UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PATRÍCIA ROSA FELICIANO

**Estudos da correlação entre estrutura e função da enzima
fumarato hidratase em *Leishmania major***

Ribeirão Preto

2013

PATRÍCIA ROSA FELICIANO

Estudos da correlação entre estrutura e função da enzima
fumarato hidratase em *Leishmania major*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Química e Física Biológica
Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Nonato Costa
Coorientadora: Profa. Dra. Catherine L. Drennan

*Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas no dia 07/10/2013. A versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Feliciano, Patrícia Rosa

Estudos da correlação entre estrutura e função da enzima fumarato hidratase em *Leishmania major* / Patrícia Rosa Feliciano; orientadora Maria Cristina Nonato Costa. – Ribeirão Preto, 2013.

142 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Química e Física Biológica) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. *Leishmania major*. 2. Fumarato hidratase. 3. Estrutura cristalográfica. 4. Mecanismo de ação enzimática.

FELICIANO, P. R. **Estudos da correlação entre estrutura e função da enzima fumarato hidratase em *Leishmania major***. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Química e Física Biológica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz e Fátima, e irmãos, João Vitor e Daniela.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, Profa. Cristina Nonato, Prof, Cris, Cristininha, Dona Maria, pelos agradáveis 10 anos de dedicada orientação e amizade. Que venham muitos mais! Muito obrigada por tudo!

À Profa. Cathy Drennan pela coorientação e por me receber em seu laboratório no MIT.

Ao Prof. Antonio José da Costa Filho pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

Aos amigos do LCP: Adam, Aline, Diego, Iara, Joane, Juliana, Renata, Ricardo e Valéria pelas eternas discussões científicas (“fosforiladas”), pela agradável convivência e acima de tudo pela grande amizade.

Aos colegas do Drennan lab (MIT) pelos ensinamentos, paciência e agradável convivência.

Aos amigos de Boston: Ale, Augusto, Amanda, Cláudia, Mandy, Marina e Joni, que fizeram dos meus dias em Boston tão agradáveis. Muito obrigada!

Aos amigos: Ana Flávia, Camila, Carol, Glenda, Livia, Josi, Juliano, Maisa, Mato, Nahas, Naty e Val pela grande amizade e compreensão das minhas constantes ausências.

Aos meus pais, meus irmãos, pelo apoio incondicional, paciência e disposição sempre que precisei.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

*“É preciso força pra sonhar e perceber
Que a estrada vai além do que se vê”*

Los Hermanos

RESUMO

FELICIANO, P. R. **Estudos da correlação entre estrutura e função da enzima fumarato hidratase em *Leishmania major***. 2013. 142 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Leishmania é um protozoário parasito flagelado responsável pelas Leishmanioses, classificadas como doenças negligenciadas, que causam um risco a 350 milhões de pessoas em todo o mundo. As fumarato hidratases (FHs) são enzimas que catalisam a hidratação reversível da molécula de fumarato em S-malato e estudos recentes em tripanosomatídeos, utilizando *Trypanosoma brucei* como modelo, apontam essas enzimas como potenciais alvos para o planejamento de compostos com ação tripanossomicida e leishmanicida. O presente trabalho visou à caracterização funcional e estrutural das enzimas fumarato hidratase de *Leishmania major* através da determinação da estrutura por técnicas de difração de raios-X em monocristais, aliadas a técnicas espectroscópicas, de mutagênese sítio dirigida e simulação de dinâmica molecular. A susceptibilidade dessa classe de enzimas ao oxigênio devido a presença de um complexo do tipo [4Fe-4S] exigiu a utilização de técnicas modernas para a realização dos experimentos em condição de anaerobiose. A estrutura da isoforma citosólica da FH em *L. major* (LmFH-2) foi determinada por técnicas de difração de raios-X em monocristais e consiste na primeira estrutura de uma proteína da classe I das FHs a ser determinada. O enovelamento de LmFH-2 foi descrito como novo e consiste em uma proteína dimérica na qual cada monômero apresenta dois domínios denominados domínios N- e C- terminais, que possuem grande mobilidade entre si. A análise das estruturas cristalográficas de LmFH-2 em complexo com o substrato malato e os inibidores malonato e succinato, associada aos estudos de dinâmica molecular, nos permitiu propor que a mobilidade entre os domínios está associada à entrada do substrato no sítio ativo. Os dados estruturais corroborados pelos dados espectroscópicos e bioquímicos foram utilizados para mapear o sítio ativo e construirmos um modelo para descrever o mecanismo de ação enzimática adotado por essa classe de enzimas. Na tentativa de dar início à validação do nosso modelo, o resíduo conservado Thr⁴⁶⁷, pertencente ao sítio ativo da LmFH-2 e identificado como importante na interação com o substrato, teve seu papel catalítico avaliado através da combinação de técnicas de mutação sítio-dirigida associada a estudos cinéticos e estruturais. A perda significativa na atividade da proteína mutante LmFH-2-T467A fortaleceu nossas hipóteses de que a Thr⁴⁶⁷ poderia atuar como ácido ou base no mecanismo

de ação das FHs da classe I. Os resultados obtidos nesse trabalho nos fornecerão as bases estruturais para o mapeamento acerca do mecanismo catalítico adotado pelas enzimas fumarato hidratase da classe I, assim como, para o planejamento de ligantes específicos como uma importante ferramenta na avaliação do potencial desta classe de enzimas como alvo para o desenvolvimento de novas terapias contra a Leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania major*, fumarato hidratase, estrutura cristalográfica, mecanismo de ação enzimática.

ABSTRACT

FELICIANO, P. R. **Structure-function relationship studies of fumarate hydratase from *Leishmania major***. 2013. 142 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Leishmania parasites are the casual agent of leishmaniasis, classified as neglected tropical diseases, with 350 million people at risk of infection. Fumarate hydratases (FH) are enzymes that catalyze the stereospecific reversible hydration of fumarate to S-malate and recent studies in trypanosomatids, using *Trypanosoma brucei* as a model suggest that the fumarate hydratase enzymes are essential for the parasite survival and should be exploited as potential targets for the development of new therapies against trypanosomatid related diseases. The present work focused the functional and structural characterization of both fumarate hydratase enzymes from *Leishmania major* by a combination of crystallographic, spectroscopic, site-direct mutagenesis and molecular dynamics techniques. The susceptibility to oxygen observed for this class of proteins due to the presence of a [4Fe-4S] cluster required the use of state-of-art infrastructure to perform the experiments under anaerobic environment. The structure of LmFH-2 has been determined by X-ray diffraction techniques and consists of the first class I FH structure to be reported. LmFH-2 folding has been found to be unique and consists of a dimer with each monomer composed of two major domains named N- and C-terminal domains. The analysis of the crystallographic structure of LmFH-2 in complex with the substrate malate and with both inhibitors malonate and succinate has allowed us to propose that the movement observed between both N- and C-domains is associated to the entrance of the substrate into the active site. The structural data corroborated with biochemical and spectroscopic studies have been used to map the active site and to build a model to describe the mechanism of action adopted by this class of enzymes. As our first attempt to validate our model, the residue Thr⁴⁶⁷ that belongs to the active site and has been identified as important in the interaction with the substrate, had its catalytic role evaluated by site-direct mutagenesis in combination with kinetic and structural studies. The significant loss in activity observed for the mutant LmFH-2-T467A supports our hypothesis that Thr⁴⁶⁷ can act as either acid or base during catalysis. Our results have provided the structural basis for the complete mapping of the catalytic mechanism adopted by fumarate hydratase enzymes, as well as for the design of specific ligands as an important tool for evaluating FHs as drug targets in development of new therapies against Leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania major*, fumarate hydratase, crystal structure, mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	01
Figura 2	Distribuição geográfica das leishmanioses pelo mundo no período de 2005 a 2009: (A) Leishmaniose visceral; (B) Leishmaniose cutânea.....	03
Figura 3	Reação reversível de hidratação estereoespecífica catalisada pela enzima fumarato hidratase.....	04
Figura 4	Alinhamento sequencial entre as isoformas LmFH-1 e LmFH-2 da enzima fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificadas pelos genes LmjF24.0320 e LmjF29.1960, respectivamente. LmFH-1 e LmFH-2 pertencem a classe I das FHs. LmFH-1 contém 549 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 60.808Da e pI teórico de 7,2. LmFH-2 contém 568 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 62.602Da e pI teórico de 6,6 (www.expasy.org). O alinhamento foi realizado no programa MultAlin (Corpet, 1988) e a figura criada no programa ESPrit (Gouet <i>et al.</i> , 1999).....	05
Figura 5	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni da enzima LmFH-2. As frações 1 a 7, 8 a 19, e 20 a 27 representam as frações com 50 mM de imidazol, 100 e 500 mM de imidazol, respectivamente. M indica o padrão de massa molecular.....	34
Figura 6	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni da enzima LmFH-2-T467A. As frações 1 a 4, 5 a 10, e 10 a 14 representam as frações com 50, 100 e 500 mM de imidazol, respectivamente. M indica o padrão de massa molecular de 250 a 10kDa (New England Biolabs).....	35
Figura 7	(A) Perfil cromatográfico de LmFH-2 por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. A cromatografia foi realizada em tampão 50 mM tris pH 8,5, 150mM NaCl. (B) SDS-PAGE 12% das frações eluídas por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. FH2 corresponde a proteína que foi concentrada e aplicada na coluna. Os números (8 a 15) correspondem as frações de 1 ml representadas em vermelho no cromatograma do item (A). (C) Perfil cromatográfico de LmFH-2 diluída por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200.....	36
Figura 8	Perfil de eluição cromatográfico para os padrões de massa molecular (A) e a correspondente curva de calibração (B) da coluna de exclusão molecular Superdex 200 (Ge Healthcare). A calibração da coluna foi realizada em 20 mM tris pH 8, 150 mM NaCl. Dados gentilmente cedidos pela aluna de doutorado Joane K. R. Bonalumi.....	37
Figura 9	Análise do perfil de tamanho encontrado para as amostras de LmFH-2 obtidas através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Nos gráficos estão representados o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função da intensidade da luz espalhada e do volume.....	38
Figura 10	Dicroísmo circular de LmFH-2. (A) Espectros de dicroísmo circular em diferentes temperaturas (10 a 90 °C). (B) Desnaturação térmica da proteína monitorada em 220 nm.....	39
Figura 11	Espectros de EPR do complexo [3Fe-4S] ⁺ da proteína LmFH-2 medidos a 10 K. (A) Espectros de LmFH-2 na forma holo (preto), incubada com ditionito de sódio	

- (vermelho), com APS (magenta) e com ditionito de sódio e em seguida com APS (azul). **(B)** Espectros de LmFH-2 na forma holo (preto), incubada com fumarato (azul) e malato (pink)..... 41
- Figura 12** Perfil pH versus atividade específica para a enzima LmFH-2 utilizando S-malato **(A)** ou fumarato **(B)** como substrato. A curva foi construída a partir da medida da velocidade inicial da formação ou do consumo de fumarato a 250 nm e 25°C. As soluções em diferentes pHs utilizadas foram: acetato de sódio 50 mM pH 4 e pH 5; cacodilato de sódio 50 mM pH 6,2; tris 50 mM pH 7, 8 e 9; glicina/NaOH 50 mM pH 10; NaHCO₃/NaOH 50 mM pH 11; KCl/NaOH 50 mM pH 12; todas contendo NaCl 150 mM. A concentração final da enzima era 40 µg/mL e dos substratos, fumarato e malato, 1 mM..... 42
- Figura 13** Cristalização de LmFH-2 na condição E11 do PEG/Ion Screen HT (4% (v/v) tacsimato pH 5, 12% (m/v) PEG 3.350). **(A)** Gota com proteína precipitada observada nos ensaios de cristalização da LmFH-2 a 9 mg/mL em tampão 50mM tris pH 8,5, 300mM NaCl. **(B)** Cristais obtidos com a proteína a LmFH-2 a 8,6 mg/mL em tampão 50mM tris pH 8,5, 300mM NaCl, 1mM DTT. As imagens foram tiradas com o microscópio CrysCam (Alfa Biotech)..... 47
- Figura 14** Cristais de LmFH-2 em 4% (v/v) tacsimato pH 5 e 12% (m/v) PEG 3.350. **(A)** Cristais de LmFH-2 na forma de complexos. **(B)** Cristais isolados de LmFH-2 obtidos através da combinação de *microseeding* e etanol 2,7%..... 47
- Figura 15** Cristal de LmFH-2 (8,7 mg/mL incubada com fumarato 5mM) obtido em tacsimato 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.. 48
- Figura 16** Cristal do complexo LmFH-2-malato (4,75 mg/mL) obtido em tacsimato^s 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*..... 48
- Figura 17** Cristal do complexo LmFH-2-fumarato (5 mg/mL) obtido em tacsimato^s 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*..... 49
- Figura 18** Cristal do complexo LmFH-2-malonato (4,7 mg/mL) obtido em tacsimato^e 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*. 49
- Figura 19** Cristal do complexo LmFH-2-succinato (4,75 mg/mL) obtido em tacsimato^e 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*. 50
- Figura 20** Cristal do complexo LmFH-2-holo (4,7 mg/mL) obtido em tacsimato^{*} 4% pH 5, PEG 3.350 14%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*..... 51
- Figura 21** Cristal de LmFH-2-T467A (4,7 mg/mL) em 4% (v/v) tacsimato pH 5 e 12% (m/v) PEG 3.350, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*..... 51
- Figura 22** Cristal de LmFH-2-T467A-fumarato (4,7 mg/mL) obtido em tacsimato[#] 4% pH 5, PEG 3.350 14%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*..... 52
- Figura 23** Cristal de LmFH-2-T467A-malonato (4,7 mg/mL) obtido em tacsimato^e 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*..... 52
- Figura 24** Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica 2F₀-F_c, com σ igual a 1,5 para a estrutura de LmFH-2 a 2,05 Å de resolução..... 55
- Figura 25** Figura em estéreo do dímero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). As cadeias A e B estão representadas em rosa e azul, respectivamente, os complexos [4Fe-4S] em amarelo, as moléculas de malato em laranja, as moléculas de malonato em verde,

	as moléculas de glicerol em ciano e a molécula de PEG em vermelho.....	55
Figura 26	Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, identificando a molécula de malato presente na estrutura resolvida a partir da cocristalização com fumarato.....	56
Figura 27	Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-malato a 2,1 Å de resolução. A molécula de malato está ligada ao cluster [4Fe-4S], identificado por asteriscos verdes (S) e cinzas (Fe).....	57
Figura 28	Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-malonato a 2,1 Å de resolução. A molécula de malonato não se liga ao cluster, que está na forma oxidada [3Fe-4S]. Os átomos de S e Fe do cluster estão identificado por asteriscos verdes e cinzas, respectivamente.....	58
Figura 29	Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-succinato a 2,6 Å de resolução. A molécula de succinato está ligada ao cluster [4Fe-4S], identificado por asteriscos verdes (S) e cinzas (Fe).....	59
Figura 30	Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-T467A em complexo com malonato a 2,18 Å de resolução. O cluster [4Fe-4S] está identificado por asteriscos verdes (S) e cinzas (Fe).....	63
Figura 31	Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-T467A-malonato.....	64
Figura 32	Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-T467A em complexo com malato a 2,5 Å de resolução. O cluster [4Fe-4S] está identificado por asteriscos verdes (S) e cinzas (Fe).....	65
Figura 33	Topologia da estrutura de LmFH-2 predita pelo banco de dados PDBSum (http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/). As fitas- β e α -hélices estão representadas em rosa e amarelo, respectivamente. As regiões N- e C- terminais estão ilustradas em azul.....	66
Figura 34	(A) Representação do domínio “swivelling” beta/beta/alfa descrito por 3 camadas: folha β /folha β /domínio α que se enovelam na forma de um barril, cuja folha central é composta de fitas paralelas (em azul), a folha da extremidade é antiparalela (vermelho) e o domínio de hélices (amarelo) se posiciona separadamente. (B) Superposição entre o monômero de LmFH-2 (amarelo) (código PDB 4LOZ) e a região C-terminal de AfFH (magenta) (código PDB 2isb).....	68
Figura 35	(A) Domínio “FwdE/GAPDH domain-like” de LmFH-2 com arranjo α - β - α - β (3); da classe α + β , na qual as regiões de folhas (verde) e fitas estão separadas (vermelho), e apresenta folhas mistas do tipo 2134, na qual a fita 2 é paralela a 1. (B) Superposição entre os domínios “FwdE/GAPDH domain-like” de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) (laranja) e de D-3-fosfoglicerato desidrogenase de Mycobacterium tuberculosis (ciano) (código PDB 1ygy (Dey, Grant e Sacchettini, 2005)). Em amarelo está representado a proteína LmFH-2 e em salmon a proteína D-3-fosfoglicerato desidrogenase.	68
Figura 36	Figura em estéreo do monômero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). Os dois domínios N e C-terminais estão representados em laranja e amarelo, respectivamente. Em magenta está representado o complexo [4Fe-4S] e em azul as Cys 133, 252 e 346, que ligam o complexo.....	69

- Figura 37** Figura do domínio N-terminal de LmFH-2 (código PDB 4LOZ), destacando os subdomínios 1 (laranja) e 2 (rosa). Em azul estão representados os resíduos Cys¹³³, Cys²⁵² e Cys³⁴⁶, que ligam o complexo [4Fe-4S] (verde)..... 70
- Figura 38** Figura em estéreo do subdomínio 1 do domínio N-terminal de LmFH-2 (código PDB 4LOZ), destacando o domínio FwdE/GAPDH (azul). Em verde estão representados resíduos Gly²¹⁴ e Asp³⁴⁹, que conectam ao subdomínio 2. Em ciano está representada a Pro³⁷⁵, que é a base do loop não modelado que conecta os domínios N e C-terminais..... 70
- Figura 39** Figura em estéreo do subdomínio 2 do domínio N-terminal de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). Em verde estão representados os resíduos Gly²¹⁴ e Ala³⁴⁸, que conectam ao subdomínio 1..... 71
- Figura 40** Figura em estéreo do domínio C-terminal de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). Em ciano está representada a Thr³⁸⁵, que é a base do loop não modelado que conecta ao domínio N-terminal..... 71
- Figura 41** Figura dos domínios N-terminal (laranja) e C-terminal (amarelo) de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) sugerindo o caminho do substrato malato (ciano). Em verde está representado o complexo [4Fe-4S]..... 72
- Figura 42** Gráfico de rmsd versus número de resíduos da sequência de LmFH-2. As curvas são correspondentes a sobreposição de Cα da estrutura de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) com LmFH-2-malato (código PDB 4LP3) (azul), LmFH-2-malonato (vermelho), LmFH-2-succinato (verde), LmFH-2-T467A-malato (roxo) e LmFH-2-T467A-malonato (ciano)..... 73
- Figura 43** Figura em estéreo do dímero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) representando os domínios N e C-terminais em laranja e amarelo, respectivamente. Os resíduos envolvidos na dimerização são do domínio N-terminal e estão destacados em azul. O complexo [4Fe-4S] está representado em rosa..... 75
- Figura 44** **(A)** Figura do malonato (amarelo) na interface dimérica de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). As cadeias A e B estão representadas em rosa e azul, respectivamente. **(B)** Interações entre o malonato e os resíduos das cadeias A e B. O malonato (Mla 603 (A)) está representado em roxo e as ligações de hidrogênio em verde. A figura foi gerada pelo programa LIGPLOT v.4.5.3 (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>)..... 75
- Figura 45** Figura da superfície das cadeias A (rosa) e B (azul) do dímero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ), evidenciando o canal no topo da proteína onde o malonato está ligado na interface dimérica..... 75
- Figura 46** Figura em estéreo do sítio ativo de LmFH-2 (código PDB 4 LOZ). Os resíduos das cadeias A e B estão representados em branco e azul, respectivamente. O substrato malato, complexo [4Fe-4S] e a molécula de água estão representados em verde, amarelo (S) e laranja (Fe) e ciano, respectivamente..... 77
- Figura 47** **(A)** Representação das ligações do cluster [4Fe-4S] (SF4 608) à proteína (Cys 133, 252 e 346) e ao substrato malato (Lmr 601). **(B)** Interações entre o substrato malato e a proteína. O malato (Lmr 601) está representado em roxo, o cluster [4Fe-4S] (SF4 608) em magenta (Fe) e amarelo (S), os resíduos em laranja e as ligações de hidrogênio em verde. As figuras foram geradas pelo programa LIGPLOT v.4.5.3 (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>)..... 77

- Figura 48** Alinhamento sequencial entre FHs da classe 1: LmFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania major*), LtFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania tropica*), LdFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania donovani*), LiFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania infantum*), LbFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania braziliensis*), TcFH-2 (isoforma citosólica de *Trypanosoma cruzi*), TbFH-2 (isoforma citosólica de *Trypanosoma brucei*), TvFH-2 (isoforma citosólica de *Trypanosoma vivax*), SpFH (*Strongylocentrotus purpuratus*), SmFH (*Schistosoma mansoni*), SjFH (*Schistosoma japonicum*), AcFH (*Acanthamoeba castellanii* str. Neff), EcFH-A (fsm A de *Escherichia coli*), SeFH (*Salmonella enterica*), EnterobacterFH (*Enterobacter* sp. SST3), SbFH (*Shigella boydii*), YpFH (*Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758), RhodococcusFH (*Rhodococcus* sp. P14), LmFH-1 (isoforma mitocondrial de *Leishmania major*), LiFH-1 (isoforma mitocondrial de *Leishmania infantum*), LmxFH-1 (isoforma mitocondrial de *Leishmania mexicana*), LbFH-1 (isoforma mitocondrial de *Leishmania braziliensis*), TbFH-1 (isoforma mitocondrial de *Trypanosoma brucei*), TcFH-1 (isoforma mitocondrial de *Trypanosoma congolense*), TvFH-1 (isoforma mitocondrial de *Trypanosoma vivax*), TcFH-1 (isoforma mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*). Em rosa estão destacadas os resíduos do sítio ativo conservados entre as FHs da classe 1 e em amarelo as cisteínas que interagem o cluster [4Fe-4S]..... 78
- Figura 49** Figuras do sítio ativo de LmFH-2 e LmFH-2-T467A, mostrando as interações entre os ligantes malato (Lmr: painéis B, E, H e J), malonato (Mla: painéis C, F, I e K) ou succinato (Sin: painéis D e G) e os resíduos do sítio ativo da proteína. No painel A está representado a superposição entre todas as estruturas (painéis B, C, D, H e I). As figuras dos painéis E, F, G, J e K foram geradas pelo programa LIGPLOT v.4.5.3 (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>)..... 80
- Figura 50** Mecanismo proposto para as reações de desidratação de malato a fumarato (A) e hidratação de fumarato a malato (B) catalisadas pela enzima LmFH-2..... 82
- Figura 51** (A) Superfície de potencial eletrostático da estrutura LmFH-2 (código PDB 4LOZ). (B) Superfície de potencial eletrostático da LmFH-2 (código PDB 4LOZ) mostrando a cavidade positiva formada pela junção das cadeias A e B. (C) Superfície das cadeias A (rosa) e B (azul) de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) destacando os resíduos envolvidos na formação da cavidade positiva (verde – cadeia A e amarelo – cadeia B). (D) Moléculas de malato (azul claro) e malonato (ciano) encontradas na cavidade positiva de LmFH-2..... 84
- Figura 52** (A) Estrutura do dímero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) colorida de acordo com o fator de temperatura. No círculo preto em destaque está representada a α -hélice 13 (Arg⁴²¹ a Asn⁴³⁴) do domínio C-terminal de cada cadeia. (B) Gráficos da distribuição do fator de temperatura em função do número de resíduos da sequência da proteína para as cadeias A e B..... 86
- Figura 53** Representação em α da estrutura de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) destacando os contatos cristalinos da α -hélice 13 do domínio C-terminal das cadeias A (A) e B (B). Em azul, rosa e cinza estão representadas as cadeias A, B e as moléculas de proteína relacionadas por simetria, respectivamente..... 86
- Figura 54** Representação gráfica da deformação estrutural (rmsd) ao longo do tempo simulado (25 ns) para a proteína LmFH-2 inteira (global - preto), domínio N-terminal (vermelho) e C-terminal (azul)..... 87
- Figura 55** Representação das estruturas de LmFH-2 simuladas por dinâmica molecular ((C) a (F)) e suas respectivas superfícies de potenciais eletrostáticos ((G) a (P)). A estrutura representa em verde (B) corresponde ao tempo zero de simulação e as demais a cada 850 ps de simulação ((C) a (F)). Em (A) está representada a

	superposição entre as estruturas no tempo zero (B) e a cada 850 ps ((C) a (F)).....	88
Figura 56	Figura em estério da superposição da estrutura de LmFH-2 no tempo zero de simulação (verde) e após a simulação (azul), mostrando o movimento do domínio C-terminal. Em destaque está representado o ângulo de abertura (35,7°) da α -hélice 13 do domínio C-terminal.....	89
Figura 57	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni da enzima LmFH-1. As frações 1 a 7, 8 a 16, e 17 a 23 representam as lavagens com 50 mM de imidazol, eluições com 100 e 500 mM de imidazol, respectivamente. M indica o padrão de massa molecular.....	102
Figura 58	(A) Perfil cromatográfico de LmFH-1 por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. A cromatografia foi realizada em tampão 20 mM tris pH 8, 50 mM NaCl. (B) SDS-PAGE 12% das frações eluídas por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. FH1 corresponde a proteína concentrada purificada por cromatografia de afinidade que foi aplicada na coluna Superdex. Os números (14 a 24) correspondem às frações obtidas pelo cromatograma representado em vermelho em (A).....	103
Figura 59	Análise do perfil de tamanho encontrado para as amostras de LmFH-1 obtidas através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Nos gráficos estão representados o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função da intensidade da luz espalhada e do volume.....	104
Figura 60	Dicroísmo circular de LmFH-1. (A) Espectros de dicroísmo circular em diferentes temperaturas (10 a 90 °C). (B) Desnaturação térmica da proteína monitorada em 222 nm.....	105
Figura 61	Espectros de EPR do complexo [3Fe-4S] ⁺ da proteína LmFH-1 medidos a 10 K. (A) Espectros de LmFH-1 na forma holo (preto), incubada com ditionito de sódio (azul) e com APS (magenta). (B) Espectros de LmFH-1 na forma holo (azul), incubada com fumarato (preto) e malato (vermelho).....	106
Figura 62	Cristalização de LmFH-1 na condição D3 do Crystal Screen HT™ (2 M sulfato de amônio, 2% PEG 400 e 0.1 M HEPES pH 7,5). (A) Cristais obtidos na forma de <i>clusters</i> . (B) Cristais obtidos após utilizar as técnicas de <i>microseeding</i> e óleo no poço.....	108
Figura 63	Curvas de atividade monitoradas pela formação de fumarato a 250 nm em condições anaeróbicas para LmFH-1 na presença de malonato (A) e succinato (B)..	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na construção do mutante LmFH-2-T467A.....	25
Tabela 2	Reação de digestão com <i>Dpn</i> I.....	26
Tabela 3	Reação de digestão com <i>Eco</i> RI.....	27
Tabela 4	Parâmetros cinéticos para LmFH-2.....	43
Tabela 5	Parâmetros cinéticos para LmFH-2-T467A.....	45
Tabela 6	Parâmetros de inibição para LmFH-2.....	45
Tabela 7	Dados cristalográficos de LmFH-2.....	61
Tabela 8	Dados cristalográficos de LmFH-2-T467A.....	65
Tabela 9	Valores de rmsd entre as estruturas de LmFH-2 e LmFH-2-T467A.....	72
Tabela 10	Ligações de hidrogênio entre os monômeros A e B de LmFH-2.....	74
Tabela 11	Parâmetros cinéticos para LmFH-1.....	109
Tabela 12	Parâmetros de inibição para LmFH-1.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AfFH	Fumarato hidratase de <i>Archaeoglobus Fulgidus</i>
APS	Persulfato de amônio
CD	Dicroísmo circular
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
FH	Fumarato hidratase
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosídeo
IRP1	Proteína regulatória de ferro I
kDA	kilo Daltons
K _m	Constante de Michaelis
LB	<i>Luria- broth</i>
LmFH	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i>
LmFH-1	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF24.0320
LmFH-1-pET28a	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF24.0320 no vetor pET-28a(+)
LmFH-2	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960
LmFH-2-malato	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960 em complexo com malato
LmFH-2-malato-malonato	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960 em complexo com malato e malonato
LmFH-2-malonato	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960 em complexo com malonato
LmFH-2-pET28a	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960 no vetor pET-28a(+)

LmFH-2-succinato	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960 em complexo com succinato
LmFH-2-T467A	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960 mutante T467A
LmFH-2-T467A-malato	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960 mutante T467A em complexo com malato
LmFH-2-T467A-malonato	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960 mutante T467A em complexo com malonato
MR	Substituição molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
pI	Ponto isoelétrico
RNA	Ácido ribonucleico
SAD	Dispersão anômala em um único comprimento de onda
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
UV	Ultravioleta
V _{max}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	9
3.	FUMARATO HIDRATASE DE <i>Leishmania major</i> CODIFICADA PELO GENE LMJF29.1960 (LmFH-2).....	11
3.1.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1.1.	FUMARATO HIDRATASE DE <i>Leishmania major</i> CODIFICADA PELO GENE LMJF29.1960 (LmFH-2).....	11
3.1.1.1.	Clonagem e expressão.....	11
3.1.1.2.	Purificação por cromatografia de afinidade.....	11
3.1.1.3.	Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho.....	12
3.1.1.4.	Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	13
3.1.1.5.	Dicroísmo circular (CD).....	13
3.1.1.6.	Ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	13
3.1.1.7.	Atividade enzimática.....	14
3.1.1.8.	Cristalização de LmFH-2.....	16
3.1.1.9.	Coleta e processamento de dados.....	22
3.1.1.10.	Determinação da estrutura e refinamento.....	22
3.1.1.11.	Simulação de dinâmica molecular.....	23
3.1.2.	FUMARATO HIDRATASE DE <i>Leishmania major</i> CODIFICADA PELO GENE LMJF29.1960 MUTANTE T467A (LmFH-2-T467A).....	25
3.1.2.1.	Clonagem do mutante LmFH-2-T467A.....	25
3.1.2.2.	Expressão do mutante LmFH-2-T467A.....	27
3.1.2.3.	Purificação por cromatografia de afinidade.....	27
3.1.2.4.	Cristalização do mutante LmFH-2-T467A.....	28
3.1.2.5.	Coleta e processamento de dados.....	32
3.1.2.6.	Determinação da estrutura e refinamento.....	32

3.1.2.7. Cinética enzimática.....	32
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
3.2.1 Clonagem, expressão e purificação por cromatografia de afinidade.....	34
3.2.2 Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho de LmFH-2.....	35
3.2.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) de LmFH-2.....	38
3.2.4 Dicroísmo circular (CD) de LmFH-2.....	38
3.2.5 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR) de LmFH-2.....	40
3.2.6 Atividade enzimática.....	42
3.2.7 Cristalização.....	46
3.2.7.1. Cristalização de LmFH-2.....	46
3.2.7.2. Cristalização de LmFH-2-T467A.....	51
3.2.8 Determinação da estrutura.....	53
3.2.8.1. Determinação da estrutura de LmFH-2.....	53
3.2.8.2. Determinação da estrutura de LmFH-2-T467A.....	62
3.2.9 Análises e comparações estruturais.....	66
3.2.9.1. Descrição geral da estrutura de LmFH-2.....	66
3.2.9.2. Análise estrutural do dímero de LmFH-2.....	73
3.2.9.3. Sítio ativo de LmFH-2.....	76
3.2.10 Proposta do mecanismo de ação da LmFH-2.....	81
3.2.11 Superfície de potencial eletrostático.....	84
3.2.12 Análise do fator de temperatura da LmFH-2.....	85
3.2.13 Simulação de dinâmica molecular.....	87
3.3. CONCLUSÕES.....	91
4. FUMARATO HIDRATASE DE <i>Leishmania major</i> CODIFICADA PELO GENE LMJF24.0320 (LmFH-1).....	95
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	95

4.1.1.	Clonagem e expressão.....	95
4.1.2.	Purificação por cromatografia de afinidade.....	95
4.1.3.	Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho.....	96
4.1.4.	Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	96
4.1.5.	Dicroísmo circular (CD).....	97
4.1.6.	Ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	97
4.1.7.	Cristalização.....	98
4.1.8.	Coleta e processamento de dados.....	99
4.1.9.	Atividade enzimática.....	99
4.2.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	102
4.2.1.	Clonagem, expressão e purificação por cromatografia de afinidade de LmFH-1.....	102
4.2.2.	Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho.....	102
4.2.3.	Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	104
4.2.4.	Dicroísmo circular (CD).....	104
4.2.5.	Ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	106
4.2.6.	Cristalização, coleta e processamento de dados de LmFH-1.....	107
4.2.7.	Atividade enzimática.....	108
4.3.	CONCLUSÕES.....	112
5.	REFERÊNCIAS.....	114

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As diferentes patogenias de leishmaniose são causadas por diferentes espécies de protozoários parasitos flagelados do gênero *Leishmania*, que são transmitidos por cerca de 30 espécies de insetos fêmeas flebotomíneos (Herwaldt, 1999).

O ciclo de vida do parasito *Leishmania* (**Figura 1**) é constituído por um estágio promastigota flagelado extracelular e um estágio amastigota intracelular morfologicamente distinto. O ciclo é iniciado pelo inseto vetor que se alimenta de sangue de mamífero infectado, como roedores, cachorros ou homem. Dentro do intestino do inseto, as formas promastigotas proliferam e passam por vários estágios de desenvolvimento e então são transferidas ao homem no ato da picada. Dentro do mamífero hospedeiro, as formas promastigotas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos no local da infecção, onde passam por diferenciação para o estado amastigota (Leifso *et al.*, 2007). Os macrófagos então se rompem, liberando as formas amastigotas que infectam outros macrófagos. O inseto, ao picar o mamífero infectado, ingere macrófagos contendo formas amastigotas do parasito, que no intestino do inseto se diferenciam em promastigotas, completando o ciclo de vida do parasito.

Figura 1. Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.

Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e0/Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg.

Diferentes espécies de *Leishmania* são responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença. Infecções por *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. donovani* causam leishmaniose cutânea; *L. braziliensis* e *L. panamensis* causam leishmaniose muco-cutânea; *L. amazonensis* e *L. Mexicana* causam leishmaniose cutânea difusa; e *L. donovani* e *L. infantum* causam leishmaniose visceral. A leishmaniose cutânea, a forma mais comum da doença, causa ulcerações no rosto, braços e pernas e deixam cicatrizes permanentes. A leishmaniose muco-cutânea causa úlceras na pele levando a destruição das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. A leishmaniose cutânea difusa, a forma mais difícil de tratar, causa lesões crônicas parecidas com a lepra, que não cicatrizam espontaneamente e voltam depois do tratamento. A leishmaniose visceral, a forma mais séria da doença, causa hipertrofia do baço e fígado, febre, anemia, perda de peso, e é fatal quando não tratada. Outra forma da doença também reportada é a leishmaniose dermal pós-kala-azar, resultado de uma complicação da leishmaniose visceral, que se manifesta na forma de uma inflamação na pele, subsequente do aparente sucesso no tratamento da leishmaniose visceral, e que se inicia na região da boca e pode se espalhar pelo corpo, como resultado de uma reação devido a presença de parasitos na pele.

As leishmanioses, classificadas como doenças negligenciadas, são um problema de saúde mundial afetando largamente as populações de baixa renda, principalmente nos países em desenvolvimento (**Figura 2**). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 350 milhões de pessoas correm o risco de contrair a leishmaniose e estima-se que há 12 milhões de pessoas infectadas e 2 milhões de novos casos por ano.

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, no período entre 2006 e 2010 foram registrados 18.168 casos de leishmaniose visceral. Em 2010, a região Nordeste apresentou 47,1% dos casos, seguida pelas regiões Norte (18,0%), Sudeste (17,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,1%). Atualmente, a doença está distribuída em 21 estados, atingindo as cinco regiões brasileiras. No mesmo período, 2006 a 2010, foram registrados 21.520 casos por ano de leishmaniose muco-cutânea no Brasil. A região Norte apresentou o maior coeficiente (55,9 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (25,7 casos/100.000 habitantes) e Nordeste (12,9 casos/100.000 habitantes).

Segundo a OMS, atualmente não há uma vacina efetiva para prevenir a leishmaniose. Inúmeros esforços para o desenvolvimento de vacinas têm sido realizados no Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Irã e Sudão contra leishmaniose cutânea e visceral (Bahar *et al.*, 1996; Armijos *et al.*, 1998; Sharifi *et al.*, 1998; Momeni *et al.*, 1999; Khalil *et al.*, 2000; Velez *et al.*, 2005; Mayrink *et al.*, 2006; Noazin *et al.*, 2009). Essa primeira geração de candidatos à vacina contra leishmaniose foi feita com o parasito morto ou a partir de extratos. No entanto,

os resultados foram inconclusivos ou negativos para a profilaxia da doença. Uma segunda geração de vacinas em estudo e que consiste no uso da poliproteína Leish-F1 recombinante (Campos-Neto *et al.*, 2001; Coler *et al.*, 2007) deu origem à LEISH-F1+MPL-SE, que foi a primeira vacina contra *Leishmania* aprovada para estudos clínicos (Duthie *et al.*, 2012).

Figura 2. Distribuição geográfica das leishmanioses pelo mundo no período de 2005 a 2009: **(A)** Leishmaniose visceral; **(B)** Leishmaniose cutânea. Fonte: Organização Mundial de Saúde (<http://gamapserv.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>).

A terapia antileishmaniose apresenta sérios efeitos colaterais, toxicidade, custos elevados e tem dado origem ao surgimento de parasitos resistentes. O tratamento da doença, utilizado por mais de 70 anos, é baseado principalmente em antimônios pentavalentes (Croft e Yardley, 2002; Croft e Coombs, 2003; Croft, Barrett e Urbina, 2005), como antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®). Em algumas áreas

endêmicas o uso destes fármacos é limitada devido à perda de sua eficácia. Fármacos de segunda linha estão sendo desenvolvidos de forma a reduzir os efeitos colaterais, como, por exemplo, anfotericina B (AmBisome®), paromomicina, miltefosina e pentamidina. AmBisome® tem mostrado ser altamente efetivo e seguro como uma monoterapia, e é considerado um fármaco de primeira linha em países onde a leishmaniose visceral é endêmica, reforçado pelo acordo com a OMS em 2007 de redução de 10% do custo total do tratamento da doença nos países em desenvolvimento (Duthie *et al.*, 2012).

Nos últimos 10 anos houve um grande avanço científico no tratamento, diagnóstico e prevenção das leishmanioses, e os preços dos medicamentos têm sido reduzidos. Esses avanços tem permitido a implementação pela OMS de programas de controle nacionais e regiões sustentáveis. No entanto, programas de controle funcional da doença ainda são raros e a mortalidade e morbidade das leishmanioses ao redor do mundo mostram uma preocupante tendência no aumento de sua incidência. Portanto, diante da limitada e ineficiente forma de controle e tratamento da leishmaniose, há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de novos, eficazes e seguros agentes antileishmania.

Os projetos genoma de *Leishmania major* (Ivens *et al.*, 2005), *Leishmania infantum* (Peacock *et al.*, 2007), *Leishmania braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007), *Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana* têm permitido entender as similaridades e diferenças entre as espécies diferentes de *Leishmania*, contribuindo significativamente para a identificação de novos alvos terapêuticos para as leishmanioses.

No caso particular deste estudo, a análise do genoma de *L. major* permitiu a identificação de dois genes, LmjF24.0320 (LmFH-1) e LmjF29.1960 (LmFH-2), que codificam a fumarato hidratase (FH), também chamada de fumarase, que catalisa a hidratação reversível da molécula de fumarato em S-malato (**Figura 3**). A análise das sequências das FHs de *L. major* revelou que ambas enzimas compartilham aproximadamente 63% de identidade sequencial (**Figura 4**) e são membros da classe 1 das fumarato hidratases.

Figura 3. Reação reversível de hidratação estereoespecífica catalisada pela enzima fumarato hidratase.

As fumarato hidratases foram inicialmente divididas em duas classes de acordo com a estabilidade térmica, estado de oligomerização e presença de metal. As FHs da classe I são sensíveis ao oxigênio, termolábeis, homodiméricas, contêm um complexo [4Fe-4S], apresentam massa molecular de aproximadamente 120 kDa e são expressas em bactérias (fumarases A e B de *E. coli* (Woods, Schwartzbach e Guest, 1988)) e em alguns eucariotos unicelulares (Shibata, Gardiner e Schwartzbach, 1985). As FHs da classe II são enzimas homotetraméricas, termoestáveis, não contêm ferro, apresentam massa molecular de aproximadamente 200 kDa e são expressas em bactéria (fumarase C de *E. coli* (Woods, Schwartzbach e Guest, 1988)) e em eucariotos superiores como mamíferos (Kinsella e Doonan, 1986; Suzuki *et al.*, 1989). Embora funcionalmente relacionadas, FHs das classes I e II apresentam baixa identidade sequencial (em torno de 20%). Recentemente, um novo grupo de fumarato hidratases foi descrito na literatura como FHs contendo duas subunidades, baseadas na identidade sequencial com as FHs da classe 1 (Shimoyama *et al.*, 2007; Van Vugt-Lussenburg *et al.*, 2009). FHs com duas subunidades são sensíveis ao oxigênio, termoestáveis, contêm complexo [4Fe-4S] e são heterodiméricas com duas subunidades diferentes (α e β).

Figura 4. Alinhamento sequencial entre as isoformas LmFH-1 e LmFH-2 da enzima fumarato hidratase de *Leishmania major* codificadas pelos genes LmjF24.0320 e LmjF29.1960, respectivamente. LmFH-1 e LmFH-2 pertencem a classe I das FHs. LmFH-1 contém 549 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 60.808Da e pI teórico de 7,2. LmFH-2 contém 568 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 62.602Da e pI teórico de 6,6 (www.expasy.org). O alinhamento foi realizado no programa MultAlin (Corpet, 1988) e a figura criada no programa ESPrit (Gouet *et al.*, 1999).

Eucariotos, em geral, expressam duas isoformas de fumarato hidratase: uma citosólica e uma mitocondrial. A isoforma citosólica pode estar envolvida na produção de fumarato, que atua como substrato da diidroorotato desidrogenase, uma enzima que participa da

biosíntese de nucleotídeos de pirimidina (Takashima *et al.*, 2002; Feliciano *et al.*, 2006). Além disso, a FH citosólica foi também descrita como capaz de migrar do citosol para o núcleo, desenvolvendo um papel chave no reparo do DNA. No homem, a deficiência na expressão da FH está relacionada com doenças hereditárias e câncer renal (Yogev *et al.*, 2010). A isoforma mitocondrial participa do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e pode também fazer parte da fermentação succínica fornecendo fumarato à enzima fumarato redutase (Besteiro *et al.*, 2002). No homem, mutações na FH mitocondrial são responsáveis pela doença de deficiência da fumarase descrita como uma severa encefalopatia que leva a convulsões e atraso do desenvolvimento (Bourgeron *et al.*, 1994).

Em tripanosomatídeos, que compreendem parasitos como *Leishmania* e *Trypanosoma*, os estudos envolvendo as fumarato hidratases são limitados aos de RNA interferência, que demonstraram que a atividade das FHs é essencial para a sobrevivência da forma procíclica do parasito *Trypanosoma brucei* (Coustou *et al.*, 2006).

O papel vital das FHs no metabolismo intermediário em *T. brucei* nos fez questionar a importância desta enzima em *Leishmania*. Do ponto de vista da estratégia de planejamento de compostos com atividade antileishmania, FH se mostra um alvo promissor, porque sua inibição, além de afetar o balanço oxi-redox mitocondrial destes organismos, através da inibição do ciclo TCA, pode também interferir na via metabólica de síntese de nucleotídeos de pirimidina, uma vez que a enzima diidroorotato desidrogenase (quarta enzima desta via metabólica) utiliza fumarato como substrato para a sua catálise enzimática (Feliciano *et al.*, 2006). Outra importante informação é que ambas as FHs, mitocondrial e citosólica, expressas em mamíferos são membros da classe II e possuem baixa identidade sequencial (em torno de 20%) com as FHs da classe I, o que nos permite considerar que os inibidores seletivos contra classe I poderão ser utilizados como moléculas com ação antileishmania em formas de estágio sanguíneo do parasito.

Interessados na busca de alvos para o planejamento de compostos com atividade antileishmaniose, iniciamos os estudos de caracterização bioquímica, cinética, estrutural e funcional das enzimas fumarato hidratase de *Leishmania major* codificadas pelos genes LmjF24.0320 (LmFH-1) e LmjF29.1960 (LmFH-2). Na primeira etapa de desenvolvimento deste trabalho foi possível a padronização de um protocolo para a expressão heteróloga das duas isoformas de FH de *L. major*, o que possibilitou a realização de ensaios bioquímicos, biofísicos e estudos cinéticos (em condições aeróbicas e anaeróbicas). Além disso, foram produzidos anticorpos policlonais para a imunodeteção das FHs em *Leishmania* por estudos de localização celular, o que nos permitiu determinar que as isoformas LmFH-1 e LmFH-2 estão localizadas na mitocôndria e no citosol, respectivamente. Estes resultados foram

compilados na forma de um artigo científico publicado em 2012 (Feliciano *et al.*, 2012). Uma outra característica importante identificada em nossos estudos foi a sensibilidade à presença de oxigênio observada para ambas as isoformas.

Em uma segunda etapa do trabalho, demos continuidade aos nossos estudos focando a caracterização estrutural das enzimas fumarato hidratase de *L. major* através da determinação da estrutura por técnicas de difração de raios-X em monocristais. Nesta etapa, a colaboração com a Profa. Dra. Catherine L. Drennan, do Massachusetts Institute of Technology nos EUA, se fez necessária por se tratar de uma pesquisadora referência na área de cristalização de proteínas sensíveis ao oxigênio, e por possuir a infraestrutura necessária para a realização de tais experimentos, ainda inexistente no Brasil.

Os estudos cristalográficos das FHs de *L. major* desenvolvidos nesse trabalho são os primeiros estudos estruturais da classe 1 das FHs e que já estão contribuindo significativamente para o entendimento do mecanismo de ação desta classe de enzimas. Além disso, estas análises fornecerão ferramentas para a utilização de estratégias de validação de um novo alvo e planejamento de fármacos baseado em estrutura de proteínas como uma ferramenta na busca de novas formas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O projeto visa a caracterização estrutural das enzimas fumarato hidratase de *Leishmania major* codificadas pelos genes LmjF24.0320 (LmFH-1) e LmjF29.1960 (LmFH-2).

As etapas de realização do projeto podem ser sumarizadas em:

- ✓ Caracterização espectroscópica de LmFH-1 e LmFH-2 através de técnicas de dicroísmo circular e ressonância paramagnética eletrônica.
- ✓ Cristalização de LmFH-1 e LmFH-2.
- ✓ Determinação da estrutura de LmFH-1 e LmFH-2 por técnicas de difração de raios-X.
- ✓ Estudos de correlação entre estrutura e atividade.

3. LmFH-2

Fumarato hidratase de *Leishmania major*
codificada pelo gene LmjF29.1960

3. FUMARATO HIDRATASE DE *Leishmania major* CODIFICADA PELO GENE LMJF29.1960 (LmFH-2)

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. Fumarato hidratase de *Leishmania major* codificada pelo gene LmjF29.1960 (LmFH-2)

3.1.1.1. Clonagem e expressão

O gene LmjF29.1960 que codifica a isoforma citosólica de fumarato hidratase em *Leishmania major*, LmFH-2, foi clonado no vetor de expressão pET28a (Novagen). A proteína LmFH-2 foi expressa em fusão com uma cauda de histidina (6XHis) na região N-terminal (Feliciano *et al.*, 2012).

Os experimentos de expressão para a proteína LmFH-2 foram realizados em *E. coli* BL21(DE3) e T7 Express (C2566 - New England BioLabs). Uma colônia de *E. coli* contendo o plasmídeo recombinante de LmFH-2-pET28a foi utilizada para inocular 10 ml de meio *Luria-broth* (LB) suplementado com kanamicina 30 µg/ml e incubado sob agitação de 190 rpm por 16 h a 37 °C. A cultura foi diluída na proporção 1:100 em 1 l de meio LB contendo kanamicina 30 µg/ml e incubada a 37 °C sob agitação de 190 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. Neste momento, a expressão da proteína foi induzida com 0,25 mM de IPTG, a cultura suplementada com 2 mM de cisteína, 0,2 mg/ml de sulfato de ferro II e 0,2 mg/ml de citrato de ferro III, e mantida sob agitação de 70 rpm por 24 h a 18 °C. Após as 24 h de indução, a cultura foi dividida em dois volumes de 0,5 l e centrifugada a 4.000 x g por 10 min a 4 °C. As células foram armazenadas a -20 °C e o sobrenadante descartado.

3.1.1.2. Purificação por cromatografia de afinidade

A purificação da proteína LmFH-2 foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni como reportado previamente (Feliciano *et al.*, 2012).

Para a realização dos experimentos de cristalização, os ensaios de purificação foram realizados com 1 mM de DTT em todos os tampões de purificação, como descrito a seguir.

As células obtidas a partir de 0,5 l de cultura foram ressuspensas em 20 ml de tampão A (50 mM NaH_2PO_4 pH 8,5, 300 mM NaCl, 1mM DTT) contendo um tablete de inibidor de protease sem EDTA (Roche). Em seguida, as células foram lisadas por sonicação por 10 min (1 s sonicado com intervalo de 2 s) em um sonicador Q700 (QSonica) com amplitude 5%, e centrifugadas a $14.100 \times g$ por 35 min a 4 °C.

O sobrenadante (extrato bruto), contendo a enzima LmFH-2, foi carregado em uma coluna com 1 ml de resina de Ni (HisTrap HP – GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada com tampão A. A coluna foi lavada com um gradiente em etapas de imidazol de 0 a 50 mM em tampão A. A enzima recombinante LmFH-2 foi eluída com tampão A contendo 100 mM de imidazol.

O grau de pureza da enzima foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (gel Mini-PROTEAN TGX - Bio-Rad). A revelação do gel foi efetuada com o corante azul de Coomassie G-250 (SimplyBlue™ SafeStain - Invitrogen). As eluições foram concentradas e dialisadas em 50 mM tris pH 8,5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT usando o concentrador Ultrafree – 30 kDa (Millipore) a $2.500 \times g$ por 10 min a 4 °C. A concentração da proteína foi determinada por espectroscopia no UV a 280 nm ($\epsilon_{\text{LmFH-2}} = 65.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) utilizando NanoDrop 2000c.

Devido à instabilidade da atividade das FHs da classe I na presença de oxigênio (Flint, Emptage e Guest, 1992; Feliciano *et al.*, 2012), a purificação foi realizada a 4 °C em um *glovebox* (MBRAUN UNIlab), com uma atmosfera de gás nitrogênio. Todas as soluções tampões foram previamente desoxigenadas com argônio por 1 h e em seguida transferidas para o *glovebox*. Todos os materiais utilizados durante a purificação foram submetidos previamente à ciclos de vácuo e gás nitrogênio e deixados *overnight* degaseificando no vácuo.

3.1.1.3. Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho

O experimento de cromatografia de filtração em gel foi realizado para a proteína LmFH-2 em um sistema de cromatografia ÄKTA *purifier*™ (GE Healthcare), utilizando a coluna Superdex™ 200 HR 10/30 (GE Healthcare). Para a purificação de LmFH-2, as frações eluídas da purificação por cromatografia de afinidade foram concentradas inicialmente e injetadas na coluna. A corrida foi realizada sob fluxo de 0,5 ml/min em 50 mM tris pH 8,5, 150 mM NaCl. As frações eluídas (1 ml) foram combinadas e concentradas utilizando o concentrador Ultrafree – 30 kDa (Millipore) a $2.500 \times g$ por 10 min a 4 °C.

3.1.1.4. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As medidas de DLS da enzima LmFH-2 foram realizadas no equipamento Zetasizer μ V (Malvern), no Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do IFSC-USP, gentilmente cedido pelo Prof. Marcos Navarro. As medidas foram realizadas em triplicata com a proteína LmFH-2 a 6,7 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5 e 150 mM NaCl a 20 °C.

3.1.1.5. Dicroísmo circular (CD)

As medidas do conteúdo de estrutura secundária da enzima LmFH-2 foram realizadas em um espectrômetro Jasco J-715 equipado com um controlador de temperatura, no Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do IFSC-USP, através da colaboração com o Prof. Antonio José da Costa Filho. O experimento foi realizado com 0,2 mg/ml de LmFH-2 em tampão 4 mM tris pH 8,5 e 4 mM NaCl e utilizando-se cubeta de quartzo retangular de caminho óptico de 1 mm. As medidas foram realizadas na região do ultravioleta distante (195 – 250 nm) com sensibilidade igual a 100 mGraus, velocidade de varredura de 100 nm.min⁻¹, largura da banda de 2 nm e tempo de resposta de 2 s. O espectro final foi resultado da média de 4 varreduras. O espectro de CD em um dado comprimento de onda foi convertido para elipticidade molar média por resíduo $[\theta]_r = (\theta_r M_0)/(10 l c)$, onde θ_r é a elipticidade observada em miligraus, M_0 é a massa média por resíduo ($M_0 = 115$), c é a concentração de proteína (mg/ml), e l é o caminho óptico (cm).

A estabilidade da proteína foi analisada através do experimento de desnaturação térmica, no qual o espectro de dicroísmo (195 – 250 nm) foi verificado para diferentes temperaturas entre 10 e 94 °C. No final da desnaturação térmica, a proteína foi resfriada a 10 °C e medida novamente para investigar se o desenovelamento da proteína era reversível ou irreversível.

3.1.1.6. Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

As medidas de ressonância paramagnética eletrônica foram realizadas com as amostras proteicas preparadas em condições aeróbicas e anaeróbicas, usando um *glove bag* com fluxo de nitrogênio, para a caracterização do tipo de complexo Fe-S encontrado na amostra proteica. Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker ELEXSYS E580 que opera em banda X (9,5 GHz) e que está equipado com cavidade retangular. Temperaturas de He líquido (cerca de 4 K) alcançadas com a utilização de um criostato da empresa Oxford modelo ITC503 foram necessárias para que se observassem os sinais de interesse. Os parâmetros experimentais utilizados foram: potência de microonda, 10 mW; modulação do campo magnético, 2 G e frequência de modulação do campo magnético, 100

kHz. Foram realizadas medidas de EPR utilizando a proteína LmFH-2 (4 e 8,8 mg/ml) na forma holo, incubadas na presença dos substratos fumarato (5 mM) e malato (45,45 mM) e com agente redutor (ditionito de sódio 209,1 mM) e oxidante (persulfato de amônio 45,45 mM).

3.1.1.7. Atividade enzimática

Os estudos cinéticos foram realizados com a amostra proteica oriunda da construção no vetor de expressão pET28a (Novagen), no qual a proteína de interesse se encontra fusionada a cauda de histidina na região N-terminal.

Devido à instabilidade da atividade das FHs da classe I na presença de oxigênio (Flint, Emptage e Guest, 1992), os ensaios de cinética enzimática foram realizados em condições anaeróbicas. Inicialmente, os experimentos foram realizados utilizando um *glove bag* (Sigma), com um fluxo de gás nitrogênio, no grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) – USP. As soluções e as cubetas foram previamente tratadas com um fluxo de nitrogênio gasoso, as cubetas seladas com uma tampa de borracha e as amostras de proteína adicionadas às soluções de atividade através de uma seringa. No entanto, essa infraestrutura ainda não era a mais adequada para a realização dos nossos experimentos, uma vez que a estimativa da quantidade de oxigênio no *glove bag*, usando um oxímetro, foi de aproximadamente 20 ppm.

Sendo assim, novos experimentos de atividade em condições anaeróbicas (0 ppm de oxigênio) foram realizados no Massachusetts Institute of Technology (MIT), nos EUA, através da colaboração com a Profa. Dra. Catherine L. Drennan, que possui em seu laboratório a infraestrutura adequada para a realização destes ensaios. Os experimentos de atividade enzimática foram realizados em um *glovebox* em condições anaeróbicas (MBRAUN UNILab), sob atmosfera de nitrogênio. As soluções tampões foram previamente desoxigenadas com argônio por 1 h e em seguida transferidas para o *glovebox*. Todos os materiais utilizados durante os ensaios de atividade foram submetidos previamente à ciclos de vácuo e gás nitrogênio e deixados *overnight* degaseificando no vácuo.

Os ensaios de atividade em condições aeróbicas também foram realizados para a enzima LmFH-2 para a realização dos estudos comparatórios.

a) Determinação do pH ótimo

Com o objetivo de determinar o pH ótimo para a atividade da enzima LmFH-2, foram realizados ensaios de atividade na presença de soluções tampões em diferentes pHs (acetato de sódio 50 mM pH 4 e 5; cacodilato de sódio 50 mM pH 6; tris 50 mM pH 7, 8 e 9;

glicina/NaOH 50 mM pH 10; NaHCO₃/NaOH 50 mM pH 11; KCl/NaOH 50 mM pH 12; todas contendo 150 mM de NaCl 150 mM). Este experimento foi realizado através de um ensaio espectrofotométrico que monitora a formação ou o consumo da molécula de fumarato por 5 minutos. O experimento foi realizado em condições aeróbicas a 25 °C em um espectrofotômetro Hitachi U-2800 usando o comprimento de onda de 250 nm ($\epsilon_{\text{fumarato}} = 1.45 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A reação foi iniciada pela adição de LmFH-2 em uma concentração final de 40 µg/ml à uma solução tampão em diferentes pHs na presença de substrato fumarato ou S-malato 1 mM, em um volume final de 1 ml. Os experimentos foram realizados com a proteína LmFH-2 em tampão 50 mM tris pH 8,5 e 150 mM NaCl.

b) Cinética enzimática

Para a determinação dos parâmetros cinéticos dos dois substratos, fumarato e S-malato, os ensaios de atividade da enzima LmFH-2 foram realizados através de um ensaio espectrofotométrico que monitora a formação ou o consumo da molécula de fumarato. Os experimentos foram realizados em condições aeróbicas e anaeróbicas, utilizando *glove bag* e *glovebox* (MBRAUN UNIlab), a temperatura ambiente em um espectrofotômetro Hitachi U-2800 ou USB4000 (Ocean Optics) usando o comprimento de onda de 250 nm ($\epsilon_{250 \text{ nm}}^{\text{fumarato}} = 1,45 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A reação foi iniciada pela adição de LmFH-2 em uma concentração final de 10 µg/ml e 40 µg/ml à uma solução tampão tris 50 mM pH 9, NaCl 150 mM adicionada dos substratos S-malato ou fumarato, em um volume final de 1 ml. Os ensaios foram realizados com a proteína LmFH-2 em tampão 50 mM tris pH 8,5, NaCl 150 mM.

Os parâmetros cinéticos, V_{max} e K_m para os dois sentidos da reação, foram determinados para os substratos S-malato e fumarato a partir da equação de Michaelis-Menten (Equação I), traçando o gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk ou através da utilização do método de regressão não linear, variando a concentração de S-malato de 0,125 a 8 mM e variando a concentração de fumarato de 0,03125 a 1 mM.

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equação I})$$

c) Inibição enzimática

Os estudos de inibição enzimática da enzima LmFH-2 foram realizados através do ensaio espectrofotométrico que monitora a formação ou o consumo da molécula de fumarato. Os experimentos foram realizados em *glovebox* (MBRAUN UNIlab), com atmosfera de nitrogênio, a temperatura ambiente em um espectrofotômetro USB4000 (Ocean Optics) usando o comprimento de onda de 250 nm ($\epsilon_{250 \text{ nm}}^{\text{fumarato}} = 1,45 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A reação foi iniciada

pela adição de LmFH-2 em uma concentração final de 10 µg/ml à uma solução tampão 50 mM tris pH 9, 150 mM NaCl adicionada dos substratos (S-malato 2 mM ou fumarato 0,5 mM) e do inibidor (malonato ou succinato) em um volume final de 1 ml.

Para determinar a constante de inibição IC_{50} (concentração de inibidor que inibe 50% da atividade enzimática) foram testadas diferentes concentrações dos inibidores succinato e malonato (0 a 120 mM). A constante de inibição IC_{50} foi determinada ajustando os valores experimentais à equação (Jordan, Bisaha e Picolletti, 2000):

$$v = \frac{V_o}{1 + I/IC_{50}}$$

onde v é a velocidade de inibição observada, V_o é a velocidade não inibida, I é a concentração de inibidor e IC_{50} é a concentração de inibidor que permite 50% de inibição.

3.1.1.8. Cristalização de LmFH-2

Os estudos de cristalização foram realizados com a amostra proteica oriunda da construção no vetor de expressão pET28a (Novagen), no qual a proteína de interesse se encontra fusionada a cauda de histidina na região N-terminal.

Os experimentos iniciais de cristalização da proteína LmFH-2 foram feitos por um processo automático de cristalização de proteína por difusão de vapor em gota sentada (Mosquito - ttp:labtech) em um *glovebox* (MBRAUN UNIlab), sob atmosfera de nitrogênio. Foram testados inicialmente os kits de cristalização Crystal Screen HT™, SaltRx HT™, Index HT™, PEG/Ion HT™ e PEGRx HT™ (Hampton Research), cada um contendo 96 condições, que são baseadas em soluções de cristalização conhecidas para macromoléculas biológicas. Os ensaios de cristalização foram realizados a temperatura ambiente com 70 µl de solução de cristalização no reservatório, na presença e ausência de DTT. As gotas consistiram de 400 nl contendo 200 nl da solução do reservatório e 200 nl de solução de proteína (9 mg/ml em tampão 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 8,6 mg/ml no mesmo tampão adicionado de 1 mM de DTT).

Os primeiros cristais foram identificados na condição E11 do PEG/Ion HT™ (tacsinato 4% (v/v) pH 5, polietilenoglicol (PEG) 3.350 12% (m/v)) na presença de DTT. O tacsinato 100% é composto por: ácido malônico 1,8305 M; citrato de amônio tribásico 0,25 M; ácido succínico 0,12 M; ácido D-L-málico 0,3 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M. Sendo assim, foram realizados ensaios iniciais de otimização das condições de cristalização em maior escala utilizando o método de difusão de vapor em gota suspensa. Esses experimentos foram realizados em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, variando a concentração de

tacsinato pH 5 (2 a 8% (v/v)) e PEG 3.350 (8 a 18% (m/v)), e na presença de tacsinato 4% em diferentes pHs (4, 7 e 8) e PEGs 1.000, 1.500, 3.350, 4.000, 6.000, 8.000, 10.000 e 20.000 (8 a 18% (m/v)). Os experimentos de cristalização foram realizados em duas temperaturas (temperatura ambiente e a 4°C) com 400 µl de solução de cristalização no reservatório. As gotas consistiram de 1 ou 2 µl de solução de cristalização e 1 µl de solução de proteína (8 a 10 mg/ml em tampão 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) resultando em um volume total da gota de 2 ou 3 µl, respectivamente.

Para melhorar a qualidade e o tamanho dos cristais de LmFH-2, que cresciam na forma de complexos de agulhas, foram usadas as técnicas de *microseeding*, cristalização na presença de óleo e aditivos, e cocrystalização incubando a proteína com os substratos fumarato e malato. Além disso, como a condição de cristalização original é composta por tacsinato, que contém o substrato (malato) e os inibidores (malonato e succinato) da proteína, várias modificações no tacsinato foram introduzidas de forma a conter apenas um ligante de interesse. Essas soluções foram usadas nos experimentos de cristalização na forma holo e em cocrystalização com substratos (malato e fumarato) e inibidores (malonato e succinato). Esses ensaios estão descritos em maiores detalhes nos itens a seguir.

a) *Microseeding*

A técnica de *microseeding* foi usada para melhorar a qualidade dos cristais de LmFH-2 e os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pela *Douglas Instruments Ltd* (http://www.douglas.co.uk/MMS_proc.htm). Os ensaios de *microseeding* foram realizados em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, variando a concentração de tacsinato pH 5 (1 a 8% (v/v)) e PEG 3.350 (8 a 18% (m/v)). Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente com 400 µl de solução de cristalização no reservatório. As gotas consistiram de 1 ou 1,5 µl de solução de cristalização, 0,5 ou 1 µl solução *seed* estoque em diferentes diluições (5 a 240 X) e 1,5 ou 2 µl de proteína (4 a 10 mg/ml) resultando em um volume total da gota de 3; 3,5 ou 4 µl.

b) Cristalização na presença de óleo

A técnica de cristalização na presença de óleo foi utilizada para controlar a taxa de difusão de vapor (Chayen, 1997). Para isso foram testadas diferentes proporções entre óleo de parafina e silicone (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 (silicone:parafina)) sobre a solução do reservatório. O volume da mistura de óleos usado foi de 100 µl. Os experimentos foram realizados em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%.

c) Cristalização na presença de aditivos

Os experimentos de cristalização de LmFH-2 na presença de aditivos foram feitos por um processo automático de cristalização de proteína por difusão de vapor em gota sentada (Mosquito – ttp:labtech) em um *glovebox* (MBRAUN UNILab), com atmosfera de nitrogênio. Foram testados os kits Detergent Screen HT™ e Additive Screen HT™ (Hampton Research), cada um contendo 96 condições. Os ensaios de cristalização foram realizados a temperatura ambiente com 70 µl da solução de cristalização (tacsinato 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12% (m/v)) no reservatório. As gotas de volume de 775 nl consistiram de 350 nl da solução do reservatório, 350 nl de solução de proteína (10 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT) e 75 nl de aditivo.

d) Cristalização com etanol como aditivo

Os ensaios de cristalização na presença de etanol 2,7% (v/v) foram realizados utilizando o método de difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização ou solução *seed* (30 a 240 X diluída), 1 µl de proteína (4 a 10 mg/ml) e 0,2 µl de etanol 30% resultando em um volume total da gota de 2,2 µl equilibradas contra a solução do reservatório, que consistiu de 400 µl de solução de cristalização (tacsinato 2 a 8% (v/v) pH 5 e PEG 3.350 8 a 18% (m/v)).

e) Cocrystalização com malato

Os ensaios de cocrystalização de LmFH-2 com malato foram realizados através da utilização do método da difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Como a condição de cristalização de LmFH-2 é composta por tacsinato, que contém o substrato (malato) e os inibidores (malonato e succinato) de LmFH-2, a primeira estrutura de LmFH-2 foi resolvida em complexo com malato (sítio ativo) e malonato (interface dimérica). No entanto, estávamos interessados também em obter a estrutura da proteína em complexo apenas com o substrato. Para isso foi preparada uma solução modificada de tacsinato^s 100% em pH 5 removendo malonato e succinato e contendo: ácido L-málico 0,3 M; citrato de amônio tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos de cocrystalização foram então realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsinato^s (sem malonato e succinato) 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350

12 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (7,6 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM malato) em um volume total da gota de 2 µl. Ensaio de cristalização usando etanol 2,7% (v/v) como aditivo na gota também foram realizados, e as gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (7,6 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM malato) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

A técnica de cristalização com aditivo (etanol) combinada com *microseeding* também foi utilizada nos experimentos de cocrystalização com malato. Esses experimentos foram realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsimate^s 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução *seed* (30 a 240X diluída), 1 µl de proteína (4,75 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM malato) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

f) Cocrystalização com fumarato

Os ensaios de cocrystalização de LmFH-2 com fumarato foram realizados a temperatura ambiente, utilizando o método de difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%.

Na busca por uma estrutura de LmFH-2 em complexo com fumarato foi preparada uma solução de tacsimate^s 100% em pH 5 adicionada de fumarato e na ausência de malato e succinato: fumarato de sódio 0,12 M; ácido malônico 1,8305 M; citrato de amônio tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos de cocrystalização foram realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsimate^s (com fumarato e na ausência de malato e succinato) 2 a 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 8 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (LmFH-2 a 10,3 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM fumarato) em um volume total da gota de 2 µl. Ensaio de cristalização usando etanol de 2,7 a 6% (v/v) como aditivo na gota também foram realizados com as gotas consistindo de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (10,3 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM fumarato) e 0,2 a 0,5 µl de etanol 30%, em um volume total da gota variando de 2,2 a 2,5 µl.

A técnica de cristalização com aditivo (etanol) combinada com *microseeding* também foi utilizada nos experimentos de cocrystalização com fumarato. Esses experimentos foram realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsimate^s 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução *seed* (30 a 240X diluída),

1 µl de proteína (5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM fumarato) e 0,2 a 0,5 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 a 2,5 µl.

g) Cocrystalização com malonato

Os ensaios de cocrystalização de LmFH-2 com malonato foram realizados através da utilização do método de difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Para a realização desses experimentos foi preparada uma solução de tacsinato^e 100% em pH 5 na ausência de malato e succinato: ácido malônico 1,8305 M; citrato de amônio tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos de cocrystalização foram realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsinato^e (sem malato e succinato) 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e 1 µl de solução de proteína (9,5 mg/ml em 50 mM tris pH8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) em um volume total da gota de 2µl. Ensaios de cristalização usando etanol 2,7% (v/v) como aditivo na gota também foram realizados, no qual as gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (9,5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

A técnica de cristalização com aditivo (etanol) combinada com *microseeding* também foi utilizada nos experimentos de cocrystalização com malonato. Esses experimentos foram realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsinato^e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução *seed* (30 a 240X diluída), 1 µl de proteína (4,75 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

h) Cocrystalização com succinato

Os ensaios de cocrystalização de LmFH-2 com succinato foram realizados utilizando a técnica de difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Para a realização desses experimentos foi preparada uma solução de tacsinato^e 100% em pH 5 na ausência de malato e malonato: ácido succínico 0,12 M; citrato de amônio tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos de cocristalização foram realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsinato[£] (sem malato e malonato) 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de 1 µl de solução de proteína (9,5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) em um volume total da gota de 2 µl. Ensaios de cristalização usando etanol 2,7% (v/v) como aditivo na gota também foram realizados, e as gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (9,5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

A técnica de cristalização com aditivo (etanol) combinada com *microseeding* também foi utilizada nos experimentos de cocristalização com succinato. Esses experimentos foram realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsinato[£] 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução *seed* (30 a 120X diluída), 1 µl de proteína (4,75 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

i) Cristalização de LmFH-2 na forma holo

Os ensaios de cristalização da LmFH-2 na forma holo foram realizados utilizando o método de difusão de vapor em gota suspensa em *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Como a condição de cristalização original é composta por tacsinato, que contém o substrato (malato) e os inibidores (malonato e succinato) de LmFH-2, para a realização dos ensaios de cristalização na forma holo foi preparada uma solução de tacsinato* 100% em pH 5 na ausência de malato, malonato e succinato: citrato de amônio tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos iniciais foram realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsinato* (sem malato, malonato e succinato) 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de 1 µl de solução de proteína (9,5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) em um volume total da gota de 2 µl. Ensaios de cristalização usando etanol 2,7% (v/v) como aditivo na gota foram realizados e as gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (9,5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) e 0,2 µl de etanol 30%.

A técnica de *microseeding* também foi utilizada na cristalização de LmFH-2 na forma holo. Os experimentos foram realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsinato* 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 14% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1

μl de solução *seed* (1 e 10X diluída) e 1 μl de solução de proteína (4,7 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) em um volume total da gota de 2 μl. Além disso, foram realizados experimentos de cristalização usando etanol como aditivo combinados com *microseeding*. Nesses experimentos as gotas consistiram de 1 μl de solução *seed* (1 a 240X diluída), 1 μl de proteína (4,7 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) e 0,2 μl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 μl.

A técnica de cristalização na presença de óleo parafina e silicone em diferentes proporções (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 (silicone:parafina)) foi utilizada em conjunto com o *microseeding* e *microseeding* + aditivo (etanol) na tentativa de otimizar os cristais de LmFH-2 na forma holó.

3.1.1.9. Coleta e processamento de dados

Os dados de difração de raios-X foram coletados na linha 24-ID-C do *Advanced Photon Source* (APS) em Chicago nos Estados Unidos. A coleta foi realizada em temperatura criogênica (100K), comprimento de onda (λ) igual a 1,7399 Å (dados anômalos coletados na borda do ferro) e 0,9795 Å (dados nativos), e os dados registrados em um detector PILATUS 6M (Henrich *et al.*, 2009). O experimento de difração de raios-X foi realizado com o cristal de LmFH-2 previamente congelado em nitrogênio líquido na presença de solução crioprotetora (tacsinato ou tacsinato^{§,§,*,} 8% pH 5, PEG 3.350 18%, glicerol 25%).

Os conjuntos de imagens coletados foram processados e escalonados no programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997).

3.1.1.10. Determinação da estrutura e refinamento

A estrutura de LmFH-2 foi resolvida pela técnica de dispersão anômala em um único comprimento de onda (SAD) baseada no sinal anômalo do átomo de ferro do complexo [4Fe-4S] presente na proteína. O programa AutoSol (PHENIX) (Adams *et al.*, 2010), que usa HYSS, SOLVE, Phaser, RESOLVE, xtriage e phenix.refine, foi utilizado para encontrar as posições dos átomos de Fe, fasear, construir e refinar o modelo preliminar de LmFH-2.

As estruturas de LmFH-2 em complexo com malato, malonato e succinato foram resolvidas por substituição molecular, implementada no programa Phaser (PHENIX) (Adams *et al.*, 2010), usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de águas) da primeira estrutura dimérica de LmFH-2.

O refinamento das estruturas de LmFH-2 foi realizado no programa phenix.refine (Adams *et al.*, 2010), seguido por vários ciclos de reconstrução dos modelos no programa Coot (Emsley *et al.*, 2010), em que as posições atômicas do modelo inicial foram modificadas

de forma a satisfazer a estereoquímica e o mapa de densidade eletrônica. As moléculas de água foram adicionadas usando o programa Coot (Emsley *et al.*, 2010) e visualmente validadas. Os ligantes malato, malonato, succinato, glicerol e PEG foram adicionados às estruturas usando o Coot (Emsley *et al.*, 2010). A estereoquímica das estruturas foi validada no MolProbity (Chen *et al.*, 2010). As figuras foram geradas no programa gráfico Pymol (Delano).

3.1.1.11. Simulação de dinâmica molecular

Na investigação de detalhes do comportamento dinâmico da proteína foram empregadas simulações de dinâmica molecular utilizando a estrutura cristalográfica de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) na ausência dos ligantes malato, malonato, glicerol, PEG e do complexo [4Fe-4S]. Os experimentos de simulação foram realizadas pela aluna de doutorado Renata Almeida Garcia Reis, do Laboratório de Cristalografia de Proteína da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, através da utilização dos softwares de simulação e análise contidos no pacote (livre) GROMACS (“GROningen MAchine for Chemical Simulation”) (Bekker *et al.*, 1993; Lindahl, Hess e Van Der Spoel, 2001; Van Der Spoel *et al.*, 2005; Hess *et al.*, 2008), sendo que neste trabalho foi usada a versão GROMACS v4.5.x.

O campo de força utilizado nas simulações foi o AMBER (“Assisted Model Building and Energy Refinement”). Especificamente, é utilizado o campo AMBER ff99sbildn, que permite uma melhor caracterização das estruturas secundárias visto uma melhor parametrização dos ângulos diedros para glicinas e alaninas, baseados em dados do PDB, e apresenta um conjunto de melhorias nos parâmetros torsionais das cadeias laterais de quatro resíduos: isoleucina, leucina, aspartato e asparagina quando comparado ao AMBER ff99SB (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010).

As simulações foram realizadas em um reservatório na forma cúbica, com modelo de solvatação explícita do tipo TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983). Neste modelo, as moléculas de água são rígidas e descritas por três sítios de interação, correspondendo aos três átomos do conjunto. O sistema foi submetido à um *ensemble* NPT (Número de partículas, Pressão e Temperatura constantes). O barostato utilizado para a manutenção da pressão foi “Parrinello-Rahman” (Bussi, Donadio e Parrinello, 2007), o sistema de interesse é fechado e permaneceu em contato diatérmico com um reservatório de calor em determinada temperatura, mantida constante (para nossos experimentos a temperatura utilizada foi de 309 K). Foi utilizado também o termostato “V-rescale” (Bussi, Donadio e Parrinello, 2007) durante a dinâmica de restrição (1 ns), e termostato “Nose-Hoover” (Nose, 1984) durante a dinâmica molecular propriamente dita.

Prezando pela uniformidade experimental, todos os experimentos neste trabalho compartilharam de um mesmo conjunto básico de parâmetros. Seguem abaixo alguns dos parâmetros complementares aos que já foram discutidos que concluem a caracterização do sistema simulado:

- Equilíbrio iônico: a fim de neutralizar as cargas implícitas geradas em pH 7,0 pelas porções N(+) e C(-) terminais, e pelos resíduos carregados que a proteína apresenta, foram inseridos íons ao sistema Na^+ e Cl^- , sempre utilizaremos as opções “neutral” e “conc” do programa “genion”;
- PME (*Particle Mesh Ewald*): é o método de soma de Ewald para eletrostática de longa distância, mais eficiente (ganho em desempenho) que a soma de Ewald clássica;
- dt (*time steps*): intervalo de tempo para a integração numérica do sistema de 0,002 ns;
- Foram aplicadas condições periódicas de contorno, e raios de corte de 1,0 nm para as interações eletrostáticas e de van der Waals.

3.1.2. Fumarato hidratase de *Leishmania major* codificada pelo gene LmjF29.1960 mutante T467A (LmFH-2-T467A)

3.1.2.1. Clonagem do mutante LmFH-2-T467A

O resíduo Thr⁴⁶⁷ de LmFH-2 foi mutado para Ala por mutação sítio dirigida usando o protocolo do kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies). O protocolo consistiu inicialmente de uma reação de PCR usando os oligonucleotídeos contendo a mutação pontual e o plasmídeo LmFH-2-pET28a (Feliciano *et al.*, 2012) como molde. Em seguida, o produto de PCR foi digerido com a enzima Dpn I e usado para transformar a *E. coli* DH5- α . A enzima endonuclease Dpn I é específica para DNA metilado e hemimetilado e é usada tanto para digerir o plasmídeo molde, que é metilado por ser isolado de *E. coli* dam⁺ (DH5- α), quanto para selecionar o DNA contendo a mutação desejada. As etapas de clonagem estão descritas a seguir.

a) Desenho dos oligonucleotídeos (*primers*)

Os oligonucleotídeos foram desenhados manualmente a partir da sequência do gene que codifica a proteína LmFH-2, disponível no banco de dados do genoma de *L. major* (código de acesso LmjF26.1960) (<http://www.genedb.org/genedb/leish/>), para a inserção da mutação pontual do resíduo Thr⁴⁶⁷ por Ala (**Tabela 1**).

A temperatura de anelamento para cada *primer* foi calculada através da fórmula:

$$T_m = 60 + 41 (G+C)/L - 500/L$$

onde G e C são os números de nucleotídeos Guanina e Citosina e L é o número de nucleotídeos total, todos da sequência de LmFH-2, contendo a mutação, utilizada na construção do *primer*.

Tabela 1. *Primers* utilizados na construção do mutante LmFH-2-T467A

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<i>Forward</i>	5' CC TTT GGC CCG GCG ACG GCC GGC CG 3'
<i>Reverse</i>	5' CG GCC GGC CGT CGC CGG GCC AAA GG 3'

A trinca de nucleotídeos que corresponde a mutação da Thr⁴⁶⁷ (ACG) por Ala (GCC) está identificada em negrito.

b) Amplificação do gene de interesse

A ampliação do gene de interesse por PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada em um termociclador (Eppendorf) utilizando: 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo,

DNA molde (plasmídeo LmFH-2) 0,9 ng/ μ l, dNTP mix 250 μ M (Invitrogen), tampão da *Pfu Ultra II reaction* 1X (Agilent Technologies), 1 μ l de *Pfu Ultra II fusion HS DNA polymerase* (Agilent Technologies), em um volume final de 50 μ l. A reação iniciou-se com a desnaturação do DNA incubando-se a reação a 95 °C por 2 min, seguida por 18 ciclos a 95 °C por 20 s (desnaturação), 76 °C por 20 s (anelamento) e 72 °C por 2 min (extensão). A extensão final foi realizada por 3 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

c) Digestão do produto amplificado com *Dpn* I

O produto amplificado por reação de PCR foi digerido com a enzima endonuclease *Dpn* I (New England Biolabs) de acordo com o descrito na **Tabela 2**. A reação de digestão foi incubada a 37 °C por 2 h, e em seguida purificada com o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). A quantidade de DNA foi estimada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm em um NanoDrop 2000c.

Tabela 2. Reação de digestão com *Dpn* I

Produto de PCR	
NEBuffer 4 (10X)	5 μ l
DNA amplificado	30 μ l
H ₂ O	14 μ l
<i>Dpn</i> I (20U/ μ l)	1 μ l
Volume total	50 μ l

d) Transformação de *E. coli* DH5 α competente com o plasmídeo LmFH-2-T467A

A transformação das células competentes de *E. coli* DH5- α (C2987H – New England Biolabs) foi realizada por choque térmico, de acordo com o protocolo do fabricante (<https://www.neb.com/protocols/1/01/01/high-efficiency-transformation-protocol-c2987>).

e) Análise e isolamento do plasmídeo recombinante LmFH-2-T467A

Algumas colônias foram selecionadas para analisar a presença do plasmídeo recombinante contendo o inserto de interesse. Cada colônia foi inoculada em 10 ml de meio LB suplementado com kanamicina 30 μ g/ml e incubada sob agitação de 190 rpm por 16 h a 37 °C. Em seguida, o DNA plasmidial foi isolado usando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante, e digerido com a enzima *Eco*RI,

como descrita na **Tabela 3**. A reação de digestão foi incubada a 37 °C por 3 h. Para checar a presença de DNA as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% (m/v).

Os plasmídeos contendo o inserto de interesse foram submetidos à sequenciamento de DNA (GENEWIZ) para checar a presença da mutação T467A.

Tabela 3. Reação de digestão com *EcoRI*

Plasmídeo LmFH-2-T467A	
NEBuffer 4 (10X)	5 µl
DNA	10 µl
H ₂ O	34 µl
<i>EcoRI</i> (20U/µl)	1 µl
Volume total	50 µl

3.1.2.2. Expressão do mutante LmFH-2-T467A

Os ensaios de expressão para o mutante LmFH-2-T467A foram realizados em *E. coli* T7 Express (C2566 - New England BioLabs). A proteína LmFH-2-T467A foi expressa em fusão com uma cauda de histidina (6XHis) na região N-terminal.

Uma colônia de T7 Express contendo o plasmídeo recombinante de LmFH-2-T467A-pET28a foi utilizada para inocular 10 ml de meio LB suplementado com kanamicina 30 µg/ml e incubado sob agitação de 190 rpm por 16 h a 37 °C. A cultura foi diluída na proporção 1:100 em 1 l de meio LB contendo kanamicina 30 µg/ml e incubada a 37 °C sob agitação de 190 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. A expressão da proteína foi induzida com 0,25 mM de IPTG, a cultura suplementada com 2 mM de cisteína, 0,2 mg/ml de sulfato de ferro II e 0,2 mg/ml de citrato de ferro III, e mantida sob agitação de 70 rpm por 24 h a 18 °C. Após as 24 h de indução, a cultura foi dividida em dois volumes de 0,5 l e centrifugada a 4.000 x g por 10 min a 4 °C. As células foram armazenadas no freezer (-20 °C) e o sobrenadante descartado.

3.1.2.3. Purificação por cromatografia de afinidade

A purificação do mutante LmFH-2-T467A foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni (Thermo scientific). Para a realização dos experimentos de cristalização, os ensaios de purificação foram realizados com 1 mM de DTT em todos os tampões de purificação.

As células obtidas a partir de 0,5 l de cultura foram ressuspensas em 20 ml de tampão A (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,5, 300mM NaCl; adicionado de 1 mM DTT para os

experimentos de cristalização) contendo um tablete de inibidor de protease sem EDTA (Roche). Em seguida, as células foram lisadas por sonicação por 10 min (1 s sonicado com intervalo de 2 s) em um sonicador Q700 (QSonica) com amplitude 5% e centrifugadas a $14.100 \times g$ por 35 min a 4 °C.

O sobrenadante (extrato bruto), contendo a enzima LmFH-2-T467A, foi carregado em uma coluna com 1 ml de resina de Ni previamente equilibrada com tampão A. A coluna foi lavada com um gradiente em etapas de imidazol de 0 a 50 mM em tampão A. A enzima recombinante LmFH-2-T467A foi eluída com tampão A contendo 100 mM de imidazol.

O grau de pureza da enzima foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (gel Mini-PROTEAN TGX - Bio-Rad). A revelação do gel foi efetuada com o corante azul de Coomassie G-250 (SimplyBlue™ SafeStain - Invitrogen). As eluições foram concentradas e dialisadas em 50 mM tris pH 8,5, 150 mM NaCl, adicionado de 1mM DTT para os experimentos de cristalização, usando o concentrador Ultrafree - 30 kDa (Millipore) a $2.500 \times g$ por 10 min a 4°C. A concentração da proteína foi determinada por espectroscopia no UV a 280 nm ($\epsilon_{\text{LmFH-2}} = 65.500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) utilizando NanoDrop 2000c.

Devido à instabilidade da atividade das FHs da classe I na presença de oxigênio (Flint, Emptage e Guest, 1992; Feliciano *et al.*, 2012), a purificação foi realizada a 4 °C em um *glovebox* (MBRAUN UNIlab), com uma atmosfera de gás nitrogênio. Todas as soluções tampões foram previamente desoxigenadas com argônio por 1 h e em seguida transferidas para o *glovebox*. Todos os materiais utilizados durante a purificação foram submetidos previamente à ciclos de vácuo e gás nitrogênio e deixados *overnight* degaseificando no vácuo.

3.1.2.4. Cristalização do mutante LmFH-2-T467A

Os estudos de cristalização foram realizados com a amostra proteica oriunda da construção no vetor de expressão pET28a (Novagen), no qual a proteína de interesse se encontra fusionada a cauda de histidina na região N-terminal.

Os experimentos de cristalização do mutante LmFH-2-T467A foram realizados através da utilização do método da difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Os ensaios de cristalização foram então realizados utilizando 400 µl de solução de cristalização (tacsinato 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 8 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (9,4 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) em um volume total da gota de 2 µl.

A técnica de cristalização com aditivo (etanol 2,7% (v/v)) combinada com *microseeding* também foi utilizada nos experimentos de cristalização do mutante LmFH-2-T467A. Esses experimentos foram realizados com 400 µl de solução de cristalização (tacsinato 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução *seed* (solução de semeadura) (30 a 240X diluída), 1 µl de proteína (4,7 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

Como a condição de cristalização original é composta por tacsinato, que contém o substrato (malato) e os inibidores (malonato e succinato) da proteína, foram preparadas soluções de tacsinato de forma a conter apenas o ligante de interesse. Essas soluções foram usadas nos experimentos de cristalização na forma holo e de cocrystalização com substratos (malato e fumarato) e inibidores (malonato e succinato), como descritos a seguir.

a) Cristalização de LmFH-2-T467A na forma holo

Os ensaios de cristalização da LmFH-2-T467A na forma holo foram realizados através da utilização do método da difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Como a condição de cristalização original de LmFH-2-T467A é composta por tacsinato, que contém o substrato (malato) e os inibidores (malonato e succinato) da proteína, para a realização dos experimentos de cristalização na forma holo foi preparada uma solução de tacsinato* 100% em pH 5 na ausência de malato (substrato), malonato e succinato (inibidores): citrato de amônio tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos iniciais foram realizados com 400 µl de solução de cristalização (tacsinato* (sem malato, malonato e succinato) 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 8 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (9,4 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl e 1 mM DTT) em um volume total da gota de 2 µl.

b) Cocrystalização de LmFH-2-T467A com malato

Os ensaios de cocrystalização de LmFH-2-T467A com malato foram realizados através da utilização do método da difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Para a realização desses experimentos foi preparada uma solução de tacsinato^s 100% em pH 5 na ausência de malonato e succinato: ácido L-málico 0,3 M; citrato de amônio

tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos de cocristalização foram realizados com 400 µl de solução de cristalização (tacsinato^s (sem malonato e succinato) 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 8 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (7,5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e malato 5 mM) em um volume total da gota de 2 µl.

A técnica de cristalização com aditivo (etanol 2,7%) combinada com *microseeding* também foi utilizada nos experimentos de cocristalização com malato. Esses experimentos foram realizados com 400 µl de solução de cristalização (tacsinato^s 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução *seed* (30 a 240X diluída), 1 µl de proteína (4,7 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM malato) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

c) Cocristalização de LmFH-2-T467A com fumarato

Os ensaios de cocristalização de LmFH-2-T467A com fumarato foram realizados através da utilização do método da difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Para a realização desses experimentos foi preparada uma solução de tacsinato[#] 100% em pH 5 adicionada de fumarato e na ausência de malato, malonato e succinato: fumarato de sódio 0,12 M; citrato de amônio tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos de cocristalização foram realizados com 400 µl de solução de cristalização (tacsinato[#] (com fumarato e sem malato, malonato e succinato) 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 8 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 ou 2 µl de solução de cristalização e de proteína (7,5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM fumarato) em um volume total da gota de 2 ou 4 µl. Ensaios de cristalização usando etanol 2,7% (v/v) como aditivo na gota também foram realizados, e as gotas consistiram de 1 ou 2 µl de solução de cristalização e de proteína (7,5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM fumarato) e 0,2 ou 0,4 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 ou 4,4 µl.

A técnica de cristalização com aditivo (etanol) combinada com *microseeding* também foi utilizada nos experimentos de cocristalização com fumarato. Esses experimentos foram realizados com 400 µl de solução de cristalização (tacsinato[#] 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 14 e 16% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução *seed* (30 a 240X diluída),

1 µl de proteína (4,7 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM fumarato) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

d) Cocrystalização de LmFH-2-T467A com malonato

Os ensaios de cocrystalização de LmFH-2-T467A com malonato foram realizados através da utilização do método da difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Para a realização desses experimentos foi preparada uma solução de tacsinato^e 100% em pH 5 na ausência de malato e succinato: ácido malônico 1,8305 M; citrato de amônio tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos de cocrystalização foram realizados com 400 µl de solução de cristalização (tacsinato^e (sem malato e succinato) 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 8 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína (9,4 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT) em um volume total da gota de 2 µl.

A técnica de cristalização com aditivo (etanol 2,7%) combinada com *microseeding* também foi utilizada nos experimentos de cocrystalização com malonato. Esses experimentos foram realizados com 400 µl de solução de cristalização (tacsinato^e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 12% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução *seed* (30 a 240X diluída), 1 µl de proteína (4,7 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT) e 0,2 µl de etanol 30%, em um volume total da gota de 2,2 µl.

e) Cocrystalização de LmFH-2-T467A com succinato

Os ensaios de cocrystalização de LmFH-2-T467A com succinato foram realizados através da utilização do método da difusão de vapor em gota suspensa em um *glovebox* (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, a temperatura ambiente.

Para a realização desses experimentos foi preparada uma solução de tacsinato^e 100% em pH 5 na ausência de malato e malonato: ácido succínico 0,12 M; citrato de amônio tribásico 0,25 M; acetato de sódio triidratado 0,4 M; formato de sódio 0,5 M e tartarato de amônio dibásico 0,16 M.

Os experimentos de cocrystalização foram realizados com 400 µl de solução de cristalização (tacsinato^e (sem malato e malonato) 2 e 4% (v/v) pH 5, PEG 3.350 8 a 18% (m/v)) no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e de proteína

(7,5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM succinato) em um volume total da gota de 2 μ l.

3.1.2.5. Coleta e processamento de dados

Os dados de difração de raios-X foram coletados na linha 24-ID-C do *Advanced Photon Source* (APS) em Chicago nos Estados Unidos. A coleta foi realizada em temperatura criogênica (100 K), comprimento de onda (λ) igual a 0,9795 Å e os dados registrados em um detector PILATUS 6M (Henrich *et al.*, 2009). O experimento de difração de raios-X foi realizado com o cristal de LmFH-2-T467A congelado em nitrogênio líquido na presença de solução crioprotetora (tacsinato ou tacsinato^{#,*} 8% pH 5, PEG 3.350 18%, glicerol 25%).

Os conjuntos de imagens coletados foram processados e escalonados no programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997).

3.1.2.6. Determinação da estrutura e refinamento

As estruturas de LmFH-2-T467A foram resolvidas por substituição molecular, implementada no programa Phaser (PHENIX) (Adams *et al.*, 2010), usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de águas) da estrutura dimérica de LmFH-2.

O refinamento das estruturas de LmFH-2-T467A foi realizado no programa phenix.refine (Adams *et al.*, 2010), seguido por vários ciclos de reconstrução dos modelos no programa Coot (Emsley *et al.*, 2010), em que as posições atômicas do modelo inicial foram modificadas de forma a satisfazer a estereoquímica e o mapa de densidade eletrônica. As moléculas de água foram adicionadas usando o programa Coot (Emsley *et al.*, 2010) e validadas visualmente. Os ligantes malato, malonato, glicerol e PEG foram adicionados às estruturas usando o Coot (Emsley *et al.*, 2010). A estereoquímica das estruturas foi validada no MolProbity (Chen *et al.*, 2010). As figuras foram geradas no programa gráfico Pymol (Delano).

3.1.2.7. Cinética enzimática

Os estudos cinéticos foram realizados com a amostra proteica oriunda da construção no vetor de expressão pET28a (Novagen), no qual a proteína de interesse se encontra fusionada a cauda de histidina na região N-terminal.

Os experimentos de cinética enzimática foram realizados em um *glovebox* (MBRAUN UNIlab), com uma atmosfera de gás nitrogênio. As soluções tampões foram previamente desoxigenadas com argônio por 1 h e em seguida transferidas para o *glovebox*. Todos os

materiais utilizados durante os ensaios de atividade foram submetidos previamente a ciclos de vácuo e gás nitrogênio e deixados *overnight* degaseificando no vácuo.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos dos dois substratos, fumarato e S-malato, os ensaios de atividade da enzima LmFH-2-T467A foram realizados através de um ensaio espectrofotométrico que monitora a formação ou o consumo da molécula de fumarato. Os experimentos foram realizados em condições anaeróbicas a temperatura ambiente em um espectrofotômetro USB4000 (Ocean Optics) usando o comprimento de onda de 250 nm ($\epsilon_{250\text{ nm}}^{\text{fumarato}} = 1,45 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A reação foi iniciada pela adição de LmFH-2-T467A em uma concentração final de 60 e 120 $\mu\text{g/ml}$ à uma solução tampão 50 mM tris pH 9, 150 mM NaCl adicionada dos substratos S-malato ou fumarato, respectivamente, em um volume final de 1 ml. A reação foi monitorada por 30 min.

Os parâmetros cinéticos, V_{max} e K_m , foram determinados para os substratos S-malato e fumarato a partir da equação de Michaelis-Menten (Equação I), através da utilização do método de regressão não linear, variando a concentração de S-malato de 0,5 a 8 mM e variando a concentração de fumarato de 0,125 a 1 mM.

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equação I})$$

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2.1 Clonagem, expressão e purificação por cromatografia de afinidade

a) LmFH-2

A proteína LmFH-2 foi clonada no vetor de expressão pET28-a (Novagen) e expressa em *E. coli* BL21(DE3) ou T7 express (New England Biolabs). As condições de expressão foram otimizadas para os experimentos de cristalização de forma a minimizar a contaminação com oxigênio. Os ensaios de expressão de LmFH-2 foram realizados a 18 °C com 0,25 mM de IPTG por 24 horas.

A purificação da enzima LmFH-2 foi realizada com sucesso por cromatografia de afinidade em resina de Ni, utilizando um gradiente em etapas de imidazol. As lavagens da resina com 0; 25 e 50 mM de imidazol contribuíram para retirar a maioria dos contaminantes e a proteína de interesse começou a eluir a partir de 100 mM de imidazol (**Figura 5**). As primeiras eluições com 100 mM de imidazol apresentaram algumas bandas de contaminação, mas a partir da fração 15 (**Figura 5**) a proteína apresentou alto grau de pureza. Uma banda de 30 kDa de baixa intensidade, possivelmente resultado da presença de um contaminante ou de um produto de degradação proteolítica, aparece nas eluições feitas na presença de 500 mM de imidazol. A presença deste contaminante não é sistemática, e portanto optou-se por não introduzir novos passos cromatográficos no protocolo de purificação por entender que a perda de rendimento e o aumento no tempo de purificação poderiam ser mais danosos ao sucesso dos experimentos de caracterização bioquímica e biofísica do que o possível favorecimento com o ganho em pureza.

Figura 5. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni da enzima LmFH-2. As frações 1 a 7, 8 a 19, e 20 a 27 representam as frações com 50 mM de imidazol, 100 e 500 mM de imidazol, respectivamente. M indica o padrão de massa molecular.

b) LmFH-2-T467A

A construção da proteína contendo a mutação T467A (LmFH-2-T467A) foi realizada para investigar o papel do resíduo Thr⁴⁶⁷ no mecanismo de ação da enzima LmFH-2. O gene que codifica LmFH-2 com a mutação T467A foi clonado com sucesso no vetor de expressão pET28a e a mutação foi confirmada por sequenciamento. A proteína mutante LmFH-2-T467A foi expressa com sucesso em *E. coli* T7 express através da indução com 0,25 mM de IPTG por 24 h a 18 °C, e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni com um gradiente em etapas de imidazol. As lavagens da resina com 0; 25 e 50 mM de imidazol contribuíram para retirar a maioria dos contaminantes e a proteína começou a eluir mais pura a partir de 100 mM de imidazol (**Figura 6**).

Figura 6. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni da enzima LmFH-2-T467A. As frações 1 a 4, 5 a 10, e 10 a 14 representam as frações com 50, 100 e 500 mM de imidazol, respectivamente. M indica o padrão de massa molecular de 250 a 10 kDa (New England Biolabs).

3.2.2 Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho de LmFH-2

Os experimentos de purificação da isoforma *LmFH-2* por coluna de afinidade haviam sido anteriormente otimizados e o grau de pureza obtido bastante satisfatório para a realização dos experimentos de produção de anticorpos, localização celular, EPR, CD e atividade enzimática. No entanto, para os experimentos de cristalização, decidimos incluir uma nova etapa de purificação que consistiu na utilização de cromatografia de exclusão por tamanho. A utilização dessa estratégia tinha como meta não somente melhorar o grau de pureza da proteína em estudo, mas também investigar o grau de oligomerização da enzima e eliminarmos possíveis agregados.

A cromatografia de exclusão por tamanho para LmFH-2 foi realizada em coluna Superdex™ 200 HR 10/30 (Ge Healthcare) e o perfil cromatográfico obtido (**Figura 7 (A)**)

indicou a presença de três picos. A análise por SDS-PAGE (**Figura 7 (B)**) revelou a presença da proteína de interesse em todos os picos, assim como a presença de contaminantes.

Figura 7. (A) Perfil cromatográfico de LmFH-2 por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. A cromatografia foi realizada em tampão 50 mM tris pH 8,5, 150mM NaCl. (B) SDS-PAGE 12% das frações eluídas por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. FH2 corresponde a proteína que foi concentrada e aplicada na coluna. Os números (8 a 15) correspondem as frações de 1 ml representadas em vermelho no cromatograma do item (A). (C) Perfil cromatográfico de LmFH-2 diluída por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200.

De forma a estimar o tamanho dos oligômeros eluídos da coluna Superdex, a mesma foi previamente calibrada pela aluna de doutorado Joane K. R. Bonalumi e a função que descreve a curva de calibração da coluna determinada (**Figura 8**). A coluna foi calibrada utilizando padrões de massa molecular para proteínas de 13,7 a 440 kDa em tampão de

corrida contendo 20 mM tris pH 8 e 150 mM NaCl, similar ao utilizado em nossos experimentos. Nestes experimentos, o volume de exclusão da coluna foi estimado em 8 ml utilizando o marcador blue dextran (2000 kDa).

Figura 8. Perfil de eluição cromatográfica para os padrões de massa molecular (A) e a correspondente curva de calibração (B) da coluna de exclusão molecular Superdex 200 (Ge Healthcare). A calibração da coluna foi realizada em 20 mM tris pH 8, 150 mM NaCl. Dados gentilmente cedidos pela aluna de doutorado Joane K. R. Bonalumi.

Através da curva de calibração da coluna foi possível estimar a forma oligomérica de LmFH-2 (65,8 kDa) em cada pico eluído da cromatografia de exclusão por tamanho: o primeiro pico eluiu em 8,3 ml, dentro do volume de exclusão da coluna; o segundo pico eluiu em 10,9 ml correspondendo à uma possível forma oligomérica hexamérica (378,5 kDa); e o terceiro pico eluiu em 12,8 ml correspondendo ao estado oligomérico dimérico (156 kDa), esperado para a classe 1 das FHs. Estes resultados sugerem que a LmFH-2 se encontra majoritariamente na forma dimérica (o terceiro pico é o mais intenso - **Figura 7 (A)**), apresentando uma pequena quantidade de agregados.

Decidimos, assim, por especular os possíveis fatores que pudessem levar à agregação da LmFH-2 testando se a concentração da amostra proteica utilizada inicialmente no experimento poderia estar induzindo a agregação e o surgimento de diferentes estados oligoméricos. Para tanto, realizamos um segundo experimento de cromatografia por exclusão molecular utilizando como amostra uma das frações de LmFH-2 diretamente eluídas da purificação por cromatografia por afinidade em resina de Ni, sem que esta passasse por qualquer processo de concentração ou diálise. A reprodutibilidade no perfil de eluição, com a presença dos três picos nas mesmas posições, obtido para a amostra proteica em concentrações baixas (**Figura 7(C)**) e sem qualquer manipulação maior reforça a idéia de que a agregação, ainda que parcial, parece ser uma característica intrínseca da proteína dentro das condições utilizadas e independente da concentração da proteína.

3.2.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) de LmFH-2

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi também utilizada para investigar o estado de agregação e o grau de oligomerização da proteína LmFH-2. A análise dos resultados para LmFH-2 (**Figura 9**) sugere a existência de uma população majoritária (98,9%) e monodispersa de massa molecular de $153,5 \pm 73,8$ kDa compatível com a forma dimérica (~ 120 kDa) esperada para as FHs da classe I. Em apenas 1% de todo conteúdo proteico foi observado a presença de formas agregadas de tamanho estimado em $6750 \pm 957,9$ kDa. Estes resultados, obtidos em experimentos de purificação independentes, estão de acordo com o previamente observado no experimento de cromatografia por exclusão molecular, que sugere a forma dimérica como a forma oligomérica encontrada para LmFH-2 em solução, assim como a possibilidade de formação de agregados nas condições utilizadas, ainda que em pequena porcentagem.

Figura 9. Análise do perfil de tamanho encontrado para as amostras de LmFH-2 obtidas através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Nos gráficos estão representados o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função da intensidade da luz espalhada e do volume.

3.2.4 Dicroísmo circular (CD) de LmFH-2

A técnica de espectroscopia por dicroísmo circular foi utilizada para avaliar o conteúdo de estrutura secundária, assim como o perfil de estabilidade química e térmica da LmFH-2 (**Figura 10**). O espectro de CD obtido foi caracterizado por duas bandas negativas em cerca de 208 e 220 nm e uma banda positiva em torno de 195 nm. O mínimo em 220 nm foi atribuído majoritariamente a transições encontradas em estruturas helicoidais, ao passo

que a banda negativa em torno de 210 nm foi provavelmente resultado de uma mistura do mínimo em 208 nm decorrente de estrutura em hélice com a banda em 215 nm oriunda de transições observadas em fitas β , o que sugeriram, portanto, uma estrutura da proteína envolvendo combinações do tipo α/β . Além disso, a intensidade comparável da banda em 208 nm, do máximo em 197 nm e do mínimo em torno de 220 nm apontaram para a existência de quantidades apreciáveis de folhas β .

Figura 10. Dicroísmo circular de LmFH-2. **(A)** Espectros de dicroísmo circular em diferentes temperaturas (10 a 90 °C). **(B)** Desnaturação térmica da proteína monitorada em 220 nm.

A predição do conteúdo de estrutura secundária foi realizada através da desconvolução do espectro de CD de LmFH-2 utilizando o programa K2D2 (<http://www.ogic.ca/projects/k2d2/>) (Perez-Iratxeta e Andrade-Navarro, 2008). O conteúdo de estrutura secundária foi estimado a 20 °C para LmFH-2 em cerca de 28% de α -hélices e 26% de folhas β . Uma comparação com os valores estimados para LmFH-1 em 29% de α -hélices e 18% de folhas β (conforme será apresentado a seguir) sugeriu que as duas isoformas, embora pertencessem a classe I, apresentam possíveis diferenças no enovelamento. Embora o valor absoluto do conteúdo de estrutura secundária possa alterar um pouco dependendo do algoritmo usado, as diferenças do conteúdo de estrutura secundária entre LmFH-1 e LmFH-2 foram claramente observadas. Nossos resultados são muito diferentes dos reportados para as FHs da classe II, que apresentaram um conteúdo de estrutura secundária de 56.5% de α -hélices e 13.1% de folhas β (Barteri *et al.*, 2004), indicando que FHs das classes I e II provavelmente apresentam diferenças estruturais importantes.

A desnaturação térmica da LmFH-2 (**Figura 10 (A)**) mostrou que a proteína perde gradualmente sua quantidade de estrutura secundária, perdendo totalmente este conteúdo a partir de 70 °C. O gráfico de elipticidade molar em função da temperatura para o comprimento de onda de 220 nm (**Figura 10 (B)**) indicou que a temperatura de desnaturação

da proteína é 57,7 °C. Uma comparação com o valor da temperatura de desnaturação para LmFH-1 (56,3 °C) mostrou que as duas enzimas apresentam temperaturas de desnaturação similares e que ambas podem ser consideradas termolábeis.

A análise do espectro da proteína resfriada a 10 °C, após o ciclo de desnaturação térmica, confirmou uma perda significativa no conteúdo de α -hélices e folhas β e um aumento no conteúdo desenovelado. Além disso, precipitados macroscópicos foram observados ao remover a amostra proteica do instrumento. Esses resultados sugeriram a desnaturação térmica irreversível da LmFH-2.

3.2.5 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR) de LmFH-2

As medidas de ressonância paramagnética eletrônica foram realizadas sob a orientação do Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho utilizando a amostra proteica preparada em condições aeróbicas e anaeróbicas de forma a caracterizar o tipo de centro metálico encontrado na proteína. Em ambas as condições, os espectros de EPR da proteína LmFH-2 mostraram ressonâncias na região em torno de 3.300 G de campo magnético que são características de um centro $[3\text{Fe-4S}]^+$ (**Figura 11 (A)**). Como as FHs da classe I contém um complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (silencioso ao EPR) no sítio catalítico, a presença do complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$ na proteína seria devido à oxidação pelo oxigênio do complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, que passaria para um estado de oxidação instável $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$, perderia um íon Fe^{2+} e em seguida degradaria para a forma inativa $[3\text{Fe-4S}]^+$ (Flint, Emptage e Guest, 1992; Imlay, 2006).

Para investigar se haveria uma fração do complexo $[4\text{Fe-4S}]^+$ na proteína foram realizados experimentos de EPR com a amostra proteica preparada no *glove bag* através da incubação com agente oxidante (persulfato de amônio - APS) e redutor (ditionito de sódio). Os resultados indicaram um aumento do sinal referente ao complexo $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ ao adicionar o APS (agente oxidante) e ausência de sinal ao incubar a proteína com ditionito de sódio (agente redutor) (**Figura 11 (A)**), sugerindo a redução do complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$ para a forma $[3\text{Fe-4S}]^0$ (silencioso ao EPR). Nenhum sinal do complexo $[4\text{Fe-4S}]^+$ foi detectado.

A presença apenas do complexo oxidado $[3\text{Fe-4S}]^+$ na LmFH-2 em condições anaeróbicas foi crucial para questionarmos se as nossas condições de trabalho poderiam não ser adequadas para garantir anaerobiose. Sendo assim, investigamos a quantidade de oxigênio no *glove bag*, utilizando um oxímetro, e vimos que, mesmo usando uma fonte de gás nitrogênio de alta pureza (3 ppm de oxigênio), a quantidade de oxigênio estimada dentro do *glove bag* era de aproximadamente 20 ppm. Nossos resultados sugeriram fortemente que caso o complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ estivesse presente na enzima LmFH-2, este seria altamente sensível ao

oxigênio, uma vez que 20 ppm de oxigênio já seria suficiente para induzir a mudança no seu estados de oxidação.

A quantificação do espectro de EPR de LmFH-2, utilizando 1 mM Cu (II), 10 mM EDTA como padrão (Crack, Green e Thomson, 2004), indicou que apenas 10% da proteína contém o complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$, sugerindo que há uma transição entre os estados de oxidação 0 e +1 do complexo $[3\text{Fe-4S}]$, sendo o $[3\text{Fe-4S}]^0$ (silencioso ao EPR) predominante. Além disso, para checar a transição entre os estados de oxidação 0 e +1 do complexo $[3\text{Fe-4S}]$ adicionamos APS à amostra de proteína reduzida com ditionito de sódio e vimos a reoxidação do cluster através do sinal de EPR de um complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$ (**Figura 11 (A)**).

Figura 11. Espectros de EPR do complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$ da proteína LmFH-2 medidos a 10 K. **(A)** Espectros de LmFH-2 na forma holo (preto), incubada com ditionito de sódio (vermelho), com APS (magenta) e com ditionito de sódio e em seguida com APS (azul). **(B)** Espectros de LmFH-2 na forma holo (preto), incubada com fumarato (azul) e malato (rosa).

De forma a investigar se o substrato se ligaria ao sítio ativo mesmo com a proteína na forma inativa, ou seja, contendo o complexo $[3\text{Fe-4S}]$, foram realizadas medidas de EPR com a proteína incubada com os substratos fumarato e S-malato (**Figura 11 (B)**). Na presença dos substratos, o espectro da forma holo se alterou, sugerindo que o referido sinal poderia ser resultado da interação do substrato com o centro Fe-S localizado no sítio ativo da proteína.

Baseado em nossos resultados, como não foi possível caracterizar o *cluster* $[4\text{Fe-4S}]$ da proteína, pretendemos realizar novos experimentos de EPR preparando as amostras em condições anaeróbicas, utilizando um *glovebox* (Mbraun) que apresenta concentração de oxigênio igual a zero. Esses experimentos serão realizados em colaboração com a Profa. Catherine Drennan no Massachusetts Institute of Technology.

3.2.6 Atividade enzimática

a) Determinação do pH ótimo de LmFH-2

Para determinar o pH ótimo de atividade da enzima *LmFH-2* para os dois substratos, S-malato e fumarato, foram realizados ensaios de atividade na presença de soluções tampões em diferentes pHs (4 a 12) (Figura 12).

Figura 12. Perfil pH versus atividade específica para a enzima LmFH-2 utilizando S-malato (A) ou fumarato (B) como substrato. A curva foi construída a partir da medida da velocidade inicial da formação ou do consumo de fumarato a 250 nm e 25°C. As soluções em diferentes pHs utilizadas foram: acetato de sódio 50 mM pH 4 e pH 5; cacodilato de sódio 50 mM pH 6,2; tris 50 mM pH 7, 8 e 9; glicina/NaOH 50 mM pH 10; NaHCO₃/NaOH 50 mM pH 11; KCl/NaOH 50 mM pH 12; todas contendo NaCl 150 mM. A concentração final da enzima era 40 µg/mL e dos substratos, fumarato e malato, 1 mM.

Os resultados obtidos sugerem que o pH ótimo de atividade da enzima é de aproximadamente 9 para os dois substratos. Este valor é similar ao encontrado para *LmFH-1* (pH 8,7 para os dois substratos – dados apresentados na dissertação de mestrado da aluna Patrícia Rosa Feliciano em 2009) e ao reportado para as enzimas da classe I: fumarase de *Euglena gracilis var. Bacillaris* (pH 8,4) (Shibata, Gardiner e Schwartzbach, 1985) e fumarase de bactéria cepa MPOB (pH 8,5) (Vankuijk *et al.*, 1996); e classe II: fumarase de *Corynebacterium glutamicum* (pH 7,5 para fumarato e pH 8,5 para malato) (Genda, Watabe e Ozaki, 2006) e fumarase de *Arabidopsis thaliana* (pH 8,2 - 8,7) (Behal e Oliver, 1997).

Com base nos resultados obtidos foi estabelecido um protocolo de caracterização cinética, no qual os experimentos de atividade foram realizados em solução tampão tris 50 mM pH 9 e NaCl 150 mM.

b) Cinética enzimática de LmFH-2

Os experimentos de cinética enzimática da LmFH-2 foram realizados em três diferentes condições durante o desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente foram

realizados ensaios de atividade em condições aeróbicas e em condições de baixa anaerobiose através da utilização de um *glove bag*, conforme dados publicados em 2012 (Feliciano *et al.*, 2012). No entanto, os resultados de EPR, conforme apresentado na seção anterior, sugeriam que as condições de purificação no *glove bag* não eram ideais, e a presença de oxigênio, ainda que em baixa concentração (20 ppm) era suficiente para oxidar o complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, presente no sítio ativo da proteína, podendo interferir na atividade catalítica da enzima. Sendo assim, diante da possibilidade de utilizarmos condições adequadas de anaerobiose (*glovebox* (Mbraun)), disponíveis no laboratório da Profa. Catherine Drennan do Massachusetts Institute of Technology, onde foi realizado o estágio de doutorado sanduíche, e da real necessidade em investigarmos a influência da oxidação do complexo $[4\text{Fe-4S}]$ para a atividade catalítica, novos experimentos de caracterização cinética foram repetidos para os dois sentidos da reação.

Os parâmetros cinéticos, $V_{\max}$ e K_m , para os substratos S-malato e fumarato foram determinados a partir da equação de Michaelis-Menten e foram comparados com os previamente obtidos conforme apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos para LmFH-2

Enzima	Substrato	K_m (mM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Condição de reação
LmFH-2	S-Malato	$5,7 \pm 0,2$	$22,7 \pm 0,5$	$24,9 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,2$	Aeróbica
LmFH-2	S-Malato	$12,6 \pm 2,7$	$138,1 \pm 18,7$	$151,4 \pm 20,5$	$12,0 \pm 4,2$	20 ppm O_2 - <i>glove bag</i>
LmFH-2	S-Malato	$5,4 \pm 0,8$	$124,9 \pm 9,6$	$137,0 \pm 10,5$	$25,4 \pm 5,7$	0 ppm O_2 - <i>glovebox</i>
LmFH-2	Fumarato	$1,9 \pm 0,3$	$44,3 \pm 4,9$	$48,6 \pm 5,4$	$25,6 \pm 6,9$	Aeróbica
LmFH-2	Fumarato	$5,7 \pm 1,4$	$186,2 \pm 47,5$	$204,2 \pm 52,1$	$35,8 \pm 17,9$	20 ppm O_2 - <i>glove bag</i>
LmFH-2	Fumarato	$1,4 \pm 0,2$	$157,8 \pm 17,0$	$173,1 \pm 18,6$	$123,6 \pm 30,9$	0 ppm O_2 - <i>glovebox</i>

A análise cuidadosa dos valores de K_m , $V_{\max}$ e k_{cat} calculados para LmFH-2 para os substratos malato e fumarato em diferentes condições de anaerobiose relevaram importantes características acerca do mecanismo utilizado pela enzima LmFH-2. Inicialmente, quando comparamos os experimentos realizados na presença e ausência de oxigênio observamos valores bastante similares para K_m , enquanto que a velocidade da reação altera significativamente. Neste sentido, o aumento na velocidade da reação e na eficiência catalítica na ausência de oxigênio está de acordo com os dados de EPR que demonstram a susceptibilidade do complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ na presença de oxigênio e sua consequente oxidação resulta no complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$ não ativo. Já os valores de K_m , inalterados em ambas as condições, sugerem que a estabilidade do complexo proteína-substrato independe do cofator

[4Fe-4S]⁺, estando este envolvido diretamente na reação, mas não na estabilização com os substratos.

Outra análise indica um valor de K_m menor para o substrato fumarato, sugerindo um favorecimento, ainda que pequeno, no sentido da conversão de fumarato em malato. Esta menor afinidade para malato foi previamente reportada para as isoenzimas malato desidrogenase em *L. major* (Leroux *et al.*, 2006), sugerindo que a concentração desse metabólito em *Leishmania ssp.* pode ser maior em relação a concentração de fumarato.

Além disso, uma comparação com o valores de K_m reportados para LmFH-1 em condições anaeróbicas ($K_m = 1,9 \pm 0,4$ mM para fumarato e $K_m = 3,7 \pm 0,2$ mM para malato) indicaram que os valores de K_m encontrados para ambas as isoformas são similares. Nossos resultados mostraram ainda que LmFHs apresentam valores de K_m maiores do que os reportados para outras enzimas da classe I: fumarato hidratase A de *E. coli* ($K_m = 0,6$ mM para fumarato e $K_m = 0,7$ mM para fumarato) (Flint, 1994), fumarato hidratase de *E. gracilis var. bacillaris* ($K_m = 0,031$ mM para fumarato e $K_m = 0,14$ mM para malato) (Shibata, Gardiner e Schwartzbach, 1985) e fumarato hidratase de *bacterium strain* MPOB ($K_m = 0,25$ mM para fumarato e $K_m = 2,38$ mM para malato) (Vankuijk *et al.*, 1996).

Embora qualquer correlação entre os dados cinéticos com a diferença em localização celular, disponibilidade de substratos e favorecimento no sentido da reação em *Leishmania* seja nesse momento meramente especulativa, esses resultados levantam importantes questões a serem investigadas em uma próxima etapa desse trabalho.

c) Cinética enzimática de LmFH-2-T467A

Os experimentos de cinética enzimática para o mutante LmFH-2-T467A foram realizados em condições anaeróbicas utilizando o *glovebox* (Mbraun), no qual as concentrações de O₂ são mantidas em 0 ppm. Os parâmetros cinéticos, V_{max} e K_m , para os substratos S-malato e fumarato foram determinados a partir do ajuste dos dados pela equação de Michaelis-Menten, e estão apresentados na **Tabela 5**.

Uma comparação dos parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , obtidos para LmFH-2 e LmFH-2-T467A indicaram uma redução significativa na atividade específica do mutante estimada em 800 e 4.300 vezes menor para os substratos malato e fumarato, respectivamente. Já quando analisamos os valores de K_m notamos que para o malato os valores obtidos para LmFH-2-T467A e LmFH-2 são similares, sugerindo que não há grande alteração na forma de ligação do substrato à proteína devido a mutação. No entanto, o valor de K_m para o fumarato encontrado para LmFH-2-T467A é 3,5 vezes menor que o encontrado para LmFH-2, sugerindo uma mudança na estabilidade do complexo proteína-fumarato.

Esses resultados sugerem um papel importante da Thr⁴⁶⁷ no mecanismo reacional da enzima LmFH-2. Os dados cinéticos, combinados com os dados estruturais expostos nas próximas seções sugerem que a Thr⁴⁶⁷ pode ser considerada um resíduo catalítico atuando como ácido ou base no mecanismo de ação da enzima LmFH-2.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos para LmFH-2-T467A

Enzima	Substrato	K _m (mM)	V _{max} (μmol/min/mg)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (10 ³ M ⁻¹ .s ⁻¹)	Condição de reação
LmFH-2-T467A	S-Malato	6,6 ± 0,7	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,027 ± 0,004	Anaeróbica - <i>glovebox</i>
LmFH-2-T467A	Fumarato	0,4 ± 0,1	0,040 ± 0,006	0,044 ± 0,006	0,11 ± 0,04	Anaeróbica - <i>glovebox</i>

d) Inibição enzimática de LmFH-2

Uma busca na literatura revelou que as moléculas de succinato e malonato eram conhecidos como inibidores competitivos das FHs da classe II (Massey, 1953). Baseada nesta informação, resolvemos testar o papel destas moléculas em membros da classe I, utilizando a LmFH-2 como modelo. Foram realizados estudos de atividade enzimática em condições anaeróbicas (*glovebox* MBraun) e os valores de IC₅₀ contra LmFH-2 foram determinados para as moléculas de malonato e succinato para os dois sentidos da reação (**Tabela 6**). Ainda que fracos inibidores, principalmente o succinato, os resultados obtidos são coerentes com as observações obtidas através dos nossos estudos estruturais (descrita em detalhes na seção 3.2.8.1. (d) e (e)), em que as estruturas cristalográficas de LmFH-2 em complexo com malonato e succinato revelam a presença destes ligantes no sítio ativo da proteína.

Os estudos de inibição para a FH de coração de porco (classe II) também sugerem que o malonato e o succinato podem ser considerados fracos inibidores para a classe II das FHs, uma vez que os valores de K_i reportados foram altos para os dois inibidores: K_i = 52 mM para succinato e K_i = 40 mM para malonato para ambos os substratos (fumarato e malato) (Massey, 1953).

Tabela 6. Parâmetros de inibição para LmFH-2

Enzima	Substrato	IC ₅₀ malonato (mM)	IC ₅₀ succinato (mM)	Condição de reação
LmFH-2	S-Malato	9,8 ± 0,3	42,6 ± 2,7	Anaeróbica - <i>glovebox</i>
LmFH-2	Fumarato	5,6 ± 0,3	72,2 ± 8,9	Anaeróbica - <i>glovebox</i>

3.2.7 Cristalização

3.2.7.1. Cristalização de LmFH-2

a) LmFH-2

Os primeiros experimentos de cristalização da LmFH-2 foram realizados utilizando o método da matriz esparsa em condições de anaerobiose obtidas com o uso do *glovebox*. Os experimentos foram realizados no robo Mosquito (ttplabtech) utilizando a solução de proteína em tampão 50 mM tris pH 8,5 e 150 mM NaCl na concentração de 9 mg/ml. Uma análise cuidadosa dos primeiros experimentos revelou que um grande número de gotas apresentava grande quantidade de precipitados, não sendo possível assim, visualizar nenhuma condição de cristalização promissora (**Figura 13 (A)**). Na tentativa de minimizar a precipitação da amostra, hipotetizamos que a grande maioria dos precipitados poderia ser consequência da instabilidade da amostra proteica, talvez induzida pela tendência a agregação como previamente visto nos experimentos de filtração em gel e espalhamento dinâmico de luz. Uma análise do conteúdo de estrutura primária para LmFH-2, que revelou a presença de 13 resíduos de cisteína, sugeriu a possibilidade de que a instabilidade poderia ser consequência de agregação induzida pela interação não desejada entre as cisteínas intermoleculares. Sendo assim, foram realizados novos ensaios com a proteína na presença de 1 mM de DTT, em que foi rapidamente possível identificar a presença de cristais na condição de cristalização E11 do PEG/Ion Screen HT (4% (v/v) tacsimato pH 5, 12% (m/v) PEG 3.350) (**Figura 13 (B)**). Os cristais surgiram após 1 dia da realização do experimento. Esses resultados indicaram que o DTT foi fundamental para a cristalização de LmFH-2. O DTT é usado para proteger centros metálicos da oxidação (Doukov *et al.*, 2008), e neste caso, também poderia evitar o pequeno grau de agregação da proteína possivelmente causado pela presença de cisteínas livres.

Uma vez obtidos os primeiros cristais de LmFH-2, uma varredura minuciosa em torno dos parâmetros envolvidos nas condições de cristalização foi realizada. Foram variadas as concentrações de tacsimato pH 5 e de PEG 3.350, duas temperaturas (ambiente e a 4 °C) foram testadas, tacsimato 4% foi preparado em diferentes pHs (4, 7 e 8) e diferentes PEGs: 1.000, 1.500, 3.350, 4.000, 6.000, 8.000, 10.000 e 20.000 foram testados. Os resultados indicaram que LmFH-2 cristalizava entre 2-8% de tacsimato pH 5 e 10-18% de PEG 3.350, sendo que os melhores cristais, de tamanho adequado para a coleta, surgiram entre 2 e 4% de tacsimato em pH 5, 12 e 14% PEG 3.350 e a temperatura ambiente. Além disso, a variação de pH mostrou que a cristalização da proteína LmFH-2 é favorecida em torno do pH 5. Os experimentos com PEG em diferentes tamanhos indicaram que LmFH-2 cristalizava em uma

ampla faixa de PEGs 6, 8, 10 e 20 k (10 a 18%). No entanto, os cristais obtidos nas diferentes condições cresciam na forma de *clusters* (**Figura 14 (A)**). Na tentativa de otimizar as condições de cristalização para obter cristais maiores e isolados foram realizados inúmeros experimentos de cristalização, em que foram testadas as técnicas de *microseeding*, cristalização na presença de óleo e aditivos na gota. Os melhores resultados foram obtidos em tacsinato 4% pH 5 e PEG 3.350 12% com a combinação de *microseeding* (solução *seed* diluída 60 e 120X) e etanol (2,7%) na gota como aditivo (**Figura 14 (B)**). A técnica de cristalização na presença de óleo (silicone e parafina) não se mostrou eficiente para o crescimento isolado dos cristais, isto é, para a obtenção de monocristais.

Figura 13. Cristalização de LmFH-2 na condição E11 do PEG/Ion Screen HT (4% (v/v) tacsinato pH 5, 12% (m/v) PEG 3.350). **(A)** Gota com proteína precipitada observada nos ensaios de cristalização da LmFH-2 a 9 mg/mL em tampão 50 mM tris pH 8,5, 300 mM NaCl. **(B)** Cristais obtidos com a proteína a LmFH-2 a 8,6 mg/mL em tampão 50 mM tris pH 8,5, 300 mM NaCl, 1 mM DTT. As imagens foram tiradas com o microscópio CrysCam (Alfa Biotech).

Figura 14. Cristais de LmFH-2 em 4% (v/v) tacsinato pH 5 e 12% (m/v) PEG 3.350. **(A)** Cristais de LmFH-2 na forma de complexos. **(B)** Cristais isolados de LmFH-2 obtidos através da combinação de *microseeding* e etanol 2,7%.

Outra estratégia utilizada para otimizar os cristais de LmFH-2 foi a cocrystalização com os substratos através da incubação da proteína com 5 mM de malato ou fumarato. Os

melhores cristais foram obtidos em tacsinato 4% pH 5, PEG 3.350 12%, com a proteína incubada com fumarato ou malato, e usando a técnica de *microseeding* combinada com aditivo na gota (etanol 2,7%) (**Figura 15**). Esse resultado associado ao fato da proteína cristalizar apenas em tacsinato, que contém o substrato malato, sugere que a presença do substrato é importante para estabilizar a proteína auxiliando no processo de cristalização.

Figura 15. Cristal de LmFH-2 (8,7 mg/mL incubada com fumarato 5 mM) obtido em tacsinato 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.

b) Cocrystalização de LmFH-2 com malato

Como a condição de cristalização de LmFH-2 é composta por tacsinato, que contém o substrato (malato) e os inibidores (malonato e succinato) de LmFH-2, a primeira estrutura de LmFH-2 foi resolvida em complexo com malato (sítio ativo) e malonato (interface do dímero). No entanto, estávamos interessados também em obter a estrutura da proteína em complexo apenas com o substrato malato. Para isso foi preparada uma solução adaptada de tacsinato^s, em que o malonato e o succinato foram removidos, em pH 5.

Os experimentos de cristalização foram realizados variando a concentração de tacsinato^s pH 5 e PEG 3.350, com e sem etanol 2,7% na gota, e através da combinação das técnicas de *microseeding* e aditivo na gota (etanol). Os resultados indicaram que o complexo LmFH-2-malato cristalizava em todas as condições testadas, mas os melhores cristais, com dimensões adequadas para a coleta de dados, foram obtidos em tacsinato^s 4%, PEG 3.350 12% usando *microseeding* e etanol como aditivo (**Figura 16**).

Figura 16. Cristal do complexo LmFH-2-malato (4,75 mg/mL) obtido em tacsinato^s 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.

c) Cocrystalização de LmFH-2 com fumarato

Na busca por uma estrutura de LmFH-2 em complexo com fumarato foi preparada uma solução de tacsimatoss (com fumarato substituindo o malato e succinato) em pH 5. Os experimentos de cocrystalização com fumarato foram realizados variando a concentração de tacsimatoss pH 5 e PEG 3.350, e através da combinação das técnicas de *microseeding* e aditivo na gota (etanol). Os resultados indicaram que o complexo LmFH-2-fumarato cristalizava entre 2-4% tacsimatoss pH 5 e 10-18% PEG 3.350, mas os melhores cristais, com dimensões adequadas para a coleta de dados, foram obtidos em tacsimatoss 4% pH 5 e PEG 3.350 12% usando *microseeding* e etanol (2,7%) como aditivo (**Figura 17**).

Figura 17. Cristal do complexo LmFH-2-fumarato (5 mg/mL) obtido em tacsimatoss 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.

d) Cocrystalização de LmFH-2 com malonato

Na busca por uma estrutura de LmFH-2 em complexo com malonato foi preparada uma solução de tacsimatoss (sem malato e succinato) em pH 5. Os experimentos de cocrystalização com malonato foram realizados variando a concentração de tacsimatoss pH 5 e PEG 3.350. Os resultados indicaram que o complexo LmFH-2-malonato cristalizava em todas as condições testadas, mas os melhores cristais, com dimensões adequadas para a coleta de dados, foram obtidos em tacsimatoss 4% pH 5, PEG 3.350 12% usando *microseeding* e etanol 2,7% como aditivo na gota (**Figura 18**).

Figura 18. Cristal do complexo LmFH-2-malonato (4,7 mg/mL) obtido em tacsimatoss 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.

e) Cocrystalização de LmFH-2 com succinato

Na busca por uma estrutura de LmFH-2 em complexo com succinato foi preparada uma solução de tacsinato[£] (sem malato e malonato) em pH 5. Os experimentos de cocrystalização com succinato foram realizados variando a concentração de tacsinato[£] pH 5 e PEG 3.350. Os resultados indicaram que o complexo LmFH-2-succinato cristalizava em tacsinato[£] 2 e 4% pH 5 e PEG 3.350 12-16%. No entanto, os melhores resultados foram obtidos em tacsinato[£] 4% pH 5, PEG 3.350 12% usando *microseeding* e etanol 2,7% como aditivo na gota. Os poucos cristais obtidos apresentaram pequenas dimensões (**Figura 19**).

Figura 19. Cristal do complexo LmFH-2-succinato (4,75 mg/mL) obtido em tacsinato[£] 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.

f) Cristalização de LmFH-2 na forma holo

Como a condição de cristalização original é composta por tacsinato, que contém o substrato (malato) e os inibidores (malonato e succinato) de LmFH-2, para a realização dos ensaios de cristalização na forma holo foi preparada uma solução de tacsinato* em pH 5 sem malato, malonato e succinato.

Os experimentos iniciais foram realizados variando a concentração de tacsinato* pH 5 e PEG 3.350, com e sem etanol 2,7% na gota. Os resultados indicaram que a LmFH-2-holo (9,5 mg/mL) cristalizava em tacsinato* 4% e PEG 3.350 14% na ausência de etanol na gota, e em tacsinato* 2 e 4% e PEG 3.350 12 - 16% na presença de etanol. Sendo assim, os experimentos de *microseeding* combinados com etanol como aditivo e óleo (silicone e parafina) no poço foram realizados na melhor condição de cristalização (tacsinato* 4%, PEG 3.350 14%). Os melhores resultados foram obtidos com a combinação das técnicas de *microseeding* e aditivo, mas os poucos cristais obtidos apresentaram pequenas dimensões (**Figura 20**).

A dificuldade em obter cristais na forma holo reforça nossa hipótese de que a presença do ligante, substratos (fumarato e malato) ou inibidores (succinato e malonato), poderia estabilizar a proteína auxiliando na cristalização.

Figura 20. Cristal do complexo LmFH-2-holo (4,7 mg/mL) obtido em tacsimato* 4% pH 5, PEG 3.350 14%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.

3.2.7.2. Cristalização de LmFH-2-T467A

Os experimentos de cristalização do mutante T467A de LmFH-2 (LmFH-2-T467A) foram realizados com a proteína na forma holo e na presença dos substratos (malato e fumarato) e os inibidores (malonato e succinato). No entanto, só foram obtidos cristais nas condições descritas abaixo:

a) LmFH-2-T467A

A proteína LmFH-2-T467A cristalizou em 2 e 4% de tacsimato pH 5 e 12 – 18% de PEG 3.3350. Os melhores cristais foram obtidos em tacsimato 4% pH 5, PEG 3.350 12% utilizando a técnica de *microseeding* combinada com aditivo na gota (etanol 2,7%) (**Figura 21**).

Figura 21. Cristal de LmFH-2-T467A (4,7 mg/mL) em 4% (v/v) tacsimato pH 5 e 12% (m/v) PEG 3.350, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.

b) Cocrystalização de LmFH-2-T467A com malato

A proteína LmFH-2-T467A (incubada com 5 mM de malato) cristalizou na presença de 2 e 4% de tacsimato^s pH 5 e 14 – 18% de PEG 3.3350, mas os cristais obtidos apareciam na forma de *clusters* de agulhas e não apresentaram dimensões adequadas para a coleta de dados. Neste caso, a combinação das técnicas de *microseeding* e aditivo na gota (etanol) não resultou em cristais do mutante LmFH-2-T467A em complexo com malato.

c) Cocrystalização de LmFH-2-T467A com fumarato

A proteína LmFH-2-T467A (incubada com 5 mM de fumarato) cristalizou em 4% de tacsinato[#] (com fumarato e sem malato, malonato e succinato) pH 5 e 14 – 18% de PEG 3.350. Os melhores cristais foram obtidos em tacsinato[#] 4% pH 5, PEG 3.350 14 e 16% e usando a técnica de *microseeding* combinada com aditivo na gota (etanol 2,7%) (**Figura 22**).

Figura 22. Cristal de LmFH-2-T467A-fumarato (4,7 mg/mL) obtido em tacsinato[#] 4% pH 5, PEG 3.350 14%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.

d) Cocrystalização de LmFH-2-T467A com malonato

A proteína LmFH-2-T467A cristalizou em 2 e 4% de tacsinato^c (sem malato e succinato) pH 5 e 12 – 18% de PEG 3.3350. Os melhores cristais foram obtidos na presença de tacsinato^c 4% pH 5, PEG 3.350 12%, utilizando a técnica de *microseeding* combinada com aditivo na gota (etanol 2,7%) (**Figura 23**).

Figura 23. Cristal de LmFH-2-T467A-malonato (4,7 mg/mL) obtido em tacsinato^c 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7% usando a técnica de *microseeding*.

3.2.8 Determinação das estruturas

3.2.8.1. Determinação da estrutura de LmFH-2

O sucesso na obtenção de cristais da enzima LmFH-2 foi dependente do uso do tampão tacsinato, cuja composição inclui a presença do substrato malato e dos inibidores malonato e succinato. Sendo assim, durante a realização dos nossos experimentos de cristalização foram feitas uma série de experimentos na tentativa de obter a proteína na forma holo e na presença dos substratos malato e fumarato e dos inibidores malonato e succinato. Com este intuito, como descrito anteriormente, varias foram as combinações do tacsinato testadas. Dos inúmeros experimentos de cristalização e de coleta de dados realizados, apenas quatro estruturas independentes foram obtidas: LmFH-2 em complexo com malato e malonato (LmFH-2-malato-malonato) resolvida a 2,05 Å de resolução, LmFH-2 em complexo com malato (LmFH-2-malato) resolvida a 2,1 Å de resolução, LmFH-2 em complexo com malonato (LmFH-2-malonato) resolvida a 2,1 Å de resolução e LmFH-2 em complexo com succinato (LmFH-2-succinato) resolvida a 2,6 Å de resolução.

a) LmFH-2-malato-malonato

Os primeiros cristais de LmFH-2 que cresceram na presença de tacsinato 2% pH 5 e PEG 3.350 14% foram submetidos a experimentos de difração de raios-X. Explorando a presença do complexo Fe-S presente na LmFH-2, a coleta de dados foi realizada explorando a borda experimental do átomo de Fe ($\lambda = 1,7399\text{\AA}$) com o objetivo de resolver a estrutura através da técnica de dispersão anômala em um único comprimento de onda (SAD). Foram coletados dois conjuntos de dados na borda do átomo de Fe ($\lambda = 1,7399\text{\AA}$), que foram processados e integrados usando o programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997). A análise dos dados de difração de cada conjunto sugeriu um sinal anômalo fraco, impossibilitando o faseamento. Resolvemos então testar a estratégia de mergear os conjuntos na tentativa de melhorar a estatística dos dados (Liu, Zhang e Hendrickson, 2011). Sendo assim, os dois conjuntos de dados provenientes de diferentes cristais foram escalonados e promediados (dataset1-2) até 2,7 Å. Os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na **Tabela 7**.

O sinal anômalo obtido com a promediação dos conjuntos de dados permitiu a determinação da estrutura de LmFH-2, a primeira estrutura da classe 1 das FHs a ser determinada, através da utilização da técnica de SAD explorando o sinal anômalo do átomo de ferro do complexo [4Fe-4S] da proteína. O programa AutoSol (PHENIX) (Adams *et al.*, 2010) foi utilizado para encontrar as posições dos átomos de Fe, fasear, construir e refinar um

modelo preliminar de LmFH-2 (LmFH-2-SAD). Os resultados do modelo inicial indicaram a presença de 8 átomos de Fe e um átomo de S (Cys) com figura de mérito de 0,368 e R-factor = 0,2809.

A análise do mapa de densidade eletrônica confirmou a presença da estrutura dimérica com um complexo [4Fe-4S] por monômero. Estes resultados estruturais preliminares estavam de acordo com a nossa proposta inicial utilizada para explicar os dados de EPR, em que o sinal [3Fe-4S] observado era consequência da oxidação do cluster. Essa susceptibilidade da LmFH-2 à presença de oxigênio é uma assinatura para proteínas da classe 1 das FHs (Shibata, Gardiner e Schwartzbach, 1985; Luqueromero e Castillo, 1991; Flint, Emptage e Guest, 1992; Vankuijk *et al.*, 1996).

Durante o refinamento da estrutura foram identificadas regiões de densidade eletrônica associadas à presença de ligantes, em particular no sítio ativo, onde a densidade eletrônica sugeria a presença do substrato malato, presente na condição de cristalização, ligado ao complexo [4Fe-4S]. No entanto, a baixa resolução dos dados não permitia a determinação inequívoca do tipo de ligante presente na estrutura. Vários esforços foram realizados na tentativa de melhorar a resolução dos dados de difração, fundamental não só para a construção do modelo proteico, mas também para a identificação da identidade correta do ligante no sítio ativo. Como melhor resultado de nossos esforços, obtivemos um novo conjunto de dados coletado (dataset3) a 2,05 Å de resolução, cujo cristal foi obtido na presença de tacsinato 4% pH 5, PEG 3.350 12%, etanol 2,7%, usando a técnica de *microseeding*, utilizando a solução de proteína a 8,7 mg/ml previamente incubada com fumarato 5 mM (**Figura 15**).

O faseamento dos dados LmFH-2 a 2,05 Å foi realizado por técnicas de substituição molecular (MR), usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de águas) da estrutura dimérica preliminar obtida através do refinamento dos dados anômalos (LmFH-2-SAD). O modelo foi refinado contra o conjunto de dados a 2,05 Å. A qualidade do mapa final de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, com σ igual a 1,5, está representada na **Figura 24**. As estatísticas de processamento de dados e refinamento estão sumarizadas na **Tabela 7**.

O modelo final para LmFH-2 corresponde a um dímero contendo os resíduos Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸, e Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Ser³⁸⁶ a Ala⁵⁶⁸, respectivamente, e ligam um complexo [4Fe-4S] por cadeia. Os 27 resíduos do N-terminal (Met¹ a Ala²⁷) e os resíduos Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁴ (cadeia A) e Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁵ (cadeia B) foram excluídos da estrutura devido à falta de densidade eletrônica interpretável. O modelo final de LmFH-2 (**Figura 25**) contém duas cadeias polipeptídicas A e B, dois complexos [4Fe-4S], 4 moléculas de malato, 4 moléculas de malonato, 8 moléculas de glicerol, uma molécula de PEG e 772 moléculas de solvente

identificadas como oxigênio da água. As coordenadas da estrutura LmFH-2 foram depositadas no banco de dados PDB (Protein Data Bank) com o código de acesso **4LOZ**.

Figura 24. Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, com σ igual a 1,5 para a estrutura de LmFH-2 a 2,05 Å de resolução. A molécula de malato está ligada ao cluster [4Fe-4S], identificado por asteriscos verdes (S) e cinzas (Fe).

Figura 25. Figura em estéreo do dímero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). As cadeias A e B estão representadas em rosa e azul, respectivamente, os complexos [4Fe-4S] em amarelo, as moléculas de malato em laranja, as moléculas de malonato em verde, as moléculas de glicerol em ciano e a molécula de PEG em vermelho.

A análise da densidade eletrônica da estrutura de LmFH-2 a 2,05 Å confirmou a presença do substrato malato ligado ao complexo [4Fe-4S] (**Figuras 24**). O malato se encontra posicionado de forma a permitir a interação direta do mesmo com o complexo [4Fe-4S] (**Figura 24**), apoiando a hipótese de que a catálise depende da interação com o complexo

[4Fe-4S] durante a catálise. Os dados estruturais, corroborados com os dados cinéticos, validam o papel do complexo [4Fe-4S] para a catálise.

Uma análise detalhada do mapa de densidade eletrônica da estrutura de LmFH-2 também revelou a presença da molécula de malonato, presente no tacsinato da condição de cristalização, na interface dimérica da proteína.

Com o objetivo de obter a estrutura de LmFH-2 em complexo com fumarato também foram realizados experimentos de cocrystalização com fumarato, na ausência de malato e succinato. O melhor conjunto de dados foi obtido a 2,65 Å de resolução e os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na **Tabela 7**. A estrutura de LmFH-2-fumarato foi resolvida por substituição molecular (MR), usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de águas) da primeira estrutura dimérica de LmFH-2 (LmFH-2-SAD). No entanto, a análise do mapa de densidade eletrônica revelou a presença do substrato malato no sítio ativo (**Figura 26**), consequência da hidratação da molécula de fumarato, reação esta catalisada pela enzima. Foram feitos alguns ciclos iniciais de refinamento, sem adição de solvente, e as estatísticas preliminares estão representadas na **Tabela 7**. Como foi encontrada a molécula de malato ligada à proteína, os passos seguintes de refinamento não foram realizados, uma vez que já havia sido obtida uma estrutura do complexo LmFH-2-malato-malonato a mais alta resolução.

Figura 26. Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, identificando a molécula de malato presente na estrutura resolvida a partir da cocrystalização com fumarato.

b) LmFH-2 em complexo com malato (LmFH-2-malato)

A primeira estrutura de LmFH-2 foi determinada em complexo com malato (sítio ativo) e malonato (interface dimérica). No entanto, buscamos a determinação da estrutura da

LmFH-2 apenas em complexo com o substrato para de avaliar as possíveis variações estruturais causadas pela presença dos outros ligantes da interface dimérica. Como estratégia de cristalização, ambos os inibidores malonato e succinato foram retirados do tacsinato e dessa forma os cristais de LmFH-2 (LmFH-2-malato) foram obtidos por cocristalização apenas com malato (**Figura 16**). O melhor conjunto de dados foi obtido a 2,1 Å de resolução. Os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na **Tabela 7**.

A estrutura de LmFH-2-malato foi resolvida por substituição molecular (MR), usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de água) da primeira estrutura dimérica de LmFH-2 (LmFH-2-SAD). A qualidade do mapa final de densidade eletrônica $2F_0-F_c$, com σ igual a 1,5, está representada na **Figura 27**. As estatísticas de refinamento estão sumarizadas na **Tabela 7**. A análise do mapa de densidade eletrônica revelou a presença do substrato malato ligado ao complexo [4Fe-4S] (**Figura 27**).

O modelo dimérico final contém as cadeias polipeptídicas A e B que consistem dos resíduos Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸, e Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Ser³⁸⁶ a Ala⁵⁶⁸, respectivamente, e ligam um complexo [4Fe-4S] por cadeia. Os 27 resíduos do N-terminal (Met¹ a Ala²⁷) e os resíduos Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁴ (cadeia A) e Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁵ (cadeia B) foram excluídos da estrutura devido à falta de densidade eletrônica interpretável. O modelo final de LmFH-2-malato contém duas cadeias polipeptídicas, dois complexos [4Fe-4S], 4 moléculas de malato, 3 moléculas de glicerol, uma molécula de PEG e 887 moléculas de solvente identificadas como oxigênio da água. As coordenadas da estrutura LmFH-2-malato foram depositadas no banco de dados PDB com o código de acesso 4LP3.

Figura 27. Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-malato a 2,1 Å de resolução. A molécula de malato está ligada ao cluster [4Fe-4S], identificado por asteriscos verdes (S) e cinzas (Fe).

c) LmFH-2 em complexo com malonato (LmFH-2-malonato)

Para a obtenção de cristais de LmFH-2 apenas na presença do inibidor malonato, o substrato malato e o inibidor succinato foram removidos da composição original do tacsinato. Os cristais de LmFH-2 em complexo com o inibidor malonato (LmFH-2-malonato) foram obtidos por cocrystalização (**Figura 18**), e o melhor conjunto de dados foi obtido a 2,1 Å de resolução. Os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na **Tabela 7**.

A estrutura de LmFH-2-malonato foi resolvida por substituição molecular (MR), usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de água) da primeira estrutura dimérica de LmFH-2 (LmFH-2-SAD). O conjunto de dados a 2,1 Å foi utilizado para refinar a estrutura de LmFH-2-malonato. A qualidade do mapa final de densidade eletrônica $2F_0-F_c$, com σ igual a 1,5, está representada na **Figura 28**. As estatísticas de refinamento estão sumarizadas na **Tabela 7**.

Nesta estrutura, em particular, o complexo se encontra na forma inativa de $[3Fe-4S]$, que pode ser explicada por uma possível contaminação com oxigênio durante o congelamento do cristal em nitrogênio líquido. Neste processo, tanto o transporte do nitrogênio para o *glovebox* como a evaporação do mesmo durante o processo contribui para o aumento da concentração de oxigênio no *glovebox*.

As cadeias polipeptídicas A e B consistem dos resíduos Asp²⁸ a Asp³⁷⁶ e Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸, e Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Ser³⁸⁶ a Ala⁵⁶⁸, respectivamente, e ligam um complexo $[3Fe-4S]$ por cadeia. Os 27 resíduos do N-terminal (Met¹ a Ala²⁷) e os resíduos Ile³⁷⁷ a Thr³⁸⁴ (cadeia A) e Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁵ (cadeia B) foram excluídos da estrutura devido à falta de densidade eletrônica interpretável. O modelo final de LmFH-2-malonato contém duas cadeias polipeptídicas, dois complexos $[3Fe-4S]$, 8 moléculas de malonato, 5 moléculas de glicerol, uma molécula de PEG, 2 íons Fe e 780 moléculas de solvente identificadas como oxigênio da água.

Figura 28. Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-malonato a 2,1 Å de resolução. A molécula de malonato não se liga ao cluster, que está na forma oxidada $[3Fe-4S]$. Os átomos de S e Fe do cluster estão identificados por asteriscos verdes e cinzas, respectivamente.

d) LmFH-2 em complexo com succinato (LmFH-2-succinato)

Para a obtenção dos cristais de LmFH-2 em complexo com o inibidor succinato (LmFH-2-succinato), ambos o substrato malato e o inibidor malonato foram removidos da composição original do tacsinato (**Figura 19**). O melhor conjunto de dados foi obtido a 2,6 Å de resolução. Os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na **Tabela 7**.

A estrutura de LmFH-2-succinato foi resolvida por substituição molecular (MR), usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de água) da primeira estrutura dimérica de LmFH-2 (LmFH-2-SAD). A qualidade do mapa final de densidade eletrônica $2F_0 - F_c$, com σ igual a 1,5, está representada na **Figura 29**. As estatísticas de refinamento estão sumarizadas na Tabela 7.

A análise do mapa de densidade eletrônica confirmou a presença da molécula de succinato ligada ao complexo [4Fe-4S] (**Figura 29**). As cadeias polipeptídicas A e B consistem dos resíduos Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸, e Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Ser³⁸⁶ a Ala⁵⁶⁸, respectivamente, e ligam um complexo [4Fe-4S] por cadeia. Os 27 resíduos do N-terminal (Met¹ a Ala²⁷) e os resíduos Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁴ (cadeia A) e Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁵ (cadeia B) foram excluídos da estrutura devido à falta de densidade eletrônica interpretável. O modelo final de LmFH-2-succinato contém duas cadeias polipeptídicas, dois complexos [4Fe-4S], 2 moléculas de succinato, 2 moléculas de glicerol, uma molécula de PEG e 482 moléculas de solvente identificadas como oxigênio da água.

Figura 29. Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0 - F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-succinato a 2,6 Å de resolução. A molécula de succinato está ligada ao cluster [4Fe-4S], identificado por asteriscos verdes (S) e cinzas (Fe).

e) LmFH-2 na forma holo (LmFH-2-holo)

Os cristais de LmFH-2 na forma holo (LmFH-2-holo) foram obtidos por cristalização na ausência de malato, malonato e succinato, moléculas presentes na condição de

cristalização inicial (**Figura 20**). O melhor conjunto de dados foi obtido a 3,6 Å de resolução. Os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na Tabela 7.

Inúmeras tentativas de resolução da estrutura de LmFH-2-holo foram realizadas utilizando a técnica de substituição molecular, sem sucesso. Foram utilizados como modelo de busca as coordenadas (excluindo as moléculas de água) da primeira estrutura dimérica de LmFH-2 (LmFH-2-SAD), assim como parte do modelo (domínios N e C-terminais).

Várias foram as nossas hipóteses para o insucesso na determinação da estrutura. Inicialmente nos preocupamos com a qualidade dos dados e os dados foram processados inúmeras vezes. Ao contrário de todos os conjuntos de dados obtidos, o processamento do conjunto de dados obtido para a proteína na ausência de ligantes indica uma mudança no tamanho do eixo cristalográfico b. Este resultado nos levou a questionar o grupo espacial, considerando que a mudança no tamanho do eixo deveria acompanhar uma mudança de simetria ao longo do mesmo eixo. Além disso, a baixa qualidade dos dados não nos permitia observar o padrão de extinção sistemática esperado para o grupo espacial $P2_12_12_1$. Por essa razão nossa busca por substituição molecular foi realizada não somente no grupo espacial $P2_12_12_1$, comum às outras estruturas, mas também utilizando diferentes subgrupos.

O insucesso na resolução da estrutura na forma holo nos leva a reforçar a hipótese de que o sucesso da cristalização da LmFH-2 depende da presença de ligantes no sítio ativo e/ou na interface dimérica e que portanto a estrutura holo deve apresentar uma conformação ou mobilidade diferente da encontrada nas estruturas resolvidas com ligantes (malato, malonato e succinato). No momento, novos experimentos de coleta de dados estão sendo programados para a realização de uma nova coleta de dados explorando a borda do átomo de Fe para a determinação da estrutura LmFH-2-holo utilizando técnicas *ab initio*.

Tabela 7. Dados cristalográficos de LmFH-2

Conjunto de dados	LmFH-2-SAD Dataset1-2	LmFH-2 - Dataset3 (código PDB 4LOZ)	LmFH-2-malato (código PDB 4LP3)	LmFH-2-fumarato	LmFH-2-malonato	LmFH-2-succinato	LmFH-2-holo
Cocrystalização	Malato, Malonato, e Succinato	Fumarato, Malato, Malonato e Succinato	Malato	Fumarato	Malonato	Succinato	-
Ligante presente na proteína	Malato	Malato e Malonato	Malato	Malato	Malonato	Succinato	-
Comprimento de onda (Å)	1,7399	0,9795	0,9795	0,9795	0,9795	0,9795	0,9795
Grupo espacial	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Parâmetros de rede (Å)	a = 65,754 b = 85,665 c = 241,622	a = 65,675 b = 85,128 c = 241,476	a = 65,613 b = 84,682 c = 239,660	a = 66,219 b = 85,094 c = 240,038	a = 65,577 b = 85,103 c = 240,229	a = 65,521 b = 84,841 c = 240,842	a = 66,172 b = 159,401 c = 238,630
Intervalo de resolução (Å)	50 – 2,70	200 – 2,05	50 – 2,10	50 – 2,65	50 – 2,10	50 – 2,6	50 – 3,60
Reflexões únicas	36042	83691	71010	40381	79305	41730	30108
Multiplicidade	6,6 (5,1)	5,5 (5,4)	5,5 (5,4)	5,9 (5,9)	6,3 (5,8)	3,7 (3,8)	6,1 (5,8)
Completeza (%)	94,9 (70,2)	98,1 (97,9)	98,1 (96,1)	94,7 (87,8)	99,9 (99,9)	98,8 (99,6)	97 (92,3)
I/σ(I)	21 (3,7)	16,5 (2,8)	10 (2)	10,8 (2,1)	10,9 (2,3)	8,2 (2,3)	5,9 (2,3)
R_{sym}^a (%)	9,1 (36,7)	11,4 (41)	11,7 (43,2)	11,7 (60,9)	12,1 (54,8)	11,7 (43,6)	19,1 (52,6)
Moléculas na unidade assimétrica	2	2	2	2	2	2	2
V_M (Å ³ . Da ⁻¹)	2,7	2,96	2,56	2,60	2,58	2,57	2,42
Conteúdo de solvente (%)	53,8	58,46	51,97	52,71	52,29	52,23	49,18
Refinamento							
R_{work} (%)	16,3	14,4	13,9	18,2	14,3	15,5	-
R_{free} (%)	20,9	17,7	18,0	22,1	17,7	19,4	-
Fator de temperatura (Å ²)	51,2	29,1	20,2	37,3	23,7	29,31	-
r.m.s.d. de distância de ligações (Å)	0,013	0,010	0,009	0,011	0,008	0,007	-
r.m.s.d. de ângulos de ligação (°)	1,314	1,066	1,106	1,378	1,082	0,804	-
<i>Ramachandran</i> ^b							
Regiões favoráveis (%)	95,85	97,36	97,28	95,19	97,36	96,98	-
Regiões permitidas (%)	3,4	2,64	2,72	3,86	2,64	3,02	-
Regiões não permitidas (%)	0,75	0,00	0,00	0,94	0,00	0,00	-

^a $R_{\text{sym}} = \sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum I_{\text{obs}}$, onde $\langle I \rangle$ é a média das intensidades calculada a partir das observações para as reflexões relacionadas por simetria.

^b A distribuição dos ângulos torsionais no diagrama de Ramachandran foi calculada com o programa MolProbity (Chen *et al.*, 2010).

Dados a mais alta resolução estão representados entre parênteses.

3.2.8.2. Determinação da estrutura de LmFH-2-T467A

As estruturas cristalográficas LmFH-2-malato-malonato, LmFH-2-malato, LmFH-2-malonato e LmFH-2-succinato foram utilizadas para dar início aos nossos estudos de mapeamento do mecanismo catalítico utilizado pela LmFH-2. Como veremos em uma descrição detalhada do sítio ativo (seção 3.2.9.3.), o resíduo Thr⁴⁶⁷ foi identificado como importante para a estabilização do complexo proteína-substrato e em nossa hipótese para descrever o mecanismo catalítico, esse resíduo teria um papel importante como doador ou aceptor de prótons.

Para testar nossas hipóteses o mutante LmFH-2-T467A foi construído, caracterizado cineticamente (seção 3.2.6.(c)) e a estrutura cristalográfica determinada na presença de diferentes ligantes: LmFH-2-T467A em complexo com malonato (LmFH-2-T467A-malonato) resolvida a 2,18 Å de resolução e LmFH-2-T467A em complexo com malato resolvida a 2,5 Å de resolução.

a) LmFH-2-T467A-malonato

Os cristais de LmFH-2-T467A foram obtidos na presença de tacsinato 4% pH 5, PEG 3.350 12% utilizando a técnica de *microseeding* combinada com aditivo na gota (etanol 2,7%) (Figura 21). O melhor conjunto de dados (LmFH-2-T467A-malonato) foi obtido a 2,18 Å de resolução. Os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na **Tabela 8**.

A estrutura de LmFH-2-T467A-malonato foi resolvida por técnicas de substituição molecular usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de água) da estrutura dimérica de LmFH-2 (LmFH-2-SAD). A qualidade do mapa final de densidade eletrônica $2F_0 - F_c$, com σ igual a 1,5, está representada na **Figura 30**. As estatísticas de refinamento estão sumarizadas na **Tabela 8**.

A análise do mapa de densidade eletrônica revelou a presença da molécula de malonato no sítio ativo (**Figura 30**), assim como na interface dimérica. Este resultado é diferente do encontrado para LmFH-2 nativa que sob as mesmas condições de cristalização sempre apresenta o substrato malato no sítio ativo (**Figura 24**). A presença do malonato no sítio ativo do mutante LmFH-2-T467A, quando o experimento é realizado na presença dos três ligantes, malato, malonato e succinato, sugere que a mutação desfavorece a interação da proteína com o substrato malato, favorecendo a seletividade pelo inibidor malonato. Esses resultados corroboram com os obtidos em nossos experimentos de cinética enzimática (seção 4.6 (c)), na qual observamos que a mutação Thr476Ala induziu uma grande perda na atividade da enzima e sugere que o resíduo Thr467 pode ter um papel importante na seletividade do ligante.

Figura 30. Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0 - F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-T467A em complexo com malonato a 2,18 Å de resolução. O cluster [4Fe-4S] está identificado por asteriscos verdes (S) e cinzas (Fe).

As cadeias polipeptídicas A e B consistem dos resíduos Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸, e Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Ser³⁸⁶ a Ala⁵⁶⁸, respectivamente, e ligam um complexo [4Fe-4S] por cadeia. Os 27 resíduos do N-terminal (Met¹ a Ala²⁷) e os resíduos Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁴ (cadeia A) e Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁵ (cadeia B) foram excluídos da estrutura devido a falta de densidade eletrônica interpretável. O modelo final de LmFH-2-T467A contém duas cadeias polipeptídicas, dois complexos [4Fe-4S], 6 moléculas de malonato, 2 moléculas de glicerol e 667 moléculas de solvente identificadas como oxigênio da água.

Experimentos de cocristalização do mutante LmFH-2-T467A apenas com malonato, na ausência de malato e succinato, também foram realizados (**Figura 23**), e o melhor conjunto de dados (LmFH-2-T467A-malonato2) foi obtido a 2,6 Å de resolução. Os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na **Tabela 8**.

A estrutura de LmFH-2-T467A-malonato2 foi resolvida por substituição molecular, usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de água) da estrutura dimérica de LmFH-2 (LmFH-2-SAD). A análise do mapa de densidade eletrônica revelou a presença da molécula de malonato no sítio ativo (**Figura 31**). Foram realizados alguns ciclos iniciais de refinamento, sem adição de solvente, e as estatísticas preliminares estão representadas na **Tabela 8**. Como foi encontrada a molécula de malonato no sítio ativo, os passos seguintes de refinamento não foram realizados, uma vez que já havia sido obtida uma estrutura de LmFH-2-T467A em complexo com malonato a mais alta resolução.

Figura 31. Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-T467A-malonato.

b) LmFH-2-T467A em complexo com malato (LmFH-2-T467A-malato)

Os cristais da proteína LmFH-2-T467A (incubada com 5 mM de fumarato) foram obtidos em 4% de tacsimato[#] (fumarato, malonato e succinato) pH 5, PEG 3.350 14 e 16% usando a técnica de *microseeding* combinada com aditivo na gota (etanol 2,7%) (**Figura 22**), e o melhor conjunto de dados (LmFH-2-T467A-malato) foi obtido a 2,5 Å de resolução. Os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na **Tabela 8**.

A estrutura de LmFH-2-T467A-malato foi resolvida por substituição molecular, usando como modelo as coordenadas (excluindo as moléculas de água) da estrutura dimérica de LmFH-2 (LmFH-2-SAD). A qualidade do mapa final de densidade eletrônica $2F_0-F_c$, com σ igual a 1,5, está representada na **Figura 32**. As estatísticas de refinamento estão sumarizadas na **Tabela 8**.

As diferenças estruturais entre a molécula de fumarato e de malato nos permitiu determinar univocamente a presença da molécula de malato no sítio ativo (**Figura 32**), embora o cristal tenha sido obtido por cocrystalização com fumarato. Estes resultados, em combinação com os dados cinéticos, demonstram que embora a mutação T467A reduza significativamente a velocidade da reação enzimática, a conversão de fumarato em malato ainda pode ser observada.

As cadeias polipeptídicas A e B consistem dos resíduos Asp²⁸ a Pro³⁷⁵ e Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸ e ligam um complexo [4Fe-4S] por cadeia. Os 27 resíduos do N-terminal (Met¹ a Ala²⁷) e os resíduos Asp³⁷⁶ a Thr³⁸⁴ foram excluídos da estrutura devido à falta de densidade eletrônica interpretável. O modelo final de LmFH-2-T467A-malato contém duas cadeias polipeptídicas, dois complexos [4Fe-4S], 2 moléculas de malato, 3 moléculas de glicerol, uma molécula de PEG e 639 moléculas de solvente identificadas como oxigênio da água.

Figura 32. Figura do contorno do mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ (azul), com σ igual a 1,5, para LmFH-2-T467A em complexo com malato a 2,5 Å de resolução. O cluster $[4Fe-4S]$ está identificado por asteriscos verdes (S) e cinzas (Fe).

Tabela 8. Dados cristalográficos de LmFH-2-T467A

Conjunto de dados	LmFH-2-T467A	LmFH-2-T467A-malato	LmFH-2-T467A-malonato2
Cocrystalização	Malato, Malonato, e Succinato	Fumarato	Malonato
Ligante presente na proteína	Malonato	Malato	Malonato
Comprimento de onda (Å)	0,9795	0,9795	0,9795
Grupo espacial	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Parâmetros de rede (Å)	a = 65,652 b = 84,938 c = 240,202	a = 65,617 b = 84,720 c = 239,674	a = 65,817 b = 85,044 c = 240,646
Intervalo de resolução (Å)	50 – 2,18	50 – 2,50	50 – 2,60
Reflexões únicas	69927	46637	38498
Multiplicidade	3,5 (3,5)	3,7 (3,7)	6,3 (6)
Completeza (%)	98,5 (99,2)	98,8 (99,7)	91,6 (88,7)
$I/\sigma(I)$	9,2 (2)	6,7 (2,1)	10,7 (2,2)
R_{sym}^a (%)	8,5 (42,9)	13,3 (45)	14,5 (63,3)
Moléculas na unidade assimétrica	2	2	2
V_M (Å ³ . Da ⁻¹)	2,58	2,56	2,59
Conteúdo de solvente (%)	52,25	52	52,52
Refinamento			
R_{work} (%)	15,35	15,97	18,68
R_{free} (%)	18,96	19,77	23,92
Fator de temperatura (Å ²)	25,53	23	39,14
r.m.s.d. de distância de ligações (Å)	0,0078	0,005	0,009
r.m.s.d. de ângulos de ligação (°)	1,134	0,700	1,291
Ramachandran ^b			
Regiões favoráveis (%)	97,16	96,60	95,57
Regiões permitidas (%)	2,84	3,40	3,58
Regiões não permitidas (%)	0,00	0,00	0,85

^a $R_{sym} = \sum |I_{obs} - \langle I \rangle| / \sum I_{obs}$, onde $\langle I \rangle$ é a média das intensidades calculada a partir das observações para as reflexões relacionadas por simetria.

^b A distribuição dos ângulos torsionais no diagrama de Ramachandran foi calculada com o programa MolProbity (Chen *et al.*, 2010).

Dados a mais alta resolução estão representados entre parênteses.

3.2.9 Análises e comparações estruturais

3.2.9.1. Descrição geral da estrutura de LmFH-2

A estrutura de LmFH-2 (dataset3) foi analisada no banco de dados PDBSum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>). Os resultados para os elementos de estrutura secundária indicaram que o monômero de LmFH-2 é composto por 23 fitas- β e 18 α -hélices, de acordo com a topologia apresentada na **Figura 33**. A análise do conteúdo de estrutura secundária indicou que o monômero é composto por 26,5% de fitas- β , 27,1% de α -hélices, 3,6% de hélice 3_{10} e 42,9% de loops e voltas. Estes resultados estão de acordo com a estimativa de conteúdo de estrutura secundária realizada por técnicas de dicroísmo circular (Feliciano *et al.*, 2012).

Figura 33. Topologia da estrutura de LmFH-2 predita pelo banco de dados PDBSum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>). As fitas- β e α -hélices estão representadas em rosa e amarelo, respectivamente. As regiões N- e C- terminais estão ilustradas em azul.

Uma vez que a estrutura cristalográfica da LmFH-2 é a primeira estrutura resolvida da classe 1 das fumarato hidratases, uma análise estrutural minuciosa foi realizada na busca por domínios conhecidos através do alinhamento 3D com estruturas de proteínas dos bancos de dados dos servidores PDBeFold (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) e DALI (Holm e Rosenstrom, 2010) (http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/).

A análise dos resultados obtidos pelo DALI sugeriu inicialmente um alinhamento estrutural com alta similaridade (Z-score = 22,8 > 2,0) entre uma região C-terminal da LmFH-2 e um modelo parcial da estrutura da fumarato hidratase de *Archaeoglobus Fulgidus* (AfFH;

código PDB: 2isb; rmsd = 2,3 Å para 173 Cα; identidade sequencial de 31%). Esses resultados sugerem que a região C-terminal da LmFH-2 (Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸) se enovela na forma de um domínio classificado pelo SCOP (Murzin *et al.*, 1995) como “swivelling” beta/beta/alfa (3 camadas: folha β/folha β/domínio α em que a folha central é composta de fitas paralelas e a outra antiparalela) (**Figura 34**). Estes domínios “swivelling”, no qual as fitas se enovelam na forma de um barril e o domínio de hélices se localiza em um dos lados, são descritos por apresentarem movimentos giratórios e são comumente encontrados em proteínas envolvidas em grandes movimentos como descrito para a proteína regulatória de ferro I (IRP1) humana (Dupuy *et al.*, 2006). A proteína regulatória de ferro I (IRP1) humana apresenta dupla função: na presença de Fe liga um complexo [4Fe-4S] e tem a função de aconitase; e na ausência de Fe liga RNA controlando a tradução de proteínas envolvidas na captação, armazenamento e utilização do ferro (Dupuy *et al.*, 2006). IRP1/aconitase é composta por 4 domínios, sendo que os domínios 3 e 4 são móveis e se abrem para ligar o RNA, quando a proteína tem função de IRP (Walden *et al.*, 2006). O domínio 4 foi classificado como “swivelling” e se assemelha estruturalmente com a região C-terminal da LmFH-2.

Para avaliar especificamente a região C-terminal, foi então realizada uma nova busca por domínios conhecidos usando como modelo apenas a região C-terminal de LmFH-2 (Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸). Os resultados indicaram, excluindo a alta similaridade já identificada para o modelo AfFH, uma baixa similaridade estrutural ($4,2 < Z\text{-score} < 2,0$) para os modelos comparados. Uma análise estrutural detalhada das estruturas mais bem ranqueadas (código do PDB: 1v7l (Yasutake *et al.*, 2004), z-score = 3,4, rmsd = 3,6 Å para 92 Cα, identidade sequencial = 8%; código do PDB: 2b3y (Dupuy *et al.*, 2006), z-score = 3,4, rmsd = 3,6 Å para 95 Cα, identidade sequencial = 11%) revelou que embora apenas 3 fitas-β e duas α-hélices se alinhem estruturalmente, esses domínios se enovelam na forma de barril β com α-hélices em um dos lados do barril e se assemelham ao encontrado para a região C-terminal de LmFH-2.

Embora os demais resultados obtidos pelo DALI indicassem uma similaridade estrutural ainda menor ($5,8 < Z\text{-score} < 2,0$) com os modelos disponíveis no banco de dados, estes sugerem que LmFH-2 pode apresentar um outro domínio classificado pelo SCOP como “FwdE/GAPDH domain-like” com arranjo α-β-α-β (3), da classe α+β, na qual as regiões de folhas e fitas estão separadas, e apresenta folhas mistas do tipo 2134, na qual a fita 2 é paralela a 1 (**Figura 35 (A)**). Para LmFH-2, esse domínio corresponderia aos resíduos Asp²⁸ a Lys²¹³ e Asp³⁴⁹ a Pro³⁷⁵. Esses resultados foram baseados, por exemplo, no alinhamento estrutural entre LmFH-2 e o fragmento (resíduos 11 a 161) de L-serina desidratase de *Legionella pneumophila* (código PDB 2iqq; Z-score = 5,4; rmsd = 2,6 Å para 98 Cα; identidade

sequencial = 13%), e D-3-fosfoglicerato desidrogenase de *Mycobacterium tuberculosis* (código PDB 1ygy (Dey, Grant e Sacchettini, 2005); Z-score = 5,8; rmsd = 3,9 Å para 102 C α ; identidade sequencial = 6%). Embora o Z-score encontrado para esses alinhamentos tenha sido baixo, a análise estrutural indicou que LmFH-2 apresenta um enovelamento semelhante ao descrito para o domínio C-terminal de 1ygy (resíduos 320 a 453) (Dey, Grant e Sacchettini, 2005), com 6 fitas β e 2 α -hélices enoveladas com arranjo alfa-beta-alfa-beta(3) (**Figura 35 (B)**).

Figura 34. (A) Representação do domínio “swivelling” beta/beta/alfa descrito por 3 camadas: folha β /folha β /domínio α que se enovelam na forma de um barril, cuja folha central é composta de fitas paralelas (em azul), a folha da extremidade é antiparalela (vermelho) e o domínio de hélices (amarelo) se posiciona separadamente. (B) Superposição entre o monômero de LmFH-2 (amarelo) (código PDB 4LOZ) e a região C-terminal de AfFH (magenta) (código PDB 2isb).

Figura 35. (A) Domínio “FwdE/GAPDH domain-like” de LmFH-2 com arranjo α - β - α - β (3), da classe α + β , na qual as regiões de hélices (verde) e fitas (vermelho) estão separadas, e apresentam folhas mistas do tipo 2134, na qual a fita 2 é paralela a 1. (B) Superposição entre os domínios “FwdE/GAPDH domain-like” de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) (laranja) e de D-3-fosfoglicerato desidrogenase de *Mycobacterium tuberculosis* (ciano) (código PDB 1ygy (Dey, Grant e Sacchettini, 2005)). Em amarelo está representado a proteína LmFH-2 e em salmon a proteína D-3-fosfoglicerato desidrogenase.

Embora os domínios N- e C-terminais se assemelhem a domínios de função conhecida, a região intermediária da sequência da proteína LmFH-2 que corresponde aos resíduos Gly²¹⁴ a Ala³⁴⁸ não apresentou similaridade estrutural suficiente para prever um enovelamento conhecido.

De acordo com os resultados apresentados, a estrutura do monômero de LmFH-2 pode ser descrita em dois domínios principais: o domínio N-terminal (Asp²⁸ a Pro³⁷⁵) e o C-terminal (Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸) (**Figura 36**), que são conectados por um *loop* (Pro³⁷⁵ a Ser³⁸⁶) que não foi modelado devido a falta de densidade eletrônica interpretável. O complexo [4Fe-4S] é estabilizado pelas cisteínas 133, 252 e 346 presentes no domínio N-terminal. Embora possamos classificar o domínio N-terminal como o domínio de ligação do complexo [4Fe-4S], o sítio ativo da proteína é constituído por resíduos localizados nos domínios N- e C-terminais.

Figura 36. Figura em estéreo do monômero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). Os dois domínios N e C-terminais estão representados em laranja e amarelo, respectivamente. Em magenta está representado o complexo [4Fe-4S] e em azul as Cys 133, 252 e 346, que ligam o complexo.

O domínio N-terminal pode ser dividido em dois subdomínios: subdomínio 1 (Asp²⁸ a Lys²¹³ e Asp³⁴⁹ a Pro³⁷⁵) e subdomínio 2 (Gly²¹⁴ a Ala³⁴⁸) (**Figura 37**). O subdomínio 1 (**Figura 38**) poderia ser descrito como composto por 11 fitas- β e 6 α -hélices, sendo que 6 fitas- β (β 1, β 4, β 5, β 8, β 9, β 15 e β 16) e 2 α -hélices (α 2 e α 5) formam o domínio similar ao “FwdE/GAPDH domain-like”, com um seguimento descontínuo entre as fitas- β 9 e 14, onde se conecta o subdomínio 2. Além disso, a análise do conteúdo de estrutura secundária em combinação com os estudos estruturais comparativos sugerem que este subdomínio descreve uma nova, ainda não descrita, subfamília da classe das proteínas alfa e beta ($\alpha+\beta$),

apresentando um domínio similar ao “FwdE/GAPDH *domain-like*”, associado a dois motivos do tipo β -hairpin ($\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 6$, $\beta 7$) e um domínio de hélices composto de três α -hélices ($\alpha 11$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$).

Figura 37. Figura do domínio N-terminal de LmFH-2 (código PDB 4LOZ), destacando os subdomínios 1 (laranja) e 2 (rosa). Em azul estão representados os resíduos Cys¹³³, Cys²⁵² e Cys³⁴⁶, que ligam o complexo [4Fe-4S] (verde).

Figura 38. Figura em estéreo do subdomínio 1 do domínio N-terminal de LmFH-2 (código PDB 4LOZ), destacando o domínio FwdE/GAPDH (azul). Em verde estão representados resíduos Gly²¹⁴ e Asp³⁴⁹, que conectam ao subdomínio 2. Em ciano está representada a Pro³⁷⁵, que é a base do loop não modelado que conecta os domínios N e C-terminais.

O subdomínio 2 (Gly²¹⁴ a Ala³⁴⁸) é composto por 5 α -hélices e 5 fitas- β , de forma que uma folha- β antiparalela formada por 4 fitas- β ($\beta 10$, $\beta 11$, $\beta 13$ e $\beta 14$), em que $\beta 10$, $\beta 11$ são paralelas, forma um sanduiche com 3 α -hélices ($\alpha 8$, $\alpha 9$ e $\alpha 10$) (**Figura 39**). Embora não tenha sido encontrado nenhuma similaridade estrutural com os domínios conhecidos no banco de dados, uma análise cuidadosa dos dados sugere que o subdomínio 2 apresenta um domínio similar ao “FwdE/GAPDH *domain-like*”.

Figura 39. Figura em estéreo do subdomínio 2 do domínio N-terminal de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). Em verde estão representados os resíduos Gly²¹⁴ e Ala³⁴⁸, que conectam ao subdomínio 1.

O domínio C-terminal (Thr³⁸⁵ a Ala⁵⁶⁸) é composto por 7 α -hélices e 7 fitas- β , formando um barril β (β 17 a β 23) com 4 α -hélices (α 13, α 15, α 16 e α 17) localizadas ao lado do barril (**Figura 40**).

Figura 40. Figura em estéreo do domínio C-terminal de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). Em ciano está representada a Thr³⁸⁵, que é a base do loop não modelado que conecta ao domínio N-terminal.

Uma análise cuidadosa da estrutura sugere que o domínio C-terminal de LmFH-2 também poderia apresentar um movimento, uma vez que está conectado ao domínio N-terminal por um loop bastante flexível, mas até o momento não sabemos se existe e qual seria a função desse movimento. Uma hipótese seria considerar que a abertura desse domínio C-terminal formaria um canal para o acesso do substrato ao sítio ativo. Esta hipótese é baseada nas informações estruturais obtidas com a determinação da estrutura cristalográfica da LmFH-2 com diferentes ligantes, em que moléculas como malato e malonato foram encontradas entre os domínios N e C-terminais (**Figura 41**), além do sítio ativo, sugerindo um possível caminho do substrato e inibidor ao sítio ativo.

Figura 41. Figura dos domínios N-terminal (laranja) e C-terminal (amarelo) de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) sugerindo o caminho do substrato malato (ciano). Em verde está representado o complexo [4Fe-4S].

Uma sobreposição de C α entre todas as estruturas de LmFH-2 resolvidas (**Tabela 9**) indicou valores de rmsd variando entre 0,117798 e 0,205334 Å. Uma análise da distribuição dos valores de rmsd para cada resíduo ao longo da sequência da proteína sugere um padrão estrutural conservado. A maior diferença foi encontrada no domínio C-terminal no resíduo Thr³⁸⁵ e entre os resíduos Phe⁵³³ e Ala⁵⁴⁰, que correspondem à regiões de loop (**Figura 42**). Este resultado também sugere que a presença dos ligantes no sítio ativo pode ser responsável por fixar o domínio C-terminal.

Tabela 9. Valores de rmsd entre as estruturas de LmFH-2 e LmFH-2-T467A

	LmFH-2 (código PDB 4LOZ)	LmFH-2-malato (código PDB 4LP3)	LmFH-2- malonato	LmFH-2- succinato	LmFH-2- T467A- malato	LmFH-2- T467A- malonato
LmFH-2 (código PDB 4LOZ)	-	0,143475 Å	0,145696 Å	0,167257 Å	0,189963 Å	0,137538 Å
LmFH-2-malato (código PDB 4LP3)	0,143475 Å	-	0,188641 Å	0,198335 Å	0,148282 Å	0,161929 Å
LmFH-2-malonato	0,145696 Å	0,188641 Å	-	0,151214 Å	0,205334 Å	0,117798 Å
LmFH-2-succinato	0,167257 Å	0,198335 Å	0,151214 Å	-	0,177068 Å	0,131355 Å
LmFH-2-T467A- malato	0,189963 Å	0,148282 Å	0,205334 Å	0,177068 Å	-	0,161374 Å
LmFH-2-T467A- malonato	0,137538 Å	0,161929 Å	0,117798 Å	0,131355 Å	0,161374 Å	-

Figura 42. Gráfico de rmsd versus número de resíduos da sequência de LmFH-2. As curvas são correspondentes a sobreposição de C α da estrutura de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) com LmFH-2-malato (código PDB 4LP3) (azul), LmFH-2-malonato (vermelho), LmFH-2-succinato (verde), LmFH-2-T467A-malato (roxo) e LmFH-2-T467A-malonato (ciano).

3.2.9.2. Análise estrutural do dímero de LmFH-2

A forma dimérica encontrada na unidade assimétrica foi previamente observada nos experimentos de caracterização biofísica e bioquímica (seções 3.2.1. e 3.2.2.). Os dois monômeros de LmFH-2 estão relacionados por um eixo de simetria não cristalográfico de ordem 2 (**Figura 25**). Uma sobreposição de C α entre os dois monômeros indicou um rmsd de 0,227081 Å.

A interface dimérica de LmFH-2 foi analisada usando o servidor PDBSum e os resultados indicaram que o dímero é estabilizado por 42 ligações de hidrogênio formadas entre os resíduos das cadeias A e B (**Tabela 10**). Uma análise detalhada da estrutura revela que nenhum resíduo do domínio C-terminal está envolvido na estabilização do dímero (**Figura 43**).

Uma análise detalhada do mapa de densidade eletrônica obtido para a estrutura LmFH-2 revelou a presença de uma molécula de malonato, presente no tacsinato da condição de cristalização, em uma região da interface dimérica, fazendo ligações de hidrogênio com os resíduos Glu²⁶⁷ (cadeia B – domínio N-terminal), Gln¹⁹⁵ e Asp¹⁹⁷ (cadeia A – domínio N-terminal) (**Figura 44**).

Esta molécula de malonato localizada na interface dimérica em um canal no topo da proteína (**Figura 45**), encontra-se distante em aproximadamente 15 Å do complexo [4Fe-4S] no sítio ativo. No entanto, na estrutura cristalográfica LmFH-2-malonato, além da interface dimérica, o malonato foi encontrado no sítio ativo, nos levando a especular se a região de interface poderia apresentar um papel importante na atividade/inibição da proteína. Até o presente momento não dispomos de evidências experimentais para levantar qualquer hipótese quanto à relevância da interface dimérica para a atividade das FH da classe I.

Tabela 10. Ligações de hidrogênio entre os monômeros A e B de LmFH-2

Monômero A						Monômero B					
Ligação de Hidrogênio	Número do átomo	Nome do átomo	Nome do resíduo	Número do resíduo	Cadeia	Número do átomo	Nome do átomo	Nome do resíduo	Número do resíduo	Cadeia	Distância
1	864	OD1	ASP	135	A	6517	NE2	HIS	334	B	2,87
2	935	NH2	ARG	145	A	5496	O	VAL	201	B	3,03
3	948	OE2	GLU	147	A	5099	N	THR	151	B	2,77
4	948	OE2	GLU	147	A	5105	N	GLY	152	B	2,79
5	978	N	THR	151	A	5069	OE2	GLU	147	B	2,89
6	984	N	GLY	152	A	5069	OE2	GLU	147	B	2,81
7	1187	O	SER	175	A	6518	N	GLY	335	B	2,84
8	1199	N	THR	177	A	6500	O	ARG	333	B	2,71
9	1202	O	THR	177	A	6497	N	ARG	333	B	3,21
10	1232	O	MET	182	A	6478	NE	ARG	330	B	3,00
11	1232	O	MET	182	A	6481	NH2	ARG	330	B	3,01
12	1265	OE1	GLU	185	A	5711	NZ	LYS	228	B	3,30
13	1265	OE1	GLU	185	A	6507	NH2	ARG	333	B	2,60
14	1266	OE2	GLU	185	A	6481	NH2	ARG	330	B	3,00
15	1266	OE2	GLU	185	A	6504	NE	ARG	333	B	2,73
16	1335	OE1	GLN	195	A	5973	OG1	THR	264	B	2,66
17	1335	OE1	GLN	195	A	5980	OG	SER	265	B	2,64
18	1336	NE2	GLN	195	A	5980	OG	SER	265	B	3,35
19	1356	O	LEU	198	A	5492	N	ALA	200	B	2,89
20	1369	N	ALA	200	A	5475	O	LEU	198	B	2,81
21	1377	O	VAL	201	A	5056	NH2	ARG	145	B	3,03
22	1508	OD1	ASN	219	A	6532	OG	SER	337	B	2,82
23	1509	ND2	ASN	219	A	6522	O	ALA	336	B	2,86
24	1522	O	ALA	221	A	5686	NE2	GLN	225	B	2,98
25	1564	NE2	GLN	225	A	5644	O	ALA	221	B	2,87
26	1852	OG1	THR	264	A	5457	OE1	GLN	195	B	2,61
27	1859	OG	SER	265	A	5457	OE1	GLN	195	B	2,74
28	1873	OE2	GLU	267	A	6049	NZ	LYS	274	B	2,84
29	1928	NZ	LYS	274	A	5994	OE2	GLU	267	B	2,88
30	2032	N	GLY	288	A	5337	O	LEU	180	B	3,28
31	2367	NE	ARG	330	A	5353	O	MET	182	B	2,99
32	2370	NH2	ARG	330	A	5353	O	MET	182	B	3,18
33	2370	NH2	ARG	330	A	5388	OE2	GLU	185	B	2,79
34	2387	N	ARG	333	A	5323	O	THR	177	B	3,23
35	2386	O	ARG	333	A	5320	N	THR	177	B	2,79
36	2393	NE	ARG	333	A	5388	OE2	GLU	185	B	2,88
37	2396	NH2	ARG	333	A	5387	OE1	GLU	185	B	2,85
38	2406	NE2	HIS	334	A	4986	OD1	ASP	135	B	2,70
39	2408	N	GLY	335	A	5308	O	SER	175	B	2,89
40	2411	O	ALA	336	A	5631	ND2	ASN	219	B	2,76
41	2421	OG	SER	337	A	5605	O	GLY	215	B	3,27
42	2421	OG	SER	337	A	5630	OD1	ASN	219	B	2,72

Figura 43. Figura em estéreo do dímero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) representando os domínios N e C-terminais em laranja e amarelo, respectivamente. Os resíduos envolvidos na dimerização são do domínio N-terminal e estão destacados em azul. O complexo [4Fe-4S] está representado em rosa.

Figura 44. (A) Figura do malonato (amarelo) na interface dimérica de LmFH-2 (código PDB 4LOZ). As cadeias A e B estão representadas em rosa e azul, respectivamente. (B) Interações entre o malonato e os resíduos das cadeias A e B. O malonato (Mla 603 (A)) está representado em roxo e as ligações de hidrogênio em verde. A figura foi gerada pelo programa LIGPLOT v.4.5.3 (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>).

Figura 45. Figura da superfície das cadeias A (rosa) e B (azul) do dímero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ), evidenciando o canal no topo da proteína onde o malonato está ligado na interface dimérica.

3.2.9.3. Sítio ativo de LmFH-2

A análise das estruturas cristalográficas da LmFH-2 na presença de diferentes ligantes permitiu identificar o sítio ativo da enzima, que se encontra localizado na interface entre os domínios N- e C-terminais e contém resíduos de ambas as subunidades A e B da proteína, demonstrando claramente a necessidade da forma dimérica para a atividade da enzima.

O sítio ativo de LmFH-2 é composto pelo complexo [4Fe-4S], por 13 resíduos (12 resíduos da cadeia A e um da cadeia B) e uma molécula de água (**Figura 46**). O domínio N-terminal da cadeia A fornece os resíduos Cys¹³³, Gln¹³⁴, Asp¹³⁵, Arg¹⁷³, Gly²¹⁶, Cys²⁵², Cys³⁴⁶, sendo que Gly²¹⁶ está localizado na α -hélice 6 e os demais resíduos em regiões de loops. As cisteínas são responsáveis por ligar o complexo Fe-S (**Figura 47 (A)**). O domínio C-terminal da cadeia A fornece os resíduos Arg⁴²¹, Thr⁴⁶⁷, Thr⁴⁶⁸, Arg⁴⁷¹ e Lys⁴⁹¹, sendo que as Arg⁴²¹ e Arg⁴⁷¹ estão localizadas nas α -hélices 13 e 15, respectivamente, e os demais resíduos em loops. O domínio N-terminal da cadeia B fornece a His³³⁴, que está localizada em um loop. Uma análise do padrão de conservação desses resíduos em outros membros da mesma classe das FHs mostrou que os 13 resíduos identificados na estrutura do complexo LmFH-2-malato são 100% conservados nas enzimas FH da classe 1 (**Figura 48**).

O substrato malato foi claramente identificado no sítio ativo da proteína LmFH-2 (dataset3) (código PDB 4LOZ), como observado no mapa de densidade eletrônica 2F_o-F_c (**Figura 24**), e se liga diretamente ao complexo [4Fe-4S] (**Figura 46**). Na **figura 47 (B)** está representado em detalhes todas as ligações de hidrogênio entre o substrato malato e a proteína, mostrando todos os átomos envolvidos.

Uma comparação entre as estrutura de LmFH-2 em complexo com o substrato malato e os inibidores malonato e succinato (**Figura 49 (A - D)**) indicaram que enquanto os ligantes malato e succinato se ligam diretamente ao Fe livre do cluster [4Fe-4S], a molécula de malonato não interage com o cluster. A superposição entre as estruturas em complexo com os ligantes malato, malonato e succinato (**Figura 49 (A)**) indica que o malato e o succinato se ligam no mesmo lugar no sítio ativo e fazem ligações de hidrogênio com os mesmos resíduos (**Figura 49 (E) e (G)**), com exceção do Asp¹³⁵ que interage com o átomo O2 do malato em LmFH-2-malato, e na estrutura LmFH-2-succinato interage com uma molécula de água que medeia a interação com o cluster [4Fe-4S] (**Figura 49 (D)**). A estrutura LmFH-2-succinato é importante porque, dada a similaridade estrutural com a molécula de fumarato, nos ajuda a compreender o mecanismo de interação com o segundo substrato, fumarato, uma vez que esta estrutura não foi possível obter. Sendo assim, a comparação estrutural entre as coordenações da proteína com o malato e o succinato nos permite observar que a molécula

de água observada na coordenação com o succinato ocupa a posição equivalente ao átomo O2 do malato em LmFH-2-malato.

Figura 46. Figura em estéreo do sítio ativo de LmFH-2 (código PDB 4 LOZ). Os resíduos das cadeias A e B estão representados em branco e azul, respectivamente. O substrato malato, complexo [4Fe-4S] e a molécula de água estão representados em verde, amarelo (S) e laranja (Fe) e ciano, respectivamente.

Figura 47. (A) Representação das ligações do cluster [4Fe-4S] (SF4 608) à proteína (Cys 133, 252 e 346) e ao substrato malato (Lmr 601). (B) Interações entre o substrato malato e a proteína. O malato (Lmr 601) está representado em roxo, o cluster [4Fe-4S] (SF4 608) em magenta (Fe) e amarelo (S), os resíduos em laranja e as ligações de hidrogênio em verde. As figuras foram geradas pelo programa LIGPLOT v.4.5.3 (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>).

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Figura 48. Alinhamento sequencial entre FHs da classe 1: LmFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania major*), LtFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania tropica*), LdFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania donovani*), LiFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania infantum*), LbFH-2 (isoforma citosólica de *Leishmania braziliensis*), TcFH-2 (isoforma citosólica de *Trypanosoma cruzi*), TbFH-2 (isoforma citosólica de *Trypanosoma brucei*), TvFH-2 (isoforma citosólica de *Trypanosoma vivax*), SpFH (*Strongylocentrotus purpuratus*), SmFH (*Schistosoma mansoni*), SjFH (*Schistosoma japonicum*), AcFH (*Acanthamoeba castellanii* str. Neff), EcFH-A (fum A de *Escherichia coli*), SeFH (*Salmonella enterica*), EnterobacterFH (*Enterobacter* sp. SST3), SbFH (*Shigella boydii*), YpFH (*Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758), RhodococcusFH (*Rhodococcus* sp. P14), LmFH-1 (isoforma mitocondrial de *Leishmania major*), LiFH-1 (isoforma mitocondrial de *Leishmania infantum*), LmxFH-1 (isoforma mitocondrial de *Leishmania mexicana*), LbFH-1 (isoforma mitocondrial de *Leishmania braziliensis*), TbFH-1 (isoforma mitocondrial de *Trypanosoma brucei*), TcFH-1 (isoforma mitocondrial de *Trypanosoma congolense*), TvFH-1 (isoforma mitocondrial de *Trypanosoma vivax*), TcFH-1 (isoforma mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*). Em rosa estão destacadas os resíduos do sítio ativo conservados entre as FHs da classe 1 e em amarelo as cisteínas que interagem o cluster [4Fe-4S].

Interessantemente, a molécula de malonato se liga de uma forma diferente ao sítio ativo, fazendo ligações de hidrogênio com os resíduos Gln¹³⁴, Arg¹⁷³, Arg⁴²¹, Thr⁴⁶⁷, Thr⁴⁶⁸ e Arg⁴⁷¹, sem se ligar ao complexo Fe-S (Figura 49 (C) e (I)). Além disso, o malonato também

ação da enzima devido à sua posição e distância do C3 do malato (3,34 Å) em uma de suas conformações. Desta forma, a Thr⁴⁶⁷ foi mutada por uma Ala (LmFH-2-T467A) e a atividade específica do mutante diminuiu aproximadamente 800 e 4.300 vezes para os substratos malato e fumarato, respectivamente, em comparação com a atividade da LmFH-2 nativa. Além disso, foram determinadas as estruturas cristalográficas de LmFH-2-T467A em complexo com o substrato malato e inibidor malonato (**Figura 49 (H) e (I)**), que mostraram que a presença da mutação T467A não altera a forma de ligação do substrato e do inibidor no sítio ativo, reforçando a hipótese de que seu papel para a catálise é mais químico do que meramente estrutural.

Outra comparação importante pode ser feita com as estruturas de LmFH-2 e LmFH-2-T467A em complexo com malonato, que apresentaram os clusters [4Fe-4S] e [3Fe-4S], respectivamente, e indicaram que não há alteração na forma de ligação do inibidor no sítio ativo, assim como não houve alteração na posição dos C α (**Figura 49 (A)**). Este resultado sugere que a oxidação no cristal do cluster [4Fe-4S], que perde um Fe e se transforma na forma inativa [3Fe-4S], não induziu nenhuma variação estrutural no posicionamento do inibidor no sítio ativo e que portanto essa diferença no posicionamento do malonato no sítio ativo em relação a posição do malato e succinato não pode estar relacionado com a oxidação do complexo [4Fe-4S]. Além disso, os resultados apresentados sugerem que o mecanismo de inibição do malonato difere do observado para o succinato (em acordo com os dados cinéticos) (**Figura 49 (C) e (D)**), uma vez que enquanto o succinato interage diretamente com o complexo [4Fe-4S], o malonato se liga à Thr⁴⁶⁷, cujos resultados sugerem ter um papel catalítico importante.

3.2.10 Proposta do mecanismo de ação da LmFH-2

Com base nas estruturas cristalográficas de LmFH-2, associada a uma análise no padrão de conservação dos resíduos encontrado em outros membros da mesma classe das FHs, foi possível identificar e propor a participação de alguns resíduos supostamente envolvidos na ligação e catálise do substrato (**Figura 48**).

Foram inicialmente identificadas as cisteínas 133, 252 e 346 que coordenam com o cluster 4Fe-4S, assim como os resíduos básicos Arg¹⁷¹, Arg⁴²¹, Arg⁴⁷¹ e Lys⁴⁹¹, que teriam o papel de posicionar o substrato de forma a permitir a interação com o cluster [4Fe-4S] e a Thr⁴⁶⁷, que devido a sua posição e distância do C3 (3,34 Å) poderia atuar com uma base ou ácido na catálise reversível de fumarato a malato.

Em nossa hipótese na reação de desidratação de malato a fumarato (**Figura 50 (A)**), o cluster [4Fe-4S] se ligaria diretamente ao grupo hidroxila do C2 através de uma interação

ácido-base de Lewis. A reação de desidratação se iniciaria com a Thr⁴⁶⁷, que atuaria como uma base, removendo o próton do C3 do malato. A eliminação do grupo OH do C2 do malato seria favorecida com o auxílio do resíduo Asp¹³⁵, que atuaria como um ácido, protonando a hidroxila do C2 do malato para ser eliminada na forma de água, com a consequente formação da dupla ligação entre C2 e C3. Já na reação de catálise no sentido inverso, a reação de hidratação do fumarato a malato (**Figura 50 (B)**), o mesmo Asp¹³⁵ poderia atuar como uma base removendo um próton da molécula de água com a consequente formação de um grupo hidróxido que atacaria o C2 do fumarato. O resíduo Thr⁴⁶⁷ poderia atuar como um ácido doando um próton para o C3 do fumarato. O cluster [4Fe-4S] poderia atuar como um ácido de Lewis para ativar o grupo hidroxila para ser eliminado ou adicionado.

Figura 50. Mecanismo proposto para as reações de desidratação de malato a fumarato (**A**) e hidratação de fumarato a malato (**B**) catalisadas pela enzima LmFH-2.

A estrutura de LmFH-2 em complexo com succinato (**Figura 49 (D)**) mimetiza a forma como o substrato fumarato poderia ligar no sítio ativo da proteína, e a presença da molécula de água coordenando com o cluster e com o Asp¹³⁵ validaria nossa hipótese do mecanismo de catálise de fumarato em malato.

Nesse modelo, a His³³⁴ teria o papel importante de atuar como ácido ou base, doando ou recebendo um próton do Asp¹³⁵. O sentido da reação seria direcionado pela ligação do substrato no sítio ativo, que causaria a remoção ou atração de solvente próximo ao sistema His³³⁴-Asp¹³⁵.

Interessados em mapear o mecanismo de catálise utilizado pelas enzimas FH da classe I e investigar nossas hipóteses sobre o mecanismo reacional, demos início aos estudos de mutação sítio dirigida através da construção do mutante LmFH-2-T467A, em que a Thr⁴⁶⁷ foi mutada por Ala. Os experimentos de atividade enzimática realizados indicaram que a atividade específica de LmFH-2-T467A diminuiu aproximadamente 800 e 4.300 vezes para os substratos malato e fumarato, respectivamente, em comparação com a atividade da LmFH-2 nativa. Além disso, a estrutura cristalográfica do mutante LmFH-2-T467A foi obtida a partir de experimentos de cocrystalização com fumarato.

De forma interessante, a análise da estrutura do complexo indicou a presença de uma molécula de malato no sítio ativo, resultado este que sugere que a proteína continua catalisando a reação de conversão do substrato fumarato em malato, ainda que muito lentamente. Além disso, a estrutura de LmFH-2-T467A em complexo com malato revelou que a presença da mutação T467A não induziu nenhuma variação estrutural significativa que pudesse justificar a perda de atividade da proteína mutante, uma vez que não é possível visualizar nenhuma variação na posição dos Ca e não houve alteração na forma de ligação do substrato/produto no sítio ativo (**Figura 49 (A), (B) e (H)**). Estes resultados juntos fortalecem a nossa hipótese que a Thr⁴⁶⁷ possa ter um papel importante para a catálise, possivelmente sendo o resíduo envolvido na adição ou remoção do próton dos substratos fumarato e malato, respectivamente. No entanto, com base na nossa hipótese para o papel da Thr⁴⁶⁷ ainda resta compreender como, ainda que muito lentamente, a catálise pode ocorrer na ausência do resíduo Thr⁴⁶⁷.

Sendo assim, em etapas futuras a este trabalho pretendemos dar continuidade ao mapeamento do papel de diferentes resíduos localizados no sítio ativo da LmFH-2, através de uma abordagem que combina técnicas de mutagênese sítio dirigida, estudos de atividade enzimática e técnicas biofísicas como ressonância paramagnética eletrônica (EPR), dicroísmo circular (CD), termofluor e cristalografia de raios-X. Nesta etapa futura pretendemos avaliar o papel dos resíduos conservados no sítio ativo não somente para a estabilidade da estrutura

da proteína, assim como para a catálise de um modo geral e para qual sentido da reação estes resíduos teriam maior influência.

3.2.11 Superfície de potencial eletrostático

A superfície de potencial eletrostático das estruturas cristalográficas dos complexos LmFH-2-malato-malonato, LmFH-2-malato, LmFH-2-malonato, LmFH-2-succinato, LmFH-2-T467A-malato e LmFH-2-T467A-malonato foi calculada usando o campo de força AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) através do servidor PDB2PQR *Version 1.8* (http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_1.8/), que utiliza o programa APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) (Baker *et al.*, 2001) (**Figura 51 (A) e (B)**).

Figura 51. (A) Superfície de potencial eletrostático da estrutura LmFH-2 (código PDB 4LOZ). (B) Superfície de potencial eletrostático da LmFH-2 (código PDB 4LOZ) mostrando a cavidade positiva formada pela junção das cadeias A e B. (C) Superfície das cadeias A (rosa) e B (azul) de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) destacando os resíduos envolvidos na formação da cavidade positiva (verde – cadeia A e amarelo – cadeia B). (D) Moléculas de malato (azul claro) e malonato (ciano) encontradas na cavidade positiva de LmFH-2.

Uma análise detalhada da superfície de potencial revelou a presença de uma cavidade carregada positivamente formada pela junção das cadeias A e B (**Figura 51 (B)**). Esta cavidade positiva é formada pelos resíduos Gly²¹⁴ a Asn²³², Thr²⁴⁶ a Ala²⁵¹, Ala³³⁶ a

Cys³³⁸, Thr⁴⁶⁸ a Asp⁴⁷³ e Lys⁴⁹¹ a Lys⁴⁹⁶ das cadeias A e B (**Figura 51 (C)**) e é localizada entre os domínios N- e C-terminais das duas cadeias. Uma comparação com a isoforma mitocondrial LmFH-1 revelou que apenas 8 resíduos não são conservados (**Figura 48**).

Uma hipótese da função dessa cavidade positiva na LmFH-2 seria permitir o acesso dos substratos/inibidores (carregados negativamente) ao sítio ativo, uma vez que foram modeladas nas estruturas cristalográficas moléculas de malato e malonato nesta cavidade (**Figura 51 (D)**). Além disso, essa região positiva poderia ter afinidade por outras moléculas ou proteínas com cargas negativas, favorecidas ainda mais pela possibilidade de que a região associada ao domínio C-terminal pode apresentar mobilidade. Uma hipótese seria que a LmFH-2 poderia se ligar à moléculas de DNA ou RNA, o que abre novas perspectivas de estudo para o nosso trabalho de mapeamento da função das FHs de um modo geral e em particular em *Leishmania major*.

3.2.12 Análise do fator de temperatura da LmFH-2

Uma análise da distribuição do fator de temperatura ao longo da sequência da proteína LmFH-2 (código PDB 4LOZ) indica que há uma diferença entre os domínios N- e C-terminais, sendo que o C-terminal apresentou um fator de temperatura maior, sugerindo a sua possível mobilidade. O domínio N-terminal, responsável pela dimerização da proteína, se mostrou mais rígido apresentando um baixo fator de temperatura (**Figura 52**). O fator de temperatura global da estrutura da proteína LmFH-2 foi determinado em 29,1 Å.

Uma análise detalhada mostrou que há diferenças no fator de temperatura entre as cadeias A e B, principalmente entre a α -hélice 13 (Arg⁴²¹ a Asn⁴³⁴) do domínio C-terminal de cada cadeia (**Figura 52 (A)**). A α -hélice 13 da cadeia A apresentou um fator de temperatura maior do que a da cadeia B, sugerindo que na cadeia A esta α -hélice poderia apresentar uma flexibilidade maior. A análise do empacotamento cristalino mostrou que na cadeia B a α -hélice 13 estaria em contato com outras moléculas da proteína impedindo sua possível mobilidade (**Figura 53 (B)**), enquanto na cadeia A esta α -hélice não apresentaria os mesmos contatos cristalinos, o que possibilitaria seu possível movimento (**Figura 53 (A)**).

Figura 52. (A) Estrutura do dímero de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) colorida de acordo com o fator de temperatura. No círculo preto em destaque está representada a α -hélice 13 (Arg⁴²¹ a Asn⁴³⁴) do domínio C-terminal de cada cadeia. (B) Gráficos da distribuição do fator de temperatura em função do número de resíduos da sequência da proteína para as cadeias A e B.

Figura 53. Representação em C α da estrutura de LmFH-2 (código PDB 4LOZ) destacando os contatos cristalinos da α -hélice 13 do domínio C-terminal das cadeias A (A) e B (B). Em azul, rosa e cinza estão representadas as cadeias A, B e as moléculas de proteína relacionadas por simetria, respectivamente.

3.2.13 Simulação de dinâmica molecular

Os experimentos de simulação de dinâmica molecular foram realizados para investigar detalhes do comportamento dinâmico da proteína LmFH-2, em especial do domínio C-terminal. Os resultados apresentados neste trabalho são preliminares, obtidos por uma simulação de 25 ns, mas já nos fornecem informações importantes do comportamento dinâmico da proteína.

A análise do gráfico de rmsd em função do tempo simulado (**Figura 54**) indica que as maiores deformações estruturais foram encontradas no domínio C-terminal. Como o domínio N-terminal não apresentou deformações estruturais significativas, os nossos resultados sugerem que as deformações estruturais da proteína (global) são referentes apenas ao domínio C-terminal. Baseado no perfil de rmsd, nossos resultados indicaram que mesmo com tempo de simulação de 25 ns foi possível observar modificações estruturais na proteína LmFH-2.

Figura 54. Representação gráfica da deformação estrutural (rmsd) ao longo do tempo simulado (25 ns) para a proteína LmFH-2 inteira (global - preto), domínio N-terminal (vermelho) e C-terminal (azul).

Os resultados da simulação indicaram que há um movimento do domínio C-terminal da proteína (**Figura 55 (A) a (F)**). Esta mobilidade estaria relacionada com a abertura e fechamento do *loop* (Pro³⁷⁵ a Ser³⁸⁶) que conecta os dois domínios N- e C-terminais da proteína LmFH-2. A análise da superfície de potencial eletrostático das estruturas simuladas indicou que a abertura do domínio C-terminal causa uma mudança na distribuição de carga negativa da proteína (**Figura 55 (H) a (K)**) ao comparar com a proteína no tempo zero de simulação (**Figura 55 (G)**). Esta diferença na carga negativa estaria relacionada com o movimento do *loop* que conecta os domínios N- e C-terminais da cadeia oposta. A análise da

Figura 55. Representação das estruturas de LmFH-2 simuladas por dinâmica molecular ((C) a (F)) e suas respectivas superfícies de potenciais eletrostáticos ((G) a (P)). A estrutura representada em verde (B) corresponde ao tempo zero de simulação, em rosa claro a 17 ns de simulação (C), em rosa escuro a 7,65 ns de simulação (D), em amarelo a 13,6 ns de simulação (E) e em azul a 6 ns de simulação (F). No painel (A) está representada a superposição entre as estruturas no tempo zero (B) e nos diferentes tempos de simulação ((C) a (F)).

cavidade positiva formada pela junção das cadeias A e B da proteína mostrou que com a abertura do domínio C-terminal há um aumento nessa cavidade expondo a superfície positiva (**Figura 55 (L) a (P)**). Estes resultados corroboram com nossa hipótese de que a proteína LmFH-2 poderia ligar moléculas como DNA/RNA, uma vez que o movimento do domínio C-terminal associado à exposição da cavidade positiva poderiam contribuir para a interação desses ligantes.

Uma análise detalhada da flexibilidade do domínio C-terminal indicou o deslocamento dos elementos de estrutura secundária (**Figura 56**), mas o movimento da α -hélice 13 (Arg⁴²¹ a Asn⁴³⁴) nos chamou atenção, uma vez que nossas análises do fator de temperatura da estrutura cristalográfica de LmFH-2 também sugeriram uma maior flexibilidade dessa α -hélice. Os experimentos de simulação de dinâmica molecular mostraram que a α -hélice 13 se deslocou aproximadamente 36° da sua posição na estrutura cristalográfica.

Figura 56. Figura em estérico da superposição da estrutura de LmFH-2 no tempo zero de simulação (verde) e após 6 ns de simulação (azul), mostrando o movimento do domínio C-terminal. Em destaque está representado o ângulo de abertura (35,7°) da α -hélice 13 do domínio C-terminal.

Sendo assim, nossos resultados de simulação associados às evidências do fator de temperatura da estrutura cristalográfica sugerem que o domínio C-terminal pode apresentar uma mobilidade. A função desta mobilidade ainda não é totalmente compreendida por nós, mas nossas evidências sugerem que a abertura do domínio C-terminal poderia facilitar o acesso do substrato ao sítio ativo. Como o resíduo Arg⁴²¹ pertence a α -hélice 13 e é um dos resíduos do sítio ativo responsável por posicionar o substrato de forma a permitir a interação

com o cluster [4Fe-4S] e a Thr⁴⁶⁷, uma hipótese seria que a α -hélice 13 se abriria para permitir a entrada do substrato e em seguida fecharia de forma a posicionar o substrato para a catálise. O mesmo fenômeno ocorreria com a Arg⁴⁷¹ da α -hélice 15, que também apresentou uma mudança de conformação (**Figura 56**), assim como para os demais resíduos do domínio C-terminal (Thr⁴⁶⁷, Thr⁴⁶⁸ e Lys⁴⁹¹) que estão em regiões de *loop* e interagem com o substrato no sítio ativo.

3.3. CONCLUSÕES

- ✓ A expressão a 18 °C e a purificação por cromatografia de afinidade da proteína LmFH-2 e do mutante LmFH-2-T467A foram realizadas com sucesso.
- ✓ Os resultados de DLS e de cromatografia por exclusão molecular indicaram que a proteína LmFH-2 se encontra majoritariamente na forma dimérica, que é a forma oligomérica esperada para FHs da classe I.
- ✓ Experimentos de dicroísmo circular para LmFH-2 indicaram que a proteína apresenta um conteúdo de estruturas secundárias em cerca de 28% de α -hélices e 26% de folhas β .
- ✓ Os estudos de desnaturação térmica por CD mostraram que a proteína perde totalmente o conteúdo de estrutura secundária a partir de 70 °C. A desnaturação térmica de LmFH-2 foi irreversível. A temperatura de desnaturação da proteína foi estimada em 57,7 °C.
- ✓ Os espectros de EPR da proteína LmFH-2 mostraram um sinal característico de um complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$. O complexo $[4\text{Fe-4S}]^+$ não foi detectado por EPR.
- ✓ A enzima recombinante LmFH-2 apresenta atividade catalítica e é inativada na presença de oxigênio.
- ✓ O pH ótimo da enzima LmFH-2 para os dois sentidos da reação (fumarato $\rightarrow$ malato e malato $\rightarrow$ fumarato) foi determinado em torno de 9.
- ✓ Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{\max}$ para LmFH-2 em condições aeróbicas e anaeróbicas indicaram que os valores de K_m são similares, enquanto a velocidade de reação aumenta significativamente em condições anaeróbicas.
- ✓ A atividade específica do mutante LmFH-2-T467A é aproximadamente 800 e 4.300 vezes menor para os substratos malato e fumarato, respectivamente, quando comparada com a proteína LmFH-2. Estes resultados sugerem que a Thr⁴⁶⁷ pode ser considerada um resíduo catalítico atuando como ácido ou base no mecanismo de ação da enzima LmFH-2.
- ✓ As moléculas malonato e succinato inibiram a atividade da proteína LmFH-2, mas os valores de IC_{50} sugerem que esses compostos são fracos inibidores.
- ✓ As proteínas LmFH-2 e LmFH-2-T467A foram cristalizadas com sucesso em 4% de tacsinato pH 5 e 12% de PEG 3,350. Os melhores cristais foram obtidos através da combinação das técnicas de *microseeding* e aditivo na gota (etanol).

- ✓ A estrutura de LmFH-2 foi resolvida por SAD. LmFH-2 representa a primeira estrutura da classe 1 das FHs a ser resolvida.
- ✓ A estrutura de LmFH-2 foi resolvida em complexo com o substrato malato e os inibidores malonato e succinato: LmFH-2-malato-malonato, LmFH-2-malato, LmFH-2-malonato e LmFH-2-succinato.
- ✓ A estrutura do mutante LmFH-2-T467A foi resolvida em complexo com malato e malonato: LmFH-2-T467A-malato e LmFH-2-T467A-malonato.
- ✓ A análise estrutural de LmFH-2 revelou que a proteína pode ser dividida em 2 domínios (N- e C-terminal) e sugere que o modelo cristalográfico obtido descreve um novo enovelamento.
- ✓ O dímero de LmFH-2 é estabilizado por ligações de hidrogênio entre os domínios N-terminais das cadeias A e B.
- ✓ O sítio ativo da proteína é composto por resíduos pertencentes aos domínios N- e C-terminais das cadeias A e B.
- ✓ O complexo [4Fe-4S] se liga à 3 cisteínas (Cys¹³³, Cys²⁵² e Cys³⁴⁶) do domínio N-terminal.
- ✓ O substrato malato, assim como os inibidores malonato e succinato, interage com resíduos dos 2 domínios da proteína e pode ter um papel de estabilizar o domínio C-terminal, que pode apresentar a característica de mobilidade.
- ✓ A molécula de malonato, além do sítio ativo, também foi identificada na interface dimérica da proteína, nos levando a especular se a região de interface poderia apresentar um papel importante na atividade/inibição da proteína. Até o presente momento não dispomos de evidências experimentais para levantar qualquer hipótese quanto à relevância da interface dimérica para a atividade das FH da classe I.
- ✓ A mutação da Thr⁴⁶⁷ por Ala não alterou a forma de ligação do malato e do malonato no sítio ativo da proteína.
- ✓ Com base nas estruturas cristalográficas de LmFH-2 e LmFH-2-T467A propomos o mecanismo de ação das FHs da classe I. Em nossa hipótese, o cluster [4Fe-4S] funcionaria como um ácido de Lewis e os resíduos Thr⁴⁶⁷ e Asp¹³⁵ seriam os resíduos catalíticos doando ou abstraindo um próton.
- ✓ A análise da superfície de potencial eletrostático da LmFH-2 indicou a presença de uma cavidade carregada positivamente formada pela junção das cadeias A e B. Uma hipótese da função dessa cavidade seria permitir o acesso dos substratos/inibidores (carregados negativamente) ao sítio ativo, uma vez que foram modeladas moléculas de malato e malonato nesta cavidade.

- ✓ Os estudos de simulação de dinâmica molecular associados às análises estruturais e do fator de temperatura da estrutura cristalográfica de LmFH-2 sugerem que o domínio C-terminal pode apresentar uma mobilidade, abrindo e fechando, de forma a permitir o acesso do substrato ao sítio ativo.
- ✓ Os estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais apresentados neste trabalho têm nos permitido dar início aos estudos do mecanismo de ação das FHs da classe 1, usando a proteína LmFH-2 como modelo. E acreditamos que as nossas descobertas contribuirão significativamente para a compreensão da função das FHs no metabolismo intermediário do parasita *Leishmania*, assim como para a validação da FH como um alvo para o planejamento de fármacos antileishmania.

4. LmFH-1

Fumarato hidratase de *Leishmania major*
codificada pelo gene LmjF24.0320

4. FUMARATO HIDRATASE DE *Leishmania major* CODIFICADA PELO GENE LMJF24.0320 (LmFH-1)

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. Clonagem e expressão

O gene LmjF24.0320 que codifica a isoforma mitocondrial de fumarato hidratase em *Leishmania major*, LmFH-1, foi clonado no vetor de expressão pET28a (Novagen). A proteína LmFH-1 foi expressa em fusão com uma cauda de histidina (6XHis) na região N-terminal (Feliciano *et al.*, 2012).

Os experimentos de expressão para a proteína LmFH-1 foram realizados em *E. coli* BL21(DE3) e T7 Express (C2566 - New England BioLabs). Uma colônia de *E. coli* contendo o plasmídeo recombinante de LmFH-1-pET28a foi utilizada para inocular 10 ml de meio *Luria-broth* (LB) suplementado com kanamicina 30 µg/ml e incubado sob agitação de 190 rpm por 16 h a 37 °C. A cultura foi diluída na proporção 1:100 em 1 l de meio LB contendo kanamicina 30 µg/ml e incubada a 37 °C sob agitação de 190 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. Neste momento, a expressão da proteína foi induzida com 0,25 mM de IPTG, a cultura suplementada com 2 mM de cisteína, 0,2 mg/ml de sulfato de ferro II e 0,2 mg/ml de citrato de ferro III, e mantida sob agitação de 70 rpm por 24 h a 18 °C. Após as 24 h de indução, a cultura foi dividida em dois volumes de 0,5 l e centrifugada a 4.000 x g por 10 min a 4 °C. As células foram armazenadas a -20 °C e o sobrenadante descartado.

4.1.2. Purificação por cromatografia de afinidade

A purificação da proteína LmFH-1 foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni como reportado previamente (Feliciano *et al.*, 2012).

Para a realização dos experimentos de cristalização, os ensaios de purificação foram realizados com 1 mM de DTT em todos os tampões de purificação, como descrito a seguir.

As células obtidas a partir de 0,5 l de cultura foram ressuspensas em 20 ml de tampão A (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,5, 300 mM NaCl, 1mM DTT) contendo um tablete de inibidor de protease sem EDTA (Roche). Em seguida, as células foram lisadas por sonicação por 10 min (1 s sonificado com intervalo de 2 s) em um sonicador Q700 (QSonica) com amplitude 5% e centrifugadas a 14.100 x g por 35 min a 4 °C.

O sobrenadante (extrato bruto), contendo a enzima LmFH-1, foi carregado em uma coluna com 1 ml de resina de Ni (HisTrap HP – GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada com tampão A. A coluna foi lavada com um gradiente em etapas de imidazol de 0 a 50 mM em tampão A. A enzima recombinante LmFH-1 foi eluída com tampão A contendo 100 mM de imidazol.

O grau de pureza da enzima foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (gel Mini-PROTEAN TGX - Bio-Rad). A revelação do gel foi efetuada com o corante azul de Coomassie G-250 (SimplyBlue™ SafeStain - Invitrogen). As frações eluídas foram concentradas e dialisadas em 50 mM tris pH 8,5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT usando o concentrador Ultrafree – 30 kDa (Millipore) a $2.500 \times g$ por 10 min a 4 °C. A concentração da proteína foi determinada por espectroscopia no UV a 280 nm ($\epsilon_{\text{LmFH-1}} = 42.790 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) utilizando NanoDrop 2000c.

Devido à instabilidade da atividade das FHs da classe I na presença de oxigênio (Flint, Emptage e Guest, 1992; Feliciano *et al.*, 2012), a purificação foi realizada a 4 °C em um *glovebox* (MBRAUN UNIlab), com uma atmosfera de gás nitrogênio. Todas as soluções tampões foram previamente desoxigenadas com argônio por 1 h e em seguida transferidas para o *glovebox*. Todos os materiais utilizados durante a purificação foram submetidos previamente à ciclos de vácuo e gás nitrogênio e deixados *overnight* para degaseificação no vácuo.

4.1.3. Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho

O experimento de cromatografia de filtração em gel foi realizado para a proteína LmFH-1 em um sistema de cromatografia ÄKTA *purifier*™ (GE Healthcare), utilizando a coluna Superdex™ 200 HR 10/30 (GE Healthcare). Para a purificação de LmFH-1, as frações eluídas da purificação por cromatografia de afinidade foram concentradas inicialmente e injetadas na coluna. A corrida foi realizada sob fluxo de 0,5 ml/min em 20 mM tris pH 8, 50 mM NaCl. As frações eluídas foram combinadas e concentradas utilizando o concentrador Ultrafree-30 kDa (Millipore).

4.1.4. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As medidas de DLS da enzima LmFH-1 foram realizadas no equipamento Zetasizer μV (Malvern), no Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do IFSC-USP, gentilmente cedido pelo Prof. Marcos Navarro. As medidas foram realizadas em triplicata com a proteína LmFH-1 a 4 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5 e 150 mM NaCl a 20 °C.

4.1.5. Dicroísmo circular (CD)

As medidas do conteúdo de estrutura secundária da enzima LmFH-1 foram realizadas em um espectrômetro Jasco J-715 equipado com um controlador de temperatura, no Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do IFSC-USP, através da colaboração com o Prof. Antonio José da Costa Filho. O experimento foi realizado com 0,2 mg/ml de LmFH-1 em tampão 5 mM tris pH 8,5 e 5 mM NaCl e utilizando-se cubeta de quartzo retangular de caminho óptico de 1 mm. As medidas foram realizadas na região do ultravioleta distante (195 – 250 nm) com sensibilidade igual a 100 mGraus, velocidade de varredura de 100 nm.min⁻¹, largura da banda de 2 nm e tempo de resposta de 2 s. O espectro final é resultado da média de 4 varreduras. O espectro de CD em um dado comprimento de onda foi convertido para elipticidade molar média por resíduo $[\theta]_x = (\theta_x M_0) / (10 l c)$, onde θ_x é a elipticidade observada em miligraus, M_0 é a massa média por resíduo ($M_0 = 115$), c é a concentração de proteína (mg/mL) e l é o caminho óptico (cm).

A estabilidade da proteína foi analisada através do experimento de desnaturação térmica, no qual o espectro de dicroísmo (195 – 250 nm) foi verificado para diferentes temperaturas entre 10 e 94 °C. No final da desnaturação térmica, a proteína foi resfriada a 10 °C e medida novamente para investigar se o desenovelamento da proteína era reversível ou irreversível.

4.1.6. Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

As medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica foram feitas para a caracterização do tipo de complexo Fe-S encontrado na amostra proteica. Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker ELEXSYS E580 que opera em banda X (9,5 GHz) e que está equipado com cavidade retangular. Temperaturas de He líquido (cerca de 4 K) alcançadas com a utilização de um criostato da empresa Oxford modelo ITC503 foram necessárias para que se observasse os sinais de interesse. Os parâmetros experimentais utilizados foram: potência de microonda, 10 mW; modulação do campo magnético, 2 G; frequência de modulação do campo magnético, 100 kHz. Foram realizadas medidas de EPR utilizando a proteína LmFH-1 (5,3 e 8,8 mg/mL) na forma holo, incubada na presença dos substratos fumarato (5 mM) e malato (45,45 mM) e com agente redutor (ditionito de sódio 383,3 mM) e oxidante (persulfato de amônio 45,45 mM).

4.1.7. Cristalização

Os estudos de cristalização foram realizados com a amostra proteica oriunda da construção no vetor de expressão pET28a (Novagen), no qual a proteína de interesse se encontra fusionada a cauda de histidina na região N-terminal.

Os experimentos iniciais de cristalização da proteína LmFH-1 foram realizados por um processo automático de cristalização de proteína por difusão de vapor em gota sentada (Mosquito – ttp:labtech) em um *glovebox* anaeróbico (MBRAUN UNIlab). Foram testados inicialmente os kits de cristalização Crystal Screen HT™, SaltRx HT™, Index HT™, PEG/Ion HT™ e PEGRx HT™ (Hampton Research), cada um contendo 96 condições, que são baseadas em soluções de cristalização conhecidas para macromoléculas biológicas. Os ensaios de cristalização foram realizados à temperatura ambiente com 70 µl das soluções de cristalização no reservatório. As gotas consistiram de 200 nl da solução do reservatório e de proteína resultando em um volume total da gota de 400 nl. Os experimentos de cristalização foram feitos com a proteína na forma holo (LmFH-1 a 11,2 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT) e utilizando a técnica de cocrystalização com o substrato malato (LmFH-1 a 10 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM malato) e o inibidor malonato (LmFH-1 a 10 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM malonato).

Os primeiros precipitados cristalinos foram identificados na condição D3 do Crystal Screen HT™ (2 M sulfato de amônio, 2% PEG 400 e 0,1 M HEPES pH 7,5) para os experimentos de cocrystalização com o substrato malato. Sendo assim, foram realizados ensaios iniciais de otimização das condições de cristalização em maior escala utilizando o método de difusão de vapor em gota suspensa. Estes experimentos foram realizados em um *glovebox* anaeróbico (Coy), com uma atmosfera de hidrogênio 7% e argônio 93%, variando a concentração de sulfato de amônio (1 a 2,5 M) e PEG 400 (1 a 7%), e na presença de tampões em diferentes pHs (0,1 M acetato de sódio pHs 4,5 e 5; 0,1 M bis-tris pHs 5,5 e 6,5; e 0,1 M hepes pHs 7 a 9) e PEG 200 (2 a 7%). Os ensaios de cristalização foram realizados a temperatura ambiente com 400 µl de solução de cristalização no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução de cristalização e 1 µl de solução de proteína (9,2 e 10 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM malato), resultando em um volume total da gota de 2 µl.

Para melhorar a qualidade e o tamanho dos cristais de LmFH-1, foi usada a técnica de *microseeding* de acordo com o protocolo estabelecido pela Douglas Instruments Ltd (http://www.douglas.co.uk/MMS_proc.htm). Os ensaios de *microseeding* foram realizados na melhor condição de cristalização (2 M sulfato de amônio, 5% PEG 400, 0,1 M HEPES pH

7,5) a temperatura ambiente com 400 µl de solução de cristalização no reservatório. As gotas consistiram de 1 µl de solução *seed* em diferentes diluições (1, 30, 60 e 120X) e de proteína (4,6 e 5 mg/ml em 50 mM tris pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT e 5 mM malato) resultando em um volume total da gota de 2 µl. O *microseeding* foi combinado com a técnica de cristalização na presença de óleo, em que foram testadas diferentes proporções entre óleo de parafina e silicone (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 (silicone:parafina)) sobre a solução do reservatório. O volume da mistura de óleos usado foi de 100 µl.

4.1.8. Coleta e processamento de dados

Os dados de difração de raio-X foram coletados na linha 24-ID-C do *Advanced Photon Source* (APS) em Chicago nos Estados Unidos. A coleta foi realizada em temperatura criogênica (100K), comprimento de onda (λ) igual a 0.9795Å e os dados registrados em um detector PILATUS 6M (Henrich *et al.*, 2009). O experimento de difração de raio-X foi realizado com o cristal de LmFH-1 congelado em nitrogênio líquido na presença de solução crioprotetora (0,1 M hepes pH 7,5; 2,45 M sulfato de amônio, 20% glicerol). Os conjuntos de imagens coletados foram processados e escalonados no programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997).

4.1.9. Atividade enzimática

Os estudos cinéticos foram realizados com a amostra proteica oriunda da construção no vetor de expressão pET28a (Novagen), onde a proteína de interesse se encontra fusionada a cauda de histidina na região N-terminal.

Devido à instabilidade da atividade das FHs da classe I na presença de oxigênio (Flint, Emptage e Guest, 1992), os ensaios de cinética enzimática foram realizados em condições anaeróbicas. Inicialmente, os experimentos foram realizados utilizando um "*glove bag*" (Sigma), com um fluxo de gás nitrogênio, no grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) – USP. As soluções e as cubetas foram previamente tratadas com um fluxo de nitrogênio gasoso, as cubetas seladas com uma tampa de borracha e as amostras de proteína adicionadas às soluções de atividade através de uma seringa. No entanto, essa infraestrutura ainda não era a mais adequada para a realização dos nossos experimentos, uma vez que a estimativa da quantidade de oxigênio no *glove bag*, usando um oxímetro, foi de aproximadamente 20 ppm. Além disso, não podemos descartar uma possível contaminação com oxigênio no manuseio da proteína durante a medida de atividade.

Sendo assim, novos experimentos de atividade em condições anaeróbicas (0 ppm de oxigênio) foram realizados no Massachusetts Institute of Technology (MIT), nos EUA, através da colaboração com a Profa. Dra. Catherine L. Drennan, que possui em seu laboratório a infraestrutura adequada para a realização destes ensaios. Os experimentos de atividade enzimática foram realizados em um *glovebox* em condições anaeróbicas (MBRAUN UNIlab), sob atmosfera de nitrogênio. As soluções tampões foram previamente desoxigenadas com argônio por 1 h e em seguida transferidas para o *glovebox*. Todos os materiais utilizados durante os ensaios de atividade foram submetidos previamente a ciclos de vácuo e gás nitrogênio e deixados *overnight* para degaseificação no vácuo.

Os ensaios de atividade em condições aeróbicas também foram realizados para a enzima LmFH-1 para a realização dos estudos comparatórios.

a) Cinética enzimática

Para a determinação dos parâmetros cinéticos dos dois substratos, fumarato e S-malato, os ensaios de atividade da enzima LmFH-1 foram realizados através de um ensaio espectrofotométrico que monitora a formação e o consumo de fumarato. Os experimentos foram realizados em condições aeróbicas e anaeróbicas, utilizando *glove bag* e *glovebox* (MBRAUN UNIlab), a temperatura ambiente em um espectrofotômetro Hitachi U-2800 ou USB4000 (Ocean Optics) usando o comprimento de onda de 250 nm ($\epsilon_{250\text{ nm}}^{\text{fumarato}} = 1,45 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A reação foi iniciada pela adição de LmFH-1 em uma concentração final de 10 µg/ml e 40 µg/ml à uma solução tampão 50 mM tris pH 9 e 150 mM NaCl adicionada dos substratos S-malato ou fumarato, em um volume final de 1 ml. Os ensaios foram realizados com a proteína LmFH-1 em tampão 50 mM tris pH 8,5 e 150 mM NaCl.

Os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m para os dois sentidos da reação foram determinados para os substratos S-malato e fumarato a partir da equação de Michaelis-Menten (Equação I), traçando o gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk ou através da utilização do método de regressão não linear, variando a concentração de S-malato de 0,25 a 8 mM e variando a concentração de fumarato de 0,0625 a 1 mM.

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equação I})$$

b) Inibição enzimática

Os estudos de inibição enzimática da enzima LmFH-1 foram realizados através do ensaio espectrofotométrico que monitora a formação e o consumo de fumarato. Os experimentos foram realizados em *glovebox* (MBRAUN UNIlab), com atmosfera de

nitrogênio, a temperatura ambiente em um espectrofotômetro USB4000 (Ocean Optics) usando o comprimento de onda de 250 nm ($\epsilon_{250\text{ nm}}^{\text{fumarato}} = 1,45 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A reação foi iniciada pela adição de LmFH-1 em uma concentração final de 10 µg/ml à uma solução tampão 50 mM tris pH 9 e 150 mM NaCl adicionada dos substratos (S-malato 2 mM ou fumarato 0,5 mM) e do inibidor (malonato ou succinato), em um volume final de 1 ml.

Para determinar a constante de inibição IC_{50} (concentração de inibidor que inibe 50% da atividade enzimática) foram testadas diferentes concentrações dos inibidores succinato (0 a 120 mM) e malonato (0 a 60 mM). A constante de inibição IC_{50} foi determinada ajustando os valores experimentais à equação (Jordan, Bisaha e Piccollelli, 2000):

$$v = \frac{V_o}{1 + I/IC_{50}}$$

onde v é a velocidade de inibição observada, V_o é a velocidade não inibida, I é a concentração de inibidor e IC_{50} é a concentração de inibidor que permite 50% de inibição.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2.1. Clonagem, expressão e purificação por cromatografia de afinidade de LmFH-1

A proteína LmFH-1 foi clonada no vetor de expressão pET28-a (Novagen) e expressada em *E. coli* BL21(DE3) ou T7 express (New England Biolabs). As condições de expressão foram otimizadas para os experimentos de cristalização de forma a minimizar a contaminação com oxigênio. Os ensaios de expressão de LmFH-1 foram realizados a 18 °C com 0,25 mM de IPTG por 24 horas.

A purificação da enzima LmFH-1 foi realizada com sucesso por cromatografia de afinidade em resina de Ni, utilizando um gradiente em etapas de imidazol. As lavagens da resina com 0; 25 e 50 mM de imidazol contribuíram para retirar a maioria dos contaminantes e a proteína começou eluir a partir de 100 mM de imidazol (**Figura 57**). As primeiras frações eluídas com 100 mM de imidazol apresentaram algumas bandas de contaminação, mas a partir da fração 14 (**Figura 57**) a proteína apresentou maior grau de pureza. As frações com 500 mM de imidazol apresentaram uma banda de contaminação em torno de 30 kDa.

Figura 57. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni da enzima LmFH-1. As frações 1 a 7, 8 a 16, e 17 a 23 representam as lavagens com 50 mM de imidazol, eluições com 100 e 500 mM de imidazol, respectivamente. M indica o padrão de massa molecular.

4.2.2. Purificação por cromatografia de exclusão por tamanho

Os experimentos de purificação da isoforma LmFH-1 por coluna de afinidade haviam sido anteriormente otimizados e o grau de pureza obtido bastante satisfatório para a realização dos experimentos de produção de anticorpos, localização celular, EPR, CD e atividade enzimática. No entanto, para os experimentos de cristalização, decidimos incluir uma nova etapa de purificação que consistiu na utilização de cromatografia de exclusão por tamanho. A utilização dessa estratégia tinha como meta não somente melhorar o grau de

pureza da proteína em estudo, mas também investigar o grau de oligomerização da enzima e eliminar possíveis agregados.

A cromatografia de exclusão por tamanho para LmFH-1 foi realizada em coluna Superdex™ 200 HR 10/30 (Ge Healthcare) e o perfil cromatográfico obtido (**Figura 58 (A)**) indicou a presença de um pico majoritário. A análise por SDS-PAGE (**Figura 58 (B)**) revelou a presença da proteína de interesse ao longo deste pico, assim como a presença de contaminantes.

Figura 58. (A) Perfil cromatográfico de LmFH-1 por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. A cromatografia foi realizada em tampão 20 mM tris pH 8, 50 mM NaCl. **(B)** SDS-PAGE 12% das frações eluídas por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. FH1 corresponde a proteína concentrada purificada por cromatografia de afinidade que foi aplicada na coluna Superdex. Os números (14 a 24) correspondem às frações obtidas pelo cromatograma representado em vermelho em (A).

De forma a estimar o tamanho dos oligômeros eluídos da coluna Superdex, a mesma foi previamente calibrada pela aluna de doutorado Joane K. R. Bonalumi e a função que descreve a curva de calibração da coluna determinada (**Figura 8**). A coluna foi calibrada utilizando padrões de massa molecular para proteínas de 13,7 a 440 kDa e tampão de corrida 20 mM tris pH 8 e 150 mM NaCl, similar ao utilizado em nossos experimentos. Nestes experimentos, o volume de exclusão da coluna foi estimado em 8 ml utilizando o marcador blue dextran (2000 kDa).

A análise do perfil cromatográfico obtido para LmFH-1 indicou que o pico majoritário eluiu em 8 ml, dentro do volume de exclusão da coluna. Este resultado indicou que LmFH-1 apresenta um alto estado de agregação, e nenhuma forma oligomérica dimérica esperada para classe 1 das FHs.

4.2.3. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi também utilizada para investigar o estado de agregação da proteína LmFH-1. A análise dos resultados para LmFH-1 (**Figura 59**) indicou que a amostra proteica é constituída por duas populações de tamanhos diferentes, em que 81,2% corresponde à massa molecular de 24.700 ± 4.790 kDa e 14,2% à massa molecular de 1.330 ± 563 kDa, sugerindo um alto grau de agregação da proteína. Este resultado é similar ao observado por cromatografia de exclusão molecular, que indicou alto grau de agregação e nenhuma forma oligomérica dimérica esperada para classe 1 das FHs.

Figura 59. Análise do perfil de tamanho encontrado para as amostras de LmFH-1 obtidas através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz. Nos gráficos estão representados o perfil de distribuição do tamanho (nm) em função da intensidade da luz espalhada e do volume.

4.2.4. Dicroísmo circular (CD)

O espectro de CD da enzima LmFH-1 em função da temperatura está representado na **Figura 60 (A)**. O espectro de CD foi caracterizado por duas bandas negativas em cerca de 208 e 220 nm e uma banda positiva em torno de 195 nm. O mínimo em 220 nm foi atribuído majoritariamente a transições encontradas em estruturas helicoidais, ao passo que a banda

negativa em torno de 210 nm foi provavelmente resultado de uma mistura do mínimo em 208 nm decorrente de estrutura em hélice com a banda em 215 nm oriunda de transições observadas em fitas β , o que sugeriu, portanto, uma estrutura da proteína envolvendo combinações do tipo α/β . Além disso, a intensidade comparável da banda em 208 nm, do máximo em 197 nm e do mínimo em torno de 220 nm apontaram para a existência de quantidades apreciáveis de folhas β .

A predição do conteúdo de estrutura secundária foi realizada através da desconvolução do espectro de CD de LmFH-1 utilizando o programa K2D2 (<http://www.ogic.ca/projects/k2d2/>) (Perez-Iratxeta e Andrade-Navarro, 2008). O conteúdo de estrutura secundária foi estimado a 20 °C para LmFH-1 em cerca de 29% de α -hélices e 18% de folhas β . Uma comparação com os valores estimados para LmFH-2 (28% de α -hélices e 26% de folhas β) sugeriu que as duas isoformas, embora pertencessem a classe I, apresentaram possíveis diferenças no enovelamento.

A desnaturação térmica da LmFH-1 (**Figura 60 (A)**) mostrou que a proteína perde gradualmente sua quantidade de estrutura secundária, perdendo totalmente este conteúdo a partir de 70 °C. O gráfico de elipticidade molar em função da temperatura para o comprimento de onda de 222 nm (**Figura 60 (B)**) indicou que a temperatura de desnaturação da proteína é 56,3 °C. Uma comparação com o valor da temperatura de desnaturação para LmFH-2 (57,7 °C) mostrou que as duas enzimas apresentam temperaturas de desnaturação similares e que ambas podem ser consideradas termolábeis, principalmente quando comparadas com as FHs da classe II que são consideradas termoestáveis e apresentam temperaturas de desnaturação em torno de 80 - 90 °C (Colombo *et al.*, 1994; Mizobata *et al.*, 1998).

Figura 60. Dicroísmo circular de LmFH-1. **(A)** Espectros de dicroísmo circular em diferentes temperaturas (10 a 90 °C). **(B)** Desnaturação térmica da proteína monitorada em 222 nm.

A análise do espectro da proteína resfriada a 10 °C, após o ciclo de desnaturação térmica, confirmou uma perda significativa no conteúdo de α -hélices e folhas β e um aumento no conteúdo desenovelado. Além disso, precipitados macroscópicos foram observados ao remover a amostra proteica do instrumento. Esses resultados sugeriram a desnaturação térmica irreversível da LmFH-1.

4.2.5. Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

As medidas de ressonância paramagnética eletrônica foram realizadas com a amostra proteica preparada em condições aeróbicas e anaeróbicas de forma a caracterizar o tipo de centro metálico encontrado na proteína. Em ambas condições, os espectros de EPR da proteína LmFH-1 mostraram ressonâncias na região em torno de 3.300 G de campo magnético que são características de um centro $[3\text{Fe-4S}]^+$ (**Figura 61**). Como as FHs da classe I contém um complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (silencioso ao EPR) no sítio catalítico, a presença do complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$ na proteína seria devido à oxidação pelo oxigênio do complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, que passaria para um estado de oxidação instável $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$, perderia um íon Fe^{2+} e em seguida degradaria para a forma inativa $[3\text{Fe-4S}]^+$ (Flint, Emptage e Guest, 1992; Imlay, 2006).

Figura 61. Espectros de EPR do complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$ da proteína LmFH-1 medidos a 10 K. **(A)** Espectros de LmFH-1 na forma holo (preto), incubada com ditionito de sódio (azul) e com APS (magenta). **(B)** Espectros de LmFH-1 na forma holo (azul), incubada com fumarato (preto) e malato (vermelho).

Para investigar se haveria uma fração do complexo $[4\text{Fe-4S}]^+$ na proteína foram realizados experimentos de EPR com a amostra proteica preparada no *glove bag* através da incubação com agente oxidante (persulfato de amônio - APS) e redutor (ditionito de sódio). Os resultados indicaram um aumento do sinal referente ao complexo $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ ao adicionar o APS (agente oxidante) e ausência de sinal ao incubar a proteína com ditionito de sódio

(agente redutor) (**Figura 61 (A)**), sugerindo a redução do complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$ para a forma $[3\text{Fe-4S}]^0$ (silencioso ao RPE). Nenhum sinal do complexo $[4\text{Fe-4S}]^+$ foi detectado.

A presença apenas do complexo oxidado $[3\text{Fe-4S}]^+$ na LmFH-1 em condições anaeróbicas sugeriu que as nossas condições de trabalho poderiam não ser adequadas para garantir anaerobiose. Investigamos a quantidade de oxigênio no *glove bag*, utilizando um oxímetro, e vimos que, mesmo usando uma fonte de gás nitrogênio mais pura (3 ppm de oxigênio), a quantidade de oxigênio estimada dentro do *glove bag* era de aproximadamente 20 ppm. Sendo assim, nossos resultados sugeriram que a LmFH-1 era altamente sensível ao oxigênio, uma vez que 20 ppm de oxigênio já seria suficiente para inativar a proteína.

A quantificação do espectro de EPR de LmFH-2, utilizando 1 mM Cu (II), 10 mM EDTA como padrão (Crack, Green e Thomson, 2004), indicou que apenas 10% da proteína contém o complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$, sugerindo que há uma transição entre os estados de oxidação 0 e +1 do complexo $[3\text{Fe-4S}]$, sendo o $[3\text{Fe-4S}]^0$ (silencioso ao EPR) predominante.

De forma a investigar se o substrato se ligaria ao sítio ativo mesmo com a proteína na forma inativa, ou seja, contendo o complexo $[3\text{Fe-4S}]$, foram realizadas medidas de EPR com a proteína incubada com os substratos fumarato e S-malato (**Figura 61 (B)**). Na presença dos substratos, o espectro da forma holo se alterou, sugerindo que o referido sinal poderia ser resultado da interação do substrato com o centro Fe-S localizado no sítio ativo da proteína.

Baseado em nossos resultados, como não foi possível caracterizar o *cluster* $[4\text{Fe-4S}]$ da proteína, pretendemos realizar novos experimentos de EPR preparando as amostras em condições anaeróbicas, utilizando um *glovebox* (Mbraun) que apresenta concentração de oxigênio igual a zero. Esses experimentos serão realizados em colaboração com a Profa. Catherine Drennan no Massachusetts Institute of Technology.

4.2.6. Cristalização, coleta e processamento de dados de LmFH-1

Os primeiros experimentos de cristalização da LmFH-1 foram realizados utilizando o método da matriz esparsa no *glovebox* com o robo Mosquito utilizando a proteína na forma holo e incubada com o substrato malato e o inibidor malonato.

Uma análise cuidadosa dos experimentos de cocrystalização com malato nos permitiu identificar os primeiros precipitados cristalinos na condição D3 do Crystal Screen HT™ (2 M sulfato de amônio, 2% PEG 400 e 0.1 M HEPES pH 7,5). Sendo assim, foram realizados ensaios iniciais de otimização das condições de cristalização variando a concentração de sulfato de amônio e PEG 400, e na presença de tampões em diferentes pHs (4,5 a 9) e PEG 200.

Os resultados indicaram que LmFH-1 cristalizava em 2M de sulfato de amônio e entre 4 - 5% de PEG 400 em diferentes pHs (7 a 9). Os experimentos com PEG indicaram que LmFH-1 também cristalizava em PEG 200 (4 - 5%). No entanto, os cristais obtidos nas diferentes condições apresentaram pequenas dimensões e cresciam na forma de *clusters* (**Figura 62 (A)**). Na tentativa de otimizar as condições de cristalização para obter cristais maiores e isolados foram realizados experimentos de cristalização, em que foram testadas as técnicas de *microseeding* e cristalização na presença de óleo. Os melhores resultados foram obtidos em 0,1 M de hepes pH 7,5; 2 M de sulfato de amônio e 5% de PEG 400 com a combinação de *microseeding* (solução *seed* diluída 30X) e óleo no poço (silicone:parafina na proporção 9:1) (**Figura 62 (B)**). No entanto, os cristais ainda apresentavam pequenas dimensões e os dados de difração foram coletados a baixa resolução (4,3 Å). Foram realizadas inúmeras tentativas de processamento dos dados, porém sem sucesso.

Novos experimentos de cristalização combinando *microseeding*, óleo no poço, aditivos e em diferentes temperaturas serão realizados com o objetivo de melhorar os cristais e consequentemente obter dados de difração de melhor qualidade.

Figura 62. Cristais de LmFH-1 em 2 M sulfato de amônio, 5% PEG 400 e 0.1 M hepes pH 7,5. **(A)** Cristais de LmFH-1 na forma de *clusters*. **(B)** Cristais de LmFH-1 obtidos após utilizar as técnicas de *microseeding* e óleo no poço.

4.2.7. Atividade enzimática

a) Cinética enzimática

Os experimentos de cinética enzimática da LmFH-1 foram realizados em três diferentes condições durante o desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente foram realizados ensaios de atividade em condições aeróbicas e em condições de baixa anaerobiose através da utilização de um *glove bag*, conforme dados publicados em 2012 (Feliciano *et al.*, 2012). No entanto, os resultados de EPR, conforme apresentados na seção 4.2.5, sugeriram

que as condições de purificação no *glove bag* não eram ideais, e a presença de oxigênio, ainda que em baixa concentração (20 ppm) era suficiente para oxidar o complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, presente no sítio ativo da proteína, podendo interferir na atividade catalítica da enzima. Sendo assim, diante da possibilidade de utilizarmos condições adequadas de anaerobiose (*glovebox* (Mbraun)), disponíveis no laboratório da Profa. Catherine Drennan do Massachusetts Institute of Technology, onde foi realizado o estágio de doutorado sanduíche, e da real necessidade em investigarmos a influência da oxidação do complexo $[4\text{Fe-4S}]$ para a atividade catalítica, novos experimentos de caracterização cinética foram repetidos para os dois sentidos da reação.

Os parâmetros cinéticos, $V_{\max}$ e K_m , para os substratos S-malato e fumarato foram determinados a partir da equação de Michaelis-Menten e foram comparados com os previamente obtidos conforme apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos para LmFH-1

Enzima	Substrato	K_m (mM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol/min/mg}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Condição de reação
LmFH-1	S-Malato	$1,2 \pm 0,3$	$0,50 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,14$	Aeróbica
LmFH-1	S-Malato	$2,3 \pm 0,3$	$11,8 \pm 1,2$	$12,9 \pm 1,3$	$5,6 \pm 1,3$	20 ppm O_2 - <i>glove bag</i>
LmFH-1	S-Malato	$3,7 \pm 0,2$	$92,6 \pm 2,7$	$99,2 \pm 2,9$	$26,8 \pm 2,2$	0 ppm O_2 - <i>glovebox</i>
LmFH-1	Fumarato	$1,3 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,6$	Aeróbica
LmFH-1	Fumarato	$2,5 \pm 0,4$	$26,4 \pm 4,4$	$28,3 \pm 4,7$	$11,3 \pm 3,7$	20 ppm O_2 - <i>glove bag</i>
LmFH-1	Fumarato	$1,9 \pm 0,4$	$172,0 \pm 28,6$	$184,3 \pm 30,6$	$97,0 \pm 36,5$	0 ppm O_2 - <i>glovebox</i>

A análise cuidadosa dos valores de K_m , $V_{\max}$ e k_{cat} calculados para LmFH-1 para os substratos malato e fumarato em diferentes condições de anaerobiose relevaram importantes características acerca do mecanismo da enzima LmFH-1. Inicialmente, quando comparamos os experimentos realizados na presença e ausência de oxigênio observamos valores similares para K_m , enquanto que a velocidade da reação altera significativamente. Neste sentido, o aumento na velocidade da reação e na eficiência catalítica na ausência de oxigênio está de acordo com os dados de EPR, que demonstram a susceptibilidade do complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ na presença de oxigênio e sua consequente oxidação que resulta no complexo $[3\text{Fe-4S}]^+$ não ativo. Já os valores de K_m , similares em ambas as condições, sugerem que a estabilidade do complexo proteína-substrato independe do cofator $[4\text{Fe-4S}]^+$, estando este envolvido diretamente na reação, mas não na estabilização com os substratos.

Outra análise indica um valor de K_m menor para o substrato fumarato, sugerindo um favorecimento, ainda que pequeno, no sentido da conversão de fumarato em malato, que seria o sentido de funcionamento do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Esta menor

afinidade para malato foi previamente reportada para as isoenzimas malato desidrogenase em *L. major* (Leroux *et al.*, 2006), sugerindo que a concentração desse metabólito em *Leishmania ssp.* pode ser maior em relação a concentração de fumarato.

Além disso, uma comparação com o valores de K_m reportados para LmFH-2 em condições anaeróbicas ($K_m = 1,4 \pm 0,2$ mM para fumarato e $K_m = 5,4 \pm 0,8$ mM para malato) indicaram que os valores de K_m encontrados para ambas as isoformas são similares. Nossos resultados mostraram ainda que LmFHs apresentam valores de K_m maiores dos que os reportados para outras enzimas da classe I: fumarato hidratase A de *E. coli* ($K_m = 0,6$ mM para fumarato e $K_m = 0,7$ mM para fumarato) (Flint, 1994), fumarato hidratase de *E. gracilis var. bacillaris* ($K_m = 0,031$ mM para fumarato e $K_m = 0,14$ mM para malato) (Shibata, Gardiner e Schwartzbach, 1985) e fumarato hidratase de *bacterium strain* MPOB ($K_m = 0,25$ mM para fumarato e $K_m = 2,38$ mM para malato) (Vankuijk *et al.*, 1996).

Embora qualquer correlação entre os dados cinéticos com a diferença em localização celular, disponibilidade de substratos e favorecimento no sentido da reação em *Leishmania* seja nesse momento meramente especulativo, esses resultados levantam importantes questões a serem investigadas em uma próxima etapa desse trabalho.

b) Inibição enzimática

Uma busca na literatura revelou que as moléculas de succinato e malonato eram conhecidas como inibidores competitivos das FHs da classe II (Massey, 1953). Baseada nesta informação testamos se esses compostos também poderiam inibir a atividade da LmFH-1. Sendo assim, foram realizados estudos de atividade enzimática para determinar o IC_{50} para as moléculas de malonato e succinato e os valores calculados estão representados na **Tabela 12**. Os resultados indicaram que as moléculas de malonato e succinato inibiram a atividade de LmFH-1 frente aos dois substratos: fumarato e malato.

Tabela 12. Parâmetros de inibição para LmFH-1

Enzima	Substrato	IC_{50} malonato (mM)	IC_{50} succinato (mM)
LmFH-1	Fumarato	$7,3 \pm 0,8$	$24,6 \pm 3,7$

Uma análise dos valores de IC_{50} para o succinato e o malonato sugerem que essas moléculas são fracos inibidores. O mesmo resultado foi observado para a isoforma citosólica LmFH-2.

Os valores de IC_{50} para malonato e succinato frente ao substrato malato não foram calculados, mas foi realizada uma medida da atividade da proteína na presença de 30 mM de

cada inibidor (**Figura 63**). A análise do gráfico sugere que as moléculas de malonato e succinato também inibem a atividade da enzima LmFH-1 frente ao substrato malato.

Figura 63. Curvas de atividade monitoradas pela formação de fumarato a 250 nm em condições anaeróbicas para *LmFH-1* na presença de malonato (**A**) e succinato (**B**).

4.3. CONCLUSÕES

- ✓ A expressão a 18 °C e a purificação por cromatografia de afinidade da proteína LmFH-1 foi realizada com sucesso.
- ✓ Os resultados de DLS e de cromatografia por exclusão molecular indicaram que a proteína LmFH-1 apresenta alto grau de agregação, e nenhuma forma dimérica esperada para FHs da classe I foi encontrada.
- ✓ Experimentos de dicroísmo circular para LmFH-1 indicaram que a proteína apresenta um conteúdo de estruturas secundárias em cerca de 29% de α -hélices e 18% de folhas β .
- ✓ Os estudos de desnaturação térmica por CD mostraram que a proteína perde totalmente o conteúdo de estrutura secundária a partir de 70 °C. A desnaturação térmica de LmFH-1 foi irreversível. A temperatura de desnaturação da proteína foi estimada em 56,3 °C.
- ✓ Os espectros de EPR da proteína LmFH-1 mostraram um sinal característico de um complexo [3Fe-4S]⁺. O complexo [4Fe-4S]⁺ não foi detectado por EPR.
- ✓ A enzima recombinante LmFH-1 apresenta atividade catalítica e é inativada na presença de oxigênio.
- ✓ A proteína LmFH-1 foi cristalizada com sucesso em 0,1 M hepes pH 7,5; 5% PEG 400 e 2 M de sulfato de amônio. Os melhores cristais foram obtidos através da combinação das técnicas de *microseeding* e óleo no poço.
- ✓ O conjunto de dados obtido foi coletado à baixa resolução (4,3 Å), mas não permitiu resolver a estrutura da LmFH-1.
- ✓ Os parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , para LmFH-1 em condições aeróbicas e anaeróbicas indicaram que os valores de K_m são similares, enquanto a velocidade da reação aumenta significativamente em condições anaeróbicas.
- ✓ As moléculas malonato e succinato inibiram a atividade da proteína LmFH-1, mas os valores de IC_{50} sugerem que esses compostos são fracos inibidores.

5. REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 66, p. 213-221, 2010. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273820800013 >.

ARMIJOS, R. X. et al. Field trial of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: Safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 5, p. 1352-1357, May 1998. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073521100029 >.

BAHAR, K. et al. Comparative safety and immunogenicity trial of two killed *Leishmania* major vaccines with or without BCG in human volunteers. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 489-495, Sep-Oct 1996. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VJ94600008 >.

BAKER, N. A. et al. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10037-10041, Aug 28 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170738000006 >.

BARTERI, M. et al. Low frequency ultrasound induces aggregation of porcine fumarase by free radicals production. **Biophysical Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 35-42, Sep 1 2004. ISSN 0301-4622. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223947900005 >.

BEHAL, R. H.; OLIVER, D. J. Biochemical and molecular characterization of fumarase from plants: Purification and characterization of the enzyme - Cloning, sequencing, and expression of the gene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 348, n. 1, p. 65-74, Dec 1 1997. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997YH89600008 >.

BEKKER, H. et al. GROMACS - A PARALLEL COMPUTER FOR MOLECULAR-DYNAMICS SIMULATIONS. **Physics Computing '92**, p. 252-256, 1993 1993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993BA17B00037 >.

BESTEIRO, S. et al. Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38001-38012, 2002.

BOURGERON, T. et al. Mutation of the fumarase gene in two siblings with progressive encephalopathy and fumarase deficiency. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 6, p. 2514-2518, Jun 1994. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NP57700031 >.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, Jan 7 2007. ISSN 0021-9606. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243380000005 >.

CAMPOS-NETO, A. et al. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 6, p. 4103-4108, Jun 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168784300074 >.

CHAYEN, N. E. A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger protein crystals. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, p. 198-202, Apr 1 1997. ISSN 0021-8898. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WW37700022 >.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 66, p. 12-21, Jan 2010. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273758800003 >.

COLER, R. N. et al. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral leishmaniasis by elicitation of CD4(+) T cells. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4648-4654, Sep 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249131700053 >.

COLOMBO, S. et al. MOLECULAR-CLONING, NUCLEOTIDE-SEQUENCE AND EXPRESSION OF A SULFOLOBUS-SOLFATARICUS GENE ENCODING A CLASS-II FUMARASE. **Febs Letters**, v. 337, n. 1, p. 93-98, Jan 3 1994. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NA14700019 >.

CORPET, F. MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT WITH HIERARCHICAL-CLUSTERING. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, Nov 1988. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988R135700032 >.

COUSTOU, V. et al. Fumarate is an essential intermediary metabolite produced by the procyclic *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 26832-26846, 2006.

CRACK, J.; GREEN, J.; THOMSON, A. J. Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 9278-9286, Mar 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000189265900090 >.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific LLC.

DEY, S.; GRANT, G. A.; SACCHETTINI, J. C. Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14892-14899, Apr 15 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228236800068 >.

DOUKOV, T. I. et al. Xenon in and at the end of the tunnel of bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. **Biochemistry**, v. 47, n. 11, p. 3474-3483, Mar 18 2008. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253926500018 >.

DUPUY, J. et al. Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. **Structure**, v. 14, n. 1, p. 129-139, Jan 2006. ISSN 0969-2126. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234685100015 >.

DUTHIE, M. S. et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 134-141, Jan 5 2012. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000299971800008 >.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 66, p. 486-501, Apr 2010. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275941300018 >.

FELICIANO, P. R. et al. Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Protein Expression and Purification**, v. 48, n. 1, p. 98-103, 2006. ISSN 1046-5928.

FELICIANO, P. R. et al. Fumarate hydratase isoforms of *Leishmania major*: Subcellular localization, structural and kinetic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 1-2, p. 25-31, Jul-Aug 2012. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306038600004 >.

FLINT, D. H. INITIAL KINETIC AND MECHANISTIC CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA-COLI* FUMARASE-A. v. 311, n. 2, p. 509-516, 1994. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NP63800043 >.

FLINT, D. H.; ALLEN, R. M. Iron-sulfur proteins with nonredox functions. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2315-2334, 1996. ISSN 0009-2665.

FLINT, D. H.; EMPTAGE, M. H.; GUEST, J. R. Fumarase A from *Escherichia coli*: purification and characterization as an iron-sulfur cluster containing enzyme. **Biochemistry**, v. 31, n. 42, p. 10331-10337, 1992.

GENDA, T.; WATABE, S.; OZAKI, H. Purification and characterization of fumarase from *Corynebacterium glutamicum*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 5, p. 1102-1109, May 2006. ISSN 0916-8451. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238056500006 >.

GOUET, P. et al. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305-308, Apr 1999. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000080363400006 >.

HENRICH, B. et al. PILATUS: A single photon counting pixel detector for X-ray applications. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment**, v. 607, n. 1, p. 247-249, Aug 1 2009. ISSN 0168-9002. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268987900072 >.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999. ISSN 0140-6736.

HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, Mar 2008. ISSN 1549-9618. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254277900007 >.

HOLM, L.; ROSENSTROM, P. Dali server: conservation mapping in 3D. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. W545-W549, Jul 2010. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284148900088 >.

IMLAY, J. A. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1073-1082, 2006. ISSN 0950-382X.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005. ISSN 0036-8075.

JORDAN, D. B.; BISAHA, J. J.; PICOLLELLI, M. A. Catalytic properties of dihydroorotate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: Studies on pH, alternate substrates, and inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 1, p. 84-92, Jun 1 2000. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087561100012 >.

JORGENSEN, W. L. et al. COMPARISON OF SIMPLE POTENTIAL FUNCTIONS FOR SIMULATING LIQUID WATER. **Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926-935, 1983 1983. ISSN 0021-9606. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983QZ31500046 >.

- KHALIL, E. A. G. et al. Autoclaved *Leishmania* major vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. **Lancet**, v. 356, n. 9241, p. 1565-1569, Nov 4 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165134500013 >.
- KINSELLA, B. T.; DOONAN, S. Nucleotide sequence of a cDNA coding for mitochondrial fumarase from human liver. **Bioscience Reports**, v. 6, n. 10, p. 921-929, 1986. ISSN 0144-8463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986G349400010 >.
- LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 35-46, 2007.
- LEROUX, A. et al. Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in *Leishmania* spp. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 74-85, Sep 2006. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239571600009 >.
- LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001 2001. ISSN 0948-5023. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171053900002 >.
- LINDORFF-LARSEN, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 78, n. 8, p. 1950-1958, Jun 2010. ISSN 0887-3585. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277767700012 >.
- LIU, Q.; ZHANG, Z.; HENDRICKSON, W. A. Multi-crystal anomalous diffraction for low-resolution macromolecular phasing. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 67, p. 45-59, Jan 2011. ISSN 0907-4449. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285928000006 >.
- LUQUEROMERO, M. M.; CASTILLO, F. INHIBITION OF ACONITASE AND FUMARASE BY NITROGEN-COMPOUNDS IN RHODOBACTER-CAPSULATUS. **Archives of Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 149-152, Jan 1991. ISSN 0302-8933.
- MASSEY, V. STUDIES ON FUMARASE .4. THE EFFECTS OF INHIBITORS ON FUMARASE ACTIVITY. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 1, p. 172-177, 1953 1953. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1953UB55300027 >.
- MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 14-21, Jan-Feb 2006. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235863100003 >.
- MIZOBATA, T. et al. Purification and characterization of a thermostable class II fumarase from *Thermus thermophilus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 355, n. 1, p. 49-55, Jul 1 1998. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074585300007 >.
- MOMENI, A. Z. et al. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed L-major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Vaccine**, v. 17, n. 5, p. 466-472, Feb 5 1999. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000078300800009 >.
- MURZIN, A. G. et al. SCOP - A STRUCTURAL CLASSIFICATION OF PROTEINS DATABASE FOR THE INVESTIGATION OF SEQUENCES AND STRUCTURES. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, n. 4, p. 536-540, Apr 7 1995. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QQ85600003 >.
- NOAZIN, S. et al. Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of leishmaniasis-A meta-analysis. **Vaccine**, v. 27, n. 35, p. 4747-4753, Jul 30 2009. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268827500006 >.

NOSE, S. A. **Molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble.** . Molecular Physics. 52: 255-268 p. 1984.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Macromolecular Crystallography, Pt A**, v. 276, p. 307-326, 1997 1997. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997BH42P00020 >.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, n. 7, p. 839-847, 2007. ISSN 1061-4036.

PEREZ-IRATXETA, C.; ANDRADE-NAVARRO, M. A. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **Bmc Structural Biology**, v. 8, 2008. ISSN 1471-2237. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256214700001 >.

SHARIFI, I. et al. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania* major plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. **Lancet**, v. 351, n. 9115, p. 1540-1543, May 23 1998. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073868000009 >.

SHIBATA, H.; GARDINER, W. E.; SCHWARTZBACH, S. D. Purification, characterization, and immunological properties of fumarase from *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. **Journal of Bacteriology**, v. 164, n. 2, p. 762-768, 1985.

SHIMOYAMA, T. et al. MmcBC in *Pelotomaculum thermopropionicum* represents a novel group of prokaryotic fumarases. **Fems Microbiology Letters**, v. 270, n. 2, p. 207-213, May 2007. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245674900005 >.

SUZUKI, T. et al. Rat Liver Mitochondrial and Cytosolic Fumarases with Identical Amino Acid Sequences Are Encoded from a Single Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 5, p. 2581-2586, 1989.

TAKASHIMA, E. et al. Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 189-200, 2002.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, Dec 2005. ISSN 0192-8651. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233021400004 >.

VAN VUGT-LUSSENBURG, B. M. A. et al. Identification of two 4Fe-4S -cluster-containing hydrolyases from *Pyrococcus furiosus*. **Microbiology-Sgm**, v. 155, p. 3015-3020, 2009. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270264300021 >.

VANKUIJK, B. L. M. et al. Purification and characterization of fumarase from the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. **Archives of Microbiology**, v. 165, n. 2, p. 126-131, 1996.

VELEZ, I. D. et al. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 8, p. 593-598, Aug 2005. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230292200005 >.

WALDEN, W. E. et al. Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. **Science**, v. 314, n. 5807, p. 1903-1908, Dec 22 2006. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242996800041 >.

WANG, L.; BROWN, S. J. BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. W243-W248, Jul 1 2006. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000245650200051 >.

WOODS, S. A.; SCHWARTZBACH, S. D.; GUEST, J. R. 2 biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 954, n. 1, p. 14-26, 1988.

YASUTAKE, Y. et al. Crystal structure of the *Pyrococcus horikoshii* isopropylmalate isomerase small subunit provides insight into the dual substrate specificity of the enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 344, n. 2, p. 325-333, Nov 19 2004. ISSN 0022-2836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000225123400005 >.

YOGEV, O. et al. Fumarase: A Mitochondrial Metabolic Enzyme and a Cytosolic/Nuclear Component of the DNA Damage Response. **Plos Biology**, v. 8, n. 3, Mar 2010. ISSN 1544-9173. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278125400008 >.