

Estudo da estabilidade das old yellow enzymes de *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi* em função do pH

Thais Carvalho de Moura

Silvia Helena Libardi

Júlio César Borges

Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP)

thaiscarvalho625@usp.br

Objetivos

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo produzir, purificar e caracterizar as enzimas recombinantes *old yellow enzymes* dos organismos *Leishmania braziliensis* (LbOYE) e *Trypanosoma cruzi* (TcOYE) e estudar a sua estabilidade estrutural em função do pH do meio.

Métodos e Procedimentos

Expressão e purificação TcOYE e LbOYE

As proteínas foram expressas em cepas de bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3) através da indução por IPTG. A utilização do vetor pET28a permitiu a obtenção das proteínas com um peptídeo de fusão de 20 aminoácidos (His-tag) sendo 6 histidinas vicinais, permitindo uma primeira etapa de purificação em coluna por afinidade ao Níquel. Após a etapa de captura, a His-tag foi excisada pela incubação com trombina *overnight* e foi realizado um passo de purificação por cromatografia de exclusão por tamanho preparativa^[1,2].

Estudo estrutural das enzimas em solução

A caracterização estrutural foi realizada por meio das técnicas dicroísmo (CD) e espectroscopia de emissão de fluorescência molecular utilizando-se como sonda a emissão de fluorescência do triptofano ($\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$). As proteínas foram colocadas em diálise *overnight* contra tampão fosfato 25 mmol L⁻¹ variando-se os valores de pH de 5,8 – 7,8 e tampão Tris-HCl (pH 8,0) na concentração de 25 mmol L⁻¹. A força iônica foi mantida em 114 mmol L⁻¹ pela adição de NaCl. A avaliação da

integridade das proteínas foi acompanhada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Resultados

Estudo estrutural das enzimas em solução

A Figura 1 mostra a imagem do gel de SDS-PAGE da TcOYE incubada nos respectivos tampões. Pode-se observar que não houve degradação significativa na estrutura primária da proteína e o mesmo comportamento foi identificado para a LbOYE (dados não mostrados).

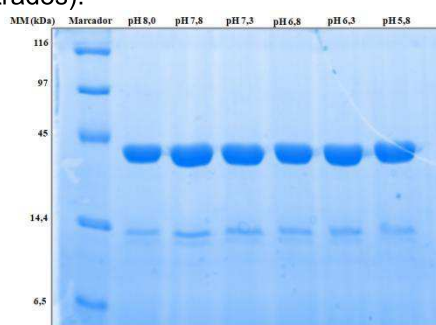


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) para a proteína TcOYE incubada nos pH 5,8, 6,3, 6,8, 7,3 e 7,8 em tampão fosfato e pH 8,0 em tampão Tris-HCl.

A Figura 2 mostra a análise de CD da TcOYE que foi utilizada para estudar a estrutura secundária da proteína. Não foram observadas mudanças significativas relativas à estrutura secundária na faixa de pH estudado para a TcOYE (Fig. 2) ou LbOYE (dados não mostrados).

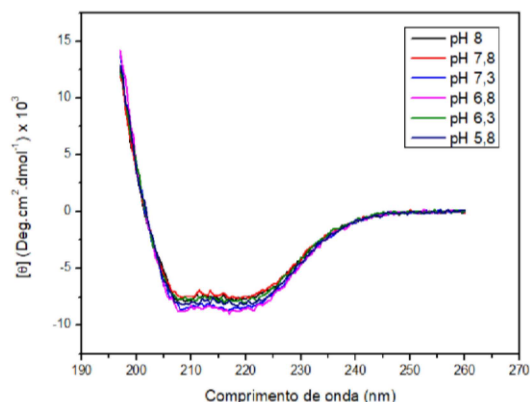


Figura 2. Espectro de CD da enzima TcOYE em tampão fosfato pH 5,8, 6,3, 6,8, 7,3 e 7,8 e pH 8,0 em tampão Tris-HCl.

Os experimentos de emissão de fluorescência revelaram a variação do centro de massa espectral para ambas as enzimas, sugerindo mudanças no ambiente químico da sonda o amino ácido triptofano. A Figura 3 mostra a análise de fluorescência da LbOYE.

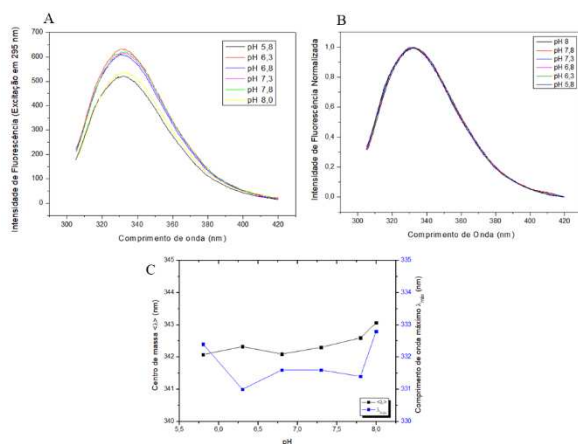


Figura 3. Análise de fluorescência da LbOYE a 298 K nos valores de pH 5,8-8,0. A. Espectro de de fluorescência da LbOYE nos pHs estudados. B. Normalização do espectro de fluorescência. C. Gráfico duplo y para comprimento de onda máximo e centro de massa espectral em função do pH. Em preto, está representado o centro de massa em função do pH e em azul o comprimento de onda máximo em função do pH.

A Figura 4 mostra a análise de fluorescência da TcOYE.

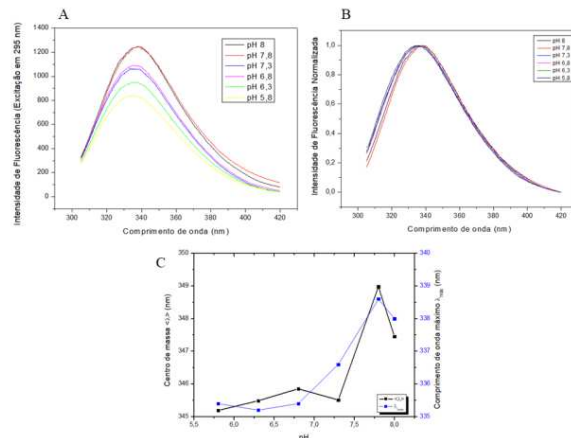


Figura 4. Análise de fluorescência da TcOYE à 25 °C nos valores de pH 5,8, 6,3, 6,8, 7,3 e 7,8 em tampão fosfato e pH 8 em tampão Tris-HCl. A. Espectro de de fluorescência da TcOYE nos pHs estudados. B. Normalização do espectro de fluorescência da TcOYE nos pHs estudados. C. Gráfico duplo y para comprimento de onda máximo e centro de massa espectral em função do pH. Em preto, está representado o centro de massa em função do pH e em azul o comprimento de onda máximo em função do pH.

Conclusões

De forma geral, os resultados indicam que as enzimas não sofreram mudanças estruturais significativas ou degradação nos pHs testados. No entanto, os experimentos de fluorescência devido ao deslocamento do centro de massa espectral indicam possíveis mudanças no ambiente químico dos aminoácidos triptofano presentes em ambas as proteínas.

Referências Bibliográficas

- [1] MURAKAMI, M. T.; RODRIGUES, N. C.; GAVA, L. M.; HONORATO, R. V. et al. Structural studies of the Trypanosoma cruzi Old Yellow Enzyme: Insights into enzyme dynamics and specificity. *Biophysical Chemistry*, 184, p. 44-53, Dec 2013.
- [2] VELOSO-SILVA, L. L. W.; DORES-SILVA, P. R.; BERTOLINO-REIS, D. E.; MORENO-OLIVEIRA, L. F. et al. Structural studies of Old Yellow Enzyme of Leishmania braziliensis in solution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 661, p.87-96, 2019/01/01/ 2019.