C. M., Straub, R .E., Goldman, D., Weinberger, D.R. 2001. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6917-6922.

Efimov, V. P., Morris, N. R., 2000. The LIS1-related NUDF protein of *Aspergillus nidulans* interacts with the coiled-coil domain of the NUDE/RO11 protein. *J. Cell Biol.*, **150**,681–688.

Feng, Y., Olson, E.C., Stukenberg, P.T., Flanagan, L.A., Kirschner, M.W., Walsh, C.A. 2000. LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron*, **28**, 665-679.

Fine, P.E.M. 1989. *Rev. Infect. Dis.*, **11**, 353-359.

Fleischmann, R.D., Alland, D., Eisen, J.A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., Deboy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Umayam, L.A., Ermolaeva, M., Salzberg, S.L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs, Jr, W.R., Jr., Venter, J.C., Fraser, C.M. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strain. *J. Bacteriol.*, **184**, 5470-5490.

Guerreiro, J. R., Winnischofer, S. M. B., Bastos, M. F., Portaro, F. C. V., Sogayar, M. C., Camargo, A. C. M., Hayashi, M. A. F. 2005. Cloning and characterization of the human and rabbit NUDEL-oligopeptidase promoters and their negative regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1730**, 77-84.

Hayashi, M. A. F., Portaro, F. C. V., Tambourgi, D. V., Sucupira, M., Yamane, T., Fernandes, B. L., Ferro, E. S., Reboucas, N. A., Camargo, A. C. M. 2000. Molecular and immunochemical evidences demonstrate that endooligopeptidase A is the predominant cytosolic oligopeptidase of rabbit brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 7-13.

Hayashi, M. A. F., Portaro, F. C. V., Bastos, M. F., Guerreiro, J. R., Oliveira, V., Gorrao, S. S., Tambourgi, D. V., Sant'Anna, O. A., Whiting, P. J., Camargo, L. M., Konno, K., Brandon, N. J., Camargo, A. C. M. 2005. Inhibition of NUDEL (nuclear distribution element-like)-oligopeptidase activity by disrupted-in-schizophrenia 1. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **102** 3828-3833.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.*, **166**, 557-580.

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

Harrison, P.J., Weinberger, D.R. 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry*, **10**, 40-68.

Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., Inoue, K. 1994. Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature*, **370**, 216-218.

Hess, J., Kaufmann, S.H.E. 1999. Development of novel tuberculosis vaccine. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **322**, 953-958.

Hennah, W., Varilo, T., Kestila, M., Paunio, T., Arajärvi, R., Haukka, J., Parker, A., Martin, R., Levitzky, S., Partonen, T., Meyer, J., Lonnqvist, J., Peltonen, L., Ekelund, J. 2003. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 3151-3159.

Hodgkinson, C.A., Goldman, D., Jaeger, J., Persaud, S., Kane, J.M., Lipsky, R.H., Malhotra, A.K. 2004. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am. J. Hum. Genet.*, **75**, 862-872

Hughes, A.L. 1993. Contrasting evolutionary rates in the duplicate chaperonin genes of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. Leprae*. *Mol. Biol.* **6**, 1343-1359.

Ginsberg, A.M. 2002. What's new in tuberculosis vaccine. *Bull. Who* **80**, 483-488.

Kitagawa, M., Umezu, M., Aoki, J., Koizumi, H., Arai, H., Inoue, K., 2000. Direct association of LIS1, the lissencephaly gene product, with a mammalian homologue of a fungal nuclear distribution protein, rNUDE. *FEBS Lett.*, **479**, 57-62.

Kholmanskikh, S.S., Dobrin, J.S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P.C., Ross, M. 2003. Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. *J. Neurosci.*, **23**, 8673-8681.

Kong, T.H., Coates, A.R.M., Butcher, P.D., Hickman, C.J., Shinnick, T.M. 1993. *Mycobacterium tuberculosis* expresses two chaperonin-60 homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 2608-2612.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lima, K.M., dos Santos, S.A., Santos, R.R., Jr., Rodrigues, J.M., Silva, C.L. 2003. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. 2003. *Vaccine*, **22**, 49-56. (a)

Lima, K.M., Santos, S.A., Lima, V.M., Coelho-Castelo, A.A., Rodrigues, Jr. J.M., Silva, C.L. 2003. Single dose of vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene Ther.*, **8**, 678-685. (b)

Lipska, B.K., Tricia Peters, T., Hyde, T.M., Halim, N., Horowitz C., Mitkus, S., Weickert, C.S., Matsumoto, M., Sawa, A., Straub, R.E., Vakkalanka, R., Herman, M.H., Weinberger, D.R., Kleinman, J. E. 2006. Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 1245-1258.

Liu, Y., Li, J., Wang, F., Chen, J., Li, P., Su, Z. 2007. A newly proposed mechanism for arginine-assisted protein refolding- not inhibiting soluble oligomers although promoting a correct structure. *Protein Expr. Purif.*, **51**, 235-242.

Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J. 1991. Predicting Coiled Coils from Protein Sequences. *Science*, **252**, 1162-1164.

Lowrie, D.B., Tascon, R.E., Bonato, V.L., Lima, V.M., Faccioli, L.H., Stavropoulos, E., Colston, M.J., Hewinson, R.G., Moelling, K., Silva, C.L. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, **400**, 269-271.

Mark, J.K., Smith, S., Hefford, M.A. 2007. Over-expression and refolding of MAP kinase phosphatase 3. *Protein Expr. Purif.*, **54**, 253-260.

Millar, J. K., Christie, S., Anderson, S., Lawson, D., Hsiao-Wei Loh, D., Devon, R. S., Arveiler, B., Muir, W. J., Blackwood, D. H., Porteous, D. J., 2001. Genomic structure and localisation within a linkage hotspot of Disrupted In Schizophrenia 1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, **6**, 173–178.

Millar, J. K., Christie, S., Porteous, D. J. 2003. Yeast two-hybrid screens implicate DISC1 in brain development and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 1019-1025.

Millar, J. K., Pickard, B. S., Mackie, S., James, R., Christie, S., Buchanan, S. R., Malloy, M. P., Chubb, J. E., Huston, E., Baillie, G. S., Thomson, P. A., Hill, E. V., Brandon, N. J., Rain, J. C., Camargo, L. M., Whiting, P. J., Houslay, M. D., Blackwood, D. H., Muir, W. J., Porteous, D. J. 2005. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science*, **310**, 1187-1191.

Millar, J. K., Wilson-Annan, J. C., Anderson, S., Christie, S., Taylor, C. A., Semple, C. A., Devon, R. S., Clair, D. M., Muir, W. J., Blackwood, D. H., Porteous, D. J. 2000. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1415-1423.

Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J.-M., Georgopoulos, C., Raina, S. 1996. Identification and characterization of HsIV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *Embo J.*, **15**, 6899-6909.

Miyoshi, K., Honda, A., Baba, K., Taniguchi, M., Oono, K., Fujita, T., Kuroda, S., Katayama, T., Tohyama, M. 2003. Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth. *Mol. Psychiatry*, **8**, 685-694.

Morris, J. A., Kandpal, G., Ma, L., Austin, C. P. 2003. DISC1 (Disrupted-In- Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1591-1608.

Murphy, R.M. 1997. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 25-30.

Nagabhushanam, V., Praszker, J., Cheer, C. 2001. Molecular and Immunological Characterization of *Mycobacterium avium* 65 kDa heat shock protein (Hsp65). *Immunology and Cell Biology* **79**, 454-461.

Neuer, A., Mele, C., Rosenwaks, Z., Witolin, S.S. 1998. Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development *in vitro*. *Hum. Reproduction Update*, **14**, 987-990.

Neuer, A., Spandorfer, S.D., Giraldo, P., Dieterle, S., Rosenwaks, Z., Witkin, S.S. 2000. The role of heat shock protein in reproduction. *Hum. Reproduction Update*, **6**, 149-159.

Niethammer, M., Smith, D. S. R., Ayala, R., Peng, J., Ko, J., Lee, M. S., Morabito, M., Tsai L. H. 2000. NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron*, **28** 697-711.

Oliveira, E. B., Martins, A. R., Camargo, A. C. M. 1976. Isolation of brain endopeptidases: influence of size and sequence of substrates structurally related to bradykinin. *Biochemistry*, **16**, 1967-1974.

Ozeki, Y., Tomoda, T., Kleiderlein, J., Kamiya, A., Bord, L., Fujii, K., Okawa, M., Yamada, N., Hatten, M. E., Snyder, S. H., 2003. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 289-294.

Pockley, A.G., Bulmer, J., Hanks, B.M., Wright, B.H. 1999. Identification of human heat shock protein 60 (HSP 60) and anti-HSP 60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress & Chaperones*, **4**, 29-35.

Portaro, F.C.V., Hayashi, M.A.F., Arauz, L.J., Palma, M.S., Assakura, M.T., Silva, C.L., Camargo, A.C.M. 2002. The *Mycobacterium leprae* hsp65 displays proteolytic activity. Mutagenesis studies indicate that the *M. leprae* hsp65 proteolytic activity is catalytically related to the HslVU protease. *Biochemistry*, **41**, 7400-7406.

Qamra, R., Mande, S. C. 2004. Crystal Structure of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein, Chaperonin 60.2, of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, **23**, 8105-8113. (a)

Qamra, R., Mande, S.C., Coates, A.R.M., Henderson, B. 2004. The Unusual Chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, **5**, 385-394. (b)

Reed, S., Lobet, Y. 2005. Tuberculosis vaccine development: from mouse to man. *Microbes and Infect.*, **7**, 922-931.

Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T., Ledbetter, D.H. 1993. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*, **364**, 717-721.

Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M.J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A. Hirotsune, S. 2000. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron*, **28**, 681-696.

Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisante-Shalom, A., Lev-Lehman, E., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisaru, N., Karp, L., Schiffer, R., Kotler, M., Strous, R.D., Swartz-Vanetik, M., Knobler, H.Y., Shinar, E., Beckmann, J.S., Yakir, B., Risch, N., Zak, N.B. 2002. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1296-1302.

Silva. C.L., Portaro, F.C., Bonato, V.L., de Camargo, A.C., Ferro, E.S. 1999. Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**, 591-595.

Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T.T., Hjaltason, O., Birgisdottir, B., Jonsson, H., Gudnadottir, V.G., Gudmundsdottir, E., Bjornsson, A., Ingvarsson, B., Ingason, A., Sigfusson, S., Hardardottir, H. 2002. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 877-892.

Straub, R.E., Jiang, Y., MacLean C.J., Ma, Y., Webb, B.T., Myakishev, M.V., Harris-Kerr, C., Wormley, B., Sadek, H., Kadambi, B., Cesare, A. J., Gibberman, A., Wang, X., O'Neill, F.A., Walsh, D., Kendler, K. S., 2002. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 337-348.

Sweeney, K. J.; Prokscha, A. & Eichele, G. NudE-L. 2001. A novel Lis1-interacting protein, belongs to a family of vertebrate coiled-coil proteins. *Mech. Dev.*, **101**, 21-33.

Van Eden, W. 2000. Stress proteins as targets for anti-inflammatory therapies. *Drug Discovery Today*, **5**, 115-120.

Van Eden, W., Van Der Zee, R., Paul, A.G.A., Prakken, B.J., Wendling, U.W., Anderton, S.M., Wauben, M.H.M. 1998. Do heat shock proteins control the balance of t-cell regulation in inflammatory disease. *Immunology Today*, **19**, 303-307.

Zugel, U., Kaufmann, S.H. 1999. Immune response against heat shock protein in infection diseases. *Immunobiology*, **1**, 22-35.

Warner, L.R., Blasick, C.M., Brown, R.J., Oxford, J.T. 2007. Expression, purification and refolding of recombinant collagen alpha 1 (XI) amino terminal domain splice variants. *Protein Expr. Purif.*, **52**, 403-409.

WHO (World Health Organization) – The World Report - Health Systems: improving performance. Geneva, Switzerland, 2000.

WHO (World Health Organization) – The World Report – 2007 Tuberculosis Facts. (<http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/> visita em 10/01/2008).

Young, D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D., Young, R.A. 1988. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **12**, 4267-4270.