



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem, expressão heteróloga e caracterização
do gene Smp_158240 de *Schistosoma mansoni***

Aline Kusumota Luiz de Souza

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem, expressão heteróloga e caracterização
do gene Smp_158240 de *Schistosoma mansoni***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Aluna: Aline Kusumota Luiz de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

Ribeirão Preto
2013

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

Luiz de Souza, Aline Kusumota

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene Smp_158240 de *Schistosoma mansoni*, Ribeirão Preto, 2013.

119f.

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Área de Concentração: Física Biológica.

Orientadora: Maria Cristina Nonato Costa

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Fumarato Hidratase. 3. Clonagem. 4. Expressão. 5. Purificação. 6. Caracterização bioquímica. 7. Caracterização estrutural.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Kusumota Luiz de Souza

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene Smp_158240 de *Schistosoma mansoni*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química e Física Biológica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

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,
Marcos e Lenice,
pelo apoio constante e por sempre me incentivarem a correr atrás de tudo que desejo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não pertence só a mim e existem muitas pessoas sem as quais ele não seria possível.

Meus agradecimentos são a todos que colaboraram de alguma forma durante o período em que estive no Laboratório de Cristalografia de Proteínas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristina Nonato, pelo exemplo de caráter e ética profissional, pela paciência e tolerância em momentos de desentendimento, pela disponibilidade, orientação e aconselhamento nos obstáculos enfrentados e pelos anos de trabalho junto!!!

À Profa. Dra. Eliane C. A. Braga pelo tempo em que nos disponibilizou seu espaço no laboratório.

Aos Profs. Dr. Antonio José da Costa Filho, Dr. Sérgio Akira Uyemura, Dr. Gustavo Henrique Goldman, Dr. Marcelo Baruffi, Monica Tallarico Pupo por disponibilizarem seus laboratórios e/ou materiais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Humberto D’Muniz Pereira, do IFSC-USP, pelo trabalho conjunto com a enzima de interesse.

Aos meus amigos do LCP: Joane, Ricardo, Patrícia, Renata, Matheus, Juliana, Lara, Valéria, Adam, Diego e João, pela amizade e pelos anos de agradável convivência, e acima de tudo pelas eternas discussões científicas decisivas para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e meus irmãos.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo.

À FAPESP pelo auxílio financeiro na concessão da bolsa de mestrado.

E, enfim, À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela minha formação como farmacêutica e pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

“Vencer uma dificuldade sempre nos dá uma alegria secreta,
pois significa superar um limite e aumentar a nossa liberdade.”

(Henri Frédéric Amiel)

Resumo

Luiz de Souza, A. K. **Clonagem, expressão heteróloga e caracterização do gene Smp_158240 de *Schistosoma mansoni***. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde, as doenças parasitárias afetam um sexto da população mundial, totalizando de mais de um bilhão de pessoas. A esquistossomose, em particular, é uma doença parasitária negligenciada pela saúde pública, causada pelo parasita helminto trematódeo do gênero *Schistosoma*, e que afeta mais de 230 milhões de indivíduos em todo o mundo, 6 milhões no Brasil, causando risco a aproximadamente 700 milhões de pessoas. Na busca por novas ferramentas para o combate à esquistossomose, uma importante estratégia consiste na identificação e caracterização de alvos moleculares do parasita *Schistosoma*. As fumarato hidratases são enzimas que catalisam a hidratação reversível da molécula de fumarato em S-malato e têm sido consideradas potenciais alvos macromoleculares para o planejamento de novos fármacos antiparasitários. Dentro desse contexto, o presente trabalho visou a clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural e bioquímica do produto do gene Smp_158240, predito como codificador da enzima fumarato hidratase para o parasita *Schistosoma mansoni*. O gene Smp_158240 foi sintetizado quimicamente com otimização de códons para expressão em *E. coli* e clonado nos vetores de expressão pET28a e pET28sumo. O produto do gene, denominado SmFH foi expresso em bactéria *E. coli* BL21(DE3) e purificado com excelente rendimento e grau de pureza. Estudos de espalhamento dinâmico de luz, associados à cromatografia por filtração em gel indicam que a proteína SmFH se oligomeriza na forma de um tetrâmero, e estudos por dicroísmo circular foram utilizados para estimar o conteúdo de estrutura secundária em 60,8 % de α -hélices, 5,7 % de fita- β e 37,6 % de coil-turn. Apesar dos resultados indicarem que a SmFH se oligomeriza e se enovela como previamente reportado para as enzimas fumarato hidratase da classe II, os ensaios de atividade indicaram que o produto do gene Smp_158240 apresenta baixa atividade fumarásica e se mostra instável para a realização dos experimentos de cristalização. A realização de predição de estrutura por modelagem molecular por homologia identificou regiões de grandes diferenças entre o modelo gerado para SmFH e as estruturas descritas para outras enzimas da mesma classe. Em particular, uma dessas variações consiste na inserção de 7 resíduos em uma região altamente conservada do sítio ativo (SS-loop), alterando significativamente a conformação e dinâmica da proteína e fornecendo

assim as bases estruturais para justificar a falta de atividade observada para o produto codificado pelo gene Smp_158240. Uma análise estrutural cuidadosa do modelo predito para SmFH, associado à análise do padrão da estrutura primária encontrado para enzimas da mesma classe sugere um erro na sequência do gene depositada no banco de dados e permite propormos a correta sequência para o gene que codifica a enzima fumarato hidratase em *Schistosoma mansoni*.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, fumarato hidratase, clonagem, expressão, purificação, caracterização bioquímica, caracterização estrutural.

Abstract

Luiz de Souza, A. K. **Cloning, heterologous expression and characterization of the gene Smp_158240 from *Schistosoma mansoni***. 2013. 119 s. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

According to recent data from World Health Organization, parasitic diseases affect one sixth of the world population, with a total of over a billion people. Schistosomiasis, in particular, is a parasitic disease neglected by public health system and pharmaceutical industries, caused by trematode helminth *Schistosoma*, which affects 230 million people worldwide, 6 million in Brazil, risking about 700 million people. In the search for new tools against schistosomiasis, an important strategy consists in the identification and characterization of potential molecular targets from *Schistosoma*. Fumarate hydratase are enzymes that catalyze the reversible hydration of fumarate to malate, and have been considered potential macromolecular targets for new antiparasitic drug design. Within this context, the present work report the cloning, expression, purification and structural and biochemical characterization of Smp_158240 gene product predict to code the enzyme fumarate hydratase for *Schistosoma mansoni* (*SmFH*). The gene Smp_158240 has been chemically synthesized with optimized codons for *E. coli* expression and cloned into pET28a e pET28sumo expression vectors. The gene product, named *SmFH* has been expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified with excellent yield and purity. Dynamic light scattering studies associated with molecular exclusion chromatography have indicated that protein oligomerizes in a tetramer and circular dichroism techniques have been used to estimate secondary structure content as 60.8% in α -helix, 5.7% β -ribbon and 37.6% in coil-turn. Although results indicate that *SmFH* oligomerization and folding state are consisted with previous data reported to fumarate hydratases from class II, activity assays indicates that Smp_158240 gene product presents low fumarasic activity as well as high instability for for crystallization experiments. The 3D structure prediction by molecular modeling based on homology has allowed us to identify large differences between the *SmFH* model and the structures reported for enzymes within the same class. In particular, one of these variations includes an insertion of 7 residues in a highly conserved region within the active site (SS loop), significantly altering the conformation and dynamics of the protein and providing the structural basis in order to justify the lack of activity observed for the product of the gene Smp_158240. A careful structural analysis for the predicted model, associated to the

observation of primary structure pattern found for enzymes from the same class, suggest a mistake in the sequence reported in the data bank and allow us to predict the correct sequence that codes for the enzyme fumarate hydratase in *Schistosoma mansoni*.

Keyword: *Schistosoma mansoni*, fumarate hydratase, cloning, expression, purification, biochemical characterization, biophysical characterization.

Lista de Figuras

Figura 1	Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansoni. (Fonte: Gerência do Programa Nacional de Controle da Esquistossomose/Secretaria da Vigilância em Saúde/MS - 2008)	4
Figura 2	Distribuição das espécies dos parasitos <i>Schistosoma</i> pelo mundo (Gryseels et al., 2006)	6
Figura 3	Caracol do gênero <i>Biomphalaria</i> . Figura extraída de: http://www-ibmc.u-strasbg.fr/ridi/index.php?cont_id=26&lang=en	6
Figura 4	Esquema do ciclo de transmissão do <i>Schistosoma mansoni</i> . 1: Ovos eliminados nas fezes ou na urina. 2: Eclosão dos ovos libera os miracídios. 3: Hospedeiro intermediário (molusco) do parasita. 4: Esporocisto, 1º estágio de desenvolvimento do parasito no caramujo. 5: Cercária, 2º estágio de desenvolvimento do parasito no caramujo, e forma infectante. 6: Hospedeiro definitivo, o homem. 7: Esquistossômulo, estágio de desenvolvimento pós-penetração na pele humana. 8: Disseminação pelo sangue. 9: Parasitos atingem o fígado. 10: Formas adultas do parasita se desenvolvem no fígado. Figura adaptada de: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Schistosomiasis_Life_Cycle.jpeg	7
Figura 5	Praziquantel e oxamniquina	9
Figura 6	Reação reversível de hidratação estereoespecífica catalisada pela enzima fumarato hidratase	10
Figura 7	Estrutura tridimensional das fumarato hidratase classe II, evidenciando a formação do homotetrâmetro. A figura foi construída com base na estrutura tridimensional da enzima fumarato hidratase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (PDB 3N09).....	12
Figura 8	Conversão reversível de fumarato em S-malato pela FH. A reação fumarato > malato ocorre por ativação da molécula de água pelo grupo B. A reação inversa é uma eliminação do tipo E1cB.....	13
Figura 9	Estrutura do monômero(A) e do tetrâmero(B), evidenciando os domínios D1, D2 e D3, respectivamente em roxo, rosa e azul. As 5 hélices do domínio D2 formam um core de 20 α -hélices emparelhadas e estruturalmente rígidas. A figura foi feita utilizando a estrutura da enzima de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , PDB:3N09, no programa Pymol (Delano e Lam, 2005).....	15
Figura 10	Fumarato Hidratase classe II e seu sítio ativo. (A) Monômero evidenciando as três regiões altamente conservadas, R1 em vermelho, R2 em verde e R3 em roxo; que contribuem para a formação do sítio ativo. (B) Tetrâmero com a formação dos sítios, onde cada região faz parte de uma cadeia diferente.	15

(C) Superfície do sítio ativo com as três regiões que o compõem. Figuras feitas utilizando a estrutura nativa de *Escherichia coli*, PDB:1YFE, no programa Pymol (Delano e Lam, 2005).....

- Figura 11** Sítio ativo da enzima Fumarato Hidratase de *Mycobacterium tuberculosis*, onde os resíduos supostamente envolvidos com a catálise estão em stick (A) Enzima na presença do substrato Malato. (B) Mutante S318C, o qual perde atividade catalítica. A mutação do resíduo de serina por cisteína possibilitou a obtenção do cristal com o substrato Fumarato. Figuras feitas utilizando as estruturas de PDBs: 4ADL e 4APB, no programa Pymol (Delano e Lam, 2005). 17
- Figura 12** Ciclo de Krebs. A enzima fumarato hidratase (fumarase) catalisa a reação reversível de hidratação estereoespecífica da molécula de fumarato. Figura adaptada de: <http://chemistry.gsu.edu/Glactone/PDB/Proteins/Krebs/Krebs.html>..... 18
- Figura 13** Esquema do vetor da série pET. O plasmídeo contém a região marcadora para resistência a kanamicina (verde), o gene *lacI* (azul), o promotor de transcrição T7 (vermelho), a região do operador *lac* (celeste) e a um sítio múltiplo de clonagem (pLink) 27
- Figura 14** Esquema representando os fragmentos amplificados nas reações de PCR utilizando primers que se anelam ao vetor pET28a. Quando o gene de interesse está ausente, o fragmento amplificado possui 551 pb, quando o gene da *SmFH* se encontra inserido no vetor, entre os sítios de *Bam* HI e *Xho* I o fragmento amplificado possui 2017 pb..... 33
- Figura 15** Interação entre a cauda de histidina da enzima e o Ni^{2+} da resina Ni-NTA Agarose..... 39
- Figura 16** Esquema geral da purificação de *SmFH* por cromatografia de afinidade. Figura cedida gentilmente pelo Dr. Matheus Pinto Pinheiro, ex-aluno do Laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP..... 40
- Figura 17** Esquema da proteína *sSmFH* em fusão com a cauda proveniente da expressão no vetor pET-SUMO. A seta vermelha indica onde ocorre a clivagem feita pela protease ULP1, sítio que possui a sequência Ala-Thr-Tyr... 41
- Figura 18** A figura esquematiza o processo pelo qual partículas menores ficam retidas nos poros da resina enquanto as maiores passam diretamente. A diferença na trajetória percorrida entre partículas de tamanhos diferentes promove a separação entre elas. Figura adaptada de (Stryer, Berg e Tymoczko, 2012)..... 44
- Figura 19** Gel de agarose 0,8% das amostras da reação de PCR de colônia mostrando os clones positivos (em vermelho) da cepa DH10b. O fragmento amplificado possui o tamanho esperado de 2017 pb..... 53

- Figura 20** **A.** Digestão das construções *SmFH*-pET28a e do vetor pET28sumo a partir de um uma construção em que já existia um fragmento inserido no sítio múltiplo de clonagem. **B.** Amostras do pET28sumo e do gene de interesse digeridos e purificados..... 54
- Figura 21** Gel de agarose 0,8% das amostras da reação de PCR de colônia mostrando os clones positivos (em vermelho). A banda de aproximadamente 2400 pb pode ser visualizada, confirmando a presença do inserto..... 55
- Figura 22** SDS-PAGE (15% poliacrilamida). Ensaio de expressão a 18°C para a construção *SmFH*-pET28a (~58 kDa). Os retângulos vermelhos indicam as bandas de expressão na fração e solúvel insolúvel. **A.** 6 horas de indução. **B.** 24 horas de indução. A enzima de interesse possui tamanho de 58 kDa..... 56
- Figura 23** SDS-PAGE (15% poliacrilamida) representando os diferentes passos de purificação na coluna de Ni da enzima p*SmFH*. **A.** Nas posições 1 e 2 estão representadas a fração insolúvel e o efluente, respectivamente. Nas posições 3 a 5 estão representadas as lavagens 2, 20 e 40 com 0 mM de imidazol, respectivamente. E nas posições 6 a 8 estão representadas as lavagens 1, 2 e 20 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 8 estão representadas as eluições 1, 3, 8, 15 com 100 mM de imidazol, respectivamente. **C.** Nas posições 1 a 4 estão representadas as eluições 1, 3, 10 e 15 com 250 mM de imidazol, respectivamente. Nas posições 5 a 7 estão representadas as eluições 1, 5 e 10 com 500 mM de imidazol, respectivamente. Apontada pela seta vermelha está a banda referente a proteína expressa pela construção *SmFH*-pET28a, que possui cerca de 58 kDa..... 57
- Figura 24** SDS-PAGE (15% poliacrilamida) representando os diferentes passos de Purificação na coluna de Ni da enzima s*SmFH*. **A.** Nas posições 1 e 2 estão representadas a fração insolúvel (pellet) e o efluente, respectivamente. Na posição 3 está representada a lavagem com tampão 0 mM de imidazol. Nas posições 4 a 6 estão representadas as lavagens 2, 3 e 4 com tampão 25 mM de imidazol, respectivamente. E nas posições 7 a 9 estão representadas as lavagens 2, 3 e 4 com 50 mM de imidazol, respectivamente. **B.** Nas posições 1 a 3 estão representadas a eluição da enzima s*SmFH* com tampão 0 mM de imidazol, após a clivagem da cauda. Nas posições 4 e 5 estão representadas as eluição com o tampão 25 mM de imidazol. E nas posições 6 a 9 estão representadas as eluições finas com o tampão com 500 mM de imidazol. Apontada pela seta vermelha está a banda referente à proteína s*SmFH*, com aproximadamente 55 kDa e a cauda que é liberada após a clivagem..... 58
- Figura 25** Padronização da coluna Superdex 200 (10/300) (GE)[®] através da utilização dos marcadores aprotinina (6,5 kDa), ribonuclease (13,7 kDa), anidrase (29 59

kDa), ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa), ferritina (440 kDa). Os diferentes volumes de eluição foram utilizados para a determinação da curva de calibração da resina.....

- Figura 26** Regressão linear para a determinação da função que correlaciona massa molecular com volume de eluição dos padrões aplicados na coluna Superdex 200 (10/300). $\ln M_r = \text{logaritmo da massa molecular}$. $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_c - V_0)$, onde V_e é o volume de eluição, V_0 é o volume de exclusão, e V_c é o volume da coluna..... 60
- Figura 27** V_0 corresponde ao volume morto ou void da coluna e se refere ao volume de coluna ao qual moléculas maiores que os poros tem acesso. O V_T é a soma entre o volume externo as esferas porosas da matriz (V_0) e o volume interno das esferas corresponde ao volume que partículas menores têm acesso durante a cromatografia. O volume interno das esferas pode ser calculado subtraindo V_T de V_0 60
- Figura 28** Perfil de eluição da *SmFH* em coluna Superdex 200 (10/300), equilibrada com tampão Tris 50mM pH8,15, KCl 150mM e 0,01% de Triton..... 61
- Figura 29** Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a enzima *SmFH*, com os tampões acetato de sódio 50 mM pH 4 e pH 5; cacodilato de sódio 50 mM pH6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e concentração de 150 mM de NaCl..... 62
- Figura 30** Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a enzima *SmFH*, com os tampões Tris 50 mM pH7,5 , pH 8 e pH 8,5; e Glicina pH 9 e pH 10 e concentração de 150 mM de NaCl..... 63
- Figura 31** Estimativas, em Å, do tamanho da fumarato hidratase de *E. coli*, feita com a medida da distância das extremidades da estrutura, PDB: 1YFE. O valor das medidas se aproxima do valor do diâmetro hidrodinâmico obtido experimentalmente para *SmFH*..... 64
- Figura 32** Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a enzima *SmFH* nos tampões MES pH 6,5; Tris 50 mM pH 7,5 e pH 8,5, e concentração de 1M de NaCl..... 65
- Figura 33** Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a enzima *SmFH* nos tampões MES pH 6,5; Tris 50 mM pH 7,5 e pH 8,5, e concentração de 150mM de KCl..... 66
- Figura 34** Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a proteína *SmFH* nos tampões cacodilato de sódio 50 mM pH6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; tris 50 mM pH7,5 , pH 8 e 66

	pH 8,5, e concentração de 150mM de NaCl, com 10% de glicerol.....	
Figura 35	Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a proteína <i>SmFH</i> nos tampões cacodilato de sódio 50 mM pH6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; tris 50 mM pH7,5 , pH 8 e pH 8,5, e concentração de 150mM de NaCl, com 5% de tacsinato.....	67
Figura 36	Espectro de Dicroísmo Circular da enzima <i>SmFH</i>	69
Figura 37	Curvas de CD de ensaio de desnaturação térmica da <i>SmFH</i>	70
Figura 38	Curva de transição da <i>pSmFH</i> induzida pelo aumento da temperatura.....	71
Figura 39	Curva de atividade monitorada a 250nM. A concentração final de proteína foi de 200ug/mL, na presença de 50 mM de malato em pH 8,5.....	73
Figura 40	Formas de cristalização de proteínas por difusão de vapor: Gota suspensa (hanging drop) e gota sentada (sitting drop) (figura cedida por Matheus P. Pinheiro).....	78
Figura 41	Sobreposição das estruturas da enzima humana (rosa), de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (ciano) e do modelo do monômero da <i>SmFH</i> (roxo). Os dois loops em vermelho representam as regiões que apresentam as maiores diferenças entre o modelo e as estruturas usadas como molde.....	81
Figura 42	Sobreposição da estrutura fumarato hidratase de <i>E. coli</i> (cinza), com o modelo do tetrâmero da <i>SmFH</i> (cadeia B-azul, cadeia C-rosa, cadeia D-amarelo). Em vermelho está a inserção de 7 aminoácidos encontrada na <i>SmFH</i>	82
Figura 43	Superfície de potencial eletrostático da proteína <i>SmFH</i> . A inserção modelada como loop (região em sticks), presente na superfície apresenta-se bem carregada, assim, pode assumir diferentes conformações.....	83
Figura 44	Figura em estéreo da sobreposição da estrutura fumarato hidratase de <i>E. coli</i> (cinza), com o modelo do tetrâmero da <i>SmFH</i> (cadeia A - verde, cadeia B - azul, cadeia C - rosa). Em vermelho está a inserção de 7 aminoácidos encontrada na <i>SmFH</i>	85

Lista de Tabelas

Tabela 1	Reação de amplificação do gene <i>Smp_158240</i> que codifica <i>SmFH</i> , a partir do cDNA.....	25
Tabela 2	Quantidade de enzimas e de tampão utilizadas para a reação de digestão do gene sintético e dos vetores da série pET.....	28
Tabela 3	Quantidades de vetor, inserto e ligase utilizados nas reações de ligação do inserto ao vetor de expressão pET28a.....	29
Tabela 4	Quantidade de enzimas e de tampão utilizadas para a reação de digestão do inserto e do vetor pET28sumo.....	34
Tabela 5	Quantidades de vetor, inserto e ligase utilizados nas reações de ligação do inserto ao vetor pET28sumo.....	35
Tabela 6	Comparação entre o conteúdo de estrutura secundária de fumarases da classe II que possuem estrutura resolvida, com o conteúdo da <i>SmFH</i> , calculado através da desconvolução do espectro de CD.....	70
Tabela 7	Estruturas utilizadas como molde para a modelagem por homologia, sua identidade sequencial com a enzima <i>SmFH</i> , e a resolução.....	80

Lista de Abreviaturas e Siglas

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CD	Dicroísmo circular
cDNA	DNA complementar
<i>DALY</i>	Anos de vida ajustados por incapacidade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Imunoensaio enzimático
FH	Fumarato hidratase
<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
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
His	Histidina
<i>IPTG</i>	Isopropiltio- β -D-galactosídeo
kDA	Kilo Daltons
LB	Luria-Bertani
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
Ni-NTA	Ácido nitrilotriacético
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pl	Ponto isoelétrico
pKa	Constante de acidez
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
<i>SmFH</i>	Fumarato Hidratase de <i>Schistosoma mansoni</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
ULP1	Ubiquitin Like Protein – 1

Sumário

RESUMO	I
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas	2
1.2. Esquistossomose	3
1.2.1. História	3
1.2.2. Epidemiologia.....	4
1.2.3. O parasito e a Fisiopatologia da doença	5
1.2.4. Diagnóstico e Tratamento	8
1.3. Fumarato Hidratase.....	10
1.3.1. Classificação	11
1.3.2. Mecanismo catalítico	12
1.3.3. Análise Estrutural	14
1.3.4. Importância Biológica.....	17
1.3.5. Fumarato Hidratase de <i>Schistosoma mansoni</i>	18
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Clonagem do gene Smp_158240 que codifica a enzima <i>SmFH</i>	24
3.1.1. Construção do cDNA	24
3.1.2. Amplificação do gene que Smp_158240.....	25
3.1.3. Subclonagem do gene sintético que codifica a enzima <i>SmFH</i>	26
3.1.4. Subclonagem do gene que codifica a <i>SmFH</i> no vetor pET28a	26
3.1.5. Digestão dos vetores de expressão e da construção <i>SmFH</i> -pUCminusMCS.....	27
3.1.6. Reação de ligação do vetor pET28a ao gene Smp_158240.....	28
3.1.7. Preparação das bactérias <i>Escherichia coli</i> DH5 α e BL21(DE3) competentes.....	29
3.1.8. Transformação das cepas de <i>Escherichia coli</i> competentes com o material das ligações	30
3.1.9. Análise da presença e isolamento do plasmídeo recombinante <i>SmFH</i> -pET28a	31
3.1.10. Subclonagem do gene que codifica a <i>SmFH</i> no vetor pET28sumo	33
3.2. Expressão heteróloga da <i>SmFH</i>	35

3.2.1.	Ensaio inicial de expressão da construção <i>SmFH</i> -pET28a.....	36
3.3.	Purificação da <i>SmFH</i>	38
3.3.1.	Purificação da p <i>SmFH</i>	38
3.3.2.	Purificação da s <i>SmFH</i>	40
3.4.	Dosagem da proteína <i>SmFH</i>	41
3.5.	Cromatografia por Filtração em gel	42
3.6.	Espalhamento dinâmico de luz	44
3.7.	Ensaio de atividade.....	45
3.8.	Dicroísmo circular.....	46
3.9.	Cristalização da enzima <i>SmFH</i>	47
3.10.	Modelagem molecular da enzima <i>SmFH</i>	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1.	Clonagem do gene <i>Smp_158240</i> que codifica a enzima <i>SmFH</i>	51
4.1.1.	Subclonagem do gene que codifica a <i>SmFH</i> no vetor pET28a	52
4.1.2.	Clonagem no vetor pET28sumo	53
4.2.	Expressão heteróloga do produto codificado pelo gene <i>Smp_158240</i>	54
4.3.	Purificação da <i>SmFH</i>	55
4.3.1.	Purificação da p <i>SmFH</i>	55
4.3.2.	Purificação da s <i>SmFH</i>	56
4.4.	Cromatografia por Filtração em gel	58
4.5.	Espalhamento dinâmico de luz	60
4.6.	Dicroísmo circular (CD).....	66
4.7.	Ensaio de atividade da <i>SmFH</i>	70
4.8.	Cristalização.....	74
4.9.	Modelagem por homologia.....	76
5.	CONCLUSÕES.....	87
6.	REFERÊNCIAS.....	91

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas

A grande maioria das doenças parasitárias são atualmente classificadas como doenças tropicais negligenciadas (DTN). As DTN são um grande e complexo grupo de doenças que se desenvolvem em climas quentes e úmidos (clima tropical) e que prevalecem em condições de pobreza. Além disso, as DTN contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade social e más condições de vida, pois são responsáveis pela morte e incapacitação temporária ou permanente de milhões de pessoas. Assim, afetam não só o indivíduo acometido pela doença, mas também toda a família e comunidade envolvida, causando a redução da produtividade e qualidade de vida da população e representando forte entrave ao desenvolvimento socioeconômico dos países mais afetados (www.who.int).

A falta de investimento, seja do setor público ou privado, para a prevenção, controle e busca por novas terapias para o tratamento, são os fatores que caracterizam essas doenças como negligenciadas no cenário mundial. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas, um sexto da população mundial, estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, que são endêmicas em populações de baixa renda, localizadas principalmente em países pobres e em desenvolvimento da África, Sudeste Asiático, América Latina e Caribe.

A maioria das DTN não dispõe de tratamentos adequados ou eficientes, muitos medicamentos utilizados são antigos, com problemas como baixa eficiência e sérios efeitos colaterais (Croft, Sundar e Fairlamb, 2006). Além disso, em alguns casos onde poderia haver a prevenção, o tratamento e a cura com os medicamentos existentes, a falha na aplicação de políticas públicas compromete o controle da doença (Baker *et al.*, 2010; Gyapong *et al.*, 2010; Liese, Rosenberg e Schratz, 2010). Esse quadro evidencia a necessidade de investimento em novas políticas de controle

e prevenção e também em pesquisa e desenvolvimento de estratégias de tratamento e diagnóstico eficazes, que possibilitem uma melhoria na condição de vida da população que continua a ser assolada por essas doenças.

1.2. Esquistossomose

1.2.1. História

A esquistossomose ou bilharzíase, doença parasitária que se encontra no grupo das DTN, ficou assim conhecida por ter sido descrita primeiramente em humanos pelo patologista alemão Theodor Maximilian Bilharz (1825-1862) (Contis e David, 1996; Liese, Rosenberg e Schratz, 2010). Ele realizou mais de 400 necrópsias no Egito a fim de identificar parasitas intestinais tropicais e subtropicais. Em seus estudos, ele relatou a descoberta de um parasita na região da veia porta, o qual inicialmente acreditava ser uma cercária e posteriormente descobriu ser um trematódeo com sexos separados. O médico chegou a descrever o ciclo de vida do parasita em detalhes e nomeou o mesmo de *Distomum* (Andrawis e Andrawis, 2008).

No Brasil, a identificação do *Schistosoma mansoni* foi feita pelo médico e pesquisador Manuel Augusto Pirajá da Silva (1873-1961), que publicou seu primeiro trabalho sobre a esquistossomose na Revista *Brazil Médico* de número 1, intitulado “*Contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia*” (Pirajá Da Silva, 1908).

1.2.2. Epidemiologia

Atualmente, a esquistossomose se tornou uma das mais sérias e prevalentes doenças parasitárias pelo mundo, responsável por mais de 500.000 mortes por ano (Pereira *et al.*, 2010). A doença afeta 77 países e territórios localizados em regiões tropicais e subtropicais (Han *et al.*, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que mais de 230 milhões de pessoas estejam infectadas por todo o mundo e cerca de 800 milhões estejam sob o risco de contrair a doença. Dos 74 países endêmicos, 54 estão localizados na Ásia, África e América. Na América Latina, os países acometidos pela doença são a Venezuela, as Ilhas do Caribe e o Brasil, que possui a maior área endêmica das Américas.

No Brasil, a doença é distribuída em 19 estados e, segundo o Ministério da Saúde, cerca de 100 mil casos são confirmados a cada ano, totalizando mais de 6,5 milhões de casos (**Figura 1**). Somente na região nordeste do país acredita-se que haja mais de 2,5 milhões de pessoas infectadas (Da Silva, Chieffi e Carrillo, 2005; D. *et al.*, 2012; Rollinson *et al.*, 2012).

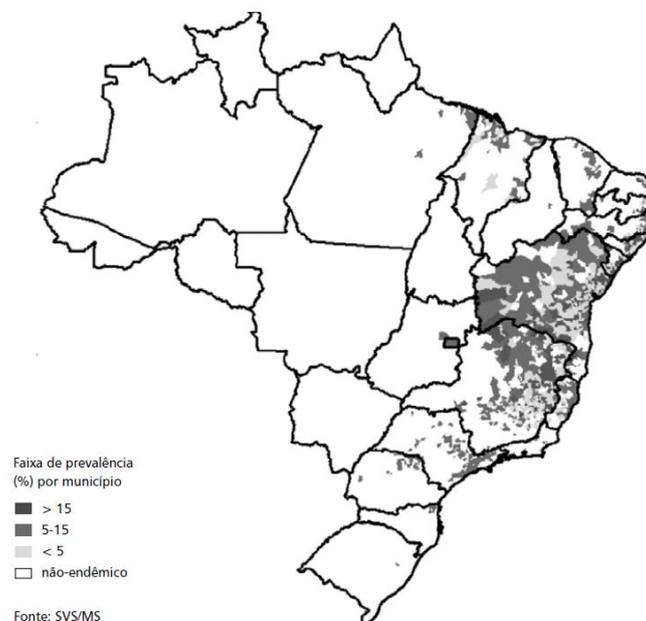


Figura 1. Áreas endêmicas e focais da esquistossomose *mansoni*. (Fonte: Gerência do Programa Nacional de Controle da Esquistossomose/Secretaria da Vigilância em Saúde/MS - 2008)

A esquistossomose é caracterizada por um valor de *DALY's* – disability-adjusted life years de 1,7 a 4,5 milhões de anos, um indicador dos anos de vida perdidos pela doença somados aos anos vividos com incapacidades vinculadas aos problemas de saúde causados pela doença. Entre todas as DTN, a doença possui um dos índices mais altos do *DALY* (Who, 2002). Dentre os indivíduos acometidos, 10% apresentam a forma severa da doença, que se caracteriza por um conjunto de manifestações clínicas como dor abdominal, diarreia e sangramento retal, e sangue na urina, além de inchaço do fígado e até do baço, que é comum em casos avançados da doença, além disso, 50-60% dos infectados, mais de 100 milhões de indivíduos, apresentam alguma dessas manifestações clínicas (Pereira *et al.*, 2010).

1.2.3. O parasito e a Fisiopatologia da doença

A esquistossomose é causada pelo parasita do gênero *Schistosoma*, que pertencem à família *Schistosomatidae*, classe *Trematoda*, subclasse *Digenea*. Estes parasitas apresentam sexos separados, e se distinguem dos outros representantes da subclasse *Digenea*, que são hermafroditas (Rey, 2001).

Em humanos, a doença é causada por 6 espécies do gênero *Schistosoma*: *S. mekongi*, *S. intercalum*, *S. malayensis*, *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*, sendo as três últimas, as espécie com maior importância em saúde pública. A incidência das espécies varia muito de acordo com a região (**Figura 2**).

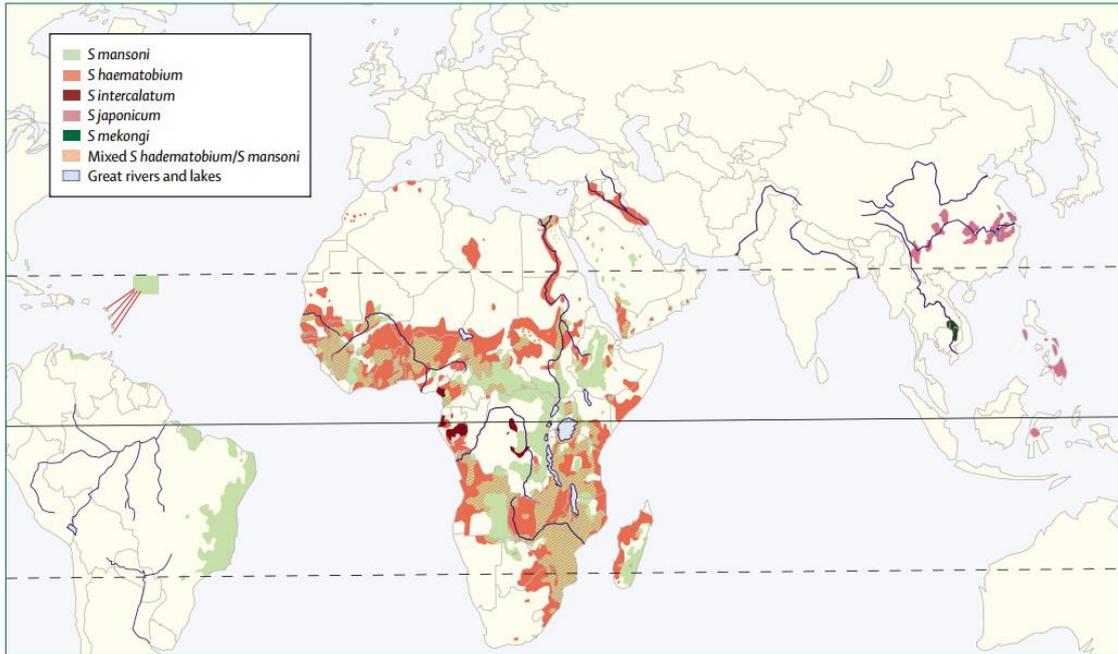


Figura 2. Distribuição das espécies dos parasitos *Schistosoma* pelo mundo (Gryseels *et al.*, 2006).

No Brasil, o único agente etiológico da doença é o *Schistosoma mansoni*. Este possui um ciclo de desenvolvimento bastante complexo envolvendo a reprodução assexuada em um hospedeiro molusco intermediário (**Figura 3**), dois estágios na forma de larva existentes na água (ambas adaptadas para otimizar a transmissão entre os hospedeiros), e a forma sexual adulta, que é a forma encontrada no hospedeiro humano.



Figura 3. Caracol do gênero *Biomphalaria*.

Figura extraída de: http://www-ibmc.u-strasbg.fr/ridi/index.php?cont_id=26&lang=en.

Dentro do organismo humano, a fêmea produz ovos que são eliminados nas fezes e na urina. O estágio larval, o miracídio, emerge dos ovos quando estes atingem a água e a larva penetra no hospedeiro intermediário, o caramujo. Depois de um período de multiplicação e desenvolvimento no caramujo, emerge a forma infectante do parasito, a cercária, forma larval de vida livre na água, que infecta os humanos. Depois de penetrar na pele humana, o parasita (esquistossômulo) deixa a pele via vasos linfáticos e sanguíneos e atinge os pulmões e coração. Dias depois, os vermes deixam os pulmões e o coração e atingem o fígado e o intestino, aqueles que atingem o sistema porta hepático tornam-se adultos e migram para os vasos sanguíneos novamente (**Figura 4**) (Cox, 2002; Gryseels *et al.*, 2006).

ESQUISTOSSOMOSE

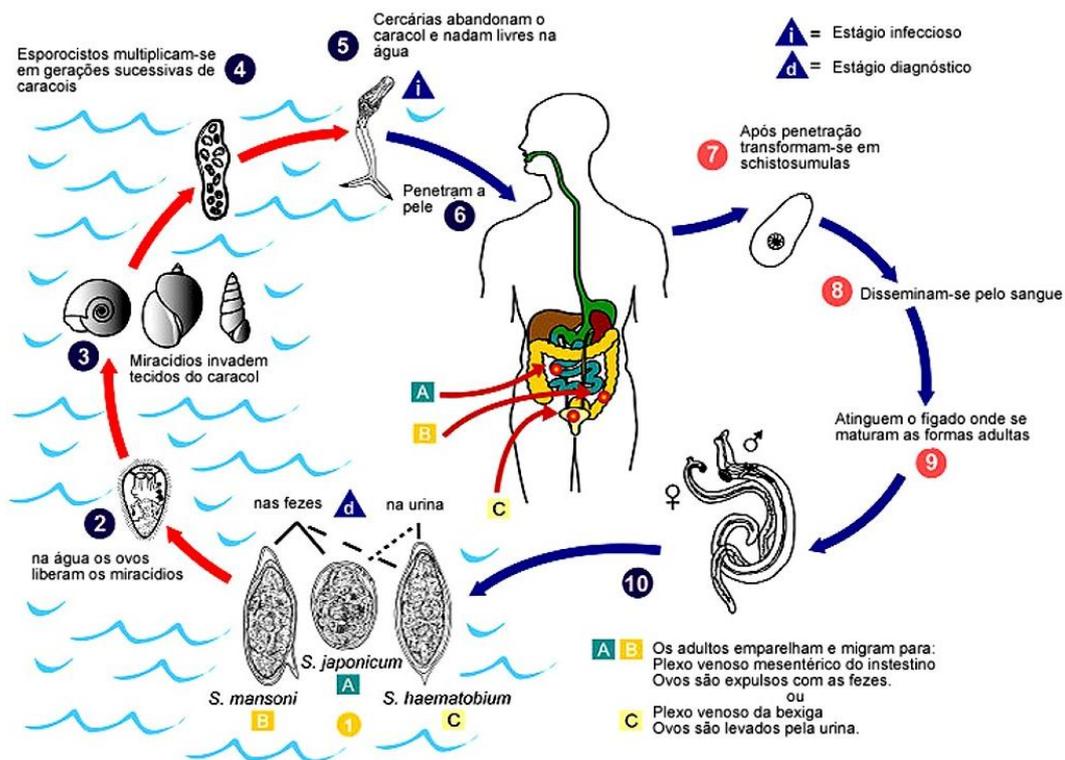


Figura 4. Esquema do ciclo de transmissão do *Schistosoma mansoni*. 1: Ovos eliminados nas fezes ou na urina. 2: Eclosão dos ovos libera os miracídios. 3: Hospedeiro intermediário (molusco) do parasita. 4: Esporocisto, 1º estágio de desenvolvimento do parasito no caramujo. 5: Cercária, 2º estágio de desenvolvimento do parasito no caramujo, e forma infectante. 6: Hospedeiro definitivo, o homem. 7: Esquistossômulo, estágio de desenvolvimento pós-penetração na pele humana. 8: Disseminação pelo sangue. 9: Parasitos atingem o fígado. 10: Formas adultas do parasita se desenvolvem no fígado. Figura adaptada de:

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Schistosomiasis_Life_Cycle.jpeg

Os parasitos adultos machos medem aproximadamente 1 cm de comprimento e 0,1 cm de largura. A fêmea tem um corpo cilíndrico, mais longo e mais fino que o macho (1,2-1,6 cm de comprimento por 0,016 cm de largura) (Machado-Silva *et al.*, 1995).

Dentro do organismo humano, as fêmeas presentes nas vênulas do mesentério chegam a produzir 400 ovos por dia. Nem todos os ovos são eliminados através da excreção e eliminação da urina, o que resulta na resposta inflamatória desencadeada pelo ovo “preso” no tecido. A morbidade e os sintomas causados pela esquistossomose estão frequentemente associados a lesões patológicas que resultam da resposta imune do organismo devido à magnitude da exposição antigênica gerada pela grande quantidade de ovos no tecido (Meira, 1991).

1.2.4. Diagnóstico e Tratamento

A forma de diagnosticar a doença mais utilizada é o método de Kato Katz (Katz, Coelho e Pellegrino, 1970; Katz, Chaves e Pellegrino, 1972) recomendado pela OMS. É um método fácil e rápido, que se baseia na identificação de ovos do parasita nas fezes do paciente. Existem ensaios sorológicos, como ELISA, e ensaios moleculares, como PCR, que podem auxiliar no diagnóstico (Rabelo *et al.*, 1997; Pontes, Dias-Neto e Rabello, 2002)

Até o presente momento ainda não foi encontrada uma maneira completamente eficaz para o tratamento ou erradicação da esquistossomose. O primeiro tratamento relatado na literatura foi feito com antimônios trivalentes, como o antimônio de tartarato de potássio, surgindo vários medicamentos a partir deste. Entretanto, todos esses compostos eram extremamente tóxicos para o músculo cardíaco e dolorosos para a aplicação intramuscular. Nos últimos 30 anos, o tratamento específico da esquistossomose passou a ser feito com compostos como o praziquantel e o oxamniquina (**Figura 5**). O tratamento com essas drogas é uma importante ferramenta para controle da morbidade e da prevalência (Coura e Conceicao, 2010). Porém, a eficácia desses medicamentos é restrita ao estágio adulto do parasito e o mecanismo de ação ainda não é completamente elucidado

(Angelucci *et al.*, 2007; Doenhoff, Cioli e Utzinger, 2008). Além disso, as formas de tratamento atuais, apesar de serem uma boa estratégia para o controle da morbidade, não conferem imunidade aos pacientes tratados, que apresentam alto risco de reinfecção, uma vez que estes indivíduos vivem em áreas de risco, sendo continuamente infectados.

Atualmente o praziquantel é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose, devido à sua relação custo/benefício. Entretanto, praziquantel e oxamniquina se equivalem quanto à segurança e eficácia. Apesar da relativa eficácia, estes medicamentos apresentam efeitos colaterais como tonturas, náuseas, vômito, cefaleia e sonolência, os quais dificultam a adesão do paciente ao tratamento (Danso-Appiah e De Vlas, 2002).

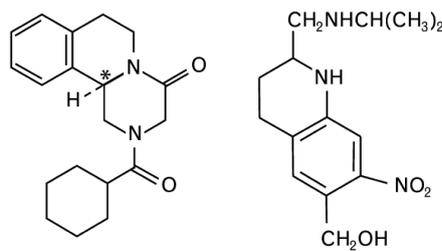


Figura 5. Praziquantel e oxamniquina

Algumas cepas do parasita *Schistosoma mansoni* menos sensíveis ao praziquantel já foram isoladas, e considerando que o fármaco é administrado a mais de 100 milhões de pessoas a cada ano, a resistência pode se tornar um sério problema, devido à massiva administração do medicamento (Fallon *et al.*, 1996).

Uma nova perspectiva para o combate a esquistossomose foi recentemente divulgada pelos pesquisadores brasileiros da Fundação Oswaldo Cruz que anunciaram o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose com base em uma proteína que liga ácido graxo e possui 14 kDa chamada de Sm14. Esta proteína é importante para a captação, transporte e compartimentalização de ácidos graxos no parasita. Em testes realizados, sua alta imunogenicidade tem mostrado efeito protetor contra a infecção pela doença. Porém a vacina se encontra ainda na fase inicial de testes

clínicos, além de ser somente um método preventivo contra a doença, mas não curativo, ou terapêutico (Tendler e Simpson, 2008).

Tendo em vista a magnitude do problema de saúde pública associado a essa doença, a organização Mundial da Saúde (OMS) têm tratado a busca de novos fármacos contra a Esquistossomose como uma necessidade e uma prioridade (Stothard *et al.*, 2009). Dentro deste contexto, o a caracterização funcional e estrutural de enzimas do agente *Schistosoma mansoni* pode ser uma importante estratégia para na busca de potenciais alvos para o planejamento racional de fármacos com ação antiesquistossomose.

1.3. Fumarato Hidratase

Na busca por potenciais alvos para o planejamento racional de fármacos antiesquistossomose, nosso laboratório está interessado em estudar a enzima fumarato hidratase (FH) de *Schistosoma mansoni*. As fumarato hidratases também chamadas de fumarases, são enzimas que catalisam a hidratação **reversível** da molécula de fumarato em S-malato (**Figura 6**).

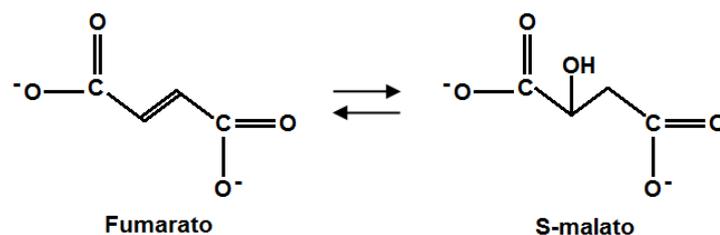


Figura 6. Reação reversível de hidratação estereoespecífica catalisada pela enzima fumarato hidratase.

1.3.1. Classificação

Inicialmente, duas classes distintas de fumarases, classe I e II, foram identificadas. Embora estas estejam funcionalmente relacionadas, compartilham baixa identidade sequencial (Williams *et al.*, 1992; Weaver *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1997). 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, tal como fungos (Wu e Tzagoloff, 1987), mamíferos (Suzuki *et al.*, 1989) e plantas superiores (Nast e Mullerrober, 1996). Em contraste, fumarases da classe I (incluindo *fumA* e *fumB*) são homodiméricas, termolábeis, ligam ferro e contém aproximadamente 120kDa. Fumarases da classe I estão presentes em alguns eucariotos unicelulares como tripanossomatídeos e bactérias, incluindo *E. coli* que possui fumarases de ambas as classes (Woods, Schwartzbach e Guest, 1988).

Além destas duas classes, recentemente, um novo grupo de fumarases foi descrito, este apresenta maior identidade sequencial com as fumarases da classe I, aproximadamente 33%. São enzimas heterodiméricas, possuem um cluster Fe-S, são sensíveis a oxigênio e termoestáveis (Shimoyama *et al.*, 2007; Van Vugt-Lussenburg *et al.*, 2009).

As fumarases da classe II de diversas origens compartilham de 50 a 65% de identidade sequencial (Reaney, Bungard e Guest, 1993). A *fumC* pertence a uma família de enzimas tetraméricas estruturalmente relacionadas (**Figura 7**), incluindo a aspartase, argininosuccinase (Woods, Schwartzbach e Guest, 1988), e adenilosuccinase (He, Smith e Zalkin, 1992), com 38%, 15% e 19% de identidade respectivamente.

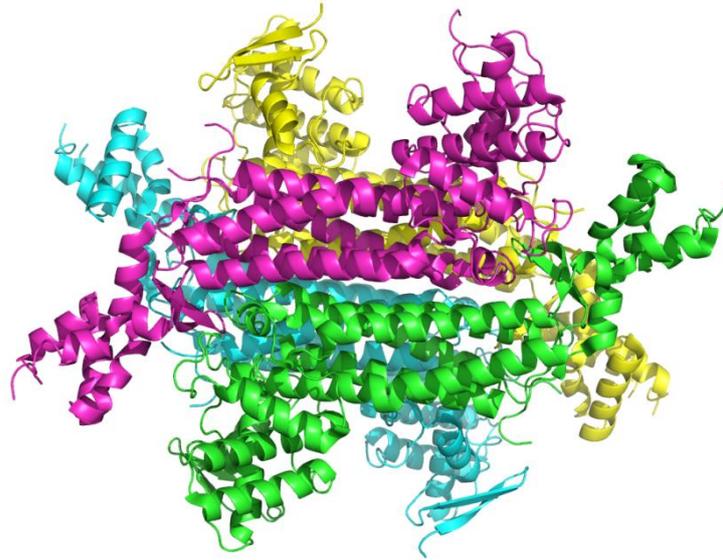


Figura 7. Estrutura tridimensional das fumarato hidratase classe II, evidenciando a formação do homotetrâmetro. A figura foi construída com base na estrutura tridimensional da enzima fumarato hidratase de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB 3NO9).

1.3.2. Mecanismo catalítico

Apesar de sua importância biológica, o mecanismo de reação da fumarase não é ainda completamente entendido. A reação de fumarato para S-malato é mais bem entendida, e envolve uma hidratação estéreo-específica do fumarato para produzir S-malato pela trans-adição 1,4 de um grupo hidroxila e um átomo de hidrogênio (**Figura 8**).

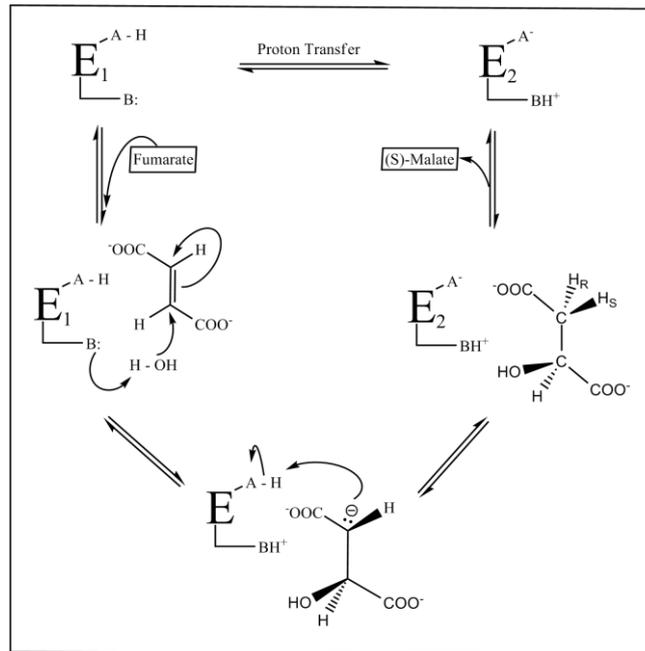


Figura 8. Conversão reversível de fumarato em S-malato pela FH. A reação fumarato \rightarrow malato ocorre por ativação da molécula de água pelo grupo B. A reação inversa é uma eliminação do tipo E1cB.

Hipóteses para descrever o mecanismo catalítico das enzimas fumarato hidratase da classe II sugerem que a formação de malato a partir de fumarato ocorre através do ataque do grupo nucleofílico B da enzima ao hidrogênio de uma molécula de água enquanto o grupo hidroxila da água, ativado, ataca o carbono do fumarato. Um par de elétrons da dupla ligação se desloca para o outro carbono, gerando o carbânion, e ataca o átomo de hidrogênio da espécie A-H da enzima. O resultado é uma molécula de S-malato e a forma zwitteriônica da enzima (Figura 8).

O mecanismo proposto para a catálise no sentido de formação de fumarato envolve a remoção de uma molécula de água do L-malato, formando o composto olefínico fumarato. Entretanto, a água é removida em duas etapas, primeiro há a formação do próton e depois a saída de um íon OH^- . Novamente, dois grupos são necessários para a reação catalítica. A enzima com o grupo A protonado não apresenta o correto estado de protonação para a reação de formação de fumarato.

O próton do A deve deixar o grupo para que o malato se ligue. Assim o grupo B se torna o acceptor para a remoção do próton da posição C3 do L-malato, formando um carbânion, que é estabilizado pela forma de ressonância, o intermediário acicarboxilato. No ponto em que se forma o acicarboxilato, ambos A e B estão protonados. O rearranjo subsequente do acicarboxilato e a doação de um próton do grupo B da enzima para o grupo abandonador OH⁻ no carbono C2 leva a formação de uma molécula de água. O próton removido na primeira etapa da reação permanece no grupo A, e sua remoção provavelmente ocorre no próximo ciclo catalítico. B(Weaver e Banaszak, 1996; Begley e McMurry, 2005; Hegeman e Perry, 2007).

1.3.3. Análise Estrutural

Enquanto nenhum dado estrutural se encontra disponível na literatura para membros da classe 1 (nosso laboratório recentemente determinou a estrutura da fumarato hidratase citosólica de *Leishmania major*), sabe-se que as FHs da classe II compartilham elevada similaridade estrutural, e possuem um motivo estrutural comum a todas as estruturas disponíveis. Cada subunidade do tetrâmero é composta de três domínios, D1, D2 e D3 (Figura 9). O domínio D1 começa no N-terminal enquanto o D3 é composto pela extremidade C-terminal da cadeia. O domínio central, D2, é composto de um conjunto de seis longas hélices empacotadas paralelamente. A associação dos quatro domínios D2 no tetrâmero forma um core de 20 α -hélices que ficam emparelhadas e estruturalmente rígidas. Os outros dois domínios, D1 e D3, são projeções a partir das extremidades N e C-terminal. (Weaver *et al.*, 1998; Weaver, 2005; Mechaly *et al.*, 2012)

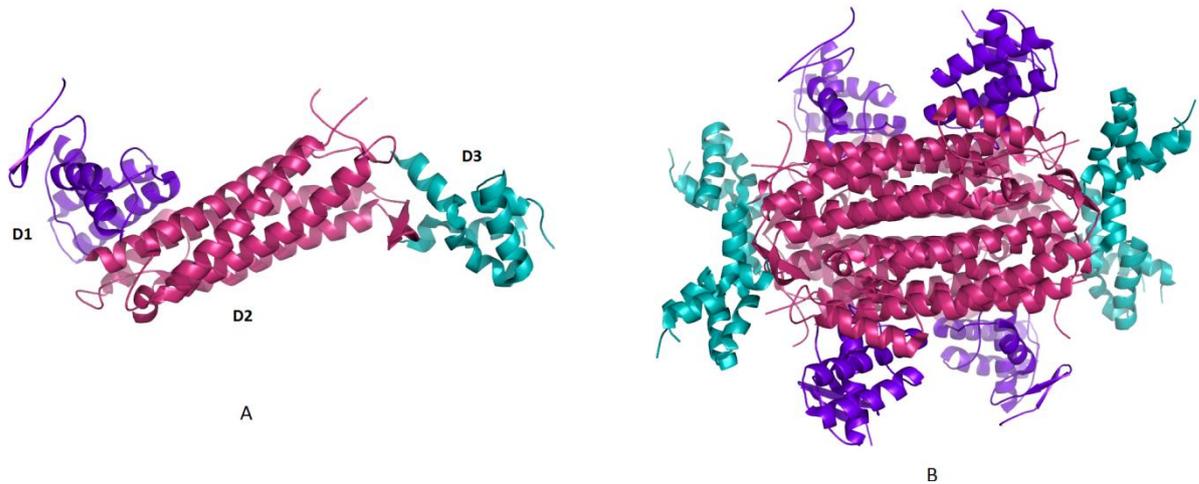


Figura 9. Estrutura do monômero (A) e do tetrâmero (B), evidenciando os domínios D1, D2 e D3, respectivamente em roxo, rosa e azul. As 5 hélices do domínio D2 formam um core de 20 α -hélices emparelhadas e estruturalmente rígidas. A figura foi feita utilizando a estrutura da enzima de *Mycobacterium tuberculosis*, PDB: 3N09, no programa Pymol (Delano e Lam, 2005).

O sítio ativo das FHs classe II é formado por resíduos de três diferentes regiões da cadeia (R1, R2 e R3) altamente conservadas entre as enzimas da classe (Figura 10). É uma região de encontro de 3 das 4 cadeias do tetrâmero, cada região é doada por uma subunidade distinta do tetrâmero para formar um sítio ativo. Dessa forma, existem 4 sítios ativos no tetrâmero, porém cada um deles possui uma combinação das regiões R1, R2 e R3 de diferentes cadeias (**Figura 10**) (Weaver, 2005).

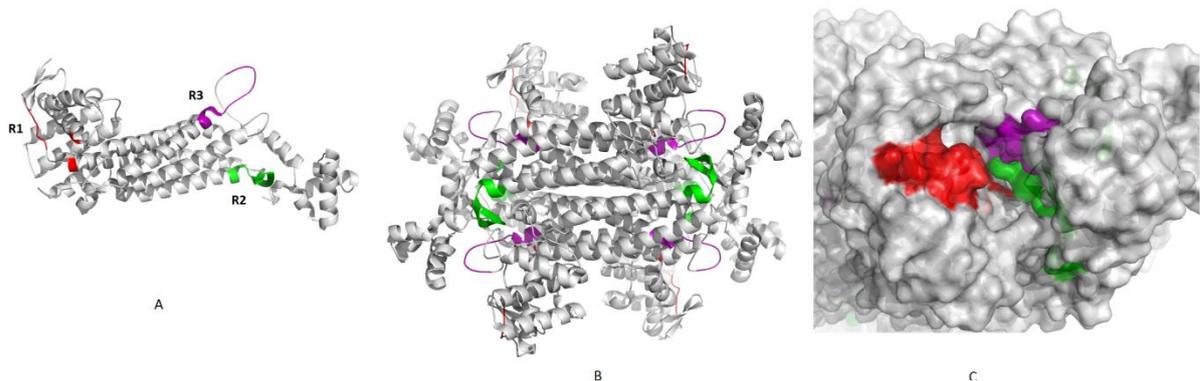


Figura 10. Fumarato Hidratase classe II e seu sítio ativo. (A) Monômero evidenciando as três regiões altamente conservadas, R1 em vermelho, R2 em verde e R3 em roxo; que contribuem para a formação do sítio ativo. (B) Tetrâmero com a formação dos sítios, onde cada região faz parte de uma cadeia diferente. (C) Superfície do sítio ativo com as três regiões que o compõem. Figuras feitas utilizando a estrutura nativa de *Escherichia coli*, PDB:1YFE, no programa Pymol (Delano e Lam, 2005).

Estudos estruturais com a enzima fumarato hidratase classe II de *E. coli* nativa e em complexo com diversos ligantes sugerem que o grupo A, que participa da catálise conforme descrito na figura 8 é composto pelo par his187-glu331 (Weaver, 2005). Já estudos mais recentes com a fumarato hidratase do microorganismo *Mycobacterium Tuberculosis*, sugerem que o papel do grupo B, descrito no mecanismo de reação, é realizado pelo resíduo Ser318 (**Figura 11a**), cuja importância catalítica já foi confirmada com a realização de mutagênese sítio-dirigida (**Figura 11b**).

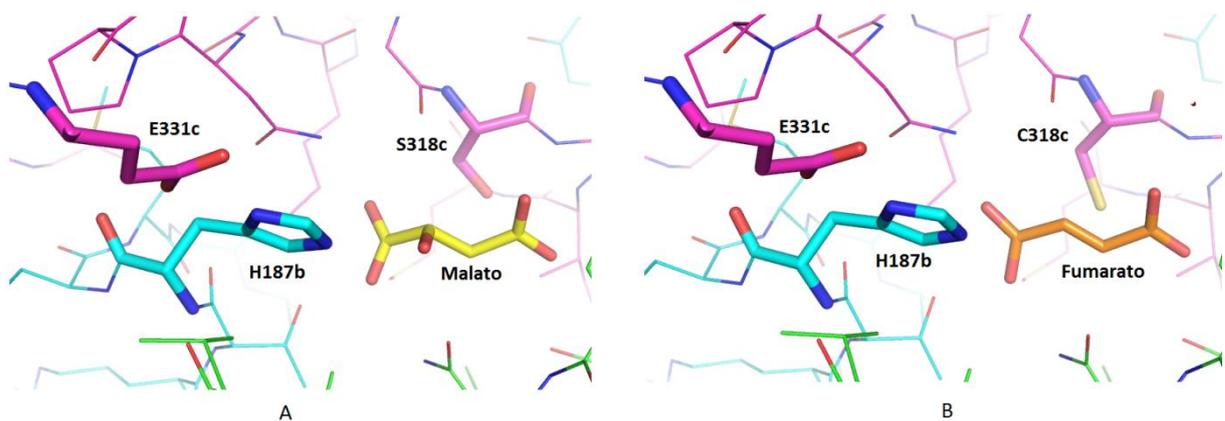


Figura 11. Sítio ativo da enzima Fumarato Hidratase de *Mycobacterium tuberculosis*, onde os resíduos supostamente envolvidos com a catálise estão em stick (A) Enzima na presença do substrato Malato. (B) Mutante S318C, o qual perde atividade catalítica. A mutação do resíduo de serina por cisteína possibilitou a obtenção do cristal com o substrato Fumarato. Figuras feitas utilizando as estruturas de PDBs: 4ADL e 4APB, no programa Pymol (Delano e Lam, 2005).

1.3.4. Importância Biológica

A enzima fumarato hidratase está presente tanto no citoplasma quanto na mitocôndria de organismos eucariotos. Estudos recentes de localização subcelular realizados em nosso laboratório para parasitas de *Leishmania mexicana* indicam que uma isoforma da enzima está presente no citosol, enquanto a outra se encontra na mitocôndria e possivelmente no glicosomo (Feliciano *et al.*, 2012).

Na mitocôndria, a fumarase atua como parte do ciclo de Krebs ou do ácido tricarboxílico, e como tal, é central para a geração de energia para estes organismos (Yogev *et al.*, 2010) (**Figura 12**). Para a forma citosólica, acredita-se estar envolvida no metabolismo da molécula de fumarato que é produzida no citosol por diferentes tipos de reações (Pines *et al.*, 1996), por exemplo, o fornecimento de fumarato para outras reações dentro do citosol, como para a enzima diidroorotato desidrogenase que participa da biossíntese de nucleotídeos de pirimidina e, em alguns casos, utiliza fumarato como substrato (Feliciano *et al.*, 2006). Além disso, a forma citosólica da fumarase em eucariotos também foi descrita como capaz de migrar do citosol para o núcleo, onde ela desempenha uma função em processos de reparo do DNA. Em humanos, a deficiência de fumarato hidratase está relacionada com uma síndrome chamada Leiomiomatose Hereditária e Câncer de células renais (HLRCC) (Yogev *et al.*, 2010).

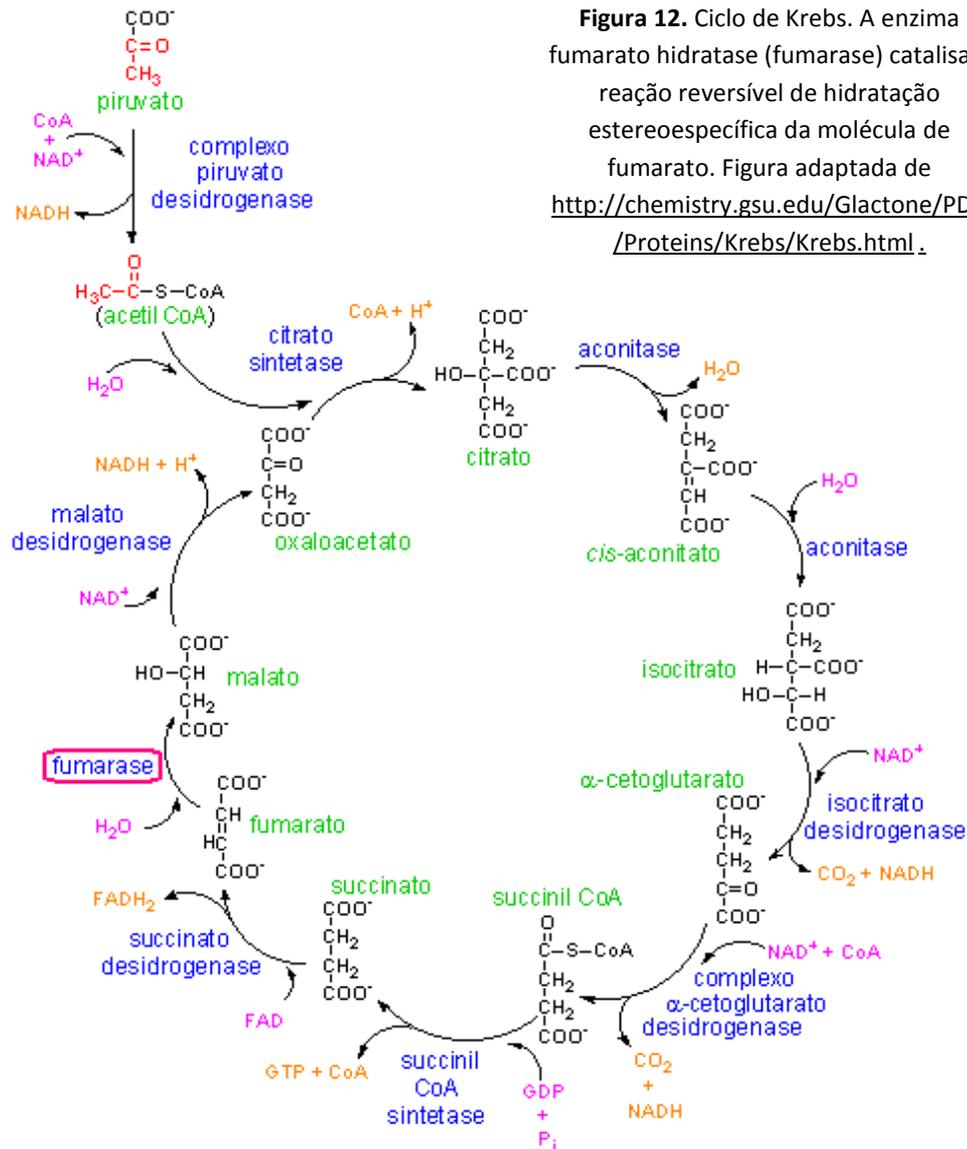


Figura 12. Ciclo de Krebs. A enzima fumarato hidratase (fumarase) catalisa a reação reversível de hidratação estereoespecífica da molécula de fumarato. Figura adaptada de <http://chemistry.gsu.edu/Glactone/PDB/Proteins/Krebs/Krebs.html>.

1.3.5. Fumarato Hidratase de *Schistosoma mansoni*

Segundo Skelly e Shoemaker (1995), o metabolismo dos carboidratos durante o desenvolvimento do parasito do gênero *Schistosoma* sofre grandes variações, de forma que ora este apresenta maior atividade aeróbica, ora anaeróbica. No estágio de vida em que o parasita penetra o homem (*Schistosoma* sp.) há um aumento na produção de lactato, indicando predomínio de atividade anaeróbica pelo parasito. No entanto, quando o parasito atinge o estágio adulto do desenvolvimento, onde os sintomas da doença aparecem, verifica-se uma diminuição nos níveis de

enzimas relacionadas à fosforilação da glicose (hexoquinase), exibindo um alto grau de metabolismo aeróbico (Skelly e Shoemaker, 1995).

O maior nível de transcrição mitocondrial em vermes adultos, quando comparados com o schistosomula, é consistente com a significativa proporção de energia que o parasita adulto adquire da respiração, dependendo assim de funções mitocondriais como o ciclo de Krebs (Vanoordt *et al.*, 1985)

Mesmo considerando que o parasito na forma adulta apresente fermentação homolática, podendo sobreviver em meio anaeróbico, o desenvolvimento dos ovos requer presença de oxigênio, sugerindo a necessidade de respiração aeróbica para o fornecimento de energia para esse processo (Bueding, 1950; Schiller *et al.*, 1975). Sendo os ovos, os principais causadores dos danos à saúde gerados pela doença, impedir a liberação de ovos também pode ser uma estratégia interessante no combate à doença (Saz, 1981).

Nesse contexto, a enzima fumarato hidratase do parasito *Schistosoma mansoni* (*SmFH*), envolvida com processos aeróbicos de obtenção de energia, surge como um possível alvo terapêutico na busca de ferramentas para o combate à Esquistossomose. A inibição desta enzima poderá afetar o balanço redox mitocondrial deste organismo, através da inibição do ciclo do ácido tricarboxílico, além de afetar mecanismos de reparo do DNA, onde foi descrita a importância dessa enzima.

Segundo o banco de dados (www.genedb.org), a enzima fumarato hidratase (*SmFH*) é codificada pelo gene *Smp_158240*. Nossa análise *in silico* revela que esta enzima pertence à classe II das fumarases, contém 495 aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 54,6 kDa e *pI* teórico de 6,8. Embora as estruturas das FH da classe II indicam alta similaridade estrutural entre os membros desta classe (PDB 3NO9, 3GTD, 3E04, 1YFE, 3E04, 1FUO), *SmFH* compartilha aproximadamente 45% de identidade sequencial com as enzimas da mesma classe. Em particular, *SmFH* compartilha 49% com a enzima humana. Estes estudos preliminares sugerem que embora o

arranjo 3D possa ser similar entre as enzimas de *Schistosoma mansoni* e humana, várias diferenças locais entre as enzimas, com base nas características dos aminoácidos intrínsecas para cada organismo, poderão ser exploradas no planejamento de ligantes na tentativa de validar *SmFH* como alvo macromolecular.

É assim nosso interesse avaliar o potencial da enzima fumarato hidratase em *Schistosoma mansoni* como alvo para o planejamento de fármacos antiesquistossomose. A longo prazo, a meta é buscar inibidores específicos e seletivos contra a enzima do parasito e ensaios *in vivo* na presença desses ligantes para avaliar o potencial dessas moléculas no controle da progressão do parasita. Para darmos início à esses estudos, nosso projeto tem como meta não somente a produção heteróloga do produto codificado pelo gene *Smp_158240*, como a detalhada caracterização bioquímica e estrutural da enzima de interesse.

OBJETIVOS

2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho visa o desenvolvimento das etapas iniciais de caracterização estrutural e funcional da enzima fumarato hidratase de *Schistosoma mansoni*, produto do gene Smp_158240 (www.genedb.org). Para tais estudos, nossa proposta envolveu a obtenção da enzima SmFH na forma solúvel e em quantidade suficiente para a realização dos estudos propostos.

Assim, as etapas para a realização do projeto podem ser sumarizadas em:

- Clonagem do gene Smp_158240, predito como codificador da enzima fumarato hidratase de *Schistosoma mansoni* (SmFH), utilizando um vetor que permite a expressão heteróloga em *E. coli* da enzima de forma solúvel e com bom rendimento.
- Purificação da SmFH
- Caracterização bioquímica e biofísica da SmFH, através da utilização de ensaios de atividade enzimática, espalhamento dinâmico de luz e dicroísmo circular.
- Realização de ensaios de cristalização da enzima SmFH de forma a possibilitar posteriores estudos estruturais.
- Predição da estrutura tridimensional da enzima SmFH através da utilização de técnicas de modelagem molecular por homologia e dinâmica molecular

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Clonagem do gene Smp_158240 que codifica a enzima SmFH

Inicialmente, foram utilizadas duas estratégias de trabalho para a construção do plasmídeo a ser utilizado na produção recombinante da enzima fumarato hidratase de *Schistosoma mansoni*. A primeira envolveu as tentativas de propagação do gene de interesse a partir da produção do cDNA de *Schistosoma mansoni*. Uma estratégia alternativa envolveu a construção de um gene sintético onde os códons foram otimizados para permitir a expressão da proteína SmFH em *E. coli*.

3.1.1. Construção do cDNA

A etapa de construção do cDNA foi realizada em parceria com nosso colaborador, pesquisador Humberto D'muniz Pereira, do Grupo de Cristalografia de Proteínas do Instituto de Física de São Carlos. Amostras de RNAm total extraído de vermes adultos machos de *S. mansoni*, foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Ricardo DeMarco do grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos, e utilizadas como molde para a construção do cDNA de *S. mansoni*.

Para os experimentos de obtenção do cDNA, foi utilizado o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis (Invitrogen). Inicialmente, foi montada uma reação onde foram adicionados, 6 µL de mRNA, 1 µL de Primer reverse (5 pmol/µL) e 1µL de tampão de anelamento, com um volume total de 8 µL de reação. Para o anelamento do primer às fitas de RNA, incubou-se a reação a 65°C por 5 minutos, sendo depois imediatamente transferida para o gelo por 5 minutos.

A amostra resultante da primeira reação foi centrifugada e misturada a 10 µL do 2 X First-Strand Reaction mix, e 2 µL do Super Script III/RNase out Enzyme mix (Invitrogen®), fornecendo um volume total de 20 µL. Para a síntese do DNA através da utilização da enzima Transcristase Reversa

(Fermentas®), a reação foi incubada a 50°C por 50 minutos, seguida do aumento da temperatura para 85°C por 5 minutos para a inativação a enzima. A amostra de cDNA de *Schistosoma mansoni* foi armazenada a -20 °C.

3.1.2. Amplificação do gene que Smp_158240

Inúmeras foram as tentativas de amplificar o gene que codifica a enzima *SmFH* utilizando amostra de cDNA como molde para a reação de PCR, conforme protocolo apresentado na **tabela 1**. Os primers Foward: 5'-CTGGATCCATGTTAGAAACAGATTCACAACG-3', e Reverse: 5'-GTCTCGAGTCATTTGTTGTTGTGAGGAAAG-3', foram desenhados baseado na sequência do gene depositada no banco de dados com código Smp_158240 (www.genedb.org) e de forma a permitir a inserção de sítios de restrição para as enzimas *Bam* HI e *Xho* I.

Tabela 1: Reação de amplificação do gene Smp_158240 que codifica *SmFH*, a partir do cDNA.

Reação de amplificação	Volume
Tampão [10x]	2 µL
MgCl ₂ [25mM]	1 µL
dNTP [10mM]	0,5 µL
primer R e F (100pmol/µL)	2 µL
DNA molde (cDNA)	0,5 µL
Enzima taq DNA-pol recombinante (Fermentas) [50U/µL]	0,3 µL
Água	13,7 µL
Total	20 µL

As reações de PCR foram realizadas num Controlador Termal Programável (Eppendorf) iniciado pela desnaturação das fitas de DNA a 96 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação compostos por desnaturação a 96 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 1 minuto

e extensão a 72 °C por 90 segundos. Por fim a reação é incubada a 72°C por 10 minutos para finalizar a extensão das fitas.

As amostras foram armazenadas a 4 °C Os resultados da reação de PCR foram monitorados através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Infelizmente, em nenhuma das condições testadas foi possível observar a presença do gene de interesse. Diante dos insucessos na amplificação a partir do cDNA, uma segunda alternativa encontrada para a resolução do problema foi a solicitação de síntese química do gene que codifica a *SmFH*.

3.1.3. Subclonagem do gene sintético que codifica a enzima *SmFH*

A sequência do gene *Smp_158240* foi inicialmente submetida a uma otimização de códons de forma a maximizar as chances de sucesso da expressão em *Escherichia coli*, e sua síntese foi solicitada à empresa Blue Heron®. O gene sintético se encontra fusionado ao vetor denominado pela empresa por pUCminusMCS, que é um derivado do pUC119 (Clontech®). A construção final foi denominada *SmFH*-pUCminusMCS. Para a expressão da *SmFH* na forma recombinante foi necessário realizar a subclonagem do gene em um vetor de expressão.

3.1.4. Subclonagem do gene que codifica a *SmFH* no vetor pET28a

A clonagem do gene de interesse foi realizada utilizando os vetores de expressão da série pET (Novagen®). Os vetores da série pET são plasmídeos desenhados para permitir rápida produção de grandes quantidades da proteína de interesse. Estes plasmídeos contém também vários elementos importantes, como o gene *lac1* que codifica a proteína repressora *lac*, o promotor T7 que é

altamente específico para T7 RNA polimerase, um operador lac que serve para bloquear a transcrição, um gene que confere resistência a um antibiótico, por exemplo, kanamicina (**Figura 13**), e um sítio múltiplo de clonagem, onde o gene de interesse é inserido no vetor. Foram testados os vetores pET28a, pET29a, pET32a e pET42a.

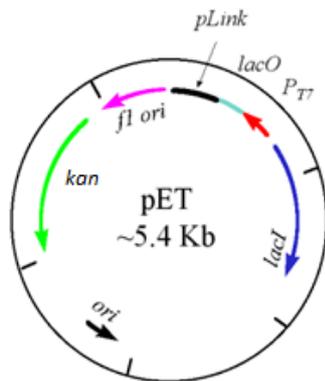


Figura 13. Esquema do vetor da série pET. O plasmídeo contém a região marcadora para resistência a kanamicina (verde), o gene lacI (azul), o promotor de transcrição T7 (vermelho), a região do operador lac (celeste) e a um sítio múltiplo de clonagem(pLink).

3.1.5. Digestão dos vetores de expressão e da construção *SmFH*-

pUCminusMCS

Amostras da construção *SmFH*-pUCminusMCS e os vetores de expressão pET28a, pET29a, pET32a e pET42a foram submetidas a dupla digestão pelas enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I (NEB[®]– New England Biolabs). As reações de dupla digestão foram montadas conforme descrito na **Tabela 2** e mantidas em banho a 37° C por 24 horas.

Tabela 2: Quantidade de enzimas e de tampão utilizadas para a reação de digestão do gene sintético e dos vetores da série pET.

	<i>S</i>mFH-pUCminusmCS	Vetor de expressão
DNA	20µL (~2 µg)	15 µL (~2 µg)
<i>Bam</i> HI-HF	1,5 µL (1,5 unidades)	1,5 µL (1,5 unidades)
<i>Xho</i> I	1,5 µL (1,5 unidades)	1,5 µL (1,5 unidades)
Buffer nº4 10X NEB®	5 µL	5 µL
BSA 100X	0,5 µL	0,5 µL
H₂O	21,5	26,5 µL
TOTAL	50 µL	50 µL

Foram realizados vários experimentos na tentativa de subclonar o fragmento de interesse em algum dos diferentes vetores da série pET utilizados. Sem sucesso, optamos por utilizar amostras de pET28a contendo um fragmento de aproximadamente 1 kb inserido no sítio múltiplo de clonagem, facilitando o monitoramento da digestão do vetor e aumentando as chances de sucesso da reação de ligação.

A digestão foi analisada em gel de agarose 1% (m/v), e a banda de interesse foi excisada do gel e o DNA foi purificado utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade de DNA obtida após a purificação foi estimada comparando-se as intensidades das bandas obtidas com as do padrão de massa molecular 1kb DNA *ladder* (BioLabs).

3.1.6. Reação de ligação do vetor pET28a ao gene *Smp_158240*

Para maximizar as chances de sucesso do experimento de ligação, foram montadas diversas reações, onde diferentes quantidades e proporções entre o inserto (gene digerido) e vetor foram testadas. As ligações foram feitas utilizando a enzima T₄ DNA ligase (Invitrogen ®) a aproximadamente 16 °C por 16 horas conforme detalhada na **Tabela 3**.

Tabela 3: Quantidades de vetor, inserto e ligase utilizados nas reações de ligação do inserto ao vetor de expressão pET28a.

	Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 4	Reação 5	Reação 6
pET28a	30ng	30ng	30ng	60ng	30ng	30ng
Inserto	16 ng	40ng	40ng	80ng	56ng	80ng
T₄ DNA Ligase	1 µL	1µL	2µL	1µL	1µL	1µL
Tampão 5x T₄	4 µL					
Total	20 µL					

3.1.7. Preparação das bactérias *Escherichia coli* DH5α e BL21(DE3) competentes

A preparação de bactérias competentes para receberem o material da ligação foi feita de acordo com o protocolo proposto por Ausubel *et al.* (1995), com algumas alterações. Para a preparação do pré-inóculo, 5 mL de meio LB (Lúria Bertani) (USB®) foram inoculados com amostras de glicerol estoque de cada cepa, as mesmas foram incubadas a 37°C sob agitação de 225 rpm durante 16h. 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 que o material atingisse 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 foi 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 suspensão foi 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. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensionadas em 2 mL da solução gelada de CaCl₂, aliqüotadas em volumes de 0,1 mL

e armazenadas a -70 °C. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril e em banho de gelo (Ausubel, 1995).

3.1.8. Transformação das cepas de *Escherichia coli* competentes com o material das ligações

A transformação das células competentes de *Escherichia coli* DH5- α foi realizada por choque térmico, com base no protocolo descrito por 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 7 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 270 μ L de meio LB foi adicionado. A suspensão de bactérias foi agitada horizontalmente a 190 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 μ g/mL ou kanamicina 30 μ g/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. (Sambrook e Russel, 1989)

Para aumentar as possibilidades de obtenção dos clones positivos e de sucesso de expressão os protocolos de preparação de bactérias competentes e transformação do material das ligações foram realizados utilizando dez diferentes cepas de *Escherichia coli*: DH5 α (Invitrogen®), BL21(DE3) (Novagen®), DH10B (Invitrogen®), BL21(DE3)-plys (Novagen®), BL21-AI (Invitrogen®), Rosetta (Novagen®), Rosetta-pLys (Novagen®), BL21 CodonPlus (Stratagene®), C41(DE3) (Lucigen®), C43(DE3) (Lucigen®).

3.1.9. Análise da presença e isolamento do plasmídeo recombinante *SmFH-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 na realização de uma reação de PCR utilizando uma colônia como molde para a amplificação do gene. Para isto, as colônias isoladas 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), em um volume final de 10 µL. O ciclo da reação de PCR se inicia com a desnaturação do DNA incubando-se a reação a 94°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 30 segundos a 60 para anelamento dos primers e seguidos pela incubação da reação a 68°C por 1 minuto e 30 segundos para a etapa de extensão. O ensaio termina através da incubação a 68°C por 10 minutos para que a extensão das fitas termine.

Para checarmos a presença do gene de interesse nas colônias obtidas, foram realizados experimentos de PCR utilizando a diferentes colônias como molde.

Para os experimentos de PCR utilizando as colônias como molde foram utilizados primers que se anelam ao vetor pET28a: pET28a-ext-foward: 3'-AGATCTCGATCCCGCAAATTAATAC-5' e pET28a-ext-reverse: 5'-AAAGCCGCGAACGTGGC-3'. Nesta estratégia, os primers amplificam um fragmento do vetor no tamanho de 551 pb, onde está o inserido sítio múltiplo de clonagem. Assim, quando o gene de interesse se encontra inserido no sítio múltiplo de clonagem, o fragmento amplificado tem o tamanho de 2017 pb, referente a 1488 pb do gene e 517 pb do vetor (**Figura 14**).

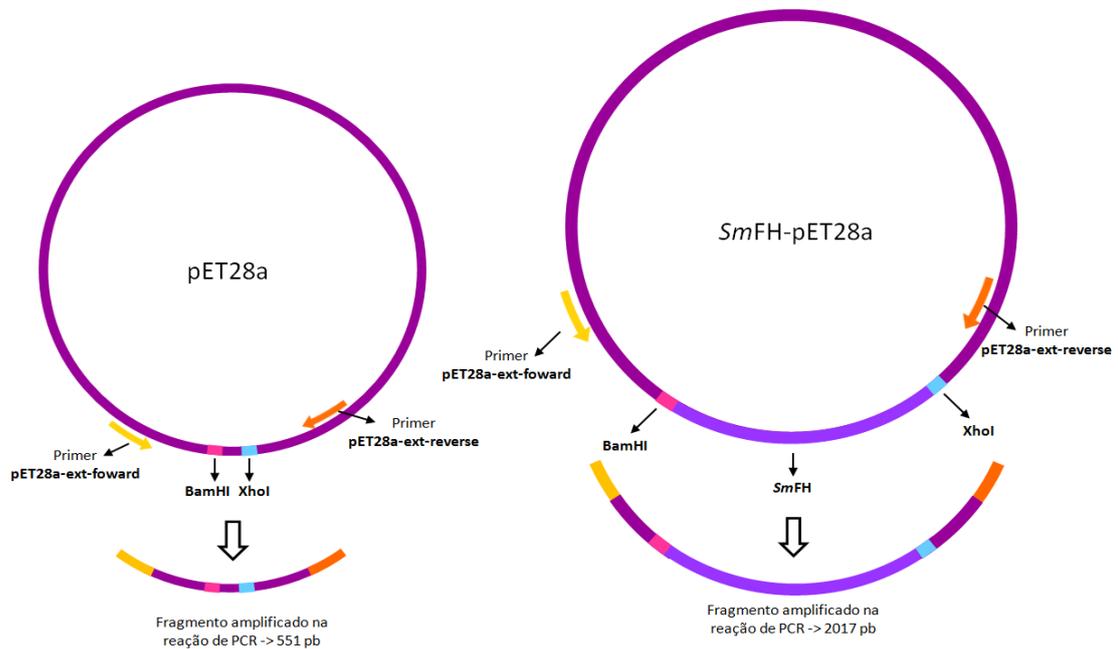


Figura 14. Esquema representando os fragmentos amplificados nas reações de PCR utilizando primers que se anelam ao vetor pET28a. Quando o gene de interesse está ausente, o fragmento amplificado possui 551 pb, quando o gene da *SmFH* se encontra inserido no vetor, entre os sítios de *Bam HI* e *Xho I* o fragmento amplificado possui 2017 pb.

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%. A corrida eletroforética foi processada em uma cuba contendo tampão TAE, sob uma tensão de 90 V, durante 60 minutos. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta. O DNA foi extraído das bactérias que possuíam o clone positivo através miniprep e a construção foi submetido a sequenciamento do DNA.

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. Para os experimentos de expressão, o DNA foi transformado em células *Escherichia coli* BL21(DE3).

3.1.10. Subclonagem do gene que codifica a *SmFH* no vetor pET28sumo

Como estratégia na tentativa de minimizar possíveis problemas de estabilidade, ausência de atividade enzimática e dificuldades de cristalização, numa etapa mais avançada do trabalho, optamos por realizar a subclonagem do gene que codifica a enzima de interesse no vetor pET28sumo, gentilmente cedido pelo pesquisador Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, Campinas).

Para facilitar o monitoramento da digestão do vetor e evitar religamento do mesmo, optamos pela mesma estratégia utilizada no processo de clonagem em pET28a. Sendo assim, utilizamos uma amostra do pET28sumo que possuía um fragmento de DNA de aproximadamente 1200 pb inserido no sítio múltiplo de clonagem. Para essa subclonagem, a construção *SmFH*-pET28a, bem como a amostra do vetor foi propagada na cepa DH5 α de *Escherichia coli* e foi realizada uma miniprep para extração do DNA das células. Em seguida, tanto a construção *SmFH*-pET28a quanto

vetor foram submetidos a reação de digestão pelas enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I (NEB – New England Biolabs®). As reações de dupla digestão foram montadas conforme descrito na **Tabela 4**, onde se utilizou 2 μ g de DNA final, tanto para vetor, quanto para inserto, e mantidas em banho a 37° C por 24 horas.

Tabela 4: Quantidade de enzimas e de tampão utilizadas para a reação de digestão do inserto e do vetor pET28sumo.

	<i>SmFH</i> -pET28a	pET28sumo-fragmento
DNA	25 µL (~2 µg)	20 µL (~2 µg)
<i>Bam</i> HI-HF	1,5 µL (1,5 unidades)	1,5 µL (1,5 unidades)
<i>Xho</i> I	1,5 µL (1,5 unidades)	1,5 µL (1,5 unidades)
Buffer nº4 10X NEB®	5 µL	5 µL
BSA 100X	0,5 µL	0,5 µL
H₂O	16,5 µL	21,5 µL
TOTAL	50 µL	50 µL

Foram realizadas 3 reações de digestão, tanto para vetor, quanto para inserto, e o material foi purificado e concentrado para que se obtivesse quantidade satisfatória de DNA para as reações de ligação. Em seguida, para a ligação foram preparadas duas reações, conforme detalhado na **Tabela 5**, utilizando a proporção de aproximadamente 1:2 e 1:5 de moléculas de vetor para inserto.

Tabela 5: Quantidades de vetor, inserto e ligase utilizados nas reações de ligação do inserto ao vetor pET28sumo.

	Reação 1	Reação 2
pET28sumo	30ng	30ng
Inserto	16 ng	40ng
T₄ DNA Ligase	1 µL	1µL
Tampão 5x T₄	4 µL	4 µL
Total	20 µL	20 µL

Células de DH5 α de *Escherichia coli* foram transformadas com o produto das ligações e para os experimentos de PCR utilizando as colônias como molde foram utilizados os primers pET28a-ext-forward e pET28a-ext-reverse, que também se anelam ao vetor pETsumo. Nesta reação, os primers amplificam um fragmento do vetor no tamanho de aproximadamente 900 pb, onde está o inserido sítio múltiplo de clonagem. Assim, quando o gene de interesse se encontra inserido no sítio múltiplo de clonagem, o fragmento amplificado terá o tamanho de aproximadamente 2400 pb, referente a 1488 pb do gene e cerca de 900 pb do vetor.

As bactérias que continham o fragmento de interesse foram utilizadas para a propagação da construção *SmFH*-pET28sumo, extraída por miniprep e em seguida o DNA foi transformado em bactérias BL21(DE3) para os experimentos de expressão.

3.2. Expressão heteróloga da *SmFH*

Para facilitar o entendimento, a proteína expressa pela construção *SmFH*-pET28a foi denominada p*SmFH*, enquanto a proteína expressa pela construção *SmFH*-pETsumo foi denominada s*SmFH*.

Os ensaios de expressão foram realizados em *E. coli* BL21(DE3). Para a obtenção da proteína de interesse na forma solúvel e com rendimento satisfatório para os experimentos de purificação e posteriores estudos funcionais, foram realizados ensaios de expressão para a otimização das condições de concentração do agente indutor IPTG, temperatura e tempo de expressão. Todas as etapas de expressão da enzima de interesse foram realizadas em ambiente estéril.

3.2.1. Ensaios iniciais de expressão da construção *SmFH-pET28a*

Ensaios iniciais de expressão da construção *SmFH-pET28a* foram realizados variando as concentrações de IPTG (5 μ M, 50 μ M, 500 μ M e 1mM) e o tempo de indução (2h, 4h, 6h e 24h). Os experimentos de indução foram realizados a 18 e 37°C. Para cada construção, foi utilizado como pré-inóculo 5 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado, 30 μ g/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 foi diluído na proporção de 1:100 em 100 mL de meio LB com 30 μ g/mL de kanamicina, incubado a 37°C sob agitação de 225 rpm até atingir uma DO_{600} entre 0,5 a 0,6. Neste ponto, a cultura foi dividida em 25 volumes de 4 mL, sendo 4 deles usados como controle (sem adição de IPTG), 4 foram induzidos com 5 μ M, 4 foram induzidos com 50 μ M, 4 foram induzidos com 500 e 4 foram induzidos com 1 μ M de IPTG. A cultura foi incubada a 25°C sob agitação de 225 rpm e nos tempos de 2h, 4h, 6h e 24h foi retirada uma amostra de cada concentração. 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 foram ressuscendidas em 300 μ L de tampão Tris 50 mM, pH 8,5, NaCl 300 mM, sonicadas 8 vezes de 15 segundos, com intervalos de 30 segundos, e centrifugadas a 16.000 g por 15 minutos a 4°C. Os precipitados e sobrenadantes obtidos foram separados e analisados por gel de eletroforese SDS-PAGE 14% para verificar o rendimento e a solubilidade da proteína.

3.2.2. Ensaios de expressão em larga escala da construção *SmFH-pET28a*

Ensaios de expressão em larga escala para a construção *SmFH-pET28a* foram realizados a 18°C, com indução de 500 μ L de IPTG por 24 horas. Estas foram as condições onde melhor se identificou expressão da proteína de interesse, maximizando assim o rendimento.

A expressão foi feita utilizando como pré-inóculo 10 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado, kanamicina 50 µg/mL, e mantidos sob agitação de 190 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 190 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 24 horas de indução, a solução do inóculo foi centrifugada a 6.800 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram armazenadas no freezer (-20 °C) e o sobrenadante descartado.

Os experimentos de expressão em larga escala da construção *SmFH*-pET28sumo foram realizados seguindo o protocolo otimizado para a construção anterior, *SmFH*-pET28a.

Além da expressão em meio LB, cuja composição é 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de cloreto de sódio, também foi utilizado o meio rico Tartoff - Hobbs Broth (Terrific Broth), cuja composição é 12 g/L de hidrolisado enzimático de caseína, 24 g/L de extrato de levedura, 2,2 g/L fosfato de potássio monobásico e 9,4 g/L de fosfato de potássio dibásico, onde o pH final a 25°C é aproximadamente $7,2 \pm 0,2$. Também foi testada a expressão da enzima em presença de 2 mM de cisteína, 0,2 mg/mL de sulfato ferroso e 0,2mg/mL citrato férrico.

A protease ULP1 utilizada para remover a fusão da *sSmFH* clonada no vetor pET-28sumo também foi expressa em nosso laboratório. A condições de expressão da enzima ULP1, coincidentemente, são as mesmas otimizadas para *pSmFH*, exceto a concentração final do agente indutor, IPTG, a qual, para a protease ULP1, foi 300 µM. A construção com o gene que codifica para ULP1 em pET-28a nos foi gentilmente cedida pelo pesquisador André Luis Berteli Ambrosio.

3.3. Purificação da *SmFH*

3.3.1. Purificação da *pSmFH*

A clonagem utilizando o vetor de expressão pET28a fornece a proteína em fusão com uma cauda que contém 6 histidinas na região N-terminal. Explorando essa propriedade, a purificação foi padronizada através da utilização de uma coluna de cromatografia por afinidade. A cauda de histidina fusionada a enzima *SmFH* interage com o níquel da resina Ni-NTA (ácido nitrilotriacético agarose) (Qiagen) (**Figura 15**) e permite a purificação da proteína de interesse (Knecht *et al.*, 2009).

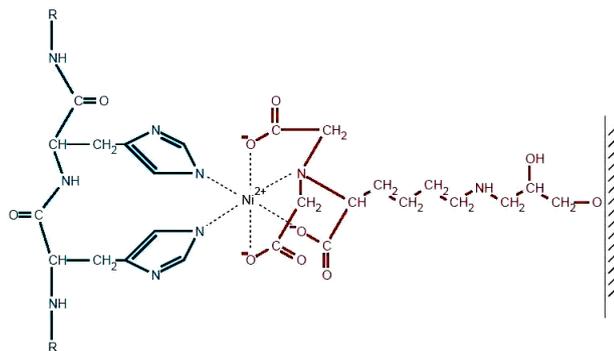


Figura 15. Interação entre a cauda de histidina da enzima e o Ni^{2+} da resina Ni-NTA Agarose.

Com o objetivo de minimizar efeitos de degradação da proteína todas as etapas de purificação foram realizadas a baixa temperatura.

As células provenientes do ensaio de expressão da construção *SmFH*-pET28a obtidas a partir de 0,5 L de cultura foram ressuspensas em 15 mL de tampão de lise (Tris 50 mM, pH 8,5, NaCl 300 mM, PMSF 1 mM), divididas em duas partes iguais e sonificadas 10 vezes de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos, e centrifugadas a 16000 g por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante (extrato bruto) obtido foi carregado em uma coluna de polipropileno Poly-Prep 0,8 x 4 cm (Bio-Rad) empacotada com 2 mL de resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada

com o tampão de ligação (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,5). Para a remoção de contaminantes que eventualmente interajam com a resina de forma menos específica, a mesma foi lavada com soluções contendo um gradiente crescente de imidazol (0 a 50 mM imidazol). A lavagem foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm, e foi realizada até que a leitura se aproximasse de zero, um indicativo de que todas as proteínas que eluem com uma concentração específica de imidazol são removidas (**Figura 16**). A eluição da enzima pSmFH foi feita com 100 e 250 mM de imidazol (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 100 e 250 mM, pH 8,5).

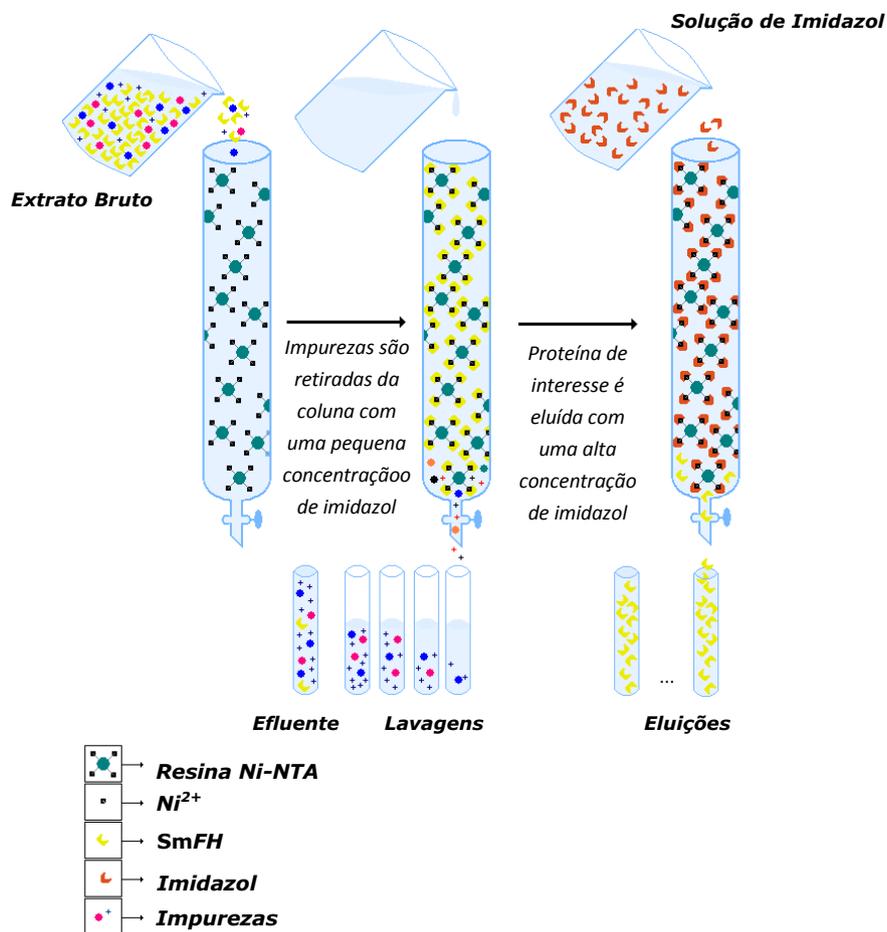


Figura 16. Esquema geral da purificação de LmFH-1 por cromatografia de afinidade. Figura cedida gentilmente pelo Dr. Matheus Pinto Pinheiro, ex-aluno do Laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP.

O grau de pureza da enzima foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 14% 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 é aplicado campo elétrico. As proteínas menores tem maior mobilidade no gel do que as proteínas maiores, portanto, serão encontradas mais próximas da extremidade inferior, onde se localiza o pólo positivo (Nelson e Cox, 2008). A revelação do gel foi efetuada com o corante azul de coomassie brilhante blue R250 (Vetec). As eluições foram concentradas usando o concentrador Ultrafree – 100 kDa (Millipore) a 3.500 g e a 4°C.

3.3.2. Purificação da sSmFH

A construção do gene em vetor pET-SUMO, permite a expressão da proteína fumarato hidratase em fusão com a proteína SUMO (Smt3) de *Saccharomyces cerevisiae* (código de acesso NCBI: AAB01675.1), formada por 101 aminoácidos e de massa molecular estimada de 11,6 kDa (ca.expasy.org/tools/protparam.html). Além disso, a cauda expressa também contém, na extremidade N-terminal, seis resíduos de histidina. Nessa construção a cauda apresenta um tamanho total de aproximadamente 15,2 kDa, está ligada à proteína de interesse por um sítio de clivagem, o motivo Gly-Gly-X, presente na extremidade C-terminal da proteína SUMO, que é reconhecido pela cisteíno-protease Ubiquitin Like Protein 1 (ULP1), possibilitando a remoção da cauda através da digestão (**Figura 17**). A clivagem da construção deixa apenas o peptídeo Ala-Thr-Tyr ligado à extremidade N-terminal das proteínas de interesse (Mossesso e Lima, 2000).



Figura 17. Esquema da proteína *sSmFH* em fusão com a cauda proveniente da expressão no vetor pET-SUMO. A seta vermelha indica onde ocorre a clivagem feita pela protease ULP1, sítio que possui a sequência Ala-Thr-Tyr.

A purificação da enzima *sSmFH* também foi realizada com base na afinidade da cauda de histidina pelo níquel da resina Ni-NTA. Para a proteína *sSmFH*, as etapas de lise celular, carregamento da coluna com extrato bruto e lavagem da coluna foram as mesmas descritas para *pSmFH*.

Para realizar a clivagem da cauda, após a lavagem de com 50 mM de imidazol, aplica-se novamente o tampão de ligação, o qual não contém imidazol, e em seguida, 200 µg da protease ULP1 são colocadas na coluna, que é mantida sob leve agitação por um período de 16 horas a 6 °C. Após a clivagem da cauda pela protease ULP1, a proteína de interesse, agora livre da cauda de histidina e da SUMO, é eluída da coluna em tampão 0mM e 25 mM, pois continua interagindo fracamente de forma inespecífica com a resina. Por fim, a cauda e a protease ULP1, que interagem mais fortemente, pois possuem a cauda 6xHis, são eluídas da coluna com tampão contendo 500 mM de imidazol. A protease ULP1, utilizada neste experimento também foi purificada através de cromatografia por afinidade em resina de níquel.

O grau de pureza da proteína *sSmFH* foi monitorado através de SDS-PAGE 14%.

3.4. Dosagem da proteína *SmFH*

A estimativa da concentração da enzima *pSmFH* foi realizada através da Lei de Lambert-Beer, utilizando o coeficiente de extinção molar teórico a 280 nm ($\epsilon=26,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) calculado pelo programa ProtParam (www.expasy.ch/tools/protparam.html). Este coeficiente é calculado a partir do

conteúdo dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, pois devido à presença de grupamentos aromáticos em suas estruturas, eles são responsáveis pelas propriedades de absorção das proteínas no comprimento de onda de 280 nm (Nelson e Cox, 2008).

A lei de Lambert-Beer 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:

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

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

3.5. Cromatografia por Filtração em gel

Para analisar o estado de oligomerização da amostra da pSmFH foi realizada cromatografia por filtração em gel em um sistema de cromatografia ÄKTA prime (GE Lifescience), controlado pelo software UNICORN 5.20. O aparelho conta um sistema de leitura espectrofotométrico na região do ultravioleta (280 nm) que permite monitorar em quais volumes as moléculas eluem da resina.

A cromatografia por filtração em gel separa moléculas com base nas diferenças em seus tamanhos quando através da utilização de uma resina empacotada em uma coluna. A resina é constituída de uma matriz porosa formada por partículas esféricas que apresentam baixa reatividade e pouca capacidade adsortiva. Para proceder com a filtração em gel, a resina é equilibrada com um tampão que preenche tanto os poros da matriz como o espaço entre as partículas. Esse processo cromatográfico é isocrático, ou seja, não há alteração na composição do tampão durante a separação. Após o equilíbrio ser estabelecido, a amostra, contendo moléculas de diferentes

tamanhos, é aplicada na coluna sob um fluxo constante. À medida que a amostra passa pelas esferas porosas, as moléculas de menor tamanho difundem para dentro dos poros enquanto as de maior tamanho passam sem serem desviadas. Dado um fluxo constante, quanto maior a molécula menor será o comprimento da sua trajetória pela matriz da resina e, portanto, mais rapidamente ela passará por todo o comprimento da coluna. Assim, moléculas maiores eluem primeiramente em relação às menores possibilitando a separação (**Figura 18**).

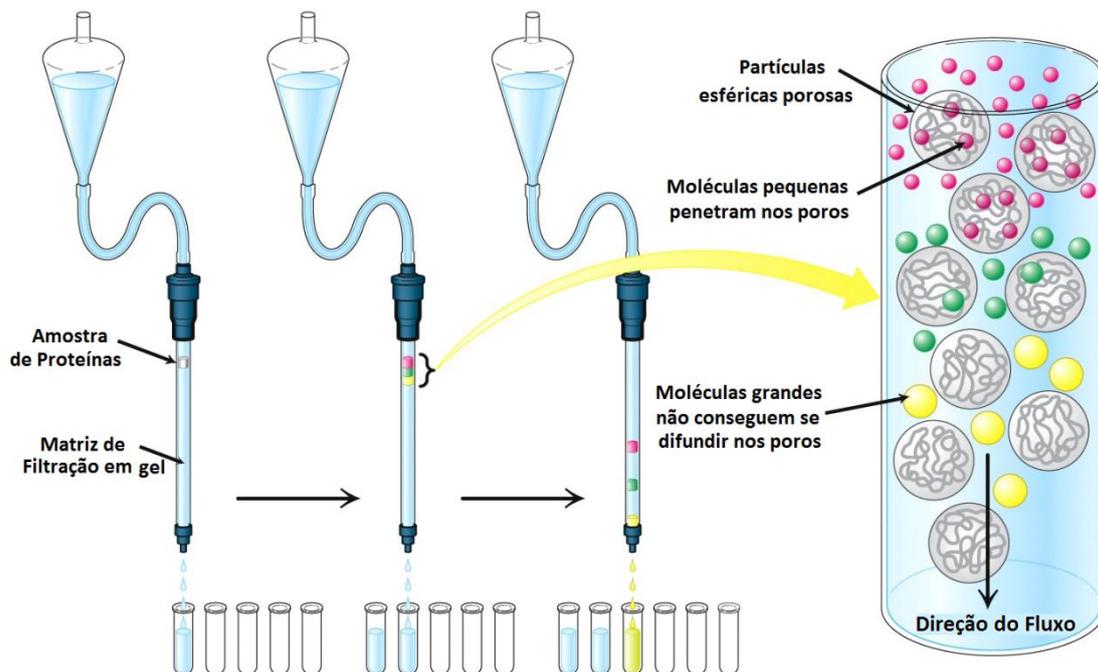


Figure 3.3
Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company

Figura 18. A figura esquematiza o processo pelo qual partículas menores ficam retidas nos poros da resina enquanto as maiores passam diretamente. A diferença na trajetória percorrida entre partículas de tamanhos diferentes promove a separação entre elas. Figura adaptada de (Stryer, Berg e Tymoczko, 2012).

Para a cromatografia por exclusão molecular foi utilizada uma coluna Superdex 200 (10/300) (GE[®]), a qual foi previamente calibrada utilizando marcadores moleculares de tamanhos conhecidos: aprotinina (6,5 kDa), ribonuclease (13,7 kDa), anidrase (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa), ferritina (440 kDa). A corrida foi realizada com um fluxo de 0,75mL/min, com um tampão de corrida (Tris 50 mM pH8,15, KCl 150 mM e 0,01% de Triton). Meio mL de cada

padrão a aproximadamente 1 mg/mL foi aplicado isoladamente. Através da curva de calibração, foi então possível estimar a massa molecular da pSmFH, a partir do volume de eluição da mesma.

A partir do perfil cromatográfico, obtendo-se o volume de eluição, foi possível estimar a massa molecular da pSmFH, utilizando curva de calibração.

3.6. Espalhamento dinâmico de luz

Além da filtração em gel, medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) colaboraram para uma melhor compreensão do tamanho de partícula, massa molecular, homogeneidade da amostra e possíveis agregações feitas pela enzima pSmFH, fornecendo importantes informação para os experimentos de cristalização.

Para os experimentos de espalhamento dinâmico de luz, as amostras continham proteína a na concentração de aproximadamente 1 mg/mL. Foram testados diferentes tampões e diferentes pHs: acetato de sódio 50 mM pH 4 e pH 5; cacodilato de sódio 50 mM pH6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,5; tris 50 mM pH7,5, pH 8 e pH 8,5; e glicina pH 9 e pH 10; todos contendo NaCl 150 mM. Também foram testados diferentes sais: KCl 150mM e NaCl 150mM e 1M; e a presença dos aditivos 10% glicerol, 5% tacsimato. O aditivo tacsimato é uma solução composta por uma mistura de sais orgânicos. Essa solução foi desenvolvida pela Hampton Research Corporation como extensão do trabalho original do Prof. Alexandre McPherson, no qual ele descreve um conjunto de sais que favorecem a cristalização de proteínas em geral (Mcpherson, 2001).

Para a realização de tais experimentos, foram utilizados os equipamentos Zetasizer μ V (Malvern Instruments), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcos Vicente de Albuquerque Salles

Navarro, do Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos; e Zetasizer nano (Malvern Instruments), gentilmente cedido pela Prof. Dr. Renata Fonseca Vianna Lopez, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

3.7. Ensaios de atividade

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados com a proteína oriunda da construção em pET28a e em pET28sumo. Amostras de proteína purificada na forma íntegra e previamente digerida com trombina, para a remoção da cauda do pET28a, e conseqüentemente avaliação de uma possível interferência da extensão N-terminal, foram testadas.

O experimento foi realizado a 25°C em espectrofotômetro Hitachi U-2800. A atividade da proteína é monitorada através de um ensaio que mede a formação ou o consumo de fumarato a 250nm ($\epsilon_{\text{fumarato}} = 1.45 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Com o objetivo de investigar a atividade da amostra de *SmFH* obtida da purificação, foram variados diversos parâmetros do ensaio, como a concentração enzima (25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 400 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), a concentração dos substratos (5-50 mM S-malate, 1-25mM fumarato) e o pH do tampão de atividade (acetato de sódio 50 mM pH 4 e pH 5; cacodilato de sódio 50 mM pH 6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,5; Tris 50 mM pH 7,5 , pH 8 e pH 8,5; e Glicina pH 9 e pH 10; todos contendo NaCl 150 mM).

3.8. Dicroísmo circular

As medidas do conteúdo de estrutura secundária da enzima pSmFH foram realizadas no espectropolarímetro Jasco 810, cedido pelo Prof. Dr. Richard John Ward do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. O experimento foi realizado em tampão Tris pH 8,5. Foi feita uma medida utilizando-se cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, com 0,03 mg/mL de proteína a 25 °C.

Foram também realizados ensaios de estabilidade térmica com 0,15 mg/mL de proteína, nos tampões acetato de sódio pH 5,5, MES pH 6,5, fosfato de sódio pH 7,5 e tris pH 8,5 com uma cubeta de quartzo retangular com caminho óptico de 1 cm, variando a temperatura do experimento de 20 a 55 °C, com intervalos de 5 °C.

As medidas foram realizadas na região do ultravioleta distante (200 – 250 nm) com sensibilidade igual a 100 miliGraus, 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 8 varreduras. O espectro de CD em um dado comprimento de onda foi convertido para elipticidade molar média por resíduo, de acordo com a equação: $[\theta]_{\lambda} = (\theta_{\lambda} M_0) / (10 l c)$, onde θ_{λ} é a elipticidade observada em miligraus, M_0 é a massa média por resíduo ($M_0 = 110$), c é a concentração de proteína (mg/mL), e l é o caminho óptico (cm).

Para a determinação do conteúdo de estrutura secundária, a desconvolução do espectro de CD da pSmFH foi realizada utilizando o pacote CDPro (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/>), que contém o programa SELCON3 (Sreerama e Woody, 2000).

3.9. Cristalização da enzima *SmFH*

A cristalização da proteína *SmFH* tem como objetivo o estudo estrutural através da utilização de métodos de difração de raios-X em monocristais. Para os experimentos de cristalização da enzima foi utilizada a técnica de difusão de vapor.

Nos experimentos de cristalização, utilizou-se 500 μL das soluções de cristalização no reservatório. As gotas consistiam de 2 μL da solução do reservatório e 2 μL de proteína resultando em um volume total da gota de 4 μL . As gotas foram monitoradas através de visualização em microscópio óptico. Os ensaios foram feitos em condições diversas variando se a concentração de proteína de 3,5 a 10 mg/mL. Visando encontrar uma condição em que a proteína estivesse mais estável, também foram realizados ensaios onde foi testada a presença de 10% de glicerol, 0,1% de detergente Triton, 1 mM de DTT e 5mM de malato na solução da proteína.

Foram testadas inicialmente 98 condições disponíveis nos kits de cristalização Crystal Screen e Crystal Screen 2 (Hampton Research), 96 condições dos kits Peg/Ion Screen e Peg/Ion Screen 2 (Hampton Research), 48 condições do kit MembFac (Hampton Research) e 48 condições do kit NeXtal Stock Kit Buffer (Qiagen). Estes kits foram testados nas temperaturas de 21 °C e 4 °C. Estas soluções utilizam o método de matriz esparsa e são baseadas em soluções de cristalização conhecidas para macromoléculas biológicas. Neste experimento são testados um grande intervalo de pH, sais, precipitantes e aditivos (Jancarik e Kim, 1991). Também foi testada a adição de 5% da solução Tacsimato em todas as condições dos kits Crystal Screen, Crystal Screen 2, Peg/Ion Screen, Peg/Ion Screen 2 e MembFac (Hampton Research).

Além disso, em colaboração com o pesquisador Dr. Humberto D’Muniz Pereira, do Grupo de Cristalografia, do Instituto de Física de São Carlos foram realizados experimentos no robô de cristalização, onde foram testadas mais de 400 condições, entre elas o kit Morpheus, que têm demonstrado bons resultados na cristalização de proteínas (Gorrec, 2009).

3.10. Modelagem molecular da enzima *SmFH*

Diante da dificuldade na cristalização e problemas na detecção de atividade da enzima *SmFH*, para predição da estrutura terciária da enzima de interesse e mapeamento das bases estruturais que pudessem justificar a atividade fumarásica reduzida, optamos pela estratégia de modelagem molecular por homologia. O princípio deste método baseia-se no fato de que proteínas que compartilham alta identidade sequencial e mesma função biológica devem apresentar alta similaridade estrutural. (Sali e Blundell, 1993). A técnica fundamenta-se na construção de modelos tridimensionais baseados em estruturas similares de proteínas homólogas já resolvidas experimentalmente, no caso utilizando modelos com elevada similaridade sequencial compartilhada pelas fumarato hidratases da classe II

Inicialmente, foi avaliada a qualidade das estruturas das enzimas da classe, disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank*. Tanto a resolução quanto a geometria das estruturas foram observadas para a escolha das estruturas que serviram de molde para a obtenção do modelo. A análise da geometria foi realizada utilizando o servidor online Molprobability (molprobability.biochem.duke.edu) (Davis *et al.*, 2007). A partir dessa análise foram escolhidas as estruturas: 1FUQ, 1VDK, 3E04, 3GTD, 3OCE, 3QBP, 3RD8, 3TV2, 4ADL e 4HGV que apresentaram melhor qualidade nos quesitos avaliados.

O modelo foi gerado utilizando o programa Modeller (versão 9.11) (Sali e Blundell, 1993), O programa foi usado para gerar modelos otimizados baseado no método do gradiente conjugado; o refinamento foi realizado usando dinâmica molecular com anelamento simulado. A estereoquímica do modelo foi avaliada pelo programa MOLPROBITY (Davis *et al.*, 2007).

A construção do modelo para a forma tetramérica foi feita manualmente com base na sobreposição entre as diferentes estruturas utilizadas para a modelagem. O refinamento foi realizado usando dinâmica molecular com anelamento simulado, utilizando intervenções manuais nas regiões reprovadas pelo Molprobability. A análise estrutural foi realizada utilizando os programas Coot (Emsley e Cowtan, 2004) e Pymol (Delano e Lam, 2005).

Na investigação de detalhes do comportamento dinâmico da proteína foram empregadas simulações de dinâmica molecular utilizando o modelo feito para a SmFH. Foram utilizados softwares de simulação e análise contidos no pacote GROMACS (“GROningen MACHine for Chemical Simulation”) v4.5x. (Bekker *et al.*, 1993; Van Der Spoel *et al.*, 2005; Hess *et al.*, 2008). O campo de força utilizado nas simulações foi o AMBER (“Assisted Model Building and Energy Refinement”). As simulações foram realizadas em um reservatório na forma cúbica, com modelo de solvatação explícita do tipo TIP3P (Bussi, Donadio e Parrinello, 2007). Neste modelo, as moléculas de água são rígidas e descritas por três sítios de interação, correspondendo aos três átomos do conjunto. O sistema foi submetido a um ensemble NPT (Número de partículas, Pressão e Temperatura constantes). O barostato utilizado para a manutenção da pressão foi “Parrinello-Rahman”(Nose, 1984) o sistema de interesse é fechado e permaneceu em contato diatérmico com um reservatório de calor na temperatura de 309K.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1. Clonagem do gene *Smp_158240* que codifica a enzima *SmFH*

Durante o desenvolvimento deste trabalho, o processo de clonagem do gene *SMP_158240*, que codifica a enzima de interesse, mostrou-se como um grande desafio e uma etapa que demandou tempo e persistência. Apesar da realização de diversos experimentos para a obtenção do gene predito codificar a enzima *SmFH* a partir do cDNA, não foi possível confirmar a amplificação do mesmo nas reações de PCR. Várias fontes de possíveis erros foram testadas como a troca dos kits, enzimas e amostras de mRNA foram testadas sem sucesso.

Uma hipótese para explicar os insucessos na obtenção do gene se baseia na idéia de que, como relatamos na introdução, o processo de desenvolvimento dos ovos na fêmea adulta requer a produção de energia de forma aeróbica, portanto o nível de expressão de *SmFH* na fêmea pode ser maior quando comparado ao macho. Tendo em vista que o RNA total utilizado para os experimentos de construção do cDNA foi extraído de vermes machos, acreditamos que a quantidade de mRNA para *SmFH* possa estar reduzida nessas amostras. Uma possível fonte dos problemas na amplificação do gene que codifica a *SmFH* seria a quantidade de cDNA. Para investigar melhor essa hipótese resolvemos obter novas amostras de RNA extraídas tanto de vermes fêmeas quanto machos. Com essa nova amostra, poderemos realizar novamente os experimentos para construção do cDNA e amplificação do gene de interesse. Esses ensaios se encontram em andamento.

Sendo assim, devido ao insucesso na obtenção do gene a partir do mRNA, a segunda estratégia que adotamos foi a de solicitar a síntese química do gene *Smp_158240* com a sequência de códons já otimizados para a expressão em *E. coli*, a construção foi nomeada *SmFH-pUCminusmCS*.

4.1.1. Subclonagem do gene que codifica a *SmFH* no vetor pET28a

A construção *SmFH*-pUCminusmCS foi propagada em *E.coli*, digerida com sucesso e o fragmento de interesse foi ligado em pET28a. Apesar de inúmeras reações de ligação, nossos experimentos de PCR utilizando as colônias como molde não indicavam a presença do inserto, e a maioria dos ensaios indicavam a presença do vetor pET28a religado. Para evitar o religamento do vetor, decidimos utilizar amostras de pET28a contendo um fragmento de aproximadamente 1 kb inserido no sítio múltiplo de clonagem. Desta forma, foi possível monitorar a digestão do vetor e diferenciar no gel, o vetor completamente digerido. Foram realizadas várias reações de digestão de 50 µL, as quais foram purificadas e reunidas para obtermos maior quantidade de DNA necessária para as reações de ligação. Este material então foi concentrado até que obtivéssemos uma quantidade suficiente de DNA.

Apesar do baixo rendimento, 6 diferentes reações de ligação foram realizadas e em seguida as mesmas foram transformadas nas diversas cepas testadas. Com esse experimento foi possível obter colônias que continham o gene de interesse (fragmento de 2017 bp), confirmado nas reações do PCR de colônia utilizando a cepa DH10b (**Figura 19**).



Figura 19. Gel de agarose 0,8% das amostras da reação de PCR de colônia mostrando os clones positivos (em vermelho) da cepa DH10b. O fragmento amplificado possui o tamanho esperado de 2017 pb.

4.1.2. Clonagem no vetor pET28sumo

Devido às dificuldades na reprodutibilidade de experimentos de atividade enzimática, problemas de estabilidade e dificuldades de cristalização da enzima pSmFH, levantamos a hipótese de que a presença da cauda de histidina pudesse interferir na atividade da enzima. Assim, o gene que codifica a enzima de interesse foi subclonado no vetor pET28sumo, gentilmente cedido pelo pesquisador Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, Campinas).

A construção SmFH-pET28a foi propagada em *E.coli*, digerida com sucesso e o fragmento de interesse foi ligado no vetor pET28sumo. Assim como foi feito com o vetor pET28a, para evitar o religamento do pET28sumo, foram utilizadas amostras do mesmo contendo um fragmento de aproximadamente 1,2 kb inserido no sítio múltiplo de clonagem. Desta forma, foi possível monitorar a digestão do vetor e diferenciar no gel, o vetor completamente digerido (**Figura 20**). As três reações de digestão realizadas para inserto e vetor foram purificadas, reunidas e concentradas para que se obtivesse a quantidade de DNA necessária para as reações de ligação.

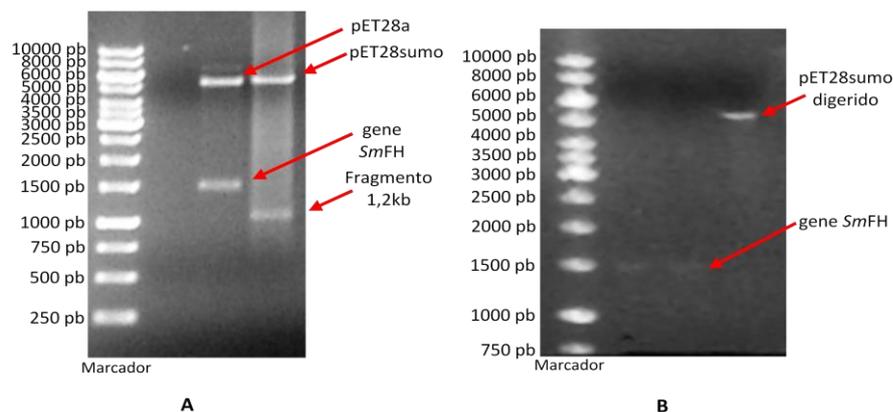


Figura 21. A. Digestão das construções SmFH-pET28a e do vetor pET28sumo a partir de um uma construção em que já existia um fragmento inserido no sítio múltiplo de clonagem. **B.** Amostras do pET28sumo e do gene de interesse digeridos e purificados.

Apesar da figura 21b indicar que houve um baixo rendimento de gene digerido, a quantidade de material permitiu realizar duas reações de ligação na proporção 1:2 e 1:5 de moléculas de vetor para moléculas de inserto. Em seguida, o material foi transformado em *Escherichia coli* DH5 α e a presença do gene de interesse nas células foi confirmada através de reações do PCR de colônia (**Figura 21**).

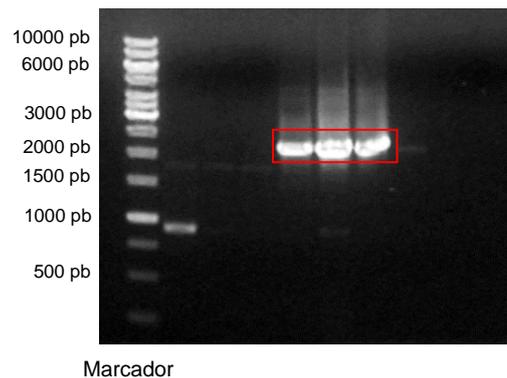


Figura 21. Gel de agarose 0,8% das amostras da reação de PCR de colônia mostrando os clones positivos (em vermelho). A banda de aproximadamente 2400 pb pode ser visualizada, confirmando a presença do inserto.

4.2. Expressão heteróloga do produto codificado pelo gene *Smp_158240*

A proteína expressa pela construção *SmFH*-pET28a, é produzida com uma cauda que possui 6 histidinas na região N-terminal e foi denominada *pSmFH*. Já a proteína expressa pela construção *SmFH*-pETsumo, é produzida em fusão com a proteína SUMO e também com uma cauda que possui 6 resíduos de histidina, e foi denominada *sSmFH*.

Para os experimentos de expressão heteróloga da *pSmFH*, foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* – BL21(DE3). Embora a análise por SDS-PAGE para os experimentos de expressão a 37 °C não indicasse a presença de uma banda correspondente à massa da *SmFH*, a análise dos experimentos de expressão a 18 °C revelou a presença de uma pequena banda, mais evidente na fração insolúvel, presente nas amostras induzidas por 24 horas (**Figura 22**).

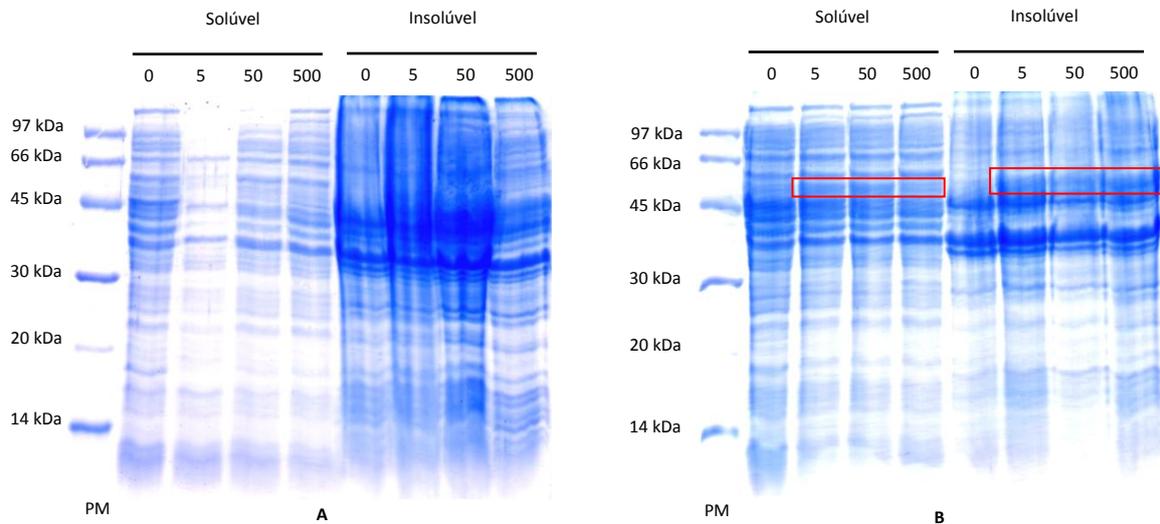


Figura 22. SDS-PAGE (15% poliacrilamida). Ensaio de expressão a 18°C para a construção *SmFH*-pET28a (~58 kDa). Os retângulos vermelhos indicam as bandas de expressão na fração e solúvel insolúvel relativo a presença da *pSmFH*. **A.** 6 horas de indução. **B.** 24 horas de indução. A enzima *a* de interesse possui tamanho de 58 kDa

Uma análise cuidadosa demonstrou um aumento na quantidade de proteína solúvel com o aumento da concentração do agente indutor. Nossos experimentos sugerem que as condições para a obtenção de maior rendimento proteico na forma solúvel requerem a combinação de experimentos de expressão à baixas temperaturas com altas concentrações de IPTG. Assim, para os ensaios de purificação, a expressão em larga escala foi padronizada para 18°C com 500 μM de IPTG por 24 horas.

Tendo em vista que as condições de expressão em larga escala para a enzima *pSmFH* já haviam sido padronizadas, e forneceram um alto rendimento de proteína solúvel, os ensaios de expressão em larga escala da enzima *sSmFH* também foram realizados nas mesmas condições.

4.3. Purificação da *SmFH*

4.3.1. Purificação da *pSmFH*

A purificação da enzima *pSmFH* foi realizada com sucesso através da utilização de uma única etapa cromatográfica (**Figura 23**). A partir da utilização de um gradiente crescente de imidazol, foi

possível obter a proteína de interesse com excelente grau de pureza e um rendimento de aproximadamente 20 mg de proteína por litro de cultura.

A análise da **Figura 24** indica que as lavagens da resina com 0, 25 e 50 mM de imidazol contribuíram para retirar a maioria dos contaminantes. A proteína pSmFH começa a eluir a partir de 50 mM de imidazol, porém ainda na presença de contaminantes. A maior quantidade de proteína elui com 100 mM de imidazol, mas amostras de pSmFH pura também podem ser visualizadas na presença de 250 e 500 mM de imidazol.

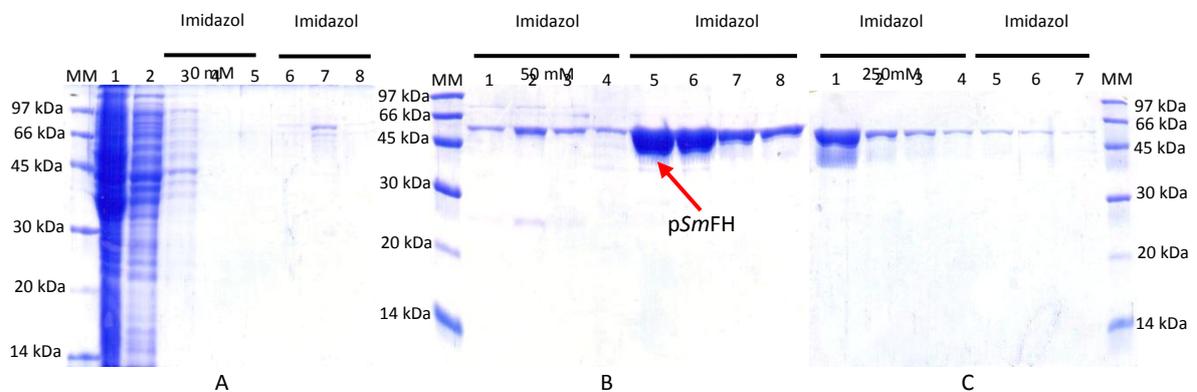


Figura 24. SDS-PAGE (15% poliacrilamida) representando os diferentes passos de purificação na coluna de Ni da enzima pSmFH. **A.** Nas posições 1 e 2 estão representadas a fração insolúvel e o efluente, respectivamente. Nas posições 3 a 5 estão representadas as lavagens 2, 20 e 40 com 0 mM de imidazol, respectivamente. E nas posições 6 a 8 estão representadas as lavagens 1, 2 e 20 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 8 estão representadas as eluições 1, 3, 8, 15 com 100 mM de imidazol, respectivamente. **C.** Nas posições 1 a 4 estão representadas as eluições 1, 3, 10 e 15 com 250 mM de imidazol, respectivamente. Nas posições 5 a 7 estão representadas as eluições 1, 5 e 10 com 500 mM de imidazol, respectivamente. Apontada pela seta vermelha está a banda referente a proteína expressa pela construção SmFH-pET28a, que possui cerca de 58 kDa.

4.3.2. Purificação da sSmFH

A enzima sSmFH também foi purificada com sucesso utilizando um único passo de purificação através de cromatografia por afinidade (**Figura 25**). O rendimento de proteína ao final da purificação foi de aproximadamente 12 mg/mL, abaixo do obtido para a enzima sSmFH. Essa diminuição no rendimento final pode ser atribuída a maior manipulação da amostra e uma consequente precipitação da sSmFH induzida pelo procedimento de digestão da cauda pela protease ULP1 na coluna.

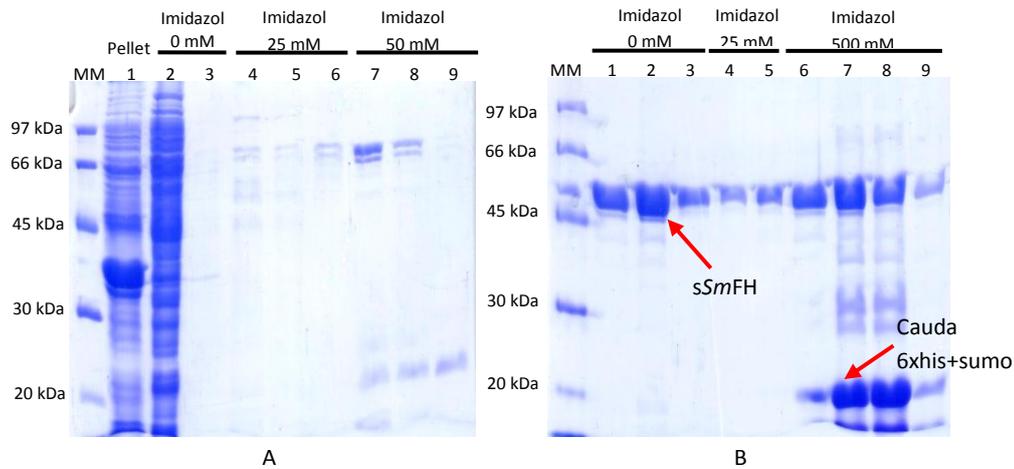


Figura 24. SDS-PAGE (15% poliacrilamida) representando os diferentes passos de Purificação na coluna de Ni da enzima *sSmFH*. **A.** Nas posições 1 e 2 estão representadas a fração insolúvel (pellet) e o efluente, respectivamente. Na posição 3 está representada a lavagem com tampão 0 mM de imidazol. Nas posições 4 a 6 estão representadas as lavagens 2, 3 e 4 com tampão 25 mM de imidazol, respectivamente. E nas posições 7 a 9 estão representadas as lavagens 2, 3 e 4 com 50 mM de imidazol, respectivamente. **B.** Nas posições 1 a 3 estão representadas a eluição da enzima *sSmFH* com tampão 0 mM de imidazol, após a clivagem da cauda. Nas posições 4 e 5 estão representadas as eluições com o tampão 25 mM de imidazol. E nas posições 6 a 9 estão representadas as eluições finas com o tampão com 500 mM de imidazol. Apontada pela seta vermelha está a banda referente à proteína *sSmFH*, com aproximadamente 55 kDa e a cauda que é liberada após a clivagem.

A proteína *sSmFH* ainda em fusão com a cauda de histidina e a proteína sumo começa a eluir com 50 mM de imidazol, porém essa lavagem se faz importante para retirar alguns contaminantes, mesmo com a perda de um pouco da proteína.

Após a lavagem, a coluna é reequilibrada com tampão de ligação, e é feita a clivagem da cauda. Após a clivagem, proteína é eluída com 10 mL de tampão de ligação (0 mM de imidazol). Nem toda a proteína é eluída com o tampão sem imidazol, sendo necessária a aplicação de tampão contendo 25 mM de imidazol para eluir as moléculas de proteína que interagiram inespecificamente com a coluna. Por fim, com 500 mM de imidazol, ainda é possível observar a eluição da proteína de interesse além da cauda, que estava retida na coluna por possuir a cauda 6xhis. Frações da proteína eluída após a clivagem com tampão contendo 0 e 25 mM de imidazol foram reunidas e concentradas para os experimentos de cinética enzimática e cristalização.

4.4. Cromatografia por Filtração em gel

Para a determinação do estado oligomérico da pSmFH e avaliação de possíveis efeitos de agregação foram realizados ensaios de cromatografia por exclusão molecular (filtração em gel). A coluna Superdex 200 (10/300) foi inicialmente calibrada (**Figura 25**) para a determinação da função que correlaciona massa molecular com volume de eluição (**Figura 26**).

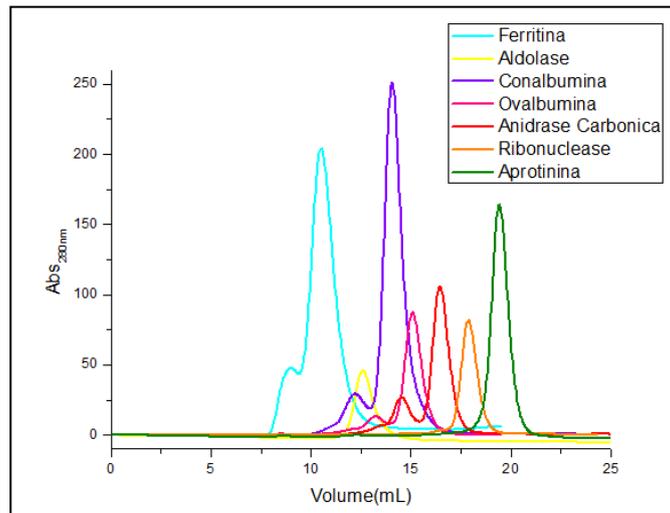


Figura 25. Padronização da coluna Superdex 200 (10/300) (GE)[®] através da utilização dos marcadores aprotinina (6,5 kDa), ribonuclease (13,7 kDa), anidrase (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa), ferritina (440 kDa). Os diferentes volumes de eluição foram utilizados para a determinação da curva de calibração da resina.

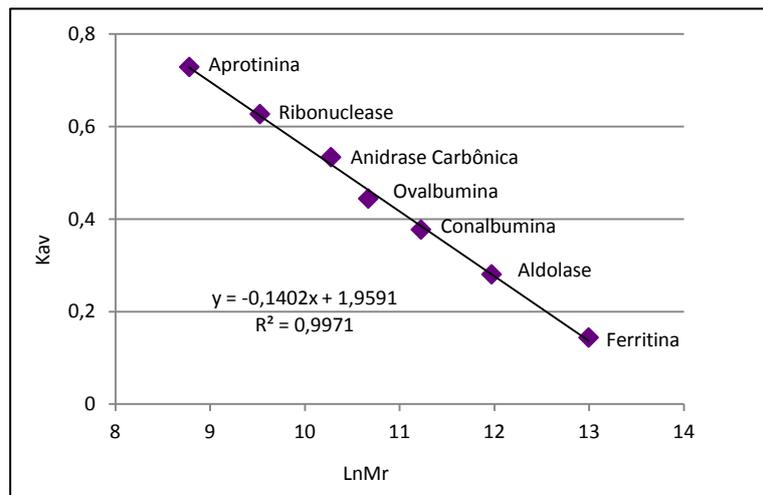


Figura 26. Regressão linear para a determinação da função que correlaciona massa molecular com volume de eluição dos padrões aplicados na coluna Superdex 200 (10/300). LnMr =logaritmo da massa molecular. $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_c - V_o)$, onde V_e é o volume de eluição, V_o é o volume de exclusão, e V_c é o volume da coluna.

A partir do volume de eluição obtido para cada proteína, foi feita uma correlação logarítmica entre massa (kDa) e o K_{av} utilizando a seguinte fórmula:
$$K_{av} = \frac{(V_E - V_0)}{(V_T - V_0)}$$

Nesta relação, K_{av} é um coeficiente de partição que se correlaciona linearmente com a massa de cada proteína, V_E é o volume de eluição que corresponde à metade do pico de absorvância, V_0 é o volume morto da coluna (ou void) e V_T é o volume total (**Figura 27**). A partir da construção do gráfico $K_{av} \times \ln(M_r)$ pode se obter a equação da reta que correlaciona as duas grandezas.

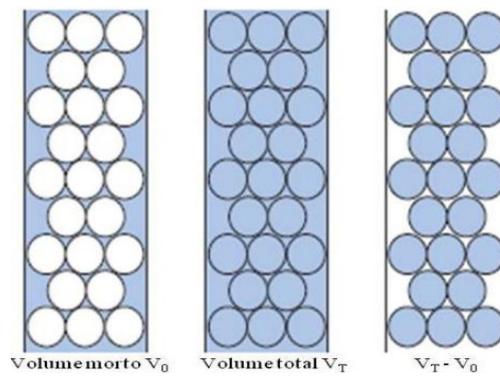


Figura 27. V_0 corresponde ao volume morto ou void da coluna e se refere ao volume de coluna ao qual moléculas maiores que os poros têm acesso. O V_T é a soma entre o volume externo as esferas porosas da matriz (V_0) e o volume interno das esferas corresponde ao volume que partículas menores têm acesso durante a cromatografia. O volume interno das esferas pode ser calculado subtraindo V_T de V_0 .

O perfil de eluição da pSmFH em coluna Superdex 200 (10/300) está representado na **Figura 29**. O cromatograma apresenta um pico majoritário com máximo de absorvância em 11,65mL, além de outros picos menores. Os resultados obtidos sugerem que a enzima pSmFH se apresenta como um tetrâmero com peso molecular de 246 kDa. A forma tetramérica corresponde ao estado oligomérico descrito para as outras proteínas descritas para a mesma classe. Esta massa é ligeiramente diferente da massa molecular esperada (~233 kDa) e essa diferença pode estar associada a interação da cauda de histidina ou da própria pSmFH com a resina e na diferença na conformação da molécula em comparação com os padrões utilizados para a padronização. Já os picos de menor intensidade, como por exemplo o que elui com 10 mL correspondente a aproximadamente 9 moléculas de pSmFH, podem ser associados a possíveis estados de agregação da enzima de interesse.

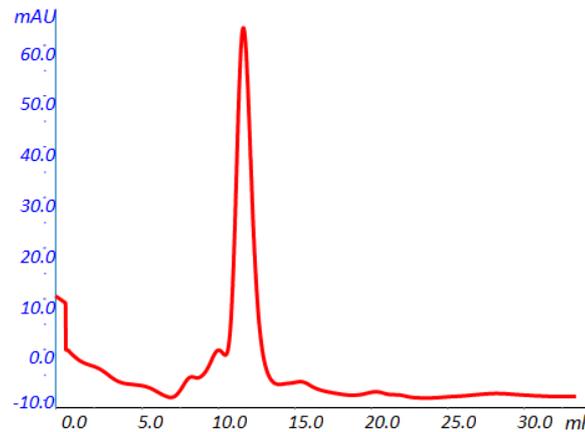


Figura 28. Perfil de eluição da *SmFH* em coluna Superdex 200 (10/300), equilibrada com tampão Tris 50mM pH8,15, KCl 150mM e 0,01% de Triton.

4.5. Espalhamento dinâmico de luz

Além da filtração em gel, medidas de espalhamento dinâmico de luz também foram utilizadas para fornecer informações acerca do tamanho de partícula da *pSmFH* e homogeneidade da amostra. Os resultados das medidas são expressos em um gráfico com a distribuição de partículas por tamanho presentes na solução de *pSmFH* de acordo com a intensidade de luz que espalham e o volume. A relação entre a intensidade de luz espalhada por partículas de um determinado tamanho e a porcentagem em volume dessa partícula na solução não é direta. Uma partícula 10 vezes maior que outra espalha 10^6 vezes mais luz. Por isso, muitas vezes a intensidade de luz observada para partículas maiores corresponde a uma quantidade mínima dessa partícula na solução, quando comparada com a partícula menor.

As figuras 29 e 30 representam as medidas feitas com variação de pH com os tampões: acetato de sódio 50 mM pH 4 e pH 5; cacodilato de sódio 50 mM pH6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; Tris 50 mM pH7,5 , pH 8 e pH 8,5; e Glicina pH 9 e pH 10; todos contendo NaCl 150 mM.

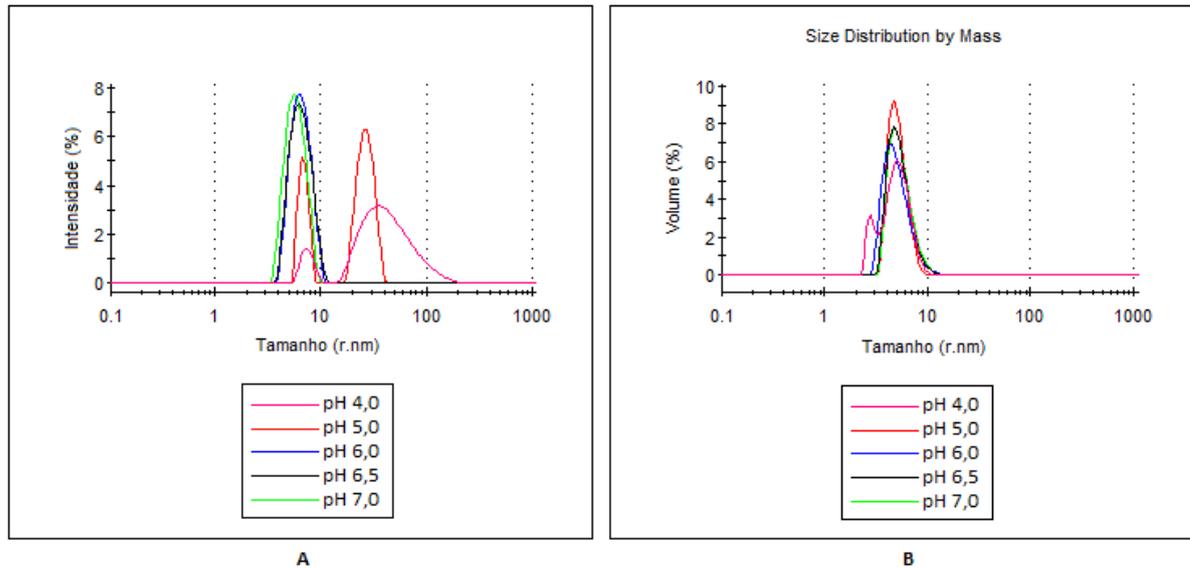


Figura 29. Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a proteína *SmFH*, com os tampões acetato de sódio 50 mM pH 4 e pH 5; cacodilato de sódio 50 mM pH 6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e concentração de 150 mM de NaCl. **A.** Distribuição de tamanho pela % do total de luz espalhada. **B.** Distribuição de tamanho pelo total de volume das partículas.

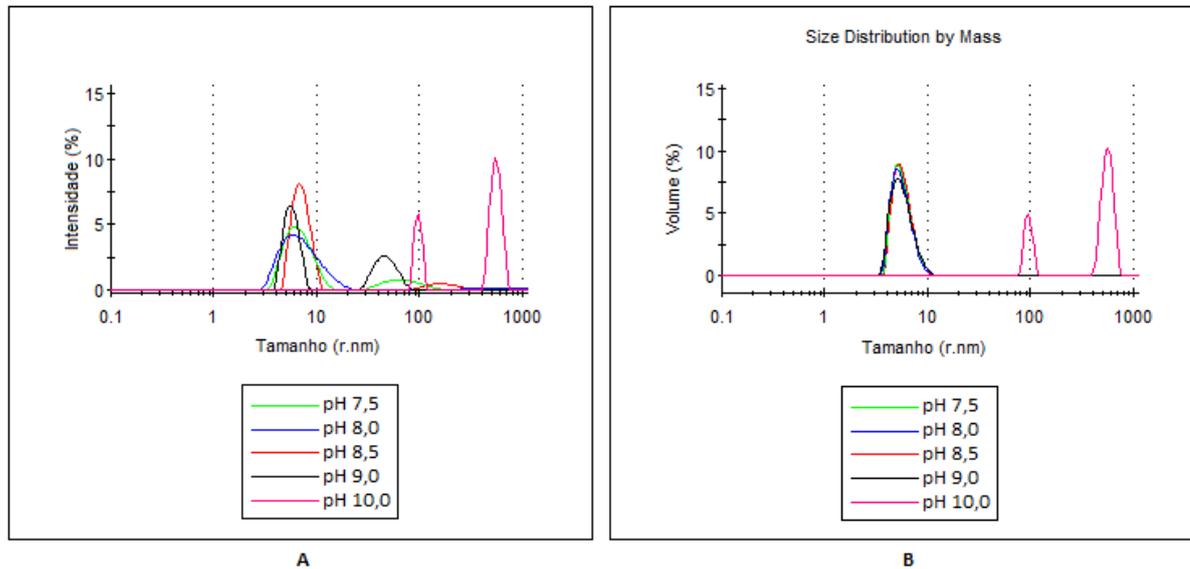


Figura 30. Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a enzima *SmFH*, com os tampões Tris 50 mM pH 7,5, pH 8 e pH 8,5; e Glicina pH 9 e pH 10 e concentração de 150 mM de NaCl. **A.** Distribuição de tamanho pela % do total de luz espalhada. **B.** Distribuição de tamanho pelo total de volume das partículas.

É possível observar um pico de valor médio de 63 Å (6,3 nm) referente ao raio hidrodinâmico da partícula, presente em todos os pHs, exceto no pH 10. A massa molecular estimada para a partícula associada a este pico foi de cerca de 250 kDa. A comparação do valor do diâmetro hidrodinâmico obtido (o dobro do raio) com o tamanho de fumarato hidratases de estrutura já resolvida, como a de *Escherichia coli* (Figura 25) mostra que a medida obtida por DLS se aproxima do tamanho medido para a FH humana. Além disso, a massa molecular estimada em 250 kDa também é próxima da massa esperada para um tetrâmero da pSmFH (aproximadamente 233 kDa) e dos resultados obtidos nos experimentos de cromatografia por filtração em gel. Os resultados obtidos pelas medidas de DLS sugerem que a proteína se apresenta como um tetrâmero.

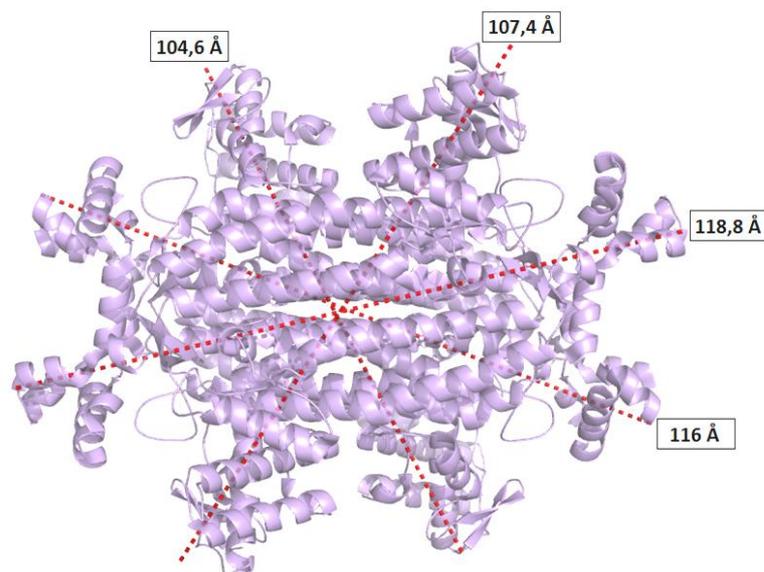


Figura 31. Estimativas, em Å, do tamanho da fumarato hidratase de *E. coli*, feita com a medida da distância das extremidades da estrutura, PDB:1YFE. O valor das medidas se aproxima do valor do diâmetro hidrodinâmico obtido experimentalmente para SmFH.

Estes resultados também revelaram que nos pHs de 7,5 ; 8 e 8,5, embora a pSmFH apresente um pico majoritário referente à forma tetramérica, também apresenta uma fração de proteína na forma agregada. Já nas medidas com pHs 4, 5, 9 e 10, a pSmFH se encontra, em sua maior parte, agregada. Além disso, a presença de um único pico nas medidas com pHs de 6; 6,5 e 7, sugerem que nestes pHs a proteína de interesse se encontra exclusivamente no estado tetramérico, sugerindo uma maior estabilidade dentro dessa estreita faixa de pH.

Buscando melhores condições de estabilidade e homogeneidade da amostra para os experimentos de cristalização foram também realizadas medidas com variação da concentração do sal para 1M de NaCl (**Figura 32**) e do tipo de sal, KCl 150 mM (**Figura 33**), além de medidas com adição de 10% de glicerol (**Figura 34**) ou 5% de tacsinato (**Figura 35**), mantendo sempre os mesmos tampões. O tacsinato, em particular, consiste em uma combinação de reagentes, a maioria deles esperados como ligantes da enzima FH, como o malonato, malato e citrato, podendo assim aumentar a estabilidade proteica.

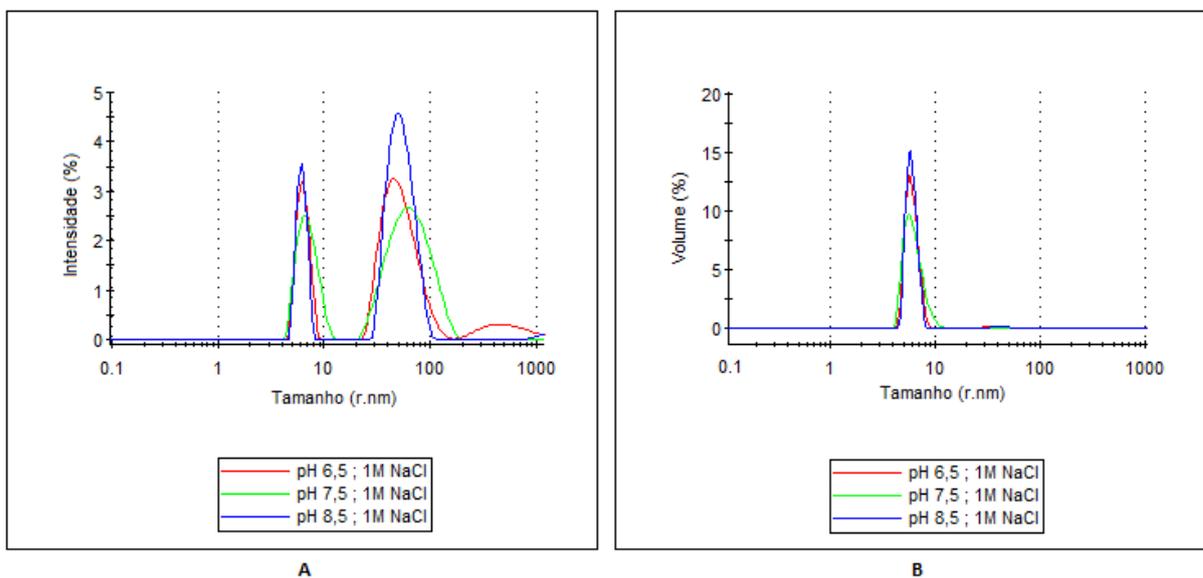


Figura 32. Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a proteína SmFH nos tampões MES pH 6,5; Tris 50 mM pH 7,5 e pH 8,5, e concentração de 1M de NaCl. **A.** Distribuição de tamanho pela % do total de luz espalhada. **B.** Distribuição de tamanho pelo total de volume das partículas.

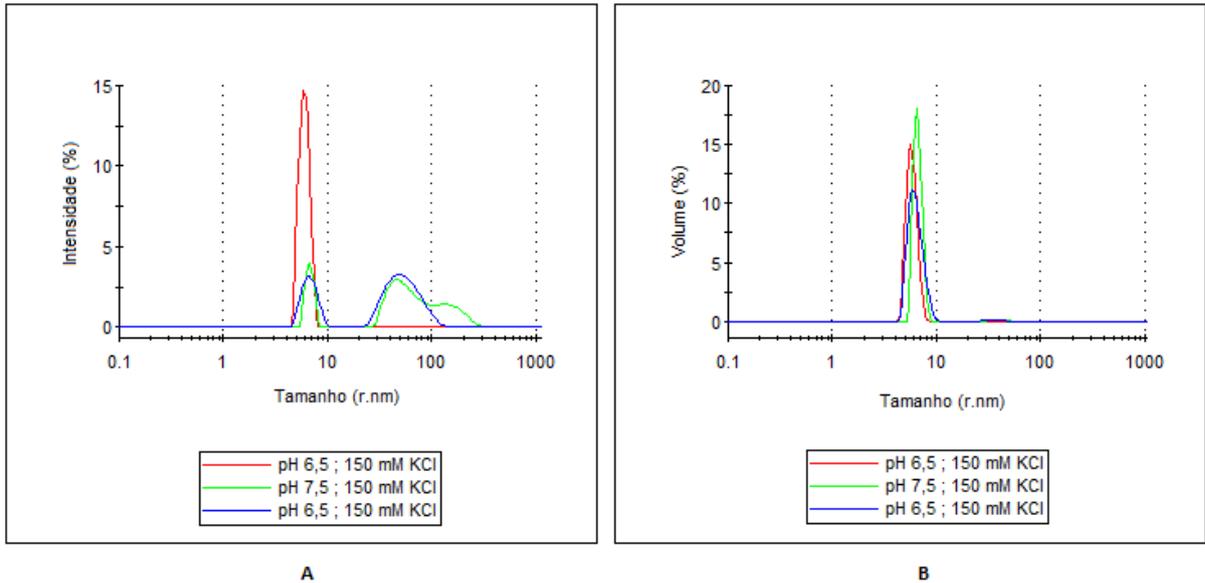


Figura 33. Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a proteína *SmFH* nos tampões MES pH 6,5; Tris 50 mM pH 7,5 e pH 8,5, e concentração de 150mM de KCl. **A.**Distribuição de tamanho pela % do total de luz espalhada. **B.** Distribuição de tamanho pelo total de volume das partículas.

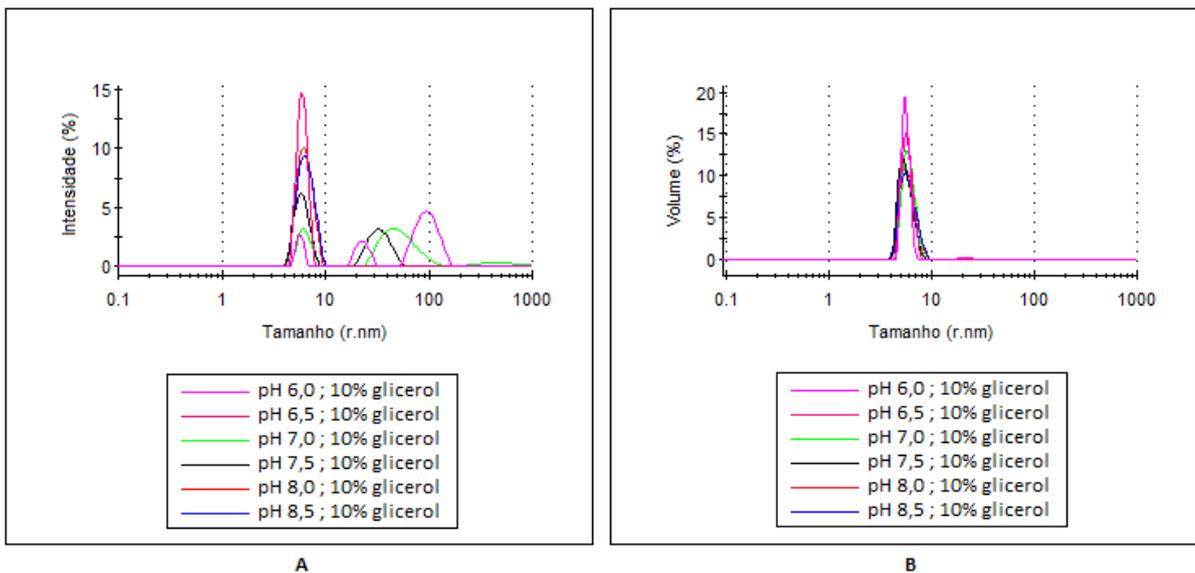


Figura 34. Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a proteína *SmFH* nos tampões cacodilato de sódio 50 mM pH6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; tris 50 mM pH 7,5 , pH 8 e pH 8,5, e concentração de 150mM de NaCl, com 10% de glicerol. **A.**Distribuição de tamanho pela % do total de luz espalhada. **B.** Distribuição de tamanho pelo total de volume das partículas.

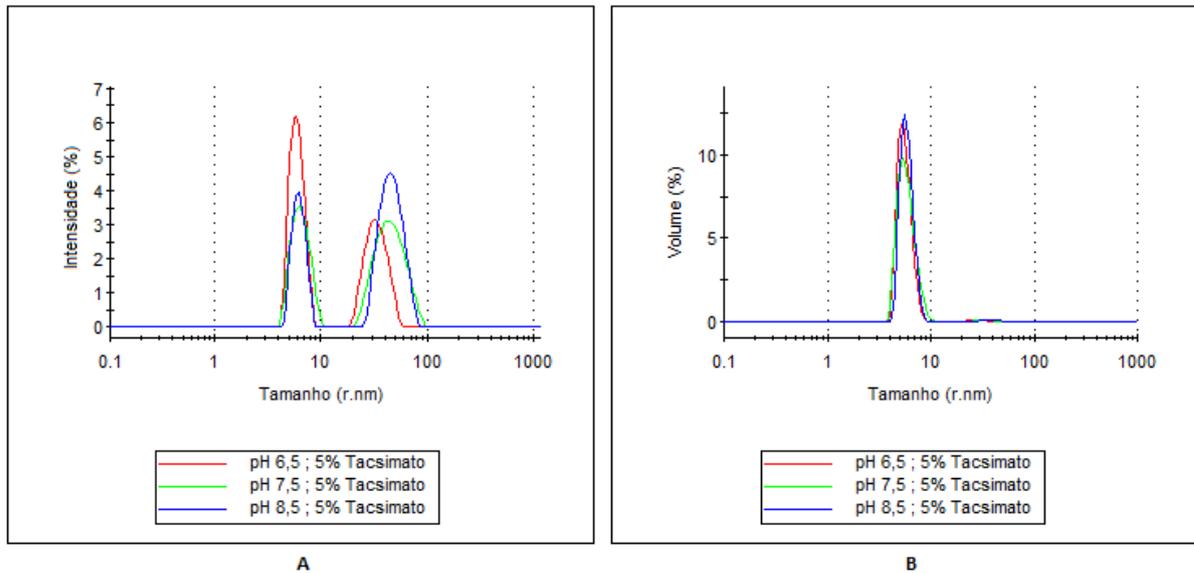


Figura 35. Representação gráfica das medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) realizadas com a proteína *SmFH* nos tampões cacodilato de sódio 50 mM pH 6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; tris 50 mM pH 7,5; pH 8 e pH 8,5, e concentração de 150mM de NaCl, com 5% de tacsinato. **A.** Distribuição de tamanho pela % do total de luz espalhada. **B.** Distribuição de tamanho pelo total de volume das partículas.

Como é possível observar nas figuras 33 e 34 no pH 6,5, em que a proteína se comporta melhor, a alta concentração ou a troca de sal não afetaram o homogeneidade da amostra, que se manteve sem agregação. Mas para a maioria dos pHs, as condições com NaCl 1M (**Figura 33**), KCl 150mM (**Figura 34**), 5% de Tacsinato (**Figura 36**), não são condições favoráveis para a proteína. Entretanto, a adição de 10 % de glicerol se mostrou favorável à estabilidade da amostra, uma vez que as medidas feitas da amostra com glicerol apresentaram menor agregação, quando comparadas com as medidas sem glicerol.

Todas as comparações entre as condições avaliadas pelos experimentos de DLS são realizadas com base nas curvas que correlacionam intensidade de luz espalhada e raio da partícula. Entretanto, quando se observa os gráficos em que estão plotadas as curvas que correlacionam a porcentagem de volume ocupado pela partícula e o tamanho da mesma, percebe-se que as partículas maiores observadas na distribuição por intensidade, em porcentagem de volume total, são

irrelevantes, ocupando um volume tão pequeno que não chega a ser observado nos gráficos. Exceto na medida realizada em pH 10, onde houve uma grande agregação da proteína. Estes resultados sugerem que mesmo que algumas condições possam ser melhores para a estabilidade da proteína, todas as condições testadas, exceto pH 10, apresentam majoritariamente a proteína em sua forma tetramérica.

Experimentos de espalhamento dinâmico de luz são muito adequados para avaliação da homogeneidade das proteínas em solução, a qual influencia diretamente na predisposição da mesma para a cristalização. Portanto, os experimentos de DLS contribuíram de forma importante para o entendimento da estabilidade da proteína em diversas pH e aditivos, nos guiando para melhorar as condições em que a proteína é armazenada e se comporta para os experimentos de cristalização.

4.6. Dicroísmo circular (CD)

Para dar início aos estudos de caracterização estrutural, foram realizadas medidas de dicroísmo circular, que poderia nos fornecer informações acerca da presença e quantidade de estrutura secundária na pSmFH.

O espectro de CD da enzima pSmFH em tampão Tris pH 8,5 é caracterizado por duas bandas negativas em cerca de 208 e 222 nm (**Figura 36**). O mínimo em 222 nm é atribuído majoritariamente a transições encontradas em estruturas helicoidais (WOODY, 1994).

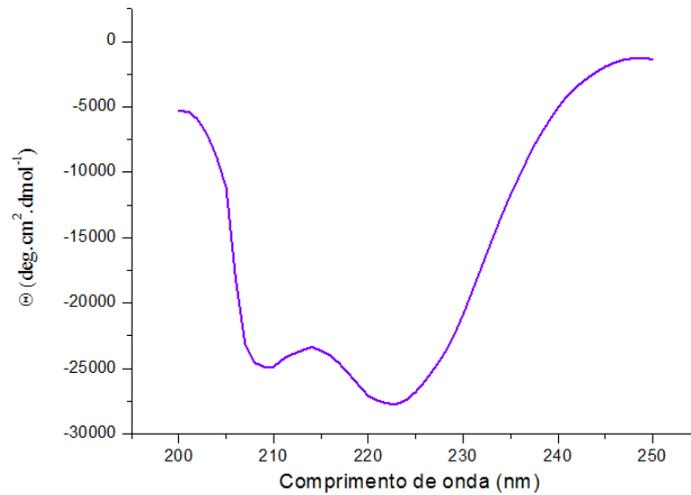


Figura 36. Espectro de Dicroísmo Circular da enzima *SmFH*.

Com a desconvolução do espectro da *pSmFH* com o pacote de programas CDPro, foi possível obter, utilizando o programa Selcon3, a estimativa do conteúdo de estrutura secundária da enzima de interesse: 60,8% de α -hélice; 5,7% de fita- β e 37,6% de Coil-Turn.

A partir desses valores realizamos comparações com estruturas já resolvidas de fumarases da classe II. Utilizando o algoritmo STRIDE (STRuctural IDentification), foi calculado o conteúdo de estrutura secundária das fumarases humana (*HsFH* - PDB:3E04), de *E. coli* (*EcFH* - PDB:1YFE) e de levedura (*ScFH* - PDB: 1YFM). A **Tabela 6** traz a comparação entre essas estruturas.

Tabela 6: Comparação entre o conteúdo de estrutura secundária de fumarases da classe II que possuem estrutura resolvida, com o conteúdo da *SmFH*, calculado através da desconvolução do espectro de CD.

	<i>α-hélice (%)</i>	<i>fita-β (%)</i>	<i>Volta+coil (%)</i>
<i>pSmFH</i>	60,8	5,7	37,6
<i>HsFH</i>	62,5	8,5	29
<i>EcFH</i>	61,9	7,2	30,9
<i>ScFH</i>	60,6	7,8	31,6

Com base na tabela acima, é possível afirmar que os resultados obtidos para a *pSmFH* sugerem que a enzima apresenta um conteúdo de estrutura secundária muito próximo daqueles calculados para as FHs da classe II. Assim, as análises qualitativas do espectro de CD da *pSmFH* fornece indícios de que a estrutura está corretamente enovelada, apresentando conteúdo de estrutura secundária dentro do esperado para fumarases da classe II.

Outra informação importante que pudemos obter com os experimentos de dicroísmo circular foi com relação à estabilidade térmica da *pSmFH*. O gráfico apresentado na **Figura 38** mostra as curvas de CD em função da temperatura.

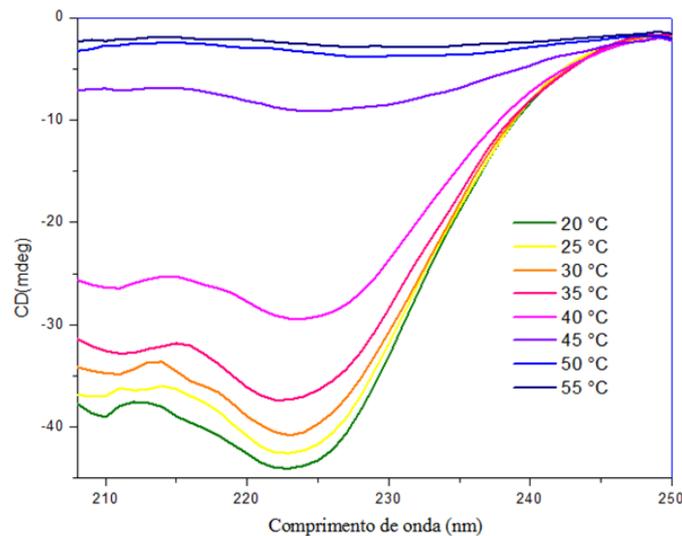


Figura 37. Curvas de CD de ensaio de desnaturação térmica da *SmFH*.

Com os dados obtidos nos experimentos de CD, foi traçada a curva de transição da *pSmFH*, expressa em termos de fração de proteína desnaturada (f_D) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$), onde é

possível observar a ocorrência das mudanças conformacionais induzidas pelo aumento da temperatura (**Figura 38**). A curva de transição é obtida através de equações descritas abaixo que relacionam a fração de proteína desnaturada em cada temperatura com os valores espectrais dos mínimos característicos para os espectros de CD.

$$f_D = \frac{x_n - x_{obs}}{x_n - x_D} \text{ e } f_n + f_D = 1;$$

x -> valores espectrais nos mínimos característicos para os espectros de CD

n e D -> refere-se à forma nativa e desnaturada, respectivamente,

obs -> valores espectrais observados a uma dada temperatura

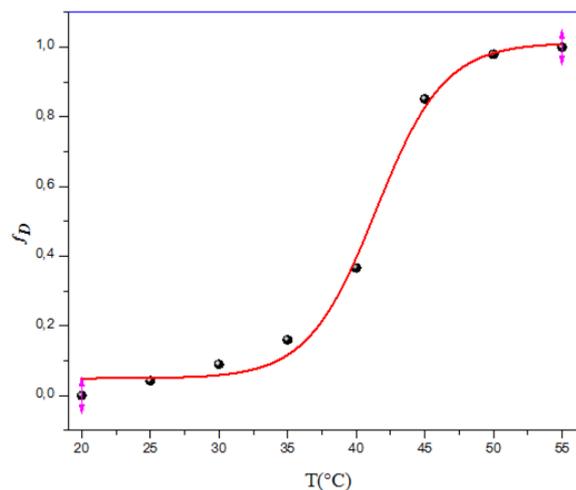


Figura 38. Curva de transição da pSmFH induzida pelo aumento da temperatura.

Com essa curva, foi possível estimar o valor da temperatura de transição $T_m = 315,95 \text{ K} = 42,8^\circ\text{C}$.

A avaliação da termoestabilidade da pSmFH nos permite realizar a comparação com outros membros da classe II das FHs. Inicialmente, acreditava-se que a termoestabilidade poderia ser uma característica intrínseca dos membros da classe II das fumarases, como por exemplo *Sulfolobus solfataricus* (PUCHEGGER, 1990), que permanece ativa mesmo a temperaturas maiores que 80°C . No

entanto, embora ainda bastante escassas, as informações disponíveis na literatura mostram uma grande variação no comportamento das FHs com relação à estabilidade frente a altas temperaturas, como é reportado para a FH de *E. coli* (WOODS, 1988), a qual possui atividade em torno de 50 °C, mas não em temperaturas mais altas, e a FH de *Saccharomyces cerevisiae* (KERUCHENKO, 1992), que a 50 °C já não possui atividade.

Como *Sulfolobus solfataricus* é um microorganismos termofílico, que vive em ambientes vulcânicos (em torno de 78-80 °C), podemos associar a estabilidade da FH dessa espécie a altas temperaturas com à característica evolutiva da espécie, consequência da adaptação ao seu ambiente natural, e não uma característica geral das enzimas da classe II das fumarases.

4.7. Ensaios de atividade da SmFH

O ensaio de atividade da pSmFH foi realizado através do monitoramento espectrofotométrico da formação do produto da catálise fumarato. Os ensaios iniciais foram realizados em Tris 50 mM pH 8,5 e NaCl 150 mM, tampão no qual a proteína se encontra após a purificação. Para esses ensaios foi utilizada 25 µg/mL de pSmFH na presença de 5mM de malato, sem sucesso. Neste pH, a atividade da pSmFH foi observada apenas quando a concentração da proteína e de substrato foram aumentadas para 200 µg/mL e 50 mM, respectivamente. A atividade da proteína concentrada após o processo de purificação foi então monitorada por 4 minutos (**Figura 39**).

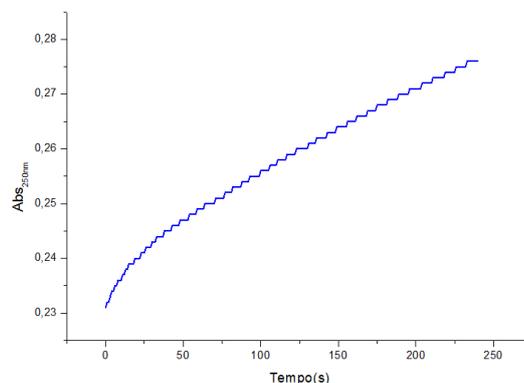


Figura 39. Curva de atividade monitorada a 250nM. A concentração final de proteína foi de 200ug/mL, na presença de 50 mM de malato em pH 8,5.

Os resultados iniciais indicaram que a proteína se encontrava pouco ativa, sendo necessário um excesso de enzima para que a atividade pudesse ser detectada. Visando encontrar uma condição melhor para os ensaios de atividade da enzima, foram então testadas diferentes concentrações de substrato, nos dois sentidos da reação, usando 5-50 mM S-malato, 1-25mM fumarato, mas nenhuma destas tentativas se mostrou eficaz para monitorar a atividade da pSmFH.

Visando encontrar condições favoráveis para o monitoramento da atividade enzimática da SmFH foram realizados ensaios de atividade onde o pH foi variado. Cogitamos a hipótese de que a mudança de pH poderia interferir na carga dos aminoácidos e portanto na atividade da pSmFH.

Assim, foram testados os tampões acetato de sódio 50 mM pH 4 e pH 5; cacodilato de sódio 50 mM pH6; MES pH 6,5; fosfato de sódio 50 mM pH 7,5; tris 50 mM pH7,5 , pH 8 e pH 8,5; e glicina pH 9 e pH 10; todos contendo NaCl 150 Mm, com 10 mM de malato.Em alguns experimentos de monitoramento de ensaio enzimático, foi possível detectar atividade da enzima para a pSmFH, no entanto estes experimentos não foram reprodutíveis, de forma que a atividade da enzima varia muito de amostra para amostra de cada purificação, dificultando a caracterização cinética da mesma.

Para continuar investigando os motivos que levam a falta de reprodutibilidade nos experimentos de atividade da enzima de interesse, outra hipótese analisada seria a de a proteína possuísse algum cofator necessário para a atividade, e a mesma estaria se enovelando sem este suposto cofator, pois o suprimento de nutriente do meio LB não estaria sendo suficiente para a formação ou o fornecimento do cofator para a enzima. Para avaliar essa hipótese, testamos a expressão da proteína em meio rico (Terrific Broth), que possui maior concentração de nutrientes que o meio LB. No entanto, os resultados deste experimento indicaram que a expressão em meio rico não favorece a atividade da pSmFH, pois nos ensaios realizados, a mesma continuou a apresentar atividade quase nula.

Para investigar se a presença da cauda de histidina poderia estar interferindo na atividade da enzima de interesse, a mesma foi subclonada no vetor pET28sumo. Entretanto, o monitoramento da

atividade da enzima *sSmFH*, obtida a partir da nova construção, também resultou em experimentos não reprodutíveis, onde a enzima apresentava-se pouco ativa.

Também foi cogitada a hipótese da atividade enzimática da proteína de interesse ser susceptível à oxigênio, através, possivelmente, da oxidação das cisteínas, ou de algum cofator. Para investigar essa possibilidade, realizamos experimentos em de monitoramento da atividade da *sSmFH* na ausência de oxigênio, no laboratório do professor José Carlos Toledo Júnior da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, que possui a infraestrutura necessária para tal experimento. Novamente, não foi possível monitorar atividade da enzima, sendo assim, essa hipótese também foi descartada.

Outras hipóteses pudessem explicar a baixa atividade da enzima de interesse foram elaboradas. Um fato interessante observado foi que após a eluição da *pSmFH* no processo de purificação e posterior concentração da mesma em sistema Amicon® Ultra, verificamos que existia um leve cor amarela presente na amostra. Como as fumarases da classe II não apresentam nenhum tipo de cofator, não era esperada tal coloração. Assim, foi cogitada a hipótese da presença de um cluster Fe-S na *pSmFH*, como ocorre nas fumarases da classe I. Este fato justificaria a baixa atividade da enzima, visto que as fumarases que apresentam o cluster são sensíveis a oxigênio. Assim, para investigar essa hipótese, realizamos a expressão da enzima em presença de 2 mM de cisteína 0,2 mg/mL de sulfato ferroso e 0,2mg/mL citrato férrico, permitindo que houvesse grande quantidade de Fe e S disponível no meio de cultura para a formação adequada do cluster durante a expressão da enzima. Estes aditivos são utilizados com sucesso em experimentos de expressão de proteínas que se ligam a cluster Fe-S. Os resultados indicaram que a nossa hipótese não se confirma, pois mesmo com ferro e cisteína no meio, a *pSmFH* manteve a sua cor amarela pálida, e, qualitativamente, não mostrou alteração na atividade, permanecendo pouco ativa.

Na tentativa de investigar a causa da cor apresentada pela enzima, também foram realizados experimentos de cromatografia por exclusão molecular em coluna HiTrap Phenyl HP (GE Lifescience) e cromatografia por troca aniônica em Mono Q 5/50 GL HP (GE Lifescience). Estes procedimnetos

cromatográficos foram realizados com base na hipótese de que algum contaminante estivesse agregado à enzima de interesse, e que fosse ele o responsável pela cor da amostra, e não a enzima *SmFH*. Entretanto, não obtivemos separação de populações através dessas cromatografias, e a enzima elui em um pico único, que, quando concentrado restabeleceu a cor amarela pálida.

Experimentos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) também foram realizados, baseados na hipótese de que a cor presente na amostra da enzima de interesse pudesse estar associada à interação com algum metal. Neste experimento, elétrons desemparelhados podem alterar seu estado de spin absorvendo energia no comprimento de onda de microondas na presença de um campo magnético.

Inicialmente não observamos nenhum sinal de EPR na amostra, e como, em medidas de EPR, somente sistemas paramagnéticos podem mostrar sinal de EPR, como V^{4+} , Ti^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , utilizamos soluções de ditionito 2M e ditioneitol 300mM, e água oxigenada 10M e persulfato de amônio 3M para tentar reduzir ou oxidar o suposto metal, e levá-lo para um estado em que pudéssemos observar sinal. No entanto, tais estratégias não surtiram efeito, e nenhum sinal pode ser observado, dando um indicativo de que a cor presente na amostra não é consequência da interação da proteína com metais. Este indicativo foi confirmado com a realização de experimentos de Espectrometria de Massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), com o qual é possível realizar uma análise multielementar da presença de metais na amostra. Novamente, não foi possível detectar quantidades de nenhum metal em níveis muito superiores ao observado na análise do tampão sem proteína (branco). Este experimento confirmou que a cor apresentada pela proteína não se deve à presença de metal.

Outra hipótese investigada por nós foi com relação ao elevado conteúdo de cisteína da *SmFH* e à possibilidade dessas cisteínas estarem interferindo na atividade por estabelecerem interações não favoráveis à atividade da enzima. Quando comparada a outras FH's da classe II, a *pSmFH* possui um conteúdo de cisteína maior que as outras analisadas. Sabe-se que o sítio ativo, conservado em todas as enzimas da classe II, não apresenta nenhuma cisteína. Porém, como desconhecemos a

estrutura tridimensional da pSmFH, cogitamos a ideia de que alguma cisteína pudesse estar envolvida com a atividade da enzima, e dessa forma, estar interferindo na atividade da enzima devido ao seu estado de oxidação ou a interações indesejadas. Para estudar essa hipótese, realizamos ensaios de purificação na presença de 1mM do agente redutor ditioneitol (DTT). O DTT protege as cisteínas tanto da oxidação, quanto de estabelecerem interações não desejadas. Os resultados desses experimentos indicaram que a adição de DTT durante as etapas de purificação não teve qualquer influência no aumento da estabilidade da proteína nem auxiliou na obtenção de proteína ativa. Duas hipóteses são propostas para estes resultados, uma delas é a de que a baixa atividade da enzima realmente não se deve a interações inadequadas das cisteínas distribuídas na estrutura da enzima, como, por exemplo uma ponte dissulfeto, cuja formação pode ser evitada pelo uso do DTT. A segunda hipótese é a de que, se realmente a falta de atividade da proteína for consequência da oxidação de cisteínas próximas ou no sítio catalítico, a presença do DTT, embora possa minimizar este efeito indesejado, permanece ligado a elas podendo atuar como um inibidor, impedindo que ocorra o mecanismo catalítico normalmente, caso ele seja dependente de alguma cisteína.

4.8. Cristalização

Para a formação de um cristal, a solução de proteína deve ser levada para um estado de supersaturação; estado termodinamicamente instável, onde as moléculas de proteína interagem entre si, sendo induzidas a se agruparem de forma organizada, em condições favoráveis. Diversos fatores podem ser combinados de forma a levar a solução de proteína para o estado de supersaturação e conseqüentemente formação do cristal. Os mais comumente utilizados são: temperatura, concentração do agente precipitante, pH, concentração de proteína, adição de ligantes que interferem na solubilidade da proteína, dentre inúmeros outros.

Existem várias técnicas utilizadas para a cristalização de proteínas como diálise, difusão líquido-líquido e difusão de vapor. Dois dos métodos mais comuns para cristalização utilizam a técnica por difusão de vapor e são conhecidos como o método da gota suspensa (“hanging drop”) e gota sentada (“sitting drop”). Os métodos de gota suspensa e sentada diferem somente na posição em que a gota é colocada no experimento em relação à solução do poço (**Figura 40**). Em ambos, uma gota contendo a solução de cristalização (tampão, precipitantes e aditivos; também chamada de líquido-mãe) é misturada à solução de proteína e equilibrada contra um reservatório (poço) contendo a mesma solução de cristalização. Desta forma, a solução de cristalização encontrada na gota fica inicialmente mais diluída do que a encontrada no poço, e a diferença de concentração inicial entre gota e poço depende da razão de diluição inicial da gota. Este sistema é selado e o equilíbrio é alcançado por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório (poço). A concentração dos precipitantes na gota aumenta, diminuindo assim a solubilidade da solução de proteína e permitindo, em condições favoráveis, a formação de cristais.

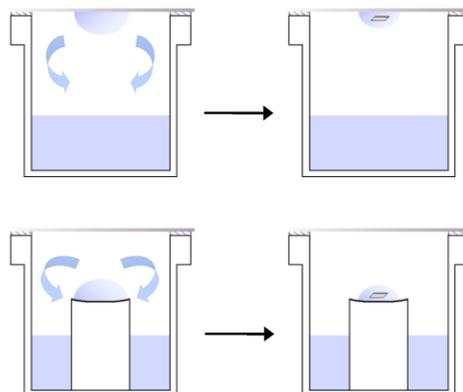


Figura 40. Formas de cristalização de proteínas por difusão de vapor: Gota suspensa (hanging drop) e gota sentada (sitting drop) (figura cedida por Matheus P. Pinheiro).

Inicialmente a concentração de proteína utilizada para os experimentos de cristalização era de 10 mg/mL em tampão tris 50mM pH 8,5 e NaCl 150mM , porém, os experimentos resultaram na precipitação da proteína em todas as gotas dos kits testados, o que nos levou a diminuir a

concentração para 7 mg/mL. Nesta concentração ainda observamos que a proteína continuava precipitando excessivamente, assim, reduzimos ainda mais a concentração dos experimentos de cristalização, que passaram a ser realizados com a proteína a 3,5 mg/mL.

Além da variação na concentração da proteína, foram testadas diversos fatores que pudessem auxiliar na estabilização da enzima, entre eles estão, a adição de agente redutor DTT, para estabilização das cisteínas, a adição do substrato natural da enzima, o malato, adição de 0,1% de detergente Triton, para estabilizar porções hidrofóbicas da proteína, diminuindo agregações, e a adição de 10% de glicerol, que aumenta a viscosidade do meio e diminui a agregação da proteína, possibilitando uma maior estabilização da mesma. Dentre todas as condições testadas, tanto para pSmFH, quanto para sSmFH, aquela que se mostrou mais eficiente na estabilização da proteína, diminuição da agregação e da formação de precipitado foi a adição de 10% de glicerol. Este resultado também se repetiu nos experimentos de DLS, que indicaram que a adição de 10% de glicerol é favorável à estabilidade da enzima.

Apesar das avaliações feitas pelos experimentos de filtração em gel e espalhamento dinâmico de luz indicarem que a proteína pSmFH se encontra relativamente homogênea e sem agregação e apesar das modificações realizadas terem indicado uma melhora na aparência das gotas dos experimentos de cristalização, não foi possível obter monocristais da proteína de interesse nos experimentos realizados.

4.9. Modelagem por homologia

Devido às dificuldades na obtenção de monocristais da proteína de interesse, optamos por utilizar a técnica de modelagem molecular por homologia para predição da estrutura terciária da SmFH.

Como o processo de obtenção de cristais é empírico e multivariável, nem sempre controladas, ele muitas vezes se torna o fator limitante para a obtenção experimental da estrutura.

No nosso caso, a técnica de modelagem não teve a intenção de substituir as técnicas experimentais de determinação estrutural, mas sim de contribuir para o entendimento das características estruturais da enzima *SmFH*, e as particularidades da mesma com relação às outras fumarato hidratases da classe II. Através da análise do modelo, a proposta era obter informações que ajudassem a entender o comportamento da enzima quanto à falta de atividade e aos ensaios de cristalização.

Inicialmente, para realização da modelagem por homologia, foi feita uma pesquisa no PDB (www.pdb.org) por estruturas disponíveis para a enzima fumarato hidratase, onde foi possível identificar um total de 21 modelos cristalográficos. Com as estruturas encontradas, foram selecionadas aquelas que possuíam boa resolução e boa qualidade estereoquímica, checada com o servidor Molprobability. A tabela 7 apresenta as estruturas do PDB selecionadas, juntamente com o organismo a qual pertencem, a resolução e a identidade sequencial com relação a *SmFH*.

Tabela 7: Estruturas utilizadas como molde para a modelagem por homologia, sua identidade sequencial com a enzima *SmFH*, e a resolução.

Estrutura	Organismo	Identidade (%)	Resolução (Å)
1FUQ	<i>Escherichia coli</i>	45	2,0
1VDK	<i>Thermus thermophilus</i>	45	1,8
3E04	<i>Homo sapiens</i>	49	1,95
3GTD	<i>Rickettsia prowasekii</i>	47	2,4
3OCE	<i>Brucella melitensis</i>	36	2,58
3QBP	<i>Mycobacterium marinum</i>	37	1,85
3RD8	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	37	2,2
3TV2	<i>Burholdeira pseudomallei</i>	45	2,1
4ADL	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36	2,2
4HGV	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	47	2,4

Foram gerados 6 modelos da *SmFHs* pelo programa Modeller, com alta similaridade entre eles. O modelo de melhor estereoquímica foi selecionado e submetido à pequenas modificações, através de intervenções manuais em regiões inicialmente de má qualidade. A análise do modelo final apresentou resultados satisfatórios, ficando todos os critérios de avaliação dentro da faixa de pontuação como ótimo ou bom, ou seja, nenhum critério foi reprovado. Estes critérios incluem a análise de contatos atômicos, diagrama de Ramachandran, rotâmeros, estereoquímica .

O modelo gerado apresentou um conteúdo de estrutura secundária distribuído em 59,8 % de α -hélices, 32,4 % de fita- β , e 7,8 % de volta-coil, este valor se encontra próximo do valor estimado pelos experimentos de CD estimado em 60,8 % de α -hélices, 37,6 % de fita- β , e 5,7 % de volta-coil.

A sobreposição dos carbonos α do modelo do monômero da *SmFH* com as estruturas da enzima humana (3E04) e da enzima de *Mycobacterium tuberculosis* (4ADL) é satisfatória (**Figura 41**), com exceções das regiões próximas ao N e ao C-terminal onde é possível observar maiores diferenças. A sobreposição do modelo da *SmFH* com a enzima humana apresentou um RMSD de 1,043 Å enquanto o RMSD de sobreposição com a enzima de *M. tuberculosis* foi de 1,255 Å. O desvio encontrado entre o modelo de *SmFH* e as estruturas de membros da mesma classe é da mesma ordem de grandeza das diferenças encontradas quando comparamos as estruturas já reportadas.

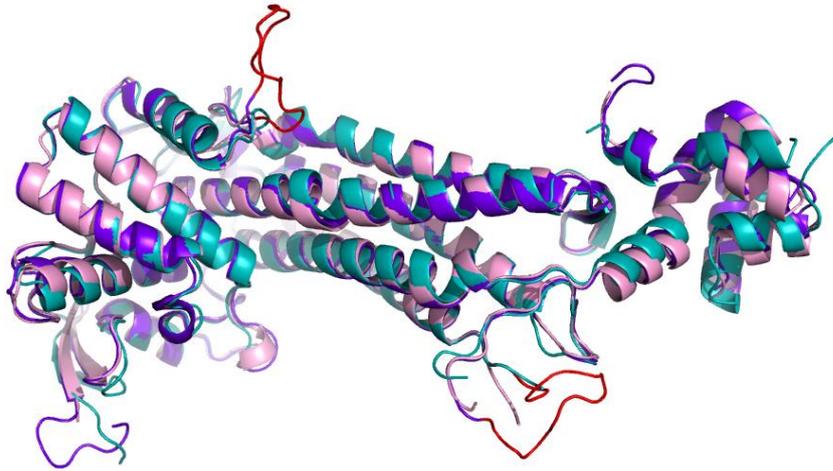


Figura 41. Sobreposição das estruturas da enzima humana (rosa), de *Mycobacterium tuberculosis* (ciano) e do modelo do monômero da SmFH (roxo). Os dois loops em vermelho representam as regiões que apresentam as maiores diferenças entre o modelo e as estruturas usadas como molde.

Quando analisamos a forma monomérica para o modelo de SmFH, as maiores diferenças observadas entre as estruturas utilizadas como molde e o modelo consistem na presença de duas inserções modeladas como dois loops (**Figura 41**) que estão ausentes nas estruturas reportadas até o presente momento para enzimas da mesma classe (**Figura 42**).

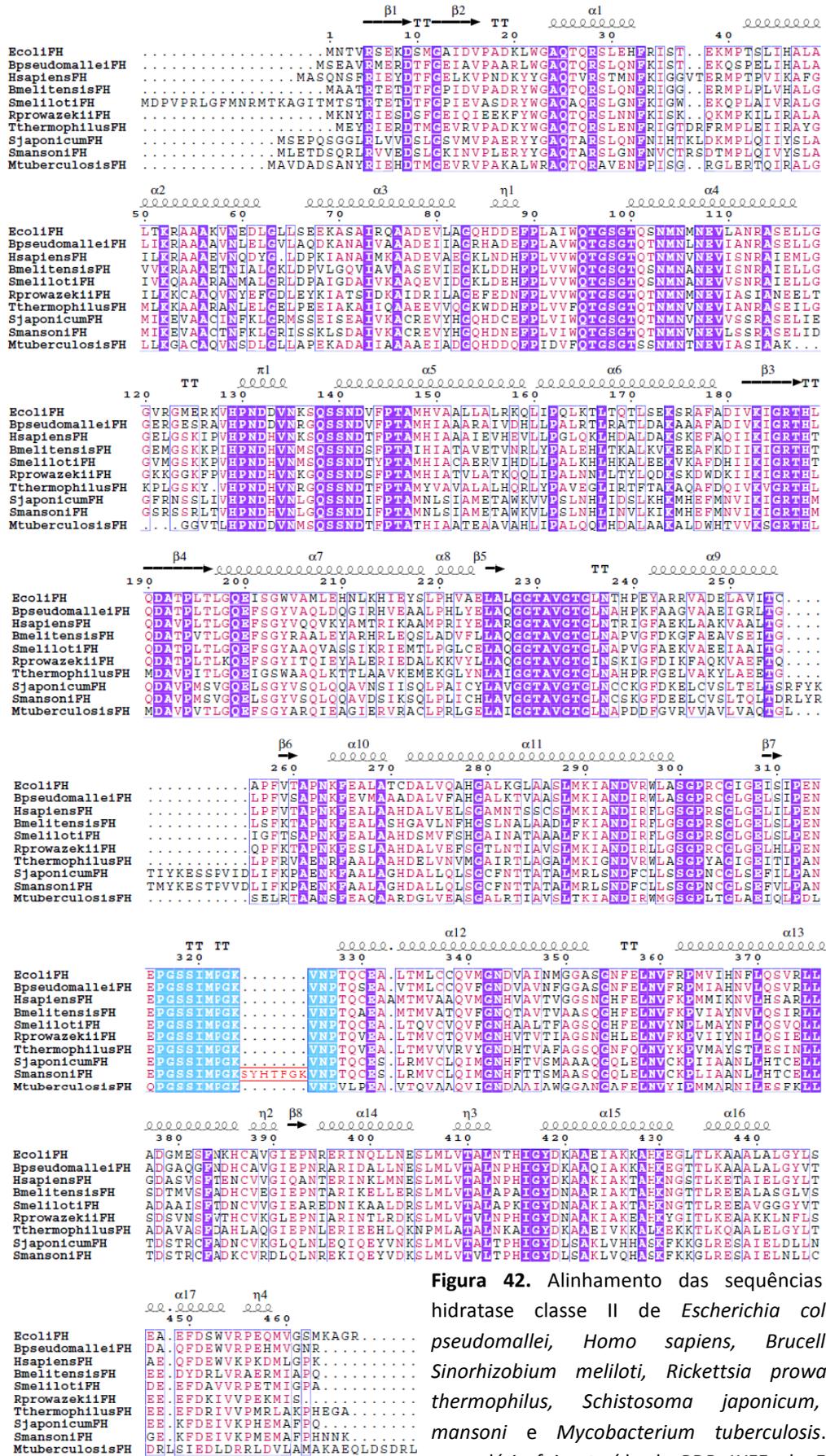


Figura 42. Alinhamento das sequências da fumarato hidratase classe II de *Escherichia coli*, *Burholderia pseudomallei*, *Homo sapiens*, *Brucella melitensis*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rickettsia prowasekii*, *Thermus thermophilus*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni* e *Mycobacterium tuberculosis*. A estrutura secundária foi extraída do PDB 1YFE, de *E. coli*. Em roxo estão os aminoácidos conservados em todas as enzimas. A região em ciano corresponde à assinatura da classe. Em vermelho está a inserção presente na sequência da SmFH.

Um dos loops se encontra na superfície da proteína, exposto ao solvente, e é caracterizado pela presença de resíduos polares, resultando em um domínio protuberante na estrutura cuja superfície de potencial eletrostático se mostra bastante carregada (**Figura 43**). Devido a sua posição relativa à estrutura e ao tamanho desta inserção composta de 14 resíduos, o modelo prediz uma região de alta flexibilidade podendo ser modelado de várias maneiras (**Figura 41**). O mesmo tipo de inserção, embora não 100% conservada, é também observada na sequência predita para a enzima fumarato hidratase de *Schistosoma japonicum* (**Figura 42**).

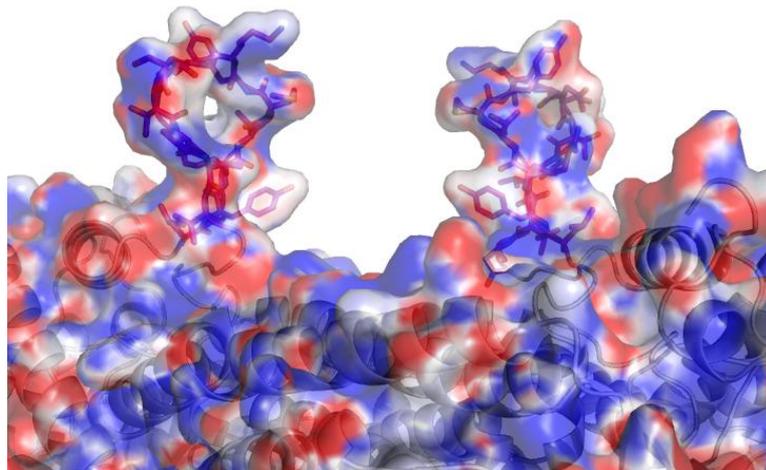


Figura 43. Superfície de potencial eletrostático da proteína *SmFH*. A inserção modelada como loop (região em sticks), presente na superfície apresenta-se bem carregada, assim, pode assumir diferentes conformações.

Embora neste momento não exista nenhuma evidência funcional que justifique a presença deste domínio protuberante presente nas enzimas de *Schistosoma*, especulamos a possibilidade desta inserção estar correlacionada com interações do tipo proteína-proteína.

Interações entre proteínas são fundamentais para controlar a maioria dos processos celulares como modificações pós-traducionais do tipo fosforilação, glicosilação, metilação, transporte, enovelamento, sinalização, dentro outros. As interações entre proteína-proteína requerem um conjunto de condições específicas, seja fraca ou forte, rápida ou lenta, de forma a permitir que proteínas se interajam através de uma combinação de interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, e pontes salinas. A força da interação é influenciada pelo tamanho do domínio de ligação.

Ainda que muito preliminar, resolvemos submeter a sequência referente ao domínio protuberante para uma análise *in silico* de forma a investigar o potencial desta inserção como região de modificação pós-traducional. Interessantemente, a busca feita com o auxílio da ferramenta NetPhos 2.0 (Blom, Gammeltoft e Brunak, 1999) sugere a presença de um sítio de fosforilação para o resíduo T273, presente nesta inserção (score de 0,980, em uma escala de 0 a 1). Esses resultados, embora especulativos neste momento, sugerem a realização de futuros experimentos para testar esta hipótese.

Já a segunda inserção, de 7 resíduos, resulta na presença de um loop que se encontra enterrado entre uma região de encontro entre três das quatro cadeias que formam o tetrâmero. Caracterizado por aminoácidos de cadeia lateral grande e anéis aromáticos, GKSYHTF, nossos experimentos de modelagem molecular associados a dinâmica molecular evidenciam nitidamente que a presença deste fragmento altera o empacotamento na forma tetramérica e induz modificações importantes na região do sítio ativo (**Figura 44**).

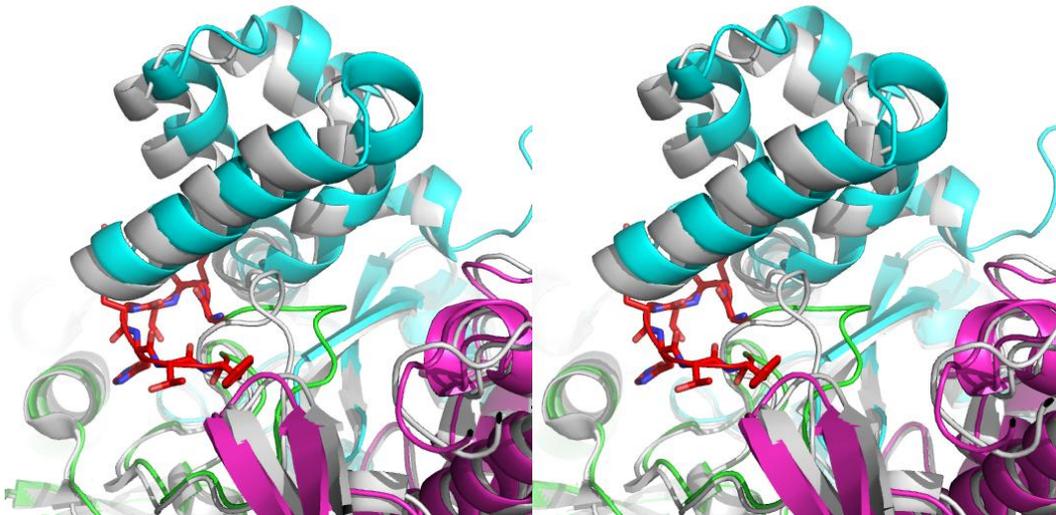


Figura 44. Figura em estéreo da sobreposição da estrutura fumarato hidratase de *E. coli* (cinza), com o modelo do tetrâmero da *SmFH* (cadeia A - verde, cadeia B - azul, cadeia C - rosa). Em vermelho está a inserção de 7 aminoácidos encontrada na *SmFH*.

Ainda tentamos utilizar de uma estratégia visando obter conformações alternativas para o loop através de técnicas de dinâmica molecular com o modelo do monômero, a qual forneceria conformações alternativas para este loop, que tivessem uma disposição mais favorável à formação do tetrâmero. Mesmo com as diferentes conformações do loop observadas como resultado da dinâmica molecular, uma nova tentativa de gerar o modelo tetramérico foi feita, sem sucesso. O resultado das nossas análises sugere fortemente que a presença desta inserção impossibilita a formação do tetrâmetro descrito para as fumarases da classe II.

Membros da classe II das fumarato hidratases são identificados pela assinatura GSSxMxKxNPxxxE (Estevez *et al.*, 2002; Weaver, 2005), essa sequência de aminoácidos é conservada em todas as enzimas da classe, já na estrutura da *SmFH* a sequência apresentada é GSSxMxxxxxxxxKxNPxxxE, modificando o padrão esperado para a classe. A modificação desse perfil descrito influencia não somente na dinâmica e estabilização da estrutura, mas também no posicionamento correto dos resíduos supostamente diretamente envolvidos na catálise. Esta observação nos levou a um questionamento acerca da presença desses aminoácidos nessa região.

O servidor online do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997) foi utilizado para procurar sequências de proteínas com alta identidade sequencial com a SmFH, e essa busca revelou que nenhuma das fumarato hidratases encontradas pelo programa apresenta essa inserção de aminoácidos na região da assinatura da classe de enzimas. A figura 43 mostra o alinhamento de algumas dessas estruturas, onde podemos perceber que nenhuma delas possui a inserção.

Além do Blast com proteínas, também foi feita a busca por sequências de shotguns do genoma do parasito *Schistosoma mansoni* (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni), que são fragmentos gerados por digestão enzimática do DNA genômico para o sequenciamento e validação de genes extensos. Esta pesquisa também não identificou sequências de shotguns que se alinhassem a esta região identificada no gene Smp_158240.

Apesar da inserção se encontrar em uma região de contato entre as cadeias, ela não impede a formação do tetrâmero, o qual foi confirmado por experimentos de Cromatografia por Exclusão Molecular e Espalhamento Dinâmico de Luz. No entanto, a análise do modelo tetramérico revela que como os moldes utilizados para criar o modelo não possuem essa inserção, o programa força a modelagem dos resíduos conservados nos mesmos lugares dos moldes, causando os problemas de contatos atômicos muito próximos nos resíduos da inserção. Esse fato sugere que na realidade os resíduos envolvidos com a catálise não adquirem o posicionamento adequado devido à inserção de 7 aminoácidos, o que provavelmente afeta a catálise enzimática. Tal fato pode explicar a falta de atividade apresentada pela enzima.

Desta forma, os nossos resultados de cinética enzimática onde foi observada a baixa ou falta de atividade fumarásica para o produto do gene Smp_158240, somado aos resultados de modelagem e dinâmica molecular e busca por shotguns sugerem fortemente que existe um erro na sequência do gene codificador da enzima fumarato hidratase depositada no banco de dados. Essa nossa hipótese é

fortalecida, quando comparamos também com a sequência da proteína homóloga de *Schistosoma japonicum*, que não apresenta esta inserção nesta importante região da proteína(Figura 43).

A possibilidade da sequência do gene Smp_158240 estar errada se torna agravante em nosso caso, pois como apresentado nos resultados, a sequência do gene depositada foi utilizada para planejar o oligo sintético e expressar nossa proteína em estudo, uma vez que não foi possível amplificar o gene a partir do cDNA.

A amplificação do gene, por nós predito como correto, se encontra em andamento, assim como novas tentativas de amplicar o gene a partir do cDNA.

Embora frustrante, os resultados obtidos ressaltam a importância das análises *in silico* e da predição da estrutura terciária para a compreensão dos dados experimentais. Além disso, alerta para confiabilidade nas sequências depositadas nos bancos de dados de genomas.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

Diferentes espécies do parasita *Schistosoma* são responsáveis pela esquistossomose, uma doença considerada negligenciada, sem tratamento eficaz e que acomete milhões de pessoas em todo mundo. Em particular, a esquistossomose constitui um sério problema de saúde pública no Brasil, observada em 19 estados e dentro de um contexto de severa limitação socioeconômica

Dentro dessa dura realidade, a Academia tem tido um papel importante na identificação e validação de alvos macromoleculares, assim como, na busca de moléculas bioativas como protótipos para o desenvolvimento de novas terapias e dentro desse contexto o nosso laboratório se interessou por avaliar o potencial da enzima fumarato hidratase como alvo para o planejamento de novos fármacos anti esquistossomose.

Como etapa crucial para atingir nossos objetivos, o presente projeto tinha inicialmente a meta de caracterizar a enzima fumarato hidratase do parasita *Schistosoma mansoni* através da combinação de técnicas bioquímicas, biofísicas e estruturais. Sendo assim, o gene depositado no genedb com código Smp_158240, e predito como codificador das enzimas fumarato hidratase, foi clonado nos vetores de expressão pET28a e pETsumo, a proteína em ambas as construções foi expressa em BL21(DE3) de *Escherichia coli* e purificada por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA Agarose, fornecendo rendimento e pureza satisfatórios.

Os experimentos de DLS e filtração indicaram que a enzima apresenta o tamanho e o estado de oligomerização compatíveis com os valores descritos para enzimas da mesma classe. Além disso, nos pHs de 6, 6,5 e 7 não se detectou a presença de agregados, indicando maior estabilidade estrutural. Também foi possível observar pelos experimentos de DLS que a alta concentração de NaCl, a troca de NaCl por KCl e a adição de tacsinato não são favoráveis à estabilidade da enzima, enquanto a adição de glicerol auxilia na estabilidade da mesma.

Os estudos de dicroísmo circular revelaram que a pSmFH possui o conteúdo de estrutura secundária de 60,8 % de α -hélices, 5,7 % de fita- β e 37,6 % de coil-turn, o qual se aproxima do calculado para as enzimas que possuem estrutura já resolvida. Porém, a enzima não se mostrou estável a altas temperaturas, com temperatura de transição de $T_m = 315,95 \text{ K} = 42,8^\circ\text{C}$, sugerindo que a termoestabilidade a altas temperaturas não pode ser considerada uma assinatura para descrever enzimas da classe II das fumarases.

Mesmo após a variação de diversos parâmetros como pH do meio, quantidades de substrato e de enzima, meio de expressão e vetor de expressão, a dificuldade em detectar atividade para a enzima SmFH impediu a realização da caracterização cinética da enzima SmFH.

Apesar dos resultados promissores dos experimentos de DLS, filtração em gel e estimativa do conteúdo de estrutura secundária da SmFH, alguns resultados obtidos, como a dificuldade em

detectar atividade, a falta de estabilidade em altas temperaturas e a elevada agregação e precipitação da enzima nos ensaios de cristalização, sugeria que a proteína não se encontrava estruturalmente estável. No decorrer do trabalho realizado, várias etapas apresentaram problemas que se tornaram entraves ao desenvolvimento do projeto, levando algum tempo para que pudessem se resolver. Inicialmente, o primeiro problema enfrentado foi a dificuldade na obtenção do cDNA do parasita *Schistosoma mansoni*, sem saber o motivo do insucesso, os experimentos foram repetidos várias vezes, até que se decidisse pela solicitação do gene sintético. Em seguida, mesmo com o gene sintético, a clonagem em vetor pET28a também apresentou problemas, pois os passos de digestão, ligação, transformação e PCR de colônia foram repetidos inúmeras vezes, sem sucesso na obtenção do clone, este processo também tomou muito tempo, até que se optou pela utilização de uma amostra do vetor contendo um fragmento já no sítio múltiplo de clonagem, o que evitou o religamento do vetor e possibilitou a obtenção clone. Os passos de expressão e purificação, apesar de terem passados por otimização, foram realizados sem grandes dificuldades. Por fim, apesar de a proteína estar pura e solúvel, ambas pSmFH e sSmFH não apresentam reprodutibilidade nos experimentos de atividade.

Devido à dificuldades na obtenção de cristais da SmFH, bem como no monitoramento da atividade da mesma, optou-se pela predição de um modelo tridimensional para a proteína em estudo através do uso de modelagem molecular por homologia. Nossa ideia era não somente mapear a estrutura da enzima do parasita, mas também buscar por bases estruturais que justificassem a perda de atividade.

O modelo obtido revelou que, além de pequenas variações locais, duas regiões se destacam como bastante diferentes entre a proteína codificada pelo gene Smp_158240 e as estruturas conhecidas para membros da mesma classe. A primeira região se caracteriza por um inserção de 14 resíduos que resulta na formação de um domínio protuberante, exposto ao solvente e que especulamos a possibilidade de estar envolvida em mecanismo de interação proteína-proteína.

A segunda região, que corresponde a uma inserção de 7 resíduos, está localizada na região do sítio ativo, onde há o encontro de três das quatro cadeias do tetrâmero, e por possuir resíduos grandes, afeta a estereoquímica da região, que não possui espaço para comportar tais resíduos. Além disso, a presença dessa inserção no sítio ativo revelou que não é possível que os aminoácidos adquiram a conformação adequada para a catálise, fato que pode explicar a falta de atividade observada.

Essa observação nos levou a questionar a presença dessa inserção. Inicialmente, a busca por sequências de shotgun do genoma do parasito *S. mansoni* não identificou a presença de tal inserção. Além disso, a análise da estrutura primária para as enzimas da mesma classe revelou um padrão de sequência de resíduos bastante conservada para essa região, onde esta inserção não se encontra

presente. Estes resultados, somado as nossas evidências experimentais fortalecem a hipótese de que esta inserção efetivamente não existe e que a sequência no banco de dados sob o código Smp_158240 apresenta erros.

Os nossos achados foram comunicados aos responsáveis pelo depósito dos dados, que está em fase de análise. Em paralelo, a sequência que julgamos ser correta será utilizada para uma nova etapa desse projeto e que consiste na clonagem, produção heteróloga e ensaios de caracterização bioquímica e biofísica.

REFERÊNCIAS

6. Referências

ALTSCHUL, S. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, SEP 1 1997 1997. ISSN 0305-1048.

ANDRAWIS, R.; ANDRAWIS, I. The life of Theodore Maximillian Bilharz. **Journal of Urology**, v. 179, n. 4, p. 310-310, APR 2008 2008. ISSN 0022-5347.

ANGELUCCI, F. et al. The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist. **Parasitology**, v. 134, p. 1215-1221, AUG 2007 2007. ISSN 0031-1820.

AUSUBEL, F. M., R. BRENT, *ET AL.* . 1995. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley and Sons, 1995.

BAKER, M. et al. Neglected Tropical Diseases 3 Mapping, monitoring, and surveillance of neglected tropical diseases: towards a policy framework. **Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 231-238, JAN 16 2010 2010. ISSN 0140-6736.

BEGLEY, T. P.; MCMURRY, J. **The organic chemistry of biological pathways**. Roberts and Co. Publishers, 2005.

BEKKER, H. et al. GROMACS - a parallel computer for molecular-dynamics simulations. **Physics Computing '92**, p. 252-256, 1993 1993.

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1351-1362, DEC 17 1999 1999. ISSN 0022-2836.

BUEDING, E. Carbohydrate metabolism of schistosoma-mansoni. **Journal of General Physiology**, v. 33, n. 5, p. 475-495, 1950 1950. ISSN 0022-1295.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, JAN 7 2007 2007. ISSN 0021-9606.

CONTIS, G.; DAVID, A. The epidemiology of bilharzia in ancient Egypt: 5000 years of schistosomiasis. **Parasitology Today**, v. 12, n. 7, p. 253-255, JUL 1996 1996. ISSN 0169-4758.

COURA, J.; CONCEICAO, M. Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 598-603, JUL 2010 2010. ISSN 0074-0276.

COX, F. History of human parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595-+, OCT 2002 2002. ISSN 0893-8512.

CROFT, S.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-+, JAN 2006 2006. ISSN 0893-8512.

D., R. et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Tropica**, v. 2899, p. 1-18, 2012.

DA SILVA, L.; CHIEFFI, P.; CARRILLO, F. *Schistosomiasis mansoni* - Clinical features. **Gastroenterologia y Hepatologia**, v. 28, n. 1, p. 30-9, 2005.

DANSO-APPIAH, A.; DE VLAS, S. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 125-129, MAR 2002 2002. ISSN 1471-4922.

DAVIS, I. et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W375-W383, JUL 2007 2007. ISSN 0305-1048.

DELANO, W.; LAM, J. PyMOL: A communications tool for computational models. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 230, p. U1371-U1372, AUG 28 2005 2005. ISSN 0065-7727.

DOENHOFF, M.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 659-667, DEC 2008 2008. ISSN 0951-7375.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 60, p. 2126-2132, Dec 2004. ISSN 0907-4449. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000225360500002 >.

ESTEVEZ, M. et al. X-ray crystallographic and kinetic correlation of a clinically observed human fumarase mutation. **Protein Science**, v. 11, n. 6, p. 1552-1557, JUN 2002 2002. ISSN 0961-8368.

FALLON, P. et al. Schistosome resistance to praziquantel: Fact or artifact? **Parasitology Today**, v. 12, n. 8, p. 316-320, AUG 1996 1996. ISSN 0169-4758.

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

FELICIANO, P. et al. Fumarate hydratase isoforms of *Leishmania major*: Subcellular localization, structural and kinetic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 1-2, p. 25-31, JUL-AUG 2012 2012. ISSN 0141-8130.

GORREC, F. The MORPHEUS protein crystallization screen. **Journal of Applied Crystallography**, v. 42, p. 1035-1042, DEC 2009 2009. ISSN 0021-8898.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, SEP 23 2006 2006. ISSN 0140-6736.

GUEST, J. 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 1985. ISSN 0022-1287.

GYAPONG, J. et al. Neglected Tropical Diseases 2 Integration of control of neglected tropical diseases into health-care systems: challenges and opportunities. **Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 160-165, JAN 9 2010 2010. ISSN 0140-6736.

HAN, Z. et al. *Schistosoma* Genomics: New Perspectives on Schistosome Biology and Host-Parasite Interaction. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, p. 211-240, 2009 2009. ISSN 1527-8204.

HE, B.; SMITH, J.; ZALKIN, H. *Escherichia coli* *purB* gene - cloning, nucleotide-sequence, and regulation by *purR*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 1, p. 130-136, JAN 1992 1992. ISSN 0021-9193.

HEGEMAN, A. D.; PERRY, F. A. **Enzymatic reaction mechanisms**. Oxford University Press, 2007.

HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, MAR 2008 2008. ISSN 1549-9618.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KATZ, N.; COELHO, P. M. Z.; PELLEGRINO, J. Evaluation of katos quantitative method through recovery of schistosoma-mansoni eggs added to human feces. **Journal of Parasitology**, v. 56, n. 5, p. 1032-&, 1970 1970. ISSN 0022-3395.

KNECHT, S. et al. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. **Journal of Molecular Recognition**, v. 22, n. 4, p. 270-279, JUL-AUG 2009 2009. ISSN 0952-3499.

LIESE, B.; ROSENBERG, M.; SCHRATZ, A. Neglected Tropical Diseases 1 Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 67-76, JAN 2 2010 2010. ISSN 0140-6736.

MACHADO-SILVA, J. R. et al. Schistosoma mansoni Sambon, 1907: comparative morphological studies of some Brazilian strains. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine** v. 37, n. 5, p. 441-447, 1995.

MCPHERSON, A. A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. **Protein Science**, v. 10, n. 2, p. 418-422, FEB 2001 2001. ISSN 0961-8368.

MECHALY, A. et al. Conformational changes upon ligand binding in the essential class II fumarase Rv1098c from Mycobacterium tuberculosis. **Febs Letters**, v. 586, n. 11, p. 1606-1611, JUN 4 2012 2012. ISSN 0014-5793.

MEIRA, D. Esquistossomose Mansônica. **Clínica de doenças tropicais e infecciosas**, p. 401-450, 1991.

MOSSESSOVA, E.; LIMA, C. Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. **Molecular Cell**, v. 5, n. 5, p. 865-876, MAY 2000 2000. ISSN 1097-2765.

NAST, G.; MULLERROBER, B. Molecular characterization of potato fumarate hydratase and functional expression in Escherichia coli. **Plant Physiology**, v. 112, n. 3, p. 1219-1227, NOV 1996 1996. ISSN 0032-0889.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: W. H. Freeman 2008.

NOSE, S. A molecular-dynamics method for simulations in the canonical ensemble. **Molecular Physics**, v. 52, n. 2, p. 255-268, 1984 1984. ISSN 0026-8976.

PEREIRA, L. et al. Clinical and laboratory evaluation of schistosomiasis mansoni patients in Brazilian endemic areas. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 449-453, JUL 2010 2010. ISSN 0074-0276.

PINES, O. 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, NOV 1996 1996. ISSN 0175-7598.

PIRAJÁ DA SILVA, M. A. Contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia. **Brazil Médico**, v. 1, n. 22, p. 281-282, 1908.

PONTES, L.; DIAS-NETO, E.; RABELLO, A. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 2, p. 157-162, FEB 2002 2002. ISSN 0002-9637.

RABELO, E. et al. Update of the gene discovery program in *Schistosoma mansoni* with the expressed sequence tag approach. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 625-629, SEP-OCT 1997 1997. ISSN 0074-0276.

REANEY, S.; BUNGARD, S.; GUEST, J. Molecular and enzymological evidence for 2 classes of fumarase in *Bacillus stearothermophilus* (var non-diastaticus). **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 403-416, MAR 1993 1993. ISSN 0022-1287.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Guanabara Koogan, 2001.

ROLLINSON, D. et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta Tropica**, v. 2899, p. 1-18, 2012.

SALI, A.; BLUNDELL, T. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779-815, DEC 5 1993 1993. ISSN 0022-2836.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, W. D. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAZ, H. Energy metabolisms of parasitic helminths - adaptations to parasitism. **Annual Review of Physiology**, v. 43, p. 323-341, 1981 1981. ISSN 0066-4278.

SCHILLER, E. et al. Aerobic and anaerobic carbohydrate-metabolism and egg-production of *Schistosoma mansoni* invitro. **Journal of Parasitology**, v. 61, n. 3, p. 385-389, 1975 1975. ISSN 0022-3395.

SHIMOYAMA, T. et al. MmcBC in *Pelotomaculum thermopropionicum* represents a novel group of prokaryotic fumarases. **Fems Microbiology Letters**, v. 270, n. 2, p. 207-213, MAY 2007 2007. ISSN 0378-1097.

SKELLY, P.; SHOEMAKER, C. A molecular-genetic study of the variations in metabolic function during schistosome development. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 281-284, MAR-APR 1995 1995. ISSN 0074-0276.

SREERAMA, N.; WOODY, R. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, DEC 15 2000 2000. ISSN 0003-2697.

STOTHARD, J. et al. Control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: progress made, new opportunities and remaining challenges. **Parasitology**, v. 136, n. 13, p. 1665-1675, NOV 2009 2009. ISSN 0031-1820.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. **Biochemistry**. New York: W. H. Freeman and Company, 2012.

SUZUKI, T. et al. Rat-liver mitochondrial and cytosolic fumarases with identical amino-acid sequences are encoded from a single gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 5, p. 2581-2586, FEB 15 1989 1989. ISSN 0021-9258.

TENDLER, M.; SIMPSON, A. The biotechnology-value chain: Development of SmA as a schistosomiasis vaccine. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 263-266, NOV-DEC 2008 2008. ISSN 0001-706X.

TURNER, M. 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, AUG 19 1997 1997. ISSN 0027-8424.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, DEC 2005 2005. ISSN 0192-8651.

VAN VUGT-LUSSENBURG, B. et al. Identification of two [4Fe-4S]-cluster-containing hydro-lyases from *Pyrococcus furiosus*. **Microbiology-Sgm**, v. 155, p. 3015-3020, SEP 2009 2009. ISSN 1350-0872.

VANOORDT, B. et al. The energy-production of the adult schistosoma-mansoni is for a large part aerobic. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 2, p. 117-126, 1985 1985. ISSN 0166-6851.

WEAVER, T. Structure of free fumarase C from *Escherichia coli*. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 61, p. 1395-1401, OCT 2005 2005. ISSN 0907-4449.

WEAVER, T.; BANASZAK, L. Crystallographic studies of the catalytic and a second site in fumarase C from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 35, n. 44, p. 13955-13965, NOV 5 1996 1996. ISSN 0006-2960.

WEAVER, T. et al. Crystal structures of native and recombinant yeast fumarase. **Journal of Molecular Biology**, v. 280, n. 3, p. 431-442, JUL 17 1998 1998. ISSN 0022-2836.

WEAVER, T. et al. The multisubunit active-site of fumarase-c from *Escherichia coli*. **Nature Structural Biology**, v. 2, n. 8, p. 654-662, AUG 1995 1995. ISSN 1072-8368.

WHO. **Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthes: Report WHO Expert Committee**. p.1-57. 2002

WILLIAMS, S. 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, OCT 13 1992 1992. ISSN 0006-2960.

WOODS, S.; SCHWARTZBACH, S.; GUEST, J. 2 biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 954, n. 1, p. 14-26, APR 28 1988 1988. ISSN 0006-3002.

WU, M.; TZAGOLOFF, A. 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, SEP 5 1987 1987. ISSN 0021-9258.

YOGEV, O. et al. Fumarase: A Mitochondrial Metabolic Enzyme and a Cytosolic/Nuclear Component of the DNA Damage Response. **Plos Biology**, v. 8, n. 3, MAR 2010 2010. ISSN 1545-7885.