



**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular**  
**Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro**

# **Caracterização bioquímica, dinâmica molecular e propriedades imunomoduladoras da proil oligopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis***

**Brina Portugal**

**Orientador: Prof. Dr. Jaime M. de Santana**  
**UnB – Universidade de Brasília**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Flávia da Silva Nader Motta**  
**UnB – Universidade de Brasília**

**Brasília – DF**  
**2014**



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Pós-graduação em Patologia Molecular  
Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

# **Caracterização bioquímica, dinâmica molecular e propriedades imunomoduladoras da prolil oligopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis***

**Brina Portugal**

**Orientador: Prof. Dr. Jaime M. de Santana**

**UnB – Universidade de Brasília**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Flávia da Silva Nader Motta**

**UnB – Universidade de Brasília**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Patologia Molecular.**

**Brasília – DF**

**2014**



Trabalho desenvolvido no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro – Instituto de Biologia da Universidade de Brasília com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAP-DF.



“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha junto é o  
começo da realidade.”  
(Cervantes)



**Dedico este trabalho aos meus pais, Maria de Jesus e Portugal, aos meus irmãos, Aline e Marcus, que sempre me incentivaram.**

**Dedico, especialmente, a Marco Paulino por estar ao meu lado em todos os momentos.**



## Agradecimentos

Aos **meus pais**, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e confortando nos momentos críticos e, principalmente nas minhas escolhas pessoais e profissionais.

Aos **meus queridos irmãos**, Aline e Marcus, o amor, a amizade, o companheirismo, os dias felizes, as palhaçadas e as inúmeras risadas.

Ao **meu amor, Marco Antonio Paulino**, pelos dias incríveis de convivência e de paciência, pelo seu coração enorme, pela ajuda e companheirismo, por conseguir minimizar todos os meus problemas e por tornar meus dias mais felizes.

Aos meus sobrinhos, **Daniel, Gabriel e Maria Luisa**, por transformarem as minhas manhãs tão agradáveis e divertidas, e ao **Matheus e Gabriel** pelos fins de semana incríveis!

Aos meus amigos, **Isabel, Raquel, Bruna, Diego, Hugo, Sol, Thiago, Aline, André e Tati** que me incentivaram nessa caminhada acadêmica, pelas conversas e desabafos.

Ao meu orientador, **Jaime Santana**, pela a oportunidade, confiança e aprendizado.

À profa. Dr. **Flávia Motta** pelos conselhos, pelo aprendizado, pelas orientações, disponibilidade do seu tempo e, principalmente, pelo incentivo nos momentos mais críticos.

À profa. Dr. **Izabela Bastos**, pelo apoio, orientação científica e incentivo nessa caminhada;

À profa. Dr. **Ana Paula Junqueira Kipnis**, pela recepção em seu laboratório e apoio à parte dessa pesquisa;

À profa. Dr. **Kelly Magalhães**, pela colaboração nesse trabalho;

Ao Prof. Dr. **Diego Nolasco** pela participação nesse estudo e pela disponibilização de seu tempo para a realização da dinâmica molecular;

Aos colegas e ex-colegas do laboratório, em especial, à **Paula e Débora**, pela convivência e momentos compartilhados nesses anos.

Ao Laboratório Central de Brasília (Lacen) pelo cultivo da micobactéria.

## Lista de abreviaturas

AMC	7-amino-4-metilcomarina
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Da	Dalton
DM	Dinâmica Molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
$[E]_0$	concentração de enzima
EDTA	Etileno bis (oxi-etilenonitrilo) do ácido tetraacético
HEPES	ácido (2-hidroxi-etil)-piperazina etanosulfônico
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50%
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kb	kilobase
<i>kcat</i>	Constante catalítica
<i>kcat/Km</i>	Eficiência catalítica
<i>Ki</i>	Constante de inibição
<i>Km</i>	Constante de Michaelis-Menten
N-Suc	N-Succinil
ORF	fase aberta de leitura
pb	pares de bases
PBS	Tampão fosfato 50 mM, NaCl 0,15 M pH 7,2
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i> (desvio médio quadrático)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
$[S]$	concentração do substrato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio
TLCK	n- $\alpha$ -Tosil-L-Lisina clorometil cetona
TPCK	n- $\alpha$ -Tosil-L-Fenilalanina clorometil cetona
UTR	região não traduzida
<i>Vmax</i>	Velocidade máxima
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo



# SUMÁRIO

---

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUÇÃO .....	3
Tuberculose.....	3
Agente Etiológico .....	9
Epidemiologia .....	10
Tratamento da Infecção .....	13
Resistência Bacteriana.....	16
Proteases .....	18
Aspártico-proteases .....	20
Cisteíno-proteases .....	20
Metalo-proteases.....	21
Treonino-proteases.....	21
Glutâmico-proteases.....	22
Serino-proteases .....	22
Família Prolil Oligopeptidase (S9) .....	23
Proteases em <i>M. tuberculosis</i> .....	28
Modelagem por Homologia e Dinâmica Molecular .....	31
Fluorescência intrínseca e sua aplicação no estudo de proteínas.....	34
JUSTIFICATIVA.....	37
OBJETIVOS .....	38
Objetivo Geral.....	38
MATERIAL E MÉTODOS .....	39
Micobactéria e Extração do DNA genômico.....	40
Análise de Bioinformática .....	40
Amplificação do gene <i>Prolil Oligopeptidase</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	40
Clonagem no vetor de expressão .....	41
Expressão heteróloga e Purificação da proteína recombinante .....	43



Eletoforese em gel de poliacrilamida .....	44
Produção de anticorpos anti-rPOPMT e Western blot .....	44
Ensaio da Atividade Enzimática .....	45
Influência do pH e da Temperatura .....	46
Perfil de Inibição da rPOPMT .....	47
Constante de Michaelis-Menten ( <i>K<sub>m</sub></i> ), velocidade máxima ( <i>V<sub>max</sub></i> ), constante catalítica ( <i>k<sub>cat</sub></i> ) e eficiência catalítica ( <i>k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub></i> ) .....	47
Espectroscopia de fluorescência.....	48
Modelagem por homologia e Dinâmica molecular.....	48
Parâmetros de simulação .....	48
Imunogenicidade da rPOPMT em camundongos e na infecção .....	49
Animais .....	49
Imunização.....	49
Coleta do soro.....	50
Elisa .....	50
Avaliação dos componentes celulares e citocinas do baço e pulmão de camundongos imunizados.....	50
Análise estatística .....	51
Perfil de secreção de citocinas <i>in vitro</i> por macrófagos murinos após incubação com rPOPMT .....	51
Estimulação de macrófagos peritoneais com rPOPMT <i>in vitro</i> .....	51
Propriedades imunomoduladoras de rPOPMT .....	51
Análise estatística .....	52
RESULTADOS.....	53
Amplificação e Clonagem do gene <i>popmt</i> .....	53
Expressão Heteróloga e Purificação da rPOPMT.....	59
Produção de anticorpos anti-rPOPMT.....	65
Atividade enzimática da rPOPMT.....	66
Especificidade da rPOPMT pelo substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC .....	66
Influência do pH na atividade enzimática e na estrutura da rPOPMT.....	68
Efeito do tampão na atividade catalítica da rPOPMT.....	69
Efeitos de NaCl e DTT na catálise da rPOPMT .....	70
Influência da Força Iônica na atividade enzimática da rPOPMT .....	71
Influência da temperatura na atividade enzimática e na estrutura da rPOPMT.....	72
Perfil de inibição da rPOPMT.....	73



Parâmetros cinéticos da rPOPmt.....	74
Modelagem por homologia e Dinâmica Molecular .....	75
Imunogenicidade da rPOPmt em camundongos .....	79
Perfil de secreção de citocinas <i>in vitro</i> por macrófagos murinos após incubação com rPOPmt ..	81
DISCUSSÃO .....	82
CONCLUSÕES .....	89
PERSPECTIVAS .....	90
MANUSCRITO - Enzymatic properties and molecular dynamics of Prolyl oligopeptidase from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

# RESUMO

---

A linha de pesquisa do nosso grupo visa à identificação e caracterização de alvos potenciais para a quimioterapia de doenças como a de Chagas, Dengue, Leishmaniose e Tuberculose tendo as proteases como principal enfoque, uma vez que estão envolvidas em processos biológicos fundamentais para a viabilidade e virulência de patógenos. Neste contexto, esta tese aborda alguns aspectos bioquímicos, estruturais e funcionais da prolil oligopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis*, microrganismo responsável por desencadear uma resposta inflamatória característica da tuberculose. A prolil oligopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis* (rPOPMT) revelou possuir atividade catalítica sobre o substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC, com uma atividade ótima a pH 7,5 e temperatura ótima a 28 °C. Aditivos como NaCl, DTT e íons não influenciaram a atividade enzimática da proteína. Os parâmetros cinéticos calculados para a enzima foram  $K_m$  e  $k_{cat}/K_m$  de 108  $\mu\text{M}$  e 21.838  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectivamente, com N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC como substrato. A enzima somente foi susceptível a inibidores de proteases da classe de serino-protease como AEBSF e TPCK, apresentando uma atividade residual de 33 e 66% na presença destes, respectivamente. O Z-Pro-prolinal, inibidor específico de prolil oligopeptidase, apresentou um valor de  $K_i$  de 16,87 nM. Pelos estudos de modelagem por homologia e dinâmica molecular, a estrutura teórica da POPMT foi obtida e, como para outras POPs, a estrutura se apresenta na forma de dois domínios: o catalítico e o  $\beta$ -propeller. Além disso, o sítio catalítico composto pela tríade Ser-Asp-His é conservado. Quando a proteína recombinante foi utilizada em formulação de vacina com CpG DNA, observou-se a estimulação em maior nível de anticorpo IgG2a conhecido como marcador da resposta imune do tipo Th1. As propriedades imunomoduladoras de POPMT no desencadeamento de respostas imunitárias *in vitro* mostra que a secreção das citocinas analisadas, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-23, IL-10, IL-1 $\beta$  e MCP-1 induzida por POPMT era em grande parte dependente da atividade da enzima. Com isso, a proteína recombinante pode contribuir para a determinação do papel da POP nativa em *M. tuberculosis*.

# ABSTRACT

---

Our group aims to identify and characterize potential targets for chemotherapy for diseases such as Chagas disease, dengue, leishmaniasis and tuberculosis. Proteases are the main focus since they are involved in fundamental biological processes for viability and virulence of pathogens. In this context, this thesis reports some biochemical, structural and functional aspects of the prolyl oligopeptidase of *Mycobacterium tuberculosis*, the microorganism responsible for triggering an inflammatory response characteristic of tuberculosis. The prolyl oligopeptidase of *M. tuberculosis* (rPOPMT) showed catalytic activity towards the substrate N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC, with optimal pH and temperature activity at 7.5 and 28 °C, respectively. Additives such as NaCl and DTT, and ions did not affect the enzymatic activity of the protein. The kinetic parameters for the enzyme using N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC as substrate were calculated showing  $K_m$  and  $k_{cat}/k_m$  of 108  $\mu\text{M}$  and 21.838  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectively. The enzyme was only susceptible to serine protease inhibitors such as AEBSF and TPCK, with a residual activity of 33 and 66 %, respectively. In presence of Z-Pro-prolinal, a specific inhibitor of prolyl oligopeptidase, a  $K_i$  value of 16.87 nM was calculated. Studies of homology modeling and molecular dynamics permitted the achievement of POPMT theoretical structure, and as for other POPs, the structure possess two domains: the catalytic and  $\beta$ -propeller domain, moreover, the catalytic site comprises the triad Ser-Asp-His is conserved along POPs. When the recombinant protein was used in a vaccine formulation with CpG DNA, it was observed a higher level of IgG2a antibody known as a marker for Th1-type immune response. The immunomodulatory properties of POPMT in triggering immune responses in vitro shows that the secretion of cytokines analyzed, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-23, IL-10, IL-1 $\beta$  and MCP-1 induced by POPMT were largely dependent on the activity of the enzyme. Thus, the recombinant protein can help to determine the role of the native POP in *M. tuberculosis*.

# INTRODUÇÃO

---

## Tuberculose

Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um problema de saúde global, sendo a segunda maior causa de mortes no mundo, ultrapassada apenas pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Em 2012, a OMS estimou o surgimento de 8,6 milhões de novos casos de pessoas infectadas pelo bacilo (desses, 13% foram diagnosticados co-infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana - HIV) e 1,3 milhão de mortes ocorreram em decorrência da doença, sendo pouco menos de 1,0 milhão entre pessoas HIV-negativos e 300 mil mortes relacionadas com TB associada ao HIV (OMS, 2012).

A TB é caracterizada por uma resposta inflamatória granulomatosa, que normalmente afeta os pulmões, mas pode atacar qualquer parte do corpo, tais como o rim, coluna vertebral, e o cérebro. A apresentação pulmonar é a mais importante no campo de saúde pública, pois é a principal responsável para transmissão da doença (Brasil, 2011). As espécies que compõem o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que é constituído por *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae* são o agente etiológico da doença, sendo de maior interesse sanitário o *M. tuberculosis*, ou bacilo de Koch (Brasil, 2011).

Este patógeno foi identificado por Robert Koch em 1882, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1905 sendo considerada sua maior conquista científica. A descoberta do bacilo da tuberculose foi apenas um marco inicial de Robert Koch no estudo da doença (Gradmann, 2001). Dentre outras descobertas está a tuberculina em 1890-1891, feita a partir de cultura do bacilo, que teve como objetivo inicial ser utilizada no tratamento da doença, mas foi considerado um fracasso, prejudicando a reputação de Koch naquele período (Gradmann, 2001). Contudo, hoje a tuberculina é utilizada como teste cutâneo (prova da tuberculina) para o diagnóstico da doença.

Os sintomas de tuberculose são a tosse, às vezes com escarro ou sangue, dores no peito, fraqueza, perda de peso, febre e sudorese noturna, que ocorrem quando a doença se instala efetivamente, ou seja, quando não há controle da infecção. O ser humano é o principal reservatório do bacilo, mas outros animais como gado bovino, primatas, aves e outros mamíferos também podem ser considerados como tal. O bacilo é transmitido de pessoa a pessoa pela tosse ou espirro de quem contém a doença respiratória ativa (bacilífero).

Em pessoas saudáveis, a infecção pelo *M. tuberculosis*, muitas vezes não causa sintomas, uma vez que o sistema imunológico atua para conter as bactérias. A infecção ocorre quando indivíduos inalam partículas de aerossóis que penetram nas vias aéreas inferiores. As gotículas ou núcleos exalados permanecem na atmosfera por várias horas, e a dose infecciosa é estimada em uma única bactéria (Nicas, Nazaroff e Hubbard, 2005). A consequência da inalação pode ser o desenvolvimento de processo pneumônico localizado que se torna o sítio de deposição do Mtb. A partir desse foco, o bacilo se dissemina por vasos linfáticos locais para o linfonodo regional, formando o complexo de Ghon ou complexo primário da tuberculose, com ou sem reação pleural, formando uma lesão pulmonar e ganglionar satélite (Marais *et al.*, 2005).

No pulmão a bactéria é fagocitada por macrófagos alveolares e induz uma resposta pró-inflamatória localizada que leva ao recrutamento de células mononucleares a partir de vasos sanguíneos vizinhos. Por consequência, ocorre infiltração de neutrófilos e monócitos, aumento progressivo de linfócitos T e B que circundam os macrófagos infectados, células dendríticas e fibroblastos, formando o característico granuloma tuberculoso (Kaufmann, 2001).

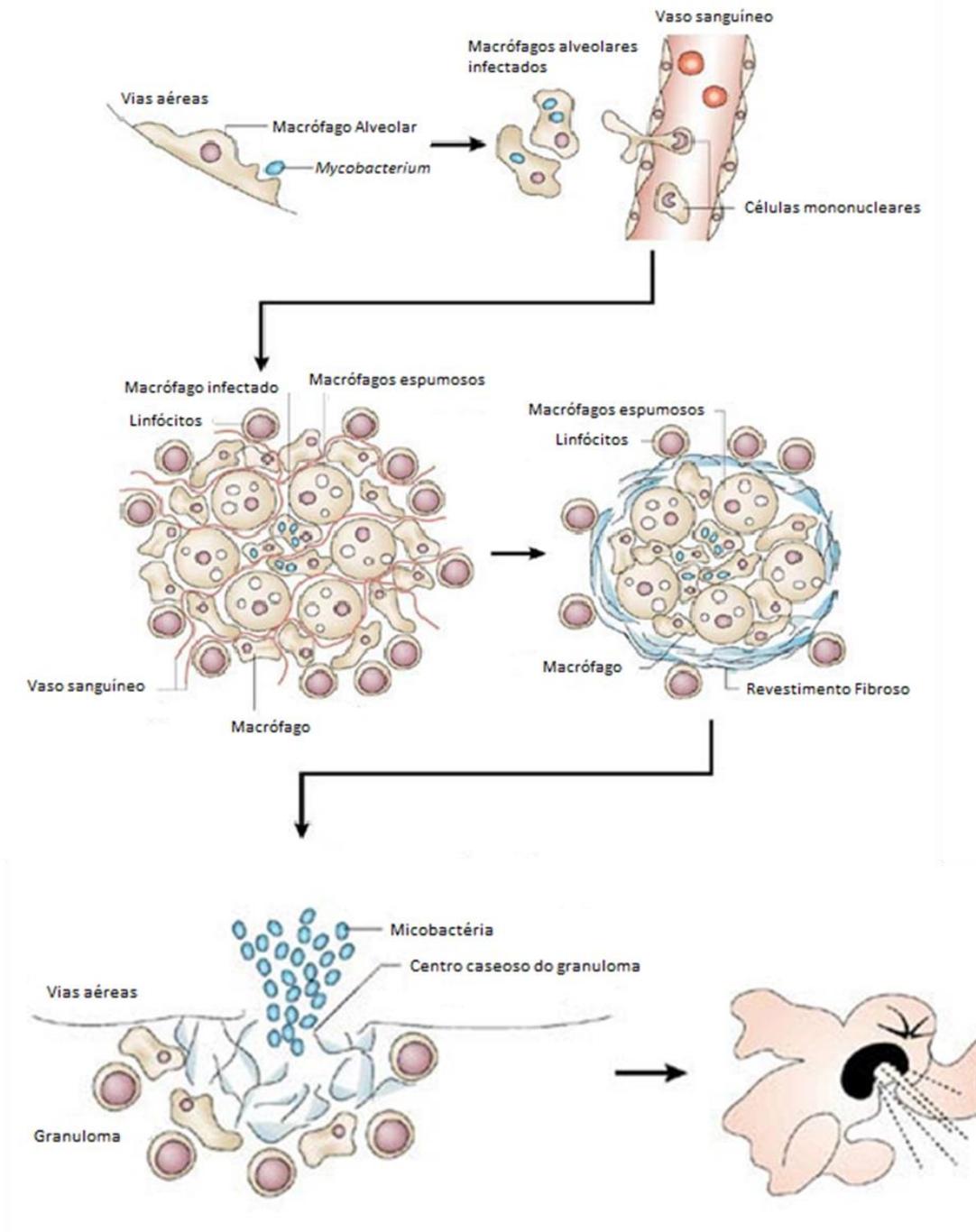
A infecção inicial leva a uma resposta imune inata, que inclui a estimulação de receptores do tipo Toll (TLRs) que reconhecem patógenos e estão localizados na membrana plasmática e dentro dos endossomos das células hospedeiras. Os TLRs são os principais receptores envolvidos no reconhecimento de antígenos do Mtb e responsáveis pela ativação de macrófagos e células dendríticas. Mtb é especialmente reconhecido por TLRs do tipo 2, 4 e 9 (Quesniaux *et al.*, 2004). A ativação de TLRs regula positivamente a transcrição de citocinas pró-inflamatórias IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 que são essenciais para o recrutamento de células imunológicas para o local da

infecção e controle da infecção por Mtb (Ladel *et al.*, 1997; Bean *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2000).

Os bacilos induzem macrófagos, células dendríticas e as células T a secretar TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Essas são citocinas importantes para o controle da infecção ativa por seu papel na inflamação local e na ativação de macrófagos. Com isso, induzem o recrutamento de linfócitos T para a formação de granulomas no local da infecção (Kaufmann, 2001; Raja, 2004). A função do TNF- $\alpha$  na manutenção e no controle do granuloma é fundamental, pois regula a concentração de quimiocinas para o recrutamento de células, prevenindo a reativação da TB. Logo, sua inativação pode resultar em reativação fatal da doença (Bean *et al.*, 1999).

O granuloma consiste de um núcleo de macrófagos infectados rodeados por macrófagos espumosos e outros fagócitos mononucleares com um manto de linfócitos em associação à fibras de colágeno e outros componentes da matriz extracelular que delinea a periferia da estrutura (Fig. 1). Esta resposta do tecido tipifica a fase da infecção em que não há sinais evidentes de doença e o hospedeiro não transmite o bacilo à outras pessoas, conhecida como fase de "contenção". Essa resposta do tecido contém a infecção e significa o fim do período de replicação rápida para Mtb (Russell, 2007).

O granuloma, em estágios mais avançados, desenvolve um revestimento fibroso que envolve o núcleo de macrófagos e exclui a maioria dos linfócitos a partir do centro da estrutura. Concomitante com esta transição ocorre uma redução acentuada no número de vasos sanguíneos que penetram nesta estrutura. Nesta fase, há um aumento notável no número de macrófagos espumosos dentro da cápsula fibrosa. Em uma pessoa imunocompetente esta progressão é localizada em granulomas individuais e no mesmo tecido irá abrigar outros granulomas que estão sob contenção imunológica perfeita (Russell, 2007).

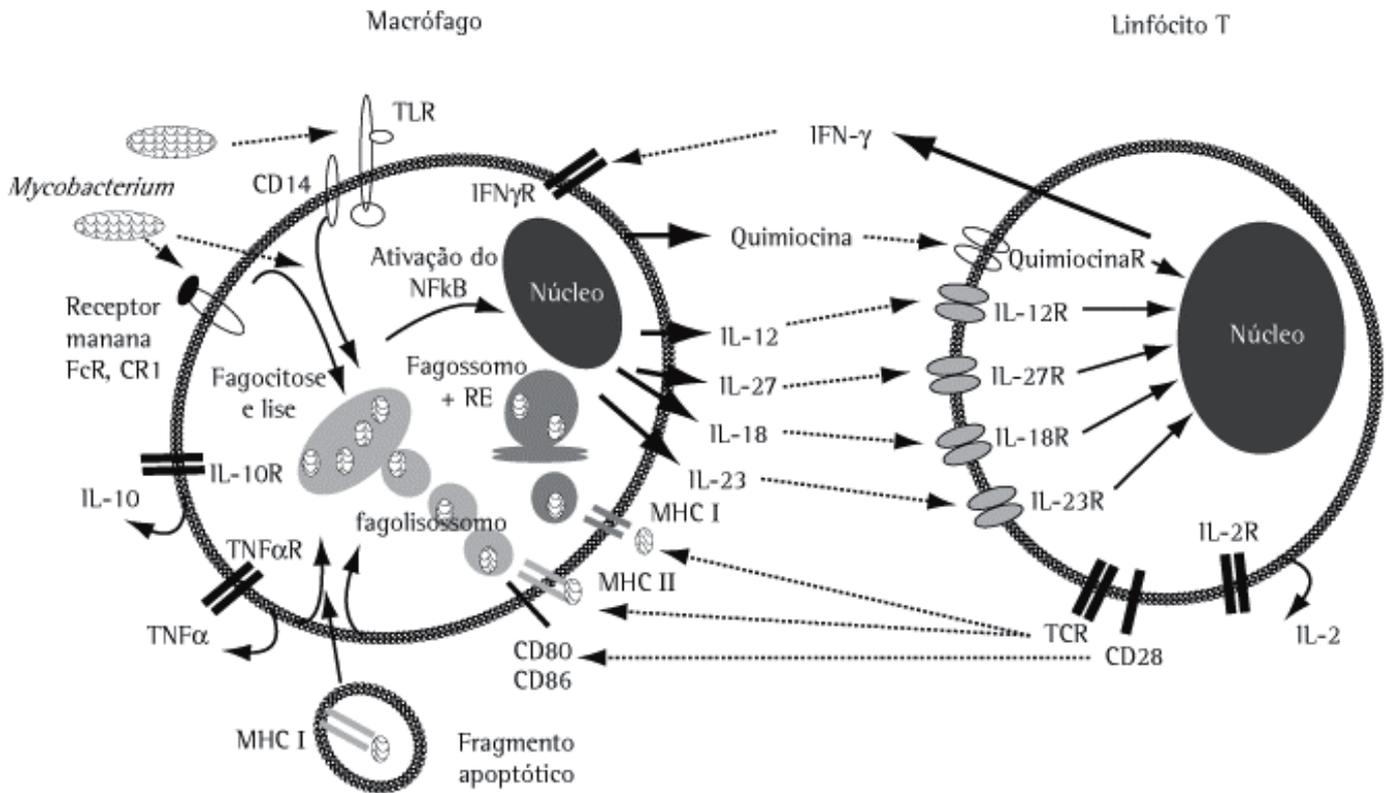


**Figura 1. Patologia do granuloma.** Após a inalação do patógeno, eles são fagocitados e internalizados por macrófagos alveolares. Isso, desencadeia uma resposta pró-inflamatória que favorece o recrutamento de células mononucleares de vasos sanguíneos próximos favorecendo a formação do granuloma. O granuloma consiste em uma parte interna de macrófagos infectados e não infectados, além de macrófagos espumosos e outros fagócitos mononucleares, circundados por um revestimento fibroso e uma capa protetora de linfócitos delineando a periferia da estrutura. Na infecção progressiva, o centro caseoso do granuloma liquefaz e sofre cavitação, derramando milhares de Mtb infecciosos nas vias aéreas facilitando a propagação dos bacilos. Fonte: Adaptado de (Russell, 2007).

A contenção dos bacilos normalmente falha quando a condição imunológica é alterada, geralmente ocasionada pela idade avançada, desnutrição ou co-infecção com HIV, ou seja, por qualquer condição que reduz o número ou prejudica a função de células T CD4<sup>+</sup>. Em consequência, ocorre ruptura do granuloma e milhares de bacilos viáveis e infecciosos são expelidos nas vias aéreas facilitando a disseminação de aerossol de bacilos infecciosos (Russell, 2007).

O Mtb é um patógeno intracelular que infecta e permanece dentro dos tecidos dos mamíferos (Russell, 2007). Assim, o sucesso da infecção está relacionado com o controle da resposta imune inata e adaptativa (Bhatt e Salgame, 2007). Após ser fagocitado, o bacilo permanece no interior do fagossomo. A partir da fusão do fagossomo e do lisossomo, antígenos podem ser processados e, posteriormente, apresentados aos linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>), através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Um fator central na imunidade protetora contra o bacilo é a interação das células T com os macrófagos infectados. As citocinas produzidas por estas células são mediadores importantes que regulam as respostas imunitárias e inflamatórias (Raja, 2004).

Quimiocinas e citocinas desempenham um papel importante na resposta imune inata e adaptativa em ambos os efetores e reguladores da imunidade a micobactéria. Sendo que o perfil de expressão das mesmas em células T CD4<sup>+</sup> esboça a resposta do tipo Th1 dominante que está associada ao controle da infecção (Fig. 2) (Cooper, Mayer-Barber e Sher, 2011). Pessoas que possuem alguma mutação recessiva em genes para receptores ligantes de IFN- $\gamma$ , subunidade IL-12p40 e a cadeia  $\beta$ 1 do receptor de IL-12 e alguns portadores do HIV, ficam gravemente debilitados quando infectados pelo Mtb, pois são inábeis a sintetizar citocinas Th1. Esse fato favorece o desenvolvimento de uma lesão que impossibilita a formação do granuloma, com a formação de lesão necrótica e disseminação do Mtb (North e Jung, 2004).



**Figura 2. Ativação de macrófagos e linfócitos T por *Mycobacterium*.** O reconhecimento e a fagocitose de micobactérias podem ocorrer via receptores para manana ou por produtos de ativação do sistema complemento, como receptor do complemento tipo 1 (CR1). Após serem fagocitados, os bacilos são processados em fagolisossomos, e os antígenos (Ags) apresentados aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> via MHC de classe II. A fusão de fagossomos com o retículo endoplasmático (RE) e/ou vesículas apoptóticas fagocitadas pode favorecer a apresentação de Ags às células T CD8<sup>+</sup> via MHC de classe I. Por outro lado, a ativação de TLRs, promove a degradação e liberação do NF- $\kappa$ B que se move para o núcleo da célula e induz a ativação da transcrição de uma variedade de genes que levam à produção de citocinas como IL-12 e TNF- $\alpha$ , e à expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86 (que interagem com CD28). A IL-23, IL-18 e IL-27 também são produzidas pelos macrófagos e, juntamente com a IL-12, induzem a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T. A produção de IL-2 e de seus receptores ocorre nas células T ativadas e induz a proliferação dos linfócitos T. O IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  ativam os mecanismos microbicidas dos macrófagos. O IFN- $\gamma$  também está envolvido na produção de quimiocinas. A IL-10, produzida por macrófagos e também por linfócitos T, atua como imunossupressor endógeno. TCR: receptor de linfócitos T; FcR: receptor para a porção Fc de anticorpos. Fonte: Adaptado de (Teixeira, Abramo e Munk, 2007).

### Agente Etiológico

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, subordem Corynebacteriaceae, ordem Actinomycetales. O gênero *Mycobacterium* compreende 83 espécies, a maioria saprófitas de vida livre. O complexo Mtb é constituído por várias espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. Outras espécies de micobactérias podem produzir quadro clínico semelhante à tuberculose, sendo necessária para o diagnóstico diferencial, a cultura e a identificação das mesmas, pelos laboratórios de referência (Brasil, 2012). As bactérias pertencentes ao complexo são bastonetes aeróbios intracelulares, pequenos e finos, com parede celular rica em lipídeos estruturais, constituindo cerca de 60% do peso seco da parede e de crescimento lento, com o tempo variando de 15 a 20 horas (Teixeira, Abramo e Munk, 2007). Apesar de possuírem a parede celular similar a bactérias gram-negativas, quando submetidos à análise morfotintorial de Gram não é observada coloração. Para sua identificação é necessário método de coloração de Ziehl-Neelsen e por isso, são classificadas como micobactérias bacilo álcool ácido resistente (BARR) (Tortora, Funke e Case, 2012).

A virulência da micobactéria é atribuída à estrutura única de sua parede celular (Barry, 2001). Ligados covalentemente a arabinogalactanos e peptidoglicano subjacentes, os ácidos micólicos e lipídios livres criam uma barreira hidrofóbica de forma compacta. Esta barreira é aproximadamente 1000 vezes menos permeável a moléculas hidrofílicas, tais como antibióticos solúveis em água, do que a parede celular de *Escherichia coli*, por exemplo (Barry e Mdluli, 1996). O ácido micólico aumenta a virulência do Mtb por resistir à digestão por fagócitos, permitindo que a bactéria possa se multiplicar dentro desses fagócitos (Tortora, Funke e Case, 2012). A camada interna de sacarídeo inibe substâncias lipofílicas de entrarem, resultando a difícil passagem através da parede celular. Além de ser covalentemente ligado à parede da célula, os ácidos micólicos formam o 6,6'- dimicolato de trealose (TDM), um glicolípido tóxico encontrado no envelope da célula. O TDM tem importância na sobrevivência intracelular de *M. tuberculosis*, pois impede a fusão fagossomo-lisossomo, detém a biogênese de fagolisossomos maduros permitindo que as micobactérias continuem latentes nos macrófagos do hospedeiro durante anos (Deretic *et al.*, 2006).

## Epidemiologia

Em 2012, havia uma estimativa de 2,9 milhões de casos e 410 mil mortes devido a TB entre as mulheres, bem como uma estimativa de 530 mil casos e 74 mil mortes entre crianças. O número de mortes por tuberculose é inaceitavelmente grande dado que a maioria das mortes seria evitada se as pessoas pudessem ter acesso a cuidados de saúde para diagnóstico, e também se o tratamento correto fosse fornecido, uma vez que utilizando medicamentos de primeira linha, com regimes de curta duração, pode ser observada a cura em torno de 90% dos casos (OMS, 2013).

Apesar de grandes números de casos e mortes relacionadas a TB, um grande progresso no controle da doença foi observado 20 anos após a OMS declarar a tuberculose como uma emergência de saúde pública mundial. No mundo, a taxa de mortalidade por tuberculose (mortes por 100 mil habitantes por ano) caiu em 45% desde 1990 e as taxas de incidência de tuberculose (novos casos por 100 mil habitantes por ano) estão caindo na maior parte do mundo. Nos 18 anos desde o lançamento da nova estratégia internacional para o cuidado e controle de TB pela OMS, com a implantação da estratégia DOTS (Estratégia de Tratamento Diretamente Observado - pacote básico que sustenta a estratégia *STOP TB*) e seu sucessor, a estratégia *STOP TB*, 56 milhões de pessoas obtiveram um tratamento bem sucedido para TB entre 1995 e 2012, salvando aproximadamente 22 milhões de vidas (OMS, 2013).

A estratégia de tratamento diretamente observado modifica o conceito dado para o tratamento da doença dando um enfoque maior no acompanhamento do paciente desde o início do tratamento até a cura. Possui a finalidade de fortalecer a adesão ao tratamento e prevenir o aparecimento de cepas resistentes aos medicamentos, reduzindo os casos de abandono e aumentando a probabilidade de cura (Brasil, 2011).

A estratégia *Stop TB* foi lançada pela OMS em 2006 como uma abordagem baseada em evidências para reduzir a carga de tuberculose. A estratégia *STOP TB* tem como visão o mundo sem TB e para isso tem como finalidade a redução drástica (de 50% comparando aos dados de 1990) da carga global (prevalência e morte) de

tuberculose até 2015. Seu objetivo final é eliminar até 2050 a tuberculose como um problema de saúde pública. Para tal, os objetivos são (OMS, 2013):

- Alcançar o acesso universal aos cuidados de alta qualidade para todas as pessoas com TB;
- Proteger as populações vulneráveis à TB, TB/HIV e TB resistentes a medicamentos;
- Apoiar o desenvolvimento de novas ferramentas e permitir a sua utilização eficaz;
- Proteger e promover os direitos humanos na prevenção, cuidados e controle da tuberculose.

Na redução de casos e de mortes decorrentes de tuberculose, 7 dos 22 países de alto risco atenderam a todas as metas para 2015 são eles: Brasil, Camboja, China, Filipinas, Uganda, República Unida da Tanzânia e Vietnã. Outros quatro irão fazê-lo até 2015: Etiópia, Índia, Mianmar e Tailândia. Em 2012, estes 11 países representavam 51% da população mundial com carga de TB, correspondendo a 47% da população do mundo. De acordo com dados da OMS, as taxas de incidência e mortalidade em decorrência da doença no período de 2000 a 2012 foram diminuindo. Os dados podem ser observados na tabela 1.

**Tabela 1. Progresso global em cuidados e controle de TB (2000-2012) – (adaptado de OMS, 2013)**

<b>Ano</b>	<b>2000</b>	<b>2012</b>
<b>Incidência (por 100.00 habitantes por ano)</b>	148	122
<b>Prevalência (por 100.00 habitantes)</b>	263	169
<b>Mortalidade (por 100.00 habitantes por ano)</b>	22	13
<b>Taxa de casos detectados (%)</b>	42	66
<b>Taxa de sucesso no tratamento (%)</b>	69	87

Um dos indicadores mais importantes de progresso global é a taxa de sucesso do tratamento de 87% em 2011, acima dos 69% em 2000. Isso demonstra enorme melhoria na prestação de alta qualidade no cuidado da TB na maioria dos países (OMS, 2013).

O aumento da incidência da TB na década de 90 pode ser devido a dois fatores principais: a epidemia e co-infecção com o HIV, bem como o aparecimento de resistência aos fármacos antituberculostáticos. Esses fatores contribuíram para o desenvolvimento de cepas multirresistentes tornando-se um fator de grande preocupação não só pela propagação dessas cepas, mas também pela dificuldade em se estabelecer regimes de tratamento eficientes e o efetivo controle da doença (OMS, 2012).

Embora as taxas de tuberculose mundiais estejam em declínio, as preocupações em relação à resistência a multidrogas (MDR) e a extensiva resistência a drogas (XDR) dessas bactérias estão crescendo. Tuberculose MDR, cuja resistência é simultânea à rifampicina e isoniazida, surgiu durante a década de 1970. Dos 12 milhões de casos de tuberculose, aproximadamente 630 mil são estimados serem de tuberculose MDR (OMS, 2012). Programas de vigilância da tuberculose foram notificados com quase 60 mil casos de tuberculose MDR em nível mundial em 2011 (OMS, 2011). Mais da metade desses casos ocorreram em pacientes que vivem na Índia, China, Federação Russa e África do Sul.

Aproximadamente 4% dos novos casos (resistência primária a medicamento) e 20% dos casos tratados previamente (resistência adquirida à droga) foram qualificados como tuberculose MDR (OMS, 2012). Destes casos de tuberculose MDR, aproximadamente 9% são considerados XDR. XDR é definido como tuberculose resistente à isoniazida, rifampicina e fluoroquinolonas, e à pelo menos um dos três medicamentos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina, ou capreomicina). A estatística de tuberculose resistente aos medicamentos pode aumentar à medida que a acessibilidade aos testes de suscetibilidade antimicrobiana para isoniazida e rifampicina também aumentar (OMS, 2012).

Dados do Ministério da Saúde revelam que o número de casos registrados no Brasil, em 2011, caiu 3,54%: foram 71.790 (2010) contra 69.245 (2011). Apesar da

diminuição do número de casos, a doença ainda preocupa as autoridades de saúde. No país, a tuberculose representa a quarta causa de óbitos por doenças infecciosas e a primeira entre pacientes com SIDA (Brasil, 2012).

O atraso no início da terapêutica pode agravar a doença entre os pacientes sintomáticos, aumentar o risco de morte por tuberculose e aumentar a taxa de transmissão. A maioria das transmissões ocorre no período entre o aparecimento da tosse e o início do tratamento, sendo este o período em que, à medida que aumenta o atraso do início da terapêutica, os doentes são considerados potenciais transmissores da doença. O diagnóstico precoce e a instauração da terapêutica são fundamentais para a redução da morbidade e mortalidade associadas à tuberculose, bem como para minimizar a propagação da infecção. Fatores logísticos relacionados com a interrupção do fornecimento dos fármacos e a negligência ou o abandono do tratamento estão entre as mais importantes limitações que condicionam o fracasso no controle da doença (Brasil, 2012).

### **Tratamento da Infecção**

A terapia de combinação constitui a abordagem desejável no tratamento de doenças micobacterianas, a fim de assegurar uma erradicação efetiva das bactérias e impedir o aparecimento da resistência. Desde 2009, o tratamento da doença no Brasil passou a ser realizado pelo esquema de apresentação farmacológica em comprimidos de doses fixas combinadas de quatro medicamentos: Rifampicina - R, Isoniazida - H, pirazinamida - Z e etambutol - E, nas seguintes dosagens: R 150mg, H 75mg, Z 400mg e E 275mg. Sendo que nos dois primeiros meses (fase intensiva) utiliza-se a combinação RHZE e nos quatro meses restantes (fase de manutenção) a combinação RH. Esse esquema é utilizado para adolescentes e adultos, já para crianças, o esquema utilizado é RHZ por dois meses (fase de ataque) e RH, por quatro meses (fase de manutenção). O uso desses esquemas deve ser diário em uma única administração conjunta (Brasil, 2012).

Cada medicamento tem um mecanismo de ação específico contra a micobactéria. A rifampicina age inibindo a RNA-polimerase DNA-dependente de micobactérias e de outros microrganismos através da formação de um complexo

fármaco-enzima estável, resultando na supressão do início da síntese da cadeia de RNA. Esse antibiótico de amplo espectro é bactericida, porém não pode ser ministrado isoladamente no tratamento da tuberculose, pois as micobactérias desenvolvem rápida resistência ao medicamento (Brunton, Lazo e Parker, 2012). A resistência microbiana deve-se a uma alteração na RNA-polimerase DNA-dependente, e na maioria dos casos, é produzida por mutações entre os códons 507 e 533 do gene *rpoB* da polimerase (Blanchard, 1996).

A isoniazida (INH) é um pró-fármaco que é convertido pela catalase-peroxidase micobacteriana (*katG*) em um metabólito ativo. O mecanismo de ação desse fármaco é complexo, mas sua ação primária consiste em inibir a síntese de ácidos micólicos, componente essencial da parede celular da micobactéria. Estudos indicam sua ação em três genes relacionados a esta síntese: *katG*, *inhA* e *kasA*. A isoniazida ativada pela catalase-peroxidase liga-se ao produto do gene *inhA* (a enzima enoil-acil redutase do ácido graxo sintase II) que converte os ácidos graxos insaturados em saturados na via de biossíntese de ácido micólico (Vilchère *et al.*, 2000). Os ácidos micólicos são peculiares das micobactérias e isso explica o alto grau de seletividade da atividade bacteriana à isoniazida (Brunton, Lazo e Parker, 2012). Outro mecanismo de ação é a inibição da *katG* micobacteriana, deixando-a mais susceptível à lesão por espécies reativas de oxigênio e  $H_2O_2$  (Brunton, Lazo e Parker, 2012).

Os mecanismos de resistência à INH consistem: em mutações na *katG*, que impedem a conversão em seu metabólito ativo e diminuem sua atividade (Blanchard, 1996) e mutações nos genes *inhA* e *KasA*, genes micobacterianos envolvidos na biossíntese do ácido micólico, e mutações na NADH desidrogenase (Banerjee *et al.*, 1994; Miesel *et al.*, 1998).

A pirazinamida é um quimioterápico derivado da pirazina, com efeito bactericida, empregado como medicamento alternativo ou de segunda escolha para acompanhar em casos de resistência ou intolerância à isoniazida, rifampicina e/ou etambutol. Sua ação é melhor em meio ácido (lesões caseosas cavitárias) e intracelularmente nos macrófagos, contra bactérias de crescimento lento. Seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido, mas o alvo parece ser o gene da ácido

graxo sintase I de micobactéria, também envolvido na biossíntese do ácido micólico (Zimhony *et al.*, 2000).

Já o etambutol, específico para micobactéria, atua inibindo a arabinosil transferase III, interrompendo, dessa forma, a transferência da arabinose necessária para a biossíntese do arabinogalactano, acarretando um desarranjo na estrutura da parede celular micobacteriana, levando a um aumento da mesma. Esse fármaco suprime o crescimento da maioria dos bacilos da tuberculose resistente à isoniazida (Brunton, Lazo e Parker, 2012). A resistência bacteriana ao fármaco desenvolve-se através de mutações de aminoácidos isolados no gene *embA*, quando o medicamento é administrado na ausência de outros agentes efetivos (Belanger *et al.*, 1996).

Em 28 de dezembro de 2012, o FDA (*Food and Drug Administration*), Agência Reguladora dos Estados Unidos, aprovou o uso de bedaquilina, um novo agente terapêutico para o tratamento de adultos com tuberculose resistente aos medicamentos comumente usados. Especificamente, o uso de bedaquilina deve ser reservado a pacientes para os quais os regimes de tratamento disponíveis não são efetivos. Essa restrição favoreceu a aprovação acelerada do FDA, pois a aprovação da bedaquilina foi concedida com base em dados de eficácia e segurança de estudos de Fase II (OMS, 2012).

A atuação da bedaquilina é através da inibição da ATP sintase, uma enzima essencial para a geração de energia para o Mtb (Andries *et al.*, 2005; Haagsma *et al.*, 2011). O fármaco liga-se à subunidade oligomérica e proteolipídica C da bomba de prótons da ATP sintase micobacteriana e mimetiza um resíduo básico conservado na cadeia de transferência de prótons, a arginina 186. Subsequentemente, mudanças conformacionais ocorrem na ATP sintase micobacteriana, bloqueando o movimento de rotação da subunidade C, necessário para o fluxo de prótons. Assim, como a micobactéria é um organismo que vive em estados de baixa energia, uma maior escassez ATP resulta em um método eficaz do antimicobacteriano (Haagsma *et al.*, 2011).

A TB quando tratada com a associação medicamentosa adequada e o tempo recomendado é 100% curável (nos casos novos da doença sensíveis aos medicamentos anti-TB). Seguir corretamente esses princípios básicos e ter o acompanhamento por

profissional de saúde impede a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos e, assim, assegura a cura do paciente. O esclarecimento da doença e do tratamento para o paciente é fundamental para o sucesso terapêutico, enfatizando a importância da regularidade do uso dos medicamentos e as consequências da sua interrupção ou abandono, a fim de estabelecer uma relação de cooperação mútua (Brasil, 2011).

Segundo o Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil, devem-se levar em conta três princípios para a escolha do melhor esquema de tratamento: ter atividade bactericida precoce, ser capaz de prevenir a emergência de bacilos resistentes e ter atividade esterilizante. Os medicamentos que seguem o primeiro princípio, com maior atividade bactericida precoce são a isoniazida, estreptomicina e a rifampicina. Já, para a prevenção de bacilos de resistentes é necessário a utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos anti-TB simultaneamente. A atividade esterilizante está relacionada a adequada esterilização da lesão que impede a recidiva da tuberculose após o tratamento (Brasil, 2011).

A única vacina utilizada atualmente é a cepa de *M. bovis* atenuada (bacilo Calmette-Guérin - BCG) e tem sido inconsistente na proteção contra a doença, com baixa ou imensurável eficácia em muitas regiões com aumento de casos diagnosticados (Colditz *et al.*, 1994; Dye *et al.*, 1999; Corbett *et al.*, 2003). Além disso, o BCG pode causar grave e disseminada infecção em crianças HIV-positivas, restringindo seu uso em áreas com alta prevalência de TB (Hesseling *et al.*, 2007). Modelos animais de TB também demonstram que a vacinação com BCG induz imunidade parcial contra *M. tuberculosis*, mas não o controle completo ou a remoção da infecção (Hinchev *et al.*, 2007). Assim, novas vacinas para tuberculose mais seguras e mais eficazes são necessárias (Orme, 2006; Skeiky e Sadoff, 2006; Sander *et al.*, 2009).

### **Resistência Bacteriana**

A resistência do *M. tuberculosis* às drogas antituberculose é provavelmente o resultado de um evento genético espontâneo (Rüsch-Gerdes, 1999). A probabilidade de mutações espontâneas à isoniazida e rifampicina são  $3,5 \times 10^{-6}$  e  $3,1 \times 10^{-8}$ ,

respectivamente (Johnson *et al.*, 2006). Como as cavidades pulmonares muitas vezes contêm altas cargas bacterianas ( $10^7$ - $10^9$  organismos) existe uma preocupação com mutações espontâneas duplas. No entanto, como o locus cromossomal responsável pela resistência não estão ligados, o risco de mutações espontâneas duplas a isoniazida e rifampicina é bastante baixo ( $9 \times 10^{-14}$ ) (Pfyffer, 2000). Isolados de tuberculose MDR podem surgir através de acumulações sequenciais de mutações em genes-alvo para antibióticos específicos, devido aos níveis subterapêuticos dos fármacos, como de erros de tratamento ou a baixa adesão.

A resistência aos agentes de primeira linha tem sido associada a mutações em pelo menos 10 genes (Zhang e Young, 1994; Pfyffer, 2000; Zignol *et al.*, 2006). A transferência destas mutações resistentes de um agente para outro tem sido demonstrado através da evolução de dois subclones estreitamente relacionados de tuberculose MDR, W e W1, responsáveis pela doença generalizada em Nova York e em outros lugares (Ramaswamy e Musser, 1998). A terapia longa com múltiplos fármacos tuberculostáticos é necessária, devido à localização intracelular e do crescimento lento de *M. tuberculosis*, e a diminuição da probabilidade de uma mutação resistente a persistir durante a terapia de combinação (Connolly, Edelstein e Ramakrishnan, 2007); (Caminero *et al.*, 2010).

A resistência aos medicamentos pode ser classificada em diversos tipos (Brasil, 2011):

- Monorresistência – resistência a um fármaco antiTB.
- Polirresistência – resistência a dois ou mais fármacos antituberculose, exceto à associação rifampicina e isoniazida.
- Multirresistência – resistência a pelo menos rifampicina e isoniazida – MDR.
- Resistência extensiva (XDR) – resistência à rifampicina e isoniazida acrescida à resistência a uma fluoroquinolona e a um injetável de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina).
- Resistência natural – surge naturalmente no processo de multiplicação do bacilo.
- Resistência primária – observado em pacientes que não foram tratados para TB, contaminados por bacilos previamente resistentes.

- Resistência adquirida ou secundária – verifica-se em pacientes com tuberculose inicialmente sensível, que se tornam resistentes após a exposição aos fármacos.

A causa para a maioria dos casos de multirresistência no mundo está relacionada a tratamentos irregulares e desistência. No Brasil, 96% dos casos de resistência notificados são adquiridos dessa forma, sendo que mais da metade tem um histórico de três ou mais tratamentos prévios para TB (Brasil, 2007). Nesses casos, o tratamento é realizado com uso de medicamentos injetáveis e de fármacos de reserva, com duração de 18 a 24 meses, apresentando eficiência de aproximadamente 60% (Brasil, 2011).

Com o exposto, a identificação e caracterização de novos alvos de drogas para o desenvolvimento de potenciais fármacos é necessária para o tratamento eficaz da tuberculose devido ao aumento da incidência da condição de resistência aos medicamentos utilizados no seu tratamento.

Dentre os potenciais alvos quimioterápicos estão incluídas as proteases. Essa classe especializada de enzima é utilizada por patógenos em diversas funções, incluindo a invasão de células hospedeiras e tecidos, a degradação de mediadores da resposta imune e na hidrólise de proteínas do hospedeiro para fins nutricionais (Klemba e Goldberg, 2002). As proteases são importantes em todos os sistemas biológicos. Eventos proteolíticos são essenciais na ovulação, fertilização, desenvolvimento embrionário, formação óssea, apresentação de antígenos, regulação do ciclo celular, cicatrização de feridas, angiogênese, apoptose e muitos outros. Alterações na estrutura e padrões de expressão de proteases acarretam muitos processos patológicos em humanos, incluindo câncer, artrite, osteoporose, moléstias neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Puente *et al.*, 2003).

## **Proteases**

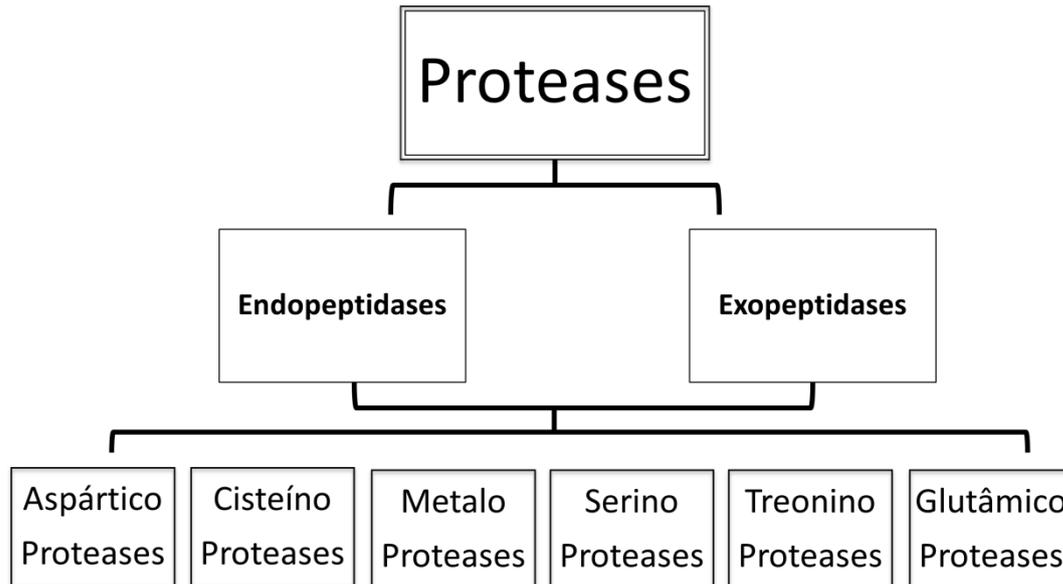
Proteases ou peptidases são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas presentes em proteínas ou fragmentos protéicos. As enzimas proteolíticas estão presentes em todos os sistemas biológicos, desde vírus até os eucariotos superiores. Elas são essenciais para a homeostase celular e desempenham um papel fundamental

na regulação de diversos processos biológicos como digestão, coagulação sanguínea, processamento hormonal, processamento de precursores relacionados à síntese de colágeno, renovação proteica, morte celular programada, e outros processos biológicos (Barrett e Rawlings, 2001).

As peptidases são usadas em uma grande variedade de aplicações, entre elas extensivamente na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de medicamentos, produzidas em pequenas quantidades e exigindo extensa purificação antes de serem utilizadas (Rao *et al.*, 1998).

As proteases podem ser classificadas de acordo com o local da hidrólise do substrato podendo ser endopeptidases quando as ligações peptídicas internas são clivadas ou exopeptidases, quando os resíduos de aminoácidos das extremidades da porção carboxi- ou amino-terminal são hidrolisados. Esta última ainda pode ser subdividida em carboxipeptidases e aminopeptidases, respectivamente (Barrett e McDonald, 1986). Contudo, existem proteases que possuem tanto atividade exopeptídica quanto endopeptídica (Barrett e McDonald, 1986).

De acordo com a *Enzyme Commission*, as enzimas são divididas em seis classes: Oxidoreduases, Transferases, Hidrolases, Liasas, Isomerases e Ligases. As peptidases são classificadas como Hidrolases. Em 1986, Barrett e McDonald apresentaram um sistema de classificação para as enzimas proteolíticas de acordo com o mecanismo catalítico da proteína e sua susceptibilidade a determinados inibidores. As classes propostas foram: aspártico-, cisteíno-, metalo- e serino-protease. Mais recentemente duas classes foram incluídas: treonino- e glutâmico-protease (Fig. 3). Essas diferentes classes podem ainda ser divididas em famílias com base na comparação de sequência de aminoácidos, e estas famílias podem ser montadas em clãs de acordo com suas estruturas tridimensionais (Rawlings *et al.*, 2008). Neste sistema de classificação, o MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), as peptidases são identificadas, classificadas e distribuídas de forma hierárquica em clãs e famílias, baseado na relação evolutiva e na estrutura das enzimas. Cada peptidase possui um código identificador que começa com uma letra indicadora do tipo catalítico da peptidase (A: aspártico, C: cisteíno, M: metalo, S: serino, T: treonino, U: desconhecido ou P: mais de um dos tipos T, C e S) (Rawlings e Barrett, 1993; Rawlings, Barrett e Bateman, 2010).



**Figura 3. Esquema de classificação das proteases.** O diagrama representa a classificação pela localização e mecanismo de ação catalítica, dividido em seis classes de proteases descritas até o momento.

**Aspártico-proteases** - as enzimas desta classe atuam sobre ligações peptídicas flanqueadas por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. O sítio ativo é, normalmente, formado por um par de resíduos de ácido aspártico e apresentam melhor atividade em pH ácido. Em regra, as aspártico-proteases são sintetizadas como zimogênio que são posteriormente convertidos em enzimas ativas por remoção de um peptídeo no N-terminal que bloqueia a fenda do sítio catalítico (Khan e James, 1998).

**Cisteíno-proteases** - formam um grupo de enzimas que contém um resíduo de cisteína localizado no sítio ativo, que é composto normalmente pela tríade catalítica Cys-His-Asn. Em geral, elas estão localizadas no citossol ou em compartimentos lisossomais de diversos tecidos de animais, plantas e microrganismos. Muitas cisteíno-proteases são sintetizadas como precursores que contêm um pró-domínio e um domínio maduro (com função catalítica). Essa pró-região possui funções independentes incluindo: chaperona intramolecular, inibidor endógeno da atividade proteolítica da enzima e, em alguns casos, um sinal que endereça a protease ao seu

destino intracelular (Sajid e Mckerrow, 2002). Essa classe de enzimas proteolíticas é fortemente inibida por p-cloromercuriobenzoato (pCMB) e L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano (E-64), além de outros agentes tais como iodoacetamida, leupeptina, cistatina e quimostatina (Bond e Butler, 1987). Nosso grupo identificou uma enzima pertencente a essa classe, a catepsina B, que é expressa nas três formas do *Trypanosoma cruzi* com localização no lisossomo. Sua função parece estar relacionada à nutrição do parasito uma vez que hidrolisa substratos não relacionados como BSA, colágeno do tipo I, gelatina, fibrinogênio e IgG desnaturada (Garcia *et al.*, 1998). Além disso, a superexpressão do seu gene na forma epimastigosta do parasito causou um aumento na taxa de replicação e metaciclogênese do parasito (Nóbrega, 2001).

**Metalo-proteases** – essa classe é caracterizada pela necessidade de cátions divalentes presentes no sítio ativo com a função de direcionar a ligação peptídica a ser clivada e estabilizar a própria proteína. Geralmente, o íon zinco é o mais comum, mas outros íons metálicos como cobalto, magnésio, cálcio e níquel podem aparecer substituindo o zinco sem que a enzima perca sua atividade enzimática. As famílias das metalo-peptidases estão agrupadas em diferentes clãs baseado na natureza do aminoácido que completa o sítio de ligação ao metal. Elas apresentam uma grande diversidade de sequências e estruturas, e são sensíveis a agentes quelantes a íons divalentes tais como 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA (Bond e Butler, 1987). Uma enzima já caracterizada pelo nosso grupo que pertence a esta classe é a Leucil-aminopeptidase de *T. cruzi* (LAPTc), classificada como membro da família M17. A enzima foi caracterizada bioquimicamente e foi observado a sua expressão em todas as formas do parasito, além disso, foi identificado a sua localização no interior de vesículas no citoplasma do mesmo. Como as vias de aminoácidos essenciais, incluindo leucina, estão desprovidas em *T. cruzi*, a LAPTc poderia ter uma função relacionada ao suprimento nutricional (Cadavid-Restrepo *et al.*, 2011).

**Treonino-proteases** - Foram primeiramente descritas como parte do proteassoma de *Thermoplasma acidophilum* (Seemüller *et al.*, 1995). Essa classe representa um elemento essencial na via ubiquitina-proteassoma, que é a principal

cascata intracelular de degradação controlada de proteínas (Mitsiades *et al.*, 2006). O mecanismo catalítico dos membros desta classe parece funcionar com um resíduo de treonina N-terminal participando como um nucleófilo no ataque ao grupo carbonil da ligação peptídica. Até o momento não se conhece nenhum inibidor natural da enzima devido à recente classificação desse grupo. As enzimas pertencentes a essa classe estão envolvidas em processos celulares fundamentais, tais como progressão do ciclo celular, divisão celular, desenvolvimento, diferenciação e apoptose (Wang e Maldonado, 2006).

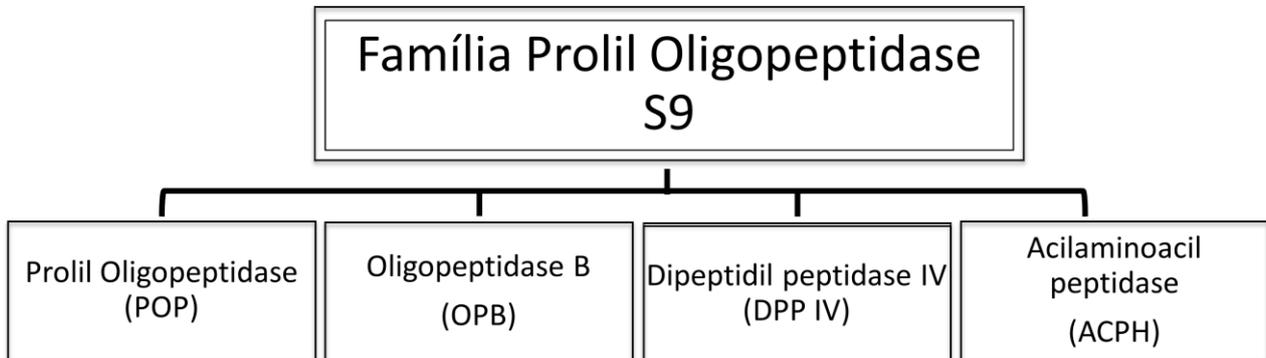
**Glutâmico-proteases** - Esta classe enzimática, recentemente descrita, é formada por duas famílias, a G1 e a G2. Seu mecanismo hidrolítico possui uma díade catalítica composta por um resíduo de glutamato e outro de glutamina, onde o glutamato ativa uma molécula de água nucleofílica enquanto a glutamina estabiliza um intermediário tetraédrico formado na via hidrolítica. Além disso, a atividade catalítica das enzimas pertencentes a essa classe parece iniciar-se com a ativação do resíduo de ácido aspártico. A atividade enzimática deste grupo de peptidases é potencialmente inibida pelo composto 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano (EPNP) (Fujinaga *et al.*, 2004).

**Serino-proteases** - A classe das serino-peptidases, a mais estudada entre todas as classes de proteases, é caracterizada por conter um resíduo de serina no sítio ativo de suas enzimas. O mecanismo catalítico destas peptidases inicia-se com o ataque nucleofílico de ligações peptídicas pelo resíduo de serina. Esse resíduo de aminoácido possui uma hidroxila que participa da reação de catálise e ligação ao substrato. A tríade catalítica característica das serino-peptidases é formada pelas cadeias laterais dos resíduos de Ser-His-Asp. As maiores famílias desta classe são a S1, a S8 e a S9, representadas pela quimotripsina, subtilisina e prolil oligopeptidase, respectivamente. Elas apresentam atividade máxima em ambientes com pH entre neutro e levemente alcalino e são inibidas por Diisopropilfluorofosfato (DFP). Muitas apresentam sensibilidade a Fenilmetilsulfonyl fluoreto (PMSF), aprotinina, n- $\alpha$ -Tosil-L-Lisina clorometil cetona (TLCK) e n- $\alpha$ -Tosil-L-Fenilalanina clorometil cetona (TPCK) (Bond e Butler, 1987). Essa classe de proteases é encontrada em eucarioto, procariotos,

arquéias e vírus. Participam de muitos processos fisiológicos importantes como digestão (tripsina, quimotripsina), repostas imunológicas (fatores do complemento), coagulação sanguínea (fatores VIIa, IXa, Xa e XIIa) e reprodução (acrosina) (Polgár, 2005). A família S1 é formada por enzimas proteolíticas envolvidas nos processos digestivos de mamíferos, como a tripsina, a quimotripsina e a elastase. Outras enzimas que participam da cascata de coagulação sanguínea e do sistema complemento estão incluídas nesta família (Barrett e Rawlings, 1995). A família S8 é composta por enzimas bacterianas, como a subtilisina, e por peptidases relacionadas encontradas em fungos, plantas e animais (Barrett e Rawlings, 1995). Elas têm papel no processamento de peptídeos sinalizadores como os hormônios adrenocorticotrópicos humanos (Rawlings, Polgar e Barrett, 1991). A determinação da estrutura tridimensional da quimotripsina, a primeira estrutura resolvida de uma peptidase, permitiu um conhecimento melhor do mecanismo catalítico dessa classe (Matthews *et al.*, 1977). Uma representante da família S9, a família Prolil Oligopeptidase, é o alvo de estudo dessa tese e a sua descrição será apresentada a seguir.

### **Família Prolil Oligopeptidase (S9)**

A família POP é amplamente distribuída nos organismos, abrangendo desde espécies de bactérias e arquéias até os seres humanos (Myohanen *et al.*, 2009; Venalainen *et al.*, 2004). Foi primeiramente descrita em 1991, baseada na homologia da sequência de aminoácidos da prolil oligopeptidase (POP), dipeptidil peptidase IV (DPP IV) e acilaminocil peptidase (ACPH), todos membros desta família (Rawlings, Polgar e Barrett, 1991). O quarto membro da família foi adicionado quando a sequência de aminoácidos da oligopeptidase B (OPB) foi determinada (Kanatani *et al.*, 1991) (Fig. 4). O grupo da família das prolil oligopeptidases chamado de família S9 foi agrupado, juntamente com outros representantes, ao clã de serino-carboxipeptidase (SC) (Rawlings e Barrett, 1994).



**Figura 4. Representação dos membros da família Prolil Oligopeptidase.** O diagrama mostra as enzimas pertencentes a família Prolil Oligopeptidase, a prolil oligopeptidase propriamente dita o alvo de estudo desta tese .

A homologia entre as sequências de aminoácidos das quatro peptidases pertencentes à família é baixa apresentando distintas especificidades, mas possuem uma estrutura tridimensional bastante conservada e similar (Polgár, 2002) com dois domínios: um  $\alpha/\beta$  hidrolase e um  $\beta$ -propeller (Polgár, 1992).

A POP e OPB são endopeptidases encontradas no citosol, já a ACPH e DPP IV são exopeptidases, sendo a primeira uma peptidase citoplasmática e a outra associada à membrana. A tríade catalítica Ser-Asp-His está concentrada na porção C-terminal com aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos. A homologia entre as sequências das enzimas dessa família é mais significativa nesta porção C-terminal do que na N-terminal (Polgár, 2002).

A POP hidrolisa peptídeos do lado carboxílico de resíduos de prolina, a DPPIV libera dipeptídeos nos quais o último aminoácido é também uma prolina, OPB cliva peptídeos após lisina e arginina e ACPH remove aminoácidos N-acetilados de peptídeos bloqueados (Venäläinen *et al.*, 2006). A propriedade mais notável dos membros da família POP é a sua seletividade a substratos, que é limitada a

oligopeptídeos compreendendo não mais do que aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos (Polgár, 2002). No entanto, nosso grupo já mostrou que a POP de *Trypanosoma cruzi* (POPTc80) e a ortóloga de *T. brucei* é capaz de clivar colágeno humano do tipo I e IV (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2010).

### ***Prolil Oligopeptidase (POP)***

Essa enzima foi nomeada como uma enzima que “cliva pós-prolina” porque hidrolisa a ligação peptídica preferencialmente do lado carboxílico de resíduos de prolina (Koida e Walter, 1976). A suposta seletividade por oligopeptídeos foi descoberta na década de 70 (Camargo, Caldo e Reis, 1979), por isso, o nome de prolil endopeptidase recomendado, inicialmente, foi modificado para prolil oligopeptidase para dar ênfase à característica especial desta enzima (Barrett e Rawlings, 1992). A POP foi primeiramente descrita no útero humano como uma enzima degradadora de oxitocina (Walter *et al.*, 1971) e está presente na maioria dos organismos e tecidos. Estudos identificaram-na em diferentes espécies, como exemplo, em cérebro de porco (Rennex *et al.*, 1991), *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto *et al.*, 1991; Chevallier *et al.*, 1992; Diefenthal *et al.*, 1993), linfócitos humanos (Shirasawa, Osawa e Hirashima, 1994; Vanhoof *et al.*, 1994), cérebro de rato (Ishino *et al.*, 1998) e boi (Yoshimoto *et al.*, 1997), *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2010).

As POPs, com relação à especificidade para substratos, clivam ligações peptídicas do lado C-terminal de resíduos prolina do tipo Pro-X, onde X é qualquer grupo amino, com exceção de prolina. Esta enzima é incapaz de clivar Pro-X se prolina ocupar a posição N-terminal na cadeia peptídica, mesmo se este estiver bloqueado (Yoshimoto *et al.*, 1978). Outra hidrólise possível desempenhada pelas POPs é a de substratos contendo alanina no lugar de prolina, porém, esta atividade enzimática é consideravelmente menor (Yoshimoto *et al.*, 1978).

A prolil oligopeptidase pode representar a concentração mais elevada entre as peptidases do cérebro e, portanto, pode estar relacionada a uma variedade de distúrbios do sistema nervoso central (Polgár, 2002). Dentro deste contexto, já foi mostrado que a POP está envolvida no metabolismo de peptídeos hormonais e

neuropeptídeos, o que a correlaciona com distúrbios neurológicos como depressão, mania, esquizofrenia, ansiedade nervosa, anorexia e bulimia (Maes *et al.*, 1995; Maes *et al.*, 1998; Maes *et al.*, 2001).

O uso de lítio para o tratamento da depressão parece estar envolvido na transdução de sinais que envolvem inositol (1,4,5)-trifosfato, mecanismo biosintético que parece estar regulado pela prolil oligopeptidase. Baixos níveis de atividade de POP parecem causar efeitos neurotróficos pelo aumento de inositol (1,4,5)-trifosfato na célula, e esse processo é revertido pelo tratamento com lítio (Williams *et al.*, 1999; Williams e Harwood, 2000). POP também tem função na regulação da pressão arterial através da participação do sistema renina-angiotensina pelo metabolismo da bradicinina e angiotensinas I e II (Welches, Brosnihan e Ferrario, 1993).

Inibidores específicos de POP revelaram um novo papel fisiológico da enzima. O primeiro inibidor eficaz, benziloxycarbonil-pro-prolinal (Z-Pro-Prolinal) (Wilk e Orlowski, 1983), mostrou inverter a amnésia induzida pela escopolamina em ratos (Yoshimoto *et al.*, 1987) que foi confirmado por uma série de estudos que utilizam vários inibidores (Atack *et al.*, 1991; Miura, Shibata e Watanabe, 1995; Portevin *et al.*, 1996; De Nanteuil, Portevin e Lepagnol, 1998; G., B. e J., 1998). Estes inibidores são descritos como potenciadores cognitivos, e alguns (Ono-1603, JTP-4819 e S-17092-1) estão sendo testados em ensaios clínicos (Cacabelos *et al.*, 2000).

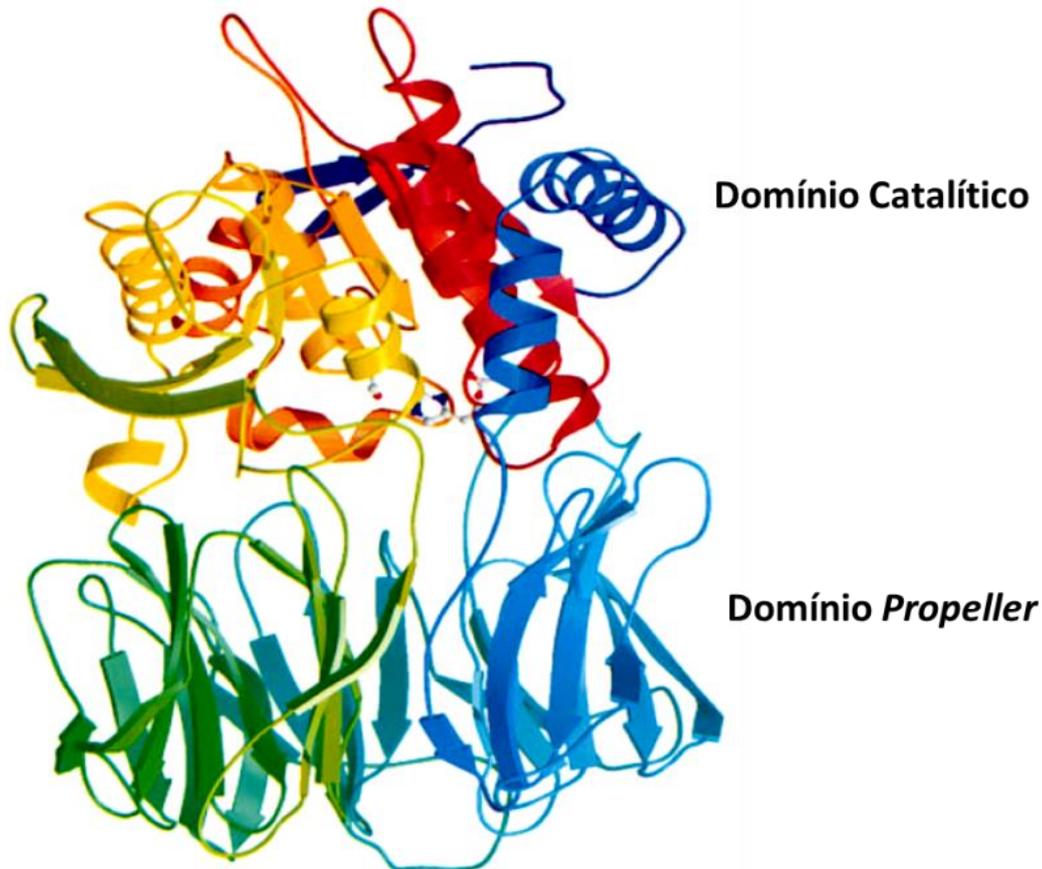
Já, inibidores clássicos de serino-protease como PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto) provocam pouco ou nenhum efeito na atividade da POP (Yoshimoto *et al.*, 1987; Santana *et al.*, 1997). No entanto, estas enzimas são completamente inibidas por diisopropilfluorofosfato (DFP). Compostos contendo clorometil cetona como N- $\alpha$ -Tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) e N- $\alpha$ -Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) alquilam resíduos de histidinas do sítio ativo constituindo-se inibidores eficazes dessas proteases (Yoshimoto *et al.*, 1987; Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2010).

Com relação a aspectos estruturais, a POP é uma proteína de cadeia simples com uma massa molecular de cerca de três vezes maior do que a tripsina ou subtilisina. Após a clonagem do cDNA da enzima do cérebro de porco (Rennex *et al.*, 1991), a massa molecular de 80,751 Da foi deduzida a partir da sequência de 710 resíduos de aminoácidos. O domínio catalítico  $\alpha/\beta$  hidrolase desta molécula está

localizado na porção carboxi-terminal da sequência de aminoácido. O sítio ativo com serina e histidina foi identificado nas posições Ser554 (Rennex *et al.*, 1991) e His680 (Stone *et al.*, 1991), respectivamente, na enzima do cérebro de porco. Esta ordem dos resíduos catalíticos é o inverso do que a encontrada com as sequências de aminoácidos de tripsina e subtilisina, mas corresponde a algumas sequências de lipases (Polgár, 2002). A relação estrutural entre as lipases e o domínio catalítico de prolil oligopeptidases foi observada pela topologia semelhante dos grupos catalíticos e pela seqüências de aminoácidos homólogas em torno destes resíduos (Polgár, 1992). A comparação das seqüências de lipases e prolil oligopeptidases sugeriu que o terceiro membro da tríade catalítica seria o Asp641 (Polgár, 1992).

Informações estruturais importantes da enzima foram obtidas após estrutura cristalográfica com 1,4 Å de resolução da POP com ou sem o inibidor Z-Pro-Prolinal (código do *Protein data bank* - 1qfm e 1qfs) (Fülöp, Böcskei e Polgár, 1998). A enzima tem uma forma cilíndrica com uma altura aproximada de 60 Å e diâmetro de 50 Å, e possui dois domínios: o catalítico e o propeller (Fig. 5). O domínio catalítico é constituído por resíduos 1-72 e 428-710, e os resíduos entre estas duas porções constitui o domínio propeller. O domínio catalítico tem o arranjo clássico de  $\alpha/\beta$  hidrolase, formado pela porção N- e C-terminal da enzima.

Em geral, domínios  $\beta$ -propellers são constituídos por folhas  $\beta$  antiparalelas que se dispõem em forma de pás de hélice (em média de 4 a 8) estabilizadas por um “velcro” (Fülöp, Böcskei e Polgár, 1998). O domínio  $\beta$ -propeller é conectado ao domínio catalítico de prolil oligopeptidase pelas duas principais cadeias de polipeptídeos de ligação, constituídas de ligações de hidrogênio e pontes de sal, mas, principalmente, com as forças hidrofóbicas (Polgár, 2002).



**Figura 5. Estrutura da Prolil oligopeptidase de porco.** Diagrama em fita da estrutura da POP suína, a cor vai da escala de azul para vermelho desde o N- para o C-terminal (PDB 1qfm). O domínio catalítico e *propeller* estão indicados. Os resíduos catalíticos são mostrados no domínio catalítico. Fonte: Adaptado de (Fülöp, Böcskei e Polgár, 1998).

### **Proteases em *M. tuberculosis***

*M. tuberculosis* possui mais de 100 genes que codificam proteases e há evidências crescentes de que as proteases podem ser bons alvos de drogas para Mtb, e para infecções bacterianas em geral (Roberts *et al.*, 2013). Algumas desempenham papel importante no desenvolvimento e progressão da doença. Alguns exemplos são: a LepB, a LspA, micosinas e ClpP (Frees *et al.*, 2007; Inobe e Matouschek, 2008).

A LepB é uma peptidase sinal do tipo I e desempenha um papel fundamental no processo de secreção de proteínas através da clivagem do peptídeo sinal na porção N-terminal que conduz à liberação da proteína madura (Paetzel *et al.*, 2002). Sua atividade é essencial para a viabilidade de todas as espécies bacterianas testadas,

incluindo *M. tuberculosis* (Ollinger, O'malley, Ahn, *et al.*, 2012; Ollinger, O'malley, Kesicki, *et al.*, 2012). Essa serino protease tem cinco regiões conservadas designadas caixas A-E (Paetzel *et al.*, 2002), que incluem um domínio de ancoragem transmembrânico da proteína na membrana citoplasmática, bem como um sítio ativo composto de uma díade catalítica com os resíduos Ser/Lys. A díade catalítica é exclusiva para LepB, em comparação com outras serino proteases, já que essa classe utiliza a tríade catalítica de Ser/His/Asp (Paetzel, Dalbey e Strynadka, 2000). LepB é considerada um alvo de drogas atraente por ser essencial para o crescimento bacteriano (Ollinger, O'malley, Ahn, *et al.*, 2012).

A inibição da atividade de LepB em Mtb utilizando MD-3, um conhecido inibidor da enzima (Barbosa *et al.*, 2002), leva à morte de bactérias replicantes, sugerindo que drogas que tenham como alvo essa enzima, provavelmente terão habilidade de reduzir a persistência e o tempo de terapia medicamentosa (Ollinger, O'malley, Ahn, *et al.*, 2012). Além disso, a reatividade cruzada com a LepB humana é limitada, devido a diferenças na estrutura, localização e mecanismo catalítico. Normalmente, as enzimas bacterianas são monômeros localizados na superfície da membrana citoplasmática com o sítio ativo voltado para o lado extracelular. Isso garante a relativa acessibilidade do sítio ativo a potenciais inibidores. Em contraste, LepBs eucarióticas são multiméricas com sítio ativo localizado no espaço da membrana interna mitocondrial ou no lúmen do retículo endoplasmático (Paetzel, Dalbey e Strynadka, 2000; Paetzel *et al.*, 2002). Sabe-se que inibidores clássicos de serino proteases não inibem a atividade de LepB (Black, Munn e Allsop, 1992), logo o uso de um inibidor específico não alteraria a atividade de outras enzimas da mesma classe (Roberts *et al.*, 2013), reforçando o papel da LepB como alvo de drogas.

Outra peptidase estudada em MTb é a LspA que medeia a clivagem de pré-proteínas permitindo o transporte através da membrana. LspA são proteases ligadas a membrana, e possuem o sítio ativo situado no lado extracelular da membrana citoplasmática, característica que os tornam acessíveis à pequenas moléculas de inibidores. Também apresentam cinco regiões conservadas e estão ausentes em células de eucariotos, sendo um bom alvo de estudo para o desenvolvimento de fármacos. Estudos mostraram que essa protease não é essencial para o crescimento da

micobactéria *in vitro*, além disso, em cepas mutantes para o gene que codifica esta enzima não foi observado nenhuma diferença na morfologia das colônias e nem na estrutura da parede celular (Sander *et al.*, 2004). Entretanto, a inativação de *lspA*, em *Mtb*, resultou em uma acentuada redução da replicação da micobactéria no pulmão e na sua incapacidade de disseminação para o baço em ratos. Além disso, os mutantes *lspA* apresentaram uma capacidade reduzida de replicação de *Mtb* em macrófagos de rato (Sander *et al.*, 2004). Como esse gene não possui ortólogo em humano, *LspA* pode ser um alvo para o desenvolvimento de drogas para combater a virulência da micobactéria (Roberts *et al.*, 2013).

As micosinas são serino proteases do tipo subtilisina símile que podem ser secretadas, estar associada a parede celular e pode estar presente na membrana citoplasmática. Elas possuem a tríade catalítica conservada Asp-His-Ser, típica dessa família (Brown *et al.*, 2000). Essas proteases são importantes para a virulência do *M. tuberculosis* (Ohol *et al.*, 2010). Por exemplo, *MycP1* é necessária para o crescimento em camundongos e a perda desta protease resulta em redução de virulência no modelo de infecção aguda, além disso, a perda da atividade proteolítica resulta em redução da virulência na fase crônica da infecção (Ohol *et al.*, 2010). O papel de *MycP1* na secreção é complexo, uma vez que a sua eliminação conduz a uma falta de secreção de substratos ESX-1, enquanto cepas mutantes que expressam *MycP3* inativa mostram aumento da secreção de substrato.

Dos membros pertencentes a essa classe, apenas *MycP3* é predito ser essencial para o crescimento de *M. tuberculosis*, sugerindo que não há nenhuma redundância na sua função, no entanto, esta característica ainda precisa ser melhor evidenciada (Brown *et al.*, 2000). Como as micosinas estão envolvidas no crescimento e na virulência do patógeno, e são altamente conservadas, elas poderiam ser um alvo de drogas simultâneo usando apenas um inibidor. Assim, as micosinas poderiam representar uma nova abordagem para o desenvolvimento de fármacos (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Entretanto, como nem todas as micosinas são essenciais para o crescimento da micobactéria pode ocorrer resistência pela regulação positiva da enzima redundante. Há homólogo de micosina I em humano, porém a identidade entre as proteínas é pequena e os sítios ativos não são conservados (Ohol *et al.*, 2010).

As Clp são serino proteases altamente conservadas presentes em várias espécies de bactéria, bem como em plantas e mamíferos. Elas participam do controle de qualidade de proteínas, degradando proteínas e agregados potencialmente tóxicos para a célula, o que contribui para a homeostase celular da proteína. A degradação dessas proteínas não-funcionais é útil para proteger a célula, mas também serve como um meio para reciclar eficientemente os recursos celulares que são limitados. Além disso, as Clp desempenham papel na regulação de vários processos por meio de proteólise controlada de proteínas reguladoras (Frees *et al.*, 2007; Inobe e Matouschek, 2008). *M. tuberculosis* tem duas subunidades de ClpP, ClpP1 e ClpP2, essenciais para o crescimento e a infecção (Ollinger, O'malley, Kesicki, *et al.*, 2012; Raju *et al.*, 2012).

Quando ClpP1 e ClpP2 foram expressas em *E. coli*, as proteínas foram enzimaticamente inativas (Ingvarsson *et al.*, 2007). A atividade proteolítica foi detectada apenas quando as duas proteínas de ClpP estavam presentes em conjunto com pequenas moléculas de ativação, sugerindo a formação de um complexo ativo misto para o desempenho da função (Benaroudj *et al.*, 2011; Akopian *et al.*, 2012). A expressão reduzida do complexo ClpP1-ClpP2 em Mtb teve como consequência a diminuição do crescimento e redução da virulência no modelo de infecção de macrófagos, confirmando ainda mais a importância de ClpP1 e ClpP2 para o crescimento e infecção pela micobactéria (Carroll, Faray-Kele e Parish, 2011).

### **Modelagem por Homologia e Dinâmica Molecular**

As proteínas desempenham diferentes funções biológicas e para entendê-las é importante o conhecimento de sua estrutura, pois se sabe que ela está intimamente relacionada com sua função. O *Protein Data Bank* (PDB), uma ferramenta de base de dados de estrutura de proteínas, foi estabelecido no Brookhaven National Laboratories – BNL em 1971, como um repositório para estruturas de cristais proteicos (Berman *et al.*, 2000) que contém as estruturas terciárias resolvidas até o momento. Hoje, estão armazenadas, não apenas estruturas resolvidas por difração de Raio-X, mas também estruturas preditas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Os métodos experimentais, como difração de Raios-X e espectroscopia de RMN, são utilizados para a determinação de novas estruturas protéicas, porém por serem técnicas com limitações, como a difícil obtenção das amostras em quantidades suficientes para os ensaios ou, mesmo após a obtenção, não possuírem a qualidade necessária para o trabalho experimental, nem sempre é possível a obtenção da estrutura terciária final (aproximadamente, apenas uma em cada vinte proteínas, produz cristais adequados para a resolução da estrutura 3D) (Maggio e Ramnarayan, 2001). Com isso, a utilização da modelagem molecular computacional se torna uma ferramenta alternativa para o estudo de estruturas de proteínas.

Para a determinação da estrutura protéica, a bioinformática possui diferentes métodos, entre eles os métodos físicos e os empíricos. O primeiro baseia-se nas interações entre os átomos que compõem a molécula e incluem métodos de modelagem molecular, como dinâmica molecular e minimização de energia. São as chamadas técnicas de primeiros princípios ou *Ab-initio*, ou seja, métodos que não possuam em suas equações parâmetros empíricos ou semi-empíricos (sendo derivados diretamente dos princípios teóricos, não incluindo dados experimentais). Já o segundo, é baseado em estruturas de proteínas que foram determinadas por métodos experimentais, ou seja, utiliza dados que são oriundos de experimentos e que estão armazenadas em banco de dados, por exemplo, no PDB (Berman *et al.*, 2000; Berman *et al.*, 2002).

A modelagem por homologia tem como base o princípio que a similaridade entre as estruturas primárias de proteínas homólogas sugere uma semelhança estrutural entre elas (Chothia e Lesk, 1986). Assim, estruturas de proteínas já determinadas experimentalmente são utilizadas como moldes para determinar a conformação de outra proteína, observando que o molde e a estrutura a ser predita devem ser similares na sua sequência de aminoácidos. Além disso, o grau de similaridade entre elas irá determinar a qualidade da nova estrutura determinada. A predição da nova estrutura geralmente envolve quatro etapas (Sánchez e Sali, 1997; Martí-Renom *et al.*, 2000):

1. identificação dos homólogos que podem ser utilizados como modelo para modelagem. O grau de identidade entre as estruturas primárias

das proteínas molde e modelo deve ser acima de 30% da sequência (D'Alfonso, Tramontano e Lahm, 2001).

2. o alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos, que tem como objetivo alinhar estruturalmente resíduos equivalentes levando em conta características estruturais comuns como elementos de estrutura secundária e resíduos catalíticos;
3. construção de um modelo para o alvo de interesse com base nas informações obtidas a partir do alinhamento previamente gerado (Vásquez, 1996; Sánchez e Sali, 1997).
4. otimização e validação do modelo. Nessa etapa deve-se avaliar a qualidade do empacotamento global da proteína, os possíveis erros estruturais e os parâmetros estereoquímicos (Johnson *et al.*, 1994).

Um método utilizado para contornar a falta de dados estruturais é a utilização de simulações de dinâmicas moleculares para amostrar os espaços conformacionais de uma proteína em solução. A dinâmica molecular (DM) consiste na solução das equações de movimento de Newton para um sistema de  $N$  átomos interagentes, ou seja, as moléculas são tratadas como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas. Simulações de DM fornecem informações detalhadas sobre as flutuações e mudanças conformacionais de proteínas e ácidos nucleicos (Sirota, Pascutti e Anteneodo, 2002).

Antes de se iniciar as simulações de DM, o sistema deve ser minimizado para extinguir os contatos inespecíficos entre os átomos. A minimização de energia é uma técnica que tem como objetivo descobrir um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema de interesse no estudo. Essa técnica consiste em caminhar sobre a superfície de potencial na direção em que a energia diminui, de forma que o sistema alcance o mínimo de energia local próximo. Utilizando modificações nas posições atômicas, as deformidades nas ligações químicas são relaxadas durante o processo nos contatos de van der Waals e nos ângulos entre as ligações. Com isso, o sistema que foi minimizado apresenta pequenas forças sobre cada átomo e pode, enfim ser usado como estrutura de partida para iniciar as

simulações de DM (Snow *et al.*, 2005). As etapas de uma simulação de DM constituem em: determinar conformação inicial das moléculas, calcular as forças desempenhadas sobre cada partícula devido às interações intermoleculares, circulação das partículas, condições (Ensembles) e controle da simulação, armazenamento das configurações obtidas (trajetória) e analisar a trajetória atômica obtida.

As equações são resolvidas simultaneamente em todos os passos da dinâmica, enquanto o sistema é mantido sob condições imutáveis de temperatura e pressão. As coordenadas dos átomos simulados são gravadas em intervalos regulares e, dadas em função do tempo, representam a trajetória do sistema. Ao longo da simulação, o sistema tem a tendência de evoluir para um estado de equilíbrio, não necessariamente o seu mínimo global de energia. Nesse estágio, as propriedades do sistema não se mantêm constantes. O período de equilíbrio é variável e depende do sistema em estudo. Geralmente, dá-se por finalizado quando se alcança o equilíbrio termodinâmico. A partir desse ponto, pode-se então gerar as trajetórias da DM e calcular as diferentes propriedades para o sistema de interesse. Por meio da análise dessa trajetória de equilíbrio, muitas propriedades macroscópicas podem ser extraídas dos arquivos de saída da DM (Van Der Spoel *et al.*, 2006).

Pelas simulações de DM pode-se entender o comportamento dinâmico de proteínas em diversas escalas de tempo, observando-se desde movimentos interiores rápidos, passando por alterações conformacionais lentas, e também a metodologia de envelhecimento de uma proteína (Snow *et al.*, 2005). Essa abordagem pode ser utilizada na predição funcional, identificação e validação de alvos terapêuticos, tema do interesse do nosso grupo de pesquisa, bem como na identificação e otimização de protótipos (Hillisch, Pineda e Hilgenfeld, 2004).

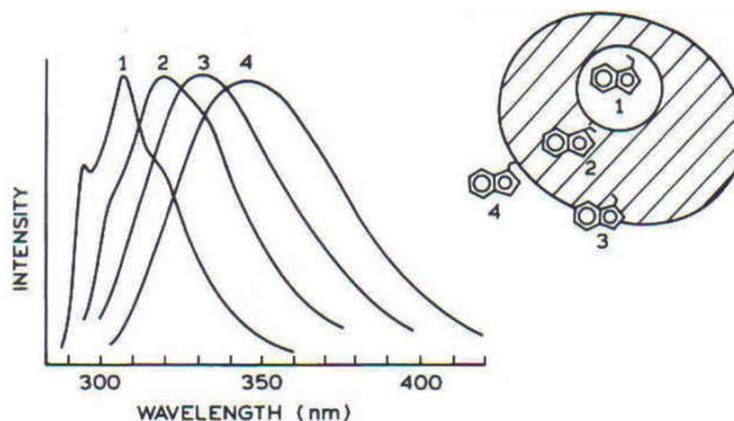
### **Fluorescência intrínseca e sua aplicação no estudo de proteínas**

A espectroscopia de fluorescência tem sido largamente explorada em estudos estruturais e funcionais de proteínas (Ammor, 2007). O fenômeno de fluorescência ocorre quando o fluoróforo absorve radiação UV e visível, passando para o estado de excitação eletrônica. Ele permanece excitado por alguns nano segundos, e depois libera a energia remanescente por meio da emissão de radiação eletromagnética, a

fluorescência. A intensidade da fluorescência de uma amostra depende da eficiência de absorção da luz emitida e da eficiência de emissão do fluoróforo excitado (Johnson, 2005). O sinal de fluorescência pode ser analisado de várias formas: intensidade, tempo de vida, energia (comprimento de onda) e liberdade rotacional (polarização e anisotropia) de forma a revelar diferentes aspectos estruturais da proteína de interesse.

A fluorescência intrínseca de proteínas é dependente da cadeia lateral de três resíduos de aminoácidos: fenilalanina, triptofano e tirosina. O triptofano é o fluoróforo mais abundante em proteínas e sua sensibilidade à polaridade e mobilidade do ambiente faz de sua fluorescência uma importante ferramenta em estudos de dinâmica e estrutura de proteína (Lakowicz, J e R, 2004).

A emissão máxima da proteína reflete a exposição dos seus triptofanos ao ambiente aquoso. Na molécula, quando o ambiente do triptofano é completamente apolar, o espectro de emissão esperado é mais próximo da faixa do azul (aproximadamente 320 nm). Com a mudança do triptofano para ambientes mais expostos ao solvente, a emissão muda para comprimentos de ondas maiores (Fig. 6). Ou seja, quanto mais o triptofano estiver enterrado na proteína o espectro de emissão será a um comprimento de onda no valor de 310 nm. Já se estiver mais exposto seu espectro será em aproximadamente 350 nm.



**Figura 6. Exemplos dos espectros de fluorescência do triptofano.** A figura ilustra os diferentes espectros de emissão do triptofano de acordo com sua localização na molécula (Lakowicz, 2004).



A observação da fluorescência é usada para acompanhar mudanças estruturais, desnaturação ou renaturação de proteínas sob influências de temperaturas, pH ou na presença de solutos como guanidina e uréia. Dependendo das modificações que essas condições causem na estrutura da proteína, o espectro do triptofano sofrerá deslocamentos, permitindo inferências sobre a conformação da proteína (Lakowicz, J e R, 2004).

# JUSTIFICATIVA

---

A Tuberculose é uma doença cujo controle enfrenta uma variedade de obstáculos como a ineficácia da vacina BCG e a aquisição de multirresistência das bactérias aos antibióticos utilizados atualmente na terapia (Dye *et al.*, 1999); (Colditz *et al.*, 1994). Com isso, surge a necessidade da descoberta de novos alvos de fármacos com a finalidade de inibir a progressão da doença e de sua resistência ao tratamento.

Devido a este cenário, nossa linha de pesquisa visa à identificação e caracterização de alvos potenciais para a quimioterapia da tuberculose. As proteases são o principal enfoque da nossa pesquisa, uma vez que participam de processos biológicos fundamentais para a viabilidade e virulência de patógenos (Klemba e Goldberg, 2002). As informações estruturais de uma enzima aliadas a sua função biológica podem nortear o desenho racional de pequenas moléculas específicas que bloqueiem sua atividade ou mesmo que desestabilizem a sua estrutura (Hillisch, Pineda e Hilgenfeld, 2004). Isso permite o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o combate de diversas doenças, não só da tuberculose.

O interesse em estudar a Prolil Oligopeptidase de *M. tuberculosis* deve-se ao fato do laboratório possuir uma vasta experiência no estudo dessa protease em *T. cruzi* e *T. brucei*. Em resultados obtidos até o momento, as duas enzimas mostram-se importantes na participação da infecção e/ou estabelecimento da doença pelos referidos parasitos (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2010). Além disso, como exposta na introdução, algumas proteases *M. tuberculosis* já foram estudadas e caracterizadas e mostraram-se relevantes para o estabelecimento da doença, justificando a importância de se caracterizar as proteases deste microrganismo e também estudar a função e participação das mesmas no desenvolvimento da doença.

# OBJETIVOS

---

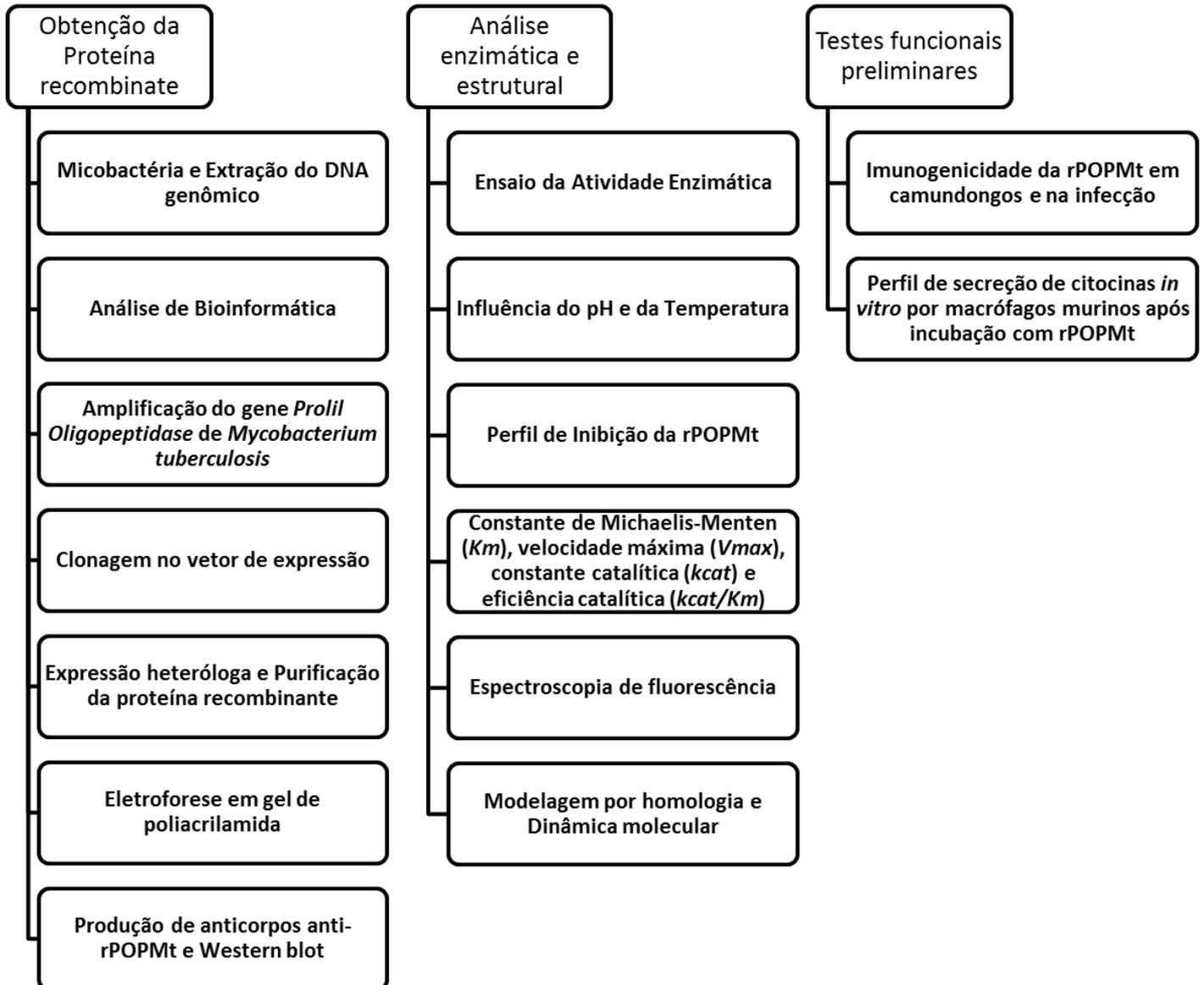
## Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi identificar e caracterizar uma protease de *M. tuberculosis* como possível alvo para a quimioterapia da tuberculose, favorecendo assim o desenvolvimento de alvos mais eficientes contra a doença. Como alvo para esse estudo, escolhemos caracterizar a Prolil oligopeptidase, uma serino-protease já descrita em outros patógenos e com função importante na infecção. Esse estudo poderá contribuir, futuramente, para o entendimento do papel que a POP desempenha na tuberculose.

Para tal, as seguintes etapas foram realizadas:

- Clonar o gene que codifica a prolil oligopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis* (POP<sub>Mt</sub>);
  - Expressar e purificar rPOP<sub>Mt</sub>;
  - Determinar as propriedades enzimáticas e os parâmetros cinéticos da enzima;
  - Conhecer o perfil da expressão da proteína em extrato total de Mt;
  - Estudar a imunogenicidade da rPOP<sub>Mt</sub> em camundongos;
  - Analisar a estrutura tridimensional da proteína por modelagem por homologia e dinâmica molecular;
  - Estudar o perfil de citocinas secretadas por macrófagos peritoneais de camundongos após estimulação com a proteína recombinante;

# MATERIAL E MÉTODOS



## **Micobactéria e Extração do DNA genômico**

O crescimento da *M. tuberculosis* H37Rv foi realizado em meio Difco™ Middlebrook 7H9 com glicerol (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) a uma OD600 de 0,5 a 37°C com leve agitação no Laboratório Central de Brasília (Lacen). As micobactérias foram tratadas com tampão TE e colocadas em banho de água em ebulição a 100 °C durante 10 min. Após, esse tempo foi realizada uma centrifugação de 3.000 rpm durante 10 min, a cultura foi coletada e foi adicionado tampão de lise (Tris 10 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,4 M e Triton X-100 a 0,5%) (pH 8,0) e 10 µl de proteinase K (10mg/ml) e a reação incubada a 56 °C durante 2-3 h. A purificação do DNA foi realizada por adição de um volume igual de fenol:clorofórmio (24:1) seguido por clorofórmio. À fase aquosa foram adicionados 2,5 volumes de etanol gelado e acetato de sódio, numa concentração final de 0,3 M para a precipitação do DNA. Os tubos foram conservados a -20 °C por 16h. A amostra foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sedimento contendo o DNA foi lavado com etanol 70% gelado. O sedimento foi deixado secar ao ar e, finalmente, suspenso em 25 µl de água Milli Q para análise por PCR (Amita *et al.*, 2002).

## **Análise de Bioinformática**

Os bancos de dados utilizados para a obtenção das sequências gênicas e protéicas da Prolil oligopeptidase foram: GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), ExpASY Proteomics Server (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>) e PDB ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)). As sequências peptídicas preditas após a tradução do gene foram alinhadas usando os programas BLAST, ClustalW e BioEdit.

## **Amplificação do gene *Prolil Oligopeptidase* de *Mycobacterium tuberculosis***

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base na sequência predita (GeneID: 886310) disponível no banco de dados de *M. tuberculosis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Foram adicionados os sítios de restrição para a enzima *Nde* I no oligonucleotídeo senso (5'- AGATTACATATGACATTTGAGCCTGCCC –

3'), com o sítio de restrição sublinhado e o códon de iniciação em negrito e *BamH* I no iniciador antisense (5' – GTTATAGGATCCTTAGCCGGCCAGCATCCG – 3') com o sítio de restrição sublinhado e o códon de terminação em negrito. Esses iniciadores foram utilizados para amplificar a fase aberta de leitura (ORF) predita para o gene *popmt* a partir do DNA genômico obtido como descrito anteriormente. O gene foi sequenciado nas duas direções e sua sequência foi avaliada em <http://www.ebi.ac.uk> com número de acesso EBMYCG00000003415.

Para amplificação do gene, a reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo, em concentrações finais, 100 ng de DNA genômico, 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 µM dNTPs, 200 nM de cada oligonucleotídeo, 0,2 µL de Pfx50™ DNA Polimerase (Invitrogen®) e tampão de reação diluído em água milliQ. O programa de amplificação foi: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a 54 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 2 min. Por fim, as reações foram estendidas por mais 7 min a 72 °C. O resultado da amplificação foi confirmado por eletroforese em gel de agarose.

### **Clonagem no vetor de expressão**

O produto amplificado correspondente ao gene *popmt* foi clonado diretamente no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) gerando o clone pCR®2.1-TOPO®+ *popmt* que foi transformado em células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5α.

Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (50 µg/mL), IPTG (100 mM) e X-Gal (25 mg/mL) e incubadas por 16 h a 37 °C. As colônias positivas presentes na placa foram coletadas e adicionadas em tubos contendo 4 mL de meio LB líquido e 50 µg/mL de ampicilina para a extração do DNA plasmidial em pequena escala. As colônias foram crescidas a 37 °C sob agitação constante, durante 16 h e uma alíquota de 1 mL da cultura foi estocada a 4 °C. Os 3 mL restantes foram centrifugados por 10 min a 5000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) e adicionados 200 µL do tampão de lise (0,2 N NaOH; SDS 1%), misturou-se por inversão e a reação foi deixada a temperatura ambiente por 5 min. Logo após, foram adicionados 150 µL de solução de neutralização (3 M Acetato de

potássio pH 4,8), misturou-se por inversão e os tubos foram deixados no gelo por 10 min. Após esse tempo, foi realizada uma centrifugação a 12.000 rpm por 20 min.

O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo e acrescentado 2 volumes de etanol 100% e novamente centrifugado por 20 min, 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70%, centrifugado como descrito anteriormente, descartado o sobrenadante e após a secagem, o sedimento foi ressuspenso com água milli-Q. Para a eliminação do RNA foi utilizado 0,1 mg/mL RNase-A por 15 min a 37°C. Assim, o DNA total dos possíveis clones foi obtido. O perfil das amostras foi analisado em gel de agarose 0,8%.

Após o resultado da extração do DNA plasmidial, o material extraído foi digerido com as enzimas *Nde* I e *Bam*H I (Invitrogen®), conforme instruções do fabricante, para a liberação dos insertos e confirmação da clonagem da ORF *popmt* no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®). As amostras digeridas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% e aquelas que apresentaram o inserto no tamanho correspondente ao gene (2200 pb) foram selecionadas e cultivadas para obtenção, agora em grande escala (midiprep), do plasmídeo pCR®2.1-TOPO®+ *popmt*. A midiprep foi realizada conforme protocolo fornecido pelo fabricante (PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit - Invitrogen™). Após extração do DNA plasmidial, o material foi novamente digerido com as enzimas de restrição descritas anteriormente, analisadas em gel de agarose 0,8% e a banda correspondente ao gene *popmt* foi excisada do gel e eluída (ilustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare) para clonagem no vetor de expressão de proteína.

O gene *popmt* purificado foi ligado ao vetor de expressão pET-28a(+) (Novagen®) previamente linearizado nos sítios de clonagem referentes as enzimas *Nde* I e *Bam*H I. A ligação do fragmento de DNA ao vetor foi realizada numa reação contendo T4 DNA ligase (Invitrogen®) e o processo foi realizado de acordo com as orientações do fabricante. A ligação foi utilizada para transformar *Escherichia coli* competentes da linhagem DH5α. As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio LB sólido com 50 µg/mL de canamicina e crescidas a 37 °C durante a noite. As placas foram submetidas à varredura por meio da coleta e crescimento das colônias em LB líquido com canamicina. O DNA plasmidial foi extraído

como citado anteriormente e as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8%. Após confirmação da clonagem por meio de reações de restrição enzimática e sequenciamento, o pET-28a(+) contendo *popmt* foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem BL21(DE3) para a expressão da proteína recombinante.

### **Expressão heteróloga e Purificação da proteína recombinante**

Para a expressão da proteína recombinante, o plasmídeo pET28a(+)-*popmt* foi transformado por choque térmico em células competentes *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) e plaqueada em meio LB sólido com canamicina. Para a indução, diferentes protocolos foram testados sempre com a variação da concentração do indutor isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG - 0,5; 0,1; 0,05 e 0,01 mM) e diferentes temperaturas (37, 30, 25 e 20°C). A indução com IPTG era iniciada quando a leitura da densidade óptica a 600 nm (OD600) era de 0,5. Após a introdução do indutor, a cultura crescia a temperaturas indicadas, 200 rpm por 5 h.

Após a indução, as culturas de bactérias foram centrifugadas por 20 min a 2500 g, o sobrenadante descartado e o sedimento de células foi ressuspenso em tampão de lise (*BugBuster® Protein Extraction Reagent* - Novagen®) e incubado a 37°C por 15 min. O produto de lise celular obtido foi centrifugado por 15 min a 12000 rpm, e as frações solúveis e insolúveis separadas e analisadas em SDS-PAGE 10%.

Para a purificação da proteína recombinante foi realizado a preparação do extrato total de proteínas utilizando cultura (células *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET-28a(+) – POPMt) induzida com 0,05 mM de IPTG 20°C por 16 h, definida como condição padrão de expressão da proteína na forma solúvel. Após a centrifugação da mesma, o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise (20 mM Tris pH 7,9; 500 mM NaCl; 0,2% lisozima), incubado a 37°C por 15 min e submetido a ciclos de sonicação. Os ciclos de sonicação foram realizados em um processador ultrassônico Vibra-Cell VC130 (Sonics) e consistiam em três ciclos, no gelo, com alternância de 2 min com pulso de 7 s de duração e com 10 W de potência. O intervalo de 1 min era realizado entre cada ciclo para evitar o aquecimento da amostra. Após o término, foi realizada a centrifugação do material a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

O sobrenadante (fração solúvel) foi adicionado à resina agarose-níquel com afinidade à histidina (His-Bind® Purification Kit, Novagen®), previamente equilibrada e carregada, com 3 volumes de água milli-Q, 5 volumes de NiSO<sub>4</sub> (Charge Buffer) e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (Binding Buffer – 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol). Após lavagem extensiva da resina, a enzima foi eluída com diferentes volumes de tampão de eluição (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl e imidazol variando de 60 mM a 400 mM). Para verificar a pureza e rendimento, as frações eluídas foram submetidas à análise por SDS-PAGE 10% sob condições desnaturantes e redutoras seguida por coloração em azul de coomassie. A concentração da proteína purificada foi determinada utilizando o coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) com valor de 148.6865 (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) a 280 nm diluída em água.

### **Eletroforese em gel de poliacrilamida**

As amostras foram analisadas em gel de acrilamida 10% sob condições desnaturantes e redutoras (SDS/PAGE). Para a aplicação das mesmas foi utilizado o tampão de amostra de proteína 5x (62,5 mM Tris HCl pH 6,8; SDS 2%;  $\beta$ -mercaptoetanol 5%; Azul de Bromofenol 0,08% e glicerol 30%) com fervura por 5 min. Para a eletroforese, foi utilizado o tampão de corrida 1x (25 mM Tris; 191 mM Glicina e SDS 0,1%). Após eletroforese, os géis foram corados com azul de Coomassie para a visualização das bandas e estimativa da massa molecular da proteína utilizando-se o marcador BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen®).

### **Produção de anticorpos anti-rPOPMT e Western blot**

Camundongos BALB/c machos foram imunizados duas vezes com 4  $\mu$ g de rPOPMT homogeneizadas em adjuvante incompleto de Freund na proporção de 1:1, com intervalo de 15 dias. A terceira e quarta imunizações foram realizadas com a mesma quantidade de proteína, porém diluída em solução salina. Após 10 dias da última imunização, o sangue dos animais foi coletado, o soro separado, diluído em glicerol (v/v) e estocado a -20°C.

POPMT purificada e/ou extrato solúvel e insolúvel de células BL21 (DE3) + POPMT-pET-28a(+) induzida foram submetidos à SDS-PAGE 10% para realização de um

western blot para confirmação da produção de anticorpos contra POPMt no soro dos camundongos imunizados. Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-C Extra*, Amersham, GE Healthcare) utilizando-se tampão de transferência 1X (25 mM Tris; 192 mM glicina; Metanol 20% e SDS 0,1%). Após a transferência, a membrana foi corada com *rouge ponceau* para simples conferência e, em seguida, incubada com PBS/leite 5% por 40 min à temperatura ambiente ou por 16 h a 4°C para bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida a membrana foi lavada três vezes com PBS por 5 min cada vez. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo anti-Histidina (1:1000) (Anti-Histidine -Tagged Protein Mouse mAb, Calbiochem®), para confirmação da expressão da proteína recombinante ou o anti-soro pré-imune e imune anti-rPOPMT (1:100), para confirmar a produção da anticorpos pelos camundongos. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS/leite 1% e incubados com a membrana por 2h a temperatura ambiente ou 16 h a 4°C. Em seguida, foram realizadas novamente as lavagens com PBS e, logo após, procedeu-se a incubação com o segundo anticorpo. Em todas as reações, foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (1:2000) (Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Alkaline Phosphatase Conjugate, Invitrogen®) por 2h à temperatura ambiente. A membrana foi lavada conforme descrito anteriormente e incubada com tampão para a fosfatase alcalina por 10 min e para revelação, a membrana foi incubada com os substratos NBT/BCIP (Nitro Blue Tetrazolina/5-bromo-4-cloro-3-indolil-1-fosfato) (Promega) segundo instruções do fabricante.

### **Ensaio da Atividade Enzimática**

A atividade enzimática da enzima recombinante POPMt foi medida por meio da liberação do 7-amido-4-metilcoumarin (AMC) pela hidrólise do substrato N- Succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC (N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC). A atividade foi realizada no tampão de reação (25 mM Tris pH 7,5) contendo 300 ng de rPOPMT, 20 µM do substrato fluorogênico para o volume final de 100 µL. A liberação do AMC foi medida sob excitação de 360 nm e emissão de 460 nm durante 20 min em placas de 96 poços no leitor de microplacas SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices) a 25 °C

como descrito por Grellier *et al* (Grellier *et al.*, 2001). Todos os experimentos foram feitos em triplicata e com três repetições independentes. A atividade da rPOPMT também foi realizada com outros substratos fluorogênicos: Ala-Ala-Phe-AMC, L-Proline-AMC hidrobromide, N-Succinyl-Ile-Ala-AMC, N-Succinyl-Leu-Tyr-AMC, N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-AMC, L-Leucine-AMC hydrochloride e N-Succinyl-Gly-Pro-AMC (N-Suc-Gly-Pro-AMC), todos provenientes da Sigma-Aldrich®. Diferentes concentrações de NaCl (0 a 400 mM) e DTT (0 a 20 mM) além de CaCl<sub>2</sub> (0 a 20 mM) e MgCl<sub>2</sub> (0 a 20 mM) foram usadas como aditivos com intuito de verificar a influencia dos mesmos na atividade enzimática da POPMt. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes de forma independente.

### **Influência do pH e da Temperatura**

Para avaliar o pH ótimo de atividade enzimática da protease, 300 ng de rPOPMT foram incubados no tampão AMT (100 mM de ácido acético, 100 mM de Mes e 200 mM de Tris-HCl) na faixa de pH 5 a 10 e 20 µM de substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC foram adicionados para 100 µL de volume final de reação (Bastos *et al.*, 2010). A leitura do AMC liberado foi realizada conforme descrita anteriormente e as velocidades das reações foram calculadas e comparadas entre si para obtenção do pH ótimo de funcionamento da enzima.

A temperatura na qual a enzima apresenta atividade máxima foi determinada medindo-se a fluorescência resultante da hidrólise de AMC por meio de ensaio *endpoint*, onde apenas a fluorescência final é considerada. O substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC foi adicionado a concentração final de 20 µM em 100 µL de tampão de reação Tris 25 mM pH 7,5 contendo 300 ng de enzima. As reações ocorreram em termociclador em diferentes temperaturas (20, 28, 37, 40, 45, 60 ou 80°C), durante 20 min cada, ao final dos quais foram interrompidas pela adição de 100 µL de etanol absoluto e a fluorescência acumulada foi medida no SpectraMax M5. O etanol não interfere na medida da fluorescência acumulada.

## Perfil de Inibição da rPOPMT

Foram utilizados inibidores clássicos de proteases para investigar o perfil de inibição da rPOPMT, entre eles: AEBSF, E-64 (L-trans-epoxysuccinylleucylamido-(4-guanidino) butane), EDTA, 1,10-Fenantrolina, Bestatina, Pepstatina A, Leupeptina, TPCK (N-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone) e TLCK (tosyl-lysylchloromethane) nas concentrações adequadas (0.01 a 100 nM). O ensaio consistiu em incubação de 300 ng de rPOPMT com cada inibidor em tampão de reação por 15 min a 25°C, após esse período, foram adicionados 20 μM do substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. A leitura da liberação do AMC foi realizada conforme descrita anteriormente.

O perfil de inibição utilizando um inibidor específico de prolil oligopeptidases, Z-Pro-Prolinal foi realizado para a determinação do IC<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% da atividade da enzima). A reação consistiu na adição de 300 ng de rPOPMT com diluição seriada do inibidor com concentração inicial de 5 μM em tampão de reação por 1h a 25°C, após esse período, foram adicionados 20 μM do substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. A leitura da liberação do AMC foi realizada conforme descrita anteriormente. O IC<sub>50</sub> foi determinado por análise da curva de regressão não-linear da atividade residual da enzima pela concentração do inibidor. O valor da constante de inibição (*K<sub>i</sub>*) foi determinado pelo método Cheng-Prusoff ( $K_i = IC_{50}/[1+([S]/K_m)]$ , onde [S] é a concentração do substrato (Cheng e Prusoff, 1973).

## Constante de Michaelis-Menten (*K<sub>m</sub>*), velocidade máxima (*V<sub>max</sub>*), constante catalítica (*k<sub>cat</sub>*) e eficiência catalítica (*k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*)

Os parâmetros cinéticos foram determinados pela incubação da rPOPMT no tampão de reação com diferentes concentrações (6,25 a 150 mM) de N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC e N-Suc-Gly-Pro-AMC. *K<sub>m</sub>* e *V<sub>max</sub>* foram determinados por regressão hiperbólica. A constante catalítica (*k<sub>cat</sub>*) foi calculada pela fórmula  $k_{cat} = V_{max}/[E]_0$ , onde [E]<sub>0</sub> representa a concentração de enzima ativa.

## **Espectroscopia de fluorescência**

As medidas da fluorescência intrínseca da POPMt foram realizadas utilizando o espectrofluorímetro ISS K-2 (Champaign, IL) a 25°C. Para a obtenção dos espectros de emissão (305 a 450 nm), a amostra foi excitada a 295 nm, comprimento de onda que excita o resíduo de aminoácido triptofano. Soluções de 0,30  $\mu$ M rPOPMt foram preparadas em tampão AMT em pHs variando de 5 a 10 ou ainda em tampão Tris 25 mM pH 7,5 para a observação da fluorescência intrínseca da proteína nas diferentes temperaturas (20 a 80°C) e nos diferentes pHs. O espectro resultante de cada condição foi proveniente da média de três leituras seguidas. As medições foram realizadas em uma cuveta de 1,0 X 1,0 cm. Os espectros finais foram corrigidos subtraindo o espectro referente a cada tampão utilizado.

## **Modelagem por homologia e Dinâmica molecular**

### **Parâmetros de simulação**

O método de modelagem molecular utilizado foi o de homologia com estruturas depositadas no *Protein Data Bank* – PDB (<http://www.pdb.org/pdb/>). O modelo tridimensional da POPMt foi construído baseado na estrutura cristalográfica da cadeia B da prolyl oligopeptidase de *Myxococcus xanthus*, com código PDB 2BKL (Shan, Mathews e Khosla, 2005b), utilizando o programa *Accelrys Discovery Studio 2.5*. Todas as figuras estruturais foram geradas no programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (Humphrey, Dalke e Schulten, 1996). A simulação foi realizada utilizando o pacote computacional GROMACS 4 - *Groningen Machine for Chemical Simulations* (Hess *et al.*, 2008). O *ensemble* simulado foi composto pela macromolécula POPMt imersa em 14.467 moléculas de água do tipo SPC - *Single Point Charge* (Berendsen *et al.*, 1981). Para neutralizar as cargas do sistema foram adicionados 4 átomos de sódio.

Para restringir a geometria das moléculas de água foi utilizado o algoritmo SETTLE (Miyamoto e Kollman, 1992). Para vincular todos os comprimentos de ligação, o algoritmo LINCS foi utilizado (Hess *et al.*, 1997). As correções eletrostáticas foram feitas através do algoritmo PME - Particle Mesh Ewald – com um raio de corte de 1,4 nm visando minimizar o tempo de simulação computacional. Derivado do cálculo de Ewald, PME estima as interações de longo alcance que ocorrem no espaço real

(Darden, York e Pedersen, 1993; Essmann *et al.*, 1995). O mesmo valor de raio de corte foi usado nas interações de forças van der Waals. A lista de vizinhos de cada átomo foi atualizada a cada 10 passos da simulação de 20 fs cada.

O sistema foi construído em uma caixa cúbica com arestas de 77 Å. Dois passos de minimização de energia foram realizados, o primeiro utilizando o algoritmo do gradiente conjugado – 2 ns – e o outro com o algoritmo Steepest Descent – 2 ns. Após o passo de minimização de energia, o sistema passou pelo processo de normalização de pressão e temperatura usando o integrador Stochastic Dynamics (SD) – 2 ns cada. Após todos esses passos, o sistema passou pela restrição de posição utilizando o integrador Molecular Dynamics (MD) – 2ns. Esse conjunto foi submetido a uma corrida de relaxamento de dinâmica molecular em computadores da GridUNESP. A simulação de 50 ns foi dividida em 25.000.000 de passos de 2 fs cada.

## **Imunogenicidade da rPOPMT em camundongos e na infecção**

### **Animais**

Camundongos BALB/c fêmeas livres de patógenos de 4-6 semanas foram mantidos isolados em cabines do biotério de nível de segurança 2 do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (UFG) com água e comida *ad libitum*. A temperatura foi mantida entre 20 a 24°C com umidade relativa entre 40 a 70%, e 12 h de ciclo claro/escuro. O uso dos camundongos foi conduzido de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética de experimentos em animais da UFG (Número de permissão: 229/11).

### **Imunização**

Os camundongos foram imunizados três vezes com intervalo de 15 dias entre as imunizações. Dez microgramas de rPOPMT combinado com 20 µg de CpG DNA (ODN 1826, InvivoGen®) ou de lipídeo A (Sigma- Aldrich®) em um volume de 100 µL foram injetados por via subcutânea no pescoço. O grupo controle recebeu 100 µL de cada um dos adjuvantes e o grupo de camundongos controle negativo recebeu 100 µL de solução salina estéril.

### **Coleta do soro**

Os soros foram obtidos 15 dias após a terceira imunização. Os soros foram incubadas por 1h a 37°C, centrifugadas a 1.200 g por 15 min a 4°C para a separação do soro. Após isso, foram estocados a -20°C.

### **Elisa**

Placas de poliestireno de 96 poços (Nunc®) foram inicialmente revestidas com a proteína recombinante (5 µg/ml) diluída em 0,05 M de tampão carbonato/bicarbonato de sódio (pH 9,6) e incubadas a 4 °C durante 16 h. Posteriormente, a placa foi lavada e incubada durante 1 h a 37 °C com PBS contendo 1% de leite desnatado. As amostras foram diluídas (1: 1000), adicionadas aos poços e incubadas durante o período de 2 h a 37 °C. Após várias lavagens, o anticorpo conjugado com biotina (1:5000) foi adicionado às placas (anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo; Pharmingen®). As placas foram incubadas durante 1 h a 37 °C, após isso a estreptavidina peroxidase (1:1000) foi adicionada, e as placas foram novamente incubadas durante 1 h a 37 °C. A reação foi, em seguida, desenvolvida com um tampão de fosfato de citrato contendo orto-fenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio e interrompida após 15 min por adição de 4 N ácido sulfúrico. A absorbância a 492 nm foi lida no leitor de ELISA (Labsystems Multiskan Thermo®). Entre cada passo, as placas foram lavadas seis vezes com PBS contendo 0,05 % de Tween 20.

### **Avaliação dos componentes celulares e citocinas do baço e pulmão de camundongos imunizados**

Após trinta dias da infecção com *M. tuberculosis*, o camundongo foi sacrificado. Os órgãos (baço e pulmão) foram removidos de maneira asséptica, e as células foram separadas utilizando pinças estéreis. A suspensão de células foi preparada e os eritrócitos foram lisados com solução Gey's (solução balanceada de sais - Sigma-Aldrich®). As células foram lavadas com RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. A concentração das células foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL, e as mesmas foram colocadas em placas de 96 poços. As células foram estimuladas com ConA (10 µg/mL) ou POP (10 µg/mL) ou não estimuladas. Após a incubação por 4 h a

37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> com monensina (eBioscience), as células foram colhidas para marcação com citocina intracelulares. Depois disso, as células foram marcadas com CD<sub>4</sub> e IFN- $\gamma$  utilizando o kit BD Cytofix/Cytoperm de acordo com as instruções do fabricante.

As células foram fixadas com PBS contendo 0,05% de azida de sódio. A aquisição das imagens foi realizada utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences). Para cada amostra, cem mil eventos foram adquiridos.

### **Análise estatística**

Os resultados foram tabulados utilizando Excel (versão 2010) e o software Prism 5 (GraphPad Software 5.0). As diferenças entre os grupos foram avaliados pelo teste t Student's bicaudal após o teste não paramétrico (Mann Whitney U). Os ensaios foram considerados diferentemente significantes quando o  $p < 0,05$

### **Perfil de secreção de citocinas *in vitro* por macrófagos murinos após incubação com rPOPMT**

#### **Estimulação de macrófagos peritoneais com rPOPMT *in vitro*.**

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram colhidos por lavagem com meio Roswell Instituto Memorial Park estéril (RPMI) 1640. Os macrófagos ( $1 \times 10^6$  células/mL) ficaram aderidos durante a noite com RPMI contendo soro fetal de bovino a 2%. As células não aderentes foram removidas após lavagem com tampão salina-fosfato (PBS). Os macrófagos foram estimulados com rPOPMT (0,01-10 mg/mL), nativa ou desnaturada por ebulição, durante 24 horas a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub>. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada por exclusão de azul de tripano no final de cada experimento.

#### **Propriedades imunomoduladoras de rPOPMT**

Os sobrenadantes das células foram coletados após 24 h de estimulação (ou não) *in vitro* pela proteína recombinante e armazenadas a -20 °C. Os níveis das citocinas, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-23, IL-10, IL-1 $\beta$  e da quimiocina, MCP-1, foram



mensurados por Elisa de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems®) nos sobrenadantes coletados.

### **Análise estatística**

Os gráficos de barras foram gerados com software Prism (GraphPad). Todos os outros dados foram expressos como média ( $\pm$  erro padrão da média) e foram analisados estatisticamente com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Neuman-Keuls-Student, com o nível de significância de  $P < 0,05$ .

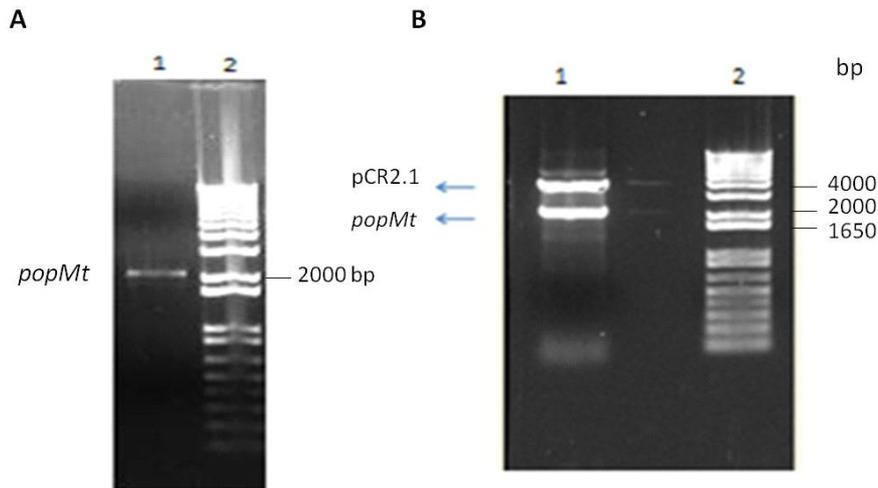
# RESULTADOS

---

## **Amplificação e Clonagem do gene *popmt***

O emprego dos oligonucleotídeos iniciadores específicos desenhados a partir da sequência obtida no banco de dados permitiu a amplificação do gene *popmt* por reação de polimerização em cadeia a partir do DNA genômico total de *M. tuberculosis*. A análise eletroforética da PCR apresentou um fragmento de DNA de aproximadamente 2022 pb (Fig. 7A), correspondente a fase aberta de leitura do gene *popmt* que codifica uma proteína de 673 aminoácidos. A banda correspondente ao produto amplificado foi excisada e eluída do gel para posterior ligação no vetor de clonagem. No intuito de facilitar a futura clonagem do gene no plasmídeo de expressão pET-28a(+) (Novagen®), foram adicionados sítios para as enzimas de restrição *Nde* I e *Bam*H I em seus iniciadores senso e antiseno, respectivamente.

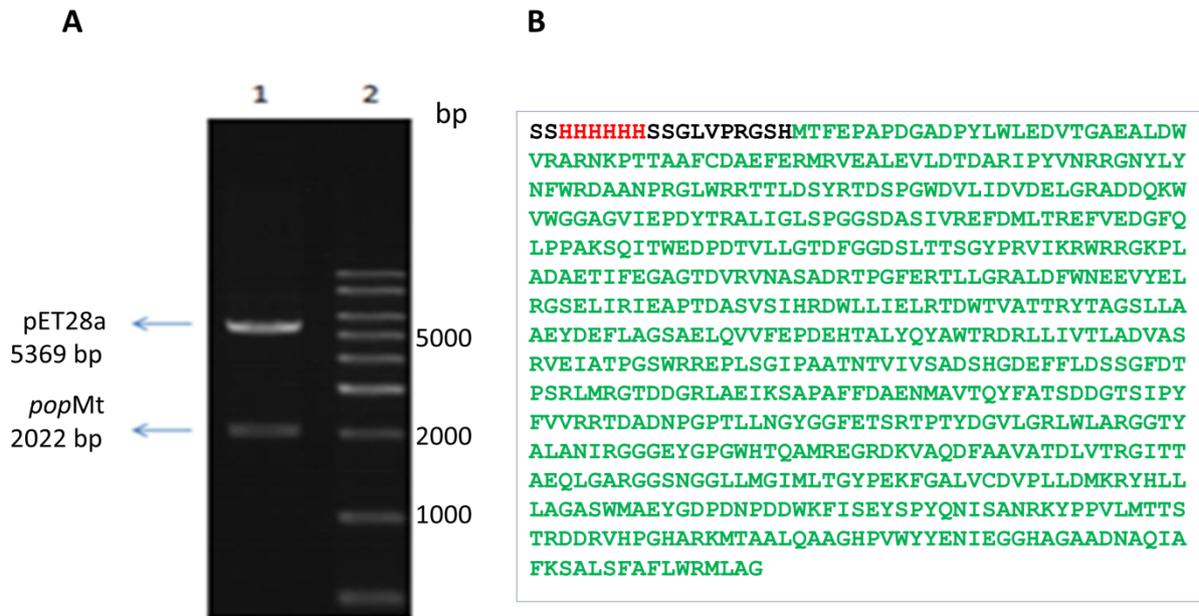
Após a amplificação do gene, o produto da PCR foi utilizado para reação de clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®). O produto da ligação de *popmt* no vetor de clonagem pCR®2.1-TOPO® foi transformado em *E. coli* da linhagem DH5α e plaqueado em meio LB ágar suplementado contendo ampicilina, X-Gal e IPTG. O uso do antibiótico é necessário para que no meio cresça somente as bactérias com pCR®2.1-TOPO®, pois o plasmídeo possui um gene de resistência à ampicilina. Após a incubação a 37 °C, as colônias positivas foram selecionadas e submetidas à extração do DNA plasmidial em pequena escala, técnica que permite a obtenção do plasmídeo íntegro. Seguinte à extração, foi realizada uma dupla digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição *Nde* I e *Bam*H I e os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) confirmando a presença do inserto clonado no pCR®2.1-TOPO® (Fig. 7B).



**Figura 7. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% da amplificação do gene *popmt* por PCR e da clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO®. A. Amplificação do gene *popmt* por PCR usando DNA genômico de *Mtb*. 1 – gene *popmt* (2022 bp); 2 – marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®). B. Confirmação da clonagem pela dupla digestão do plasmídeo *popmt* + pCR®2.1-TOPO® com enzimas de restrição *BamHI* e *NdeI*. 1 – plasmídeo *popmt* (2022 bp) + pCR®2.1-TOPO® (3900 bp); 2 – marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).**

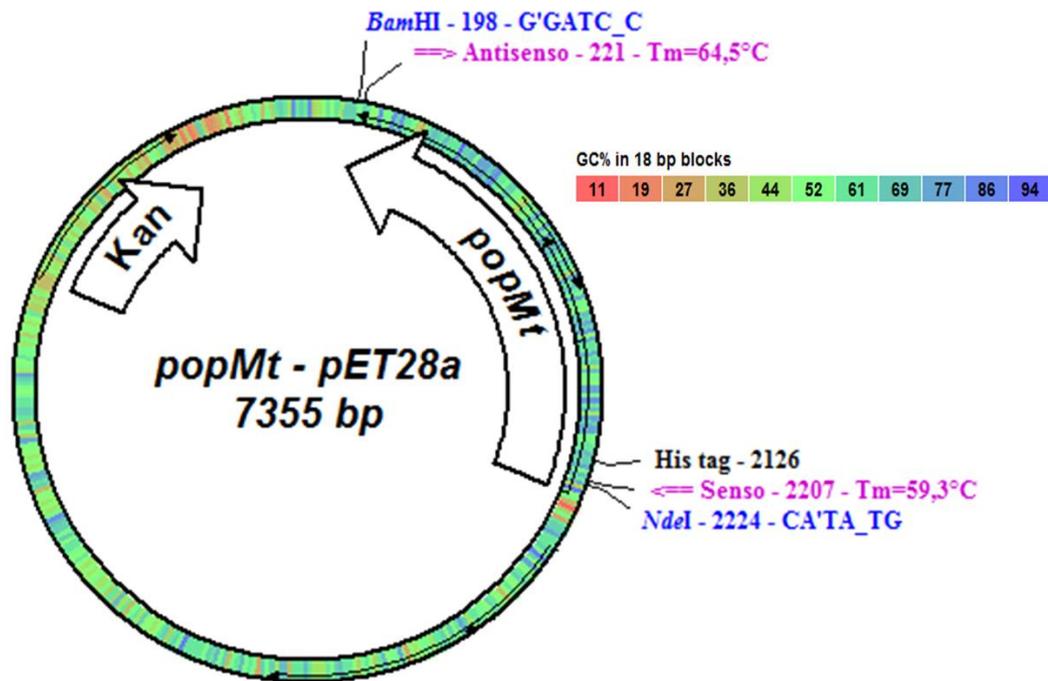
O fragmento referente ao inserto liberado do vetor de clonagem pCR®2.1-TOPO® pela dupla digestão enzimática foi excisado, eluído e purificado do gel de agarose. Após isso, *popmt* foi subclonado no vetor de expressão pET-28a(+), previamente digerido com as enzimas de restrição *Nde I* e *BamH I*, formando o plasmídeo pET28a-*popmt*. O vetor de expressão pET-28a(+) contém uma região que codifica uma cauda composta por seis resíduos de histidina, expressa junto com a proteína recombinante na extremidade N-terminal ou C-terminal. A expressão da cauda de histidina, neste caso, foi realizada na porção N-terminal da proteína.

A subclonagem pET28a-*popmt* foi confirmada por uma triagem de plasmídeos extraídos de colônias selecionadas (dados não mostrados). Os resultados obtidos na reação de restrição enzimática, bem como o sequenciamento realizado, confirmam o sucesso da subclonagem (Fig. 8A e 8B), o que possibilitou sua aplicação no sistema de expressão bacteriano, visando à obtenção da proteína recombinante para estudos enzimáticos e funcionais.



**Figura 8. Clonagem do gene *popmt* no vetor de expressão pET-28a(+).** A. Análise da dupla digestão do plasmídeo pET28a-*popmt* com as enzimas de restrição *Nde I* e *BamH I*. 1 – plasmídeo digerido com as enzimas de restrição; 2 – marcador Kb *Ladder* (Invitrogen®); B. Resultado do sequenciamento do plasmídeo pET28a-*popmt*. A figura representa a tradução da fase aberta de leitura obtida após ligação do inserto nos sítios de clonagem do vetor pET-28a(+). A cauda de histidina está marcada em vermelho, em verde a sequência protéica da POPMt.

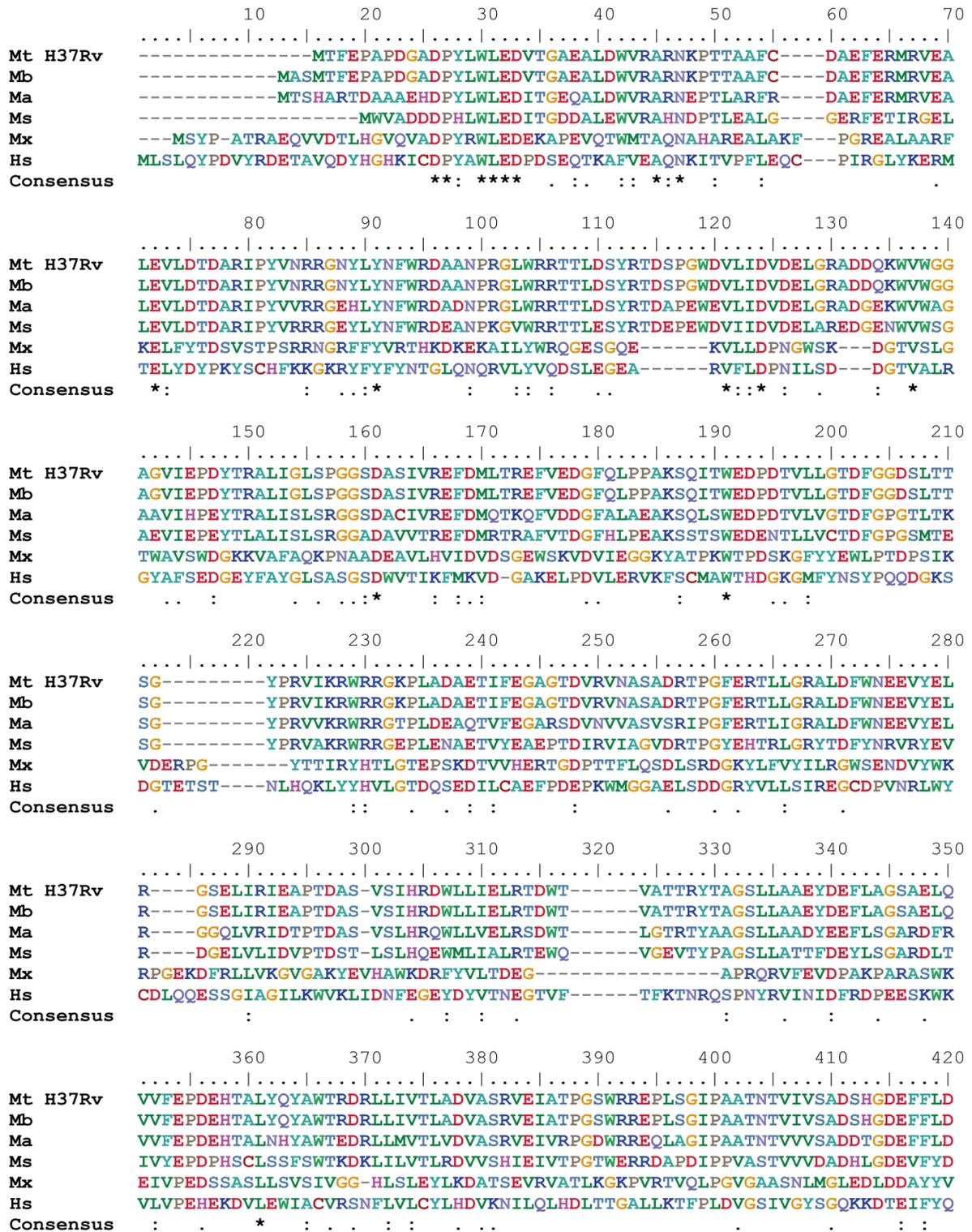
O sentido e a fase de inserção da ligação do inserto no pET-28a(+) foram confirmados pelo sequenciamento do plasmídeo com os oligonucleotídeos aneladores para as regiões T7 promotora e terminadora. A análise do resultado do sequenciamento indica que a fase aberta de leitura do gene clonado codifica uma proteína de fusão com a cauda de poli-histidina cuja sequência é igual àquela depositada no banco de dados. A ligação *in silico* do fragmento sequenciado no vetor pET-28a(+) está representada na Fig. 9.



**Figura 9. Representação *in silico* da ligação do *popmt* no vetor *pET28a* após resultado do sequenciamento.** Indicações em magenta apontam para sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas temperaturas de anelamento; em azul os sítios de restrição utilizados para clonagem. Análises concebidas no programa pDRAW32 (versão 1.1.107).

A sequência de resíduos de aminoácidos obtida após sequenciamento do gene *popmt* foi comparada com as depositadas no banco de dados BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) para verificação de sequências homólogas. Por meio de uma análise peptídica *in silico* foi possível calcular o grau de identidade entre as espécies de *Mycobacterium*, sendo de 99,55, 78,35 e 64,99% de identidade para *Mycobacterium bovis*, *M. avium* e *M. smegmatis* respectivamente. Essa semelhança peptídica pode sugerir um papel funcional semelhante entre essas POPs, porém ainda é necessário estudos para identificação da função das mesmas em micobactéria. Já a sequência de resíduos de aminoácidos da POPMt possui 20,64% de identidade com a POP de *Homo sapiens*. Esse dado que é interessante porque um fármaco baseado na estrutura da POPMt pode apresentar efeitos colaterais reduzidos em humanos. Os resíduos da tríade catalítica (Ser-Asp-His) de POPs aparecem invariantes entre essas

sequências analisadas, sendo que a POPMt apresenta os resíduos do sítio ativo nas posições Ser 532, Asp 615 e His 647 (Fig. 10).



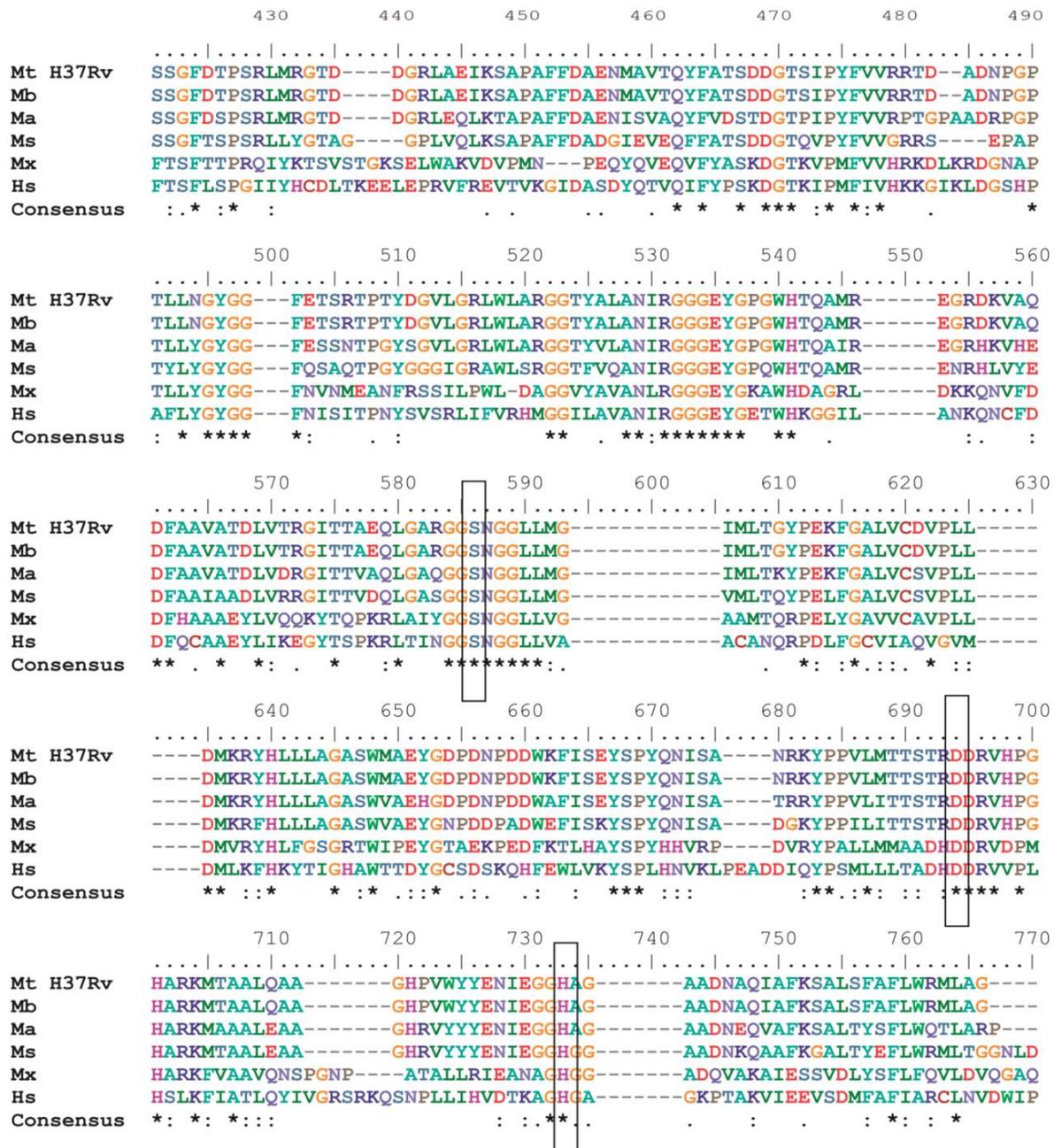
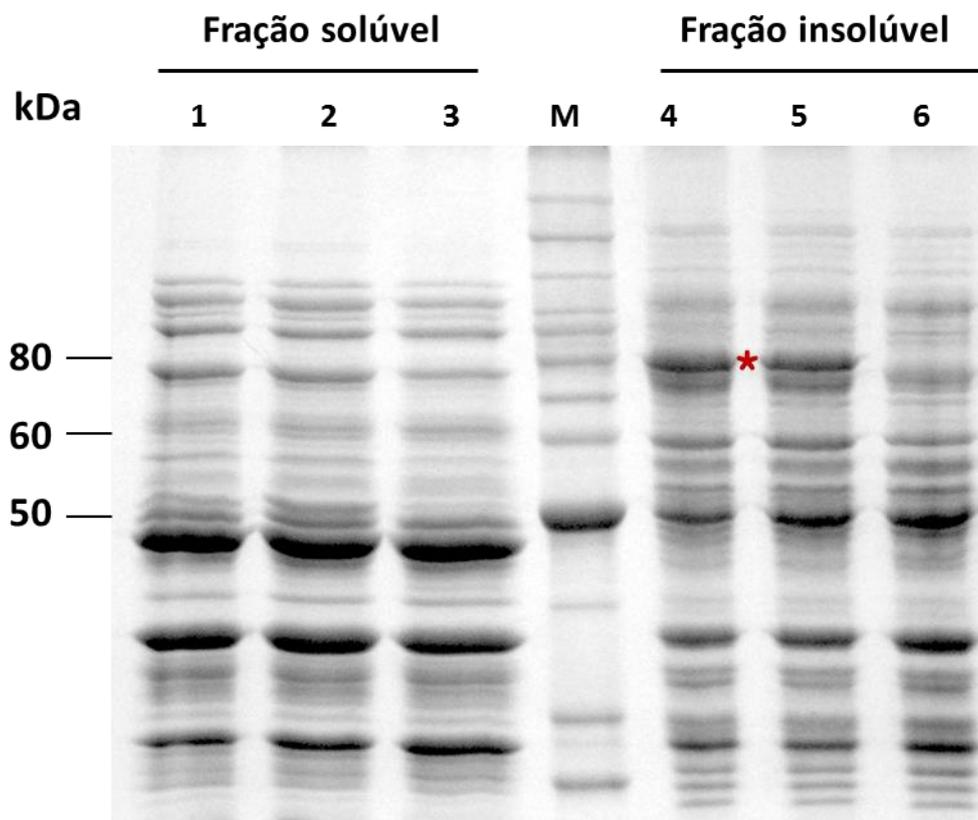


Figura 10. Alinhamento das seqüências peptídicas previstas da tradução do gene *pop* das espécies de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mt H37Rv), *M. avium* (Ma), *M. bovis* (Mb), *M. smegmatis* (Ms), *M. xanthus* (Mx) e *Homo sapiens* (Hs). A seqüência consenso é gerada automaticamente pelo programa ClustalW: (\*) resíduos idênticos em todas as seqüências; (:) substituição conservativa; (.) substituições semiconservativas. As caixas identificam os resíduos da tríade catalítica conservada entre as POPs.

## Expressão Heteróloga e Purificação da rPOPMT

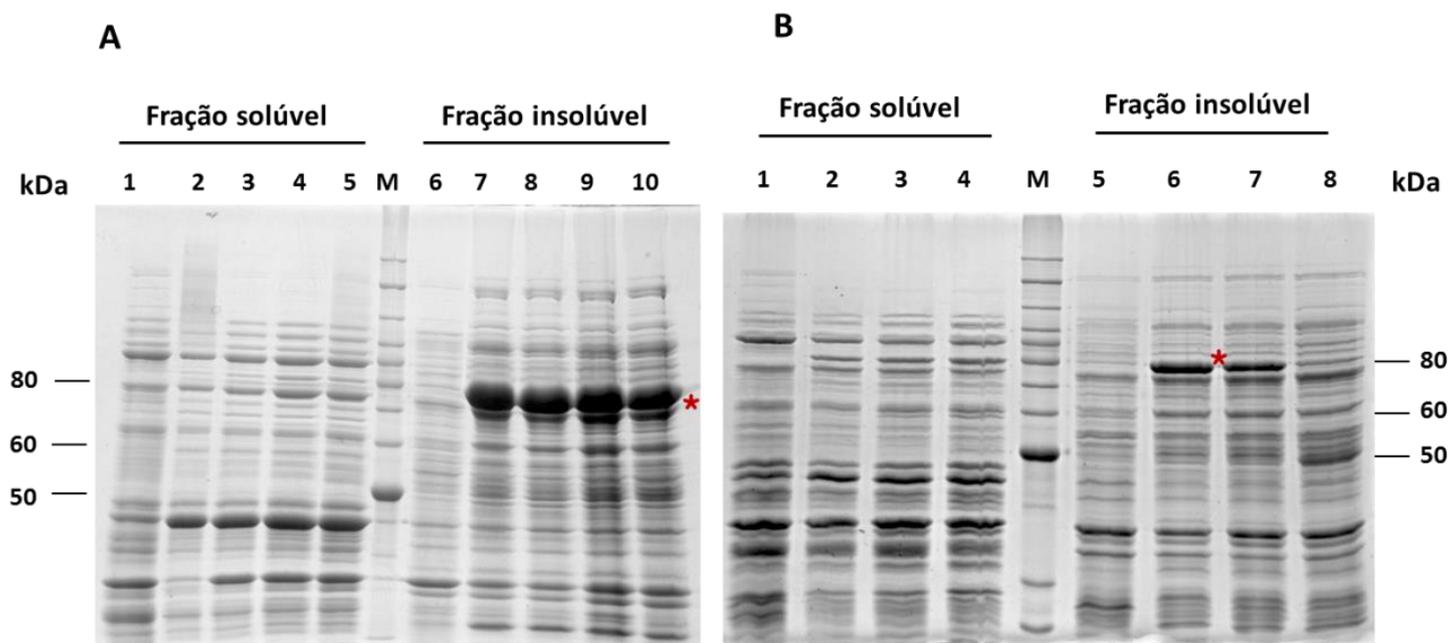
Após o sequenciamento e a confirmação de que o gene foi corretamente clonado no vetor de expressão pET-28a(+), o plasmídeo de expressão foi transformado por choque térmico em *E. coli* da linhagem BL21 (DE3). Extratos de vários clones de bactérias *E. coli* BL21(DE3) foram analisados por varredura por SDS-PAGE para averiguar qual deles expressava a proteína recombinante de forma mais eficiente (dados não mostrados). O nível de expressão, normalizado para a OD<sub>600</sub>, variou pouco entre as colônias testadas, assim como a proporção de proteína recombinante presente no extrato solúvel e insolúvel. Então duas colônias foram escolhidas e submetidas à indução inicial com 1 mM de IPTG, nas condições de 200 rpm, 37 °C por 5 h. Esse procedimento foi realizado com o intuito de observar o perfil de expressão da proteína recombinante. Como controle, o pET-28a(+) vazio, sem o gene, foi induzido nas mesmas condições descritas acima. A análise em gel SDS-PAGE 10% permitiu identificar, nas duas colônias, a expressão de uma proteína com massa molecular próxima ao esperado de aproximadamente 75 kDa, o que caracteriza a provável expressão da POPMT (Fig. 11). A proteína recombinante foi produzida, no entanto, essa condição de expressão permitiu somente a visualização da proteína em corpo de inclusão, ou seja, na fração insolúvel.



**Figura 11. Perfil eletroforético do extrato solúvel e insolúvel dos clones contendo o plasmídeo de expressão após indução.** Análise da expressão heteróloga da rPOPMT foi realizada por SDS-PAGE 10%. A indução foi realizada com 1mM de IPTG 37 °C por 5 h. **1 e 4** – fração induzida da colônia 1; **2 e 5** – fração induzida da colônia 2; **3 e 6** – fração induzida da colônia com pET-28a(+) vazio; M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen®). O gel foi corado com azul de Coomassie.

Dessa forma, visando à obtenção da proteína na sua forma solúvel, foram realizadas várias induções a fim de otimizar a concentração de IPTG e determinar a temperatura ótima para que se obtivesse a proteína em boa quantidade e na fração solúvel, além de verificar a expressão da proteína nos diferentes clones e possibilitar a seleção de um desses para a padronização do protocolo de expressão heteróloga. Para esse aperfeiçoamento, foram realizados testes de indução com diferentes concentrações de IPTG e temperaturas de 25 e 30 °C. Análise em gel SDS-PAGE 10% demonstrou que a 30 °C durante 3h e com baixa concentração de IPTG (0,05 e 0,01 mM, colunas 4 e 5, respectivamente – Fig. 12A), obteve-se uma expressão da rPOPMT

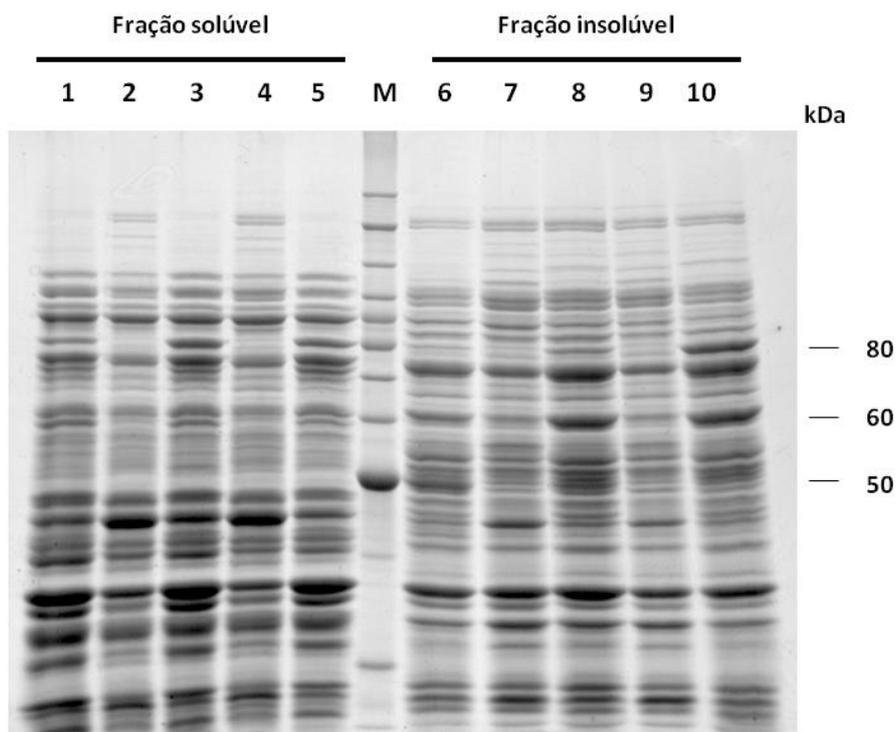
na fração solúvel, mas a maioria proteína recombinante expressa ainda foi observada na fração insolúvel (Fig. 12A, coluna 7-10). No teste de expressão a 25 °C por 16h pode-se notar que a proteína já aparece solúvel em todas as condições testadas (Fig. 12B, coluna 2-4).



**Figura 12. Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga da rPOPmt. A.** Indução realizada com diferentes concentrações de IPTG a 30°C por 3 h. **1 e 6** – pET-28a(+) vazio induzido com 0,1 mM de IPTG; **2 e 7** – fração induzida com 0,5 mM de IPTG; **3 e 8** – fração induzida com 0,1 mM de IPTG; **4 e 9** – fração induzida com 0,05 mM de IPTG; **5 e 10** – fração induzida com 0,01 mM de IPTG. **B.** Indução realizada com diferentes concentrações de IPTG a 25°C por 16 h. **1 e 5** – pET-28a(+) vazio induzido com 0,1 mM de IPTG; **2 e 6** – fração induzida com 0,1 mM de IPTG; **3 e 7** – fração induzida com 0,05 mM de IPTG; **4 e 8** – fração induzida com 0,01 mM de IPTG; M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen®). O gel foi corado com azul de Coomassie.

Na tentativa de se alcançar um protocolo padronizado de indução onde uma maior quantidade de proteína recombinante solúvel fosse obtida, outro teste foi realizado, agora a 20 °C. A figura 13 ilustra o resultado desse experimento a partir do qual ficou estabelecido a melhor condição para expressão da POPmt recombinante utilizando 0,05 mM de IPTG, a 20 °C, 200 rpm por 16 h. Em outros trabalhos realizados no laboratório vimos que a POP de *Trypanoma cruzi* e *T. brucei* também são expressas

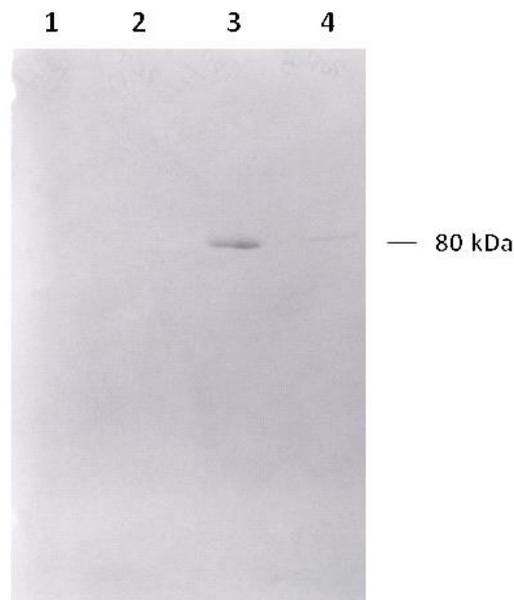
na sua forma solúvel e ativa em condições semelhantes a essa (Bastos *et al.*, 2005). A 20 °C, a bactéria apresenta um crescimento lento e tempo hábil para a realização completa da transcrição e tradução da proteína recombinante, permitindo que a mesma se enovele corretamente. Nessa condição estabelecida, a proteína é expressa em sua forma solúvel e, provavelmente, ativa viabilizando sua caracterização enzimática.



**Figura 13. Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga da rPOPmt a 20°C.** Indução realizada com diferentes concentrações de IPTG a 20°C por 16 h. **1 e 6** – fração induzida com 0,01 mM de IPTG; **2 e 7** – pET-28a(+) vazio induzido com 0,05mM, 4 e 9 - pET28a vazio induzido com 0,1 mM de IPTG; **3 e 8** – fração induzida com 0,05 mM de IPTG; **5 e 10** – fração induzida com 0,1 mM de IPTG; M – Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen®). O gel foi corado com azul de Coomassie.

Para confirmar se a banda observada durante os experimentos de indução representa a expressão da proteína recombinante, foi realizado um teste de *western blot* utilizando-se como amostra o extrato celular total de *E. coli* linhagem BL21 (DE3) induzida com o plasmídeo pET-28a(+)-*popmt*, na condição de 20 °C por 16h com 0,05 mM de IPTG. Para o experimento, foi utilizado como 1º anticorpo, o anti-His tag

(Novagen®), uma vez que a rPOPMT apresenta na porção amino-terminal uma cauda de seis histidinas, como já mencionado anteriormente. Após a lise do sedimento seguida de eletroforese de gel poliacrilamida e western blot, foi possível verificar a presença da proteína recombinante no extrato solúvel (em maior quantidade) e no insolúvel (em menor quantidade) de *E. coli* linhagem BL21 (DE3) previamente induzida. O controle, pET-28a(+) vazio, não apresentou marcação (Fig. 14).

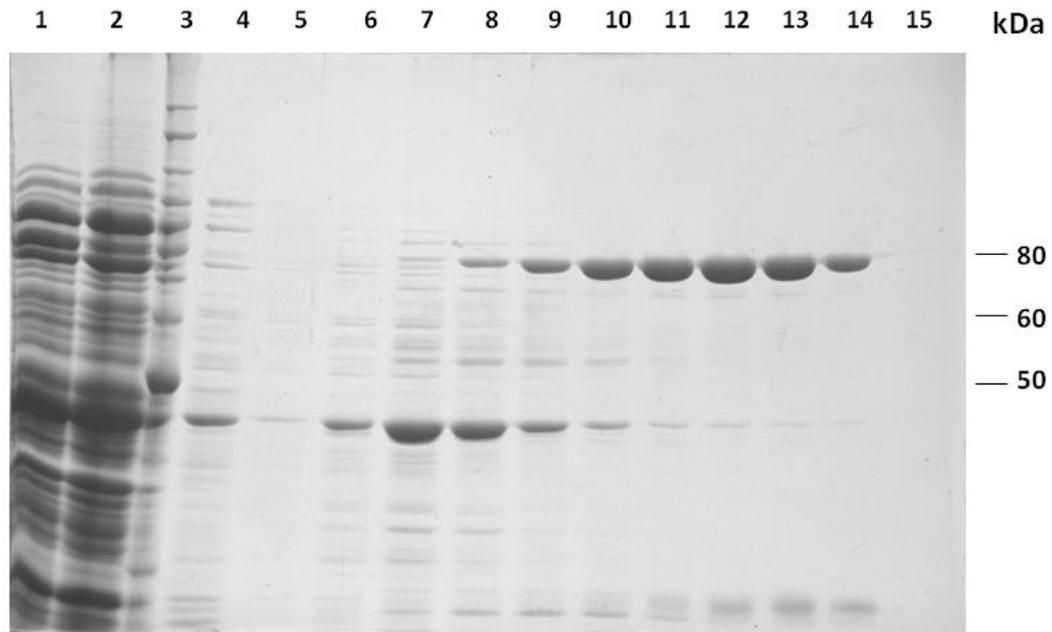


**Figura 14. Western blot realizado com anticorpo anti-His Tag.** Fração solúvel da colônia 1 cultivada a 20°C por 16h com 0,05 mM de IPTG. **(1)** Extrato insolúvel do pET-28a(+) vazio, **(2)** Extrato solúvel do pET-28a(+) vazio, **(3)** Extrato solúvel da colônia positiva para rPOPMT, **(4)** Extrato insolúvel da colônia positiva para rPOPMT.

O próximo passo, após a confirmação da expressão da proteína solúvel, foi a purificação da rPOPMT por cromatografia de afinidade em coluna com resina agarose-níquel (Novagen®). Para purificação da rPOPMT foi realizada uma varredura das condições de purificação, com diferentes concentrações de imidazol no tampão de lavagem, otimizando o protocolo fornecido pelo fabricante da resina. Após a indução na condição padronizada e a lise da bactéria por sonicação conforme descrito na metodologia, o extrato solúvel da rPOPMT foi adicionado à resina. A cauda de histidina presente na proteína recombinante permite a ligação da mesma a resina, permitindo sua purificação.

Em seguida, a resina foi submetida ao tampão de lavagem contendo concentrações crescentes de imidazol para que fossem retiradas proteínas inespecíficas ligadas a resina. O imidazol é utilizado nesse tipo de purificação por ser um competidor da histidina (que possui um grupo indol na sua cadeia lateral) na interação com a resina devido a sua afinidade pelos íons de níquel. Além disso, o fluxo constante do tampão de lavagem na coluna de cromatografia impede que proteínas retiradas da resina voltem a se grudar, favorecendo uma purificação mais efetiva. Assim, todas as frações da lavagem e eluição foram coletadas e foi realizada a análise em SDS-PAGE 10% do procedimento.

Nessa análise, observou-se que rPOPMT é eluída, com elevado grau de pureza, a partir da lavagem contendo 60 mM de imidazol (Fig. 15). A purificação também mostrou que o protocolo de indução permite a obtenção de proteína em quantidade suficiente ( $\sim 1,2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  na eluição com 60 mM de imidazol – Fig. 15 coluna 12) para os testes enzimáticos posteriores. Os contaminantes de massa molecular abaixo de 70 kDa foram eliminados durante a etapa de concentração e diálise em filtro Amicon® (Milipore Inc). O processo de concentração promoveu, portanto o enriquecimento da enzima recombinante em comparação aos contaminantes, gerando uma amostra com elevado grau de pureza propícia para os estudos de atividade enzimática e ensaio de imunologia.

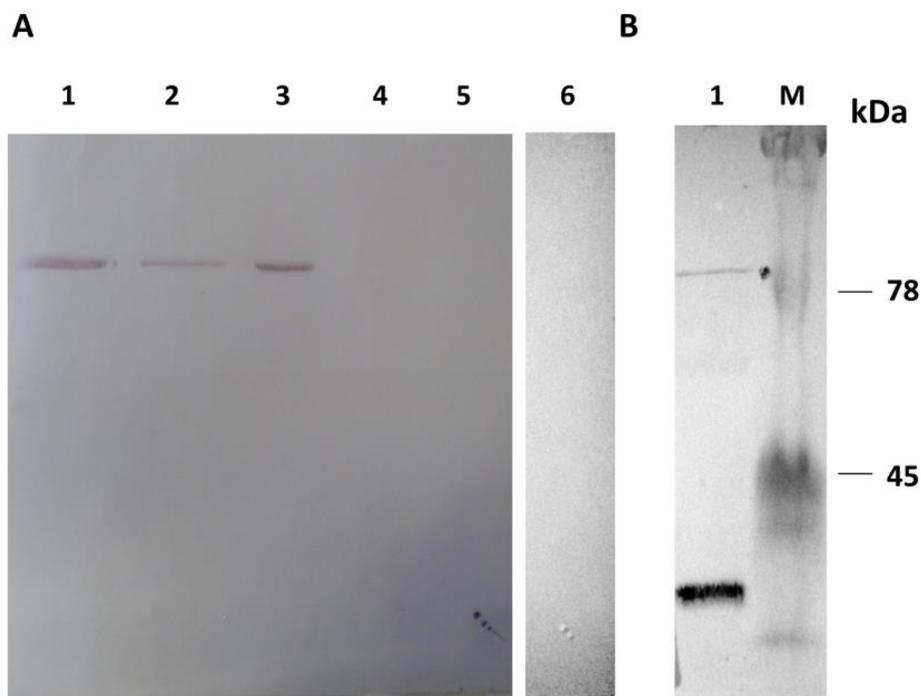


**Figura 15. Análise da purificação da proteína na presença de tampão de lavagem contendo diferentes concentrações de imidazol.** A colônia foi induzida com 0,05 mM de imidazol a 20°C por 16 h. A amostra foi sonicada em tampão de lise para obtenção do extrato total. **1** – Extrato total; **2** – fração não-ligada à resina; **3**- Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen®); **4 e 5** – tampão de lavagem com 5 mM de imidazol; **6**- tampão de lavagem com 10 mM de imidazol; **7**- tampão de lavagem com 20 mM de imidazol; **8**- tampão de lavagem com 30 mM de imidazol; **9**- tampão de lavagem com 40 mM; **10 a 14** – eluição com diferentes concentrações de imidazol (50 mM a 400 mM); **15** - Eluição com 600 mM de imidazol.

### Produção de anticorpos anti-rPOPMT

A imunogenicidade da enzima foi testada por *Western blot* utilizando extrato total solúvel e insolúvel de bactéria e a proteína purificada como antígenos. Quando submetidos a desafios intra-dérmicos, camundongos machos isogênicos do tipo Balb/c produziram anticorpos específicos anti-rPOPMT que reconheceram uma única banda de 75 kDa no extrato total induzido de *E. coli* linhagem BL21 (DE3) (fração solúvel e insolúvel), além da rPOPMT purificada conforme protocolo padronizado (Fig. 16A). Esse resultado indica a presença de anticorpos específicos para prolil oligopeptidase de *M. tuberculosis* no soro dos camundongos imunizados indicando que foi imunogênica nestes animais. Com o anticorpo produzido foi realizado um *Western blot* usando como antígeno o extrato total de *M. tuberculosis* e como observado na figura 16B, o

soro anti-rPOPMT reconheceu uma banda na altura referente a proteína nessa condição. Esse resultado demonstra que a POPMT é expressa em *M. tuberculosis*.



**Figura 16. Immunoblotting realizado com soro anti-rPOPMT. A. Frações de extrato total de *E. coli*. (1) rPOPMT purificada; (2) e (3) Extrato insolúvel e solúvel de *E. coli* linhagem BL21 (DE3) pET-28a(+)-popmt, respectivamente; (4) e (5) Extrato insolúvel e solúvel do pET-28a(+) vazio, respectivamente; (6) Soro pré-imune. B. Fração do Extrato total de *Mt*. (1) *Mt* H37Rv; (M) Marcador Kaleidoscope Prestained (Biorad®).**

## Atividade enzimática da rPOPMT

### Especificidade da rPOPMT pelo substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC

Conforme mostrado por trabalhos anteriores do nosso laboratório, o peptídeo N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC é o substrato específico da prolil oligopeptidase de *T. cruzi* e *T. brucei* (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2010). Para mostrar a especificidade da rPOPMT na clivagem desse substrato, foram utilizados outros peptídeos que são ou não clivados por membros da família das POPs. A atividade relativa da rPOPMT em cada substrato pode ser observado na tabela 2. A proteína

recombinante foi incubada com tampão de atividade (Tris 25 mM pH 7,5) contendo 20  $\mu$ M dos diferentes substratos para o volume final de 100  $\mu$ L durante 20 min, período em que ocorreu a leitura da hidrólise de cada substrato a partir da excitação e emissão do AMC.

Entre estes substratos, a enzima só foi capaz de hidrolisar aqueles que contêm um resíduo de prolina na posição P1. Com respeito a esses substratos, a enzima foi ativa em N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC e N-Suc-Gly-Pro-AMC, mas totalmente inativa em relação a L-Pro-AMC e Pro-Gly-AMC. Como observado para POPs de alguns tripanossomatídeos, a POP de *M. tuberculosis* tem maior atividade sobre o substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC e com menos intensidade na clivagem do substrato N-Suc-Gly-Pro-AMC. A partir desses dados, todos os testes enzimáticos foram realizados utilizando o substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC.

**Tabela 2.** Especificidade de rPOPMT aos substratos testados

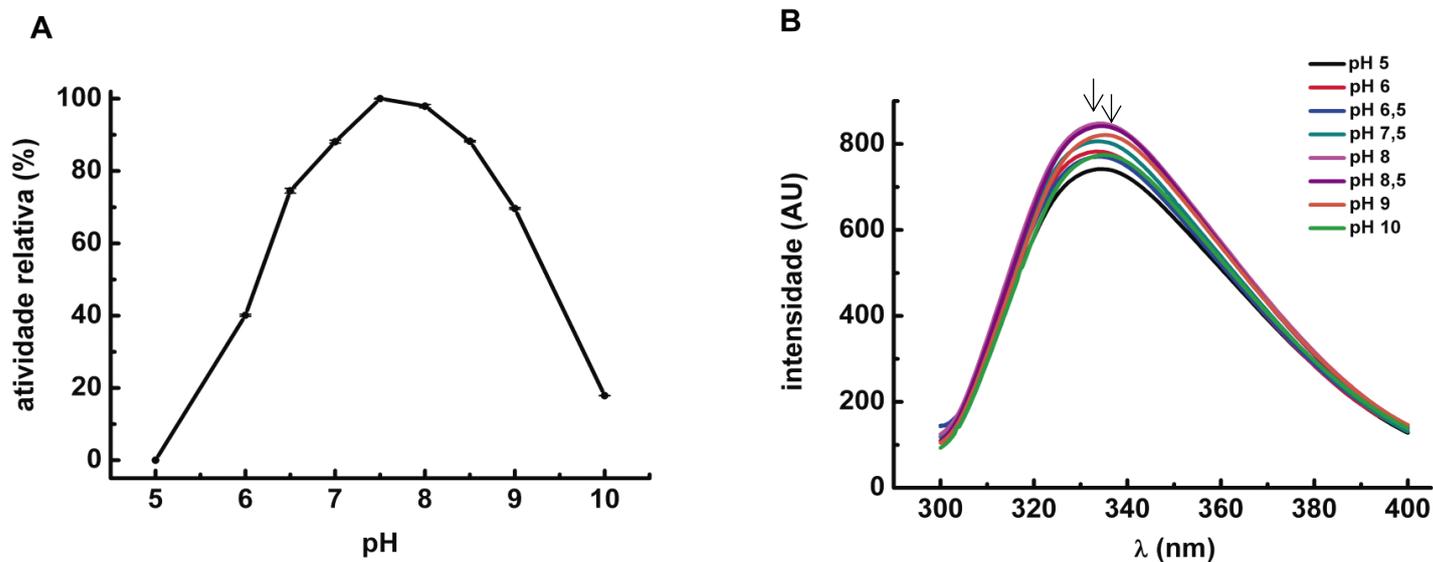
<b>Substrato</b>	<b>Atividade Relativa (%)</b>
Ala-Ala-Phe-AMC	n.a
L-Proline-AMC	n.a
Gly-Pro-AMC	n.a
N-Succinyl-Ile-Ala-AMC	1,31
N-Succinyl-Leu-Tyr-AMC	n.a
N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	n.a
L-Leucine-AMC	n.a
N-Succinyl-Gly-Pro-AMC	48
N-Succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC	100

n.a, Nenhuma atividade relativa observada. Ensaios foram realizados incubando 300 ng de proteína com 20  $\mu$ M de cada substrato. A hidrólise dos substratos foi observada por 20 min.

### **Influência do pH na atividade enzimática e na estrutura da rPOPMT**

Para prosseguir com a caracterização bioquímica da rPOPMT, foi realizado um ensaio enzimático em diferentes pHs com o intuito de estabelecer o pH de melhor atividade para a enzima. Quando incubada em tampão AMT (Acetato 100 mM, MES 100 mM e TRIS 200 mM) variando o pH de 5,0 – 10,0, a enzima mostrou-se com atividade ótima no pH 7,5, porém na faixa de pH 7,0 a 8,5, a proteína ainda possuía acima de 80% da sua atividade relativa (Fig. 17A), sendo inativa em pH 5,0 e pouco ativa em pH 10,0 – 0% e 18% de atividade, respectivamente. Além disso, observa-se uma atividade considerável em pH 9,0 - 67% de atividade. Assim, a prolil oligopeptidase recombinante de *M. tuberculosis* possui atividade ótima em pH alcalino, sendo o pH 7,5 escolhidos para os testes enzimáticos, uma vez que esse valor é próximo ao fisiológico.

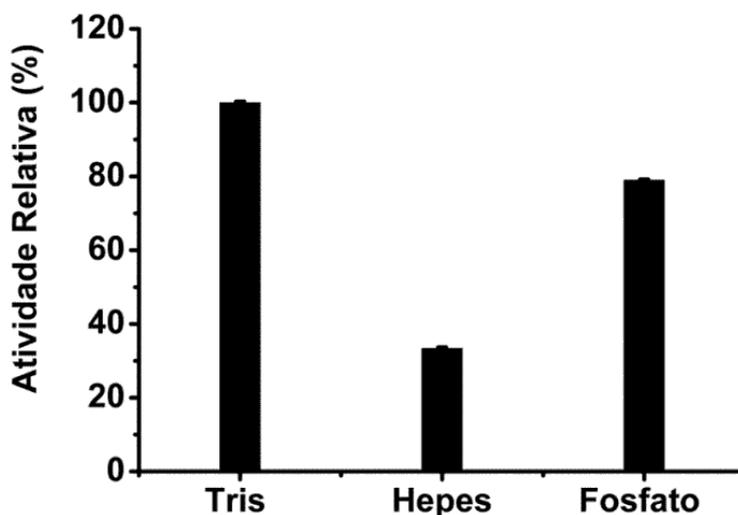
Um recurso valioso de fluorescência intrínseca de proteínas é a alta sensibilidade do triptofano ao seu ambiente local. Assim, é possível observar mudanças no espectro de emissão do triptofano em resposta à transições conformacionais da proteína, associação de subunidades, a ligação do substrato ou a desnaturação, todos os quais podem afetar o ambiente em torno do anel de indole de triptofano. A POPMT possui 20 resíduos de triptofano, e como mostrado na figura 17B, a emissão máxima foi em 335 nm, indicando que a maioria dos triptofanos estão parcialmente enterrados na proteína. A forma do espectro de fluorescência da rPOPMT não modificou na faixa de pH 7,5 a 8,5, e apenas ocorreu uma ligeira modificação nos pHs 9 e 10. Isso sugere que o ambiente envolta dos resíduos de triptofano é preservado nesses pHs. No entanto, valores de pH mais elevados conduzem a um aumento na intensidade de fluorescência, e possivelmente, a alterações estruturais.



**Figura 17. Efeito do pH na atividade relativa e na estrutura terciária da rPOPMT. A. pH de atividade ótima da rPOPMT.** A proteína purificada (300 ng) foi incubada em tampão AMT com diferentes valores de pHs (5,0-10,0) na presença de 20  $\mu$ M N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. A leitura da liberação do AMC foi realizada durante 20 min. **B. Espectro de emissão do triptofano em diferentes pHs.** O espectro de fluorescência intrínseco da proteína foi realizado a 25 °C com excitação a 295 nm e emissão entre 305 a 400 nm em diferentes pHs. As setas indicam a ligeira mudança no pico de emissão.

#### Efeito do tampão na atividade catalítica da rPOPMT

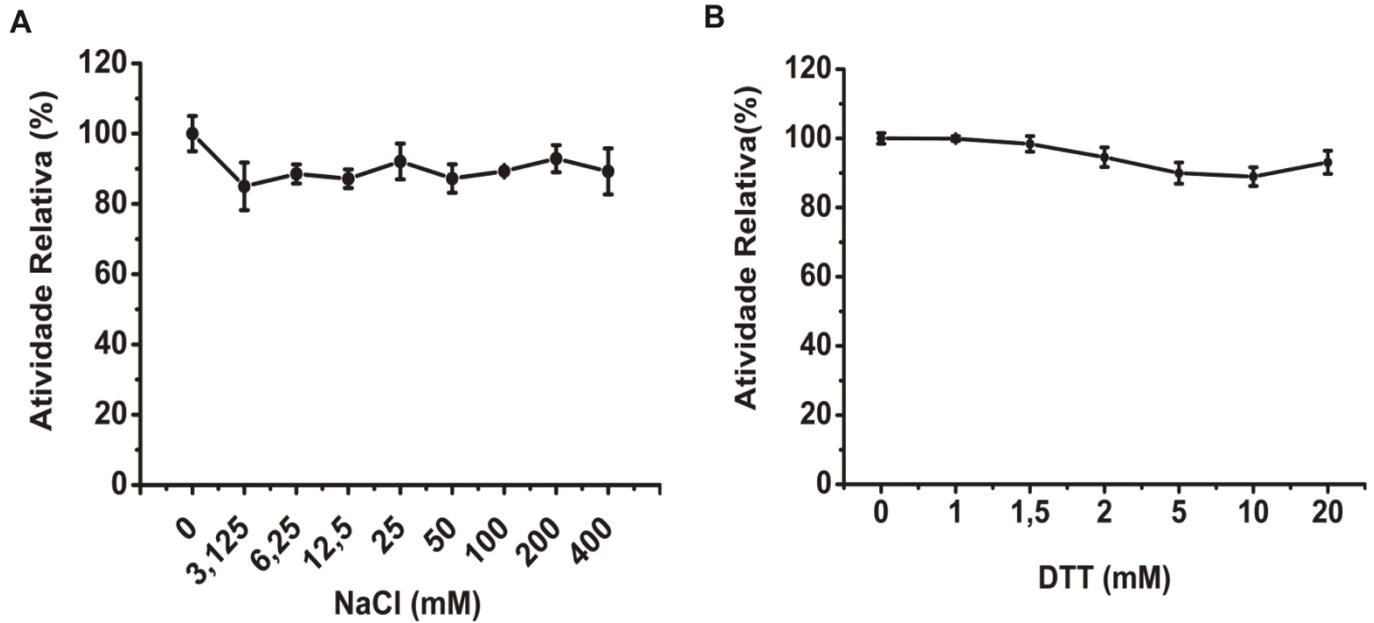
Para definir qual o melhor tampão a ser utilizado para definição dos parâmetros cinéticos da POPMT, foi realizado um teste de atividade em três tampões diferentes, Tris, Hepes e Fosfato de Sódio, para faixa de tamponamento de 7,5; faixa escolhida após o teste de influência do pH. Como observado na figura 18, a proteína teve melhor atividade enzimática na presença do tampão Tris. Com o tampão Hepes a atividade ficou em apenas 30% e com o tampão Fosfato de Sódio ficou em 80%. Ainda seguindo uma padronização, os testes enzimáticos para determinação de parâmetros bioquímicos foram realizados em tampão Tris 25 mM pH 7,5 denominado como tampão de atividade.



**Figura 18. Efeito de diferentes tampões na atividade relativa da rPOPmt.** O substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC foi adicionado à reação contendo o tampão e rPOPmt (300 ng). A leitura da liberação do AMC foi realizada durante 20 min.

#### Efeitos de NaCl e DTT na catálise da rPOPmt

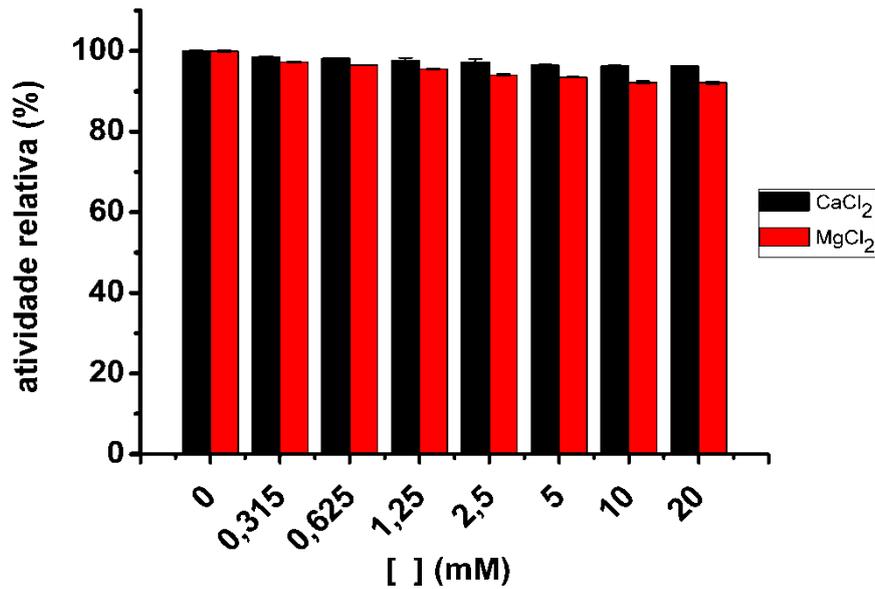
A sensibilidade a aditivos como sais e substâncias reativas ao grupo tiol é conhecida por melhorar a atividade enzimática de membros da família de POPs (Usuki *et al.*, 2009). Baseado nisso, foram testados dois aditivos, NaCl e DTT, para determinar sua influência na atividade da enzima. Diferentes concentrações de NaCl (0 – 400 mM) foram adicionadas em tampão de atividade com molaridade constante utilizando o substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. Como mostra a figura 19A, a presença de NaCl não alterou o padrão catalítico da enzima quando comparado com o controle (sem NaCl). O mesmo resultado foi observado quando utilizadas concentrações crescentes do agente redutor DTT como aditivo, ou seja, sua presença não influenciou na atividade enzimática da rPOPmt (Fig. 19B), como observado para outras enzimas pertencentes da família de POP como a Oligopeptidase B de *T. cruzi* (Motta *et al.*, 2012), porém na atividade enzimática de POP de *T. cruzi* e *T. brucei*, esse reagente aumenta em torno de cinco vezes a capacidade de hidrólise das enzimas (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2010).



**Figura 19. Influência de aditivos na atividade enzimática da rPOPmt.** A proteína purificada (300 ng) foi incubada em tampão de atividade com (A) diferentes concentrações de NaCl (0-400 mM) e (B) DTT (0-20 mM), sua atividade foi medida por 20 min após adição de 20  $\mu$ M do substrato específico. Os resultados são descritos como a porcentagem de atividade relativa em relação ao valor máximo obtido para cada condição.

#### **Influência da Força Iônica na atividade enzimática da rPOPmt**

A análise da influência da força iônica na atividade enzimática da rPOPmt foi realizada com diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$  (0 a 20 mM) e  $\text{MgCl}_2$  (0 a 20 mM). Esses íons foram adicionados em tampão de atividade com molaridade constante. Isso permite a análise do papel da interação de íons livres com a proteína recombinante na velocidade da reação enzimática. Como observado com os aditivos, a atividade relativa da enzima não sofreu alteração com a adição de  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$  quando comparada ao controle (sem íon) (Fig. 20).

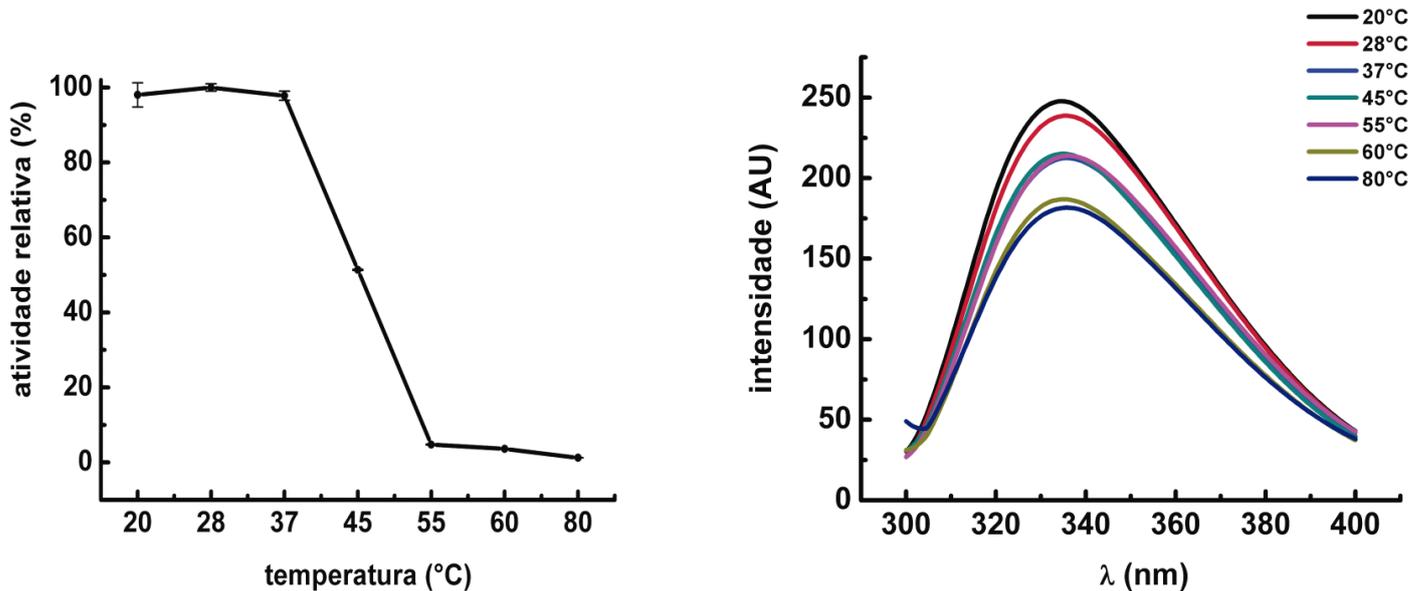


**Figura 20. Influência da Força Iônica na atividade enzimática da rPOPMT.** A proteína purificada (300 ng) foi incubada em tampão de atividade com diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> (0 a 20 mM) (barra preta) e MgCl<sub>2</sub> (0 a 20 mM) (barra vermelha). Atividade foi medida por 20 min após adição de 20 μM do substrato específico. Os resultados são descritos como a porcentagem de atividade relativa em relação ao valor máximo obtido para cada condição.

### **Influência da temperatura na atividade enzimática e na estrutura da rPOPMT**

O próximo passo para caracterização bioquímica da rPOPMT foi testar a influência de diferentes temperaturas na atividade da enzima sobre seu substrato específico. A enzima foi incubada em tampão de atividade por 20 min em diferentes temperaturas (20 a 80 °C) na presença de 20 μM N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. Os resultados obtidos apontam para maior atividade da enzima a 28 °C, apresentando uma estabilidade na atividade no intervalo de 20 °C a 37 °C (97% e 96% de atividade relativa, respectivamente), só apresentando uma redução de 50% na atividade quando atinge a temperatura de 45 °C, sendo inferiores nas demais temperaturas (Fig. 21A). O estudo da estabilidade da estrutura terciária foi realizado a partir do espectro de emissão do triptofano em diferentes temperaturas (Fig. 21B). Diferentemente do esperado, a estrutura da enzima parece não ter sido modificada com o aumento da temperatura, o que poderia sugerir uma estabilidade estrutural para rPOPMT, no

entanto outros dados precisam ser obtidos para confirmar esta provável estabilidade estrutural da protease.



**Figura 21. Influência da temperatura na atividade relativa e na estrutura terciária da rPOPmt.** A. O substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC foi adicionado à reação após as amostras atingirem a temperatura indicada. A reação ocorreu por 20 min e foi interrompida com a adição de etanol absoluto. A leitura foi realizada pelo acúmulo da fluorescência liberado pelo AMC hidrolisado no período indicado. B. O espectro de fluorescência intrínseco da proteína foi realizado a 25 °C com excitação a 295 nm e emissão entre 305 a 400 nm em diferentes temperaturas.

### Perfil de inibição da rPOPmt

O ensaio de inibição enzimática com inibidores de proteases foi realizado para confirmar a classificação predita da rPOPmt como uma enzima da família serino-protease. O teste consistiu em uma incubação prévia do inibidor (com concentrações conforme a tabela 3) com a rPOPmt por 15 min no tampão de atividade, seguido da adição do substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC à reação. Conforme mostrado na tabela 03, a enzima foi parcialmente inibida por AEBSF e TLCK, 33 e 35%, respectivamente. Por outro lado, o TPCK, um inibidor de protease do tipo quimotripsina, inibiu 66% da atividade da enzima. Leupeptina, E64, pepstatina A e inibidores de metaloproteinase, tais como fenantrolina, bestatina e EDTA não tiveram

nenhum efeito sobre a atividade da enzima. O padrão de inibição observado foi como já descrito para outras POPs (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2010), a rPOPmt não foi sensível a inibidores de outras classes que não a de serino-proteases. Estes resultados confirmam que a POPmt pertence a classe das serino-proteases.

**Tabela 3.** Perfil de inibição da rPOPmt por inibidores de protease

Inibidor	Concentração (mM)	Inibição (%)
AEBSF	1	33
Bestatin	0.1	n.i
E-64	0.1	n.i
EDTA	1	n.i
Leupeptin	0.1	n.i
Pepstatin A	0.1	n.i
Phenanthroline	0.1	n.i
TLCK	0.1	35
TPCK	0.1	66

n.i, Nenhuma inibição. Os ensaios foram realizados incubando 300ng de rPOPmt com cada inibidor por 15 min, depois foi adicionado 20  $\mu$ M do substrato à reação. A hidrólise do substrato foi registrada por 20 min.

Para corroborar a sua classificação como um membro da família prolil oligopeptidase propriamente dita, o efeito de Z-Pro-prolinal, um inibidor específico para POP foi testado (Wilk e Orłowski, 1983; Yoshimoto *et al.*, 1987). O valor do IC<sub>50</sub> encontrado foi de 4,17 nM, determinado pela incubação do inibidor com a proteína purificada durante 1h. Z-Pro-Prolinal inibiu a atividade de rPOPmt sobre o seu substrato específico com um *K<sub>i</sub>* de 16,87 nM determinado pelo método Cheng-Prusoff.

#### Parâmetros cinéticos da rPOPmt

A incubação da enzima com um gradiente de concentrações do substrato possibilitou inferir a quantidade necessária de N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC para a

enzima atingir metade de sua velocidade máxima. Valores mais precisos da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) foram obtidos por meio de regressão linear pelos métodos de Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf. As fórmulas utilizadas na regressão encontram-se a seguir:

$$\text{Lineweaver-Burk: } 1/V_0 = (K_M/V_{max}) \cdot (1/S) + 1/V_{max}$$

$$\text{Hanes-Woolf: } S/V_0 = (S/V_{max}) + (K_M/V_{max})$$

Os valores obtidos em cada regressão estão descritos na tabela 4. A eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) da enzima, também foi calculada, sendo  $21.838 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

**Tabela 4.** Constante de Michaelis Menten ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ) da enzima pelos métodos de regressão utilizados. O valor de  $R^2$  corresponde à confiabilidade da regressão.

Tipo de Regressão	$K_m^*$	$V_{max}^{**}$	$R^2$
Lineweaver-Burk	108	57012,585	0,992
Hanes-Woolf	150	77256,6425	0,9809

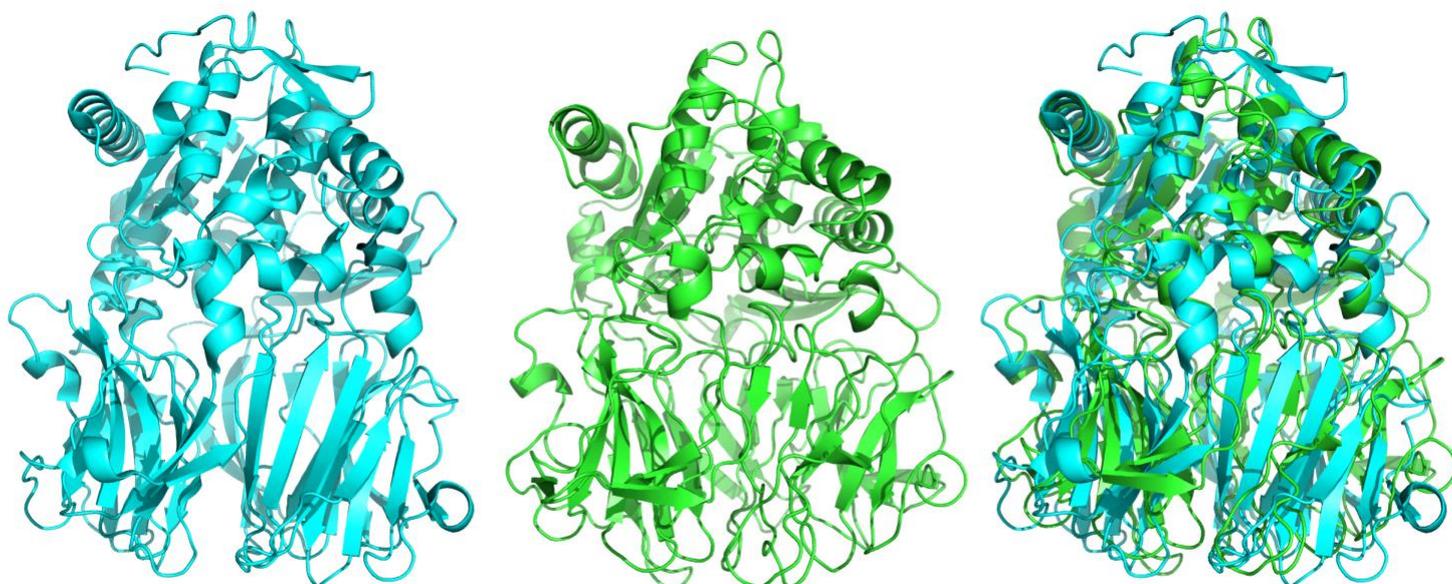
\*A unidade de  $K_m$  é dada em  $\mu\text{M}$ ;

\*\*A unidade de  $V_{max}$  está em miliunidades de fluorescência por minuto.

### Modelagem por homologia e Dinâmica Molecular

O modelo da POPMt foi construído com base na estrutura cristalográfica da cadeia B de Prolil Oligopeptidase de *Myxococcus xanthus*, PDB 2BKL, com o auxílio do programa Discovery Studio 2.5 (Accelrys). Com esse aplicativo foram feitas as etapas da modelagem (MODELER) e de minimização de energia. A minimização de energia foi realizada em campo de força CHARMM, com carga parcial Momany-Rome, pelo protocolo “*Smart Minimizer*” (1000 passos de minimização do tipo “*steepest descent*” seguidos de 200 passos de minimização de gradiente conjugado) em um solvente implícito do tipo GBSW (Generalized Born with a simple SWitching). Após alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das duas espécies pode-se verificar que alguns resíduos permanecem conservados, apresentando uma identidade entre elas de 37%, como visto na Fig. 10.

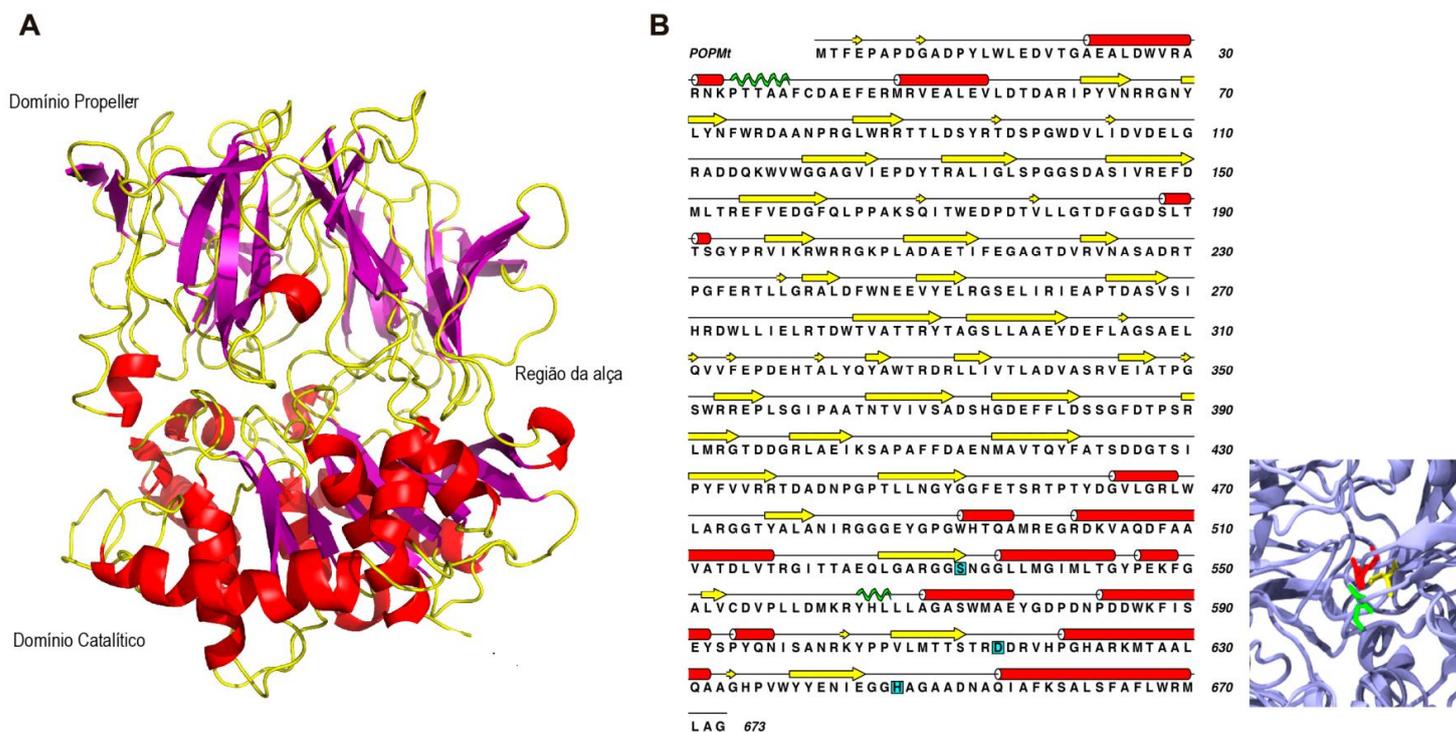
O modelo obtido por minimização de energia, conforme observado na figura 22 mostrou-se bem enovelado, com poucas diferenças da estrutura cristalográfica. Uma dinâmica molecular de relaxamento mostrou-se necessária para validar o modelo e, também, para averiguar possíveis interações intramoleculares desfavoráveis que possam levar a uma perda de estrutura. A dinâmica de equilíbrio molecular permitiu um relaxamento da macromolécula, levando a estrutura a um estado de energia mais baixo tornando a estrutura mais estável.



**Figura 22. Modelagem molecular por homologia da POP de *M. tuberculosis*.** O molde (estrutura em azul à esquerda) (PDB 2BKL) e o modelo (estrutura em verde no meio) foram sobrepostos (estrutura sobreposta à direita) para observação do posicionamento das estruturas secundárias.

A estrutura macromolecular POPMt é dividida em dois domínios (Fig. 23A), com um domínio catalítico  $\alpha/\beta$  hidrolase e um domínio  $\beta$ -propeller, como já descrito para outras POPs (Polgár, 2002). O domínio  $\beta$ -propeller é baseado em repetição de sete vezes de quatro folhas  $\beta$  antiparalelas. No caso das POPs, este domínio é considerado de topologia “open-velcro”, onde primeira e sétima lâminas são ligadas apenas por meio de interações hidrofóbicas, apesar de as suas sequências primárias divergirem (Kaushik e Sowdhamini, 2011). A sequência de aminoácidos de POPMt com sua estrutura secundária atribuída está mostrada na figura 23B compreendendo: coil, folha

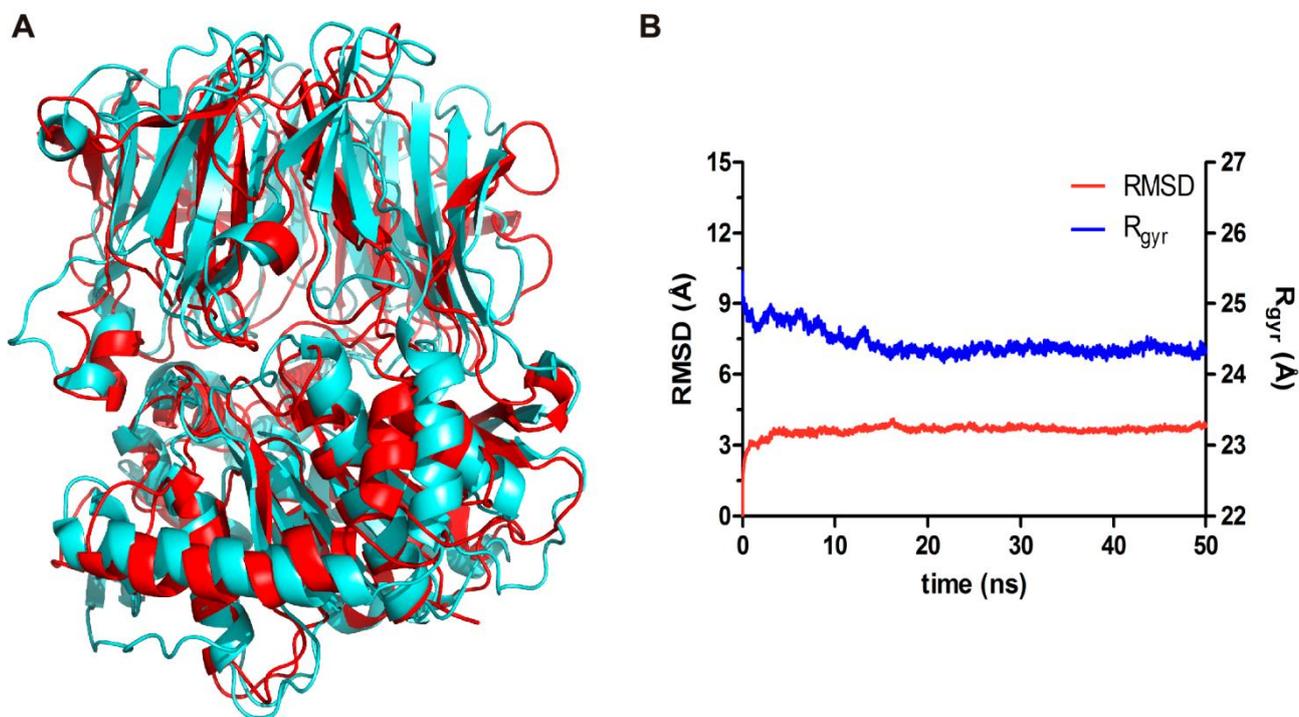
$\beta$ ,  $\alpha$ -hélice e hélice Pi. A tríade catalítica Ser-Asp-His característica da família na porção C-terminal é realçada na Figura 23B e, como apresentado anteriormente, também é preservada em outras POPs.



**Figura 23. Modelo estrutural tridimensional da POPMt.** **A.** Estrutura composta de dois domínios: domínio catalítico  $\alpha/\beta$  hidrolase e domínio  $\beta$ -propeller; **B.** Sequência de aminoácidos da POPMt com a estrutura secundária atribuída: coil (linha preta), folha  $\beta$  (amarelo),  $\alpha$ -hélice (vermelho), hélice Pi (verde). Em destaque estão marcados os resíduos que participam da tríade catalítica: Ser 532 (amarelo), Asp 615 (verde) e His 647 (vermelho).

A sobreposição de ambas as estruturas (POP *M. Xanthus* e *M. tuberculosis*) mostra um RMSD máximo de 4,86 Å (Fig. 24), ou seja, o valor corresponde à distância entre as cadeias principais das duas proteínas sobrepostas. A estrutura da POP *M. xanthus* foi resolvida por meio de cristalografia, o que fornece uma estrutura final endurecida devido à compressão inerente no processo de cristalização, o que resulta na incapacidade de alojamento da estrutura e da sua adaptação ao respectivo ambiente. As estruturas que são submetidas a ensaios de dinâmica molecular passam

por um processo de relaxação e ajustes, sempre guiados por restrições bioquímicas e estruturais.

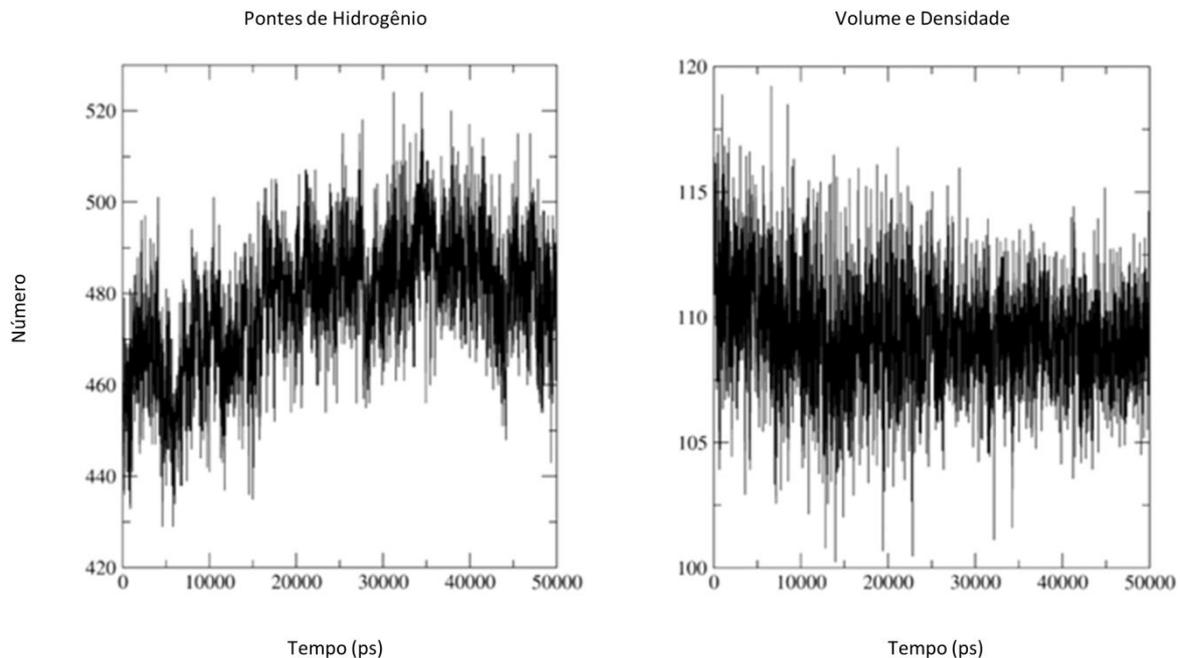


**Figura 24. Análise da dinâmica molecular da POPMt.** (A) Superposição da estrutura da POPMt (azul) com a POPMx (vermelho). (B) RMSD vs. Tempo e Raio de Giro vs. Tempo.

O processo de relaxamento da estrutura da POPMt favoreceu a diminuição do raio de giro (Fig. 24B), que pode ser devido ao aumento do número de ligações de hidrogênio (Fig. 25), durante a dinâmica. A diminuição do raio de giro é dada em função das ligações feitas pelos resíduos de aminoácidos ao longo da dinâmica. Ligação como as de hidrogênio cooperam para reduzir o volume do sistema e, assim, aumentar o grau de compactação da proteína.

O número de ligações de hidrogênio aumenta significativamente à medida que o sistema evolui. Estas ligações aumentam tanto a estabilidade do sistema e do seu grau de compactação e, também são responsáveis por manter a estabilidade de conformações estruturais. A área acessível ao solvente, que corresponde à área de solvente foi removida, devido à relação da proteína com ele mesmo (dados não

mostrados). Ao se dobrar, a proteína contrai, o que resulta na redução da área acessível ao solvente com diminuição do volume da proteína, caracterizando a separação das porções hidrofóbicas e hidrofílicas (Fig. 25).

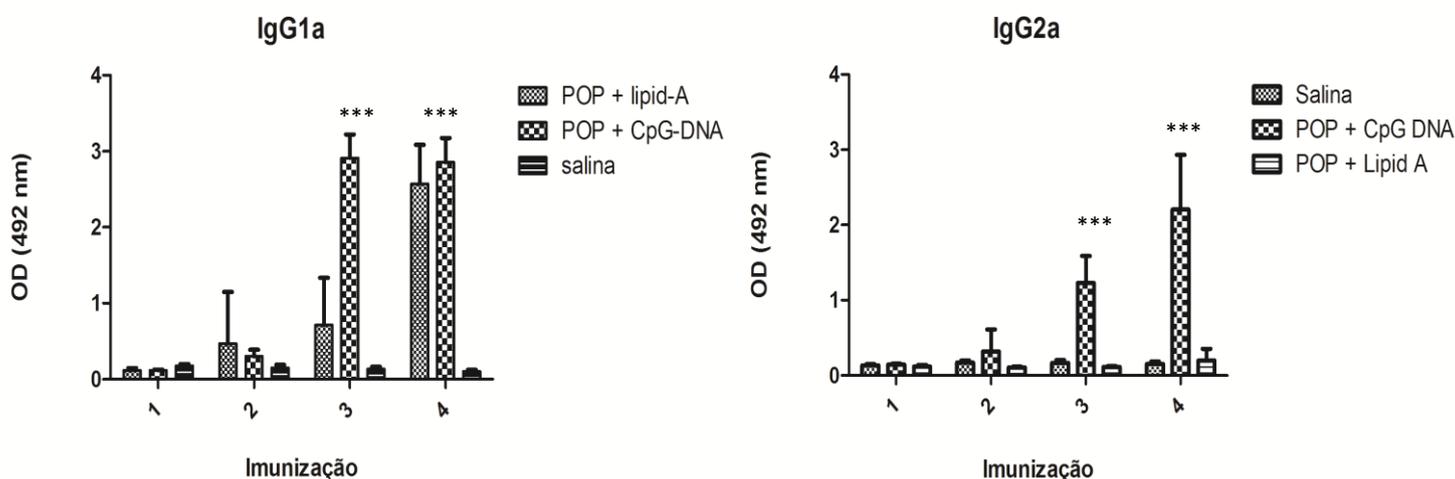


**Figura 25. Análise da dinâmica molecular do modelo proposto para a POPMt.** Aumento do número de ligações de hidrogênio com o tempo e diminuição do volume e densidade da proteína com o tempo.

### **Imunogenicidade da rPOPmt em camundongos**

Para avaliar o quanto a rPOPmt pode ser usada como uma subunidade de vacina, vacinas contendo a enzima recombinante foram formuladas com CpG DNA ou Lípidio A como adjuvante, para tal teste três imunizações subcutâneas foram realizadas em camundongos BALB/c. O grupo controle foi vacinado apenas com solução salina. O nível de anticorpos IgG1 e IgG2a foi medido quinze dias após a terceira imunização. Após esse período, altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a foram observados tanto na formulação com CpG DNA como com Lípidio A comparados com o controle (Salina) (Fig. 26). Porém, apenas para o grupo CpG DNA foi detectado um

nível maior de anticorpo IgG2a conhecido como marcador de resposta imune do tipo Th1 (Flynn e Chan, 2001; Maassen *et al.*, 2003).



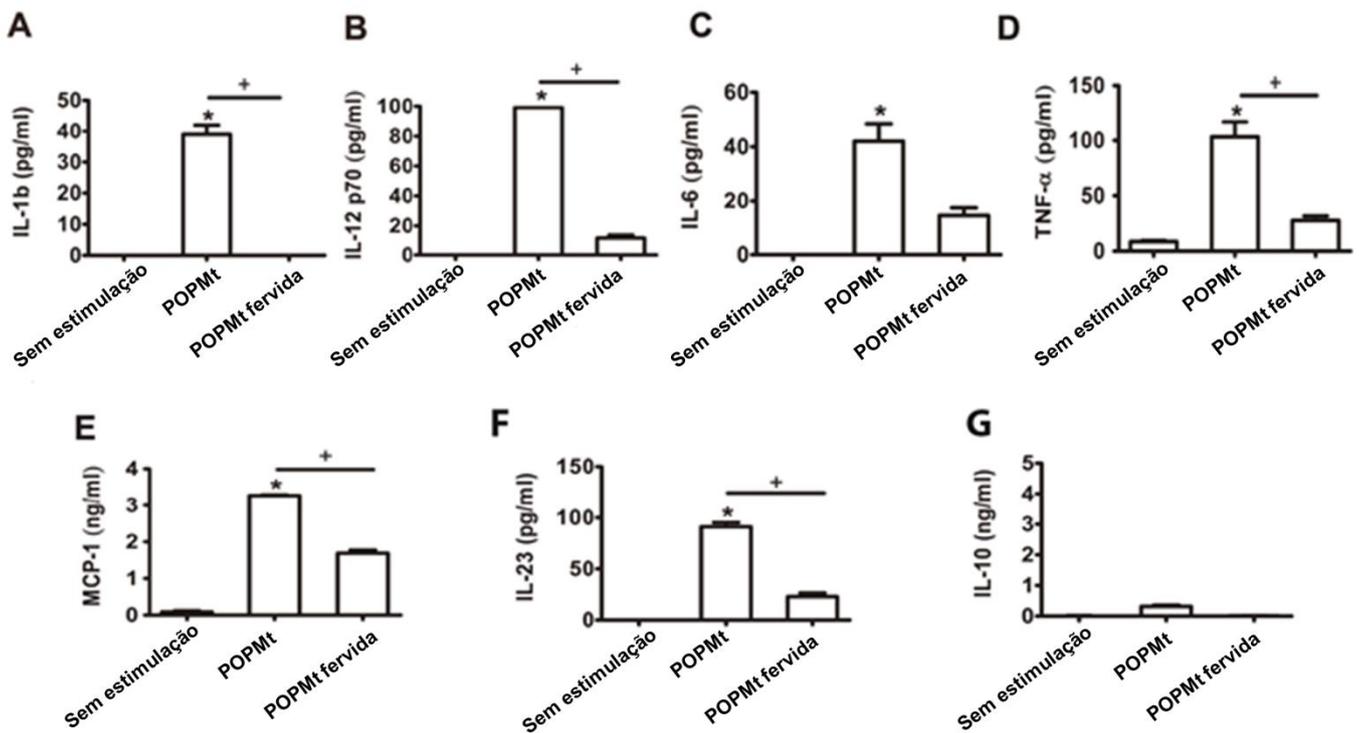
**Figura 26. Dosagem dos níveis de IgGs após cada imunização.** O nível de IgG1 (à esquerda) e IgG 2a (à direita) mensurados por ELISA. Vacina de rPOPMT com dois adjuvantes (CpG DNA ou Lipid A). Cada condição testada foi realizada em triplicata. \*\*\* P<0,001

Como a resposta imune do tipo Th1 está associada com a proteção, investigamos se a vacina subcutânea com a proteína e o adjuvante CpG DNA poderia induzir uma resposta específica Th1 nos baços e pulmões de camundongos vacinados com essa formulação e, posteriormente, infectados com *M. tuberculosis*. Para isso, as células desses órgãos foram analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células TCD4<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  no grupo de camundongos que foram imunizados com a formulação POP com CpG e apenas com solução salina (grupo controle) foram analisados, porém não mostrou uma mudança significativa entre eles (dados não mostrados). Esses dados foram analisados de forma preliminar, sendo necessário novos experimentos para definir se a formulação de vacina contendo a proteína POP será capaz de induzir uma resposta imunitária específica TCD4<sup>+</sup>.

## Perfil de secreção de citocinas *in vitro* por macrófagos murinos após incubação com rPOPMT

### *rPOPMT* induz a produção de citocina pró-inflamatória *in vitro*

Para investigar as propriedades imunomoduladoras do rPOPMT no desencadeamento de respostas imunitárias *in vitro*, os macrófagos peritoneais foram estimulados com rPOPMT durante 24h. rPOPMT desencadeou, significativamente, a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$ , bem como de quimiocina MCP-1 após 24 h (Fig. 27 A-F). No entanto, não conseguiu desencadear a secreção da citocina IL-10 que é anti-inflamatória e imunossupressora (Figura 27G). Além disso, todas as citocinas e a secreção de quimiocinas induzidas por rPOPMT analisadas foram largamente dependente da atividade rPOPMT, uma vez que a produção de citocinas e quimiocinas induzidas por rPOPMT fervida foram significativamente reduzidos em comparação com a enzima correspondente intacta.



**Figura 27. Imunomodulação dirigida por rPOPMT. Macrófagos peritoneais foram estimulados com rPOPMT por 24h *in vitro*.** Os níveis de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-12p70, (C) IL-6, (D) TNF- $\alpha$ , (E) MCP-1, (F) IL-23 e (G) IL-10 foram analisados no sobrenadante. Unstimulated – sem estimulação. Diferenças estatísticas entre rPOPMT e rPOPMT que foi fervida estão representadas pelo símbolo +. \* P<0,05.

# DISCUSSÃO

---

Nessa tese foi relatado a identificação, purificação, caracterização bioquímica, dinâmica molecular e propriedades imunomoduladoras de uma prolil oligopeptidase de *M. tuberculosis*. No banco de dados de *M. tuberculosis*, a enzima foi descrita como uma provável serino-protease pertencente a família prolil oligopeptidase S9, subfamília S9A e nossos resultados bioquímicos e estruturais corroboraram essa classificação. Algumas prolil oligopeptidases foram descritas em bactérias como *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto, Walter e Tsuru, 1980; Yoshimoto *et al.*, 1991), *Sphingomonas capsulate* (Kabashima *et al.*, 1998), *Aeromonas hydrophila* (Kanatani *et al.*, 1993) e *Myxococcus xanthus* (Shan *et al.*, 2004), mas esse é o primeiro estudo que caracterizou a POP em micobactérias.

A análise da sequência de aminoácidos deduzida de POPMt revelou uma homologia com prolil oligopeptidases de *Mycobacterium avium*, *M. bovis* e *M. smegmatis* com cerca de 99,5% a 64,90% de identidade. Por outro lado, a identidade com o POP humano é de cerca de 20,6%. Em teoria isso facilitaria o desenvolvimento de fármacos seletivos, isto é, com efeitos colaterais reduzidos em humanos.

Os anticorpos policlonais produzidos pelos camundongos imunizados foram eficientes no reconhecimento da proteína recombinante e da proteína no extrato total de *M. tuberculosis* por immunoblot, neste tipo de ensaio a proteína está na sua forma desnaturada, logo, os anticorpos policlonais reconhecem epítopos presentes na sequência primária da proteína. Com isso, mostrou-se imunogênica em camundongos.

A expressão heteróloga de proteínas fusionadas a uma cauda é uma estratégia bastante utilizada na produção de proteínas recombinantes (Drewes e Bouwmeester, 2003; Terpe, 2003). A purificação por afinidade de proteínas usando caudas fusionadas às suas sequências, tais como tioredoxina (TRX)<sup>2</sup> (Lavallie *et al.*, 1993; Yuan e Hua, 2002), glutationa S-transferase (GST) (Nygren, Ståhl e Uhlén, 1994; Sun *et al.*, 2005) e sequências de poli-histidina, que são clonadas e expressas como parte da proteína de interesse, permite purificações de muitas proteínas por cromatografias simples. A fusão da cauda de histidina à porção N-terminal da POPMt favoreceu a sua purificação na forma ativa que possibilitou os ensaios enzimáticos com a mesma.

Já é conhecido da literatura que POPs clivam, preferencialmente, ligações peptídicas do lado C-terminal de prolina (Pro-X) e, a uma taxa baixa, alanina (Ala-X) (Yoshimoto *et al.*, 1978). Nossos ensaios enzimáticos mostraram que o substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC, que contém a prolina na posição P1, foi hidrolisado de forma mais eficiente entre todos os testados. Este resultado está de acordo com o visto para outras POPs já estudadas no laboratório, a de *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2010). No que diz respeito ao substrato com Ala na posição P1 (N-Suc-Ile-Ala-AMC), a rPOPmt, diferentemente do esperado, não foi capaz de hidrolisá-lo. Isto pode ser devido à presença de um resíduo isoleucina na posição P2 do substrato testado e já foi descrito que POP tem preferência para resíduos tais como Ala, Pro, Phe e Gly nessa posição (Van Elzen e Lambeir, 2011).

Os aditivos utilizados (DTT e NaCl) são elementos descritos por influenciar a atividade da família POP (Usuki *et al.*, 2009), mas não pode ser verificado em relação a atividade enzimática da rPOPmt. No entanto, essa insensibilidade a NaCl e DTT também já foi relatada para outros membros da família prolil oligopeptidase. Por exemplo, os reagentes com grupo tiol não interferem na atividade da oligopeptidase B do *T. cruzi* (Motta *et al.*, 2012), nem POP de *Flavobacterium meningosepticum* e *Lyophyllum cinerascens* (Yoshimoto *et al.*, 1988; Yoshimoto *et al.*, 1991). Na oligopeptidase B de *T. brucei*, um resíduo Cys na posição 255 foi identificada como o aminoácido responsável pela interação com reagentes de tiol (Morty *et al.*, 2005). Também foi mostrado que POP do cérebro de porco é inibida por pCMB, um inibidor de cisteína protease, possivelmente por meio de reação com Cys255, um resíduo localizado perto do local de ligação ao substrato da enzima (Szeltner, Renner e Polgár, 2000). A insensibilidade da rPOPmt ao DTT pode ser atribuída à ausência, na sua sequência primária, do aminoácido cisteína na posição 255, que parece ser o responsável pela interação com reagentes com grupo tiol. Além disso, POPmt possui dois resíduos de cisteína previstos na sequência primária de seus aminoácidos, na posição 40 e 554 e, de acordo com os nossos estudos de dinâmica molecular, a distância entre estes resíduos de Cys foi mantida em aproximadamente 17 Å durante a simulação, tal distância não é favorável para a formação de ponte de dissulfeto, que é postulada entre 4,4 e 6,8 Å (Richardson, 1981).

O pH e temperatura ótimas para a atividade da POPMt foram de 7,5 e 28 °C, respectivamente, valores compatíveis com aqueles já descritos para outras POPs (Yoshimoto, Walter e Tsuru, 1980; Szwajcer-Dey *et al.*, 1992; Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2010). Espectroscopia de fluorescência tem sido amplamente explorada em estudos estruturais e funcionais das proteínas e com o intuito de observar o comportamento da estrutura terciária da rPOPMt em diferentes temperaturas, monitoramos o espectro de emissão de triptofano. De uma forma geral, o aumento da temperatura afeta, primeiramente, as interações necessárias para manutenção da estrutura terciária. Quando essas interações são rompidas, a molécula adquire uma estrutura mais flexível, expondo certas partes que antes estavam em ambientes mais hidrofóbicos e agora interagem mais com o solvente e isso pode ser detectado pela mudança no comprimento de onda máximo de emissão do triptofano (conforme explicado na introdução).

De acordo com a sua sequência primária de aminoácidos, POPMt contém vinte resíduos de triptofano distribuídos por toda a molécula que parecem estar semi-enterrados na molécula, uma vez que, a temperatura ambiente, o comprimento de onda máximo de emissão do triptofano foi de 335 nm. Mesmo com o aumento da temperatura não se observou nenhum deslocamento no espectro de emissão, o que indica que não houve muita variação na estrutura terciária da rPOPMt. Esse resultado foi bastante intrigante porque mesmo em elevadas temperaturas (acima de 70 °C), a molécula ainda permaneceu estruturada. No entanto, a enzima perde 50% da sua atividade enzimática a 45 °C, o que indica modificação na sua estrutura. Outros experimentos são necessários para o entendimento do comportamento da estrutura desta proteína em temperaturas elevadas. Estudos de fluorescência intrínseca do triptofano já foram usados para sondar a estrutura terciária e o desdobramento de duas anidrases carbônicas, Rv3588c e Rv1284 de *Mycobacterium tuberculosis* (Mukherjee, Saha e Das, 2009).

Inibidores clássicos de proteases foram utilizados para estabelecer o perfil de inibição da atividade enzimática da rPOPMt. Na presença de AEBSF, um típico inibidor de serino protease, a enzima manteve somente 66% da sua atividade. A rPOPMt foi

altamente susceptível a TPCK, um inibidor de protease quimiotripsina símile, com 66% de inibição. Esses resultados também são comparáveis aos observados para POP de *T. brucei* cuja inibição foi de 12% e 91% utilizando AEBSF e TPCK, respectivamente (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2010). Um grande número de inibidores específicos de POP já foram sintetizados e desenvolvidos (Yoshimoto *et al.*, 1987; Venäläinen *et al.*, 2006), um destes é o Z-Pro-prolinal. Algumas funções do Z-Pro-prolinal estão relacionadas com a prevenção de estresse celular induzido pela produção ROS ou translocação de GAPDH (Puttonen *et al.*, 2006). Esse inibidor específico foi utilizado em estudos de determinação do valor de  $IC_{50}$  e constante de inibição,  $K_i$ , para rPOPMT, 4,17 nM e 16,87 nM, respectivamente. O  $K_i$  foi ligeiramente mais elevado do que o encontrada para o POP de cérebro de coelho, de 14 nM (Wilk e Orłowski, 1983) e a inibição foi menos eficaz quando comparado a da POP de rato e humanos com valor de  $K_i$  de 0,35 e 0,50 nM, respectivamente (Bakker *et al.*, 1990). Essa diferença pode indicar diferenças na bolsa catalítica entre essas POPs e a POPMt, uma vez que já se sabe que a ligação do resíduo prolinal do inibidor interage com o subsítio S1 e, com isso, a formação de um grupo hemiacetal com a serina ativa da enzima contribui para potencial inibição (Wilk e Orłowski, 1983).

Outro foco do trabalho foi a geração de um modelo da estrutura da POPMT para que o mesmo possa ser empregado em *screening* virtual de inibidores com potencial para uso terapêutico. Após a geração do modelo da estrutura terciária da enzima, partimos para a dinâmica molecular onde fomos capazes de observar a estabilidade do nosso modelo de homologia e a segurança de utilizá-lo como ferramenta de estudo. Após a dinâmica molecular, a estrutura da proteína mostrou-se estável e observou-se a semelhança com a estrutura de outras POP. A enzima tem uma forma cilíndrica e possui dois domínios: o catalítico e o  $\beta$ -propeller. O domínio catalítico tem o arranjo clássico de  $\alpha/\beta$  hidrolase, formado pela porção N- e C-terminal da enzima. Em geral, domínios  $\beta$ -propellers são constituídos por folhas  $\beta$  antiparalelas que se dispõem em forma de pás de hélice (em média de 4 a 8) estabilizadas por um “Velcro”, rede de pontes de hidrogênio, entre a primeira e última pá. No caso da POP, as folhas  $\beta$  antiparalelas do domínio  $\beta$ -propeller estão dobradas e arranjadas radialmente em volta de um túnel central. No entanto, este túnel é estabilizado por

ligações hidrofóbicas entre a primeira e última pé e não pelo “Velcro”, como esperado. A tríade catalítica de POPMt (Ser 532, Asp 615 e Sua 647) manteve-se conservada em relação às outras POPs e está localizada na interface entre os domínios catalítico e  $\beta$ -*propeller* (Rea e Fülöp, 2006).

Como pôde ser observado pelas análises realizadas após a dinâmica molecular, a POPMt adotou características próprias que fez com que ela se diferenciasse da POPMx que foi usada como *template*, que pode ser observado pela diminuição de seu volume, área acessível ao solvente e raio de giro, e pelo aumento do número de pontes de hidrogênio formadas entre os resíduos da proteína bem como de seu RMSD. Dados extraídos desta trajetória de dinâmica molecular serão usados para identificar agrupamentos conformacionais de famílias que serão utilizadas em conjunto de acoplamentos visando a identificação de novos compostos para o tratamento de tuberculose. Além disso, por meio de simulações de mutações de alguns resíduos juntamente com o encaixe do substrato ou de inibidor específico no sítio catalítico poderemos observar os diferentes comportamentos estruturais da proteína. Dessa forma, o estudo da estrutura tridimensional de proteínas é fundamental para a compreensão de seus mecanismos de ação, o que implicará no entendimento dos fenômenos relacionados às suas atividades. Estudos adicionais estão sendo desenvolvidos para caracterizar o POPMt como um fator de virulência, e esforços paralelos estão sendo realizados para usar esse modelo refinado a fim de encontrar novos inibidores contra esta enzima.

Finalmente, um estudo funcional da POPMt recombinante foi realizado para observar se a proteína desencadearia uma resposta imune protetiva e imunomoduladora. A resposta imune do tipo Th1 está associada com a indução de anticorpos IgG2a específicos, devido à produção de IFN- $\gamma$ , enquanto que a indução do tipo Th2 (principalmente IL-4/IL-10) está associada com anticorpos IgG1 (Flynn e Chan, 2001; Maassen *et al.*, 2003). Para examinar a resposta imune induzida pela POP, foram analisados os níveis de diferentes subclasses de anticorpos. Níveis mais elevados de anticorpos específicos IgG1 ( $2,90 \pm 0,04$ ) e IgG2a ( $2,80 \pm 0,03$ ) foram observados para a proteína. A resposta linfocitária do tipo Th1 induz citotoxicidade e resposta inflamatória decorrente da produção de interleucinas como a IL-2, o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ .

(Maassen *et al.*, 2003; Thakurdas, Hasan e Hussain, 2004; Feng *et al.*, 2011). A importância dos anticorpos na infecção por Mtb ainda é controversa, no entanto, durante a fase extracelular, anticorpos específicos podem se ligar na micobactéria, facilitando a absorção e a fagocitose (Hoft, 2008). Além disso, anticorpos IgG2a, e em menor grau, IgG1, aumentam a atividade microbicida dos macrófagos, células NK e células T citotóxicas, por ADCC (Maassen *et al.*, 2003; Thakurdas, Hasan e Hussain, 2004; Feng *et al.*, 2011). Assim, a vacina (rPOPMT + CpG DNA) foi mais eficiente em induzir uma resposta imune humoral específica em camundongos BALB/c, já que foram observados o aumento dos níveis de IgGs após a terceira e quarta imunização.

Em alguns estudos tem sido descrito que muitas citocinas inatas possuem a função crucial de promover e manter a resposta da célula T que medeia a resistência do hospedeiro e a imunopatologia do *M. tuberculosis* (Cooper, Mayer-Barber e Sher, 2011). Estudos em camundongos e humanos mostraram que IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 são as principais citocinas envolvidas no controle de infecções por *M. tuberculosis* (Dinarello, 2003; Cooper, Mayer-Barber e Sher, 2011). Além disso, estas citocinas aumentam em casos de tuberculose e pode discriminar tuberculose ativa do estado latente (Novikov *et al.*, 2011; Mihret *et al.*, 2013; Shenderov *et al.*, 2013). Demonstramos que POPMT induz a secreção das citocinas Th1 pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, bem como IL-23 em macrófagos de camundongos, indicando que POPMT pode contribuir de forma significativa para a imunopatologia da tuberculose.

Infecção por *M. tuberculosis* também é caracterizada pela indução de níveis elevados de uma variedade de quimiocinas, como CXCL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-5, RANTES, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , MIP-2 e IP-10, e seus receptores (Orme e Cooper, 1999; Juffermans *et al.*, 2000; Mihret *et al.*, 2013). Os nossos dados demonstram que POPMT induziu a secreção de níveis elevados de MCP-1, sugerindo que POPMT poderia ser crítica no processo de recrutamento de monócitos/macrófagos. Além do recrutamento de monócitos/macrófagos, essa quimiocina inflamatória recruta células adicionais a partir do compartimento de sangue (Gerszten *et al.*, 1999) e de outras áreas do pulmão (Sertl *et al.*, 1986; Holt e Schon-Hegrad, 1987) para amplificar a resposta inflamatória. Além disso, a MCP-1 está associada com a resposta imune à infecção por *M. tuberculosis*, visto que ratos deficientes de MCP-1 tiveram defeitos persistentes no

recrutamento de macrófagos para os pulmões e uma diminuição do número de macrófagos e de células dendríticas em linfonodos mediastinais (Peters *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2004).

A secreção de IL-1 $\beta$  foi amplamente descrita por estar relacionada na infecção por Mtb (Mayer-Barber *et al.*, 2011; Novikov *et al.*, 2011; Abdalla *et al.*, 2012; Dwivedi *et al.*, 2012; Krishnan, Robertson e Thwaites, 2013). Foi demonstrado nesse trabalho que POPMt é capaz de desencadear a secreção de IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  é uma potente citocina pró-inflamatória que depende da ativação do inflamassoma para que ocorra a sua maturação e secreção. Os nossos dados sugerem que POPMt poderia ter um papel importante na indução da ativação do inflamassoma.

A compreensão da(s) função(s) desta enzima necessita de experimentos adicionais como o nocaute de seu gene e/ou o emprego de inibidores sintéticos obtidos pela varredura virtual de bibliotecas. A partir do modelo obtido pela modelagem por homologia e corroborado pela dinâmica molecular, poderemos elucidar o completo mecanismo catalítico da enzima e selecionar inibidores seletivos *in silico* para então, empregá-los em estudos de interação do patógeno com o hospedeiro.

# CONCLUSÕES

---

A caracterização bioquímica e funcional de proteases é importante já que muitas vezes são alvos farmacológicos promissores no combate a doenças onde o tratamento é insatisfatório. O presente trabalho caracteriza, pela primeira vez, uma atividade de prolil oligopeptidase em *M. tuberculosis*. A partir dos nossos estudos, foi possível concluir que:

- A sequência nucleotídica putativa do gene *pop* de *M. tuberculosis* tem uma fase aberta de leitura de 2022 pb e codifica uma Prolil oligopeptidase funcional;
- A proteína recombinante rPOPMT, referente ao produto do gene *popmt* foi expressa solúvel e ativa em *E. coli*;
- A rPOPMT possui parâmetros bioquímicos característicos da família da Prolil Oligopeptidase de serino-proteases, com atividade ótima em pH 7,5 e a 28 °C;
- O padrão de inibição indica que POPMT é uma enzima da classe serino-protease e da família prolil oligopeptase, essa última pode ser concluída porque a enzima é inibida pelo composto específico, Z-Pro-Prolinal;
- Através da modelagem por homologia de sequências foi possível obter a estrutura preliminar da POP de *M. tuberculosis* e o estudo da dinâmica molecular definiu sua estrutura. Dados extraídos desta trajetória de dinâmica molecular poderão ser usados na identificação de novos compostos para o tratamento de tuberculose.
- rPOPMT é imunogênica em camundongos, o que abre espaço para novas perspectivas de estudos de imunocitoquímica diferencial da enzima;
- POPMT induz a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, bem como IL-23 em macrófagos de camundongos, e a quimiocina MCP-1, indicando que POPMT pode contribuir de forma significativa para a imunopatologia da tuberculose.

# PERSPECTIVAS

---

Nossos dados nos permitem propor algumas perspectivas no intuito de complementar e aprofundar o que foi apresentado neste trabalho.

A modelagem da POPMt será usada como base para varredura virtual de bibliotecas de inibidores sintéticos e aqueles com melhor score serão testados *in vitro*, sobre a enzima e a micobactéria e em modelo animal da Tuberculose, *in vivo*. Essa modelagem juntamente com a elucidação completa do mecanismo catalítico da enzima será de grande importância para o desenvolvimento possíveis inibidores terapêuticos.

Além disso, tentaremos cristalizar e resolver estrutura da enzima de forma a utilizá-la como uma ferramenta de auxílio na busca de inibidores específicos para a mesma. Com a estrutura resolvida poderemos realizar um estudo estrutural para observar a possível estabilidade termodinâmica estrutural da rPOMt.

Testes funcionais utilizando a proteína como subunidade de vacina serão realizados a fim de observar a possível proteção imunológica desempenhada pela rPOPMT, para isso novas formulações de vacinas com diferentes adjuvantes serão testadas.

Por fim, realizaremos ao nocaute da POPMt. Após a confirmação do mutante nulo para *popmt*, partiremos para os estudos de viabilidade do patógeno para assim, observar o papel funcional da POPMt na infecção pelo *M. tuberculosis*.

# Enzymatic properties and molecular dynamics of Prolyl oligopeptidase from *Mycobacterium tuberculosis*

Apresentado na forma de manuscrito para publicação

## Enzymatic properties and molecular dynamics of prolyl oligopeptidase from *Mycobacterium tuberculosis*

Brina Portugal<sup>1</sup>, Flávia Nader Motta<sup>1,2</sup>, Diego O. Nolasco<sup>3,4</sup>, Kelly Grace Magalhães<sup>5</sup>, Hugo de Almeida<sup>1</sup>, Izabela M. D. Bastos<sup>1</sup>, Jaime Martins Santana<sup>1,‡</sup>

<sup>1</sup>Pathogen-Host Interface Laboratory, Department of Cell Biology, The University of Brasília, Brasília, Brazil, 70910-900, <sup>2</sup>Faculty of Ceilândia, The University of Brasília, Brasília, Brazil, 72220-140, <sup>3</sup>Curso de Física - Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil, 71966-700, <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil, 70790-160, <sup>5</sup>Laboratório de Imunologia e Inflamação, Department of Cell Biology, The University of Brasília, Brasília, Brazil, 70910-900.

<sup>‡</sup>To whom correspondence should be addressed: The University of Brasília – UnB, Department of Cell Biology - IB, Pathogen-Host Interface Laboratory, 70910-900, Brasília, DF, Brazil. Tel.: 55 61 31073055; Fax: 55 61 31072904; E-mail: jsantana@unb.br

### Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that causes more death worldwide and is characterized by an inflammatory response caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Proteases are important virulence factors in pathogens including biological processes and host interactions. Prolyl oligopeptidase (POP) is involved in the hydrolysis of biologically active peptides such as hormones and neuropeptides which seems to be correlated with neurological disorders. In this study, we present the identification, biochemical characterization, molecular dynamics and immunomodulatory properties of POP from *Mycobacterium tuberculosis* (rPOPMT). The rPOPMT revealed catalytic activity upon N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC substrate, with optimal activity at pH 7.5 and optimal temperature at 28°C. In addition, the enzyme presented Km and Kcat/Km values of POPMT toward N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC were 108 µM and 21.838 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>, respectively and is inhibited by serine proteases inhibitor. Using N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC as substrate, Z-Pro-Prolinal, a specific POP inhibitor, has a Ki value of 16.87 nM. After the dynamics the structure was stable and we observed the

similarity with the structure of other POPs. The immunomodulatory properties of POPMt in triggering immune responses *in vitro* shows that TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-23, IL-10, IL-1b and MCP-1 secretion induced by POPMt were largely dependent on POPMt activity. The recombinant protein may contribute to determining the role of the native POP in *M. tuberculosis*.

## Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that causes more death worldwide, with an estimated 8.6 million new cases and 1.3 million deaths in 2012 (Who, 2013). This disease is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), an intracellular bacterium that infects and remains within mammalian tissue (Russell, 2001) mostly in the lung (Bhatt e Salgame, 2007) and is characterized by to elicit an inflammatory response that leads to containment, but not eradication, by granuloma production.

The immune response to Mtb must be strictly regulated to support a satisfactory response in order to limit bacterial growth and dissemination while avoiding excessive inflammation that could damage host tissues. The protective response to Mtb is a complex and multifactorial process involving many components of the immune system, mainly the result of productive cooperation between macrophages and T-cell populations. Cytokines and chemokines play an important role in the innate and adaptive immune response as both effectors and regulators of mycobacterial immunity and their expression profile in CD4+T cells clearly delineates the dominant Th1-like response that is associated with control of TB infection (Cooper, Mayer-Barber e Sher, 2011).

Little is known about proteases role in *M. tuberculosis*. However, it became clear that they play important role in pathogenicity and viability of *M. tuberculosis*. For example, *M. tuberculosis* possesses two potential ClpP proteolytic subunits (ClpP1P2), each of which is required for full activity of a single proteolytic complex role that is important for viability being required for bacterial growth during infection and growth in mice (Raju *et al.*, 2012). Another example is Rv2224c that is predicted to be a probable exported protease (Cole *et al.*, 1998). This peptidase is required for bacterial survival (Sasseti e Rubin, 2003; Lamichhane, Tyagi e Bishai, 2005) and modulates the innate immune response in macrophages in infected mice and also is important to extracellular release of the Mt stress-induced protein (Rengarajan *et al.*, 2008).

The prolyl oligopeptidase (POP) is a serine peptidase involved in the metabolism of peptide hormones and neuropeptides, which seems to be correlated with neurological disorders (Koida e Walter, 1976). Alterations in POP enzymatic activity have been measured in patients suffering from depression, mania, schizophrenia, nervous anxiety, anorexia and bulimia (Maes *et al.*, 1995; Maes *et al.*, 1998; Maes *et al.*, 2001), including Alzheimer's and Parkinson's diseases (Mantle *et al.*, 1996) and an autoimmune disorder, multiple sclerosis (Tenorio-Laranga *et al.*, 2010). POP also seems to be related to regulation of pathways involving inositol (1,4,5)-triphosphate (IP<sub>3</sub>), it was already shown that low levels of the enzyme cause neurotrophic effects by increasing IP<sub>3</sub> (Williams *et al.*, 1999; Williams e Harwood, 2000; Maes *et al.*, 2001). In addition, POP orthologous enzymes from some pathogens have been described as virulence factors of infectious diseases, as in the case of trypanosomiasis. In *T. cruzi*, POPTc80 is secreted by infective forms and hydrolyzes extracellular matrix components such as collagen and fibronectin. Selective and specific POPTc80 inhibitors block *in vitro* trypomastigotes entry into different types of non-phagocytic cells reinforcing the enzyme role in cell invasion (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2010) (Bastos *et al.*, 2005). POP of *T. brucei* is active in the plasma of infected mice and is capable of hydrolyzes native collagen and peptide hormones that are deregulated in sleeping sickness (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2010), suggesting POPs as potential target for drug development (Klemba e Goldberg, 2002).

Concerning structure features, data obtained by crystallization, three dimensional modeling, molecular dynamics, spectroscopic analysis and site-directed mutagenesis have showed that POPs are structurally similar enzymes that consist of a cylindrical architecture divided into an  $\alpha/\beta$  hydrolase catalytic domain and a  $\beta$ -propeller domain (Polgár, 2002). The  $\alpha/\beta$  hydrolase is a structurally conserved domain with diverse catalytic functions also present in acetylcholinesterase, diene lactone hydrolase, lipase, thioesterase, serine carboxypeptidase, proline iminopeptidase and others (Holmquist, 2000). This domain in POP is formed by the folding of the C-terminal and a short extension of the N-terminal region. The internal cavity of the POP  $\beta$ -propeller domain forms a funnel with a lower face opening toward the external milieu and an upper face covalently joined to the  $\alpha/\beta$ -hydrolase domain (Fülöp, Böcskei e Polgár, 1998; Shan, Mathews e Khosla, 2005a; Haffner *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

In this work, we present the biochemical and enzymatic properties of the prolyl oligopeptidase from *M. tuberculosis* and information about its three-dimensional structure based on molecular dynamics experiments. Furthermore, we investigate murine macrophages immunomodulatory response elicited by the enzyme. This is the first study of prolyl oligopeptidase from *Mycobacterium*

## Materials and Methods

### **Bacterial culture and growth conditions**

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was grown at 37°C in a shaking incubator (120 rpm) in Difco™ Middlebrook 7H9 broth containing 0.2% glycerol, 0.05% Tween 80, and 10% albumin-dextrose-catalase growth enrichment (Becton Dickinson and Company, Diagnostic Systems, Sparks, MD) to OD<sub>600</sub> of 0.5. The *E. coli* strains DH5  $\alpha$  and BL21 were used for cloning and expression and were grown in an LB broth or on LB agar plate at 37 °C.

### **PCR Amplification and Cloning of popMt (Rv0457c) Gene**

*pop* gene was amplified using Taq DNA polymerase from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA using the gene-specific primers. Forward, 5'- AGATTACCATATGACATTTGAGCCTGCCC - 3' (*Nde* I site, underlined; initiation codon, bold) and reverse, 5' – GTTATAGGATCCTTAGCCGGCCAGCATCCG – 3' (*Bam*HI site, underlined; stop codon, bold) primers were used to amplify the *popMt* ORF from genomic DNA of *M. tuberculosis* H37Rv, the hole insert was sequenced in both directions. The 2022 bp PCR product were digested and ligated into similarly digested pET-28a(+) (Novagen) using T4 DNA ligase (Invitrogen) in-frame with N-terminus 6xHis-tag vector. The recombinant plasmid pET-28a(+):*popMt* was verified for PCR anomalies by DNA sequencing of both strands using T7 primers (Genscript, USA). For overexpression and purification of his-tagged recombinant proteins, the confirmed plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells.

### **Expression and Purification of Recombinant POPMt**

Overnight culture of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pET-28a(+):*pop* was inoculated into 500 ml of LB broth supplemented with 30  $\mu$ g/ml kanamycin and were incubated at 37°C, 200 rpm until the OD<sub>600</sub> nm reached 0.6–0.7. Standard conditions of expression were established with 0.05 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 20°C for 16h. Recombinant POPMt were purified from the soluble fractions through nickel affinity chromatography (His Bind® Kit - Novagen) columns under native conditions according to the manufacturer's protocol. Purified rPOPMT was stored in 50% glycerol at -20 °C. Proteins were analyzed on 10% SDS-PAGE followed by Coomassie Brilliant Blue R staining (Sigma-Aldrich). The protein was quantified using the molar absorption coefficient  $\epsilon$  value of 148,865 ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) at 280 nm measured in water.

### **Western blot**

BALB/c mice were immunized twice with 4 µg of purified POP Mt emulsified in incomplete Freund's adjuvant followed by two biweekly boosters with the enzyme in PBS. 10 days after the last booster, serum was collected. The total extract of *M. tuberculosis* proteins were subjected to 10% SDS PAGE and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked by incubation in 5% (w/v) non-fat milk/PBS overnight at 4°C. Blot was incubated for 2 h with 1:100 rPOPMT diluted in 1% non-fat milk/PBS. Following several washes with PBS, the membrane was incubated for 1 h with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG diluted to 1:1000 (Invitrogen) and washed. Immunocomplexes were revealed with the alkaline phosphatase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT Color Development Substrate - Promega).

### **Enzymatic characterization of rPOPMT**

The activity was measured by using 7-amido-4-methylcoumarin (AMC). The released of AMC was monitored up to 20 min in 96-well SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices) at 25 °C as previously described (Grellier *et al.*, 2001). The rPOPMT activity was assayed on fluorogenic substrates: Ala-Ala-Phe-AMC, L-Proline-AMC hydrobromide, N-Succinyl-Ile-Ala-AMC, N-Succinyl-Leu-Tyr-AMC, N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-AMC, L-Leucine-AMC hydrochloride, Gly-Pro-AMC, N-Succinyl-Gly-Pro-AMC (N-Suc-Gly-Pro-AMC) and N-Succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC (N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC), which were purchased from Sigma-Aldrich. Enzymatic reactions were performed with 25 mM TRIS pH7.5 (reaction buffer) containing 20 µM of fluorogenic substrate with or without additives (NaCl - 0 to 400 mM and DTT - 0 to 20 mM) in 100 µl final volume. All experiments were performed in triplicate and repeated three times independently.

Enzyme assays of rPOPMT were carried out at different temperatures (20, 28, 37, 40, 45, 60 or 80°C) in reaction buffer and AMT (100 mM acetic acid, 100 mM MES and 200 mM Tris-HCl) of pH ranging from 5 to 10 (Bastos *et al.*, 2010) in order to determine the optimum temperature and pH for their enzyme activities.

Kinetic parameters were determined by incubation of rPOPMT in reaction buffer with different concentrations (6.25 to 150 µM) of N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC.  $K_m$  and  $V_{max}$  were determined by hyperbolic regression according to Cornish-Bowden (Cornish-Bowden, 1976). The  $k_{cat}$  was calculated by  $k_{cat} = V_{max}/[E]_t$ , where  $[E]_t$  is the total enzyme concentration.

Different concentrations of tosyl-lysylchloromethane (TLCK), N-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), bestatin, EDTA, L-trans-epoxysuccinylleucylamido-(4-guanidino) butane (E-64), 1,10-phenanthroline or leupeptin (0.01 - 100 nM) were incubated with rPOPMT in 100 µl reaction buffer for 15 min at room temperature before the addition of 20 µM N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC and the enzymatic reactions were monitored as described above. The inhibition profile (IC<sub>50</sub>) using Z-Pro-Prolinal, specific inhibitor of POP, was determined by nonlinear regression analysis from the residual activity versus inhibitor concentrations curve and the  $K_i$  values determined using the Cheng-Prusoff method ( $K_i = IC_{50}/[1+(S)/K_m]$ ), where [S] is the concentration of the substrate (Cheng e Prusoff, 1973).

### **Fluorescence Spectroscopy**

Fluorescence measurements were performed using an ISS K-2 (Champaign, IL) spectrofluorimeter at 25°C and at the temperatures described above. Spectra were recorded from 305 to 450 nm using an excitation wavelength of 295 nm and 2 nm bandwidth for both excitation and emission. Solutions of 0.30 µM rPOPMT were prepared in AMT buffer at pHs

ranging from 5 to 10 and in reaction buffer. Measurements were carried out in a 1.0 x 1.0-cm cuvette. The final spectra were baseline corrected by subtracting buffer spectrum.

### ***Homology Modeling and Molecular Dynamics Simulation Parameters***

The POPMt model was built based on the crystal structure of prolyl oligopeptidase B chain of *Myxococcus xanthus*, PDB code 2BKL (Shan, Mathews e Khosla, 2005b), using the MODELLER 9v8 software (Eswar *et al.*, 2006). Briefly, using the NCBI BLASTP web servers (Altschul *et al.*, 1997), the POPMt sequence was submitted to a search query against a structure database (Protein Data Bank – PDB (Berman *et al.*, 2000)). The PSI-BLAST algorithm was used to perform an alignment profile between all the homologous sequences and facilitate the alignment between the target sequence (POPMt) and the template (*Myxococcus xanthus*, PDB ID 2BKL). The alignment was then subjected to the MODELLER software, providing 5 comparative models. The lowest energy one was selected to further refining by Molecular Dynamics (MD) simulations.

The MD simulation was performed using the computational package GROMACS 4 - Groningen Machine for Chemical Simulations (Hess *et al.*, 2008). The simulated ensemble was composed of the POPMt model immersed in 14,46 Single Point Charge (SPC) water molecules (Berendsen *et al.*, 1981) in a cubic box with edges of 77 Å. Four sodium atoms were also included in order to neutralize the system charges. The lysine residues of the protein were protonated and an amide group was added to the C-terminus. The SETTLE algorithm (Miyamoto e Kollman, 1992) was used to constrain the geometry of water molecules, and the LINCS (Hess *et al.*, 1997) algorithm was used to constrain bond lengths. The electrostatic corrections were performed by the Particle Mesh Ewald (PME) algorithm with a cutoff radius of 1.4 nm, in order to minimize the computational time of the simulation. Derived from the Ewald summation, PME estimates in the Fourier space the long-range interactions that happen in real space (Darden, York e Pedersen, 1993; Essmann *et al.*, 1995). The same radius value cutoff was also used in the van der Waals interactions. The neighbors list of each atom was updated every 10 simulation steps of 20 fs each.

The system was contained. Two steps of energy minimization were performed, the first used the conjugate gradient algorithm - 2 ns - and the other one used the steepest descent algorithm - 2 ns. After the energy minimization step, the system went through a pressure and temperature normalization process using the integrator Stochastic Dynamics (SD) - 2 ns each. After all these steps the system went through a position restrain step using the Molecular Dynamics (MD) integrator - 2 ns. This ensemble was subjected to a relaxation molecular dynamics run at GridUNESP computers. The 50 ns simulation was divided into 25,000,000 steps of 2 fs each.

### ***Stimulation of peritoneal macrophages with rPOPMt in vitro.***

Peritoneal macrophages from naive C57BL/6 mice were harvested by lavage with sterile Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium. Macrophages ( $1 \times 10^6$  cells/mL) adhered overnight with RPMI containing 2% fetal calf serum. Nonadherent cells were removed after phosphate-buffered saline (PBS) wash. Macrophages were stimulated with rPOPMt (0.01–10 mg/mL), either native or denatured by boiling, for 24 h at 37 °C in CO<sub>2</sub> atmosphere. Macrophages viability assessed by trypan blue exclusion at the end of each experiment was always > 95%.

### ***Immunomodulatory properties of rPOPMt***

Cell-free supernatants from in vitro rPOPMt stimulated macrophages were collected after 24 h and stored at -20 °C until the day of analysis. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IL-23, IL-10, IL-1b and MCP-1 levels were measured in supernatants from in vitro rPOPMt stimulated macrophages by enzyme-linked immunosorbent assay, in accordance with manufacturer instructions (R&D Systems).

### **Statistical analysis.**

Bars graphics were generated with Prism computer software (GraphPad). All other data were expressed as mean ( $\pm$  standard error of the means) and were analyzed statistically with analysis of variance (ANOVA) followed by the Neuman-Keuls-Student test, with the level of significance set at  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **Expression and purification of POPMt**

The *popmt* gene of *M. tuberculosis* has an open read frame of 2,022 bp and encodes a protein of 673 amino acids with a predict mass of 74.40 kDa. Prolyl oligopeptidase from *M. tuberculosis* (POPMt) was produced in *E. coli* BL21(DE3) as a soluble and active enzyme which allowed us to proceed to POPMt purification (Fig. 1a) and its biochemical and enzymatic characterization. When subjected to intra-dermal immunization, isogenic BALB/c yielded specific anti-POPMt serum that recognized a single band of approximately 75 kDa in the total extract of *M. tuberculosis* proteins. This suggests that POPMt was immunogenic in mice and the protein is expressed in H37Rv, a *M. tuberculosis* human pathogenic strain (Fig. 1b).

### **Substrate specificity and kinetic parameters of POPMt**

We tested some fluorogenic peptides to define the specific substrate of POPMt. Among these substrates, the enzyme was only able to hydrolyze those that contain a proline residue at the P1 position. With respect to these substrates, the enzyme was active on N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC and N-Suc-Gly-Pro-AMC but totally inactive toward L-Pro-AMC and Gly-Pro-AMC (Table 1). The  $K_m$  and  $K_{cat}/K_m$  values of POPMt toward N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC were 108  $\mu\text{M}$  and 21.83  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectively.

### **Effects of NaCl and DTT on POPMt Catalysis**

Thiol-reacting reagents and salts are known to improve POP enzymatic activity (Usuki *et al.*, 2009). Based on that, NaCl and DTT were tested to determine their influence on POPMt activity. As shown in Fig. 2, up to 20 mM DTT in the reaction buffer did not affect the enzyme activity. The same result was found when POPMt activity was tested toward N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC in the presence of increasing concentrations of NaCl (Fig 2).

### **Influence of pH and temperature on POPMt structure and enzymatic activity**

The characterization of POPMt revealed that the enzyme had a strongly dependence of slightly alkaline pH 7.0 to 8.5. It was most stable at pH 7.5 and retained more than 90% of the residual activity at pH 8.0 and 8.5 (Fig. 3a). We also analyzed POPMt tertiary structure changes under different pHs by fluorescence spectroscopy (Fig. 3b). It is possible to observe changes in emission spectra of tryptophan in response to protein conformational transitions, subunit association, substrate binding or denaturation, all of which can affect the local environment surrounding the tryptophan indole ring (Lakowicz, J e R, 2004). POPMt contains 20 tryptophan residues and, as shown in Figure 3b, the emission maximum was 335 nm, indicating that most POPMt tryptophans are partially buried in the protein. The shape of the enzyme intrinsic fluorescence spectra does not change from pH 7.5 to 8.5 and a limited red-shift happens at pH 9.0 and 10.0. This suggests that the environment around the tryptophan residues is globally preserved over this pH range. However, higher pHs lead to an increase in fluorescence intensity and, most likely, structural changes.

The effect of the temperature on the enzymatic activity of POPMt was examined over a range of 20–80°C at pH 7.5. The enzyme has its maximal enzymatic activity between 20 and 37°C. While at 45 °C, the enzyme activity decreased nearly 50% (Fig. 4a). Although, according to all the adjusted fluorescence spectra, temperatures up to 60°C did not alter tryptophan emission, suggesting a thermal structural stability of the enzyme.

### POPMt inhibition profile

Table 2 summarizes the effects of protease inhibitors on the activity of prolyl oligopeptidase from *M. tuberculosis*. Although POPMt is a serine protease, its activity was partially inhibited by AEBSF and TLCK, 33 and 35%, respectively. On the other hand, TPCK, a chymotrypsin-like protease inhibitor, inhibited 66% of the enzyme activity. Leupeptin, E64, pepstatin A and metalloproteinase inhibitors such as o-phenanthroline, bestatin and EDTA had no effect on the enzyme activity. These results support that the predicted enzyme is a serine protease and to corroborate its classification as a prolyl oligopeptidase, we tested the effect of Z-Pro-Prolinal, a specific inhibitor for POPs (Wilk e Orłowski, 1983; Yoshimoto *et al.*, 1987). Using N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC as substrate, Z-Pro-Prolinal has a  $K_i$  value of 16.87 nM that correlates well with other results found for POPs (Wilk e Orłowski, 1983).

### Homology Modeling and Molecular Dynamics Simulations

Concerning the homology modeling, the top ranked homolog structure returned by BLAST was that of *Myxococcus xanthus* (PDB ID 2BKL), with a query coverage of 64% and 37% identity. As we couldn't obtain a higher query coverage, we opted to perform molecular dynamics simulations to either refine or validate our model. We predicted that an equilibrium molecular dynamics simulation would allow a relaxation of the macromolecule, leading the structure to a lower energy state, in which the *Mycobacterium tuberculosis* features would be adopted and not just the *Myxococcus xanthus* ones.

The POPMt macromolecular structure is divided in two domains (Fig. 5a) with a catalytic  $\alpha/\beta$  hydrolase domain and an unusual  $\beta$ -propeller domain. The catalytic triad Ser-Asp-His characteristic of the family in the C-terminal portion is highlighted in Figure 5b and is also preserved in other POPs (Van Elzen e Lambeir, 2011). The POPMt presents the active site residues at positions Ser 532, Asp 615 and His 647. The amino acid sequence of POPMt with the assigned secondary structure comprising coil,  $\beta$  sheet,  $\alpha$  helix and Pi helix is shown in Figure 5b.

The superposition of the predicted and template structures (Fig. 6a) shows an average RMSD of 4.86 Å (Fig. 6b, red line). The structure of the *Myxococcus xanthus* POP is a crystal structure, hardened due to the compression inherent in the crystallization process, which results in the inability of structure accommodation and its respective adaptation to the environment. Structures subjected to molecular dynamics simulations are expected to exhibit RMSD changes, as they go through a process of relaxation and adjustments, always driven by biochemical and structural restrictions.

Albeit resulting in conformational changes when compared to the initial structure, as observed by the RMSD shift, the POPMt relaxation process led the structure to a smaller radius of gyration (Fig. 6b, blue line), indicating the contraction of the system. This can be interpreted as a sign of conformational stability, as during protein unfolding we would expect the opposite, and may be explained due to the increasing number of intramolecular hydrogen bonds during the simulation (Fig. S1a). This kind of interactions cooperates to reduce the volume of the system and thus increase the degree of compaction of the protein.

Besides increasing both the stability of the system and its degree of compaction the hydrogen bonds are also responsible for maintaining the stability of structural elements, such as  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets. Another sign of compaction is the solvent accessible area (Fig. S1b), which corresponds to the area of solvent removed due to the relationship of the protein with itself. By folding, the protein contracts, resulting in the reduction of the solvent accessible area, decreasing the protein volume characterized by the separation of hydrophobic and hydrophilic portions.

### POPMT induces pro-inflammatory cytokine production in vitro

To investigate the immunomodulatory properties of POPMT in triggering immune responses in vitro, peritoneal macrophages were stimulated with POPMT for 24h. POPMT significantly triggered production of the pro-inflammatory cytokines TNF, IL-12p70, IL-6, IL-23 and IL-1b, as well as chemokine MCP-1 after 24 h (Fig. 7A-F). However, POPMT failed to trigger the anti-inflammatory and immunosuppression cytokine IL-10 (Fig. 7G). In addition, all cytokines and chemokine secretion induced by POPMT and analyzed here were largely dependent on POPMT activity, since cytokine and chemokine production induced by boiled POPMT were greatly reduced compared to the corresponding intact enzyme.

### Discussion

Here we report the identification, purification, biochemical characterization of a prolyl oligopeptidase from *M. tuberculosis*. Some prolyl oligopeptidases have been described in bacteria like *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto, Walter e Tsuru, 1980; Yoshimoto *et al.*, 1991), *Sphingomonas capsulate* (Kabashima *et al.*, 1998), *Aeromonas hydrophila* (Kanatani *et al.*, 1993) and *Myxococcus xanthus* (Shan *et al.*, 2004) but it is the first studied that characterized POP in mycobacteria. Analysis of the deduced amino acid sequence of POPMT revealed homology with prolyl oligopeptidases from *M. bovis*, *M. avium* and *M. smegmatis* showing 99.5, 78.3 and 64.9% of identity, respectively. On the other hand, the identity with human POP is about 20.6%.

Enzymatic tests were performed using N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC as substrate since it was hydrolyzed more efficiently than the others what was also observed for POP from *T. cruzi* and *T. brucei* (Santana *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2010). Those results are supported by previous data showing that other POPs cleave preferentially at the carboxyl side of Pro and, at a weaker rate, Ala (Yoshimoto *et al.*, 1978), POPMT hydrolyzed the fluorogenic substrate with Ala at the carboxyl side in much less extensive rate when compared to N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. This could be due to the presence of Ile as a residue in the P2 position in the tested substrate once it seems that POPs have a preference for residues such as Ala, Pro, Phe and Gly at this position (Van Elzen e Lambeir, 2011). The additives used in this study are known to influence the enzymatic activity of POP family (Usuki *et al.*, 2009), but that was not the case for POPMT. Nevertheless, the insensitivity to thiol-reacting reagents, such as DTT, has been reported for other members of this family. For example, DTT did not interfere in the activity of oligopeptidase B from *T. cruzi* (Motta *et al.*, 2012) neither in POP from *F. meningosepticum* and *Lyophyllum cinerascens* (Yoshimoto *et al.*, 1988; Yoshimoto *et al.*, 1991). In oligopeptidase B from *T. brucei*, a Cys residue located at position 256 was identified as the amino acid responsible for the interaction with thiol reagents (Morty *et al.*, 2005). It also has been shown that porcine brain POP is inhibited by pCMB, a cysteine protease inhibitor, possibly by reacting with Cys<sub>256</sub>, a residue located close to the enzyme substrate binding site (Szeltner, Renner e Polgár, 2000). There is two Cys predicted in POPMT primary sequence at position 40 and 554, none of them conserved around those positions listed above. Moreover, according to our molecular dynamic studies, the distance between these Cys residues remained at approximately 17 Å throughout the simulation, such distance is not favorable for the formation of

disulfide bridge, which is postulated between 4.4 and 6.8 Å (Richardson, 1981). Both features may explain the insensitivity of POPMt to thiol reagents.

POPMt optimum pH and temperature were at 7.5 and 37°C, respectively, values compatible with those already described for other POPs (Yoshimoto, Walter e Tsuru, 1980; Szwajcer-Dey *et al.*, 1992). Fluorescence spectroscopy has been widely exploited in structural and functional studies of proteins. The intrinsic fluorescence of the tryptophan residues of proteins is a sensitive probe for protein denaturation and can be used in experiments of tertiary structure of proteins (Lakowicz, J e R, 2004). Intrinsic tryptophan fluorescence studies have been used to probe into the tertiary structure unfolding of two carbonic anhydrase, Rv3588c and Rv1284, both from *Mycobacterium tuberculosis* (Mukherjee, Saha e Das, 2009). The spectra of intrinsic POPMt tryptophan fluorescence did not change drastically as function of the pH which could suggest that the environment around these residues is locally preserved.

Classical inhibitors of proteases were used to establish the profile of inhibition on the enzymatic activity of POPMt. As result, we observed a pattern similar to that already noticed for POPs such as low inhibition by AEBSF (33%), a typical serine protease inhibitor, and a higher susceptibility (66%) for the chymotrypsin-like protease inhibitor TPCK (Bastos *et al.*, 2010). The canonical POP inhibitor Z-Pro-Prolinal was also essayed in POPMt, showing a  $K_i$  value of 16.87 nM that is slightly higher than that found for the rabbit brain POP of 14 nM (Wilk e Orlowski, 1983). However, that inhibition was less efficient compared to mouse and human POPs with  $K_i$  value of 0.35 and 0.50 nM, respectively (Bakker *et al.*, 1990), indicating differences in the catalytic pocket among these POPs and POPMt.

The Molecular Dynamics simulations consists in observing the evolution of the system under study over time. By doing so, we were able to observe the stability of our homology model, including several structural features present in other organisms. The propeller domain is based on a radially arranged seven-fold repeat of four stranded antiparallel  $\beta$  sheets. In the case of POPs, this domain is considered to be of the “open-velcro” topology, where first and seventh blades are connected only through hydrophobic interactions, although their primary sequences diverge (Kaushik e Sowdhamini, 2011). The POPMt catalytic triad residues (Ser 532, Asp 615 e His 647) position is conserved like in other POPs and it is localized at the interface of the catalytic and propeller domains (Rea e Fülöp, 2006). Further studies are being engaged to characterize the POPMt as a virulence factor, and parallel efforts are being performed to use this refined model in order to find new inhibitors against this enzyme. Data extracted from this MD trajectory will be used to identify clusters of conformational families as recently accomplished to the Dengue virus NS3 protease (De Almeida *et al.*, 2013), which will be used in ensemble docking campaigns aiming the identification of new drug-like lead compounds for the treatment of TB.

It has been described that several innate cytokines play crucial role promoting and maintaining adaptative T cell responses that mediate host resistance or immunopathology to Mtb (Cooper, Mayer-Barber e Sher, 2011). Studies in mice and human showed that IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-12 are the key cytokines involved in the control of *M. tuberculosis* infections (Dinarelli, 2003; Cooper, Mayer-Barber e Sher, 2011). Moreover, these cytokines are increased in TB cases and can discriminate active TB disease from latent (Novikov *et al.*, 2011; Mihret *et al.*, 2013; Shenderov *et al.*, 2013). We have showed here that POPMt induced the secretion of the proinflammatory Th1 cytokines TNF, IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6 as well as the Th17 IL-23 in murine macrophages, indicating that POPMt could significantly contribute to TB immunopathology.

Mtb infection is also characterized by induction of elevated levels of a variety of chemokines, such as CXCL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-5, RANTES, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , MIP-2 and IP-10 and their receptors (Orme e Cooper, 1999; Juffermans *et al.*, 2000; Mihret *et al.*, 2013). Our data

demonstrated that POPMt induced high levels of MCP-1 secretion, suggesting that POPMt could be critical in monocyte/macrophage recruitment process. Beyond monocyte/macrophage recruitment, these inflammatory chemokine recruit additional cells from the blood compartment (Gerszten *et al.*, 1999) and from other areas of the lung (Sertl *et al.*, 1986; Holt e Schon-Hegrad, 1987) to amplify the inflammatory response. In addition, MCP-1 is associated with the immune response to Mtb infection, because MCP-1 deficient mice had early and persistent defects on macrophage recruitment to the lungs and a reduced number of macrophage and dendritic cells in mediastinal lymph nodes (Peters *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2004).

IL-1b secretion has been largely implicated in Mtb infection (Mayer-Barber *et al.*, 2011; Novikov *et al.*, 2011; Abdalla *et al.*, 2012; Dwivedi *et al.*, 2012; Krishnan, Robertson e Thwaites, 2013). We have demonstrated here that POPMt was capable of triggering IL-1b secretion. IL-1b is a potent proinflammatory cytokine which maturation and secretion is dependent on inflammasome activation. Our data suggests that POPMt could have an important role in eliciting inflammasome activation.

### Acknowledgments

The molecular dynamics research was made possible thanks to the computing resources provided by the Center for Scientific Computing (GridUNESP), Universidade Estadual Paulista (UNESP). This work was supported by FAPDF, CNPq and CAPES/COFECUB.

### References

1. WHO (2013) Global tuberculosis control. Geneva:World Health Organization.
2. Russell DG (2001) Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 569-577.
3. Bhatt K, Salgame P (2007) Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Immunol* 27: 347-362.
4. Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A (2011) Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol* 4: 252-260.
5. Raju RM, Unnikrishnan M, Rubin DH, Krishnamoorthy V, Kandror O, et al. (2012) Mycobacterium tuberculosis ClpP1 and ClpP2 function together in protein degradation and are required for viability in vitro and during infection. *PLoS Pathog* 8: e1002511.
6. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. (1998) Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
7. Sassetti CM, Rubin EJ (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12989-12994.
8. Lamichhane G, Tyagi S, Bishai WR (2005) Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of Mycobacterium tuberculosis in mouse lungs. *Infect Immun* 73: 2533-2540.
9. Rengarajan J, Murphy E, Park A, Krone CL, Hett EC, et al. (2008) Mycobacterium tuberculosis Rv2224c modulates innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 264-269.
10. Koida M, Walter R (1976) Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. *J Biol Chem* 251: 7593-7599.
11. Maes M, Goossens F, Scharpé S, Calabrese J, Desnyder R, et al. (1995) Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. *Psychiatry Res* 58: 217-225.
12. Maes M, Song C, Lin A, De Jongh R, Van Gastel A, et al. (1998) The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 10: 313-318.

13. Maes M, Monteleone P, Bencivenga R, Goossens F, Maj M, et al. (2001) Lower serum activity of prolyl endopeptidase in anorexia and bulimia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 26: 17-26.
14. Mantle D, Falkous G, Ishiura S, Blanchard PJ, Perry EK (1996) Comparison of proline endopeptidase activity in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin Chim Acta* 249: 129-139.
15. Tenorio-Laranga J, Coret-Ferrer F, Casanova-Estruch B, Burgal M, García-Horsman JA (2010) Prolyl oligopeptidase is inhibited in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 7: 23.
16. Williams RS, Eames M, Ryves WJ, Viggars J, Harwood AJ (1999) Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate. *EMBO J* 18: 2734-2745.
17. Williams RS, Harwood AJ (2000) Lithium therapy and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 21: 61-64.
18. Santana JM, Grellier P, Schrével J, Teixeira AR (1997) A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J* 325 ( Pt 1): 129-137.
19. Bastos IM, Motta FN, Charneau S, Santana JM, Dubost L, et al. (2010) Prolyl oligopeptidase of Trypanosoma brucei hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. *Microbes Infect* 12: 457-466.
20. Bastos IM, Grellier P, Martins NF, Cadavid-Restrepo G, de Souza-Ault MR, et al. (2005) Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of Trypanosoma cruzi (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J* 388: 29-38.
21. Klemba M, Goldberg DE (2002) Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* 71: 275-305.
22. Polgár L (2002) The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci* 59: 349-362.
23. Holmquist M (2000) Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci* 1: 209-235.
24. Fülöp V, Böcskei Z, Polgár L (1998) Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* 94: 161-170.
25. Shan L, Mathews II, Khosla C (2005) Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3599-3604.
26. Li M, Chen C, Davies DR, Chiu TK (2010) Induced-fit mechanism for prolyl endopeptidase. *J Biol Chem* 285: 21487-21495.
27. Haffner CD, Diaz CJ, Miller AB, Reid RA, Madauss KP, et al. (2008) Pyrrolidinyl pyridone and pyrazinone analogues as potent inhibitors of prolyl oligopeptidase (POP). *Bioorg Med Chem Lett* 18: 4360-4363.
28. Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IM, Drobecq H, et al. (2001) Trypanosoma cruzi prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J Biol Chem* 276: 47078-47086.
29. Cornish-Bowden A (1976) **Principles of Enzyme Kinetics.**
30. Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22: 3099-3108.
31. Shan L, Mathews II, Khosla C (2005) Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3599-3604.
32. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, et al. (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 5: Unit 5.6.*
33. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
34. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, et al. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242.

35. Hess B, Kutzner C, Spoel Dvd, Lindahl E (2008) GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation **Journal of Chemical Theory and Computation** 4: 435-447.
36. BERENDSEN HJC, POSTMA JPM, GUNSTEREN WFV, HERMANS J (1981) Interaction Models for Water in Relation To Protein Hydration. **Intermolecular Forces** 11: p.331-338.
37. Miyamoto S, Kollman PA (1992) Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry* 13: 952-962.
38. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* 18: 1463-1472.
39. DARDEN T, YORK D, PEDERSEN L (1993) Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. **Journal of Chemical Physics** 98: 10089-10092.
40. ESSMANN U, PERERA L, BERKOWITZ ML, DARDEN T, LEE H, et al. (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* 103: 8577-8593.
41. Usuki H, Uesugi Y, Iwabuchi M, Hatanaka T (2009) Activation of oligopeptidase B from *Streptomyces griseus* by thiol-reacting reagents is independent of the single reactive cysteine residue. *Biochim Biophys Acta* 1794: 1673-1683.
42. Lakowicz, J, R (2004) *Principle of fluorescence spectroscopy*: New York: Springer Science+Business Media.
43. Wilk S, Orłowski M (1983) Inhibition of rabbit brain prolyl endopeptidase by *n*-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal, a transition state aldehyde inhibitor. *J Neurochem* 41: 69-75.
44. Yoshimoto T, Kado K, Matsubara F, Koriyama N, Kaneto H, et al. (1987) Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. *J Pharmacobiodyn* 10: 730-735.
45. Van Elzen R, Lambeir AM (2011) Structure and function relationship in prolyl oligopeptidase. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10: 297-305.
46. Yoshimoto T, Walter R, Tsuru D (1980) Proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium*. Purification and properties. *J Biol Chem* 255: 4786-4792.
47. Yoshimoto T, Kanatani A, Shimoda T, Inaoka T, Kokubo T, et al. (1991) Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene. *J Biochem* 110: 873-878.
48. Kabashima T, Fujii M, Meng Y, Ito K, Yoshimoto T (1998) Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene. *Arch Biochem Biophys* 358: 141-148.
49. Kanatani A, Yoshimoto T, Kitazono A, Kokubo T, Tsuru D (1993) Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme. *J Biochem* 113: 790-796.
50. Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM, Khosla C (2004) Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J* 383: 311-318.
51. Yoshimoto T, Fischl M, Orłowski RC, Walter R (1978) Post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase. Comparison of two peptidases with high specificity for proline residues. *J Biol Chem* 253: 3708-3716.
52. Motta FN, Bastos IM, Faudry E, Ebel C, Lima MM, et al. (2012) The *Trypanosoma cruzi* Virulence Factor Oligopeptidase B (OPBTc) Assembles into an Active and Stable Dimer. *PLoS One* 7: e30431.
53. Yoshimoto T, Sattar AK, Hirose W, Tsuru D (1988) Studies on prolyl endopeptidase from shakashimeji (*Lyophyllum cinerascens*): purification and enzymatic properties. *J Biochem* 104: 622-627.
54. Morty RE, Shih AY, Fülöp V, Andrews NW (2005) Identification of the reactive cysteine residues in oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* 579: 2191-2196.
55. Szeltner Z, Renner V, Polgár L (2000) The noncatalytic beta-propeller domain of prolyl oligopeptidase enhances the catalytic capability of the peptidase domain. *J Biol Chem* 275: 15000-15005.
56. Richardson JS (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv Protein Chem* 34: 167-339.
57. Szwajcer-Dey E, Rasmussen J, Meldal M, Breddam K (1992) Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of an enzyme from a *Xanthomonas* sp. *J Bacteriol* 174: 2454-2459.

58. Mukherjee S, Saha B, Das AK (2009) Differential chemical and thermal unfolding pattern of Rv3588c and Rv1284 of *Mycobacterium tuberculosis* - A comparison by fluorescence and circular dichroism spectroscopy. *Biophys Chem* 141: 94-104.
59. Bakker AV, Jung S, Spencer RW, Vinick FJ, Faraci WS (1990) Slow tight-binding inhibition of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *Biochem J* 271: 559-562.
60. Kaushik S, Sowdhamini R (2011) Structural analysis of prolyl oligopeptidases using molecular docking and dynamics: insights into conformational changes and ligand binding. *PLoS One* 6: e26251.
61. Rea D, Fülöp V (2006) Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes. *Cell Biochem Biophys* 44: 349-365.
62. de Almeida H, Bastos IM, Ribeiro BM, Maigret B, Santana JM (2013) New binding site conformations of the dengue virus NS3 protease accessed by molecular dynamics simulation. *PLoS One* 8: e72402.
63. Dinarello CA (2003) Anti-cytokine therapeutics and infections. *Vaccine* 21 Suppl 2: S24-34.
64. Novikov A, Cardone M, Thompson R, Shenderov K, Kirschman KD, et al. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 $\beta$  production in human macrophages. *J Immunol* 187: 2540-2547.
65. Mihret A, Bekele Y, Bobosha K, Kidd M, Aseffa A, et al. (2013) Plasma cytokines and chemokines differentiate between active disease and non-active tuberculosis infection. *J Infect* 66: 357-365.
66. Shenderov K, Barber DL, Mayer-Barber KD, Gurucha SS, Jankovic D, et al. (2013) Cord factor and peptidoglycan recapitulate the Th17-promoting adjuvant activity of mycobacteria through mincle/CARD9 signaling and the inflammasome. *J Immunol* 190: 5722-5730.
67. Orme IM, Cooper AM (1999) Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* 20: 307-312.
68. Juffermans NP, Dekkers PE, Peppelenbosch MP, Speelman P, van Deventer SJ, et al. (2000) Expression of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on granulocytes in human endotoxemia and tuberculosis: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Infect Dis* 182: 888-894.
69. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, et al. (1999) MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398: 718-723.
70. Holt PG, Schon-Hegrad MA (1987) Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. *Immunology* 62: 349-356.
71. Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans VJ, Kaliner MA, et al. (1986) Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med* 163: 436-451.
72. Peters W, Scott HM, Chambers HF, Flynn JL, Charo IF, et al. (2001) Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7958-7963.
73. Peters W, Cyster JG, Mack M, Schlöndorff D, Wolf AJ, et al. (2004) CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 172: 7647-7653.
74. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Barber DL, Hieny S, Feng CG, et al. (2011) Innate and adaptive interferons suppress IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity* 35: 1023-1034.
75. Abdalla H, Srinivasan L, Shah S, Mayer-Barber KD, Sher A, et al. (2012) *Mycobacterium tuberculosis* infection of dendritic cells leads to partially caspase-1/11-independent IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion but not to pyroptosis. *PLoS One* 7: e40722.
76. Dwivedi VP, Bhattacharya D, Chatterjee S, Prasad DV, Chattopadhyay D, et al. (2012) *Mycobacterium tuberculosis* directs T helper 2 cell differentiation by inducing interleukin-1 $\beta$  production in dendritic cells. *J Biol Chem* 287: 33656-33663.
77. Krishnan N, Robertson BD, Thwaites G (2013) Pathways of IL-1 $\beta$  secretion by macrophages infected with clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Tuberculosis (Edinb)* 93: 538-547.

## Figure Legends

**Figure 1. Purification and analysis of the recombinant and native POPMt.** (A) SDS PAGE of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pET-28(a+):*pop* induced in the presence of 0.05 mM IPTG at 20 °C for 16 h. 1 - Total protein extract; 2 – Flow through; 3 – MW; 4 to 9 - wash buffer containing imidazole (5 - 30 mM); 10 to 12 - eluting buffer containing imidazole (40 - 60 mM); (B) *M. tuberculosis* total protein extract was resolved by 10% SDS PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Blot was probed with anti-rPOPMt. 1 – POPMt purified; 2 - Total protein extract from *M. tuberculosis* H37Rv;

**Figure 2. Effects of additives on rPOPMt activity.** The substrate N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC was hydrolyzed by rPOPMt in the presence of (A) 0-20 mM DTT; (B) 0-400mM NaCl. Results are expressed as the percent activity relative to the maximum value obtained at each condition.

**Figure 3. pH influence on rPOPMt activity and its tertiary structure.** (A) pH optimum activity of rPOPMt was assayed in AMT buffer against N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. Results are expressed as the percent activity relative to the maximum value obtained at each condition. (B) Intrinsic spectra were recorded at 25°C from 305 to 400 nm using excitation wavelength of 295 nm at different pHs.

**Figure 4. Influence of temperature on rPOPMt activity and its tertiary structure.** (A) rPOPMt was incubated with substrate at different temperatures for 20 min and the release of AMC was quantified as described in Material and Methods. Results are expressed as the percent activity relative to the maximum value obtained at each condition. (B) Intrinsic spectra were recorded from 305 to 400 nm using excitation wavelength of 295 nm at different temperatures.

**Figure 5. Sequence and three dimensional structure of POPMt.** (A) POPMt tertiary structure showing  $\alpha/\beta$  hydrolase catalytic domain,  $\beta$ -propeller domain and the hinge region between the two domains. (B) The amino acid sequence of POPMt with the assigned secondary structure: coil (black line),  $\beta$  sheet (yellow),  $\alpha$  helix (red), Pi helix (green). The catalytic triad is highlighted.

**Figure 6. Analysis of molecular dynamics of POPMt.** (A) Superposition of POPMt (blue) and POPMx (red). (B) RMSD vs. time and Radius of gyration vs. time

**Figure 7. Immunomodulation triggered by POPMt.** Peritoneal macrophages were stimulated with POPMt for 24h in vitro. Levels of (A) IL-1b, (B) IL-12p70, (C) IL-6, (D) TNF- $\alpha$ , (E) MCP-1, (F) IL-23 and (G) IL-10 were analyzed in the supernatant. Statistical differences between POPMt and POPMt that was boiled are represented by symbol +. \*  $p < 0.05$ .

**Figure S1. Analysis of molecular dynamics of POPMt.** (A) Radius of gyration vs. time. (B) Increasing number of hydrogen bonds. (C) Solvent accessible area vs. time.

### Tables

**Table 1.** rPOPMt substrate specificity

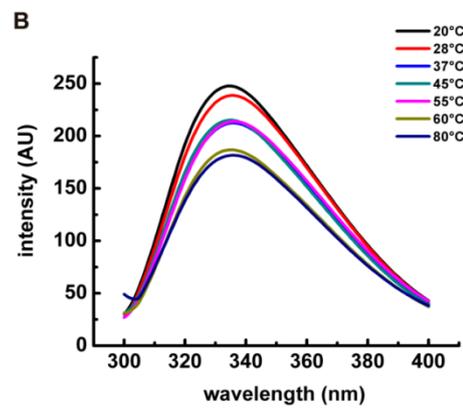
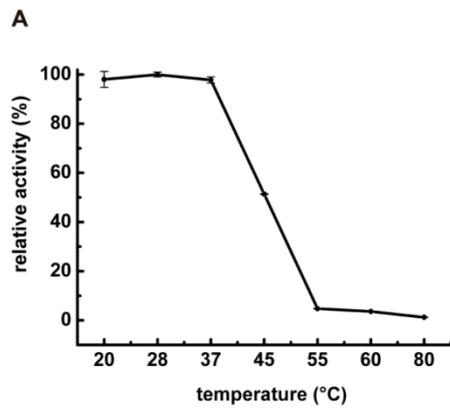
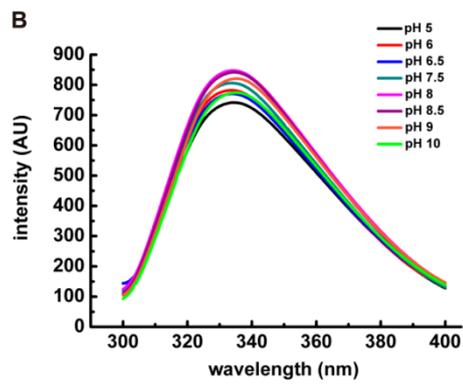
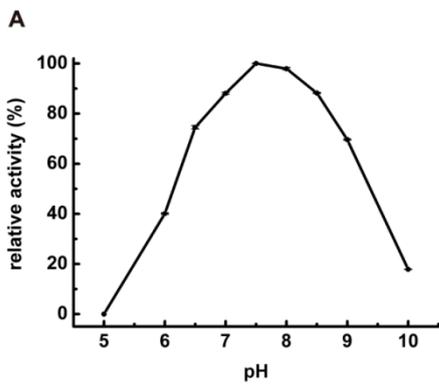
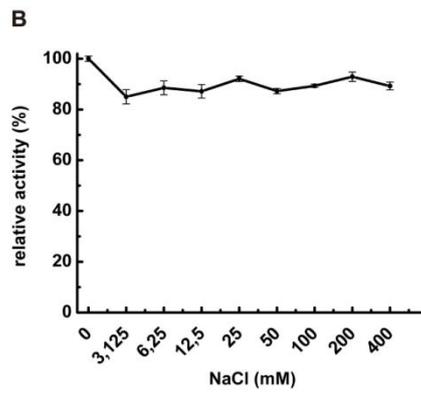
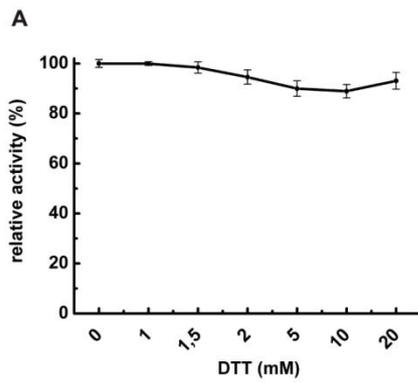
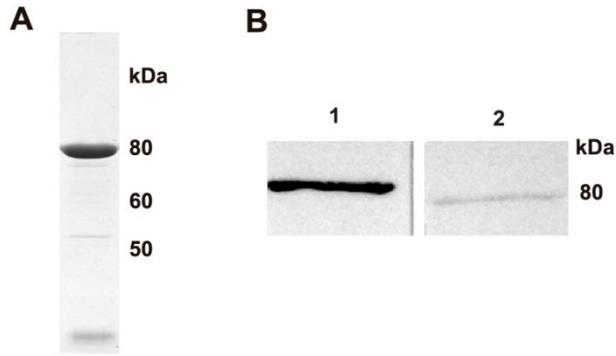
<b>Substrate</b>	<b>Relative Activity (%)</b>
Ala-Ala-Phe-AMC	n.a
L-Proline-AMC	n.a
Gly-Pro-AMC	n.a
N-Succinyl-Ile-Ala-AMC	1.31
N-Succinyl-Leu-Tyr-AMC	n.a
N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	n.a
L-Leucine-AMC	n.a
N-Succinyl-Gly-Pro-AMC	48
N-Succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC	100

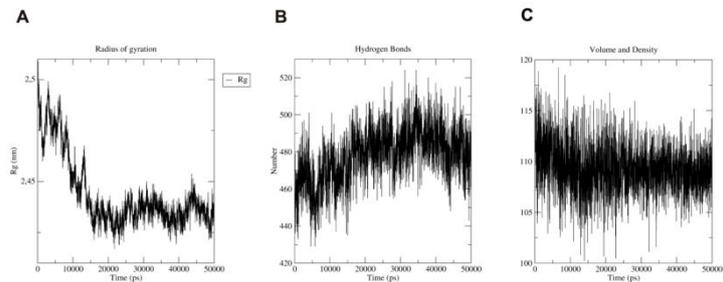
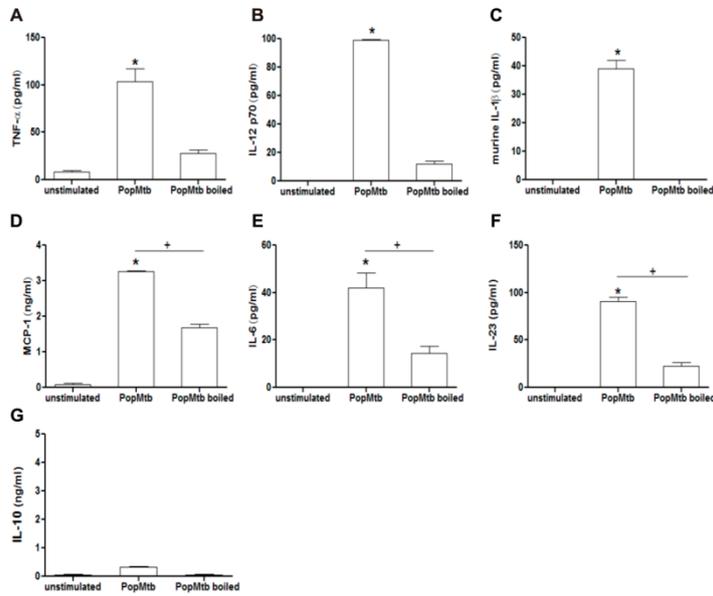
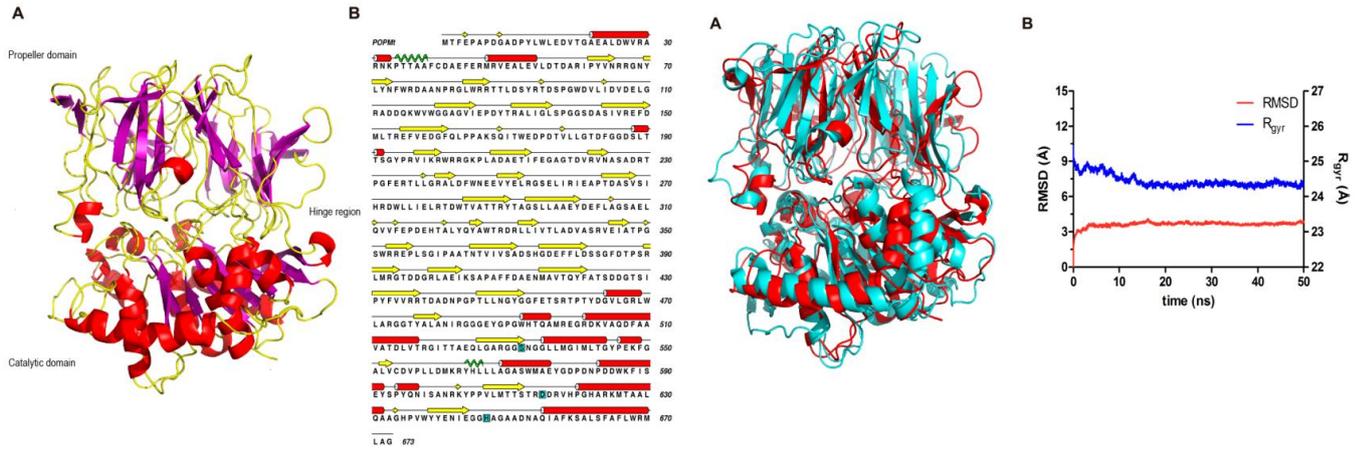
n.a, No activity. Assays were performed by incubating 300 ng of rPOPMt with 20  $\mu$ M of each substrate. Hydrolysis was recorded up to 20min.

**Table 2.** Inhibition of rPOPMt by protease inhibitors

<b>Inhibitor</b>	<b>Concentration (mM)</b>	<b>Inhibition (%)</b>
AEBSF	1	33
Bestatin	0.1	n.i
E-64	0.1	n.i
EDTA	1	n.i
Leupeptin	0.1	n.i
Pepstatin A	0.1	n.i
Phenanthroline	0.1	n.i
TLCK	0.1	35
TPCK	0.1	66

n.i, No inhibition. Assays were performed by incubating 300ng of rPOPMt with the inhibitor for 15 min, before the addition of 20  $\mu$ M of substrate. Hydrolysis was recorded up to 20min.





# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDALLA, H. et al. Mycobacterium tuberculosis infection of dendritic cells leads to partially caspase-1/11-independent IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion but not to pyroptosis. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40722, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911706> >.

AKOPIAN, T. et al. The active ClpP protease from *M. tuberculosis* is a complex composed of a heptameric ClpP1 and a ClpP2 ring. **EMBO J**, v. 31, n. 6, p. 1529-41, Mar 2012. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286948> >.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1997. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694> >.

AMITA, J. et al. Qualitative Evaluation of Mycobacterial DNA Extraction Protocols for Polymerase Chain Reaction. **Molecular Biology Today**, v. 3, p. 43-50, 2002.

AMMOR, M. S. Recent advances in the use of intrinsic fluorescence for bacterial identification and characterization. **J Fluoresc**, v. 17, n. 5, p. 455-9, Sep 2007. ISSN 1053-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624580> >.

ANDRIES, K. et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 307, n. 5707, p. 223-7, Jan 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591164> >.

ATAACK, J. R. et al. In vitro and in vivo inhibition of prolyl endopeptidase. **Eur J Pharmacol**, v. 205, n. 2, p. 157-63, Nov 1991. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1812006> >.

BAKKER, A. V. et al. Slow tight-binding inhibition of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. **Biochem J**, v. 271, n. 2, p. 559-62, Oct 1990. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2241932> >.

BANERJEE, A. et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, n. 5144, p. 227-30, Jan 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284673> >.



BARBOSA, M. D. et al. Regulated expression of the Escherichia coli lepB gene as a tool for cellular testing of antimicrobial compounds that inhibit signal peptidase I in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 11, p. 3549-54, Nov 2002. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384363> >.

BARRETT, A. J.; MCDONALD, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **Biochem J**, v. 237, n. 3, p. 935, Aug 1986. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3541905> >.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v. 373, n. 7, p. 353-60, Jul 1992. ISSN 0177-3593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1515061> >.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Arch Biochem Biophys**, v. 318, n. 2, p. 247-50, Apr 1995. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7733651> >.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Biol Chem**, v. 382, n. 5, p. 727-33, May 2001. ISSN 1431-6730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517925> >.

BARRY, C. E. Interpreting cell wall 'virulence factors' of Mycobacterium tuberculosis. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 237-41, May 2001. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336841> >.

BARRY, C. E.; MDLULI, K. Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components. **Trends Microbiol**, v. 4, n. 7, p. 275-81, Jul 1996. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8829336> >.

BASTOS, I. M. et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of Trypanosoma cruzi (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. **Biochem J**, v. 388, n. Pt 1, p. 29-38, May 2005. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581422> >.

BASTOS, I. M. et al. Prolyl oligopeptidase of Trypanosoma brucei hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. **Microbes Infect**, v. 12, n. 6, p. 457-66, Jun 2010. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188209> >.



BEAN, A. G. et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J Immunol**, v. 162, n. 6, p. 3504-11, Mar 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092807> >.

BELANGER, A. E. et al. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 21, p. 11919-24, Oct 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8876238> >.

BENAROUDJ, N. et al. Assembly and proteolytic processing of mycobacterial ClpP1 and ClpP2. **BMC Biochem**, v. 12, p. 61, 2011. ISSN 1471-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22132756> >.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Interaction Models for Water in Relation To Protein Hydration. **Intermolecular Forces**, v. 11, p. p.331-338, 1981.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, n. Pt 6 No 1, p. 899-907, Jun 2002. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037327> >.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 235-42, Jan 2000. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592235> >.

BHATT, K.; SALGAME, P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Immunol**, v. 27, n. 4, p. 347-62, Jul 2007. ISSN 0271-9142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17364232> >.

BLACK, M. T.; MUNN, J. G.; ALLSOP, A. E. On the catalytic mechanism of prokaryotic leader peptidase 1. **Biochem J**, v. 282 ( Pt 2), p. 539-43, Mar 1992. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1546969> >.

BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p. 215-39, 1996. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8811179> >.

BOND, J. S.; BUTLER, P. E. Intracellular proteases. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 333-64, 1987. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3304137> >.



BRASIL. **Multirresistente: guia de vigilância epidemiológica**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Rio de Janeiro: Centro de Referência Prof. Hélio Fraga 2007.

BRASIL, B. M. D. S. S. D. V. E. S. D. D. V. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. SAÚDE, S. D. V. E. 2011.

BRASIL, M. D. S., SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1527](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527), 2012. Acesso em: 09/01.

BROWN, G. D. et al. The mycosins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a family of subtilisin-like serine proteases. **Gene**, v. 254, n. 1-2, p. 147-55, Aug 2000. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974545> >.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. AMGH Editora Ltda.: 2012.

CACABELOS, R. et al. Pharmacological treatment of Alzheimer disease: from psychotropic drugs and cholinesterase inhibitors to pharmacogenomics. **Drugs Today (Barc)**, v. 36, n. 7, p. 415-99, Jul 2000. ISSN 1699-3993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12861345> >.

CADAVID-RESTREPO, G. et al. The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases. **BMC Biochem**, v. 12, p. 46, 2011. ISSN 1471-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21861921> >.

CAMARGO, A. C.; CALDO, H.; REIS, M. L. Susceptibility of a peptide derived from bradykinin to hydrolysis by brain endo-oligopeptidases and pancreatic proteinases. **J Biol Chem**, v. 254, n. 12, p. 5304-7, Jun 1979. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/447650> >.

CAMINERO, J. A. et al. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 9, p. 621-9, Sep 2010. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20797644> >.

CARROLL, P.; FARAY-KELE, M. C.; PARISH, T. Identifying vulnerable pathways in *Mycobacterium tuberculosis* by using a knockdown approach. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 14, p. 5040-3, Jul 2011. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642404> >.



CHENG, Y.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. **Biochem Pharmacol**, v. 22, n. 23, p. 3099-108, Dec 1973. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4202581> >.

CHEVALLIER, S. et al. Characterization of a prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. Complete sequence and localization of the active-site serine. **J Biol Chem**, v. 267, n. 12, p. 8192-9, Apr 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1569074> >.

CHOTHIA, C.; LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **EMBO J**, v. 5, n. 4, p. 823-6, Apr 1986. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3709526> >.

COLDITZ, G. A. et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. **JAMA**, v. 271, n. 9, p. 698-702, Mar 1994. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8309034> >.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-44, Jun 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634230> >.

CONNOLLY, L. E.; EDELSTEIN, P. H.; RAMAKRISHNAN, L. Why is long-term therapy required to cure tuberculosis? **PLoS Med**, v. 4, n. 3, p. e120, Mar 2007. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17388672> >.

COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 3, p. 252-60, May 2011. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430655> >.

CORBETT, E. L. et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Arch Intern Med**, v. 163, n. 9, p. 1009-21, May 2003. ISSN 0003-9926. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742798> >.

CORNISH-BOWDEN, A. **Principles of Enzyme Kinetics**. 1976.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. **J Struct Biol**, v. 134, n. 2-3, p. 246-56, 2001 May-Jun 2001. ISSN 1047-8477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11551183> >.



DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.

DE ALMEIDA, H. et al. New binding site conformations of the dengue virus NS3 protease accessed by molecular dynamics simulation. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72402, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991109> >.

DE NANTEUIL, G.; PORTEVIN, B.; LEPAGNOL, J. Prolyl oligopeptidase inhibitors: a new class of memory enhancing drugs. **Drugs Fut**, v. 23, p. 167-179, 1998.

DERETIC, V. et al. Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 719-27, May 2006. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611222> >.

DIEFENTHAL, T. et al. Cloning of proline-specific endopeptidase gene from *Flavobacterium meningosepticum*: expression in *Escherichia coli* and purification of the heterologous protein. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 40, n. 1, p. 90-7, Oct 1993. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764331> >.

DINARELLO, C. A. Anti-cytokine therapeutics and infections. **Vaccine**, v. 21 Suppl 2, p. S24-34, Jun 2003. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763679> >.

DREWES, G.; BOUWMEESTER, T. Global approaches to protein-protein interactions. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 2, p. 199-205, Apr 2003. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648676> >.

DWIVEDI, V. P. et al. Mycobacterium tuberculosis directs T helper 2 cell differentiation by inducing interleukin-1 $\beta$  production in dendritic cells. **J Biol Chem**, v. 287, n. 40, p. 33656-63, Sep 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22810226> >.

DYE, C. et al. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. **JAMA**, v. 282, n. 7, p. 677-86, Aug 1999. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10517722> >.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577-8593, 1995.

ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. Chapter 5, p. Unit 5.6, Oct 2006. ISSN 1934-340X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18428767> >.

FENG, L. et al. B lymphocytes that migrate to tuberculous pleural fluid via the SDF-1/CXCR4 axis actively respond to antigens specific for Mycobacterium tuberculosis. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 11, p. 3261-9, Nov 2011. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21818756> >.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 93-129, 2001. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244032> >.

FREES, D. et al. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. **Mol Microbiol**, v. 63, n. 5, p. 1285-95, Mar 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17302811> >.

FUJINAGA, M. et al. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 10, p. 3364-9, Mar 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993599> >.

FÜLÖP, V.; BÖCSKEI, Z.; POLGÁR, L. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. **Cell**, v. 94, n. 2, p. 161-70, Jul 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9695945> >.

G., D. N.; B., P.; J., L. Prolyl oligopeptidase inhibitors: a new class of memory enhancing drugs. **Drugs Fut**, v. 23, p. 167-179, 1998.

GARCIA, M. P. et al. Characterisation of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease. **Mol Biochem Parasitol**, v. 91, n. 2, p. 263-72, Mar 1998. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566519> >.

GERSZTEN, R. E. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 718-23, Apr 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227295> >.

GEY VAN PITTIUS, N. C. et al. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. **Genome Biol**, v. 2, n. 10, p. RESEARCH0044, 2001. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597336> >.



GRADMANN, C. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. **Med Hist**, v. 45, n. 1, p. 1-32, Jan 2001. ISSN 0025-7273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11235050> >.

GRELLIER, P. et al. Trypanosoma cruzi prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47078-86, Dec 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598112> >.

HAAGSMA, A. C. et al. Probing the interaction of the diarylquinoline TMC207 with its target mycobacterial ATP synthase. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23575, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858172> >.

HAFFNER, C. D. et al. Pyrrolidinyl pyridone and pyrazinone analogues as potent inhibitors of prolyl oligopeptidase (POP). **Bioorg Med Chem Lett**, v. 18, n. 15, p. 4360-3, Aug 2008. ISSN 1464-3405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606544> >.

HESS, B. et al. LINC: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, p. 435-447, 2008.

HESSELING, A. C. et al. The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children. **Vaccine**, v. 25, n. 1, p. 14-8, Jan 2007. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959383> >.

HILLISCH, A.; PINEDA, L. F.; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. **Drug Discov Today**, v. 9, n. 15, p. 659-69, Aug 2004. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279849> >.

HINCHEY, J. et al. Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of Mycobacterium tuberculosis. **J Clin Invest**, v. 117, n. 8, p. 2279-88, Aug 2007. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671656> >.

HOFT, D. F. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. **Lancet**, v. 372, n. 9633, p. 164-75, Jul 2008. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620952> >.



HOLMQUIST, M. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. **Curr Protein Pept Sci**, v. 1, n. 2, p. 209-35, Sep 2000. ISSN 1389-2037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369917> >.

HOLT, P. G.; SCHON-HEGRAD, M. A. Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. **Immunology**, v. 62, n. 3, p. 349-56, Nov 1987. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3499375> >.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **J Mol Graph**, v. 14, n. 1, p. 33-8, 27-8, Feb 1996. ISSN 0263-7855. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8744570> >.

INGVARSSON, H. et al. Insights into the inter-ring plasticity of caseinolytic proteases from the X-ray structure of Mycobacterium tuberculosis ClpP1. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 63, n. Pt 2, p. 249-59, Feb 2007. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17242518> >.

INOBE, T.; MATOUSCHEK, A. Protein targeting to ATP-dependent proteases. **Curr Opin Struct Biol**, v. 18, n. 1, p. 43-51, Feb 2008. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276129> >.

ISHINO, T. et al. cDNA cloning of mouse prolyl endopeptidase and its involvement in DNA synthesis by Swiss 3T3 cells. **J Biochem**, v. 123, n. 3, p. 540-5, Mar 1998. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9538240> >.

JOHNSON, A. E. Fluorescence approaches for determining protein conformations, interactions and mechanisms at membranes. **Traffic**, v. 6, n. 12, p. 1078-92, Dec 2005. ISSN 1398-9219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16262720> >.

JOHNSON, M. S. et al. Knowledge-based protein modeling. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 29, n. 1, p. 1-68, 1994. ISSN 1040-9238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8143488> >.

JOHNSON, R. et al. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Curr Issues Mol Biol**, v. 8, n. 2, p. 97-111, Jul 2006. ISSN 1467-3037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16878362> >.

JUFFERMANS, N. P. et al. Expression of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on granulocytes in human endotoxemia and tuberculosis: involvement of the p38 mitogen-activated



protein kinase pathway. **J Infect Dis**, v. 182, n. 3, p. 888-94, Sep 2000. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950785> >.

KABASHIMA, T. et al. Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene. **Arch Biochem Biophys**, v. 358, n. 1, p. 141-8, Oct 1998. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9750174> >.

KANATANI, A. et al. Protease II from *Escherichia coli*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme. **J Biochem**, v. 110, n. 3, p. 315-20, Sep 1991. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1769955> >.

KANATANI, A. et al. Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme. **J Biochem**, v. 113, n. 6, p. 790-6, Jun 1993. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8370677> >.

KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 20-30, Oct 2001. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905811> >.

KAUSHIK, S.; SOWDHAMINI, R. Structural analysis of prolyl oligopeptidases using molecular docking and dynamics: insights into conformational changes and ligand binding. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26251, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22132071> >.

KHAN, A. R.; JAMES, M. N. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. **Protein Sci**, v. 7, n. 4, p. 815-36, Apr 1998. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9568890> >.

KLEMBA, M.; GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 275-305, 2002. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045098> >.

KOIDA, M.; WALTER, R. Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. **J Biol Chem**, v. 251, n. 23, p. 7593-9, Dec 1976. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/121173> >.

KRISHNAN, N.; ROBERTSON, B. D.; THWAITES, G. Pathways of IL-1 $\beta$  secretion by macrophages infected with clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 93, n. 5, p. 538-



47, Sep 2013. ISSN 1873-281X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849220> >.

LADEL, C. H. et al. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. **Infect Immun**, v. 65, n. 11, p. 4843-9, Nov 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353074> >.

LAKOWICZ; J; R. **Principle of fluorescence spectroscopy**. New York: Spring Science+Business Media, 2004.

LAMICHHANE, G.; TYAGI, S.; BISHAI, W. R. Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of Mycobacterium tuberculosis in mouse lungs. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2533-40, Apr 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784600> >.

LAVALLIE, E. R. et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. **Biotechnology (N Y)**, v. 11, n. 2, p. 187-93, Feb 1993. ISSN 0733-222X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7763371> >.

LI, M. et al. Induced-fit mechanism for prolyl endopeptidase. **J Biol Chem**, v. 285, n. 28, p. 21487-95, Jul 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20444688> >.

MAASSEN, C. B. et al. Growth phase of orally administered Lactobacillus strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. **Vaccine**, v. 21, n. 21-22, p. 2751-7, Jun 2003. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798614> >.

MAES, M. et al. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. **Psychiatry Res**, v. 58, n. 3, p. 217-25, Oct 1995. ISSN 0165-1781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8570777> >.

MAES, M. et al. Lower serum activity of prolyl endopeptidase in anorexia and bulimia nervosa. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 1, p. 17-26, Jan 2001. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11070331> >.

MAES, M. et al. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. **Cytokine**, v. 10, n. 4, p.



313-8, Apr 1998. ISSN 1043-4666. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9617578> >.

MAGGIO, E. T.; RAMNARAYAN, K. Recent developments in computational proteomics. **Trends Biotechnol**, v. 19, n. 7, p. 266-72, Jul 2001. ISSN 0167-7799. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11412950> >.

MANTLE, D. et al. Comparison of proline endopeptidase activity in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. **Clin Chim Acta**, v. 249, n. 1-2, p. 129-39, May 1996. ISSN 0009-8981. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8737597> >.

MARAIS, B. J. et al. Diversity of disease in childhood pulmonary tuberculosis. **Ann Trop Paediatr**, v. 25, n. 2, p. 79-86, Jun 2005. ISSN 0272-4936. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949195> >.

MARTÍ-RENOM, M. A. et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 29, p. 291-325, 2000. ISSN 1056-8700. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940251> >.

MATTHEWS, D. A. et al. Re-examination of the charge relay system in subtilisin comparison with other serine proteases. **J Biol Chem**, v. 252, n. 24, p. 8875-83, Dec 1977. ISSN 0021-9258. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21885> >.

MAYER-BARBER, K. D. et al. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 1023-34, Dec 2011. ISSN 1097-4180. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22195750> >.

MIESEL, L. et al. NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in Mycobacterium smegmatis. **J Bacteriol**, v. 180, n. 9, p. 2459-67, May 1998. ISSN 0021-9193. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9573199> >.

MIHRET, A. et al. Plasma cytokines and chemokines differentiate between active disease and non-active tuberculosis infection. **J Infect**, v. 66, n. 4, p. 357-65, Apr 2013. ISSN 1532-2742. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178506> >.

MITSIADES, C. S. et al. Proteasome inhibition as a new therapeutic principle in hematological malignancies. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 10, p. 1341-7, Oct 2006. ISSN 1873-5592. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17073596> >.



MIURA, N.; SHIBATA, S.; WATANABE, S. Increase in the septal vasopressin content by prolyl endopeptidase inhibitors in rats. **Neurosci Lett**, v. 196, n. 1-2, p. 128-30, Aug 1995. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501240> >.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, p. 952-962, 1992.

MORTY, R. E. et al. Identification of the reactive cysteine residues in oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*. **FEBS Lett**, v. 579, n. 10, p. 2191-6, Apr 2005. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15811340> >.

MOTTA, F. N. et al. The *Trypanosoma cruzi* Virulence Factor Oligopeptidase B (OPBTc) Assembles into an Active and Stable Dimer. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30431, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22276197> >.

MUKHERJEE, S.; SAHA, B.; DAS, A. K. Differential chemical and thermal unfolding pattern of Rv3588c and Rv1284 of *Mycobacterium tuberculosis* - A comparison by fluorescence and circular dichroism spectroscopy. **Biophys Chem**, v. 141, n. 1, p. 94-104, Apr 2009. ISSN 1873-4200. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181437> >.

NICAS, M.; NAZAROFF, W. W.; HUBBARD, A. Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens. **J Occup Environ Hyg**, v. 2, n. 3, p. 143-54, Mar 2005. ISSN 1545-9624. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764538> >.

NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 599-623, 2004. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032590> >.

NOVIKOV, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 $\beta$  production in human macrophages. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2540-7, Sep 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784976> >.

NYGREN, P. A.; STÅHL, S.; UHLÉN, M. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. **Trends Biotechnol**, v. 12, n. 5, p. 184-8, May 1994. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764901> >.

NÓBREGA, O. T. **Caracterização molecular e funcional da catepsina tipo B de *Trypanosoma cruzi***. 2001



OHOL, Y. M. et al. Mycobacterium tuberculosis MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. **Cell Host Microbe**, v. 7, n. 3, p. 210-20, Mar 2010. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227664> >.

OLLINGER, J. et al. Inhibition of the sole type I signal peptidase of Mycobacterium tuberculosis is bactericidal under replicating and nonreplicating conditions. **J Bacteriol**, v. 194, n. 10, p. 2614-9, May 2012. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427625> >.

OLLINGER, J. et al. Validation of the essential ClpP protease in Mycobacterium tuberculosis as a novel drug target. **J Bacteriol**, v. 194, n. 3, p. 663-8, Feb 2012. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123255> >.

ORME, I. M. Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: a comprehensive review. **Vaccine**, v. 24, n. 1, p. 2-19, Jan 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139397> >.

ORME, I. M.; COOPER, A. M. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. **Immunol Today**, v. 20, n. 7, p. 307-12, Jul 1999. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10379048> >.

PAETZEL, M.; DALBEY, R. E.; STRYNADKA, N. C. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target. **Pharmacol Ther**, v. 87, n. 1, p. 27-49, Jul 2000. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924740> >.

PAETZEL, M. et al. Signal peptidases. **Chem Rev**, v. 102, n. 12, p. 4549-80, Dec 2002. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475201> >.

PETERS, W. et al. CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v. 172, n. 12, p. 7647-53, Jun 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187146> >.

PETERS, W. et al. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to Mycobacterium tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 14, p. 7958-63, Jul 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438742> >.

PFYFFER, G. E. Drug-resistant tuberculosis: resistance mechanisms and rapid susceptibility testing. **Schweiz Med Wochenschr**, v. 130, n. 49, p. 1909-13, Dec 2000. ISSN 0036-7672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153397> >.



POLGÁR, L. Structural relationship between lipases and peptidases of the prolyl oligopeptidase family. **FEBS Lett**, v. 311, n. 3, p. 281-4, Oct 1992. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1397329> >.

POLGÁR, L. The prolyl oligopeptidase family. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 2, p. 349-62, Feb 2002. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11915948> >.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 19-20, p. 2161-72, Oct 2005. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16003488> >.

PORTEVIN, B. et al. New prolyl endopeptidase inhibitors: in vitro and in vivo activities of azabicyclo[2.2.2]octane, azabicyclo[2.2.1]heptane, and perhydroindole derivatives. **J Med Chem**, v. 39, n. 12, p. 2379-91, Jun 1996. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8691432> >.

PUENTE, X. S. et al. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 7, p. 544-58, Jul 2003. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838346> >.

QUESNIAUX, V. et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. **Microbes Infect**, v. 6, n. 10, p. 946-59, Aug 2004. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15310472> >.

RAJA, A. Immunology of tuberculosis. **Indian J Med Res**, v. 120, n. 4, p. 213-32, Oct 2004. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520479> >.

RAJU, R. M. et al. Mycobacterium tuberculosis ClpP1 and ClpP2 function together in protein degradation and are required for viability in vitro and during infection. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002511, Feb 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22359499> >.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. **Tuber Lung Dis**, v. 79, n. 1, p. 3-29, 1998. ISSN 0962-8479. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10645439> >.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sep 1998. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729602> >.



RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem J**, v. 290 ( Pt 1), p. 205-18, Feb 1993. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8439290> >.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of serine peptidases. **Methods Enzymol**, v. 244, p. 19-61, 1994. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7845208> >.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Database issue, p. D227-33, Jan 2010. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892822> >.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. Database issue, p. D320-5, Jan 2008. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17991683> >.

RAWLINGS, N. D.; POLGAR, L.; BARRETT, A. J. A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. **Biochem J**, v. 279 ( Pt 3), p. 907-8, Nov 1991. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1953688> >.

REA, D.; FÜLÖP, V. Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes. **Cell Biochem Biophys**, v. 44, n. 3, p. 349-65, 2006. ISSN 1085-9195. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679522> >.

RENGARAJAN, J. et al. Mycobacterium tuberculosis Rv2224c modulates innate immune responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 1, p. 264-9, Jan 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172199> >.

RENEX, D. et al. cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. **Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2195-203, Feb 1991. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1900195> >.

RICHARDSON, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. **Adv Protein Chem**, v. 34, p. 167-339, 1981. ISSN 0065-3233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7020376> >.

ROBERTS, D. M. et al. Proteases in Mycobacterium tuberculosis pathogenesis: potential as drug targets. **Future Microbiol**, v. 8, n. 5, p. 621-31, May 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23642117> >.

RUSSELL, D. G. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 8, p. 569-77, Aug 2001. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483990> >.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 39-47, Jan 2007. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160001> >.

RÜSCH-GERDES, S. Epidemiology of resistant tuberculosis in Europe. **Infection**, v. 27 Suppl 2, p. S17-8, 1999. ISSN 0300-8126. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10885821> >.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol Biochem Parasitol**, v. 120, n. 1, p. 1-21, Mar 2002. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849701> >.

SANDER, C. R. et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 179, n. 8, p. 724-33, Apr 2009. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151191> >.

SANDER, P. et al. Lipoprotein processing is required for virulence of Mycobacterium tuberculosis. **Mol Microbiol**, v. 52, n. 6, p. 1543-52, Jun 2004. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186407> >.

SANTANA, J. M. et al. A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochem J**, v. 325 ( Pt 1), p. 129-37, Jul 1997. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224638> >.

SASSETTI, C. M.; RUBIN, E. J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 22, p. 12989-94, Oct 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14569030> >.

SEEMÜLLER, E. et al. The proteasome from Thermoplasma acidophilum is neither a cysteine nor a serine protease. **FEBS Lett**, v. 359, n. 2-3, p. 173-8, Feb 1995. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7867793> >.

SERTL, K. et al. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. **J Exp Med**, v. 163, n. 2, p. 436-51, Feb 1986. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3511172> >.

SHAN, L. et al. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. **Biochem J**, v. 383, n. Pt 2, p. 311-8, Oct 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15245330> >.

SHAN, L.; MATHEWS, I. I.; KHOSLA, C. Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 10, p. 3599-604, Mar 2005a. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738423> >.

SHAN, L.; MATHEWS, I. I.; KHOSLA, C.. Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 10, p. 3599-604, Mar 2005b. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738423> >.

SHENDEROV, K. et al. Cord factor and peptidoglycan recapitulate the Th17-promoting adjuvant activity of mycobacteria through mincle/CARD9 signaling and the inflammasome. **J Immunol**, v. 190, n. 11, p. 5722-30, Jun 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23630357> >.

SHIRASAWA, Y.; OSAWA, T.; HIRASHIMA, A. Molecular cloning and characterization of prolyl endopeptidase from human T cells. **J Biochem**, v. 115, n. 4, p. 724-9, Apr 1994. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089089> >.

SIROTA, F. L.; PASCUTTI, P. G.; ANTENEODO, C. Molecular modeling and dynamics of the sodium channel inactivation gate. **Bioophys J**, v. 82, n. 3, p. 1207-15, Mar 2002. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867438> >.

SKEIKY, Y. A.; SADOFF, J. C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 6, p. 469-76, Jun 2006. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710326> >.

SNOW, C. D. et al. How well can simulation predict protein folding kinetics and thermodynamics? **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 34, p. 43-69, 2005. ISSN 1056-8700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869383> >.

STONE, S. R. et al. Inactivation of prolyl endopeptidase by a peptidylchloromethane. Kinetics of inactivation and identification of sites of modification. **Biochem J**, v. 276 ( Pt 3), p. 837-40, Jun 1991. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2064618> >.



SUN, Q. M. et al. Expression, purification of human vasostatin120-180 in *Escherichia coli*, and its anti-angiogenic characterization. **Protein Expr Purif**, v. 39, n. 2, p. 288-95, Feb 2005. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15642481> >.

SZELTNER, Z.; RENNER, V.; POLGÁR, L. The noncatalytic beta-propeller domain of prolyl oligopeptidase enhances the catalytic capability of the peptidase domain. **J Biol Chem**, v. 275, n. 20, p. 15000-5, May 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747969> >.

SZWAJCER-DEY, E. et al. Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of an enzyme from a *Xanthomonas* sp. **J Bacteriol**, v. 174, n. 8, p. 2454-9, Apr 1992. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1556065> >.

SÁNCHEZ, R.; SALI, A. Advances in comparative protein-structure modelling. **Curr Opin Struct Biol**, v. 7, n. 2, p. 206-14, Apr 1997. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9094331> >.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 3, p. 323-34, 2007 May-Jun 2007. ISSN 1806-3756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906795> >.

TENORIO-LARANGA, J. et al. Prolyl oligopeptidase is inhibited in relapsing-remitting multiple sclerosis. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 23, 2010. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370893> >.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 5, p. 523-33, Jan 2003. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12536251> >.

THAKURDAS, S. M.; HASAN, Z.; HUSSAIN, R. IgG1 antimycobacterial antibodies can reverse the inhibitory effect of pentoxifylline on tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) secreted by mycobacterial antigen-stimulated adherent cells. **Clin Exp Immunol**, v. 136, n. 2, p. 320-7, May 2004. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15086397> >.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **MICROBIOLOGIA**. 10ª Edição. 2012.

USUKI, H. et al. Activation of oligopeptidase B from *Streptomyces griseus* by thiol-reacting reagents is independent of the single reactive cysteine residue. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 11, p. 1673-83, Nov 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665591> >.



VAN DER SPOEL, D. et al. Thermodynamics of hydrogen bonding in hydrophilic and hydrophobic media. **J Phys Chem B**, v. 110, n. 9, p. 4393-8, Mar 2006. ISSN 1520-6106. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16509740> >.

VAN ELZEN, R.; LAMBEIR, A. M. Structure and function relationship in prolyl oligopeptidase. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 297-305, May 2011. ISSN 1996-3181. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21222621> >.

VANHOOFF, G. et al. Cloning and sequence analysis of the gene encoding human lymphocyte prolyl endopeptidase. **Gene**, v. 149, n. 2, p. 363-6, Nov 1994. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7959018> >.

VENÄLÄINEN, J. I. et al. Binding kinetics and duration of in vivo action of novel prolyl oligopeptidase inhibitors. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 5, p. 683-92, Feb 2006. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405869> >.

VILCHÈZE, C. et al. Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol**, v. 182, n. 14, p. 4059-67, Jul 2000. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869086> >.

VÁSQUEZ, M. Modeling side-chain conformation. **Curr Opin Struct Biol**, v. 6, n. 2, p. 217-21, Apr 1996. ISSN 0959-440X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728654> >.

WALTER, R. et al. Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. **Science**, v. 173, n. 3999, p. 827-9, Aug 1971. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5572174> >.

WANG, J.; MALDONADO, M. A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. **Cell Mol Immunol**, v. 3, n. 4, p. 255-61, Aug 2006. ISSN 1672-7681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978533> >.

WELCHES, W. R.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. **Life Sci**, v. 52, n. 18, p. 1461-80, 1993. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8387132> >.

OMS. **Global tuberculosis control. Geneva:World Health Organization** 2011.



OMS. **Global tuberculosis control. Geneva:World Health Organization** 2012.

OMS. **Global tuberculosis control. Geneva:World Health Organization** 2013.

WILK, S.; ORLOWSKI, M. Inhibition of rabbit brain prolyl endopeptidase by n-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal, a transition state aldehyde inhibitor. **J Neurochem**, v. 41, n. 1, p. 69-75, Jul 1983. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345724> >.

WILLIAMS, R. S. et al. Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate. **EMBO J**, v. 18, n. 10, p. 2734-45, May 1999. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329620> >.

WILLIAMS, R. S.; HARWOOD, A. J. Lithium therapy and signal transduction. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 2, p. 61-4, Feb 2000. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10664610> >.

YAMADA, H. et al. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 759-67, May 2000. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10830786> >.

YOSHIMOTO, T. et al. Post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase. Comparison of two peptidases with high specificity for proline residues. **J Biol Chem**, v. 253, n. 10, p. 3708-16, May 1978. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/649599> >.

YOSHIMOTO, T. et al. Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect. **J Pharmacobiodyn**, v. 10, n. 12, p. 730-5, Dec 1987. ISSN 0386-846X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3330562> >.

YOSHIMOTO, T. et al. Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene. **J Biochem**, v. 110, n. 6, p. 873-8, Dec 1991. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1840588> >.

YOSHIMOTO, T. et al. Cloning and expression of the cDNA encoding prolyl oligopeptidase (prolyl endopeptidase) from bovine brain. **Biol Pharm Bull**, v. 20, n. 10, p. 1047-50, Oct 1997. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353562> >.



YOSHIMOTO, T. et al.. Studies on prolyl endopeptidase from shakashimeji (*Lyophyllum cinerascens*): purification and enzymatic properties. **J Biochem**, v. 104, n. 4, p. 622-7, Oct 1988. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3071534> >.

YOSHIMOTO, T.; WALTER, R.; TSURU, D. Proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium*. Purification and properties. **J Biol Chem**, v. 255, n. 10, p. 4786-92, May 1980. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6768725> >.

YUAN, L. D.; HUA, Z. C. Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif**, v. 25, n. 2, p. 300-4, Jul 2002. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135563> >.

ZHANG, Y.; YOUNG, D. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 34, n. 3, p. 313-9, Sep 1994. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7829406> >.

ZIGNOL, M. et al. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. **J Infect Dis**, v. 194, n. 4, p. 479-85, Aug 2006. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845631> >.

ZIMHONY, O. et al. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nat Med**, v. 6, n. 9, p. 1043-7, Sep 2000. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973326> >.