



# Bolsas Universidade de Lisboa / Fundação Amadeu Dias

Edição 2011/2012

## Relatório de Projeto

Caracterização molecular e estrutural do sintase do óxido nítrico de *Leishmania infantum*

Bolseiro(a): Ana Iolanda d' Armada Moreira

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Curso: Licenciatura em Bioquímica

Ano: 2

Tutor(a): Carlos Alberto Alves Cordeiro

Julho de 2012

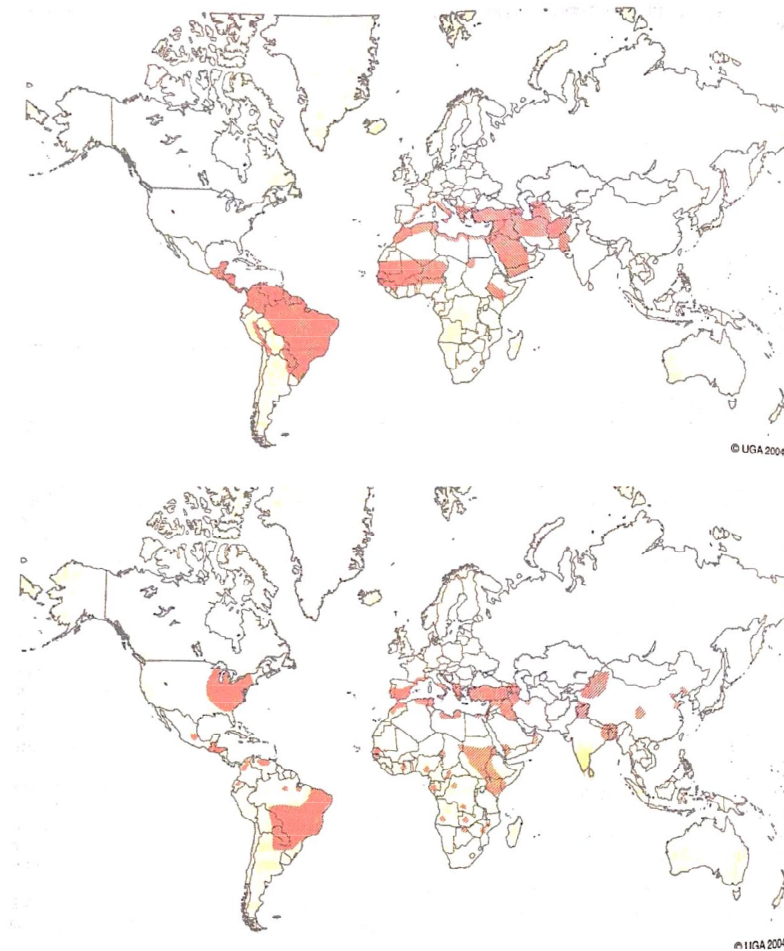
# Índice

<b>ENQUADRAMENTO</b>	<b>2</b>
LEISHMANIOSE	2
LEISHMANIA	3
SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO	5
<b>OBJETIVOS DO PROJETO</b>	<b>7</b>
<b>METODOLOGIA APLICADA</b>	<b>8</b>
<b>RESULTADOS OBTIDOS</b>	<b>16</b>
<b>EXECUÇÃO FINANCEIRA</b>	<b>16</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>16</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>18</b>
<b>ANEXOS</b>	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
<b>PARECER DE ACOMPANHAMENTO E AVALIAÇÃO DO TUTOR</b>	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.

# Enquadramento

## Leishmaniose

As leishmanioses são doenças que afetam humanos, animais domésticos e selvagens causadas por parasitas protozoários do género *Leishmania* (ordem Kinetoplastidae, da família *Trypanosomatidae*), e transmitidas utilizando como vetor algumas espécies de mosca da areia, nomeadamente da subfamília Phlebotominae no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. É de notar que apenas as fêmeas destes insetos têm a capacidade de transmitir o parasita a hospedeiros mamíferos. Atualmente, conhecem-se cerca de 30 espécies de *Leishmania* capazes de infetar mamíferos, das quais 21 infetam humanos. Atualmente, cerca de 12 milhões de pessoas estão infetadas com leishmaniose, e 350 milhões estão em risco de serem contagiadas. [1]



**Fig. 1:** Distribuição da leishmaniose cutânea e mucocutânea (em cima) e da visceral (em baixo). Dados adaptados da *World Health Organization*.

Existem três tipos de leishmaniose: cutânea, mucocutânea e visceral.

A leishmaniose cutânea, forma mais comum, caracteriza-se pelo aparecimento de úlceras cutâneas em zonas expostas como cara, braços e pernas. Pode ser causada por *L. aethiopica*, *L. major* e *L. infantum*.

A variante visceral é a variante mais severa, causando uma variedade de sintomas sistêmicos que são fatais quando não tratados. Os parasitas proliferam no fígado, baço e medula óssea, levando a uma imunossupressão do hospedeiro que pode levar à morte. Pode ser causado, por exemplo, por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. tropica*.

Outro tipo mais raro de leishmaniose é mucocutâneo, variante grave que afeta as mucosas oral e nasal destruindo total ou parcialmente as ditas mucosas. Pode ser causada por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*. [1]

## Leishmania

### ▪ Ciclo de vida

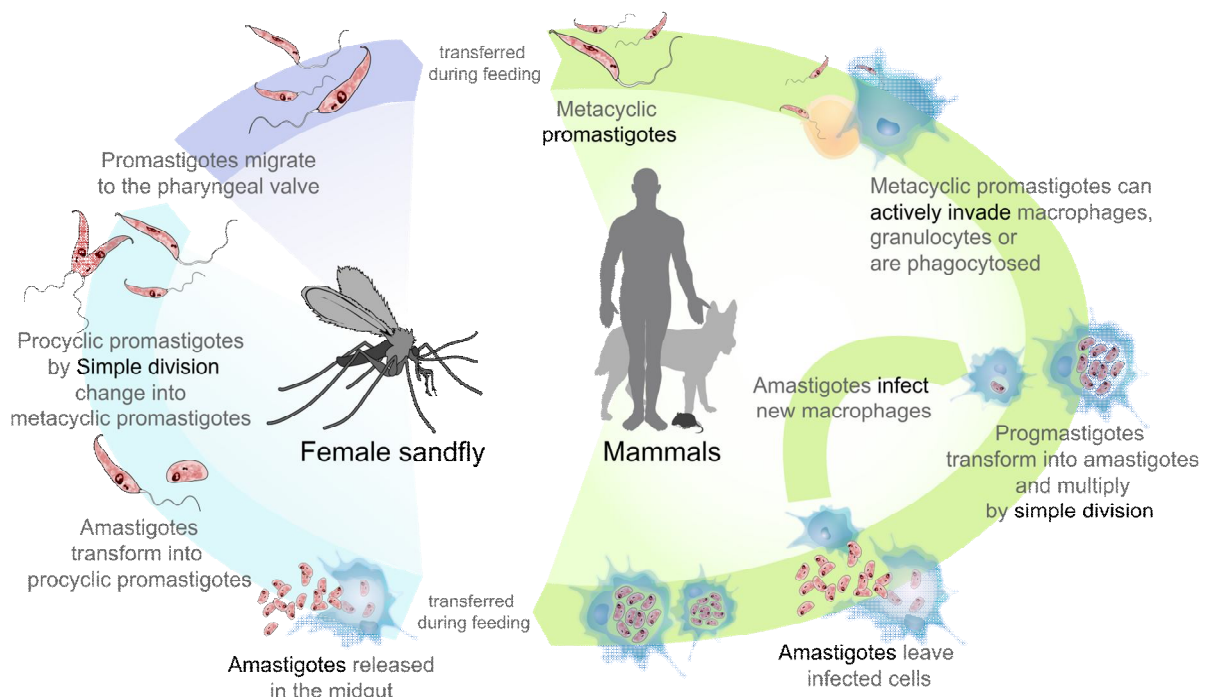


Fig. 2: Ciclo de vida de *L. infantum*. Baseado em [2]

O género *Leishmania* tem um ciclo de vida dimórfico, ilustrado na figura anterior. O parasita pode existir em duas formas: promastigota e amastigota, sendo promastigota uma forma flagelada e extracelular e amastigota aflagelada e intracelular. A diferenciação em cada

forma é condicionada por diferenças ao nível de nutrientes disponíveis, pH, disponibilidade de oxigénio e temperatura que existem entre hospedeiros e vetores.

Quando a mosca da areia se alimenta num hospedeiro infetado, ingerindo macrófagos infetados dos tecidos do hospedeiro, os parasitas (amastigotas) são libertados no trato digestivo da mosca, local onde se diferenciam em promastigotas, que se replicam no trato digestivo. Os promastigotas são regurgitados aquando de outra refeição da mosca infetada, passando a infeção para um novo hospedeiro através da saliva da mosca. Os parasitas são então fagocitados e multiplicam-se como amastigotas nos fagolisossomas dos macrófagos. Quando os macrófagos rompem, os amastigotas livres penetram outras células do hospedeiro, disseminando-se do local primário de infeção e generalizando a mesma. [1]

- ***L. infantum***

A espécie *Leishmania infantum*, responsável pela leishmaniose visceral no Homem e canídeos, é endémica da bacia Mediterrânica. Apesar de o principal hospedeiro deste parasita ser o cão, a prevalência de infeções relaciona-se com a distribuição e abundância de vetores de transmissão do parasita. Podemos relacionar o aumento do número e diversidade de vetores de transmissão e crescente prevalência da doença na Europa com o aquecimento global e com o aumento de casos de coinfeção com o vírus VIH.

Atualmente, apesar da severidade e abundância da doença, não existem vacinas humanas nem terapias eficazes. Como tal, é necessário um desenvolvimento de fármacos e de novos alvos terapêuticos, sendo para isso essencial estudar características bioquímicas e fisiológicas dos parasitas que os distingam do hospedeiro.[3]

- **Importância do NO**

O radical óxido nítrico (NO) é uma molécula importante para sinalização celular, tendo um papel central em vários processos biológicos. Este radical é, por exemplo, um vasodilatador produzido em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo nas artérias. Funciona também como um relaxador muscular, pois é um ativador do guanilato ciclase, causando várias reações em cascata: aumento da concentração intracelular de cGMP, que inibe a entrada de cálcio na célula e diminui a concentração intracelular do mesmo; ativação de canais de  $K^+$ , levando a hiperpolarização e relaxação; estimulação de um proteína cinase dependente de cGMP que ativa a miosina fosfatase, enzima que desfosforila as cadeias leves da miosina, relaxando os músculos. Esta pequena molécula pode ainda controlar a secreção de insulina, movimentos peristálticos, desenvolvimento do sistema nervoso, entre

outras funções.[4] É parte fulcral do sistema imunitário humano, tendo ação tumoricida e antimicrobiana, atuando como agente tóxico para organismos infecciosos.[5,6]

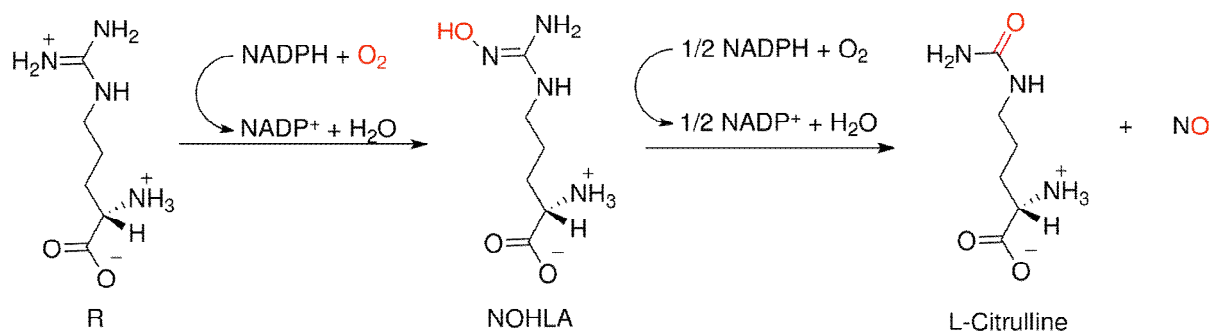
## Sintase do óxido nítrico

Os sintases do óxido nítrico (NOS do inglês *Nitric Oxide Synthase*) são uma família de enzimas que catalisam a formação de NO (radical óxido nítrico - NO•) partindo de L-arginina (Fig. 3). Estes enzimas são mediados por cálcio/calmodulina e controlam a sinalização celular via óxido nítrico.[7]

Existem três isoenzimas:

- eNOS: NOS endotelial, localizado no endotélio, tem como função a vasodilatação;
- nNOS: NOS neuronal, localizado no tecido nervoso e músculo esquelético, tem como função comunicação intercelular;
- iNOS: NOS indutível, localizada no sistema imunitário e cardiovascular, esta isoforma está envolvida em resposta imunitária contra agentes patogêneos.[8,9,10]

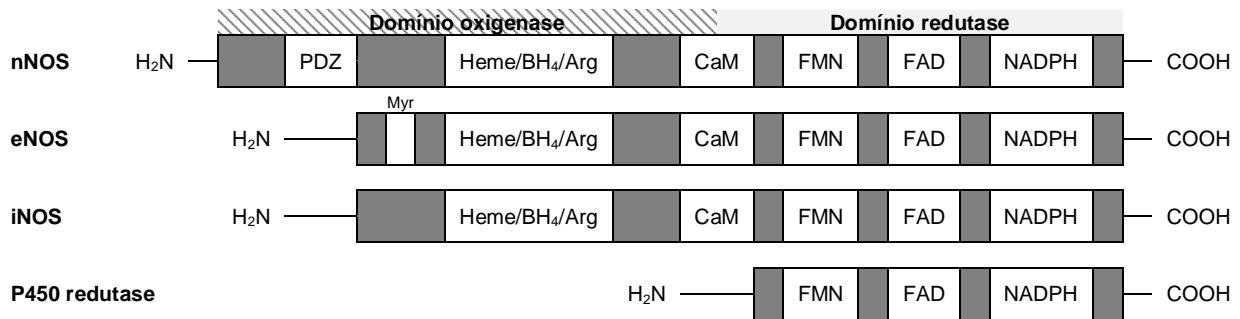
Para além destas três isoformas, podemos considerar mais um tipo de NOS: NOS bacteriano (bNOS). Este enzima, presente em bactérias Gram<sup>+</sup>, protege as mesmas contra stress oxidativo, diversos antibióticos e resposta imunitária por parte de hospedeiros.[11]



**Fig. 3:** Reação de formação de NO. A oxidação de L-arginina a L-citrulina ocorre em duas monooxigenações sucessivas, gerando o intermediário N<sup>ω</sup>-hidroxi-L-arginina (NOHLA). São geradas 2 mol de O<sub>2</sub> e consumidas 1,5 mol de NADPH por mol de NO formado.

As isoformas do NOS podem também catalisar reações secundárias, como gerar o ião superóxido à custa de consumo de NADPH.

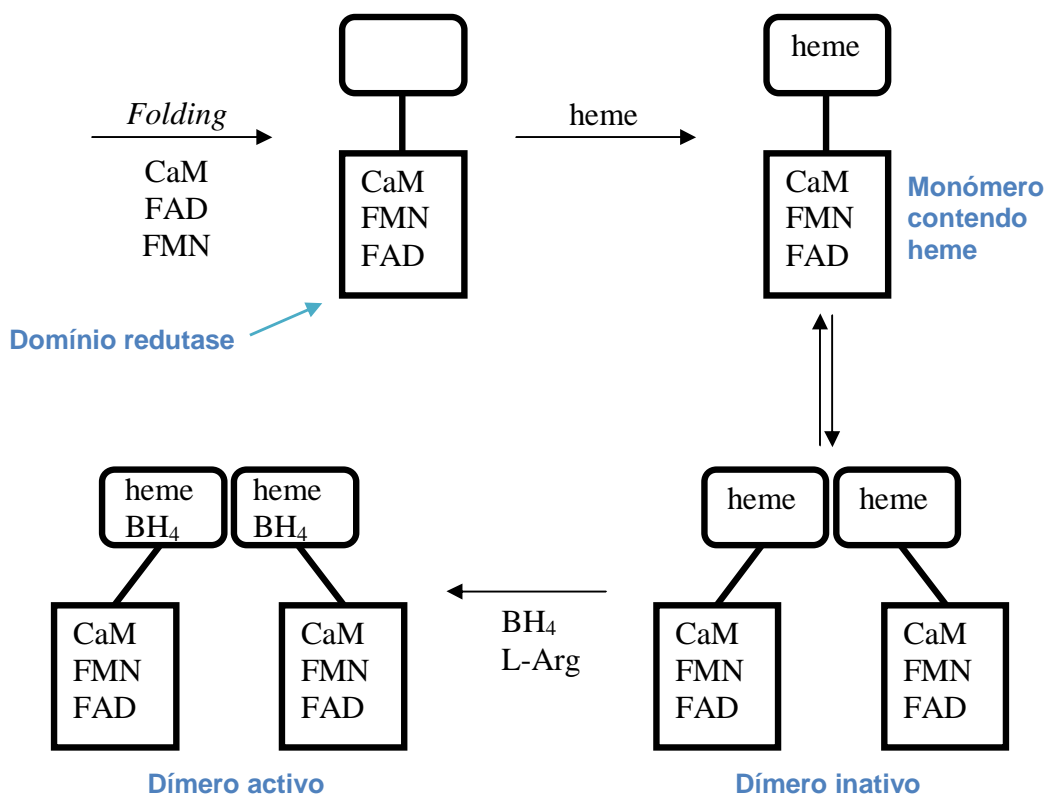
Para catalisar a formação de NO, os NOS necessitam de cinco cofactores: dinucleótido de flavina e adenina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN), heme (protoporfirina IX de ferro), tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e calmodulina.[7]



**Fig. 4:** Esquema das isoformas dos sintases do óxido nítrico e do citocromo P450 redutase, exacerbando a semelhança entre os domínios redutase das várias isoformas e do *cyt* P450 redutase. O domínio oxigenase apresenta maior diversidade entre as isoformas.[7]

O NO sintase existe geralmente sob a forma de homodímero. Em eucariotas, cada monómero possui dois grandes domínios: domínio oxigenase na zona do N-terminal, parte hémica do enzima, e um domínio redutase multifuncional na zona do C-terminal, homólogo ao NADPH:*cyt* P450 redutase e outras flavoproteínas. A ligação entre estes dois domínios possui um local de ligação para a calmodulina (Fig. 4).[12]

Os cofatores são necessários não só para a atividade catalítica deste enzima, mas também para o processo de dimerização.



**Fig. 5:** Modelo do processo de dimerização do NOS. Aquando do *folding*, dá-se a ligação de CaM (calmodulina), FAD e FMN ao domínio redutase do enzima. Seguidamente, ocorre a assimilação do grupo heme, permitindo a associação de dois monómeros e formação do dímero inativo. O homodímero é ativado na presença de BH<sub>4</sub> e L-Arg.[8]

## Objetivos do projeto

Tendo em conta a importância do óxido nítrico em vários organismos, este deverá exercer também um papel fundamental em mecanismos de sinalização celular em *Leishmania*, nomeadamente na nitrosilação (modulação de função) de várias proteínas. Em várias espécies deste género, como *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, já foi descrita a produção endógena de NO por ação de um sintase de óxido nítrico activo.

Assim sendo, é de grande importância a purificação e caracterização bioquímica deste enzima, de modo a ser possível, em futuras investigações, investigá-lo como potencial alvo terapêutico. Como tal, o objetivo deste trabalho consiste na expressão e purificação da proteína recombinante NO Sintase de *Leishmania infantum* em *E. coli*, complementada com a análise da mesma por espetrometria de massa.



## Metodologia aplicada

A metodologia baseia-se na referência 3.

### Expressão do LiNOS

Partindo do plasmídeo pET-28a/his-LiNOS, a expressão da proteína recombinante (com *His-tag* – epítipo específico, composto por seis histidinas) foi induzida em células *E. coli* BL21-CodonPlus (Stratagene), adicionando cloranfenicol a 34 µg/mL, canamicina a 30 µg/mL e 0,1% glucose em meio LB.

Foi também induzida a expressão em células BL21 (DE3) (Novagen) CC3, com os mesmos antibióticos utilizados em BL21-CodonPlus, com a adição de spectinomicina a 34 µg/mL, também em meio LB.

Utilizaram-se células BL21-CodonPlus pois estas possuem um plasmídeo contendo genes que codificam alguns tRNAs considerados raros em *E. coli*, mas que normalmente são abundantes em eucariotas. Desta forma, evita-se uma limitação da tradução da proteína pretendida. Estes genes encontram-se clonados num plasmídeo que confere resistência ao cloranfenicol, sendo utilizado este antibiótico no meio de cultura para seleção das células transformadas.

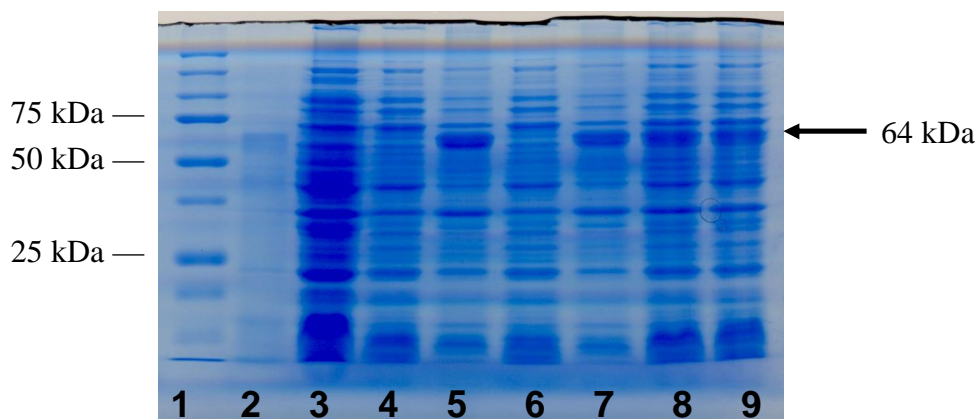
Por outro lado, as estirpes BL21 (DE3) contêm plasmídeos para a co-expressão de chaperones e chaperoninas que ajudam ao *fold*ing de proteínas expressas na célula. As células CC3 expressam especificamente DnaK, DnaJ e GrpE. Estes plasmídeos contêm ainda um gene de resistência à spectinomicina, sendo possível complementar o meio destas células com este antibiótico para a sua seleção.

Paralelamente a testarmos a expressão da proteína de interesse em BL21-CodonPlus e em BL21 (DE3), incubámos também algumas culturas com hemina, com a finalidade de perceber se desta forma as proteínas incorporavam o grupo heme (sendo que a hemina consiste numa protoporfirina IX de ferro cujo quinto ligando é um átomo de cloro), obtendo o *fold*ing correto.

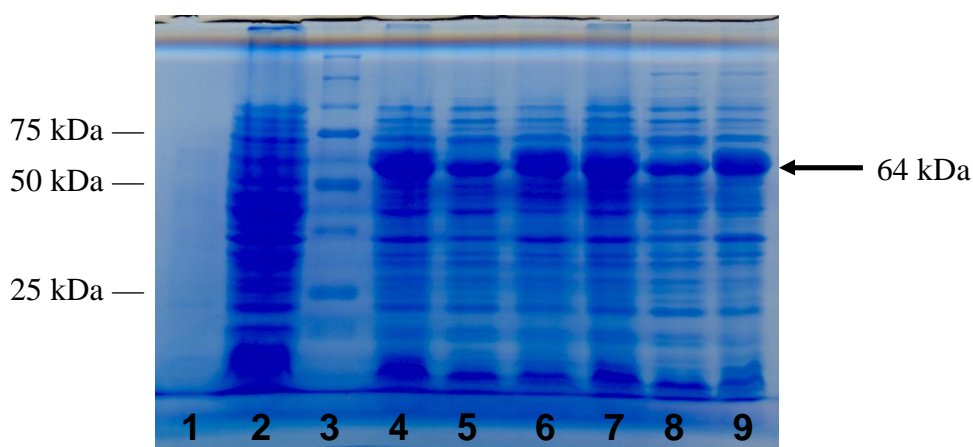
Com esta parte do trabalho, concluiu-se que tanto os *chaperones* como a hemina não facilitam significativamente o *fold*ing correto do NO Sintase. Como tal, para a expressão em grande escala, optou-se por utilizar BL21-CodonPlus sem hemina.

Para a indução da expressão da proteína recombinante, as bactérias foram colocadas a crescer em 300 mL de meio LB, com os respectivos antibióticos e suplementos até apresentarem uma  $OD_{600\text{ nm}}$  (*optical density*) de cerca de 0,6 (indicando que se encontravam em fase exponencial de crescimento). Quando esta condição se verificou, a indução foi feita pela adição de 0,5 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida, reagente que ativa a transcrição do operão *lac*) e incubação durante 3 horas a 37 °C e a 250 rpm.

Seguidamente, as culturas foram centrifugadas a 8000 g durante 5 minutos, sendo depois suspensas em 8 mL de tampão PBS pH 7,4. Esta centrifugação teve como objetivo separar as frações solúvel e insolúvel (fração citosólica e corpos de inclusão, respetivamente). Os resultados são apresentados nas Fig. 6 e 7. Note-se que o *LiNOS* tem uma massa molecular de 64 kDa.



**Fig. 6:** Teste das condições de expressão de *LiNOS* por SDS-PAGE. 1 - Marcador; 2 - Proteína purificada (controlo); 3 - BL21  $T_0$  (pré-indução); 4 - BL21 solúvel; 5 - BL21 *pellet*; 6 - BL21 + hemina solúvel; 7 - BL21 + hemina *pellet*; 8 - BL21 total (pré-centrifugação); 9 - BL21 + hemina total.



**Fig. 7:** Teste das condições de expressão de *LiNOS* por SDS-PAGE. 1 - Proteína purificada (controlo); 2 -  $CC_3$   $T_0$  (pré-indução); 3 - Marcador; 4 -  $CC_3$  total; 5 -  $CC_3$  solúvel; 6 -  $CC_3$  *pellet*; 7 -  $CC_3$  + hemina total; 8 -  $CC_3$  + hemina solúvel; 9 -  $CC_3$  + hemina *pellet*.

Nestas condições, a proteína *LiNOS* não adquire o *folding* correto, ficando retida em corpos de inclusão (fracção insolúvel) – sem expressão correta na sua forma biologicamente ativa. A expressão de proteínas recombinantes na fracção insolúvel pode ocorrer também se a dita proteína for tóxica para a bactéria, ou por ser demasiado grande, ou ainda por ser um enzima que produza moléculas indesejáveis para a bactéria. A recuperação e purificação proteica ficam assim dificultadas.

### **Purificação proteica**

Dado que a proteína de interesse se encontra em corpos de inclusão, ou seja, na fracção insolúvel, é necessário solubilizar a mesma. Esta solubilização consiste em três fases: isolamento dos corpos de inclusão por lise e centrifugação, solubilização e desnaturação da proteína por adição de ureia e, por fim, renaturação através de diálise.

As células foram lisadas por sonicação (10 ciclos de 10 segundos a 70%, com incubação em gelo entre cada ciclo, a fim de evitar a desnaturação provocada pelo calor). O produto resultante foi centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C, separando-se o sobrenadante (fracção solúvel) do *pellet* (fracção insolúvel).

Como já se referiu anteriormente, devido ao *folding* incorreto adquirido pelo NOS aquando da expressão em *E. coli*, dá-se a formação de corpos de inclusão, ficando o NOS na fracção insolúvel. Assim, é necessário solubilizar a proteína para a purificar.

Para tal, suspendeu-se o *pellet* obtido da centrifugação em tampão PBS com adição de ureia. A solubilização fez-se pelo aumento gradual da concentração de ureia na solução (4 M e 8 M). Este aumento gradual de agente desnaturante permite que haja uma purificação parcial da proteína recombinante. Uma vez que cada proteína é solubilizada a uma certa concentração de agente desnaturante, o aumento gradual permite eliminar outras proteínas. Cada passo da solubilização consistiu na suspensão do *pellet* em solução de ressuspensão, 8 mL por *pellet*, seguido de uma centrifugação a 10000 g, durante 5-10 minutos a 4 °C, sendo despedido o sobrenadante. Após a suspensão final, em PBS + 8 M de ureia, a solução foi congelada em azoto líquido. Depois de descongelar, foi centrifugada a 10000 g, durante 10-20 minutos a 4 °C, sendo guardado o sobrenadante (já com a proteína solubilizada).

A proteína a purificar foi expressa com a seguinte sequência no N-terminal: MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH. As seis histidinas seguidas nesta sequência permitem uma purificação via cromatografia de metalo-afinidade (IMAC – *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*). Este tipo de cromatografia baseia-se na afinidade entre os grupos imidazole das histidinas da *His-tag* e íons divalentes como  $\text{Ni}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{2+}$ . Para isso, utilizou-se *PureProteome™ Nickel Magnetic Beads* da Millipore, uma resina com íons  $\text{Ni}^{2+}$  imobilizados.

Equilibraram-se as *beads* em tampão PBS + 8 M de ureia + 5 mM de imidazole. O imidazole estabiliza os íons  $\text{Ni}^{2+}$  antes da adição da amostra. Seguidamente adicionou-se a amostra (em PBS + 8 M de ureia), sendo a proporção 750  $\mu\text{L}$  de *beads* para 8 mL de amostra, com incubação com agitação durante uma hora e meia a temperatura ambiente. Lavou-se a amostra com 2 mL de tampão PBS + 8 M de ureia + concentração crescente de imidazole (5, 20 e 50 mM), a fim de remover outras proteínas e contaminantes, ressuspendendo-se o *pellet* e incubando durante dois minutos entre cada lavagem. Para eluir o NOS, utilizou-se tampão PBS + 8 M de ureia + concentrações elevadas de imidazolo, nomeadamente 250 e 500 mM. O imidazolo em excesso vai competir com a *His-tag* pela ligação ao Ni, causando a eluição da proteína de interesse. Para finalizar, lavou-se a resina com tampão PBS + 8 M de ureia + 1 M imidazolo para garantir que todo o NOS se encontrava eluído. Realizou-se a cromatografia com a proteína desnaturada pois, no estado nativo, a mesma não se liga à coluna (forma um precipitado insolúvel).

No fim deste passo, já temos o NO sintase puro, sem outros contaminantes proteicos. No entanto, este enzima continua desnaturado, em 8 M de ureia. Para prosseguir o trabalho foi portanto necessário renaturar a proteína. Para o fazer, juntaram-se todas as frações com a proteína de interesse retiradas da cromatografia e realizou-se diálise contra PBS da *pool* resultante. Utilizou-se Novagen Midi-dialysis tubes com *cut-off* de 3,5 kDa MW, decrescendo gradualmente a concentração de ureia em solução: 4 M durante duas horas; 2 M durante duas horas; 1 M durante duas horas e PBS durante duas horas.

Para finalizar, a proteína em estado nativo foi concentrada em tubos Amicon Ultra-15 da Millipore, através de centrifugação.

## SDS-Page

Vários passos da purificação proteica foram seguidos por SDS-PAGE, utilizando o seguinte protocolo:

**Gel de separação a 10%:** 1,25 mL Acrilamida/bisacrilamida 40%; 1,25 mL Tris-HCl (pH 8,8) 1,5 M; 50 µL SDS 10%; 2,4 mL H<sub>2</sub>O; 7,5 µL TEMED; 37,5 µL APS.

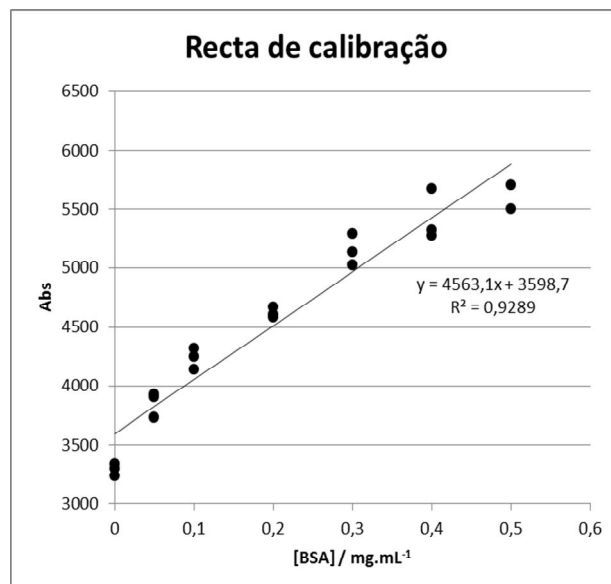
**Gel de concentração a 3%:** 187,5 µL Acrilamida/bisacrilamida 40%; 625 µL Tris-HCl (pH 6,8) 0,5 M; 25 µL SDS 10%; 1,675 mL H<sub>2</sub>O; 3,75 µL TEMED; 18,75 µL APS.

**Nota:** As amostras contendo ureia não são fervidas. O marcador utilizado foi *Precision Plus Protein Standards (All Blue)* da BioRad.

## Doseamento proteico

No final da purificação, doseou-se a proteína, a fim de se perceber que quantidade de NOS foi possível obter partindo da cultura inicial.

Utilizou-se para isto o método de Bradford em microplaca, com os seguintes resultados:



**Fig. 8:** Retra de calibração traçada com diferentes concentrações de BSA

Após ter sido traçada a reta de calibração com BSA, aplicou-se a equação obtida às amostras contendo NOS.

Exemplificação dos cálculos:

$$\begin{aligned}Abs &= 4563,1 \times [NOS] + 3598,7 \\ [NOS] &= \frac{Abs - 3598,7}{4563,1} \\ [NOS] &= \frac{5153 - 3598,7}{4563,1} = 0,34 \text{ mg.mL}^{-1}\end{aligned}$$

Conclui-se assim que, após o processo de purificação (e sabendo que originalmente o volume de cultura foi 300 mL), foi possível obter 1,13 mg do enzima por litro de cultura.

### **Peptide Mass Fingerprint**

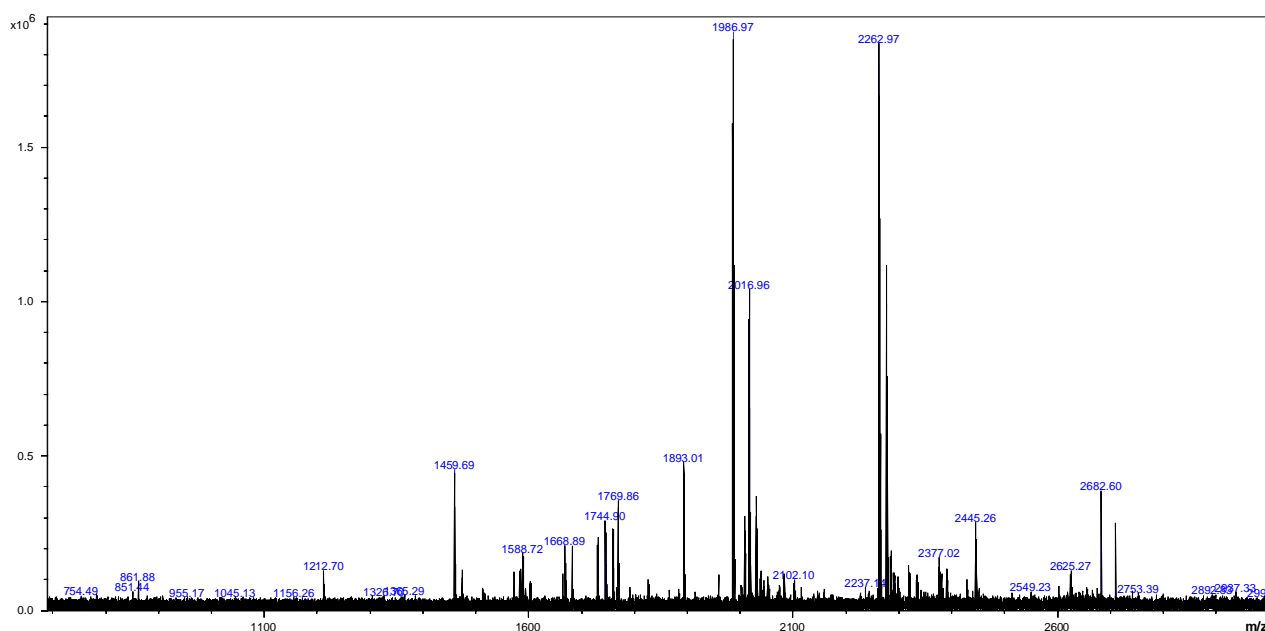
Depois de se obter o NOS purificado, foi necessário confirmar que de facto se tratava da proteína de interesse. Para isso, separou-se a proteína purificada por SDS-PAGE, sendo a banda de interesse (correspondente ao NOS, na zona dos 64 kDa) excisada para digestão *in gel* e análise por MALDI-FTICR-MS.

A digestão *in gel* foi feita com tripsina. O tripsina é um enzima que hidrolisa a ligação peptídica de proteínas em resíduos de arginina e lisina, R-X e K-X, excepto quando X é uma prolina.

As bandas de interesse foram cortadas do gel de SDS-PAGE com um bisturi e colocadas em microtubos. Seguidamente, as bandas foram lavadas com 100  $\mu$ L acetonitrilo (ACN) a 50% (v/v) com agitação até a banda se tornar transparente. Adicionou-se então 100  $\mu$ L ACN a 100% (v/v) e as bandas foram deixadas a secar ao ar. Posteriormente, as proteínas foram reduzidas com a adição de 50  $\mu$ L de ditioneitol (DTT) 10 mM, seguida da adição de 20  $\mu$ L de iodoacetamida 55 mM (este passo tem como objetivo evitar a formação das pontes persulfureto. Lavou-se novamente com ACN 100% e secaram-se as amostras. A esta altura, as amostras estão prontas para a digestão *in gel* com tripsina: adicionou-se 20  $\mu$ L de tampão com 6,7 ng/ $\mu$ L de tripsina, durante trinta minutos a 4 °C.

Para a preparação das amostras para a placa de MALDI, foram preparadas colunas em pontas *Gel loader* da Eppendorf, com resina R2 (Applied Biosystems) em ACN 100% (v/v). As colunas foram lavadas com ACN 50% (v/v) e guardadas a 4°C em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v). Para a aplicação da amostra, removeu-se o TFA e aplicou-se todo o volume da mesma na coluna. Para eluir a amostra, utilizou-se 0,5 µL de solução de matriz (5 mg/mL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamínico, em TFA 0,1% (v/v) diluído em ACN 50% (v/v)), sendo a eluição feita diretamente nos locais para amostras da placa de MALDI (*MALDI target AnchorChip*, da Brüker Daltonics).

As misturas de péptidos foram analisadas por MALDI-FTICR-MS no espectrómetro de massa Apex Ultra da Brüker, Apollo II Combi-Source (Brüker Daltonics), com um magneto de 7 Tesla (MagneX Corporation).



**Fig. 9:** Análise por PMF da proteína purificada. Os valores correspondem à razão massa/carga (m/z).

O último passo deste protocolo consiste em analisar os dados obtidos. Como tal, as massas monoisotópicas foram determinadas utilizando o algoritmo SNAP2, no software Data Analysis v4.0 (Brüker Daltonics). A identificação das proteínas foi feita com o programa MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), utilizando o software BioTools 3.2 (Brüker Daltonics).

## MASCOT Search Results

### Protein View: gi|146084837

#### oxidoreductase-like protein [Leishmania infantum JPCM5]

**Database:** NCBIInr  
**Score:** 175  
**Expect:** 5.7e-11  
**Nominal mass (M<sub>r</sub>):** 65279  
**Calculated pI:** 5.21  
**Taxonomy:** [Leishmania infantum JPCM5](#)

Fig. 10: Identificação da proteína pelo programa MASCOT.

Este *software* permitiu concluir que, de facto, se purificou o sintase do Óxido Nítrico de *Leishmania infantum*, com uma cobertura de sequência de 45% (Fig. 10 e 11).

```

1  MRRPREPAPG  ECCGSGCTRC  VWDIYYDEVA  RFEELIAGGG  IEEDCTQSSE
51  EEEVVNYIGS  VVVKYIDPPA  LPTTGSPGEW  ERAEMKARGF  FPIDRIELVS
101 CSTSLFSPTD  PGISVVNLFT  SAKGR TMLPG  DVVEVLVTNS  RGTQDADDVE
151 RLCKALRLDP  YAWCELHRSP  FVPEDNFPPW  LPLQKPLTLG  QLLSAYVDIS
201 SSSYLLHQSF  FESLFR IYSD  SKPSSASSTS  TTPSPDPEKV  RLLEACASSE
251 TGPQLLRSL  KSSTPLCYPS  LVDVLEVFSS  VQIPLDRLLE  VSGPLQTRRY
301 SLANWIPATL  PPSPLQLCMR  EVCARRSANL  PAATAVGADA  QRVADMLNRA
351 AQDASRDHSD  FFFGHTSHPL  CCAARSMTRS  AAAAGQRGBY  VSFSLFGNSL
401 FARQLQAGCT  ALCNPAQAKS  LCSQLFLIGC  GTGIAPLIAA  VTQLMLRRAS
451 TAAGSAPFPC  WVFYGARTKA  ELLYDETLQE  ALRTGAI AKY  EYALSREEDN
501 KKQGRYVTDL  VKRNRLMVTG  SLQNEGQLFV  CGPAKALLSV  RQLVKCDLLA
551 EPDDDDSVQE  QRLLMLEDRG  RLNFDIWSTG  NIFE

```

Fig. 11: Sequência da proteína LiNOS. A vermelho estão assinalados os péptidos observados por MALDI-FTICR-MS que permitiram a identificação desta proteína.



## Resultados obtidos

Graças à otimização de protocolo, foi-nos possível purificar o sintase do Óxido Nítrico de *Leishmania infantum*, obtendo 1,13 mg da proteína recombinante por litro de cultura.

Através de espetrometria de massa, confirmámos a identidade da proteína expressa em bactéria, tendo obtido uma cobertura de sequência de 45%.

## Execução financeira

Este trabalho cumpriu o plano orçamental proposto em 2011.

## Conclusões

A leishmaniose visceral é uma doença que afeta humanos e canídeos em grande número e é causada pelo parasita *Leishmania infantum*. Apesar da gravidade desta doença, atualmente não existem curas eficazes. Como tal, é necessário um estudo bioquímico mais aprofundado acerca deste tripanossomatídeo, a fim de encontrar potenciais alvos terapêuticos.

Estudos anteriores sugerem que o óxido nítrico (NO) é essencial para todas as células vivas, dados os vários processos de sinalização e defesa em que esta molécula está envolvida. Particularmente, em *Leishmania*, o NO parece ser especialmente necessário devido à nitrosilação de proteínas (modificação pós-traducional causada pelo NO em resíduos de Cys, associada à modulação da atividade de diversas proteínas). Sabe-se que estes parasitas são capazes de produzir endogenamente NO mas o enzima responsável por esta produção, NO Sintase, continua pouco estudado.

Assim, com este trabalho, foi possível dar um primeiro passo no estudo do sintase do Óxido Nítrico de *Leishmania infantum* como possível alvo terapêutico. Através da otimização do protocolo de purificação, conseguiu-se obter a proteína pura, em estudos futuros será possível realizar estudos cinéticos e testar vários inibidores que afetem especificamente este enzima, que difere do hospedeiro.

Este trabalho permitiu a familiarização com diversos métodos e técnicas utilizadas em enzimologia, assim como uma consolidação de conhecimentos teóricos da área da Bioquímica.

## Bibliografia

- [1] Greene, C. (2006) *Infectious diseases of the Dog and Cat*, 3rd ed., Saunders
- [2] "Leishmaniasis" in Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, online em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>, consultado em 24.07.2012
- [3] Silva, F. (2010) *Caracterização do Sintase do Óxido Nítrico de Leishmania infantum*, FCUL
- [4] Murad, F. (1999) "Discovery of some biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling" in *Bioscience Reports*, Vol. 19, 133-154
- [5] Bogdan, C. *et al* (2000) "The function of nitric oxide in the immune system" in *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. Nitric Oxide, Mayer B., 443-492
- [6] Tripathi, P. *et al* (2007) "The role of nitric oxide in inflammatory reactions" in *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol. 51, 443-452
- [7] Hobbs, A. *et al* (1999) "Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target" in *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 39, 191-220
- [8] Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman
- [9] Quintas, A. *et al* (2008) *Bioquímica: Organização Molecular da Vida*, 1ª ed., Lidel
- [10] Stryer, L. *et al* (2006) *Biochemistry*, 6th ed., W. H. Freeman
- [11] Gusarov, I. *et al* (2009) "Endogenous Nitric Oxide Protects Bacteria Against a Wide Spectrum of Antibiotics" in *Science*, vol. 325, 1380–1384
- [12] Chen, Y. *et al* (2002) "Control of Nitric Oxide Synthase Dimer Assembly by a Heme-NO-Dependent Mechanism" in *Biochemistry*, Vol. 41, 4618-4625