UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PATRÍCIA ROSA FELICIANO

**Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene
LmjF24.0320 que codifica a enzima fumarato hidratase em
*Leishmania major***

Ribeirão Preto

2009

PATRÍCIA ROSA FELICIANO

**Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene
LmjF24.0320 que codifica a enzima fumarato hidratase em
*Leishmania major***

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

Área de Concentração: Física Biológica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

Ribeirão Preto

2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Feliciano, Patrícia Rosa

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene LmjF24.0320 que codifica a enzima fumarato hidratase em *Leishmania major* / Patrícia Rosa Feliciano; orientadora Maria Cristina Nonato Costa. – Ribeirão Preto, 2009.

110 f.

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

1. *Leishmania major*. 2. Fumarato hidratase. 3. Clonagem. 4. Expressão. 5. Purificação. 6. Cinética enzimática. 7. Localização celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrícia Rosa Feliciano

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene LmjF24.0320 que codifica a enzima fumarato hidratase em *Leishmania major*

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

Área de Concentração: Física Biológica

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais,
Luiz e Fátima,
grandes incentivadores.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cristina Nonato pela dedicada orientação, confiança e amizade. Prof você é TUDO!!!

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

Ao Prof. Dr. Paul Michels pela oportunidade e por toda ajuda durante o meu trabalho na Bélgica.

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi pela colaboração nos estudos imunoquímicos.

À Profa. Dra. Eliane C. A. Braga por disponibilizar seu espaço no laboratório e pela agradável convivência.

Aos Profs. Drs. Sérgio Akira Uyemura, Gustavo Henrique Goldman, Nádia Monesi e Ana Patrícia Yatsuda Natsui por disponibilizarem seus laboratórios para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Otávio Thiemann por ceder o DNA genômico de *Leishmania major* Friedlin.

Aos pesquisadores Ney e Val por cederem o vetor pET28a imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do LCP: Aline, Camila, Cíntia, Joane, Matheus e Ricardo pelas eternas discussões científicas, pela agradável convivência e acima de tudo pela grande amizade.

À todo o pessoal do LCP e do laboratório de Toxinas Animais.

À todos os meus amigos.

Aos meus pais, meus irmãos, pela paciência e disposição sempre que precisei.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

*"Para conquistar coisas importantes,
devemos não apenas agir mas também sonhar,
não apenas planejar mas também acreditar."*

(Anatole France)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Clonagem.....	16
3.1.1. Clonagem de <i>LmFH-1</i> nos vetores de expressão pET-28a(+), pET-32a(+) e pET-42a(+)	19
3.2. Expressão	25
3.2.1 Ensaios iniciais de expressão para as construções <i>LmFH-1</i> -pET32a e <i>LmFH-1</i> -pET42a.....	25
3.2.2. Ensaios de expressão em larga escala para a construção <i>LmFH-1</i> -pET32a	26
3.2.3 Ensaios iniciais de expressão para a construção <i>LmFH-1</i> -pET28a	27
3.2.4. Ensaios de expressão em larga escala para a construção <i>LmFH-1</i> -pET28a	27
3.3. Purificação.....	27
3.3.1. Cromatografia de afinidade	27
3.4. Dosagem de <i>LmFH-1</i>	30
3.5. Análise hidrofóbica	31
3.6. Ensaios de atividade	31
3.6.1. Determinação do pH ótimo para <i>LmFH-1</i>	31
3.6.2. Cinética enzimática	32
3.7. Dicroísmo circular (CD)	33
3.8. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	33
3.9. Localização celular.....	34

3.9.1. Análises <i>in silico</i>	34
3.9.2. Estudos imunoquímicos	34
3.9.3. Estudos de localização subcelular em <i>Leishmania mexicana mexicana</i> promastigotas.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
4.1. Clonagem.....	42
4.1.1. Clonagem de <i>LmFH-1</i> nos vetores de expressão pET-28a(+), pET-32a(+) e pET-42a(+)	44
4.2. Expressão	46
4.3. Purificação.....	49
4.4. Ensaios de atividade	52
4.4.1. Determinação do pH ótimo para <i>LmFH-1</i>	53
4.4.2. Cinética enzimática	54
4.5. Dicroísmo circular (CD)	58
4.6. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	59
4.7. Localização celular.....	60
4.7.1. Estudos imunoquímicos	63
4.7.2. Estudos de localização subcelular em <i>Leishmania mexicana mexicana</i> promastigotas.....	65
5. CONCLUSÕES	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
APÊNDICE.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mosquito-palha no ato da picada	02
Figura 2	Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	03
Figura 3	Estruturas químicas dos principais fármacos empregados no tratamento da leishmaniose.....	06
Figura 4	Reação reversível de hidratação estereoespecífica catalisada pela enzima fumarato hidratase	07
Figura 5	Esquema representativo do metabolismo de energia e carboidrato em <i>T. brucei</i> na forma procíclica.....	09
Figura 6	Alinhamento seqüencial entre as isoformas LmjF24.0320 e LmjF29.1960 da enzima fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i>	11
Figura 7	Esquema do vetor da série pET	16
Figura 8	Estrutura química do IPTG	17
Figura 9	Figura ilustrativa das construções de <i>LmFH-1</i> nos vetores de expressão pET-28a(+), pET-42a(+) e pET-32a(+).	18
Figura 10	Interação entre a cauda de histidina da enzima e o Ni^{2+} da resina Ni-NTA Agarose.....	28
Figura 11	Esquema geral da purificação de <i>LmFH-1</i> por cromatografia de afinidade	29
Figura 12	Gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk.....	33
Figura 13	Mapa do vetor pTZ57R/T	43
Figura 14	Ligação do produto de PCR no vetor pTZ57R/T.....	44
Figura 15	Gel de agarose 0,8% (m/v). Amplificação do gene <i>LmFH-1</i> (LmjF24.0320) por reação de PCR a partir de DNA genômico	45
Figura 16	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Ensaio de expressão a 25°C para as construções <i>LmFH-1</i> -pET32a, <i>LmFH-1</i> -pET42a e <i>LmFH-1</i> -pET28a..	47
Figura 17	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Ensaio de expressão a 18°C para a construção <i>LmFH-1</i> -pET28a	48
Figura 18	Perfil hidrofóbico da enzima <i>LmFH-1</i>	50
Figura 19	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação na coluna de Ni da enzima <i>LmFH-1</i>	51
Figura 20	Degradação do complexo [4Fe-4S] por oxidação com oxigênio.....	52

Figura 21	Curvas de atividade em condições anaeróbicas e aeróbicas com adição de Fe^{2+} para <i>LmFH-1</i> monitorada pela formação de fumarato a 250 nm e 25°C.....	53
Figura 22	Perfil pH versus atividade específica para a enzima <i>LmFH-1</i> utilizando S-malato (a) ou fumarato (b) como substrato	54
Figura 23	Determinação de V_{max} e K_m para o substrato S-malato utilizando <i>LmFH-1</i> em tampão tris 50 mM pH 8,5, NaCl 150 mM	55
Figura 24	Determinação de V_{max} e K_m para o substrato fumarato utilizando <i>LmFH-1</i> em tampão tris 50 mM pH 8,5, NaCl 150 mM	55
Figura 25	Determinação de V_{max} e K_m para o substrato S-malato utilizando <i>LmFH-1</i> em tampão PBS pH 7,4	58
Figura 26	Determinação de V_{max} e K_m para o substrato fumarato utilizando <i>LmFH-1</i> em tampão PBS pH 7,4	58
Figura 27	Espectro de dicroísmo circular para a enzima <i>LmFH-1</i>	59
Figura 28	Alinhamento seqüencial entre as isoformas <i>LmFH-1</i> e <i>TbFHm</i>	62
Figura 29	Alinhamento seqüencial entre as isoformas <i>LmFH-2</i> e <i>TbFHc</i>	62
Figura 30	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação por cromatografia por afinidade em coluna de proteína G dos anticorpos IgG anti- <i>LmFH-1</i> (a) e anti- <i>LmFH-2</i> (b)	65
Figura 31	Anticorpo IgG.....	65
Figura 32	Esquema geral da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> mostrando as principais estruturas celulares	66
Figura 33	Gráficos de atividade enzimática para enolase (a) , hexokinase (b) e fumarase (c) a partir dos sobrenadantes obtidos por fracionamento celular com digitonina (0 a 1 mg digitonina/mg proteína) e com Triton X-100 0,1%.....	67
Figura 34	<i>Western blotting</i> com anticorpo policlonal anti- <i>LmFH-1</i> , anticorpo policlonal anti- <i>LmFH-2</i> e anticorpo anti-TIM para detectar, respectivamente, <i>LmFH-1</i> , <i>LmFH-2</i> e TIM nas frações obtidas do fracionamento de <i>L. mexicana</i> com digitonina (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mg digitonina/mg proteína – posições 1 a 8, respectivamente) e Triton X-100 0,1% (posição 9)	69
Figura 35	Imunolocalização das duas isoformas de FH em <i>L. mexicana</i> promastigotas.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene de interesse para a clonagem em vetores de expressão	19
Tabela 2	Reações de digestão com <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i>	21
Tabela 3	Reações de ligação para o vetor pET-28a(+)	22
Tabela 4	Reações de ligação para os vetores pET-32a(+) e pET-42a(+)	22
Tabela 5	Valores de K_m e V_{max} para fumarases das classes 1 e 2.....	56
Tabela 6	Valores de K_m e V_{max} para <i>LmFH-1</i> em tampões diferentes.....	57
Tabela 7	Média das medidas de absorbância a 450 nm das diluições do soro pré-imune, antes da 3ª imunização (após 30 dias da 1ª imunização), antes da 4ª imunização (após 45 dias da 1ª imunização) e anticorpo purificado para o anticorpo anti- <i>LmFH-1</i>	63
Tabela 8	Média das medidas de absorbância a 450 nm das diluições do soro pré-imune, antes da 2ª imunização (após 15 dias da 1ª imunização), antes da 3ª imunização (após 30 dias da 1ª imunização) e anticorpo purificado para o anticorpo anti- <i>LmFH-2</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
AEBSF	Fluoreto de 4-(2-amino-etil)-benzenossulfonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FH	Fumarato hidratase
FHc	Fumarato hidratase citosólica
FHm	Fumarato hidratase mitocondrial
FRD	Fumarato redutase
FRDg	Fumarato redutase glicosomal
FRDm	Fumarato redutase mitocondrial
<i>fumA</i>	Fumarase da classe I do tipo A
<i>fumB</i>	Fumarase da classe I do tipo B
<i>fumC</i>	Fumarase da classe II
GST	Glutathione S-transferase
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
His	Histidina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosídeo
kDA	Kilo Daltons
K _m	Constante de Michaelis
LB	Luria-Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
<i>LmFH</i>	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i>
<i>LmFH-1</i>	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF24.0320
<i>LmFH-2</i>	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF29.1960
<i>LmFH-1-pET28a</i>	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF24.0320 no vetor pET-28a(+)
<i>LmFH-1-pET32a</i>	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF24.0320 no vetor pET-32a(+)

<i>LmFH-1-pET42a</i>	Fumarato hidratase de <i>Leishmania major</i> codificada pelo gene LmjF24.0320 no vetor pET-42a(+)
LV	Leishmaniose visceral
Ni-NTA	Ácido nitrilotriacético
NP-40	Nonil fenoxilpolietoxiletanol
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Fosfoenolpiruvato
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	Interferência de RNA
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TbFHm	Fumarato hidratase de <i>Trypanosoma brucei</i> mitocondrial
TbFHC	Fumarato hidratase de <i>Trypanosoma brucei</i> citosólica
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
TRX	Tioredoxina
V _{max}	Velocidade máxima

RESUMO

FELICIANO, P. R. **Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene LmjF24.0320 que codifica a enzima fumarato hidratase em *Leishmania major*.** 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Leishmania é um protozoário parasito flagelado responsável pela Leishmaniose, doença que afeta 88 países, distribuídos em 4 continentes, e que causa um risco a aproximadamente 350 milhões de pessoas. Estudos recentes em tripanosomatídeos, utilizando *Trypanosoma brucei* como modelo, sugerem que as enzimas fumarato hidratase, enzimas que catalisam a hidratação reversível da molécula de fumarato em S-malato, são essenciais para sobrevivência de tripanossomatídeos. O presente projeto visou a clonagem, expressão, purificação e caracterização cinética e biofísica da enzima fumarato hidratase codificada pelo gene LmjF24.0320 de *Leishmania major*. A proteína foi expressa em bactéria e purificada por cromatografia de afinidade. Os ensaios de cinética enzimática mostram que a enzima segue o modelo de cinética de Michaelis-Menten com K_m e V_{max} de $2,7 \pm 0,5$ mM e $35,2 \pm 5,8$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para fumarato e $5,2 \pm 0,4$ mM e $11,8 \pm 0,6$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para S-malato, respectivamente. Para os estudos de localização celular foram produzidos e purificados anticorpos policlonais para as isoformas LmFH-1 e LmFH-2 de *Leishmania major* através de imunização de coelhos. A combinação de técnicas de imunofluorescência por microscopia confocal, *western blotting* e controle da atividade enzimática através fracionamento celular com digitonina nos permitiu concluir que a isoforma LmFH-1 se encontra localizada na mitocôndria do parasito, enquanto que a isoforma LmFH-2 possui dupla localização, sendo encontrada tanto no citosol quanto no glicossomo. A presença das isoformas LmFH-1 e LmFH-2 nos três compartimentos celulares: citosol, glicossomo e mitocôndria reforçam a importância da molécula de fumarato em diferentes processos celulares, e fortalecem a idéia de que a enzima fumarato hidratase pode ser considerada um potencial alvo para planejamento de fármacos anti-leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania major*, Fumarato hidratase, Clonagem, Expressão, Purificação, Cinética enzimática, Localização celular

ABSTRACT

FELICIANO, P. R. **Cloning, heterologous expression and characterization of the gene LmjF24.0320 that encodes the enzyme fumarate hydratase in *Leishmania major***. 2009. 110 f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Leishmania parasites are the casual agent of leishmaniasis, a group of disease that affects 88 countries, distributed in four continents, with 350 million people at risk of infection. Recent studies in trypanosomatids, using *Trypanosoma brucei* as a model suggest that the fumarate hydratase enzymes, which catalyze the stereospecific hydration of fumarate to malate, are essential for trypanosomatid survival. The present project focused the cloning, expression, purification and both kinetic and biophysical characterization of fumarate hydratase encoded by gene LmjF24.0320 of *Leishmania major*. The protein has been expressed in bacteria and purified by affinity chromatography. The kinetic experiments reveal that the enzyme follow the Michaelis-Menten classic model with K_m and V_{max} of $2,7 \pm 0,5$ mM and $35,2 \pm 5,8$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ for fumarate and $5,2 \pm 0,4$ mM and $11,8 \pm 0,6$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ for S-malate, respectively. For the subcellular localization studies, polyclonal antisera against both isoforms LmFH-1 e LmFH-2 of *Leishmania major* were obtained after immunization of rabbits. The combination of confocal microscopy, western blotting and enzymatic activity through cell fractionation by selective permeabilization of membranes with digitonin suggest that LmFH-1 isoform is localized to mitochondria, while the LmFH-2 isoform is found to both cytosol and glycosome. The presence of LmFH-1 and LmFH-2 isoforms at the three cell compartments: cytosol, glycosome and mitochondria strongly supports the premise that fumarate is important for many cell processes and suggests that fumarate hydratase enzyme can be considered an attractive target for the development of anti-leishmaniasis drugs.

Keywords: *Leishmania major*, Fumarate hydratase, Cloning, Expression, Purification, Kinetic, Cellular localization

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As diferentes patogenias de leishmaniose são causadas por aproximadamente 21 espécies de protozoários parasitos flagelados do gênero *Leishmania* (Herwaldt, 1999), pertencentes à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastida. Cerca de 30 espécies de insetos flebotomíneos são responsáveis por transmitir a leishmaniose (Herwaldt, 1999). Um exemplo é a transmissão dos protozoários ao homem pela picada de um inseto fêmea hematófago do gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente como birigui ou mosquito-palha (**Figura 1**). Outros raros modos de transmissão da doença incluem transfusão sanguínea, compartilhamento de agulha contaminada ou através de acidentes laboratoriais (Magill, 1995; Herwaldt, 2001).

Figura 1. Mosquito-palha no ato da picada. Figura adaptada de br.geocities.com/insecta_tv/Phlebotoninae001.jpg.

O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* é constituído por um estágio promastigota flagelado extracelular e um estágio amastigota intracelular morfológicamente distinto (**Figura 2**). O ciclo de vida 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 2**).

Figura 2. Ciclo de vida do parasito *Leishmania*. Figura adaptada de www.earlham.edu/~jonesst2/leishmania.htm.

As diferentes formas clínicas de leishmaniose são: **leishmaniose cutânea (LC)**, a forma mais comum da doença, que causa ulcerações no rosto, braços e pernas e deixam cicatrizes permanentes; **leishmaniose muco-cutânea (LMC)** que causa úlceras na pele levando a destruição das membranas mucosas do nariz, boca e garganta; **leishmaniose cutânea difusa (LCD)**, a forma mais difícil de tratar, que produz lesões crônicas parecidas com a lepra, não cicatrizam espontaneamente e voltam depois do tratamento; e **leishmaniose visceral (LV)**, também chamada calazar, que é a forma mais séria da

doença e é fatal quando não tratada. Causa hipertrofia do baço e fígado, febre, anemia e perda de peso.

Espécies diferentes de *Leishmania* são responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença. Infecções por *L. major* ou *L. tropica* causam LC, as espécies da América do Sul, como *L. braziliensis*, causam LMC e *L. donovani* ou *L. infantum* causam LV.

As leishmanioses são endêmicas em 88 países distribuídos em 4 continentes (África, Ásia, Europa e América do Norte e do Sul). No entanto, o impacto da doença sobre a saúde pública permanece gravemente negligenciado.

No mundo, há um risco de 350 milhões de pessoas contraírem a doença, uma estimativa de 14 milhões de pessoas infectadas e de 2 milhões de novos casos por ano (ftp.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA60/A60_10-en.pdf). Segundo a Organização Mundial de Saúde (www.who.int), surgem anualmente 500.000 novos casos de LV (90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão) e 1,5 milhões de casos de LC (90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria). Além de 90% dos casos de LMC ocorrerem no Brasil, Bolívia e Peru.

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, registram-se anualmente cerca de 3 mil casos de leishmaniose visceral distribuídos em 19 estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, com 90% dos casos concentrados no Nordeste do país. Além disso, cerca de 30 a 35 mil casos anuais de leishmaniose cutânea ou tegumentar, conhecida popularmente como ferida brava, são relatados, principalmente em moradores de áreas rurais ou próximas de matas.

A incidência de LC no Brasil aumentou progressivamente de 21.000 casos em 1998 para 30.550 casos em 2000. Uma tendência similar foi reportada para Cabul, Afeganistão, onde o número de casos era 14.200 em 1994, mas em 1999 subiu dramaticamente para 200.000 (TDR, 2003-04 / <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>).

Esse aumento no número de casos tem sido atribuído às variações ambientais, invasão das matas, desmatamento, ocupação desordenada das áreas urbanas e

processos de urbanização. No estado de São Paulo a doença vem descendo da região oeste para a leste podendo chegar à cidade de São Paulo, maior metrópole da América do Sul, onde vivem 19 milhões de pessoas (<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=3632&bd=1&pg=1&lg>). A leishmaniose associada com a infecção por HIV também contribuíram para aumentar a epidemia da doença no Brasil e no mundo. Infecções por HIV aumentam o risco de desenvolver LV de 100 para 2.320 vezes em áreas endêmicas, reduz a possibilidade de uma resposta terapêutica e aumenta muito a chance de recaída (Alvar *et al.*, 2008).

O tratamento da leishmaniose LV e LC tem como fármacos de primeira linha os derivados de antimônios pentavalentes (Croft e Yardley, 2002; Croft e Coombs, 2003; Croft *et al.*, 2005), como estibogluconato de sódio (Pentostam – GlaxoSmithKline) e antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime – Aventis) (**Figura 3**). Este último é distribuído gratuitamente no Brasil pelo Ministério da Saúde. O mecanismo de ação desses fármacos ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasito inibindo a via glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Apesar da elevada eficácia, são cardiotoxicos e a sua administração tem dado origem ao aparecimento de parasitos resistentes (Croft, 2001).

Diversos outros fármacos têm sido utilizados no tratamento da doença, como a Pentamidina (Pentacarinat – Rhodia Farma), Paromomicina, Miltefosina (Imávido – Zentaris AG) e Anfotericina B (Fungisone – Bristol Meyers Squibb) (**Figura 3**). A Anfotericina B é a mais eficaz, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasito. Todos eles apresentam limitações, como necessidade de tratamentos prolongados, efeitos colaterais e custos elevados.

Além do tratamento, o desenvolvimento de vacinas surge como uma nova perspectiva no combate à leishmaniose (Pinheiro, 2004). No Brasil, existe atualmente uma vacina em desenvolvimento denominada Leishvacin (Biobrás). No entanto, a produção ainda está limitada para a realização de estudos clínicos (Toledo *et al.*, 2001) e estima-se que a produção em escala comercial se iniciará apenas em 2020.

Figura 3. Estruturas químicas dos principais fármacos empregados no tratamento da leishmaniose. **(a)** Pentamidina **(b)** Miltefosina **(c)** Anfotericina B **(d)** antimoniato-N-metil glucamina **(e)** Paromomicina **(f)** estibogluconato de sódio. Figura adaptada de Rath *et al.*, 2003.

Diante da limitada e ineficiente forma de tratamento da leishmaniose, a busca por novos alvos terapêuticos se faz necessária. Dentro deste contexto, o nosso laboratório tem focado a caracterização cinética, estrutural e funcional de potenciais alvos macromoleculares para o planejamento de moléculas com potencial ação no tratamento da leishmaniose. Nossa estratégia envolve a aplicação da técnica de planejamento de fármacos baseado em estrutura de proteínas (*structure-based drug design*), estratégia esta atualmente utilizada pela indústria farmacêutica e que tem se tornado uma importante ferramenta biotecnológica na busca de novos fármacos e vacinas (Kroemer, 2007). Através da combinação de métodos experimentais para a caracterização

bioquímica, estrutural e funcional, e de métodos computacionais, sítios para a modelagem de inibidores/ligantes podem ser propostos. Além disso, o conhecimento das características químicas e estruturais particulares de cada proteína favorece a descoberta de compostos com alta seletividade, eficácia e baixa toxicidade.

O grande desafio para a aplicação eficiente desta técnica se baseia na identificação e validação de novos alvos macromoleculares. Além de enzimas como tripanotona redutase, cisteíno peptidase (Clan CA), diidrofolato redutase (Croft e Coombs, 2003) que já foram validadas como alvos para o planejamento de compostos com atividade contra *Leishmania*, estudos comparativos entre diferentes tripanosomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, também têm sido utilizados para predizer a existência de novos potenciais alvos. Entre estas espécies, *T. brucei* se tornou o modelo favorito para se estudar o metabolismo e outros processos compartilhados com outras espécies de tripanosomatídeos através da aplicação da técnica de interferência de RNA (RNAi) (Ngo *et al.*, 1998).

Um exemplo destes estudos se baseia na caracterização da enzima fumarato hidratase (FH), também chamada de fumarase, que catalisa a hidratação reversível da molécula de fumarato em S-malato (**Figura 4**). Estudos de RNAi demonstraram que a atividade das fumarato hidratases é essencial para a sobrevivência da forma procíclica do parasito *Trypanosoma brucei* (Coustou *et al.*, 2006). Além disso, nos estudos detalhados realizados por Coustou e colaboradores (Coustou *et al.*, 2006), foi descoberto que na verdade, a molécula de fumarato, produto da reação catalisada pelas FHs, é um metabólito intermediário essencial para *T. brucei*.

Figura 4. Reação reversível de hidratação estereoespecífica catalisada pela enzima fumarato hidratase.

De fato, a molécula de fumarato participa de várias etapas do metabolismo intermediário dos tripanosomas. No citosol, a molécula de fumarato participa de diferentes tipos de reações (Pines *et al.*, 1996), como, por exemplo, atuando como substrato da enzima diidroorotato desidrogenase, que participa da biosíntese de nucleotídeos de pirimidina (Takashima *et al.*, 2002; Feliciano *et al.*, 2006). Na mitocôndria e no glicossomo, a molécula de fumarato participa do caminho de fermentação succínico (Van Weelden *et al.*, 2003; Besteiro *et al.*, 2002) servindo como substrato para as enzimas fumarato redutase mitocondrial (FRDm) e glicossomal (FRDg), respectivamente (**Figura 5**). Na verdade, para a maioria das formas adaptativas de tripanosomatídeos, que possuem um metabolismo de energia bastante elaborado, succinato é o principal produto a ser excretado (60 a 70%) (Van Weelden *et al.*, 2003; Besteiro *et al.*, 2002), e é produzido tanto no glicossomo, quanto na mitocôndria. Aproximadamente 2/3 do succinato é produzido nos glicossomos pela isoforma fumarato redutase glicosomal (FRDg) (Besteiro *et al.*, 2002), enquanto a isoforma mitocondrial FRD (FRDm) produz o succinato restante.

Esse modelo sugere que em tripanosomatídeos as fumarases estejam presentes em ambos os compartimentos, glicossomo e mitocôndria, para fornecer fumarato para as FRDs. No entanto, estudos genéticos, metabólicos e de localização celular, utilizando *T. brucei* como modelo (Coustou *et al.*, 2006), sugerem que tripanosomas expressam uma isoforma mitocondrial e uma isoforma citosólica. No caso da isoforma mitocondrial (FHm), esta provavelmente fornece fumarato para a enzima fumarato redutase mitocondrial, que converte fumarato em succinato e, uma vez que as fumarases também catalisam a reação reversa, FHs também funcionariam na direção oxidativa do ciclo de Krebs ou do ácido tricarboxílico (TCA), tendo papel central para a respiração aeróbica destes organismos (**Figura 5**).

Figura 5. Esquema representativo do metabolismo de energia e carboidrato em *T. brucei* na forma procílica. As setas azuis, roxas e laranjas representam os passos enzimáticos no metabolismo de D-glicose, Treonina e L-prolina/L-glutamina, respectivamente. Os produtos excretados (acetato, L-alanina, glicerol, glicina, L ou D-lactato, succinato e CO_2) pelo metabolismo de glicose, treonina e L-prolina/L-glutamina estão representados em caixas azuis, roxas e laranjas, respectivamente. Setas pontilhadas indicam os passos que supostamente ocorrem em nível basal ou não ocorre em lugar nenhum, quando o parasito cresce em meio rico em glicose. O produto D-lactato foi observado somente em *Leishmania spp* (caixinha pontilhada). Abreviações: AA, aminoácido; AOB, aminooxobutirato; 1,3BPGA, 1,3-bisfosfoglicerato; C, citocromo C; Cit, citrato; CoASH, coenzima A; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; F-6-P, frutose-6-fosfato; FBP, frutose 1,6-bisfosfato; G-3-P, gliceraldeído 3-fosfato; G-6-P, glicose 6-fosfato; GLU, glutamato; Gly-3-P, glicerol 3-fosfato; IsoCit, isocitrato; 2Ket, 2-ketoglutarato; AO, 2-oxoácido; Oxac, oxaloacetato; PEP, fosfoenolpiruvato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; Pi, fosfato inorgânico; PPI, pirofosfato inorgânico; γ SAG, glutamato γ -semialdeído; SucCoA, succinil-CoA; T[SH]₂, forma reduzida da tripanotona; UQ, ubiquinona. Enzimas: 1, hexoquinase; 2, glicose 6-fosfato isomerase; 3, fosfoglicerato quinase; 4, aldolase; 5, triose-fosfato isomerase; 6, glicerol 3-fosfato desidrogenase; 7, glicerol quinase; 8, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 9, fosfoglicerato quinase glicossomal; 10, fosfoglicerato quinase citosólica; 11, fosfoglicerato mutase; 12, enolase; 13, piruvato quinase; 14, fosfoenolpiruvato carboxiquinase; 15, piruvato fosfato diquinase; 16, malato desidrogenase glicossomal; 17, fumarase citosólica (e glicossomal) (FHC); 18, fumarato redutase glicossomal; 19, fumarase mitocondrial (FHM); 20, fumarato redutase mitocondrial; 21, adenilato quinase glicossomal; 22, enzima málico; 23, enzima desconhecida; 24, alanina aminotransferase; 25, complexo piruvato desidrogenase; 26, acetato:succinato CoA-transferase; 27, enzima desconhecida; 28, succinil-CoA sintetase; 29, citrato sintase; 30, aconitase; 31, isocitrato desidrogenase; 32, complexo 2-ketoglutarato desidrogenase; 33, succinato desidrogenase (complexo II da cadeia respiratória); 34, malato desidrogenase mitocondrial; 35, L-prolina desidrogenase; 36, pyrroline-5 carboxilato desidrogenase; 37, L-glutamina deaminase; 38, glutamato aminotransferase; 39, glutamato desidrogenase; 40, L-threonina desidrogenase; 41, acetil-CoA:glicina C-acetiltransferase; 42, glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de FAD; 43, rotenona-insensitivo NADH desidrogenase; 44, oxidase alternativa; 45, FOF1-ATP sintase; 46, reação espontânea; 47, glioxalase I; 48, glioxalase II.

Interessantemente, uma diferente isoforma de FH foi encontrada no citosol (FHC) (Coustou *et al.*, 2006) e nenhuma isoforma de FH foi detectada na fração glicossomal. Acredita-se que a isoforma citosólica, FHC, pode se ligar ao lado citosólico dos glicossomos, podendo facilitar trocas de metabólitos entre os compartimentos

glicossomais e citosólicos. Além disso, a enzima FH citosólica poderia fornecer fumarato para outras reações dentro do citosol como para a enzima diidroorotato desidrogenase (Takashima *et al.*, 2002; Feliciano *et al.*, 2006). A presença de FH no citosol é apoiada pela ausência de seqüências de direcionamento das proteínas, PTS1 (seqüência de 3 aminoácidos – SKL - localizada na região C-terminal) e PTS2 (seqüência do tipo [RK]-[LVI]-x5-[HQ]-[LA] localizada próxima a região N-terminal), necessárias para a localização das proteínas no glicossomo (Opperdoes e Szikora, 2006).

O papel vital das FHs no metabolismo intermediário em *T. brucei* nos fez questionar a importância desta enzima em *Leishmania major*. Assim como em *T. brucei*, a análise do genoma de *Leishmania major* revela a existência de dois genes, LmjF24.0320 e LmjF29.1960, que codificam a enzima fumarato hidratase, e que estas dividem aproximadamente 63% de identidade seqüencial (**Figura 6**).

A análise da seqüência das FHs codificadas pelos genes LmjF24.0320 e LmjF29.1960, mostra que ambas enzimas em *L. major* são membros da classe I das fumarato hidratases. Membros desta classe (incluindo *fumA* e *fumB*) são homodiméricas, termolábeis, ligam ferro e contém aproximadamente 120 kDa. Fumarases da classe I são expressas primariamente em bactérias, incluindo *E. coli* (Woods *et al.*, 1988) e estão também presentes em alguns eucariotos unicelulares. Em contraste, fumarases da classe II (*fumC*) são enzimas homotetraméricas, termoestáveis e de massa molecular de aproximadamente 200 kDa. Estas são expressas em várias bactérias (Guest *et al.*, 1985) e em eucariotos, tais como fungos (Wu e Tzagoloff, 1987), plantas superiores (Nast e Mullerrober, 1996) e mamíferos (Suzuki *et al.*, 1989). Interessantemente, embora estas estejam funcionalmente relacionadas, membros da classe I e II não apresentam identidade seqüencial (Williams *et al.*, 1992; Weaver *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1997).

Figura 6. Alinhamento sequencial entre as isoformas LmjF24.0320 e LmjF29.1960 da enzima fumarato hidratase de *Leishmania major*. O alinhamento foi realizado no programa MultAlin (Corpet, 1988) e a figura criada no programa ESPrIt (Gouet et al., 1999).

Interessados na busca de alvos para o planejamento de compostos com atividade anti-leishmaniose, nosso laboratório iniciou os estudos de caracterização bioquímica, cinética, estrutural e funcional das enzimas fumarato hidratase de *L. major* (LmFH). Neste projeto, focamos a clonagem, expressão heteróloga em *E. coli*, purificação e caracterização da proteína LmFH-1, codificada pelo gene LmjF24.0320. A expressão heteróloga de FH abriu a oportunidade para a realização de novos ensaios bioquímicos, estudos cinéticos, assim como a produção de anticorpos policlonais e imunodeteção das FHs em *L. major* em estudos de localização celular.

LmFH-1 pertence a classe I das fumarases, contém 549 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 60.808 Da e pI teórico de 7,2 (www.expasy.org). Uma vez que os dados na literatura sobre esta classe de enzimas, especialmente para este organismo, são bastante limitados, acreditamos que o desenvolvimento deste projeto

contribuirá significativamente para o entendimento do mecanismo de ação destas enzimas em *Leishmania*.

Do ponto de vista da estratégia de planejamento de compostos com atividade anti-*Leishmania*, FH se mostra um alvo promissor. Isto porque, a inibição desta enzima, além de afetar o balanço oxi-redox mitocondrial destes organismos, através da inibição do ciclo do ácido tricarboxílico (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 fumarases, mitocondrial e citosólicas, expressas em mamíferos são membros da classe II e possuem baixa identidade seqüencial com as fumarases da classe I, o que nos permite considerar que os inibidores seletivos contra classe I poderão ser utilizados como moléculas com ação anti-*Leishmania* em formas de estágio sanguíneo do parasito.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é a caracterização da enzima fumarato hidratase de *Leishmania major* codificada pelo gene LmjF24.0320 (*LmFH-1*). Dentro deste contexto, a nossa proposta envolve a obtenção de *LmFH-1* na forma solúvel, funcionalmente ativa e em quantidade para a realização dos estudos propostos.

As etapas de realização do projeto podem ser sumarizadas em:

- Clonagem, expressão heteróloga em *E. coli* e purificação de *LmFH-1*.
- Implementação de ensaios enzimáticos para a caracterização cinética de *LmFH-1* através da determinação das constantes catalíticas, K_m e V_{max} , para fumarato e S-malato.
- Estudos de localização celular através da técnica de imunofluorescência usando microscopia confocal e fracionamento celular através da permeabilização das diferentes membranas celulares com o detergente digitonina.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Clonagem

A clonagem do gene de interesse foi realizada em vetores de expressão da série pET (Novagen): pET-28a(+), pET-32a(+), e pET-42a(+). Os vetores da série pET são plasmídeos desenhados para permitir rápida produção de grandes quantidades da proteína de interesse. Estes plasmídeos contêm vários elementos importantes: o gene *lacI* que codifica a proteína repressora *lac*; o promotor T7 que é altamente específico para T7 RNA polimerase (e não para RNA polimerase de bactérias) e que não aparece em genoma de procariotos; um operador *lac* que serve para bloquear a transcrição; um sítio de policlonagem; uma origem *f1* de replicação; e um gene de resistência a um determinado antibiótico, como ampicilina, por exemplo (**Figura 7**).

Figura 7. Esquema do vetor da série pET. O plasmídeo contém a região marcadora para resistência a ampicilina (verde), o gene *lacI* (azul), o promotor de transcrição T7 (vermelho), a região do operador *lac* (celeste) e a um sítio de policlonagem (pLink) em preto.

O gene de interesse é clonado no sítio de policlonagem. Quando T7 RNA polimerase está presente, e o operador *lac* não está sendo reprimido, a transcrição do gene de interesse procede rapidamente. Uma vez que T7 é um promotor viral, este transcreve rapidamente, enquanto a T7 RNA polimerase estiver presente. Uma das

principais características do sistema de expressão pET envolve o fato que o gene de interesse não é transcrito a menos que a T7 RNA polimerase esteja presente. Como células de procariotos não produzem este tipo de RNA, T7 RNA polimerase, esta deve ser adicionada. Usualmente, a célula hospedeira para este sistema de expressão é uma bactéria que tenha sido geneticamente modificada para incorporar o gene T7 RNA polimerase, o promotor *lac* e o operador *lac* em seu genoma. Quando lactose, ou uma molécula similar à lactose, como IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) (**Figura 8**), está presente dentro da célula, a transcrição de T7 RNA polimerase é ativada. Tipicamente, a célula utilizada como hospedeira para plasmídeos do tipo pET é *E. coli* BL21(DE3).

Figura 8. Estrutura química do IPTG.

Nas três construções, o gene que codifica a enzima é precedido por uma sequência codificadora que permite a expressão da proteína fusionada a uma cauda de histidina (6xHis) na região N-terminal (**Figura 9**). No caso das construções em pET-32a(+) e pET-42a(+), a região de 6 histidinas é precedida por uma fusão com tioredoxina (TRX) e glutathione S-transferase (GST), respectivamente. A construção em pET-32a(+) é resistente a ampicilina, enquanto as construções em pET-28a(+) e pET-42a(+) são resistentes a kanamicina. Sendo assim, além das diferenças encontradas quanto à fusão nas diferentes construções, diferentes antibióticos podem permitir uma flexibilidade na utilização de diferentes cepas de *E. coli* durante os experimentos de expressão.

Figura 9. Figura ilustrativa das construções de *LmFH-1* nos vetores de expressão pET-28a(+), pET-42a(+), pET-32a(+), respectivamente.

3.1.1. Clonagem de *LmFH-1* nos vetores de expressão pET-28a(+), pET-32a(+) e pET-42a(+)

O gene LmjF24.0320 que codifica a enzima *LmFH-1* foi clonado utilizando como molde o DNA genômico isolado da forma epimastigota de *Leishmania major* Friedlin, cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Otávio Thiemann (Instituto de Física de São Carlos - USP). 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 FH, disponível no banco de dados do genoma de *L. major* (código de acesso LmjF24.0320) (<http://www.genedb.org/genedb/leish/>), para a inserção de sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* (Invitrogen) e *NotI* (Invitrogen) (**Tabela 1**). A escolha dos sítios de restrição foi baseada na ausência dos mesmos no gene de interesse e na utilização de sítios de restrição comuns aos vetores de expressão pET-28a(+), pET-32a(+) e pET-42a(+).

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-1* utilizada na construção do *primer*.

Tabela 1. *Primers* utilizados na amplificação do gene de interesse para a clonagem em vetores de expressão

Primer	Seqüência
<i>Forward</i>	5'- GACGACGAATTC ATG CTCCGCCGCCTTGC - 3'
<i>Reverse</i>	5'- GACGACGCGGCCGC ACTA GAGCTGTTCAAGAAGTCGTTG - 3'

As seqüências de iniciação e terminação de transcrição do gene de interesse estão em negrito. Os sítios de restrição estão sublinhados e correspondem as enzimas *EcoRI* e *NotI*, respectivamente.

(b) Amplificação do gene de interesse

A ampliação do gene de interesse por PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada em um Controlador Termal Programável (Eppendorf) utilizando: 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo, DNA genômico 0,5 ng/ μ L, MgSO₄ 2 mM (Invitrogen), dNTP mix 200 μ M (Invitrogen), tampão da Taq DNA Polymerase High Fidelity 1X (Invitrogen), 1 unidade de Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), em um volume final de 50 μ L. A enzima Taq DNA Polymerase High Fidelity apresenta atividade corretiva para evitar a inserção de mutações e conseqüente erro na amplificação do gene de interesse. A reação se inicia com a desnaturação do DNA incubando-se a reação a 94°C por 2 minutos, seguida por 25 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação. Dando seqüência, diferentes temperaturas de anelamento: 55, 59, 60 e 65°C por 30 segundos foram testadas seguida pela incubação da reação a 68°C por 1'50'' para a etapa de extensão. O ensaio termina através da incubação a 68°C por 10 minutos para a terminação. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8% (m/v) preparado com tampão TAE (EDTA 10 mM; Tris-acetato 40 mM pH 8,0) e contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo (Invitrogen). As amostras foram preparadas adicionando-se tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% (m/v), xileno cianol FF 0,25% (m/v) e glicerol 30% (v/v)). A corrida eletroforética foi processada em uma cuba contendo tampão TAE, sob uma tensão de 80 V, durante 1 hora e 30 minutos. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta. O produto de PCR foi excisado do gel e purificado utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante.

(c) Digestão dos vetores de expressão e do produto de PCR

Os vetores de expressão pET-28a(+), pET-32a(+), pET-42a(+) e o produto de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Após a digestão, os vetores e o produto de PCR apresentam extremidades coesivas, que permitem o anelamento do produto de PCR com o vetor. Como as enzimas *EcoRI* e *NotI* apresentam máxima eficiência no mesmo tampão (React® 3 – Invitrogen), foram realizadas reações de dupla digestão, descritas na **Tabela 2**. As reações de digestão foram mantidas em

banho a 37°C por 4 horas para os vetores pET-32a(+) e pET-42a(+) e por 9 horas para o vetor pET-28a(+) e o produto de PCR. As reações de digestão foram purificadas utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). A digestão foi analisada em gel de agarose 0,8% (m/v) e a quantidade de DNA foi estimada comparando-se as intensidades das bandas obtidas com as do padrão de massa molecular 1kb DNA *ladder* (BioLabs).

Tabela 2. Reações de digestão com *EcoRI* e *NotI*

	Produto de PCR	pET-28a(+)	pET-32a(+)	pET-42a(+)
<i>EcoRI</i> (10U/μL)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
<i>NotI</i> (15U/μL)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
React® 3 (10X)	3 μL	3 μL	3 μL	3 μL
DNA	20 μL (~1,8 μg)	25 μL (~2,1 μg)	14 μL (~2,2 μg)	12 μL (~2,3 μg)
H ₂ O	5 μL	-	11 μL	13 μL
Volume total	30 μL	30 μL	30 μL	30 μL

(d) Reação de ligação dos vetores de expressão ao produto de PCR

As reações de ligação dos plasmídeos com o produto de PCR foram realizadas na presença da enzima ligase. Estas reações foram montadas variando-se as proporções de inserto e vetor, de modo a maximizar as chances de sucesso do experimento. As reações de ligação foram feitas na presença da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em um banho a 16°C por 16 horas e estão representadas nas **tabelas 3 e 4**.

Tabela 3. Reações de ligação para o vetor pET-28a(+)

	Ligação controle	Ligação 1 (1:3)*	Ligação 2 (1:6)*	Ligação 3 (1:9)*
pET-28a(+) (~10 ng/μL)	5 μL	5 μL	5 μL	4 μL
Produto de PCR (~60 ng/μL)	-	2,5 μL	5 μL	6 μL
T4 DNA ligase (1 U/μL)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Tampão T4 5X	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
H ₂ O	10 μL	7,5 μL	5 μL	5 μL
Volume total	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL

* Proporção vetor:inserto.

Tabela 4. Reações de ligação para os vetores pET-32a(+) e pET-42a(+)

	Ligação controle	Ligação 1 (1:4)*	Ligação 2 (1:3)*
Vetor	1 μL	1 μL (~60 ng)	3 μL (~54 ng)
Produto de PCR	-	10 μL (~240 ng)	7 μL (~168 ng)
T4 DNA ligase (1 U/μL)	1 μL	1 μL	1 μL
Tampão T4 5X	4 μL	4 μL	4 μL
H ₂ O	14 μL	4 μL	5 μL
Volume total	20 μL	20 μL	20 μL

* Proporção vetor:inserto.

(e) Preparação das bactérias *Escherichia coli* DH5 α e BL21(DE3) competentes

As bactérias competentes foram preparadas de acordo com o protocolo proposto por Ausubel *et al.*, 1995 com pequenas alterações. Para a preparação do pré-inóculo, amostras de glicerol estoque da bactéria foram utilizadas para inocular 5 mL de meio LB (Lúria Bertani) (USB) e incubadas a 37°C sob agitação de 225 rpm durante a noite. Em seguida, o inóculo foi preparado através da adição de 1 mL da solução do pré-inóculo em 100 mL de meio LB e novamente incubados a 37°C sob agitação de 225 rpm até uma densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) de aproximadamente 0,3. Neste momento, a cultura foi distribuída em dois tubos de polipropileno de 50 mL estéreis previamente resfriados em banho de gelo e mantida em repouso no gelo por 10 minutos. O material foi centrifugado a 1.600 *g* por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante é então descartado, as bactérias gentilmente homogeneizadas em 10 mL de uma solução gelada de CaCl₂ (HEPES 10mM, CaCl₂ 60mM, glicerol 15% (v/v) pH 7,0) e a solução novamente centrifugada a 1.100 *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente ressuspensionado em 10 mL da solução gelada de CaCl₂, mantido no gelo por 30 minutos e centrifugado a 1.100 *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensionadas em 2 mL da solução gelada de CaCl₂, aliquotadas em volumes de 0,2 mL e armazenadas a -70 °C. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril e em banho de gelo.

(f) Transformação da bactéria *Escherichia coli* DH5 α competente com os plasmídeos recombinantes *LmFH-1-pET28a*, *LmFH-1-pET32a* e *LmFH-1-pET42a*

A transformação das células competentes de *Escherichia coli* DH5- α foi realizada por choque térmico, de acordo com Sambrook *et al.*, 1989. As bactérias foram retiradas do freezer a -70°C e deixadas em repouso no gelo por 15 minutos para descongelar. Um volume de 50 μ L das bactérias foi adicionado a 10 μ L da reação de ligação, sem agitação. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos, seguida do choque térmico a 42°C por 2 minutos. Após este tempo, as bactérias foram colocadas em gelo novamente por 5 minutos e adicionadas de 270 μ L de meio LB. A suspensão de bactérias foi agitada

horizontalmente a 225 rpm por 1 hora a 37°C. As células foram semeadas em meio LB sólido (bactotripton 10g, extrato de levedura 5g, NaCl 10g, Agar 17g e 950mL H₂O, para 1L de solução) contendo os antibióticos adequados para a seleção das bactérias transformadas (ampicilina 50 µg/mL ou kanamicina 30µg/mL). Após a semeadura, as placas foram incubadas por 12 horas a 37°C e as colônias que cresceram foram isoladas para analisar a presença do plasmídeo contendo nosso inserto de interesse. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril.

(g) Análise e isolamento dos plasmídeos recombinantes *LmFH-1-pET28a*, *LmFH-1-pET32a* e *LmFH-1-pET42a*

Para analisar a presença dos plasmídeos contendo nosso inserto de interesse, algumas colônias foram submetidas à técnica de PCR de colônia. A técnica de PCR de colônia consiste na realização de uma reação de PCR utilizando uma colônia como molde para a amplificação do gene. Para isto, as colônias isoladas a serem testadas são individualmente “pescadas” com o auxílio de uma ponteira (previamente autoclavada) e mergulhadas na solução de reação de PCR. Em seguida, estas mesmas colônias são utilizadas para inocular meio LB adicionado de antibiótico apropriado e mantido sob agitação de 225 rpm por 12 horas a 37°C. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril.

As reações de PCR foram montadas contendo: tampão da Taq DNA Polymerase com KCl 1X (Fermentas), DNTP mix 0,2 mM (Invitrogen), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, MgCl₂ 2 mM (Fermentas), 1 unidade de Taq DNA Polymerase (Fermentas) e Tween 20 0,1%, em um volume final de 40 µL. O ciclo da reação de PCR é o mesmo descrito no item 3.1.1.(b) com temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos de 60°C. Para checar a presença de clones positivos as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% (m/v). As colônias selecionadas foram utilizadas para preparar estoque em glicerol estéril (8% (v/v)) e armazenadas a -70°C. Os plasmídeos recombinantes foram purificados com o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), de acordo

com as especificações do fabricante, e quantificados espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm.

(h) Transformação da bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) competente com os plasmídeos recombinantes *LmFH-1-pET28a*, *LmFH-1-pET32a* e *LmFH-1-pET42a*

A transformação das células de *E. coli* BL21(DE3) com os plasmídeos recombinantes *LmFH-1-pET28a*, *LmFH-1-pET32a* e *LmFH-1-pET42a* foi realizada por choque térmico da mesma forma descrita no item 3.1.1.(f). Estas células transformadas foram armazenadas na forma de estoque em glicerol estéril (8% (v/v)) e mantidas a -70°C para os experimentos de expressão.

3.2. Expressão

Os primeiros ensaios de expressão foram realizados em *E. coli* BL21(DE3). Testes de expressão foram realizados otimizando as melhores condições de concentração do agente indutor IPTG, temperatura e tempo de expressão, de forma a maximizar o rendimento e a solubilidade. Todas as etapas de expressão da enzima *LmFH-1* foram realizadas em ambiente estéril.

3.2.1 Ensaios iniciais de expressão para as construções *LmFH-1-pET32a* e *LmFH-1-pET42a*

Ensaios iniciais de expressão para as construções *LmFH-1-pET32a* e *LmFH-1-pET42a* foram realizados em *E. coli* BL21(DE3) variando as concentrações de IPTG (0,25; 0,5 e 1 mM) e o tempo de indução (1, 4 e 6 horas). Os experimentos de indução foram realizados a 25°C. Para cada construção, foi utilizado como pré-inóculo 5 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado, ampicilina 50 µg/mL para *LmFH-1-pET32a* e kanamicina 30 µg/mL para *LmFH-1-pET42a*, inoculados com amostras de estoque em glicerol e incubados a 37°C sob agitação de 225 rpm por 16 horas. O pré-inóculo (1 mL) foi diluído

1:100 em 100 mL de meio LB com antibiótico apropriado e incubado a 37°C sob agitação de 225 rpm até atingir uma DO_{600} entre 0,5 e 0,6. Neste ponto, a cultura foi dividida em 4 volumes de 10 mL, sendo que um foi usado como controle (sem adição de IPTG) e os 3 foram induzidos com concentrações diferentes de IPTG (0,25; 0,5 e 1 mM). A cultura foi incubada a 25°C sob agitação de 225 rpm e alíquotas de 2 mL foram retiradas nos intervalos de 1, 4 e 6 horas. As amostras foram centrifugadas a 15.700 g por 15 minutos a 4°C, o precipitado com as bactérias foi guardado no freezer (-20°C) e o sobrenadante descartado.

As células de 6 horas de indução para as duas construções foram ressuspensas em 300 μ L de tampão NaH_2PO_4 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, sonificadas 3 vezes de 10 segundos, com intervalos de 30 segundos, e centrifugadas a 15.700 g por 15 minutos a 4°C. Os precipitados e sobrenadantes obtidos foram separados e analisados por gel de eletroforese SDS-PAGE 12% para verificar o rendimento e a solubilidade da proteína.

3.2.2. Ensaios de expressão em larga escala para a construção *LmFH-1-pET32a*

Ensaios de expressão em larga escala para a construção *LmFH-1-pET32a* foram realizados na melhor condição de expressão do gene de interesse, maximizando assim o rendimento. A expressão foi feita utilizando como pré-inóculo 10 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado, ampicilina 50 μ g/mL, e mantidos sob agitação de 225 rpm por 16 horas a 37°C. O pré-inóculo foi diluído 1:100 em 1 L de meio LB contendo antibiótico e incubado a 37 °C sob agitação de 225 rpm até atingir DO_{600} entre 0,5 e 0,6. Neste momento, a expressão da proteína foi induzida com 0,5 mM de IPTG e mantida sob agitação de 225 rpm por 6h a 25°C. Após as 6 horas de indução, a solução do inóculo foi dividida em quatro volumes de 250 mL e centrifugada a 6.800 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram armazenadas no freezer (-20 °C) e o sobrenadante descartado.

3.2.3 Ensaios iniciais de expressão para a construção *LmFH-1-pET28a*

Ensaios iniciais de expressão para a construção *LmFH-1-pET28a* foram realizados em BL21(DE3), da mesma forma descrita no item 3.2.1., variando as concentrações de IPTG (5, 50, 100, 250, 500 e 1000 μ M), o tempo (1, 3, 6 e 24 horas) e a temperatura (18 e 25°C) de indução. O antibiótico utilizado foi kanamicina 30 μ g/mL.

3.2.4. Ensaios de expressão em larga escala para a construção *LmFH-1-pET28a*

Os ensaios de expressão em larga escala para a construção *LmFH-1-pET28a* foram realizados em BL21(DE3), da mesma forma descrita no item 3.2.2., através da indução com 0,25 mM de IPTG por 24 horas a 18°C.

3.3. Purificação

Ensaios de purificação foram realizados para a construção *LmFH-1-pET28a*. Nestes ensaios foi otimizada a concentração de imidazol para a eluição da proteína durante a etapa de cromatografia por afinidade em coluna de Ni-NTA (ácido nitrilotriacético) (Qiagen). O sucesso da purificação foi monitorado por gel de eletroforese SDS-PAGE 12%. Com o objetivo de minimizar efeitos de degradação da proteína todas as etapas de purificação foram realizadas a baixa temperatura, usando banho de gelo ou aparelhos refrigerados.

3.3.1. Cromatografia de afinidade

A primeira etapa de purificação utiliza a técnica de cromatografia de afinidade que separa as proteínas de acordo com suas diferentes afinidades por um específico ligante (Nelson e Cox, 2002). Em nosso caso, para as 3 construções, *LmFH-1* foi expressa em fusão com um peptídeo, contendo 6 aminoácidos de histidina, denominado cauda de histidina e que confere a enzima, em pH apropriado, afinidade por íons bivalentes

carregados positivamente. A resina utilizada nesta etapa possui como matriz (conjunto ligante-polímero) íons de níquel ligados a agarose, Ni-NTA (**Figura 10**).

Figura 10. Interação entre a cauda de histidina da enzima e o Ni^{2+} da resina Ni-NTA Agarose.

As células de *LmFH-1-pET28a* obtidas a partir de 0,5 L de cultura foram ressuspendidas em 10 mL de tampão de lise (NaH_2PO_4 50 mM, pH 8,5, NaCl 300 mM, PMSF 1 mM), sonicadas 10 vezes de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos, e centrifugadas a 15.700 g por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante (extrato bruto) obtido foi carregado em uma coluna contendo a resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada com o tampão de ligação (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,5). Para a remoção de contaminantes que eventualmente interajam com a resina de forma menos específica, lavamos a mesma com diferentes soluções aplicando-se um gradiente crescente de imidazol (0 a 50 mM imidazol). A lavagem foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm, até zerar a leitura, um indicativo que todas as proteínas que eluem com uma específica concentração de imidazol são removidas.

A eluição da enzima *LmFH-1* foi feita com 100 mM de imidazol (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 100 mM, pH 8,5). Uma representação esquemática dos passos de purificação da enzima *LmFH-1* está sumarizada na **Figura 11**.

Figura 11. Esquema geral da purificação de *LmFH*-1 por cromatografia de afinidade. Figura cedida gentilmente por Matheus Pinto Pinheiro, aluno de doutorado do Laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP.

O grau de pureza da enzima foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A eletroforese na presença de SDS separa as proteínas quase exclusivamente com base em sua massa molecular. O SDS ligado à proteína contribui com uma grande carga líquida negativa e as proteínas migram para o interior do gel quando um campo elétrico é aplicado. As proteínas menores movem-se mais rapidamente no gel do que as proteínas maiores, portanto, serão encontradas na extremidade inferior, onde se localiza o pólo positivo (Nelson e Cox, 2002).

A análise do grau de pureza da proteína *LmFH*-1 por SDS-PAGE foi realizada em todas as etapas de purificação. A revelação do gel foi efetuada com o corante azul de

coomassie brilhante blue R250 (Vetec). As eluições foram concentradas usando o concentrador Ultrafree – 10 kDa (Millipore) a 2.500 g por 30 minutos a 4°C.

Devido à instabilidade da atividade das FHs da classe I na presença de oxigênio (Flint *et al.*, 1992) e esta instabilidade aumentar com o grau de pureza da proteína, todos os passos de purificação foram realizados em um *glovebox* anaeróbico, com um fluxo de gás nitrogênio. Todas as soluções tampões e os frascos utilizados para coletar as frações foram previamente tratados com fluxo de nitrogênio gasoso. Este procedimento foi realizado no grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do Instituto de Física de São Carlos e é sempre adotado para realizar os estudos cinéticos da enzima.

3.4. Dosagem de *LmFH-1*

Os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, devido à presença de grupamentos aromáticos em suas estruturas, são responsáveis pelas propriedades de absorção das proteínas no comprimento de onda de 280 nm (Nelson e Cox, 2002).

Sendo assim, a estimativa da concentração da enzima *LmFH-1* é determinada através da Lei de Lambert-Beer, utilizando o coeficiente de extinção molar teórico a 280 nm ($\epsilon=42,79 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) calculado pelo programa ProtParam (www.expasy.ch/tools/protparam.html). Esta lei demonstra que a relação entre a intensidade da luz incidente, I_0 , e a intensidade da luz transmitida, I , por um meio transparente de espessura b e concentração c é dada por:

$$A = \log I_0/I = \epsilon.b.c$$

onde ϵ é o coeficiente de proporcionalidade denominado coeficiente de extinção, o qual é característico da espécie absorvente e varia com o comprimento de onda e o solvente empregado; A é a absorbância da solução.

3.5. Análise hidrofóbica

A análise da hidrofobicidade da proteína *LmFH-1* foi realizada no programa Protein Hydrophobicity Plots (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/>). O caráter hidrofóbico da proteína é predito a partir de sua seqüência de aminoácidos.

3.6. Ensaios de atividade

Os estudos cinéticos foram realizados com a proteína oriunda da construção em pET28a. Neste caso, a proteína se encontra fusionada somente a cauda de histidina enquanto que nas construções em pET32a e pET42a, além da cauda de histidina, a extensão também inclui as proteínas tioredoxina e GST, respectivamente, o que poderia interferir nos estudos cinéticos. Optamos também por trabalhar com a construção em pET28a por apresentar melhor rendimento quando comparado com os resultados obtidos para as construções em pET32a e pET42a.

Devido à instabilidade da atividade das FHs da classe I na presença de oxigênio (Flint *et al.*, 1992), os ensaios de purificação em coluna de Ni-NTA e de cinética enzimática foram realizados em condições anaeróbicas. Estes experimentos foram realizados em um glovebox anaeróbico, com um fluxo de gás nitrogênio, no grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do Instituto de Física de São Carlos – USP. As soluções e as cubetas foram previamente tratadas com um fluxo de nitrogênio gasoso, as cubetas foram seladas com uma tampa de borracha e a proteína foi adicionada a solução de atividade através de uma seringa.

3.6.1. Determinação do pH ótimo para *LmFH-1*

Com o objetivo de determinar o pH ótimo para a atividade da enzima *LmFH-1*, 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 6,2; tris 50 mM pH 7, 8 e 9; todas contendo 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 a 25°C em 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*-1 em uma concentração final de 26 µg/mL, para malato como substrato, e 40 µg/mL, para fumarato como substrato, a uma solução tampão em diferentes pHs na presença de substrato 1 mM, em um volume final de 1 mL.

Os experimentos foram realizados com a proteína *LmFH*-1 em tampão 50 mM tris pH 8,5, NaCl 150 mM.

3.6.2. 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 da molécula de fumarato, para S-malato e fumarato como substrato, respectivamente. O experimento foi realizado a 25°C em 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*-1 em uma concentração final de 40 µg/mL a uma solução tampão tris 50 mM pH 8,5, NaCl 150 mM na presença dos substratos S-malato ou fumarato, em um volume final de 1 mL.

Os parâmetros cinéticos, V_{max} e K_m , são determinados a partir da equação de Michaelis-Menten, traçando o gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk (**Figura 12**) variando a concentração de S-malato de 62,5 a 8000 µM e variando a concentração de fumarato de 31,25 a 1000 µM.

Os estudos cinéticos foram realizados com a proteína *LmFH*-1 em tampão 50 mM tris pH 8,5, NaCl 150 mM e em tampão PBS pH 7,4 (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM).

Figura 12. Gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk.

3.7. Dicroísmo circular (CD)

As medidas do conteúdo de estrutura secundária da enzima *LmFH-1* foram realizadas em um espectrômetro Jasco J-810, 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 PBS pH 7,4 e utilizando-se cubeta de quartzo retangular de caminho óptico de 0,1 cm. 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 1 nm e tempo de resposta de 0,5 segundo. O espectro final é resultado da média de 16 varreduras. O espectro de CD em um dado comprimento de onda foi convertido para elipticidade molar média por resíduo $[\theta]_{\lambda} = (\theta_{\lambda} M_0)/(10 \ell c)$, onde θ_{λ} 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).

3.8. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

As medidas preliminares de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foram realizadas para verificar a presença de íons de ferro na amostra protéica. As medidas foram realizadas no espectrômetro Bruker ELEXSYS E580 que opera em banda X (9,5 GHz) e que está equipado com cavidade retangular. As medidas foram realizadas no Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do IFSC-USP, através da colaboração

com o Prof. Antonio José da Costa Filho, em temperatura de He líquido (cerca de 4 K) alcançada com a utilização de criostato da empresa Oxford modelo ITC503. Os parâmetros utilizados foram: potência de microonda, 10 mW; modulação do campo magnético, 2 G; frequência de modulação do campo magnético, 1000 kHz. A concentração final de proteína utilizada durante o experimento foi de 1,3 mg/ml em 50 μ L.

3.9. Localização celular

Para os estudos de caracterização funcional da isoforma *LmFH-1* foi utilizado como controle a isoforma *LmFH-2*, codificada pelo gene *LmjF29.1960* em *L. major*. Para isso, durante o desenvolvimento deste projeto, a enzima *LmFH-2* foi clonada em pET28a, expressada em BL21(DE3) e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA (**Apêndice**).

3.9.1. Análises *in silico*

Estudos preliminares de caracterização funcional das duas isoformas da enzima *LmFH*, através da predição da sua localização celular, foi realizada utilizando os programas Mitoprot (Claros e Vincens, 1996), através da busca de seqüências sinais para endereçamento mitocondrial, e Multalin (Corpet, 1988), através de alinhamento seqüencial.

3.9.2. Estudos imunoquímicos

A produção de anticorpo policlonal contra *LmFH-1* e *LmFH-2* foi realizada através de imunizações em coelhos com 800 mg de proteína em tampão PBS pH 7,4. Os experimentos foram realizados no laboratório de Glicoimunobiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, através da colaboração com o Prof. Marcelo Dias Baruffi. A primeira imunização foi realizada com adjuvante completo de Freund's e a

injeção foi aplicada em cinco pontos no dorso do animal. A partir da segunda imunização, utilizou-se adjuvante incompleto de Freund's e a injeção foi aplicada no músculo da perna. Foram realizadas cinco imunizações para LmFH-1 e quatro para LmFH-2, com intervalos de 15 dias. Como controle dos experimentos, previamente a cada imunização, amostras do sangue dos coelhos foram retiradas e mantidas em um banho a 37°C por 30 minutos. Em seguida, o sangue de cada coelho foi centrifugado a 450 g por 15 minutos e o soro foi aliquoteado e congelado a - 20°C. Após 15 dias a partir da última imunização o soro total de cada coelho foi coletado, precipitado com 40% de sulfato de amônio e dialisado com tampão PBS pH 7,4 durante 3 dias.

Os anticorpos IgG anti-LmFH-1 e anti-LmFH-2, presentes nos soros dialisados, foram purificados utilizando cromatografia por afinidade em coluna de proteína G. Para tanto, o soro total dialisado obtido foi carregado na coluna de proteína G previamente equilibrada com o tampão PBS pH 7,4. Para remover os contaminantes que eventualmente interajam com a resina de maneira menos específica, lavamos a mesma com tampão PBS pH 7,4. A lavagem foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm, até leituras próximas de 0,01. A eluição do anticorpo foi realizada com glicina 0,2 M pH 2,8 e imediatamente neutralizada com K₂HPO₄ 1 M pH 10.

A produção de anticorpos policlonais contra LmFH-1 e LmFH-2 por cada coelho foi monitorada através do método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

3.9.3. Estudos de localização subcelular em *Leishmania mexicana mexicana* promastigotas

Os estudos de localização subcelular para as duas isoformas da enzima LmFH foram realizados em colaboração com o Prof. Paul Michels, da Research Unit for Tropical Diseases, de Duve Institute, Université Catholique de Louvain em Bruxelas na Bélgica.

(a) Parasitos

Os parasitos *Leishmania mexicana mexicana* promastigotas (MHOM/BZ/84/BEL46) foram cultivados *in vitro* a 28°C em meio semi-definido (SDM-79) suplementado com soro fetal bovino 10% (FCS).

(b) Fracionamento celular com digitonina

As células de *Leishmania mexicana* na forma promastigota foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos, lavadas duas vezes com tampão SHE (HEPES 25 mM pH 7,4, sacarose 250 mM, EDTA 1 mM) contendo coquetel de inibidor de protease (pepstatina 1 µM, leupeptina 1 µM, AEBSF 10 µM, EDTA 100 µM) e ressuspendidas em 1 mL da mesma solução tampão. Em seguida, 100 µL de células foram incubadas com triton X-100 0,1% (v/v) a 4°C por 20 minutos e a concentração total de proteína foi estimada pelo método de Bradford. Uma vez determinada a concentração de proteína total, para o experimento de fracionamento com o detergente digitonina, alíquotas de células contendo 300 µg de proteína foram diluídas em tampão HBSS (CaCl₂ 1,3 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 0,3 mM, MgCl₂ 0,5 mM, MgSO₄ 0,4 mM, NaCl 138 mM, NaHCO₃ 4 mM, NaHPO₄ 0,3 mM, HEPES 15 mM pH 7,1) e digitonina (0,01 a 1 mg digitonina / mg proteína) em um volume final de 300 µL. As células foram incubadas a 25°C por 4 minutos e centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos a 4°C. Como controle total de lise da célula, o parasito foi incubado com Triton X-100 0,1% (v/v) em tampão HBSS por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes e frações insolúveis (ressuspendidos em 300 µL de tampão HBSS) obtidos a partir do fracionamento celular com digitonina foram utilizados para realizar *Western blotting* e para determinar a atividade das enzimas hexokinase (controle glicossomal), enolase (controle citosólico) e fumarase, a proteína de estudo.

(c) Western blotting

As frações solúveis e insolúveis obtidas do fracionamento com digitonina e triton X-100 foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE 10% e as bandas separadas foram

transferidas para membrana de nitrocelulose aplicando-se uma voltagem de 70 V por 70 minutos a 4°C. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com tampão PBS contendo leite 5% (m/v) por 12 horas a 4°C, e posteriormente lavadas 3 vezes de 10 minutos com tampão PBS a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (anti-*LmFH*-1, anti-*LmFH*-2 e anti-TIM) diluídos em tampão PBS contendo leite 1% (m/v), por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. A proteína TIM foi utilizada como controle glicossomal. Após incubar com anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com tampão PBS seguida de uma lavagem de 10 minutos com tampão PBS contendo NP-40 0,05% (v/v) e novamente 3 vezes de 10 minutos com tampão PBS, a temperatura ambiente sob agitação. O anticorpo secundário anti-IGg de coelho conjugado com peroxidase horseradish (HRP), diluído 1:10.000 em tampão PBS contendo leite 1% (m/v), foi incubado com as membranas por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, realizou-se outro processo de lavagem da mesma forma descrita anteriormente, alternando entre as 3 lavagens com PBS uma lavagem com PBS contendo NP-40. Após as lavagens, as membranas foram incubadas por 1 minuto com a solução reveladora "ECL *Western blotting system*" (Pierce), montadas em papel filme no cassete de autoradiografia para exposição e os anticorpos primários marcados foram visualizados em filme fotográfico.

(d) Atividade enzimática

As frações solúveis obtidas do fracionamento com digitonina (0,01 a 1 mg digitonina/mg proteína) e triton X-100 0,1% (v/v) foram utilizadas para determinar a atividade enzimática das enzimas hexokinase (controle glicossomal), enolase (controle citosólico) e fumarase, a proteína de estudo. Os ensaios espectrofotométricos foram realizados a 25°C de acordo com o protocolo de atividade de cada enzima.

A enzima hexokinase é responsável por catalisar a reação:

E a enzima glicose-6P-desidrogenase catalisa a reação:

Os ensaios de atividade para a enzima hexokinase foram realizados indiretamente através do monitoramento da formação de NADPH a 340 nm por 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 0,7 U de glicose-6P-desidrogenase em solução tampão TEA 0,1 M pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, NADP 0,6 mM, glicose 10 mM, ATP 0,75 mM, adicionado de 5 µL de cada amostra solúvel obtida do fracionamento com digitonina e triton X-100, em um volume final de 1 mL.

A enzima enolase catalisa a reação:

Os experimentos de atividade para enolase foram realizados através do monitoramento da formação do produto da catálise, PEP (fosfoenolpiruvato), a 240 nm por 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição de glicerato-2-P 1 mM a uma solução tampão TEA 0,1 M pH 7,4, MgSO₄ 5 mM, KCl 0,1 M adicionado de 5 µL de cada amostra solúvel obtida do fracionamento com digitonina e triton X-100, em um volume final de 1 mL.

Os ensaios de atividade para a enzima fumarase foram realizados de acordo com o protocolo descrito no item 3.6.2, utilizando S-malato 12 mM como substrato e 5 µL de cada amostra solúvel obtida do fracionamento com digitonina e triton X-100.

(e) Microscopia confocal

As células de *Leishmania mexicana mexicana* foram inicialmente preparadas para os estudos de imunofluorescência por microscopia confocal de forma a introduzir um marcador mitocondrial Mito Tracker Red CMXRos (Molecular Probes). Para isso, adicionou-se 500 µL de cultura de *L. mexicana mexicana* em 3 poços de placa de cultura, adicionou-se 1,5 µL de Mito Tracker a 100 nM (concentração final de 0,3 nM) em cada poço e incubou-se a placa por 30 minutos a 28°C. Após este período, as células foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos a 4°C, ressuspensas em 1 mL de meio de cultura SDM-79 e incubadas novamente por 30 minutos a 28°C. Em seguida, as células

foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos a 4°C, ressuspensas em 125 µL de tampão PBS, adicionadas de 125 µL de PBS contendo formaldeído 8%, utilizado para fixação das células, e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente sob leve agitação. Após o tempo de incubação, foram adicionados às células 200 µL de PBS, 50 µL de PBS contendo Triton X-100 10% (v/v), utilizado para permeabilizar a célula, e as células foram incubadas novamente sob leve agitação por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 130 µL de glicina em PBS 0,5 M, para fixar o formaldeído ou remover o formaldeído que resta, e incubou-se as células por 12 horas a 4°C sob leve agitação. Após este período, as células foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos a 4°C e ressuspensas em 500 µL de tampão PBS.

As lâminas utilizadas para fixar os parasitos foram previamente preparadas através de lavagens dos poços com água quente, etanol e água destilada, seguidas da adição de 10 µL de poli-lisina 10 mg/mL por poço. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente em um ambiente úmido, lavadas com água destilada e secadas por 15 minutos a 37°C.

Para os estudos de imunofluorescência, as lâminas foram preparadas adicionando-se 10 µL de células de *Leishmania mexicana* previamente preparadas em cada poço e fixadas por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foi eliminado o excesso de PBS de cada poço, adicionou-se 15 µL de solução de bloqueio BSA 5% (m/v) em tampão PBS e a lâmina foi incubada por 45 minutos a 37°C. Após este período, o excesso de solução foi retirado, 10 µL de anticorpo primário (anti-*Lm*FH-1 e anti-*Lm*FH-2), diluídos em BSA 2% (m/v) em tampão PBS, foram adicionados em cada poço e as lâminas foram incubadas novamente por 45 minutos a 37°C. Em seguida, foram realizadas 6 lavagens de 5 minutos com 50 µL de tampão PBS a temperatura ambiente. Após as lavagens, foi adicionado em cada poço 10 µL de anticorpo secundário (Alexa Fluor® 488 anti-IgG de coelho com fluorescência verde (Molecular Probes)) contendo TOPRO (marcado azul de DNA) na diluição 1:1000, diluídos em BSA 2% (m/v) em tampão PBS, e as lâminas foram incubadas novamente por 45 minutos a 37°C. As lâminas foram lavadas 6 vezes de 5 minutos com 50 µL de PBS e mergulhadas em soluções de etanol 70, 85 e 96% para

desidratar e melhorar a fixação dos parasitos. Em seguida, as lâminas foram secadas sobre um fluxo de ar e adicionou-se 35 a 40 μ L de mowiol entre os poços para selar utilizando uma lamínula, sem formar bolhas. Todos os passos foram realizados em ambiente úmido e escuro, porém as lâminas foram guardadas apenas em ambiente escuro.

Os estudos de localização celular através da técnica de imunofluorescência usando microscopia confocal foram realizados em um microscópio confocal Zeiss Axiovert acoplado com um sistema de varredura de imagem a laser MRC-1024 (Bio Rad), onde os parasitos foram visualizados e as imagens foram capturadas. As imagens foram tratadas no programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Resultados e Discussões

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Clonagem

Durante o desenvolvimento deste trabalho, a etapa de clonagem do gene que codifica a enzima *LmFH-1* mostrou-se como um grande desafio e uma experiência ímpar de aprendizagem. A abordagem inicial era clonar o gene que codifica a enzima diretamente no vetor de expressão pET-28a(+) utilizando os sítios de restrição para as enzimas *NdeI* (Invitrogen) e *NotI* (Invitrogen). O vetor pET-28a(+) confere à proteína a fusão de uma cauda de seis histidinas na região N-terminal, o que facilitaria os ensaios de purificação. Apesar de extensivos testes, não foi possível obter o clone desejado. O insucesso na clonagem direta do produto de PCR ao vetor pET-28a(+) nos levou a testar várias hipóteses, como a eficiência das bactérias competentes e das enzimas: Taq DNA polimerase recombinante nas reações de PCR de colônia, T4 DNA ligase nas reações de ligação, e *NdeI* e *NotI* nas reações de digestão. Todas as hipóteses foram testadas: a eficiência da competência das bactérias foi avaliada, foram utilizados diferentes lotes de DNA polimerase e de ligase, e no último caso, também foi testado a influência de ATP (adenosina trifosfato) para a eficiência da enzima T4 DNA ligase durante a etapa de ligação. Todos estes testes foram realizados sem sucesso. Além disso, foi realizada uma análise da eficiência das enzimas *NdeI* e *NotI* na clivagem dos *primers* desenhados (http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/cleavage_olignucl_eotides.asp). Através de dados empíricos, o site disponibiliza a taxa de eficiência de digestão para oligos de diferentes tamanhos. Constatou-se inicialmente que a partir destas análises, a porcentagem de eficiência de clivagem das enzimas *NdeI* e *NotI* era, respectivamente, zero para o *primer* 5' GACGACCATATGCTCCGCCGCTTGC 3' e de apenas 10% para o *primer* 5' GACGACGCGGCCGCACTAGAGCTGTTCGAAGAAGTCGTTG 3'. Baseado nesta hipótese, decidimos usar outra estratégia de clonagem, como o uso do vetor de clonagem pTZ57R/T (Fermentas) (**Figura 13**). Este vetor é pré-digerido com a enzima *Eco321* e tratado com a enzima deoxinucleotidil transferase terminal, que catalisa

a adição de nucleotídeos deoxitimidina (ddT) às terminações 3'OH do DNA de uma cadeia.

Figura 13. Mapa do vetor pTZ57R/T (Fermentas).

(Figura: <http://www.fermentas.com/catalog/kits/kitinstaclone.htm>)

Para possibilitar a ligação no vetor de clonagem, é necessário que o produto de PCR possua nucleotídeos de adenina (A) nas suas extremidades (**Figura 14**). Uma vez que a enzima utilizada para a amplificação do fragmento de interesse, Taq DNA Polimerase High Fidelity, não possui a propriedade de adicionar A na extremidade 3' do produto de PCR, foi necessário fazer uma reação de adenilação no produto de PCR previamente aos experimentos de ligação. Desta forma, o gene que codifica a enzima *LmFH-1* foi clonado com sucesso no vetor de policlonagem pTZ57R/T (Fermentas).

Utilizando agora o clone em pTZ57R/T, o sucesso da digestão com as enzimas *NdeI* e *NotI* pode ser monitorado através de eletroforese em gel de agarose. No entanto, foram realizados inúmeros ensaios na tentativa de subclonar o fragmento no vetor pET-28a(+), sem sucesso. Neste momento, novas hipóteses foram levantadas para explicar as dificuldades obtidas como a qualidade dos oligos e a integridade do vetor utilizado. Ambos foram enviados para seqüenciamento.

Figura 14. Ligação do produto de PCR no vetor pTZ57R/T (Fermentas).

Diante dos fatos relatados, foi necessário traçar uma nova estratégia de clonagem. Decidimos então desenhar um novo *primer* usando a enzima de restrição *EcoRI*, em substituição ao sítio de restrição para a enzima *NdeI*. Além disso, os novos experimentos de clonagem foram realizados com uma nova amostra do vetor pET-28a(+). Esta nova abordagem nos permitiu, com sucesso, a clonagem direta do produto de PCR nos vetores de expressão pET-28a(+), pET-32a(+) e pET-42a(+).

4.1.1. Clonagem de *LmFH-1* nos vetores de expressão pET-28a(+), pET-32a(+) e pET-42a(+)

A amplificação do gene que codifica a enzima *LmFH-1* (LmjF24.0320) por reação de PCR a partir de DNA genômico foi realizada com sucesso através da amplificação de um fragmento único de aproximadamente 1,65 kb (**Figura 15**). Inicialmente foram testados perfis termais diferentes com o objetivo de encontrar a melhor temperatura de anelamento para os oligonucleotídeos utilizados (**Figura 15 (a)**). Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência da *LmFH-1* para a inserção de sítios de

restrição para as enzimas *EcoRI* e *NotI* (**Tabela 1**). Estes sítios de restrição foram inseridos de forma a permitir a clonagem nos vetores de expressão.

Os resultados indicam que embora estejamos trabalhando com DNA genômico, os *primers* utilizados se anelam especificamente ao nosso gene de interesse, independente das diferentes temperaturas testadas (**Figura 15 (a)**). Para os experimentos subseqüentes, escolhemos a temperatura de anelamento de 60°C e repetimos as reações de PCR (**Figura 15 (b)**). O produto de PCR foi excisado do gel, purificado utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm. A concentração obtida foi de 90 ng/μL.

Figura 15. Gel de agarose 0,8% (m/v). Amplificação do gene *LmFH-1* (LmjF24.0320) por reação de PCR a partir de DNA genômico **(a)** Variando a temperatura de anelamento dos primers. M - Marcador 1 Kb DNA Ladder (Biolab) **(b)** Usando temperatura de anelamento de 60°C.

O produto de PCR e os vetores de expressão pET-28a, pET-32a e pET-42a foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* e submetidos a reação de ligação. Os produtos de ligação foram transformados em bactéria competentes *E. coli* DH5α e as colônias obtidas analisadas por reações de PCR de colônia. Dentre os clones positivos obtidos, escolheu-se um de cada construção para a extração dos DNAs plasmidiais. Os plasmídeos foram purificados através do QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), quantificados espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm e posteriormente submetidos a seqüenciamento. Os plasmídeos recombinantes *LmFH-1*-pET28a, *LmFH-1*-pET32a e *LmFH-1*-pET42a extraídos apresentaram concentração de 230 ng/μL, 245 ng/μL e 200 ng/μL, respectivamente.

Os plasmídeos recombinantes isolados foram transformados em bactéria competente *E. coli* BL21(DE3) para os ensaios de expressão subseqüentes.

4.2. Expressão

Os ensaios de expressão para as três construções *LmFH-1-pET28a*, *LmFH-1-pET32a* e *LmFH-1-pET42a* foram realizados em *E. coli* BL21(DE3).

Inicialmente foram realizados testes de expressão para as três construções utilizando a temperatura de 25°C e variando-se o tempo de indução e a concentração de IPTG. Exemplo do perfil de expressão está representado para os resultados obtidos depois de 6 horas de indução com concentrações diferentes de IPTG (**Figura 16**).

A análise da **Figura 16** indica que a expressão da proteína depende da concentração de IPTG. Para a construção *LmFH-1-pET32a* os melhores resultados são encontrados quando utilizamos 0,5 mM de IPTG enquanto que para a construção *LmFH-1-pET28a* a expressão é constante a partir de 0,25 mM de IPTG. Para a construção *LmFH-1-pET42a* a proteína é expressa em menor quantidade, independente da concentração do agente indutor IPTG. Além disso, para todas as construções os resultados indicam que a proteína foi expressa na forma insolúvel. Ensaios de expressão em larga escala a 25°C para as construções *LmFH-1-pET28a* e *LmFH-1-pET32a* foram realizados de forma a visualizar proteína na forma solúvel, porém sem sucesso.

Embora a análise dos experimentos de eletroforese indicassem que as construções *LmFH-1-pET32a* e *LmFH-1-pET28a* apresentavam expressão em maior quantidade, optamos trabalhar somente com *LmFH-1-pET28a* por estar fusionada somente a cauda de histidina. Como nosso objetivo é a caracterização estrutural e cinética da *LmFH-1* a presença da cauda com tioredoxina e histidina, presente como fusão na construção em *LmFH-1-pET32a* e, glutathione-S-transferase e histidina, presente como fusão na construção em *LmFH-1-pET42a* poderia interferir nos nossos estudos. Além disso, nossa experiência com este tipo de construção mostra que a remoção destes domínios de fusão

pela adição de proteases específicas não é um processo eficiente, reduzindo drasticamente o rendimento proteico.

Figura 16. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Ensaios de expressão a 25°C para as construções *LmFH-1-pET32a*, *LmFH-1-pET42a* e *LmFH-1-pET28a* para 6 horas de indução com diferentes concentrações de IPTG (0; 0,005; 0,05; 0,25; 0,5 e 1,0 mM). Os retângulos em rosa indicam as bandas de expressão. **(a) *LmFH-1-pET32a*** tem massa molecular de aproximadamente **81,2 kDa**, por estar fusionada a tioredoxina (20,4 kDa). **(b) *LmFH-1-pET42a*** tem massa molecular de aproximadamente **96,4 kDa**, por estar fusioana a GST (35,6 kDa). **(c) e (d) *LmFH-1-pET28a*** tem massa molecular de aproximadamente **64,3 kDa**, por estar fusionada a cauda de histidina (~3,2 kDa).

Com o objetivo de solubilizar a proteína foram realizados novos testes de expressão a 18°C a partir da construção *LmFH-1-pET28a*. Nesses ensaios foram testados tempo de indução (3, 6 e 24 horas) e concentração de IPTG (5, 50, 100, 250, 500 e 1000 μ M). Os resultados foram analisados por SDS-PAGE e estão representados na **Figura 17**.

Os resultados indicam que a expressão da proteína *LmFH-1-pET28a* a 18°C pode ser visualizada apenas para concentrações de IPTG acima de 0,25 mM, independente do tempo de indução e que o maior rendimento é obtido quando a expressão é induzida com 0,5 mM de IPTG por 24 horas. No entanto, mesmo com a redução da temperatura, a maior parte da proteína é ainda expressa na fração insolúvel. Uma análise minuciosa dos experimentos sugere que uma pequena fração de proteína é expressa na fração solúvel quando induzidas com 0,25 mM de IPTG por 24 horas (indicada pela seta rosa na **Figura 17 (f)**).

Figura 17. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Ensaios de expressão a 18°C para a construção *LmFH-1-pET28a* (~64,3 kDa) variando o tempo de indução (3, 6 e 24 horas) e a concentração de IPTG (0; 0,005; 0,050; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mM). O retângulo e a seta em rosa indicam as bandas de expressão na forma insolúvel e solúvel, respectivamente. (a) e (b) 3 horas de indução. (c) e (d) 6 horas de indução. (e) e (f) 24 horas de indução.

Baseado em nossos resultados, a indução a baixas temperaturas e por um período extenso se mostrou fundamental para a solubilização da proteína. Os ensaios de expressão em larga escala foram então realizados a 18°C com 0,25 mM de IPTG por 24 horas.

4.3. Purificação

Os primeiros ensaios de purificação da enzima para a construção *LmFH-1-pET28a* foram realizados em cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA. Uma vez que os testes de expressão indicavam baixa solubilidade da mesma, decidimos testar a presença do detergente Triton-X 100 no objetivo de minimizar quaisquer efeitos de agregação que pudessem levar a insolubilidade. Nossa hipótese foi baseada na análise do perfil hidrofóbico da enzima *LmFH-1*, traçado pelo programa Protein Hydrophobic Plots (**Figura 18**). O programa usa a escala Kyte-Doolittle para indicar caráter hidrofóbico em proteínas. Nesta escala, regiões com valores acima de zero apresentam caráter hidrofóbico. Os resultados indicam que a proteína *LmFH-1* não apresenta domínio transmembrânico (**Figura 18 (a)**). No entanto, apresenta regiões hidrofóbicas expostas em sua superfície (**Figura 18 (b)**). É possível observar regiões com valores acima de zero na escala Kyte-Doolittle, chegando a quase 3, como por exemplo, entre os aminoácidos 532-539 (DKGNDFFE) próximo da região C-terminal da *LmFH-1* (indicado pela seta vermelha na **Figura 18 (b)**). Desta forma, a presença de regiões hidrofóbicas na enzima *LmFH-1* poderia inicialmente explicar a baixa solubilidade apresentada para a proteínas nas diferentes construções.

Foram então realizados estudos com 0,2% de Triton X-100 em todas as etapas de purificação, apenas na etapa de lise e na ausência do detergente. Com o objetivo de melhorar a solubilidade da proteína em estudo, foi também realizado um ensaio de expressão na presença de Fe^{2+} . Como a enzima liga Fe^{2+} na forma de um complexo $[\text{4Fe-4S}]$, supostamente importante para a catálise (Flint *et al.*, 1992), adicioná-lo poderia ajudar no enovelamento da proteína e na sua atividade.

Baseado nos nossos experimentos, concluímos que a presença do detergente não contribui para aumentar a solubilidade da proteína, sustentando a hipótese de que a baixa solubilidade não é consequência da agregação devido à presença de resíduos de caráter hidrofóbico, possivelmente expostos à superfície. Além disso, a presença do íon Fe^{2+} durante os ensaios de purificação não se mostrou eficiente para melhorar o rendimento de proteína solúvel (resultados não apresentados).

Figura 18. Perfil hidrofóbico da enzima *LmFH-1*. **(a)** Análise de domínio transmembrânico. **(b)** Análise de região hidrofóbica exposta na superfície da proteína. A seta vermelha indica uma região hidrofóbica próxima do C-terminal da proteína.

Outro resultado importante dos nossos experimentos revelou que além dos problemas de insolubilidade, o rendimento dos ensaios de purificação era reduzido com o passar do tempo. Estes resultados sugerem que as células contidas no glicerol estoque usado na expressão poderiam estar perdendo o plasmídeo. Para checar esta hipótese realizou-se um experimento de expressão a partir de células recém transformadas e posteriormente um ensaio de purificação. Os resultados indicaram um aumento na quantidade de proteína solúvel.

Desta forma, o protocolo de purificação de *LmFH-1* através de cromatografia de afinidade em resina de níquel foi estabelecido. Além de realizada na ausência de Triton X-100 e com células recém transformadas, para alcançar o sucesso da purificação

utilizamos um gradiente crescente de concentração de imidazol. Os resultados de uma dessas purificações foram analisados por SDS-PAGE e estão representados na **Figura 19**.

A análise da **Figura 19** indica que as lavagens da resina com 0, 25 e 50 mM de imidazol contribuíram para retirar a maioria dos contaminantes e a proteína começa eluir a partir de 100 mM de imidazol. Porém as primeiras eluições apresentam bandas de contaminação, sendo 3 mais intensas em aproximadamente 66, 45 e 30 kDa. Estes contaminantes podem ser resultado da ineficácia no processo de purificação. Porém não podemos descartar a hipótese de serem produtos de degradação da enzima, possível produto de ataque proteolítico, ou agregação da *LmFH-1* com outras proteínas. A análise da **Figura 19** indica que a partir da sexta eluição com 100 mM de imidazol a proteína *LmFH-1* elui com menor contaminação. E nas eluições com 250 e 500 mM não há sinal de contaminação, indicando que a proteína está pura.

Figura 19. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação na coluna de Ni da enzima *LmFH-1*. **(a)** Nas posições 1, 2 e 3 estão representadas as frações insolúvel, solúvel e o efluente, respectivamente. Nas posições 4 a 6 estão representadas as lavagens 5, 20 e 30 com 0 mM de imidazol, respectivamente. E nas posições 7 a 9 estão representadas as lavagens 1, 4 e 8 com 25 mM de imidazol, respectivamente. **(b)** Nas posições 1 a 4 estão representadas as lavagens 1, 3, 5 e 9 com 50 mM de imidazol, respectivamente. E nas posições 5 a 9 estão representadas as eluições 1 a 5 com 100 mM de imidazol, respectivamente. **(c)** Nas posições 1 a 3 estão representadas as eluições 6 a 8 com 100 mM de imidazol, respectivamente. Nas posições 4 a 7 estão representadas as eluições 1 a 4 com 250 mM de imidazol, respectivamente. E nas posições 8 e 9 estão representadas as eluições 2 e 3 com 500 mM de imidazol, respectivamente.

4.4. Ensaios de atividade

Os primeiros estudos cinéticos da enzima *LmFH-1* foram realizados em condições aeróbicas. Foram realizados vários ensaios onde foram testadas diferentes concentrações de proteína (11,4; 13; 26; 65 e 130 $\mu\text{g/mL}$), tampões em diferentes pHs (tampão fosfato 100 mM pH 7,3; NaH_2PO_4 50 mM pH 8,5 e NaCl 300 mM; HEPES 20 mM pH 7,2; tris 20 mM pH 8), duas concentrações de S-malato (0,5 e 1 mM) e uma concentração de fumarato (1 mM). Os resultados obtidos comprovaram as hipóteses já reportadas para diferentes FHs (Flint *et al.*, 1993), onde a presença do oxigênio, inativa a proteína.

Uma vez que a proteína é instável na presença de oxigênio iniciamos nossos ensaios de purificação e de cinética enzimática na ausência de oxigênio. A purificação da proteína na ausência de oxigênio é necessária, pois segundo Flint *et al.*, 1992 a instabilidade na atividade da proteína aumenta com o aumento do grau de pureza. Como as FHs da classe I contem um complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ no sítio catalítico, acredita-se que o O_2 inativa a enzima pela oxidação deste complexo, que passa para um estado de oxidação instável $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$, perde um íon Fe^{2+} e em seguida degrada para a forma inativa $[3\text{Fe-4S}]^+$ (Flint *et al.*, 1993; Imlay, 2006) (**Figura 20**).

Figura 20. Degradação do complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ por oxidação com oxigênio. A molécula de oxigênio (denotado $[\text{O}]$) converte o complexo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ para o estado de oxidação +3 instável. Em seguida, o complexo é espontaneamente decomposto para a forma inativa $[3\text{Fe-4S}]^+$ (Imlay, 2006).

Através dos nossos estudos, foi possível constatar que há uma grande influência da molécula de oxigênio na atividade da *LmFH-1*, indicando que há inativação da atividade da proteína pelo ar (**Figura 21**), uma característica das FHs da classe I (Flint *et al.*, 1992; Shibata *et al.*, 1985; Vankuijk *et al.*, 1996; Luque-Romero e Castillo, 1991). É

também descrito, no entanto, que parte da atividade da FH pode ser reativada por incubação anaeróbica com Fe^{2+} e ditioneitol (Flint *et al.*, 1992) ou β -mercaptoetanol (Vankuijk *et al.*, 1996), sugerindo que a degradação do complexo $[\text{4Fe-4S}]$ é reversível.

Ensaio de atividade na presença de Fe^{2+} em condições aeróbicas também foram realizados para checar a hipótese da inativação da enzima ser devido à perda ou ausência do íon ferro. Os resultados obtidos sugerem que a instabilidade na atividade não é devido à perda de ferro (**Figura 21**), evidenciando mais uma vez a inativação da *LmFH-1* pelo oxigênio.

As curvas de atividade demonstram que em condições anaeróbicas a proteína produzida através do protocolo estabelecido no desenvolvimento do presente projeto se encontra na forma ativa (**Figura 21**), permitindo a caracterização cinética da proteína *LmFH-1*, através da determinação de suas constantes catalíticas.

Figura 21. Curvas de atividade em condições anaeróbicas e aeróbicas com adição de Fe^{2+} para *LmFH-1* monitorada pela formação de fumarato a 250 nm e 25°C. A concentração final de enzima é aproximadamente 60 $\mu\text{g/mL}$ e a solução de atividade HEPES 20 mM pH 7,2 e S-malato 1 mM.

4.4.1. Determinação do pH ótimo para *LmFH-1*

Para determinar o pH ótimo de atividade da enzima *LmFH-1* utilizando S-malato ou fumarato como substrato foram realizados ensaios de atividade na presença de soluções tampões em diferentes pHs (4 a 9) (**Figura 22**). Os resultados obtidos sugerem que o pH ótimo de atividade da enzima é de aproximadamente 8,7 para os dois substratos. Esse valor é similar ao reportado para as enzimas da classe I: fumarase de

Euglena gracilis var. *Bacillaris* (pH 8,4) (Shibata *et al.*, 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 *et al.*, 2006) e fumarase de *Arabidopsis thaliana* (pH 8,2 - 8,7) (Behal e Oliver, 1997). Estabeleceu-se, assim, que os ensaios cinéticos seriam realizados em solução tampão tris 50 mM pH 8,5 e NaCl 150 mM.

Figura 22. Perfil pH versus atividade específica para a enzima LmFH-1 utilizando S-malato **(a)** ou fumarato **(b)** como substrato. A curva é 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 são: 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; todas contendo NaCl 150 mM. A concentração final da enzima é 26 µg/mL para S-malato e 40 µg/mL para fumarato. A concentração dos substratos, fumarato e malato, é 1 mM.

4.4.2. Cinética enzimática

Ensaio de atividade preliminares foram necessários para determinar o melhor intervalo de concentração e tempo de cinética a serem utilizados para cada substrato durante a reação de catálise.

As curvas de atividade da enzima LmFH-1, monitoradas pela formação ou consumo do fumarato, para diferentes concentrações dos substratos S-malato e fumarato estão representadas nas **figuras 23 (a) e 24 (a)**, respectivamente. As representações de Lineweaver-Burk utilizadas para determinar o K_m e a V_{max} dos

substratos S-malato e fumarato estão representadas, respectivamente, nas **figuras 23 (b) e 24 (b)**.

Figura 23. Determinação de $V_{\max}$ e K_m para o substrato S-malato utilizando *LmFH-1* em tampão tris 50 mM pH 8,5, NaCl 150 mM. **(a)** Medida da formação de fumarato a 250 nm e 25°C. A concentração final de enzima é 40 $\mu\text{g/mL}$ e a concentração do substrato S-malato varia de 0,0625 a 8 mM. **(b)** Gráfico dos Duplos Recíprocos de Lineweaver-Burk para a determinação da $V_{\max}$ e do K_m para o substrato S-malato.

Figura 24. Determinação de $V_{\max}$ e K_m para o substrato fumarato utilizando *LmFH-1* em tampão tris 50 mM pH 8,5, NaCl 150 mM. **(a)** Medida de consumo de fumarato a 250 nm e 25°C. A concentração final de enzima é 40 $\mu\text{g/mL}$ e a concentração do substrato fumarato varia de 31,25 a 1000 μM . **(b)** Gráfico dos Duplos Recíprocos de Lineweaver-Burk para a determinação da $V_{\max}$ e do K_m para o substrato fumarato.

Uma comparação da ordem de grandeza para os valores de K_m obtidos neste estudo mostram que os nossos resultados são similares aos reportados para as enzimas FHs da classe I: fumarase A de *E. Coli* (Flint, 1994), fumarase de *Euglena gracilis* var. *Bacillaris* (Shibata *et al.*, 1985) e fumarase de bactéria cepa MPOB (Vankuijk *et al.*, 1996); e da classe 2: fumarase de *Ascaris suum* (Kulkarni *et al.*, 2003), fumarase de

Corynebacterium glutamicum (Genda *et al.*, 2006), fumarase de *Arabidopsis thaliana* (Behal e Oliver, 1997) e fumarase humana (Estévez *et al.*, 2002) (**Tabela 5**).

Os únicos valores de $V_{\max}$ descritos são para as fumarases humana e de *Arabidopsis thaliana* (**Tabela 5**), que aparentemente são muito mais rápidas que a *LmFH-1*. Não existem dados na literatura que permitem uma análise mais detalhada sobre o comportamento da velocidade de reação para diferentes espécies.

Tabela 5. Valores de K_m e $V_{\max}$ para fumarases das classes 1 e 2

Enzima	Substrato	K_m (mM)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
<i>LmFH-1</i>	Fumarato	2,7	35,2
<i>LmFH-1</i>	S-Malato	5,2	11,8
Fumarase A de <i>E. Coli</i>	Fumarato	0,6	NC
Fumarase A de <i>E. Coli</i>	S-Malato	0,7	NC
Fumarase de <i>Euglena gracilis var. Bacillaris</i>	Fumarato	0,031	NC
Fumarase de <i>Euglena gracilis var. Bacillaris</i>	S-Malato	1,4	NC
Fumarase de bactéria cepa MPOB	Fumarato	0,25	NC
Fumarase de bactéria cepa MPOB	S-Malato	2,38	NC
Fumarase de <i>Ascaris suum</i>	Fumarato	1,43	NC
Fumarase de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	Fumarato	0,67	NC
Fumarase de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	S-Malato	5,0	NC
fumarase de <i>Arabidopsis thaliana</i>	S-Malato	0,45	650
Fumarase humana	Fumarato	0,207	344,8
Fumarase humana	S-Malato	0,857	178,6

* NC = não calculado

Interessantemente, ao realizar estudos cinéticos em condições anaeróbicas com a proteína *LmFH-1* dialisada em tampão PBS pH 7,4 (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM) foi observado uma diminuição na atividade enzimática. Como

inicialmente reportado para outras FHs (Shibata *et al.*, 1985, Genda *et al.*, 2006, Alberty *et al.*, 1954), uma explicação para nossos resultados seria a presença de íons fosfato que a altas concentrações poderia inibir a enzima de interesse.

Uma comparação dos parâmetros cinéticos para S-malato e fumarato (**Tabela 6**) obtidos para *LmFH-1* dialisada em tampão tris 50 mM pH 8,5, NaCl 300 mM (**Figuras 23 e 24**) e em tampão PBS pH 7,4 (**Figuras 25 e 26**) sugere um mecanismo de inibição do tipo não-competitivo para íons fosfato frente aos dois substratos. Na inibição do tipo não-competitivo, um caso especial de inibição mista, há alteração na V_{max} , mas o K_m permanece constante. Inibidores mistos se ligam em regiões diferentes do sítio ativo, porém podem se ligar tanto à enzima como ao complexo enzima-substrato. Futuros experimentos serão realizados para quantificar a influência do íon fosfato na atividade da enzima.

Tabela 6. Valores de K_m e V_{max} para *LmFH-1* em tampões diferentes

Enzima	Tampão	Substrato	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
<i>LmFH-1</i>	Tris pH 8,5	Fumarato	$2,7 \pm 0,5$	$35,2 \pm 5,8$
<i>LmFH-1</i>	Tris pH 8,5	S-Malato	$5,2 \pm 0,4$	$11,8 \pm 0,6$
<i>LmFH-1</i>	PBS pH 7,4	Fumarato	$1,80 \pm 0,41$	$2,85 \pm 0,56$
<i>LmFH-1</i>	PBS pH 7,4	S-Malato	$4,21 \pm 2,47$	$0,49 \pm 0,26$

Figura 25. Determinação de V_{max} e K_m para o substrato S-malato utilizando *LmFH-1* em tampão PBS pH 7,4. **(a)** Medida da formação de fumarato a 250 nm e 25°C. A concentração final de enzima é 40 µg/mL e a concentração do substrato malato varia de 0,25 a 8 mM. **(b)** Gráfico dos Duplos Recíprocos de Lineweaver-Burk para a determinação da Vmax e do Km para o substrato malato.

Figura 26. Determinação de V_{max} e K_m para o substrato fumarato utilizando *LmFH-1* em tampão PBS pH 7,4. **(a)** Medida de consumo de fumarato a 250 nm e 25°C. A concentração final de enzima é 40 µg/mL e a concentração do substrato fumarato varia de 62,5 a 1000 µM. **(b)** Gráfico dos Duplos Recíprocos de Lineweaver-Burk para a determinação da Vmax e do Km para o substrato fumarato.

4.5. Dicroísmo circular (CD)

O espectro de CD da enzima *LmFH-1* em tampão PBS (pH 7,4) é caracterizado por duas bandas negativas em cerca de 208 e 222 nm e uma banda positiva em torno de 195 nm (**Figura 27**). No intervalo de comprimento de onda usado (UV distante), o grupo repórter em análise é a própria ligação peptídica e as referidas bandas são atribuídas às transições $n\pi^*$ (em torno de 210 nm) e $\pi\pi^*$ (em torno de 195 nm) (Kelly e Price, 1997). O mínimo em 222 nm é atribuído majoritariamente a transições encontradas em estruturas helicoidais (WOODY, 1994).

Além disso, uma análise qualitativa da forma do espectro através da comparação com espectros calculados e experimentais contidos no trabalho seminal de Greenfield e Fasman (Greenfield e Fasman, 1969), indica que a intensidade comparável do máximo em 197 nm e do mínimo em torno de 210 nm, bem como a forma pouco definida da banda em 222 nm são indicativos da existência de quantidade apreciáveis de estruturas β e desordenadas. O espectro aqui apresentado é bastante similar àquele obtido para a enzima RNase, cujo conteúdo de estrutura secundária foi estimado por Greenfield e Fasman (Greenfield e Fasman, 1969) em cerca de 10% de hélices α , 33% de estruturas β e 58% de estruturas desordenadas. Para uma determinação mais rigorosa dos conteúdos de estrutura secundária, estamos procedendo com a desconvolução do espectro de CD da *LmFH-1* utilizando o pacote CDPro (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/>), que contém os programas SELCON3, CDSSTR e CONTIN (Sreerama e Woody, 2000).

Figura 27. Espectro de dicroísmo circular para a enzima *LmFH-1*.

4.6. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

As medidas de EPR da enzima *LmFH-1* à temperatura de 4,7 K não resultaram em nenhum sinal detectável dentro do intervalo de variação do campo magnético desde 50 G até 6000 G. Este fato pode ter origem em diversos fatores. O primeiro deles seria a existência de quantidade insuficiente de proteína na amostra medida, mas isto pode ser descartado já que concentrações da ordem de 1,3 mg/mL utilizadas no experimento são

facilmente detectáveis em nosso equipamento. Outro fator seria a não existência de espécies paramagnéticas na amostra medida, resultado da não incorporação do cluster de Fe-S nativo à estrutura da proteína durante o processo de expressão. Por fim, poderíamos ainda entender a ausência de sinais no espectro de RPE como resultado da presença do íon Fe no estado de oxidação Fe (II) em que este ou não é paramagnético ou possui um estado de spin eletrônico $S=2$, que não é detectável em frequências ordinárias de microondas como aquela utilizada em nossos experimentos. Estes resultados estão de acordo com os reportados para as enzimas fumarase A e B de *Escherichia coli*, que no estado nativo não apresentam sinal em RPE (Flint e Allen, 1996).

4.7. Localização celular

A função de uma proteína está estritamente relacionada com sua localização celular. Assim, para a caracterização funcional das mesmas, e validação de FH como potencial alvo para planejamento de fármacos, além dos dados cinéticos aqui descritos e estruturais (próxima etapa do projeto), também é fundamental conhecermos o local onde estas enzimas atuam em *L. major* e em que forma de vida deste parasito estas estão sendo expressas. Dentro deste contexto, estudos *in silico* e *in vitro* de localização celular da enzima *LmFH-1* foram realizados para a completa caracterização funcional da mesma.

Recentemente, estudos genéticos, metabólicos e de localização (Coustou *et al.*, 2006) demonstram que *Trypanosoma brucei* expressa duas isoformas da enzima FH: uma isoforma mitocondrial que atua como parte do ciclo de Krebs e uma isoforma citosólica que se acredita estar envolvida no metabolismo da molécula de fumarato que é produzida no citosol por diferentes tipos de reações.

Uma análise comparativa entre as seqüências das duas isoformas de *T. brucei* (TbFHm e TbFhc) e *L. major* (*LmFH-1* e *LmFH-2*) sugere inicialmente que *L. major* também expressa as isoformas mitocondrial e citosólica (**Figuras 28 e 29**). As isoformas TbFHm e *LmFH-1* apresentam 76,4% de identidade seqüencial e as isoformas TbFhc e *LmFH-2* 72,7%.

No entanto, estudos *in silico* utilizando as sequências de FHs para *Leishmania major* (Opperdoes e Szikora, 2006) demonstram que, até o presente momento, não é claro a correta localização dessas isoformas. A isoforma *LmFH-1* apresentaria um peptídeo sinal de endereçamento para a mitocôndria e uma sequência sinal de endereçamento para o glicossomo PTS2 (-KVSHKETKY-), ambos localizados no N-terminal (**Figura 28**). A isoforma *LmFH-2* não apresenta nenhuma sequência de direcionamento (Opperdoes e Szikora, 2006). Além disso, uma diferente análise na busca de peptídeos sinais para endereçamento mitocondrial foi por nós realizada através da utilização do programa Mitoprot. Enquanto as probabilidades obtidas para *T. brucei* são 0,9 para a isoforma TbFHm e 0,03 para a isoforma TbFHc, confirmando os resultados experimentais que evidenciam a presença de TbFHm na mitocôndria (Coustou *et al.*, 2006) para este organismo, as probabilidades calculadas pelo programa para as isoformas *LmFH-1* e *LmFH-2* são 0,38 e 0,29, respectivamente. Estes valores muito baixos encontrados para ambas isoformas em *L. major*, levantou dúvidas com relação à localização celular destas enzimas.

Curiosamente, Coustou e colaboradores (Coustou *et al.*, 2006) nos seus estudos de caracterização das enzimas FH em *T. brucei*, reportaram a presença de uma sequência sinal de endereçamento para o glicossomo PTS1, que se encontraria de forma encriptada na extremidade C-terminal de TbFHc (-AKLV-). Em seu trabalho, os autores levantam a hipótese de que a sequência PTS1 oculta poderia ser responsável pela localização parcial e transitória da TbFHc no glicossomo. Através de nossas análises, também identificamos a presença desta sequência de endereçamento PTS1 para *LmFH-2* (-SKTLA-) na mesma posição (**Figura 29**). Este modelo sugere que *LmFH-2* também pode ter dupla localização, podendo facilitar a troca de metabólitos entre os compartimentos glicossomal e citosólico.

Figura 28. Alinhamento seqüencial entre as isoformas *LmFH-1* e *TbFHm*. Em verde e azul estão indicadas as seqüências sinal de endereçamento para o glicosossomo PTS2 para *LmFH-1* e *TbFHm*, respectivamente. O alinhamento foi realizado no programa MultAlin (Corpet, 1988) e a figura foi criada no programa ESPrit (Gouet *et al.*, 1999).

Figura 29. Alinhamento seqüencial entre as isoformas *LmFH-2* e *TbFHc*. Em roxo e azul estão indicadas as seqüências sinal de endereçamento para o glicosossomo PTS1 para *LmFH-2* e *TbFHc*, respectivamente. O alinhamento foi realizado no programa MultAlin (Corpet, 1988) e a figura foi criada no programa ESPrit (Gouet *et al.*, 1999).

Fica evidente destas análises que somente a partir da análise da estrutura primária da proteína não é possível prever a localização celular das isoformas *LmFH-1* e *LmFH-2*. Através da produção heteróloga destas enzimas, foi possível assim iniciar estudos imunoquímicos para a determinação da localização celular.

4.7.1. Estudos imunoquímicos

A partir da produção heteróloga das duas isoformas de *LmFH* foi possível produzir anticorpo policlonal contra *LmFH-1* e *LmFH-2* com sucesso.

Através do método de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo, foi possível detectar a produção de anticorpos anti-*LmFH-1* e anti-*LmFH-2* pelos coelhos (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Média das medidas de absorbância a 450 nm das diluições do soro pré-imune, antes da 3ª imunização (após 30 dias da 1ª imunização), antes da 4ª imunização (após 45 dias da 1ª imunização) e anticorpo purificado para o anticorpo anti-*LmFH-1*

Diluições	Soro Pré-imune (UA)	Soro antes da 3ª imunização (UA)	Soro antes da 4ª imunização (UA)	Anticorpo purificado (UA)
1:500	0,044	0,894	0,872	-
1:1.000	0,026	0,871	0,867	0,257
1:2.000	0,015	0,846	0,856	0,226
1:4.000	0,012	0,847	0,799	0,241
1:8.000	0,008	0,768	0,769	0,241
1:16.000	0,004	0,684	0,674	0,173
1:32.000	0,006	0,515	0,542	0,120

Tabela 8. Média das medidas de absorbância a 450 nm das diluições do soro pré-imune, antes da 2ª imunização (após 15 dias da 1ª imunização), antes da 3ª imunização (após 30 dias da 1ª imunização) e anticorpo purificado para o anticorpo anti-*LmFH-2*

Diluições	Soro Pré-imune (UA)	Soro antes da 2ª imunização (UA)	Soro antes da 3ª imunização (UA)	Anticorpo purificado (UA)
1:500	0,197	0,587	0,765	-
1:1.000	0,153	0,427	1,125	0,307
1:2.000	0,183	0,323	0,785	0,338
1:4.000	0,114	0,240	0,741	0,280
1:8.000	0,097	0,176	0,710	0,252
1:16.000	0,053	0,099	0,624	0,219
1:32.000	0,051	0,048	0,507	0,171

A análise das tabelas 7 (para o anticorpo anti-*LmFH-1*) e 8 (para o anticorpo anti-*LmFH-2*) indica que através do método de ELISA é possível detectar as proteínas de interesse após 15, 30 e 45 dias da primeira imunização e para o anticorpo purificado, uma vez que reagiram até a diluição de 1:32.000.

Os anticorpos IgG anti-*LmFH-1* e anti-*LmFH-2* foram purificados por cromatografia por afinidade em coluna de proteína G e analisados por SDS-PAGE (**Figura 30**). As lavagens com tampão PBS pH 7,4 foram eficientes para retirar os contaminantes e os anticorpos eluídos puros com glicina 0,2 M pH 2,8 foram imediatamente neutralizados com K_2HPO_4 1 M pH 10. Os anticorpos IgG apresentam massa molecular de aproximadamente 150 kDa e são constituídos por 4 cadeias peptídicas, duas cadeias pesadas de aproximadamente 50 kDa e duas cadeias leves de aproximadamente 25 kDa (**Figura 31**).

Figura 30. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação por cromatografia por afinidade em coluna de proteína G dos anticorpos IgG anti-*LmFH-1* **(a)** e anti-*LmFH-2* **(b)**. Na posição 1 está representado o efluente. Nas posições 2 e 3 estão representadas as lavagens 1 e 3 com PBS pH 7,4, respectivamente. Nas posições 4 a 8 estão representadas as eluições 1 a 5 com glicina 0,2 M pH 2,8, respectivamente. Os anticorpos purificados apresentam duas bandas, uma em 50 kDa e uma em 25 kDa.

Figura 31. Anticorpo IgG. **1)** Região variável. **2)** Região constante. **3)** Cadeias pesadas. **4)** Cadeias leves. **5)** Região de ligação do antígeno. **6)** Sítio de clivagem da papaína. As duas cadeias pesadas são ligadas por ligações dissulfetos e se ligam às cadeias leves também por ligações dissulfeto (Figura: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/19/Immunoglobulin_basic_unit.svg).

4.7.2. Estudos de localização subcelular em *Leishmania mexicana mexicana* promastigotas

As principais estruturas celulares presentes em tripanosomatídeos estão representadas na **Figura 32**. Dentre as organelas presentes em eucariotos, destaca-se a presença de uma mitocôndria, que se ramifica pelo corpo do parasito, além de uma bolsa flagelar de onde emerge um flagelo que pode ou não se exteriorizar. A mitocôndria, além de possuir DNA mitocondrial, caracteriza-se também por possuir cinetoplasto

(minicírculos de DNA), importante na diferenciação das formas de vida do parasito durante o ciclo biológico (Rey, 2001). Outra organela importante em tripanosomatídeos é o glicosomo, que não está apenas envolvido no metabolismo de carboidratos, mas é predito também que esta organela conduza glicogênese, reações da via da hexose-monofosfato, via de salvação de purinas e biosíntese de pirimidinas, β -oxidação dos ácidos graxos, aumento dos ácidos graxos e biosíntese de lipídeos. Além disso, parece que o glicosomo catalisa várias reações de síntese de isoprenóide e está envolvido na proteção do estresse oxidativo (Oppendoes e Szikora, 2006).

Figura 32. Esquema geral da forma epimastigota de *T. cruzi* mostrando as principais estruturas celulares (<http://www.fiocruz.br/chagas/cqi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=70>).

A partir de estudos de fracionamento celular, realizados na presença do detergente digitonina, e utilizando as proteínas hexokinase como controle para proteínas glicosomais, e enolase como controle para proteínas citosólicas foi possível realizar os estudos de localização celular para as enzimas *LmFH-1* e *LmFH-2*.

Em nossos estudos, amostras das frações solúveis obtidas a partir do fracionamento celular de *L. mexicana* com diferentes concentrações de detergente

digitonina (0 a 1 mg digitonina/mg proteína) foram utilizados para avaliar a atividade das enzimas hexokinase (proteína glicosomal), enolase (proteína citosólico) e fumarase, a proteína de estudo (**Figura 33**). As frações solúveis e insolúveis obtidas a partir do fracionamento com digitonina também foram utilizadas para realizar os experimentos de *Western blotting* com anticorpos anti-LmFH-1, anti-LmFH-2 e anti-TIM (**Figura 34**). Como controle total de lise celular foi usado Triton X-100 0,1%.

Figura 33. Gráficos de atividade enzimática para enolase **(a)**, hexokinase **(b)** e fumarase **(c)** a partir dos sobrenadantes obtidos por fracionamento celular com digitonina (0 a 1 mg digitonina/mg proteína) e com Triton X-100 0,1%.

O perfil de atividade proteica monitorado para as diferentes concentrações de digitonina (**Figura 33**) indica que as proteínas citosólicas (enolase como controle) podem ser monitoradas para valores acima de 0,1 mg digitonina/mg proteína. Já para a fração glicosomal, a atividade enzimática para hexokinase (glicosomal) revela que as proteínas glicosomais podem ser observadas somente a partir de 0,5 mg digitonina/mg proteína.

Desta forma, através do monitoramento da atividade para fumarase, pudemos observar a presença da mesma a partir de 0,1 mg digitonina/mg proteína, com um pequeno aumento na atividade observado na presença de 0,5 mg digitonina/mg proteína. Uma análise cuidadosa dos dados sugere a presença da fumarase já na fração citosólica. O pequeno aumento de atividade observado na presença de 0,5 mg digitonina/mg proteína sugere ainda que uma fração, ainda que pequena, da proteína fumarase poderia provir do compartimento glicosomal. Poderíamos ainda considerar a presença de conteúdo proteico proveniente de outros compartimentos celulares, especialmente a mitocôndria. No entanto, nossas tentativas de utilizarmos proteínas mitocôndrias como controle conforme as metodologias estabelecidas para *T. brucei* foram realizadas sem sucesso.

Os resultados aqui apresentados, aliados com nossa experiência nos ensaios de atividade enzimática, sugerem que a atividade fumarásica observada deve ser majoritariamente consequência da presença da isoforma *LmFH-2*. Isto porque, os ensaios apresentados foram realizados em ambiente aeróbico e conforme relatado neste trabalho a presença de oxigênio inibe a atividade enzimática para a isoforma *LmFH-1*. Estes resultados estão também de acordo com os experimentos de *Western blotting* (**Figura 34**) que sugerem que a isoforma *LmFH-2* é citosólica. Nestes experimentos podemos visualizar na fração solúvel a presença da *LmFH-2* a partir de baixas concentrações de digitonina. Observa-se também que em altas concentrações de digitonina toda proteína se encontra no sobrenadante.

Já a análise do perfil imunoenzimático de *LmFH-2* comparado com o da proteína TIM (glicosomal) não é suficiente para predizer se a isoforma *LmFH-2* também é glicosomal, pois não há diferença significativa na quantidade de proteína detectada a partir de 0,5 mg digitonina/mg proteína.

Para a isoforma *LmFH-1*, os ensaios de *Western blotting* apenas sugerem fortemente que a proteína se encontra compartimentalizada. Para baixas concentrações de digitonina, a proteína se encontra na fração insolúvel, já para valores superiores a 0,25 mg digitonina/mg a isoforma proteína *LmFH-1* aparece na fração solúvel. Baseado

nas nossas análises *in silico*, onde identificamos a presença do peptídeo sinal, acreditamos que estes resultados sugerem que *LmFH-1* é mitocondrial. Infelizmente não foi possível realizar os estudos imunoenzimáticos para controle mitocondrial por não possuímos anticorpo contra uma proteína mitocondrial de *Leishmania*.

Figura 34. Western blotting com anticorpo policlonal anti-*LmFH-1*, anticorpo policlonal anti-*LmFH-2* e anticorpo anti-TIM para detectar, respectivamente, *LmFH-1* (61,1 kDa), *LmFH-2* (62,6 kDa) e TIM (27 kDa) nas frações obtidas do fracionamento de *L. mexicana* com digitonina (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mg digitonina/mg proteína – posições 1 a 8, respectivamente) e Triton X-100 0,1% (posição 9). **(a)**, **(c)** e **(e)** frações solúveis **(b)**, **(d)** e **(f)** frações insolúveis.

Importante comentar que os ensaios de *western blotting* com os anticorpos policlonais anti-*LmFH-1* e anti-*LmFH-2* não apresentaram alta especificidade, uma vez que outras bandas, além das bandas de interesse, foram detectadas. Uma hipótese para explicar este efeito de reação cruzada está no fato de que anticorpo policlonal poderia estar reconhecendo epitopos em outras proteínas de *Leishmania* similares aos encontrados no antígeno.

Outra estratégia utilizada para os estudos de localização celular foi através da realização de ensaios de imunofluorescência por microscopia confocal para as isoformas de FH (**Figura 35**). Foram utilizados parasitos *Leishmania mexicana* na forma promastigota com anticorpos policlonais de coelho produzidos contra as proteínas *LmFH-*

1 e *LmFH-2* (anti-*LmFH-1* e anti-*LmFH2*). Nestes ensaios foram utilizados os marcadores Mito Tracker para a mitocôndria e Topro para o núcleo.

A análise da **Figura 35 (A a D)** indica uma clara colocalização do anticorpo anti-*LmFH-1* e do Mito tracker, sugerindo a localização da proteína *LmFH-1* na mitocôndria. Para *LmFH-2*, os estudos de imunofluorescência (**Figura 35 (E a H)**) indicam uma dupla localização no citosol e no glicossomo, uma vez que é possível observar pontos mais intensos na **Figura 35 (G)**, sugerindo localização no glicossomo.

Figura 35. Imunolocalização das duas isoformas de FH em *L. mexicana* promastigotas. Imagens de microscopia confocal de *L. mexicana* promastigotas marcadas com **(A)** e **(E)** Mito tracker, marcador de mitocôndria com fluorescência vermelha; **(B)** e **(F)** TOPRO, marcador de DNA com fluorescência azul; **(C)** anticorpo policlonal anti-*LmFH-1*, fluorescência verde do anticorpo secundário Alexa Flur® 488; e **(G)** anticorpo policlonal anti-*LmFH-2*, fluorescência verde do anticorpo secundário Alexa Flur® 488. Merge são as imagens com mitotracker, TOPRO e anticorpo anti-*LmFH-1* **(D)** ou anti-*LmFH-2* **(H)** combinadas.

A combinação das três técnicas (imunofluorescência por microscopia confocal, *western blotting* e atividade enzimática para as proteínas enolase, hexokinase e fumarase a partir do fracionamento com digitonina) nos permite concluir que a isoforma *LmFH-1* apresenta localização celular mitocondrial e a isoforma *LmFH-2* apresenta dupla localização no citosol e no glicossomo.

Os estudos de localização celular apresentados neste trabalho para as isoformas de FH de *Leishmania* sustentam a hipótese levantada por Coustou e colaboradores (Coustou *et al.*, 2006) que sugere que a isoforma *LmFH-2* pode facilitar a troca de metabólitos entre os compartimentos glicossomal e citosólico. A busca pelo compartimento glicossomal poderia ser favorecida pela presença de uma seqüência sinal de endereçamento para o glicossomo PTS1, que se encontraria de forma encriptada na extremidade C-terminal de *LmFH-2* (-SKTLA-).

Fica evidente destas análises que as isoformas *LmFH-1* e *LmFH-2* são importantes para o metabolismo de energia em *Leishmania*, através da produção de fumarato no citosol, glicossomo e mitocôndria. A molécula de fumarato tem um papel importante em várias etapas do metabolismo intermediário dos tripanosomatídeos, participando no citosol de diferentes tipos de reações, como por exemplo, como substrato da enzima diidroorotato desidrogenase, que participa da biosíntese de nucleotídeos de pirimidina. Na mitocôndria e no glicossomo, a molécula de fumarato participa do caminho de fermentação succínico servindo como substrato para as enzimas fumarato redutase mitocondrial (FRDm) e glicossomal (FRDg), respectivamente. Os resultados sugerem que as isoformas *LmFH-1* e *LmFH-2* devem ser consideradas como potenciais alvo para desenvolvimento de fármacos anti-leishmaniose.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- O gene que codifica a proteína *LmFH-1* foi amplificado com sucesso por reação de PCR e clonado nos vetores de expressão pET-28a(+), pET-32a(+) e pET-42a(+).
- As três construções *LmFH-1*-pET42a, *LmFH-1*-pET32a e *LmFH-1*-pET28a foram expressas com sucesso a 25°C, porém na forma insolúvel.
- A proteína *LmFH-1*-pET28a foi expressa na forma solúvel a 18°C com 0,25 mM de IPTG por 24 horas.
- A proteína *LmFH-1*-pET28a foi isolada com sucesso a partir do uso de cromatografia por afinidade em coluna de Ni-NTA.
- A enzima recombinante *LmFH-1* apresenta atividade catalítica, porém é inativada na presença de oxigênio. Sendo assim, todos os nossos ensaios de purificação e caracterização cinética foram realizados em condições anaeróbicas.
- O pH ótimo da enzima *LmFH-1* para os dois sentidos da reação (fumarato → malato e malato → fumarato) foi determinado em torno de 8,7.
- Os valores das constantes catalíticas, K_m e V_{max} , para os dois substratos foram determinados: $K_m \text{ Fumarato} = 2,7 \pm 0,5 \text{ mM}$ e $V_{max} \text{ Fumarato} = 35,2 \pm 5,8 \mu\text{mol/min/mg}$
 $K_m \text{ S-malato} = 5,2 \pm 0,4 \text{ mM}$ e $V_{max} \text{ S-malato} = 11,8 \pm 0,6 \mu\text{mol/min/mg}$.
- Experimentos de dicroísmo circular comprovaram que a proteína *LmFH-1* se encontra corretamente enovelada com predominância para estruturas secundárias do tipo folha β .
- A proteína *LmFH-1* não apresentou sinal em RPE, de acordo com o reportado para as enzimas fumarase A e B de *Escherichia coli*, que no estado nativo também não apresentam sinal em RPE.
- A combinação das três técnicas (imunofluorescência por microscopia confocal, *western blotting* e atividade enzimática para as proteínas enolase, hexokinase e fumarase a partir do fracionamento com digitonina) nos permite concluir que a

isoforma *LmFH-1* apresenta localização celular mitocondrial e a isoforma *LmFH-2* apresenta dupla localização no citosol e no glicossomo.

- As isoformas *LmFH-1* e *LmFH-2* são importantes para o metabolismo de energia em *Leishmania*, através da produção de fumarato no citosol, glicossomo e mitocôndria. Os resultados sugerem que FH pode ser considerada um potencial alvo para planejamento de fármacos anti-leishmaniose.
- Como objetivo futuro, a expressão e purificação de *LmFH-1* aqui descritas permitirão também que novas metodologias sejam utilizadas para a caracterização estrutural da mesma, como por exemplo a determinação da estrutura cristalográfica da enzima. Além disso, a implementação de um ensaio enzimático adequado para *LmFH-1* será fundamental para a realização de estudos de inibição na presença de produtos naturais e *screening* virtual de moléculas.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberty, R. A., V. Massey, *et al.* Studies of the enzyme fumarase. The dependence of the kinetic constants at 25 degrees upon the concentration and pH of phosphate buffers. Journal of the American Chemical Society, v.76, n.9, p.2485-2493. 1954.

Alvar, J., P. Aparicio, *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clinical Microbiology Reviews, v. 21, n. 2, p. 334-359. 2008.

Ausubel, F.M., R. Brent, *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. 1995.

Behal, R. H. e 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. 1997.

Besteiro, S., M. Biran, *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.

Claros, M. G. e P. Vincens. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. European Journal of Biochemistry, v.241, p.779-786. 1996.

Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Research, v.16, n.22, p.10881-10890. 1988.

Coustou, V., M. Biran, *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.

Croft, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. Tropical Medicine & International Health, v.6, n.11, p.899-905. 2001.

Croft, S. L., M. P. Barrett, *et al.* Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. Trends in Parasitology, v.21, n.11, p.508-512. 2005.

Croft, S. L. e G. H. Coombs. 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. e V. Yardley. Chemotherapy of leishmaniasis. Current Pharmaceutical Design, v.8, n.4, p.319-342. 2002.

Estévez, M., J. Skarda, *et al.* X-ray crystallographic and kinetic correlation of a clinically observed human fumarase mutation. Protein Science, v. 11, n. 6, p. 1552-1557. 2002.

Feliciano, P. R., A. T. Cordeiro, *et al.* Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. Protein Expression and Purification, v.48, n.1, p.98-103. 2006.

Flint, D. H. e Allen, R. M. Iron-sulfur proteins with nonredox functions. Chemical Reviews, v. 96, n. 7, p. 2315-2334, 1996.

Flint, D. H., M. H. Emptage, *et al.* Fumarase-A from *Escherichia coli* – purification and characterization as an iron sulfur cluster containing enzyme. Biochemistry, v.31, n.42, p.10331-10337. 1992.

Flint, D. H., J. F. Tuminello, *et al.* The Inactivation of Fe-S Cluster Containing Hydrolyases by Superoxide. The Journal of Biological Chemistry, v.268, n.30, p.22369-22376. 1993.

Genda, T., S. Watabe, *et al.* Purification and Characterization of Fumarase from *Corynebacterium glutamicum*. Biosci. Biotechnol. Biochem., v.70, n.5, p.1102-1109. 2006.

Gouet, P., E. Courcelle, *et al.* ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. Bioinformatics, v.15, p.305-308. 1999.

Greenfield, N. e G. D. Fasman. Computed Circular dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. Biochemistry, v.8, p.4108-4116. 1969.

Guest, J. R., J. S. Miles, *et al.* The fumarase genes of *Escherichia coli* – location of the FumB gene and discovery of a new gene (FumC). Journal of General Microbiology, v.131, n.NOV, p.2971-2984. 1985.

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

Herwaldt, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin. Microbiol. Rev., v. 14, p.659-688. 2001.

Imlay, J. A. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. Molecular Microbiology, v. 59, n. 4, p. 1073-1082, 2006.

Kelly, S. M. e N. C. Price. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. Biochimica Biophysica Acta, v.1338, p.161-185. 1997.

Kroemer, R. T. Structure-based drug design: Docking and scoring. Current Protein & Peptide Science, v.8, n.4, Aug, p.312-328. 2007.

Leifso, K., G. Cohen-Freue, *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.

Luque-Romero, M. M. e F. Castillo. Inhibition of aconitase and fumarase by nitrogen-compounds in rhodobacter-capsulatus. Archives of Microbiology, v.155, n.2, Jan, p.149-152. 1991.

Magill, A. J. Epidemiology of the leishmaniases. Dermatol. Clin., v. 13, p.505-523. 1995.

Nast, G. e B. Muller-rober. Molecular characterization of potato fumarate hydratase and functional expression in *Escherichia coli*. Plant Physiology, v.112, n.3, p.1219-1227. 1996.

Nelson, L. D. e M. M. Cox. Lehninger Princípios de Bioquímica. SARVIER, 3ª ed. 2002.

Ngo, H., C. Tschudi, *et al.* Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.95, n.25, Dec, p.14687-14692. 1998.

Opperdoes, F. R. e J-P. Szikora. *In silico* prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes, v.147, n.2, p.193-206. 2006.

Pines, O., S. Evenram, *et al.* The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of fumarase. Applied Microbiology and Biotechnology, v.46, n.4, p.393-399. 1996.

Pinheiro, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. Infarma, v.16, n.7-8, p.79-82. 2004.

Rath, S., L. A. Trivelin, *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da arte. Química Nova, v.26, n.4, p.550-555. 2003.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Guanabara Koogan, 3ª ed., p. 137-150. 2001.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1989.

Shibata, H., W. E. Gardiner, *et al.* Purification, characterization, and immunological properties of fumarase from *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. Journal of Bacteriology, v.164, n.2, p.762-768. 1985.

Sreerama, N e R.W. Woody. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. Anal. Biochem., v.282, p.252-260. 2000.

Suzuki, T., M. Sato, *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., D. K. Inaoka, *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.

Toledo, V. P. C. P., W. Mayrink, *et al.* Immunochemotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: Immunological Aspects before and after Treatment. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.96, n.1, p.89-98. 2001.

Turner, M. A., A. Simpson, *et al.* Human argininosuccinate lyase: A structural basis for intragenic complementation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.94, n.17, p.9063-9068. 1997.

Vankuijk, B. L. M., N. D. Vanloo, *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.

Van Weelden, S. W. H., B. Fast, *et al.* Procyclic *Trypanosoma brucei* do not use Krebs cycle activity for energy generation. Journal of Biological Chemistry, v.278, n.15, p.12854-12863. 2003.

Weaver, T. M., D. G. Levitt, *et al.* The multisubunit active-site of fumarase-C from *Escherichia coli*. Nature Structural Biology, v.2, n.8, p.654-662. 1995.

Williams, S. E., E. M. Woolridge, *et al.* 3-carboxy-cis, cis-muconate lactonizing enzyme from *Pseudomonas putida* is homologous to the class II fumarase family - A new reaction in the evolution of a mechanistic motif. Biochemistry, v.31, n.40, p.9768-9776. 1992.

Woods, S. A., S. D. Schwartzbach, *et al.* 2 biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. Biochimica Et Biophysica Acta, v.954, n.1, p.14-26. 1988.

Woody, R., N. Berova, *et al.* Circular dichroism: Principles and applications. New York: VCH Publishers, 1994. 570 p.

Wu, M. e A. Tzagoloff. Mitochondrial and cytoplasmic fumarases in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single nuclear gene FUM1. Journal of Biological Chemistry, v.262, n.25, p.12275-12282. 1987.

Apêndice

Clonagem, expressão e purificação da enzima LmFH-2

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

A partir da análise do genoma de *Leishmania major* foi possível identificar a presença de dois genes que codificam a enzima fumarato hidratase: LmjF24.0320 e LmjF29.1960. O presente projeto de mestrado teve como objetivo caracterizar a isoforma *LmFH-1* (codificada pelo gene LmjF24.0320), no entanto, durante o desenvolvimento do trabalho se fez necessário também o estudo da isoforma *LmFH-2* (codificada pelo gene LmjF29.1960) para um melhor entendimento da localização celular das duas isoformas. Para isso foi necessário realizar a clonagem, expressão e purificação da enzima *LmFH-2*. *LmFH-2* pertence a classe I das fumarases, contém 568 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 62.602 Da e pI teórico de 6,6 (www.expasy.org).

1.1. Materiais e métodos

1.1.1. Clonagem de *LmFH-2* no vetor de expressão pET28a(+)

O gene LmjF29.1960 que codifica a enzima *LmFH-2* foi clonado utilizando como molde o DNA genômico isolado da forma epimastigota de *Leishmania major* Friedlin, cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Otávio Thiemann (Instituto de Física de São Carlos - USP). 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 FH, disponível no banco de dados do genoma de *L. major* (código de acesso LmjF29.1960) (<http://www.genedb.org/genedb/leish/>), para a inserção de sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* (Invitrogen) e *NotI* (Invitrogen) (**Tabela 1**). A escolha dos sítios de restrição foi baseada na ausência dos mesmos no

gene de interesse e na utilização de sítios de restrição comuns ao vetor de expressão pET-28a(+).

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

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

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* utilizada na construção do *primer*.

Tabela 1. *Primers* utilizados na amplificação do gene de interesse para a clonagem em vetor de expressão

Primer	Sequência
<i>Forward</i>	5'- GACGACGAATTC ATGT CTCTGTGCGACCAGTGC - 3'
<i>Reverse</i>	5'- GACGACGCGGCCGC TCAC GCAAGCGTCTTCGAGTACAT - 3'

As sequências de iniciação e terminação de transcrição do gene de interesse estão em negrito. Os sítios de restrição estão sublinhados e correspondem as enzimas *EcoRI* e *NotI*, respectivamente.

(b) Amplificação do gene de interesse

A ampliação do gene de interesse por PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada em um Controlador Termal Programável (Eppendorf) utilizando: 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 0,5 ng/µL de DNA genômico, 2 mM de MgCl₂ (Fermantas), 200 µM de dNTP mix (Invitrogen), tampão da Taq DNA Polymerase True Start 1X (Fermentas), 1,25 unidades de Taq DNA Polymerase True Start (Fermentas), em um volume final de 50 µL. A reação se inicia com a desnaturação do DNA incubando-se a reação a 95°C por 2 minutos, seguida por 25 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação. Dando sequência, diferentes temperaturas de anelamento: 50, 55 e 60°C por 30 segundos foram testadas seguida pela incubação da reação à 68°C por 2 minutos para a etapa de extensão. O ensaio termina através da incubação a 68°C por 10 minutos para a terminação. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8% (m/v) preparado com tampão TAE (EDTA 10 mM; Tris-acetato 40 mM pH 8,0) e contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (Invitrogen). As amostras foram preparadas adicionando-se tampão

de amostra (azul de bromofenol 0,25% (m/v), xileno cianol FF 0,25% (m/v) e glicerol 30% (v/v)). A corrida eletroforética foi processada em uma cuba contendo tampão TAE, sob uma tensão de 80 V, durante 1 hora e 30 minutos. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta. O produto de PCR foi excisado do gel e purificado utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante.

(c) Digestão do vetor de expressão e do produto de PCR

O vetor de expressão pET-28a(+) e o produto de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. Como as enzimas *EcoRI* e *NotI* apresentam máxima eficiência no mesmo tampão (React® 3 – Invitrogen), foram realizadas reações de dupla digestão, descritas na **Tabela 2**. As reações de digestão foram mantidas em banho a 37°C por 17 horas e foram purificadas utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). A digestão foi analisada em gel de agarose 0,8% (m/v) e a quantidade de DNA foi estimada comparando-se as intensidades das bandas obtidas com as do padrão de massa molecular 1kb DNA *ladder* (BioLabs).

Tabela 2. Reações de digestão com *EcoRI* e *NotI*

	Produto de PCR	pET-28a(+)
<i>EcoRI</i> (10U/μL)	1 μL	1 μL
<i>NotI</i> (15U/μL)	1 μL	1 μL
React® 3 (10X)	3 μL	3 μL
DNA	25 μL (~1 μg)	15 μL (~2,2 μg)
H ₂ O	-	10 μL
Volume total	30 μL	30 μL

(d) Reação de ligação do vetor de expressão ao produto de PCR

As reações de ligação do plasmídeo com o produto de PCR foram realizadas na presença da enzima ligase. Estas reações foram montadas variando-se as proporções de inserto e vetor, de modo a maximizar as chances de sucesso do experimento. As reações de ligação foram feitas na presença da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em um banho a 16°C por 21 horas e estão representadas nas **tabelas 3**.

Tabela 3. Reações de ligação do vetor pET-28a(+) com o produto de PCR

	Ligação controle	Ligação 1 (1:1)*	Ligação 2 (1:3)*	Ligação 3 (1:2)*
pET-28a(+)	5 µL (~55 ng/µL)	5 µL (~55 ng/µL)	3 µL (~48 ng/µL)	3 µL (~48 ng/µL)
Produto de PCR (~60 ng/µL)	-	5 µL (~70 ng/µL)	10 µL (~140 ng/µL)	12 µL (~84 ng/µL)
T4 DNA ligase (1 U/µL)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Tampão T4 5X	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
H ₂ O	10 µL	5 µL	2 µL	-
Volume total	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

* Proporção vetor:inserto.

(e) Transformação da bactéria *Escherichia coli* DH5α competente com o plasmídeo recombinante LmFH-2-pET28a

A transformação das células competentes de *Escherichia coli* DH5-α foi realizada por choque térmico, de acordo com Sambrook *et al.*, 1989. As bactérias foram retiradas do freezer a -70°C e deixadas em repouso no gelo por 15 minutos para descongelar. Um volume de 50 µL das bactérias foi adicionado a 10 µL da reação de ligação, sem agitação. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos, seguida do choque térmico a 42°C por 2 minutos. Após este tempo, as bactérias foram colocadas em gelo novamente por 5 minutos e adicionadas de 270 µL de meio LB. A suspensão de bactérias foi agitada

horizontalmente a 225 rpm por 1 hora a 37°C. As células foram semeadas em meio LB sólido (bactotripton 10g, extrato de levedura 5g, NaCl 10g, Agar 17g e 950mL H₂O, para 1L de solução) contendo o antibiótico adequado para a seleção das bactérias transformadas (kanamicina 30µg/mL). Após a semeadura, as placas foram incubadas por 12 horas a 37°C e as colônias que cresceram foram isoladas para analisar a presença do plasmídeo contendo nosso inserto de interesse. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril.

(f) Análise e isolamento do plasmídeo recombinante *LmFH-2-pET28a*

Para analisar a presença dos plasmídeos contendo nosso inserto de interesse, algumas colônias foram submetidas à técnica de PCR de colônia. A técnica de PCR de colônia consiste em fazer uma reação de PCR utilizando uma colônia como molde para a amplificação do gene. Para isto, as colônias isoladas a serem testadas são individualmente “pescadas” com o auxílio de uma ponteira (previamente autoclavada) e mergulhadas na solução de reação de PCR. Em seguida, estas mesmas colônias são utilizadas para inocular meio LB adicionado de antibiótico apropriado e mantido sob agitação de 225 rpm por 12 horas a 37°C. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril.

As reações de PCR foram montadas contendo: tampão da Taq DNA Polymerase com KCl 1X (Fermentas), 0,2 mM de DNTP mix (Invitrogen), 0,1 µM de cada oligonucleotídeo, 2 mM de MgCl₂ (Fermentas), 0,5 unidade de Taq DNA Polymerase (Fermentas), em um volume final de 10 µL. O ciclo da reação de PCR é o mesmo descrito no item 1.1.1.(b) com temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos de 60°C. Para checar a presença de clones positivos as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% (m/v). As colônias selecionadas foram utilizadas para preparar estoque em glicerol estéril (8% (v/v)) e armazenadas a -70°C. Os plasmídeos recombinantes foram purificados com o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), de acordo com as especificações

do fabricante, e quantificados espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260nm.

(g) Transformação da bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) competente com o plasmídeo recombinante *LmFH-2-pET28a*

A transformação das células de *E. coli* BL21(DE3) com o plasmídeo recombinante *LmFH-2-pET28a* foi realizada por choque térmico da mesma forma descrita no item 1.1.1.(e). Estas células transformadas foram armazenadas na forma de estoque em glicerol estéril (8% (v/v)) e mantidas a -70°C para os experimentos de expressão.

1.1.2. Expressão

Os primeiros ensaios de expressão foram realizados em *E. coli* BL21(DE3). Testes de expressão foram realizados otimizando as melhores condições de concentração do agente indutor IPTG, temperatura e tempo de expressão, de forma a maximizar o rendimento e a solubilidade. Todas as etapas de expressão da enzima *LmFH-2* foram realizadas em ambiente estéril.

(a) Ensaios iniciais de expressão para a construção *LmFH-2-pET28a*

Ensaios iniciais de expressão para a construção *LmFH-2-pET28a* foi realizado em *E. coli* BL21(DE3) variando as concentrações de IPTG (0,25, 0,5 e 1 mM), o tempo (1, 4, 6 e 24 horas) e a temperatura de indução (18°C e 25°C). Para a construção *LmFH-2-pET28a*, foi utilizado como pré-inóculo 5 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado, 30 µg/mL de kanamicina, inoculados com amostras de estoque em glicerol e incubados a 37°C sob agitação de 225 rpm por 16 horas. O pré-inóculo (1 mL) foi diluído 1:100 em 100 mL de meio LB com antibiótico apropriado e incubado a 37°C sob agitação de 225 rpm até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. Neste ponto, a cultura foi dividida em 4 volumes de 10 mL, sendo que um foi usado como controle (sem adição de IPTG) e os 3 foram induzidos com concentrações diferentes de IPTG (0,25, 0,5 e 1 mM). A cultura foi

incubada a 18°C e 25°C sob agitação de 225 rpm e alíquotas de 2 mL foram retiradas nos intervalos de 1, 4 e 6 horas para a temperatura de 25°C e após 24 horas para 18°C. As amostras foram centrifugadas a 15.700 g por 15 minutos a 4°C, o precipitado com as bactérias foi guardado no freezer (-20°C) e o sobrenadante descartado.

As células de 6 horas de indução a 25°C e 24 horas a 18°C foram ressuspensas em 300 µL de tampão NaH₂PO₄ 50mM, pH 8, NaCl 300mM, sonificadas 3 vezes de 10 segundos, com intervalos de 30 segundos, e centrifugadas a 15.700 g por 15 minutos a 4°C. Os precipitados e sobrenadantes obtidos foram separados e analisados por gel de eletroforese SDS-PAGE 12% para verificar o rendimento e a solubilidade da proteína.

(b) Ensaios de expressão em larga escala para a construção *LmFH-2-pET28a*

Ensaios de expressão em larga escala para a construção *LmFH-2-pET28a* foram realizados na melhor condição de expressão do gene de interesse, maximizando assim o rendimento. A expressão foi feita utilizando como pré-inóculo 10 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado, 30 µg/mL de kanamicina, e mantidos sob agitação de 225 rpm por 16 horas a 37°C. O pré-inóculo foi diluído 1:100 em 1 L de meio LB contendo antibiótico e incubado a 37 °C sob agitação de 225 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. Neste momento, a expressão da proteína foi induzida com 0,25 mM de IPTG e mantida sob agitação de 225 rpm por 24h a 18°C. Após as 24 horas de indução, a solução do inóculo foi dividida em quatro volumes de 250 mL e centrifugada a 6.800 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram armazenadas no freezer (-20 °C) e o sobrenadante descartado.

1.1.3. Purificação

Nos ensaios de purificação para a construção *LmFH-2-pET28a* foi otimizada a concentração de imidazol para a eluição da proteína durante a etapa de cromatografia por afinidade em coluna de Ni-NTA (ácido nitrilotriacético) (Qiagen). O sucesso da purificação foi monitorado por gel de eletroforese SDS-PAGE 12%. Todas as etapas de

purificação foram feitas a baixa temperatura, usando banho de gelo ou aparelhos refrigerados para evitar a degradação da proteína.

(a) Cromatografia de afinidade

A primeira etapa de purificação utiliza a técnica de cromatografia de afinidade que separa as proteínas de acordo com suas diferentes afinidades por um específico ligante (Nelson e Cox, 2002). *LmFH-2* foi expressa em fusão com um peptídeo, contendo 6 aminoácidos de histidina, denominado cauda de histidina e que confere a enzima, em pH apropriado, afinidade por íons bivalentes carregados positivamente. A resina utilizada nesta etapa possui como matriz (conjunto ligante-polímero) íons de níquel ligados a agarose, Ni-NTA.

As células de *LmFH-2*-pET28a obtidas a partir de 1 L de cultura foram ressuspendidas em 20 mL de tampão de lise (NaH_2PO_4 50 mM, pH 8,5, NaCl 300 mM, PMSF 1 mM), sonizadas 10 vezes de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos, e centrifugadas a 15.700 g por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante (extrato bruto) obtido foi carregado em uma coluna contendo a resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada com o tampão de ligação (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,5). Para a remoção de contaminantes que eventualmente interajam com a resina de forma menos específica, lavamos a mesma com diferentes soluções aplicando-se um gradiente crescente de imidazol (0 mM a 50 mM imidazol). A lavagem foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm, até zerar a leitura, um indicativo que todas as proteínas que eluem com uma específica concentração de imidazol são removidas. A eluição da enzima *LmFH-2* foi feita com 100 mM de imidazol (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 100 mM, pH 8,5).

O grau de pureza da enzima foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A revelação do gel foi efetuada com o corante azul de coomassie brilhante blue R250 (Vetec). As eluições foram concentradas usando o concentrador Ultrafree – 10 kDa (Millipore) a 2.500 g por 30 minutos a 4°C.

A estimativa da concentração da enzima *LmFH-2* foi determinada através da Lei de Lambert-Beer, utilizando o coeficiente de extinção molar teórico a 280 nm ($\epsilon=1,05 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) calculado pelo programa ProtParam (www.expasy.ch/tools/protparam.html).

1.1.4. Ensaio de atividade enzimática

O ensaio de atividade foi realizado utilizando a enzima *LmFH-2* para a construção em pET28a sem a remoção da cauda de histidina.

Os estudos de atividade iniciais da enzima *LmFH-2* foram realizados através de um ensaio espectrofotométrico que monitora a formação da molécula de fumarato. O experimento foi realizado a 25°C em espectrofotômetro Hitachi U-2001 usando o comprimento de onda de 250 nm ($\epsilon = 1.45 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para fumarato. A reação foi iniciada pela adição de *LmFH-2* em uma concentração final de 43 $\mu\text{g/mL}$ a uma solução tampão tris 50 mM pH 8,5, NaCl 150 mM na presença de S-malato 1 mM, em um volume final de 1 mL. A reação reversa substituindo o substrato S-malato por fumarato não foi realizada.

1.2. Resultados e discussões

1.2.1. Clonagem de *LmFH-2* no vetor de expressão pET28a(+)

A amplificação do gene que codifica a enzima *LmFH-2* (LmjF29.1960) por reação de PCR a partir de DNA genômico foi realizada com sucesso através da amplificação de um fragmento único de aproximadamente 1,7 kb (**Figura 1**).

Inicialmente foram testados perfis termais diferentes com o objetivo de encontrar a melhor temperatura de anelamento para os oligonucleotídeos utilizados (**Figura 1 (a)**). Os resultados indicaram que embora estejamos trabalhando com DNA genômico, os *primers* utilizados se anelaram especificamente ao nosso gene de interesse, independente das diferentes temperaturas testadas (**Figura 1 (a)**). Para os experimentos subseqüentes, escolhemos a temperatura de anelamento de 60°C e repetimos as reações de PCR (**Figura 1 (b)**). O produto de PCR foi excisado do gel, purificado utilizando o QIAquick Gel Extraction

Kit (Qiagen) e a quantidade de DNA foi estimada comparando-se as intensidades das bandas obtidas com as do padrão de massa molecular 1kb DNA *ladder* (BioLabs). A concentração obtida foi de aproximadamente 42 ng/μL.

Figura 1. Gel de agarose 0,8% (m/v). Amplificação do gene *LmFH-2* (LmjF29.1960) por reação de PCR a partir de DNA genômico **(a)** Variando a temperatura de anelamento dos primers. M - Marcador 1 Kb DNA Ladder (Biolab) **(b)** Usando temperatura de anelamento de 60°C.

O produto de PCR e o vetor de expressão pET-28a foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* e submetidos a reação de ligação. Os produtos de ligação foram transformados em bactéria competentes *E. coli* DH5α e as colônias obtidas analisadas por reações de PCR de colônia. Dentre os clones positivos obtidos, escolheu-se um para extrair o DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). O plasmídeo recombinante *LmFH-2*-pET28a extraído foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260nm e a concentração obtida foi de 110 ng/μL. O plasmídeo recombinante isolado foi transformado em bactéria competente *E. coli* BL21(DE3) para os ensaios de expressão subseqüentes.

1.2.2. Expressão

Os ensaios de expressão para a construção *LmFH-2*-pET28a foram realizados em *E. coli* BL21(DE3).

Inicialmente foram realizados testes de expressão para a temperatura de 25°C e variando-se o tempo de indução (1, 4 e 6h) e a concentração de IPTG (0,25; 0,5 e 1

mM). Os resultados obtidos depois de 6 horas de indução com concentrações diferentes de IPTG estão representados na **Figura 2**.

A análise da **Figura 2** indicou que a expressão da proteína independe da concentração de IPTG, é constante a partir de 0,25 mM de IPTG, e que a proteína foi expressa na forma insolúvel.

Com o objetivo de solubilizar a proteína foi realizado um novo teste de expressão a 18°C. Nesse ensaio foi testado tempo de indução (24 horas) e concentração de IPTG (0,25; 0,50 e 1 mM). Os resultados foram analisados por SDS-PAGE e estão representados na **Figura 3**.

Os resultados indicaram que a expressão da proteína *LmFH-2-pET28a* a 18°C também independe da concentração de IPTG. No entanto, mesmo com a redução da temperatura, a maior parte da proteína é ainda expressa na fração insolúvel. Uma análise minuciosa dos experimentos sugere que uma pequena fração de proteína é expressa na fração solúvel independente da concentração de IPTG por 24 horas (indicada pelo retângulo rosa na **Figura 3**). Baseado em nossos resultados, a indução a baixas temperaturas e por um período extenso se mostrou fundamental para a solubilização da proteína. Os ensaios de expressão em larga escala foram então realizados a 18°C com 0,25 mM de IPTG por 24 horas.

Figura 2. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Ensaio de expressão a 25°C para a construção *LmFH-2-pET28a* para 6 horas de indução com diferentes concentrações de IPTG (0,25; 0,5 e 1,0 mM). Os retângulos em rosa indicam as bandas de expressão. *LmFH-2-pET28a* tem massa molecular de aproximadamente 65,8 kDa, por estar fusionada a cauda de histidina (~3,2 kDa).

Figura 3. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Ensaios de expressão a 18°C para a construção *LmFH-2-pET28a* (~64,3 kDa) para 24 horas de indução e variando a concentração de IPTG (0,25; 0,5 e 1,0 mM). Os retângulos em amarelo e rosa indica as bandas de expressão na forma insolúvel e solúvel respectivamente.

1.2.3. Purificação

A purificação da proteína *LmFH-2* por cromatografia por afinidade foi realizada com sucesso, utilizando um gradiente crescente de concentração de imidazol. Os resultados da purificação foram analisados por SDS-PAGE e estão representados na **Figura 4**. A análise da **Figura 4** indica que as lavagens da resina com 0, 25 e 50 mM de imidazol contribuíram para retirar a maioria dos contaminantes e a proteína começa eluir a partir de 100 mM de imidazol, porém com algumas bandas de contaminação. E a proteína elui pura com imidazol 250 mM.

Figura 4. SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Purificação na coluna de Ni da enzima *LmFH-2*. **(a)** Nas posições 1 e 2 estão representadas a fração insolúvel e o efluente, respectivamente. Nas posições 3 e 4 estão representadas as lavagens 5 e 20 com imidazol 0 mM, respectivamente. Nas posições 5 e 6 estão representadas as lavagens 3 e 10 com imidazol 25 mM, respectivamente. E nas posições 7 a 9 estão representadas as lavagens 3, 5 e 7 com imidazol 50 mM, respectivamente. **(b)** Nas posições 1 a 5 estão representadas as lavagens 1 a 5 com imidazol 100 mM, respectivamente. E nas posições 6 a 8 estão representadas as eluições 1 a 3 com imidazol 250 mM, respectivamente.

1.2.4. Ensaio de atividade enzimática

Os ensaios iniciais de atividade enzimática para *LmFH-2* foram realizados em ambiente aeróbico. A curva de atividade da enzima *LmFH-2*, monitorada pela formação da molécula de fumarato, utilizando como substrato S-malato 1 mM está representada na **figura 5**.

A atividade da enzima *LmFH-2*, ao contrário do que foi observado para *LmFH-1*, não é influenciada pela molécula de oxigênio, indicando que não há inativação da atividade da proteína pelo ar. A inativação da atividade pelo ar é uma característica das FHs da classe I (Flint *et al.*, 1992; Shibata *et al.*, 1985; Vankuijk *et al.*, 1996; Luque-Romero e Castillo, 1991). No entanto, duas hipóteses levantadas para a enzima dihidroxi-ácido desidratase de espinafre (Flint e Allen, 1996), que contém um complexo Fe-S, podem ser usadas para explicar porque a atividade de *LmFH-2* não é afetada por oxigênio. A primeira hipótese é a proteína proteger o complexo Fe-S através de seus ligantes, que não permitem um acesso direto da molécula de oxigênio ao complexo. E a

segunda é a proteína conter um complexo [2Fe-2S], que possui como característica dois íons Fe^{3+} , que não seriam susceptíveis ao ataque pelo oxigênio.

Figura 5. Curva de atividade da enzima *LmFH-2* monitorada pela formação de fumarato a 250nm e 25°C. A concentração final de enzima é aproximadamente 43 $\mu\text{g/mL}$ e a solução de atividade tris 50 mM pH 8,5, NaCl 150 mM e S-malato 1 mM.

1.3. Conclusões

- O gene que codifica a proteína *LmFH-2* foi amplificado com sucesso por reação de PCR e clonado no vetor de expressão pET-28a(+).
- A construção *LmFH-2*-pET28a foi expressa com sucesso a 25°C, porém na forma insolúvel.
- A proteína *LmFH-2*-pET28a é expressa na forma solúvel a 18°C com 0,25 mM de IPTG por 24h.
- A proteína *LmFH-2*-pET28a foi isolada com sucesso a partir do uso de cromatografia por afinidade em coluna de Ni-NTA.
- A enzima recombinante *LmFH-2* apresenta atividade catalítica e não é inativada na presença de oxigênio.

1.4. Referências bibliográficas

Flint, D. H., M. H. Emptage, *et al.* Fumarase-A from *Escherichia coli* – purification and characterization as an iron sulfur cluster containing enzyme. Biochemistry, v.31, n.42, p.10331-10337. 1992.

Luque-Romero, M. M. e F. Castillo. Inhibition of aconitase and fumarase by nitrogen-compounds in rhodobacter-capsulatus. Archives of Microbiology, v.155, n.2, Jan, p.149-152. 1991.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1989.

Shibata, H., W. E. Gardiner, *et al.* Purification, characterization, and immunological properties of fumarase from *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. Journal of Bacteriology, v.164, n.2, p.762-768. 1985.

Nelson, L. D. e M. M. Cox. Lehninger Princípios de Bioquímica. SARVIER, 3ª ed. 2002.

Vankuijk, B. L. M., N. D. Vanloo, *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.

Flint, D. H.; Allen, R. M. Iron-sulfur proteins with nonredox functions. Chemical Reviews, v. 96, n. 7, p. 2315-2334, 1996.