



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular  
Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro

# Leucil-aminopeptidase recombinante de *L. interrogans*

Dissertação de Mestrado

Hugo de Almeida Silva

Brasília – 2008

HUGO DE ALMEIDA SILVA

# Leucil-aminopeptidase recombinante de *L. interrogans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr. Silene de Paulino Lozzi

Co-orientador: Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Brasília – 2008

## Agradecimentos

---

# Agradecimentos

---

Tenho muitas pessoas a agradecer, e me faltam palavras para conseguir fazê-lo.

Agradeço a todos os que me ajudaram, direta ou indiretamente, a chegar onde estou.

Agradeço à professora Dra. Silene de Paulino Lozzi, pelos conselhos, paciência, e confiança, depositada em mim desde o começo, ao aceitar me orientar.

Ao professor Dr. Jaime Santana, pela orientação, pelos debates e incentivo ao pensamento científico.

Ao professor Dr. Carlos Roberto Felix, pelas valiosas dicas, esclarecimentos, boa vontade e disponibilidade.

Ao professor Dr. Bergmann Morais Ribeiro, pelo treinamento científico-intelectual provido desde a graduação, pelos conselhos e por disponibilizar a infraestrutura de seu grupo de pesquisa como colaborador.

Ao professor Dr. Edivaldo Ximenes, e ao professor Dr. Antônio Teixeira pelos conselhos e colaborações.

Aos meus pais, por sempre terem me apoiado, e terem estimulado o meu desenvolvimento acadêmico. À minha família, que me deu base e me impulsionou em seguir em frente.

À minha esposa, Sol, que ilumina os meus dias e me apóia incondicionalmente, me dá conselhos e contribui pro meu crescimento como indivíduo.

Aos colegas de cada um dos laboratórios: microscopia eletrônica, enzimologia, e patologia, pela convivência harmoniosa e pacífica, além de contribuições para a vida.

Ao amigo e companheiro de bancada Thiago “Sangas”, pelo suporte integral, pela partilha das caixas de ponteiras, idas ao RU, conversas e desabafos, e pela consideração! Ao colega Félix Siqueira, pelas conversas, dicas e disposição para nos acompanhar durante os ensaios.

Aos estagiários, André e Raquel, pelo apoio e interesse na pesquisa. Aos colegas e amigos do laboratório, Flávia, Keyla, Izabela, David, Dani, Teresa, Brina e aos que estão chegando agora.

A todos os professores da graduação e da pós-graduação, que contribuíram não só intelectualmente, mas participaram ativamente do meu processo de formação de identidade. Aos colegas que se distanciaram, e aos amigos que estão sempre no peito!

# Lista de Abreviaturas

---

AMC	7-amino-4-metilcumarina
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal de cadeia polipeptídica
DFP	Diisopropilurofosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato
E-64	L-trans-epoxisuccinil-leucilamido (4-guanidino)-butano
EC	Enzyme Class
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	N,N,N',N',-etilenoglicol-bis[aminoetil éter] – ácido etilenodiaminotetracético
EMJH	Meio de cultura Ellinghausen McCullough Johnson Harris
ET	Extrato total
FPLC	Cromatografia líquida e rápida de proteínas
HaLAP	Leucil-aminopeptidase de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjo
HapepA	Gene pepA de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjo
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
LAP	Leucil-aminopeptidase
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
N-terminal	Extremidade amino-terminal da cadeia polipeptídica
pCMB	p-cloromercurobenzoato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogênico
PMSF	Fenilmetilsufonil fluoreto
PoLAP	Leucil-aminopeptidase de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Pomona
PopepA	Gene pepA de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Pomona
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo Duodecil Sulfato de Sódio
UV	Espectro de luz ultra-violeta
$V_{max}$	Velocidade máxima
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosídeo
°C	Graus Celsius
g	Grama
ng	Nanograma
μg	Micrograma
mg	Miligrama
<i>g</i>	Unidade de força gravitacional
kDa	<i>Kilodalton</i>
V	Volts
L	Litro
μL	Microlitro
mL	Mililitro
pb	Pares de bases
M	Molar
μM	Micromolar
mM	Milimolar

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
Ile	Isoleucina
His	Histidina
Leu	Leucina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Tyr	Tirosina
Val	Valina

# Resumo

---

Uma varredura em busca de atividades proteolíticas em bactérias patogênicas e não-patogênicas do gênero *Leptospira* identificou a presença de atividade aminopeptidolítica apenas nas primeiras. Visando a esclarecer este achado, o presente trabalho propôs caracterizar bioquimicamente a enzima potencialmente responsável pela atividade leucil-aminopeptidásica presente apenas em sorovares patogênicos de *Leptospira*. Por meio da clonagem do gene *pepA*, que codifica uma provável leucil-aminopeptidase (LAP) citossólica, obtivemos a forma recombinante ativa da enzima, que possui características filogenética e bioquímica semelhantes às aquelas enzimas da família M17 das metalopeptidases. Assim como outras enzimas dessa família, essa LAP recombinante demonstrou atividade catalítica sobre o substrato L-Leu-AMC, com uma atividade ótima em pH 8,5, e termofilia com temperatura ótima de 50 °C. Além disso, a enzima exibiu comportamento típico de cinética clássica de Michaelis-Menten. É inibida irreversivelmente por EDTA, apesar de outras LAPs serem reativadas por cofatores iônicos. Aparentemente, a enzima forma um oligômero de 320 kDa, apresentando dependência dessa forma para sua atividade sobre o substrato L-Leu-AMC, em gel de eletroforese. Adicionalmente, foi produzido soro  $\alpha$ -HaLAP em camundongos isogênicos, demonstrando a antigenicidade da enzima e possibilitando a posterior utilização de anticorpos em outros estudos sobre a expressão diferenciada dessa peptidase durante infecções. Esse trabalho abre caminho para a elucidação de novos mecanismos operando exclusivamente em membros patogênicos de bactérias do gênero *Leptospira*.

# Abstract

---

Screening proteolytic activities in non-pathogenic and as well in pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, we identified the presence of aminopeptidolytic activity in the latter only. Aiming at clarification of this finding, this work led to the biochemical characterization of the enzyme which appears to be responsible for the leucyl-aminopeptidase activity present in pathogenic *Leptospira* serotypes. By the cloning of the *pepA* gene coding a putative cytosolic leucyl-aminopeptidase (LAP), we obtained the active recombinant enzyme, showing phylogenetic and biochemical features similar to those present in the M17 metallopeptidase enzymes family. Like other enzymes belonging to this family, recombinant LAP revealed catalytic activity upon L-Leu-AMC substrate, with optimal activity at pH 8.5, and a slight thermophilic behavior, with its optimal temperature at 50 °C. Besides, the enzyme presented typical Michaelis-Menten kinetics. It is irreversibly inhibited by EDTA, although other LAPs shows reactivation towards ionic cofactors. Apparently, the enzyme forms a 320 kDa oligomer, structure which the activity on the L-Leu-AMC substrate in electrophoresis gel seems to be dependent. In addition, the antiserum against  $\alpha$ -HaLAP produced in isogenic mice showed its high antigenicity. This finding suggests that the enzyme could be employed to produce specific antibody, which could be useful in clarifying the differential expression of the peptidase in the course of severe infections. This work opens a new avenue that may lead to elucidation of novel mechanisms exclusively associated with pathogenic species within the genus *Leptospira*.

# Sumário

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	1
➤ Leptospirose	2
▪ Etiologia	3
▪ Biologia Molecular	4
▪ Epidemiologia	5
▪ Transmissão e Patologia	6
▪ Patogênese	9
➤ Peptidases	11
▪ Aspártico-peptidases	12
▪ Cisteíno-peptidases	13
▪ Serino-peptidases	14
▪ Metalo-peptidases	15
▪ Amino-peptidases bacterianas	16
<b>OBJETIVOS</b>	18
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	20
➤ Sorovares de <i>Leptospira spp.</i> e condições de cultivo	21
➤ Preparação das amostras submetidas à reação em cadeia da polimerase	21
➤ Amplificação do gene <i>pepA</i> de <i>L. interrogans</i>	21
➤ Clonagem dos genes Hardjo <i>pepA</i> e Pomona <i>pepA</i>	22
▪ Vetor T/A	22
▪ pET19b	23
➤ Seqüenciamento	23
➤ Análise filogenética	24
➤ Expressão das proteínas recombinantes	24
➤ Extração das proteínas recombinantes	25
▪ BugBuster®	25
▪ Ciclos de congelamento e descongelamento	25
▪ Sonicação	25
➤ Eletroforese em gel de poliacrilamida	26
▪ Eletroforese desnaturante	26
▪ Eletroforese não-desnaturante	26
➤ Eletroforese para determinação de atividade enzimática (enzimografia) da HaLAP	26
➤ Purificação das enzimas recombinantes PoLAP e HaLAP	27
▪ Cromatografia de afinidade em coluna de níquel	27
▪ Cromatografia de exclusão de massa molecular	27
➤ Caracterização da atividade proteolítica das enzimas recombinantes	28
▪ Influência do pH	28
▪ Temperatura ótima	29
▪ Influência da força iônica	29
▪ Influência de agente redutor	29
▪ Inibição por EDTA	29
▪ Suplementação e/ou dependência de cátions	30
▪ Velocidade máxima e Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ )	30
➤ Produção do soro $\alpha$ -HaLAP em camundongos	30
➤ Imunoblot	31

<b>RESULTADOS</b>	32
➤ O produto amplificado tem uma massa molecular semelhante à predita	33
➤ O fragmento de 1500 pb foi clonado corretamente nos vetores	34
➤ Seqüenciamento: o gene foi inserido em fase de leitura apropriada	35
➤ O seqüenciamento parcial indica que a seqüência dos genes obtidos tem identidade com seqüências depositadas em bancos de dados	39
➤ Análise filogenética baseada na LAP reafirma a classificação atual	39
➤ Bactérias BL21-DE3 foram transformadas eficientemente	41
➤ A proteína de 55 kDa já é expressa generosamente após 2 horas de indução	41
➤ A proteína é expressa significativamente aos 30 °C	42
➤ Concentração de IPTG maior que 0,5 mM pode induzir super-expressão da proteína de 55 kDa	43
➤ Recuperação da fração de proteína solúvel é maior após sonicação	43
➤ O extrato solúvel de bactérias induzidas possui atividade sobre o substrato L-Leu-AMC	44
➤ A proteína recombinante tem boa ligação com a coluna de afinidade à histidina	44
➤ A força de ligação entre proteína e a resina carregada com níquel suporta concentrações de até 100mM de imidazol	45
➤ Frações eluídas da coluna de níquel continham uma proteína de massa molecular superior a 250 kDa	45
➤ O imidazol presente no tampão de reação não influencia na atividade sobre o substrato fluorogênico	46
➤ A atividade leucil-aminopeptidásica da enzima recombinante depende de sua estrutura quaternária	46
➤ A estrutura oligomérica da leucil-aminopeptidase recombinante se desfaz parcialmente quando submetida à migração em sistema de SDS-PAGE	47
➤ A enzima recombinante possui propriedades termofílicas	47
➤ A leucil-aminopeptidase recombinante possui atividade ótima em pH alcalino	48
➤ O aumento da força iônica no tampão de reação resulta em decréscimo da atividade enzimática	49
➤ Influência de agente redutor	50
➤ Inibição por EDTA	51
➤ Influência de íons na atividade enzimática	51
➤ Constante de Michaelis-Menten ( $k_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{máx}$ )	53
➤ A leucil-aminopeptidase recombinante de <i>L. interrogans</i> é imunogênica em camundongo	54
<b>DISCUSSÃO</b>	55
➤ Comparação da atividade proteolítica entre sorovares patogênicos e não-patogênicos de bactérias do gênero <i>Leptospira</i>	56
➤ Implicações na detecção do gene <i>pepA</i>	56
➤ Inferências sobre a possível expressão diferencial da leucil-aminopeptidase de <i>Leptospira spp.</i>	57
➤ A LAP de <i>L. interrogans</i> faz parte da família M17 de metaloproteases	58
➤ Os resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade catalítica são conservados entre espécies representantes de <i>Leptospira</i> e outras	59
➤ Parâmetros de indução e expressão da enzima recombinante HaLAP	59
➤ A atividade peptidolítica da leucil-aminopeptidase recombinante de <i>L. interrogans</i> depende de sua estrutura oligomérica	60
➤ Parâmetros cinéticos da leucil-aminopeptidase recombinante de <i>L. interrogans</i>	61
▪ O pH ótimo de atividade da enzima recombinante HaLAP é 8,5	61
▪ A LAP de <i>L. interrogans</i> é termofílica	62

▪ A leucil-aminopeptidase de <i>L. interrogans</i> é inibida por EDTA	63
▪ A influência de co-fatores iônicos na atividade da enzima recombinante	64
➤ Aspectos biológicos e funcionais de leucil-aminopeptidases	65
<b>CONCLUSÕES</b>	69
<b>ANEXOS</b>	71
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	74

# Introdução

---

# Introdução

---

## Leptospirose

A leptospirose é uma doença infecciosa febril causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Foi descrita primeiramente por Weil, em 1886, como uma doença multisistêmica grave, apresentada com icterícia profunda e comprometimento renal (Levett, 2005). Pode ser adquirida diretamente pelo contato com animais infectados e seus fluidos corporais, ou indiretamente com solo e água contaminados pela urina dos mesmos. Atualmente, sabe-se que existe uma grande variedade de manifestações clínicas, desde formas assintomáticas até casos graves, com comprometimento renal e pulmonar severo, que freqüentemente levam a morte. Pelo fato de estar presente no mundo inteiro e infectar cerca de 160 espécies de mamíferos (Enna e Rolando, 2007), a leptospirose é considerada uma das mais importantes zoonoses que, como tal, atinge economicamente diversos setores da produção. A doença representa, por exemplo, uma das causas mais comuns de surtos de abortos em bovinos, sendo que no Brasil já foram encontrados sinais de infecção em até 6,7% de fetos abortados, a maior taxa de abortos por causas bacterianas no estudo (Corbellini *et alii*, 2006). Além disso, a leptospirose também leva a perdas na produção de caprinos, suínos e eqüinos (Leon-Vizcaino, Hermoso de Mendoza e Garrido, 1987; Ellis, 1994). Como se não bastassem os prejuízos causados por essas perdas, o mal atinge também os trabalhadores envolvidos na manipulação dos animais doentes, o que resulta em altos gastos hospitalares e perdas de dias de trabalho (Ministério da Saúde, 2005).

Em comunidades carentes, a precariedade do sistema sanitário aumenta o número de casos não ocupacionais, já que o lixo acumulado nas margens dos reservatórios de água serve como habitat para roedores que albergam a *Leptospira* (Bharti *et alii*, 2003). A excreta dos animais infectados contamina mananciais, lagoas e poços artesianos usados por essas populações. Contudo, casos crescentes de infecções relacionadas a atividades recreativas ou esportivas (Morgan *et alii*, 2002; Haake *et alii*, 2002, St John *et alii*, 2000; Bharti *et alii*, 2003) que dependem da água (pesca, corrida de aventura, triátlon, etc.) fazem com que a doença deixe de ser atribuída somente a

classes sociais desfavorecidas, e passe também a representar riscos para indivíduos de classe média e média-alta (Bharti *et alii*, 2003).

A falta de sintomas clínicos bem definidos, associada à carência de recursos nos ambulatórios de países em desenvolvimento, muitas vezes leva à má interpretação de diagnósticos, subestimando o número de casos de leptospirose até mesmo em áreas endêmicas (Dall'Antônia *et alii*, 2008). O recente seqüenciamento dos genomas de algumas linhagens de *Leptospira* (Ren *et alii*, 2003; Nascimento *et alii*, 2004) despertou novo interesse sobre os mecanismos de patogênese da doença, e, conseqüentemente, aumento no número de casos relatados.

### **Etiologia**

Bactérias do gênero *Leptospira* são espiroquetas gram-negativas obrigatoriamente aeróbias de aproximadamente 0,1 µm de diâmetro por 6 a 20 µm de comprimento. São dificilmente visualizadas por técnicas de coloração convencionais, sendo mais recomendados os métodos de iluminação de campo escuro ou microscopia de contraste de fase (Faine, 1982). As células possuem extremidades afiladas, geralmente curvadas em forma de gancho, característica que deu o nome da espécie patogênica – *L. interrogans* – por lembrar um sinal de interrogação. Possuem dois filamentos axiais periplasmáticos responsáveis por sua mobilidade, que partem de extremidades opostas e se sobrepõe no centro da bactéria (Levett, 2005), as quais se locomovem tanto por movimentos de rotação quanto por flexão.

O gênero *Leptospira* compreende classicamente duas espécies: *L. interrogans* e *L. biflexa* (espécie patogênica e saprofítica, respectivamente). Estas duas espécies são subdivididas em sorovares, de acordo com exames de aglutinação para antígenos específicos. Sorovares antigenicamente relacionados são, por conveniência, agrupados em sorogrupos. Estudos recentes baseados na seqüência genética de diversos sorovares levaram a uma nova classificação taxonômica das bactérias desse gênero. Assim, atualmente as *Leptospira* são divididas em 18 genomoespécies (Matthias *et alii*, 2008) das quais oito possuem representantes patogênicos, seis não apresentam nenhum representante patogênico e quatro encontram-se numa posição intermediária, consideradas oportunistas (Tabela 1). A classificação genética não se relaciona com a sorológica, podendo haver sorovares diferentes dentro de uma

mesma espécie (incluindo sorovares patogênicos e não-patogênicos) e espécies diferentes em um mesmo sorogrupo.

**Tabela 1. Representantes dos atuais clados do gênero *Leptospira*, inferidos por análise filogenética do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal.**

<b>Classificação</b>	<b>Genomoespécie</b>
Patogênicas	<i>Leptospira interrogans</i> <i>Leptospira kirschneri</i> <i>Leptospira noguchii</i> <i>Leptospira alexanderi</i> <i>Leptospira weilii</i> <i>Leptospira genomospecies 1</i> <i>Leptospira borgpetersenii</i> <i>Leptospira santarosai</i>
Intermediárias ou oportunistas	<i>Leptospira inadai</i> <i>Leptospira fainei</i> <i>Leptospira broomii</i> <i>Leptospira licerasiae</i>
Não-patogênicas	<i>Leptospira biflexa</i> <i>Leptospira meyeri</i> <i>Leptospira wolbachii</i> <i>Leptospira genomospecies 3</i> <i>Leptospira genomospecies 4</i> <i>Leptospira genomospecies 5</i>

## Biologia Molecular

O genoma da *Leptospira* é composto por dois cromossomos circulares que juntos podem chegar a 5000 kb: o cromossomo maior tem de 3600 a 4600 kb e o menor de 300 a 350 kb. Não foi reportada a presença de nenhum plasmídeo nos genomas seqüenciados. O grande tamanho de seu genoma, quando comparado com o de outras espiroquetas, é atribuído à alta capacidade do organismo em sobreviver no ambiente e ao número de hospedeiros que pode infectar. Quatro genomas de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* já foram seqüenciados, e o tamanho reduzido do genoma de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis foi relacionado à diminuição da capacidade de transmissão dessa espécie (Dieter *et alii*, 2006).

Estudos com manipulação genética e transformação de *Leptospira* foram dificultados por muito tempo, devido principalmente ao complexo sistema de restrição

destes organismos. Um vetor de entrada para *L. biflexa* foi construído e divulgado em 2000 (Girons *et alii*, 2000), e mais recentemente um grupo demonstrou a importância de pelo menos um gene para a patogenia de *L. interrogans* por meio de inserções aleatórias (Ristow *et alii*, 2007).

## Epidemiologia

A leptospirose ocorre durante o ano todo em várias partes do mundo, mas tem um pico de incidência nos períodos de maior precipitação. No campo de países em desenvolvimento tem sido considerada como doença laboral, enquanto que nas cidades aparece como surtos precedidos de enchentes (McBride *et alii*, 2005). Entretanto, sua epidemiologia vem mudando cada vez mais, acompanhada pelas constantes mudanças climáticas e sociais. Surtos foram relacionados com o fenômeno do *El niño* (Storck *et alii*, 2007) e com atividades recreativas em reservas de água contaminadas (Morgan *et alii*, 2002; Haake *et alii*, 2002, St John *et alii*, 2000). O aumento do número de desabrigados, mesmo em países desenvolvidos, faz com que mais pessoas estejam expostas ao contato com a urina de ratos e ratazanas. Furacões e tornados além de causarem enxurradas e alagamentos, deixam centenas de pessoas desabrigadas, o que favorece a contaminação. A biologia da doença é, portanto, altamente variável e dependente de fatores abióticos (clima, topografia, e geografia), bióticos (diversidade de hospedeiros, vetores e suas relações ecológicas) e antropológicos (comportamento, exploração ambiental e infra-estrutura). Para simplificar, Faine (1994) ilustrou pelo menos três situações de risco diferentes: a primeira é relacionada aos riscos laborais, e ocorre principalmente em áreas temperadas, onde os animais de criação são praticamente os únicos reservatórios de *Leptospira*. A segunda ocorre em países de clima tropical, geralmente em desenvolvimento, com medidas de saneamento básico precárias e um número maior de hospedeiros de manutenção. Nesse caso, existe um aumento da probabilidade de contato com a bactéria, independente da ocupação. A terceira situação está relacionada às infecções ocasionadas por roedores urbanos, como os ratos de esgoto, por exemplo. Essa última situação tem particular importância em cidades destruídas pela guerra ou por desastres naturais (Levett, 2001).

Os hospedeiros podem ser classificados como de manutenção, quando perpetuam a contaminação do meio ambiente, ou acidentais, quando apresentam a forma aguda da infecção (como no caso dos humanos). Diversos estudos tentaram relacionar a prevalência de alguns sorovares com hospedeiros específicos e suas variações de acordo com a região. De um modo geral, pequenos roedores são os principais hospedeiros de manutenção que, dependendo das espécies, podem albergar sorovares distintos. Ratos são conhecidos por abrigar sorovares dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Ballum, já os camundongos são hospedeiros para o sorogrupo Ballum (Levett, 2001). No Brasil, os sorovares Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Hardjo e Pyrogenes, compreendem os principais sorogrupos que acometem o homem, canídeos, ovinos, bovinos e caprinos, respectivamente (Ministério da Saúde, 1995; Favero *et. alii*, 2002). Conhecer os sorovares prevalentes e seus hospedeiros de manutenção é fundamental para entendermos a epidemiologia da doença em qualquer região do mundo (Levett, 2001).

### **Transmissão e Patologia**

Uma vez excretadas no meio, as bactérias podem sobreviver por longos períodos de tempo. Sua sobrevivência é aumentada quando o ambiente é quente, úmido e neutro ou ligeiramente alcalino (Enna e Rolando, 2007), condições facilmente encontradas em países tropicais.

Entre os hospedeiros de manutenção, a infecção é passada dos indivíduos mais antigos para os mais novos, por contato direto, durante o parto ou pela contaminação do solo. No caso dos seres humanos, hospedeiros acidentais, a bactéria entra por abrasões na pele, pelas mucosas ou até mesmo pela pele íntegra quando o indivíduo se mantém imerso em água contaminada por períodos prolongados (como no caso de trabalhadores de esgotos ou arrozais, por exemplo). Embora mais raros, existem casos documentados de transmissão sexual, transplacentária e de infecção por ingestão de água contaminada (Enna e Rolando, 2007). Uma vez dentro do hospedeiro, as *Leptospira* são transportadas pela corrente sanguínea e invadem tecidos e órgãos. O período de incubação varia de 2 a 20 dias, sendo mais comum de 7 dias (Ministério da Saúde, 2005).

Clinicamente, a doença pode se manifestar com diversos graus de severidade. A maioria das infecções é supostamente assintomática, com o único sinal sendo bacteremia. Entretanto, formas graves da doença são relativamente freqüentes e apresentam taxas de mortalidade de 10 a 50% (McBride, 2005). Vários estudos tentaram relacionar as apresentações clínicas com sorovares específicos, mas nenhum conseguiu resultados conclusivos. Aparentemente, o conjunto de fatores que influencia a variação dos quadros clínicos inclui a linhagem do parasita, quantidade inoculada, recorrência de infecção e as interações parasito-hospedeiras específicas.

Os sintomas variam muito e dependem da severidade da doença, mas os mais comuns são a febre, mialgias intensas, cefaléia, manifestações gastrointestinais, infecção conjuntiva e meningite. A apresentação clínica da doença é geralmente bifásica, com a fase aguda durando cerca de uma semana, seguida pela fase imune, caracterizada pela soroconversão e excreção de *Leptospira* pela urina (Levett, 2005).

A vasculite sistêmica, que facilita a migração das espiroquetas para os demais órgãos, pode resultar em dano vascular severo, acompanhado de hemorragias e comprometimento pulmonar, renal e hepático. Outras complicações da leptospirose estão associadas com a localização tecidual das *Leptospira* durante a fase imune, e ocorrem a partir da segunda semana da doença (Levett, 2001).

A patogenia é caracterizada pelo desenvolvimento de vasculite, dano endotelial e infiltrados inflamatórios compostos por monócitos, células plasmáticas, macrófagos e neutrófilos.

Nas análises histopatológicas, alterações são mais evidentes no fígado, rins, coração e pulmões, mas outros órgãos também podem ser afetados de acordo com a severidade da doença. O comprometimento hepático se manifesta clinicamente por hepatomegalia e icterícia, efeitos secundários da invasão dos sinusóides, espaço de Disse e destruição localizada de hepatócitos (Enna e Rolando, 2007). Há evidência de hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, pode haver colestase intra-hepática, e eritrofagocitose já foi reportada (Levett, 2001).

Nos rins, a maior ocorrência é de nefrite intersticial, acompanhada de infiltração celular de neutrófilos e monócitos. Pode haver também insuficiência renal com padrões de nefrose hipoxêmica, associada a elementos que sugerem dano celular mediado por toxinas (Enna e Rolando, 2007). *Leptospira* podem ser encontradas nos túbulos renais, que apresentam depleção mitocondrial, bordas em escova desnudas, e membranas basais espessadas. Mudanças na estrutura glomerular conferem uma base anatômica para a proteinúria na leptospirose (Levett, 2001).

No coração, os sinais encontrados incluem miocardite intersticial, com infiltração de linfócitos e células plasmáticas, hemorragia e infiltração mononuclear no epicárdio, efusões pericárdicas, e arterite coronariana (Levett, 2001).

Hemorragias pulmonares relacionadas à leptospirose têm ganhado cada vez mais atenção desde o reconhecimento da forma pulmonar severa da leptospirose (severe pulmonary form of leptospirosis – SPFL), uma das maiores causas de morte em pacientes que desenvolvem a forma mais grave da doença (Dolhnikoff et alii, 2007). Taxas de incidência de envolvimento pulmonar aumentaram recentemente, e podem variar de 20 a 70 por cento dos casos totais (Bharti et alii, 2003; Dall’Antonia et alii, 2008). Sinais clínicos envolvem congestão e hemorragia pulmonar, com infiltração dos espaços alveolares por monócitos e neutrófilos. Pode haver formação de membrana hialina, e *Leptospira* podem ser encontradas em células endoteliais dos septos inter-alveolares e dos capilares (Levett, 2001).

Necrose focal de músculos esqueléticos (principalmente das pernas) pode ocorrer, com infiltração de macrófagos, neutrófilos e células plasmáticas (Levett, 2005).

No cérebro, observa-se infiltração perivascular de linfócitos. Comprometimento neurológico é observado na forma de cefaléia intensa, e raramente como alteração de consciência. Pode-se desenvolver também meningite, geralmente durante a fase imune da doença, o que nos leva a crer que os problemas neurológicos devem estar associados a manifestações do sistema imune do hospedeiro (Levett, 2001).

O comprometimento ocular é observado por sufusão conjuntiva, que quando acompanhada de icterícia é um indicativo da doença de Weill, uma das formas mais graves da leptospirose. Ocasionalmente, pode-se desenvolver uveíte anterior, manifestada por visão embaçada, fotofobia e dor (Enna e Rolando, 2007). Postulou-se que a persistência de alguns antígenos possa provocar uma reação auto-imune responsável por tais manifestações (Parma, Cerone e Sansinanea, 1992; Kalsow e Dwyer, 1998; Rathinam, 2005). *Leptospira* podem ser encontradas no humor aquoso em humanos e eqüinos, como demonstrado tanto por microscopia quanto por PCR (Levett, 2001).

Infecções agudas podem afetar o curso da gravidez, tanto por efeito da febre e alterações patológicas na mãe quanto por transmissão transplacentária ao feto. Em pelo menos um caso bactérias do sorovar Hardjo foram transmitidas da mãe para o bebê pela amamentação (Levett, 2001).

### **Patogênese**

Existem basicamente dois tipos de mecanismos para a patogênese da leptospirose: os efeitos diretos da bactéria nos tecidos e a reação imune do hospedeiro à infecção.

Apesar dos mecanismos moleculares responsáveis pela patogenia das *Leptospira* ainda não terem sido elucidados, vários fatores de virulência foram propostos e caracterizados recentemente. Dentre eles, lipoproteínas e proteínas de superfície, proteínas secretadas, elementos de mobilidade, quimiotaxia, adesão e invasão, e lipopolissacarídeos (Palaniappan, Ramanujam e Chang, 2007).

Sabe-se que a lipoproteína LipL36 tem expressão diferenciada quando mantidas em culturas *in vitro* comparada com *in vivo* (Barnett *et alii*, 1999). LigA, Qlp42, LipL42 e Loa22 se mostraram reguladas positivamente durante infecções (Haake e Matsunaga, 2002). LipL32 dispara uma resposta inflamatória por meio de um mecanismo envolvendo fator kappa-B nuclear e receptores do tipo Toll (TLR)2 (Yang, Hung e Wu, 2006). LfHA, LruA e LruB foram identificados e caracterizados como novas proteínas imunogênicas (Palaniappan, Ramanujam e Chang, 2007).

Existem pelo menos 79 genes associados à mobilidade em todos os genomas seqüenciados até o momento, sendo que destes, 42 se conservam entre outras espiroquetas conhecidas, como *B. burgdorferi* e *T. pallidum*. Análise genômica indica que o sistema de quimiotaxia de *L. interrogans* é muito mais sofisticado do que o de *B. burgdorferi* e *T. pallidum*. Linhagens patogênicas apresentam quimiotaxia em direção à hemoglobina, enquanto que as saprofíticas não (Nascimento *et alii*, 2004).

A adesão de bactérias às células hospedeiras é o primeiro passo para se estabelecer uma infecção. Leptospiras entram tanto em células fagocíticas quanto não-fagocíticas, e diversos estudos com culturas de células demonstram a importância de moléculas de superfície para adesão e invasão. Uma proteína de adesão à fibronectina expressa na superfície de bactérias do sorovar Icterohaemorrhagiae, mas não de linhagens não-virulentas, pode exercer papel importante no contato inicial do parasita com o hospedeiro (Merien *et alii*, 2000; Lin e Chang, 2007).

O lipopolissacarídeo (LPS) leptospiral tem atividade endotóxica mais baixa em relação ao de outras bactérias Gram-negativas, apesar de terem composições semelhantes. Outra singularidade é que disparam o sistema inato em humanos por receptores do tipo toll (TLR)2, ao invés de TLR4. A resistência dos camundongos à infecção por leptospiras patogênicas ao homem foi atribuída à alta afinidade entre essas moléculas e receptores do tipo TLR2 e TLR4, que confere uma resposta imune inata efetiva para o sorovar em questão (Viriyakosol *et alii*, 2006). Mudanças no LPS de leptospiras patogênicas afetam a letalidade da infecção. Algumas regiões dessas moléculas são altamente variáveis em diferentes sorovares, e são responsáveis por evocar uma imunidade sorovar-específica.

Foi reportado que os sorovares Pomona e Copenhageni produzem uma proteína citotóxica, e o plasma de animais infectados possuía atividade citotóxica. *In vivo*, essa proteína foi capaz de causar infiltrações histopatologicamente evidentes. Outras frações com atividade citotóxica foram purificadas dos sorovares Copenhageni e Canicola, mas também foram detectadas em sorovares não-patogênicos, sugerindo que outros fatores de virulência podem ter papéis mais importantes. Nos genomas anotados, existem diversas hemolisinas, esfingomielinases e fosfolipases. Uma

esfingomielinase apresenta atividade formadora de poros em várias células de mamíferos, e pode contribuir para a vasculite sistêmica (Levett, 2001).

Mesmo com as recentes elucidações sobre a patogenia da doença, muitas proteínas ainda não de ser identificadas e caracterizadas, o que trará uma percepção mais acurada dos processos infecciosos induzidos pelas Leptospiras.

## Peptidases

Apesar de o termo “protease” ser comumente empregado, o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, em inglês) recomenda o termo “peptidase” para a classe de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. Estão amplamente difundidas na natureza, onde diversas funções biológicas dependem de sua atividade. Atualmente, três critérios principais são utilizados para classificar as peptidases: (1) a reação catalisada; (2) a natureza química do sítio catalítico; e (3) a relação evolutiva entre outras proteases, como revelada pela estrutura primária e/ou terciária da proteína.

Quanto ao tipo da reação catalisada, as peptidases podem ser divididas em *endopeptidases*, quando preferencialmente clivam peptídeos de regiões internas da proteína, longe das extremidades, ou *exopeptidases*, quando agem próximas às terminações da cadeia polipeptídica. As que exibem especificidade em relação à região n-terminal das proteínas são chamadas de *aminopeptidases*, enquanto que as que clivam peptídeos da região c-terminal são conhecidas por *carboxipeptidases*. Existem também as *omegapeptidases*, que clivam peptídeos ou dipeptídeos de ambas as regiões, que são ligados, substituídos ou ciclizados por pontes isopeptídicas (Rawlings *et alii*, 2008).

As peptidases podem ainda ser agrupadas quanto ao tipo de sítio catalítico que possuem. Em 1960, Hartley reconheceu quatro tipos de sítios catalíticos, que mais tarde levaram à classificação por seríno-, cisteíno-, aspártico- e metalo-peptidases (Barrett, 1980; Barrett e McDonald, 1986). Atualmente, com o reconhecimento das treonína e glutâmico-peptidases (respectivamente, Abadjieva *et alii*, 2000 e Fujinaga *et alii*, 2004), somadas ao grupo de peptidases com ação catalítica desconhecida, o

número de tipos de peptidases de acordo com essa classificação chega a sete. Esse sistema de agrupamento contribui para os dois sistemas atuais de nomenclatura e classificação de peptidases, o EC e o MEROPS.

O último critério de classificação das peptidases é baseado na homologia, ou seja, na relação evolutiva e estrutural entre as enzimas, inferida a partir da comparação de seqüências de aminoácidos e/ou estruturas terciárias. Esse método foi introduzido por Barret e colaboradores em 2003, e atualmente é o motor do banco de dados MEROPS<sup>1</sup> (Rawlings *et alii*, 2008). A partir dessas comparações, a função biológica de uma determinada enzima pode ser inferida com base apenas na seqüência nucleotídica do gene responsável por sua codificação (Potempa e Pike, 2005). Além de o sistema MEROPS utilizar-se da homologia entre os diferentes tipos de proteases para classificá-las em famílias, que posteriormente são agrupadas em clãs, ele utiliza-se ainda da classificação quanto ao tipo de sítio catalítico, pois as peptidases comuns em uma família geralmente possuem uma grande conservação na seqüência peptídica.

O sistema EC foi introduzido pela Comissão de Enzimas, e atualmente é mantido pelo Comitê de Nomenclatura da IUBMB<sup>2</sup>. Esse sistema é baseado no tipo de ação das enzimas, sendo que as peptidases se encontram no grupo 3.4 (o número '3' corresponde às hidrolases, e o '4' ao tipo de ligações clivadas – no caso as peptídicas).

As propriedades das principais classes de peptidases estão descritas a seguir.

### **Aspártico-peptidases**

Atualmente composta por 14 famílias, agrupadas em sete clãs distintos, essa classe inclui as enzimas digestivas, como pepsina, quimiosina e renina, bem como algumas peptidases fúngicas. Também fazem parte dessa classe de peptidases as retropepsinas, como a protease do vírus da imunodeficiência humana. Dentre os sete clãs definidos, dois (AC e AF) contêm enzimas presentes apenas entre as bactérias. O clã AD possui também uma família composta apenas por peptidases bacterianas. O sítio ativo foi inferido por estudos de modificação química (Delpierre e Fruton, 1965;

---

Disponível em: <sup>1</sup> <http://merops.sanger.ac.uk/>.

<sup>2</sup> <http://www.chem.gmw.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>.

Hartsuk e Tang, 1972; Dunn, 2001), e é normalmente composto por um par de resíduos de ácido aspártico (Asp-32 e Asp-215, na pepsina). A catálise da quebra das ligações peptídicas mediada por membros dessa classe de peptidases ocorre sem o uso de um ataque nucleofílico por um grupo funcional da enzima, ao invés disso, uma molécula de água é fortemente ligada entre os dois resíduos catalíticos (Dunn, 2001), que exerce a função esperada de nucleófilo. São inibidas especificamente por pepstatina A ou por compostos de diazoacetil.

Na bactéria da praga *Yersinia pestis*, a aspartato-peptidase Pla converte plasminogênio do hospedeiro em plasmina, além de desabilitar a  $\alpha_2$ -antiplasmina, o que facilita a atividade dessa peptidase na degradação de fibrina e outras proteínas não-colagenosas da matriz extracelular. Isso causa o dano local do tecido conjuntivo, e permite a invasão eficiente da bactéria para a circulação. É também sabido que a peptidase Pla medeia a adesão do parasita à membrana basal e a invasão de células epiteliais em humanos. (Potempa e Pike, 2005).

Adicionalmente, várias outras aspartato-peptidases estão envolvidas no processo de regulação de diversos fatores de virulência em outras bactérias. Na *E. coli* enteropatogênica, a correta montagem do pilo formador de maços (BFP) depende da atividade peptidásica da pré-pilina (Anantha, Stone e Donnenberg, 2000; Potempa e Pike, 2005). O nocaute do gene responsável pela produção da pré-pilina em *Legionella pneumophila*, prejudica a habilidade da bactéria de crescer em amebas ou células macrófago-símiles de humanos (Liles, Edelstein e Cianciotto, 1999; Potempa e Pike, 2005).

### **Cisteíno-peptidases**

Essa classe é atualmente composta por 58 famílias, dispostas em nove clãs. Apesar de duas peptidases bacterianas (estreptopaína e clostripaína) dessa classe constarem entre as primeiras enzimas com atividade peptídeo-hidrolásica descritas, as cisteíno-peptidases são sub-representadas em organismos procariontes (Potempa e Pike, 2005). Em compensação, estão amplamente distribuídas nos outros reinos. A papaína é o arquétipo membro mais estudado dessa classe de peptidases. Os principais clãs dessa classe de peptidases são: CA, que possui todas as famílias

relacionadas à papaína; o CD, que contém famílias com motivos semelhantes ao da família das caspases; e o CL, que corresponde às peptidases bacterianas que clivam e transferem peptídeos da parede celular das bactérias (Rawlings, 2008).

O mecanismo catalítico dessa classe se baseia numa tríade catalítica, na qual um resíduo de histidina é usado para ativar o resíduo de cisteína em um nucleófilo (no caso, um átomo de enxofre). Em um segundo momento, a histidina funciona comoceptor de elétrons, facilitando a transferência da região carboxiterminal do resíduo atacado para a formação de um intermediário covalente (Dunn, 2001). Peptidases dessa classe são inibidas por p-cloromercuriobenzoato (pCMB) e L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano (E-64), e também por outros agentes como iodoacetamida, leupeptina, cistatina e quimostatina (Bond e Butler, 1987).

### **Serino-peptidases**

Composta por 29 famílias dispostas em 13 clãs, as serino-peptidases são as enzimas mais estudadas no ramo das proteases, e talvez em toda a enzimologia (Dunn, 2001). É também o maior grupo de peptidases, constituindo cerca de 35% do total de enzimas presentes no banco de dados MEROPS. Essa classe catalítica possui um resíduo de serina agindo como nucleófilo durante o ataque. O mecanismo de ataque é basicamente o mesmo das cisteíno-peptidases, com exceção da formação do intermediário covalente, que no caso das serino-peptidases é um éster, ao invés de um tiol-éster. Do ponto de vista evolutivo, o mecanismo de ataque das serino-peptidases é considerado o mais eficiente dentre as outras peptidases, já que é o mais comum devido ao grande número de peptidase no grupo dessas enzimas. As duas maiores famílias dessa classe são a S1A e a S8A, representadas pela quimiotripsina e pela subtilisina, respectivamente. Enquanto que as enzimas da família S1A são de origem animal, as da S8A derivam de bactérias. No entanto, suas estruturas são muito semelhantes, e postula-se que elas possuem uma origem comum a partir de uma duplicação gênica de uma serino-peptidase ancestral, seguida de evolução divergente (Voet e Voet, 1990). Cataliticamente, são conhecidas por terem atividade máxima em pH ligeiramente alcalino, e são inibidas por diisopropilfluorofosfato (DFP), e muitas são sensíveis a fenilmetilsulfonyl fluoreto (PMSF) e aprotinina.

O fator de virulência bacteriano mais bem descrito dessa classe de peptidases, provavelmente, é a C5a peptidase, dos grupos A e B de *Streptococci*. Como o próprio nome sugere, trata-se de uma enzima que cliva o componente C5a do sistema complemento, um agente quimiotáxico para os leucócitos polimorfonucleares (Hill *et alii*, 1988; Potempa e Pike, 2005).

### **Metalopeptidases**

A classe das metalopeptidases é considerada a mais primitiva, porém se destaca das demais pela solução mais direta do efeito catalítico na ligação peptídica. Ao contrário das outras peptidases, que se baseiam em pontes de hidrogênio em uma fenda oxianônica, as metalopeptidases utilizam a coordenação de um íon metálico divalente para exercer o mesmo efeito (Dunn, 2001). São peptidases que diferem amplamente em suas seqüências e estruturas, e a grande maioria tem um átomo de zinco cataliticamente ativo. O zinco, em alguns casos, pode ser substituído por cálcio, cobalto ou níquel, sem perda de atividade. O íon metálico geralmente é imobilizado por três aminoácidos ligantes: His, Glu ou Asp. Além dos ligantes ao metal, pelo menos mais um resíduo (geralmente um resíduo de glutamato) está envolvido na hidrólise catalítica das ligações peptídicas, exercendo a função de uma base na polarização do solvente catalítico (Potempa e Pike, 2005). São inibidas por agentes quelantes de íons, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), N,N,N',N',-etilenoglicol-bis[aminoetil-éter]-ácido etilenodiaminotetracético (EGTA) e 1,10-fenantrolina (Bond e Butler, 1987).

Atualmente estão divididas em 53 famílias, agrupadas em 15 clãs, que são reconhecidos pelo tipo e número de íons metálicos necessários para a catálise e pelo arranjo seqüencial dos ligantes metálicos e resíduos catalíticos. O clã MA é o mais representado e divergente, abrangendo as zincínas. Ao contrário da limitada ocorrência das aspártico- e cisteíno-peptidases entre bactérias, as metalopeptidases são freqüentemente encontradas nesses microorganismos, e possuem representantes bacterianos em 50 de suas 53 famílias. Três peptidases dessa classe são extremamente importantes do ponto de vista farmacêutico. São elas as FtsH peptidases, metionil-aminopeptidases e homólogos da sialoglicopeptidase de *Pasteurella haemolytica*, únicas peptidases entre todas as classes que são completamente conservadas entre

diversas espécies bacterianas. Por essa razão, membros dessa classe de peptidases são alvos perfeitos para o desenvolvimento de inibidores específicos, que, bloqueando a ação dessas peptidases, poderiam ser utilizados para impedir o crescimento ou até mesmo matar a maioria das bactérias (Potempa e Pike, 2005). Infelizmente, homólogos humanos da metionil-aminopeptidase também são susceptíveis aos inibidores enzimáticos bacterianos. É necessário, portanto, o desenvolvimento de novos inibidores específicos baseados na estrutura tridimensional e características bioquímicas dessas enzimas. Corroborando a idéia de tamanha importância das metalopeptidases para as bactérias, sabe-se que elas compõem dois terços das aminopeptidases bacterianas conhecidas (Gonzales e Robert-Baudouy, 1996).

### **Aminopeptidases bacterianas**

Aminopeptidases são enzimas capazes de clivar o aminoácido N-terminal de cadeias peptídicas. Podem ser classificadas de acordo com o tipo de sítio catalítico e especificidade aos substratos. Possuem papel importante em diversas funções biológicas, tais como manutenção celular, crescimento, desenvolvimento e defesa. Historicamente, eram consideradas meras coadjuvantes no processo de reciclagem de aminoácidos, mas atualmente passaram a ser reconhecidas por diversos outros papéis. Em bactérias, por exemplo, possuem funções secundárias de regulação gênica, repressão transcricional, recombinação sítio-específica e de receptores virais e de toxinas (Matsui, Fowler e Walling, 2006). Existem 219 aminopeptidases explícitas no banco de dados MEROPS, e estão distribuídas entre os mais diversos organismos. Foram umas das primeiras peptidases descobertas, e desde então são estudadas a sério, devido suas importantes funções biológicas.

Como já foi dito anteriormente, a maior parte das aminopeptidases faz parte das metalopeptidases. Nesse grupo específico, as leucil-aminopeptidases (aminopeptidases com preferência a resíduos de leucina) merecem destaque, já que estão envolvidas em diversos mecanismos patogênicos e possuem estrutura tridimensional resolvida (Strater, Sherratt e Colloms, 1999). Apesar da importância dessas peptidases nos processos patogênicos de diversos organismos, estudos envolvendo a capacidade proteolítica em espiroquetas são raros, com exceção das bactérias do gênero *Treponema* (Makinen *et alii*, 1988 e 1995; Ohta, Makinen e

Loesche, 1986). Há alguns anos, Bertin e colaboradores caracterizaram uma leucil-aminopeptidase de *Borrelia burgdorferi* (Bertin, 2005). Devido ao pequeno número de publicações sobre proteases de espiroquetas, em específico de *Leptospira*, o presente trabalho visou identificar e caracterizar atividade leucil-aminopeptidásica relacionada com essa bactéria uma vez que tal atividade somente havia sido detectada em representantes patogênicos de *L. interrogans*.

Objetivos

---

# Objetivos

---

Tendo em vista o importante papel que as peptidases exercem nos processos de virulência e perseverança de microorganismos patogênicos, estudá-las é fundamental, não somente para conhecer os mecanismos moleculares da fisiologia das doenças parasitárias, mas também para encontrar possíveis alvos de quimioterapia.

Uma vez identificadas diferenças significativas na atividade peptídeolítica entre sorovares patogênicos e não-patogênicos de bactérias do gênero *Leptospira*, novas investigações devem ser feitas, de modo a desvendar se as enzimas responsáveis constituem ou não possíveis alvos quimioterápicos.

Nesse contexto, o objetivo geral deste trabalho é caracterizar bioquimicamente a enzima responsável pela diferença de atividade leucil-aminopeptídeolítica detectada em sorovares patogênicos de *Leptospira*. Para tanto, os objetivos específicos traçados foram:

1. Obter a forma recombinante e ativa da enzima responsável pela degradação do substrato L-Leu-AMC em sorovares patogênicos de *Leptospira*;
2. Caracterizar bioquimicamente sua atividade determinando os parâmetros cinéticos da mesma;
3. Produção de soro anti-LAP de *L. interrogans* patogênica, com vistas a posteriores estudos que relacionem a presença da proteína com a patogenicidade característica de alguns sorovares.

## Material e Métodos

---

# Material e Métodos

---

Com base nas anotações genômicas dos sorotipos de *Leptospira interrogans* seqüenciados, pôde-se atribuir a atividade leucil-aminopeptidásica do extrato total bacteriano à proteína codificada pelo gene *pepA* (provável aminopeptidase citosólica). O gene em questão foi, então, clonado e expresso recombinantemente em bactérias *E. coli* BL21-DE3, altamente recomendadas para essa finalidade. O DNA cromossomal dos sorovares de *Leptospira spp.* utilizado como molde para a reação de polimerase em cadeia (PCR) foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Marcos Bryan Heynemann (Universidade Federal de Minas Gerais).

## **Sorovares de *Leptospira spp.* e condições de cultivo**

Os sorovares utilizados nesse estudo foram cultivados a 28 °C em meio EMJH suplementado com soro de coelho inativado, como descrito por Turner e Mohun (1970 *in* Heinemann *et alii*, 2000).

## **Preparação das amostras de DNA submetidas à reação de polimerase em cadeia**

Leptospiras em cultura foram coletadas por centrifugação a 13.000 *g* por 30 minutos, e o DNA genômico extraído como descrito por Sambrook *et alii* (1989 *in* Heinemann *et alii*, 2000).

## **Amplificação do gene *pepA* de *Leptospira interrogans***

Os oligonucleotídeos foram desenvolvidos com base na seqüência disponível do gene *pepA* (Aminopeptidase citosólica) de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 (número de acesso no GENBANK: NC\_005823). Suas seqüências, com os sítios de restrição já adicionados, são:

- *pepALIF*-NdeI: 5'-CATATGAAACTGGATAAAAATAAAATCCAAATC-3', para o iniciador senso, com adição do sítio de restrição para a enzima NdeI (seqüência sublinhada);

- pepALIR-XhoI: 5'-CTCGAGCTATTTCTTTTGCCAATCTTTTCAAC-3', para o iniciador anti-senso, com adição do sítio de restrição para a enzima XhoI (seqüência sublinhada).

Cada reação de 50 µL era composta por (as quantidades ou concentrações finais estão contidas nos parênteses): 1 µL de DNA (50 ng), 1µL de cada oligonucleotídeo (300 nM), 1µL de dNTP MIX (10 µM), 5µL de tampão de reação 10X (1X), 2µL de MgCl<sub>2</sub> (1 mM), 1µL de Taq DNA polimerase (Fermentas, 1,25u) e água milliQ q.s.p. 50 µL. Em seguida, as amostras seguiram para um termociclador programado com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por um minuto, anelamento a 54 °C por um minuto, extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos, e uma etapa de extensão final a 72 °C por cinco minutos.

## Clonagem dos genes *Hardjo pepA* e *Pomona pepA*

### Vetor T/A

Os produtos amplificados, de aproximadamente 1500 pares de base, foram ligados diretamente no vetor TA pGEMT-Easy (Promega) e transformados em bactérias competentes DH5α, RecA negativas e conseqüentemente mais apropriadas para replicação de plasmídeos de alta fidelidade. As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg / mL, concentração final), IPTG e X-Gal, e incubadas *overnight* em estufa a 37°C. As colônias brancas foram coletadas e crescidas em tubos com 1 mL de meio LB líquido adicionado de ampicilina, também *overnight*. Posteriormente, 100 µL das culturas crescidas foram retirados e guardados em tubos do tipo *ependorf*, a 4°C. Os 900 µL restantes foram centrifugados por cinco minutos em uma mini-centrífuga (Eppendorf) a 7.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. As células precipitadas foram ressuspensas em 70 µL de H<sub>2</sub>O milliQ, e o DNA total dos possíveis clones foi extraído adicionando-se 100µL de fenol-clorofórmio (1:1), seguido de agitação rápida até homogeneização, e centrifugação a 16.000 rpm, por dez minutos. Quinze microlitros da fase superior de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 0,8%, para avaliação da diferença de massa molecular plasmídeas. Clones que apresentaram plasmídeos com massa

molecular mais alta foram cultivados em 15 mL de meio LB líquido, dos quais 10 mL foram centrifugados e submetidos à extração por lise alcalina do tipo “miniprep” (*PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit*, Invitrogen). O DNA plasmideal obtido foi submetido à análise por PCR, com condições idênticas às utilizadas para amplificação do DNA genômico. Clones positivos foram divididos em alíquotas e armazenados em glicerol 15% a -80 °C. Os plasmídeos foram chamados de pGEM-HapepA, obtido do fragmento amplificado do sorovar Hardjo, e pGEM-PopepA, obtido do sorovar Pomona.

### **Vetor pET19b**

Para clonagem no vetor de expressão, os plasmídeos pGEM-HapepA e pGEM-PopepA foram digeridos com as enzimas XhoI e NdeI (Fermentas), como descrito pelo fabricante. O resultado da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e os fragmentos de aproximadamente 1500 pb foram eluídos com o *kit PureLink Gel Extraction* da Invitrogen. Os fragmentos purificados foram ligados no vetor pET19b (Novagen) previamente digerido com as mesmas enzimas, e transformados em bactérias competentes *E. coli* XL1 Blue por choque térmico. As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina e crescidas a 37°C por toda a noite. Colônias aleatoriamente selecionadas foram crescidas em meio LB líquido adicionado de ampicilina (concentração final de 100 µg por mL), e submetidas à extração do DNA total por fenol-clorofórmio, como descrito anteriormente. Os clones que apresentaram plasmídeos com massa molecular acima do controle (pET19b+ vazio), foram crescidos novamente em 15 mL de meio de cultura LB com ampicilina, dos quais 10 mL destinados à extração plasmideal por “miniprep” (*PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit*, Invitrogen) e submetido à análise por PCR. Os 5 mL restantes dos clones positivos foram divididos em alíquotas e armazenados em glicerol 40% a -80°C. Os vetores de expressão obtidos foram chamados de pET19b-HapepA e pET19b-PopepA, para os sorovares Hardjo e Pomona, respectivamente.

### **Seqüenciamento**

Aproximadamente 500 ng de DNA plasmidial das amostras pET19b-HapepA e pET19b-PopepA foi enviado em tubo *ependorf* para a empresa Genomic Engenharia

Molecular. A amplificação se deu com uso dos iniciadores para o promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e para a região terminadora T7 (5'-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3'). A qualidade do seqüenciamento foi confirmada por visualização do cromatograma com o auxílio do programa *Chromas Lite*<sup>3</sup>.

## **Análise filogenética**

As seqüências parciais obtidas dos dois genes clonados foram alinhadas com as seqüências de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e Lai (nº de acesso YP\_000715.1 e NP\_713621.1), *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis (nº de acesso YP\_798593.1 e ABJ75481.1), *L. biflexa* sorovar Patoc (nº de acesso ABZ92974.1 e ABZ96589.1), *H. influenzae* (nº de acesso AAC23351.1), *E. coli* (YP\_001726686.1), *H. pilory* (nº de acesso NP\_207365.1), *T. denticola* (nº de acesso NP\_970914.1), *P. falciparum* (nº de acesso XP\_001348613.1), *T. cruzi* (nº de acesso EAN91071.1), *T. brucei* (nº de acesso AAX70152.1), *L. major* (nº de acesso CAJ02694.1), *M. musculus* (nº de acesso AAK13495.1), *H. sapiens* (nº de acesso NP\_056991.2), pelo programa ClustalW (Larking *et alii*, 2007). Em seguida tiveram sua distância filogenética atribuída pelo programa DNAdist, e a matriz resultante processada pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) com auxílio do algoritmo NEIGHBOR, ambos da suíte de aplicativos PHYLIP<sup>4</sup>. O arquivo com as informações da árvore filogenética foi visualizado com o programa TreeView<sup>5</sup>.

## **Expressão das proteínas recombinantes**

Células BL21-(DE3) foram transformadas por choque térmico com os vetores de expressão pET19b-HapepA e pET19b-PopepA, e em seguida plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina. Uma colônia de cada placa foi escolhida e testada por PCR, a fim de comprovar a transformação. Colônias positivas foram cultivadas em meio LB com ampicilina, divididas em alíquotas e armazenadas em glicerol 15% a -80 °C.

---

Disponíveis em: <sup>3</sup> [http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html).

<sup>4</sup> <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.

<sup>5</sup> <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

As condições ótimas de expressão foram obtidas por ensaios em diferentes temperaturas (20 °C, 30 °C, 37 °C), concentrações de IPTG (1 mM, 0,5 mM, 0,3 mM e 0,1 mM) e tempos de indução (2 h, 3 h, 4 h, 6 h, ou por toda a noite). Extratos totais das bactérias induzidas em cada condição foram centrifugados e as frações solúveis e insolúveis foram separadas em SDS-PAGE 9%. Uma grande quantidade de proteína solúvel foi obtida induzindo culturas na fase estacionária ( $OD_{600} \sim 0,6$ ) com 0,3 mM de IPTG durante 16h e agitação constante de 200 rpm.

## **Extração das proteínas recombinantes**

### **Reagente BugBuster®**

Culturas de células BL21-DE3 foram centrifugadas por 15 minutos a 5.000 *g*, e, após o descarte do sobrenadante, ressuspensas em reagente *BugBuster*® (Novagen) na razão de cinco mL para cada grama de célula, e submetendo-as a leve agitação em temperatura ambiente. O produto de lise obtido foi centrifugado a 16.000 *g* por 10 minutos, e as frações solúveis e insolúveis separadas em tubos diferentes e analisadas em SDS-PAGE 9%.

### **Ciclos de congelamento e descongelamento**

Células de culturas induzidas foram ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 25 mM, pH 8, NaCl 300 mM, lisozima 0,2%) e submetidas a cinco ciclos de congelamento (-20 °C) e descongelamento (37°C). Após centrifugação, frações solúveis e insolúveis foram analisadas por SDS-PAGE 8%.

### **Sonicação**

Células provenientes de 100 mL de culturas previamente induzidas e precipitadas foram ressuspensas em 15 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, pH 7,9, NaCl 500 mM, lisozima 0,2%) e incubadas a 37°C por 15 minutos. Em seguida, foram submetidas a 3 ciclos de sonicação em banho de sal e gelo com um processador ultra-sônico Vibra-Cell VC130 (Sonics). Cada ciclo consistia da aplicação de 10 watts de potência (marcador de amplitude apontando 40) em pulsos com sete segundos de duração e intervalos de um segundo entre eles, num tempo total de três minutos (aproximadamente 22 pulsos). O tempo entre os ciclos era de, no mínimo, um minuto

para evitar aquecimento das amostras. A intensidade, o tempo total e o tempo de cada pulso foram determinados experimentalmente, de modo que a maior parte das células fossem lisadas sem que houvesse degradação das proteínas recombinantes.

## **Eletroforese em gel de poliacrilamida**

### **SDS-PAGE**

As análises que exigiram separação de extrato celular, estimativa de massa molecular e monitoramento da purificação da enzima recombinante foram feitas por sistema descontínuo de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970). O tampão de amostra utilizado era composto por 0,1% SDS e 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol. A menos que a visualização de oligômero fosse necessária, as amostras eram previamente fervidas por cinco minutos antes de aplicação no gel. A eletroforese ocorreu mediante aplicação de voltagem constante (100 V durante a etapa de concentração e de 150 V durante a separação) em sistema de eletroforese vertical *MiniProtean 3* (Bio-Rad) com tampão de corrida Tris-Glicina, como descrito pelo fabricante. Para a visualização das bandas, os géis foram corados com azul de Coomassie.

As massas moleculares foram estimadas comparando-se o padrão de migração das amostras com os dos marcadores comerciais *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen) ou SDS-6H (Sigma).

### **PAGE**

Para averiguar se o padrão de migração da enzima era alterado durante a eletroforese desnaturante, foram corridos géis sem a adição de SDS em sua formulação nem nos tampões de amostra e de corrida, com fervura prévia ou não das amostras, sob as mesmas condições descritas acima.

## **Eletroforese para determinação da atividade enzimática (enzimografia) da HaLAP**

A eletroforese de géis de atividade (enzimograma) foi realizada a 4 °C, com voltagem constante de 100 V e sem fervura prévia das amostras. O tampão de amostra

tinha um teor reduzido de SDS (0,1%) e não possuía agentes redutores. Após a corrida, os géis foram lavados quatro vezes com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, por 15 minutos, sob agitação lenta à temperatura ambiente. A atividade enzimática foi visualizada após incubação do gel com o substrato L-AMC, 20  $\mu$ M, por até 30 minutos em temperatura ambiente, sob incidência de luz UV (Santana *et alii*, 1992, com modificações). Depois de fotodocumentados, os géis foram lavados com água destilada e corados com azul de Coomassie.

## **Purificação das enzimas recombinantes PoLAP e HaLAP**

### **Cromatografia de afinidade em coluna de níquel**

O extrato solúvel contendo as enzimas recombinantes foi aplicado em coluna de níquel com afinidade por histidina (*His Bind Purification Kit*<sup>®</sup>, Novagen). Um mililitro da resina em estoque (adicionada de etanol) foi utilizado para cada coluna, resultando em um volume final de 500  $\mu$ L de resina assentada. Após várias lavagens com H<sub>2</sub>O milliQ, a resina foi carregada com 5 volumes de NiSO<sub>4</sub> 400 mM (*Charge Buffer*), ativada com 3 volumes de tampão de ligação (*Bind Buffer* - Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM) e só então submetida à passagem da amostra (fluxo de aproximadamente 8 mL.h<sup>-1</sup>). Em seguida foram aplicados 10 volumes (10x 500  $\mu$ L) de tampão de ligação, com cuidado para não ressuspender a resina, e outros 10 volumes de tampão de lavagem (*Wash Buffer* – Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 100 mM). As amostras foram eluídas com seis volumes de tampão de eluição (*Elute Buffer* – Tris-HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 500 mM, imidazol 300 mM). Alíquotas foram recolhidas em cada etapa da purificação, para posterior análise em SDS-PAGE. As concentrações de imidazol dos tampões de lavagem e de eluição foram obtidas experimentalmente, por meio de lavagens com tampão contendo 20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM, 200 mM e 400 mM de imidazol.

### **Cromatografia de exclusão de massa molecular**

Para separação da forma quaternária das enzimas recombinantes, 200  $\mu$ L do segundo volume eluído da coluna de níquel (eluato com maior concentração de proteínas) foram aplicados em um *looping* no sistema de FPLC (*Fast Protein Liquid*

*Chromatography*, Pharmacia LCC 501 Plus) acoplado a uma coluna de filtração em gel Superdex-200 (Sigma), previamente equilibrada com tampão (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 150 mM) filtrado e degaseificado, com fluxo de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A amostra aplicada no *looping* foi injetada na coluna com o mesmo tampão e fluxo utilizados para equilibrá-la. Das 52 frações coletadas (Pharmacia LKB SuperFrac), 26 foram testadas (intercaladamente: amostra sim, amostra não) para atividade leucil-aminopeptidolítica. Brevemente,  $18 \mu\text{L}$  das frações foram adicionados a  $2 \mu\text{L}$  de substrato L-AMC  $200 \mu\text{M}$  (concentração final  $20 \mu\text{M}$ ) em uma placa, e, após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, visualizada sob luz ultravioleta. Frações positivas (e adjacentes) para atividade leucil-aminopeptidolítica foram armazenadas em gelo a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  até o uso.

## **Caracterização da atividade proteolítica das enzimas recombinantes**

Os ensaios foram lidos com o auxílio de um espectrofotômetro *Spectramax M2<sup>e</sup>* (Molecular Devices) programado para leituras no espectro de 440 nm, com excitação de 380 nm, em intervalos de um minuto para os testes de dez minutos de duração, ou em intervalos de dez segundos para os testes de cinco minutos de duração. A velocidade média da reação pôde ser calculada pela leitura do acúmulo de fluorescência emitida decorrente do aumento do número de moléculas de AMC livres. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas.

### **Influência do pH**

Aproximadamente  $1 \mu\text{g}$  de proteína obtida no primeiro passo de purificação (coluna de níquel) foi utilizada para cada reação de  $100 \mu\text{L}$  em tampão AMT + L-AMC (ácido acético 50 mM, Mes 50 mM, Tris-HCl 100 mM, L-AMC  $20 \mu\text{M}$ ), para a faixa de pH 5,0 a 10, ou Tris-CAPS + L-AMC (Tris-HCl 100 mM, CAPS 100 mM, L-AMC  $20 \mu\text{M}$ ), para a faixa de pH 8,0 a 11,5. Tampão e enzima foram aplicados em uma placa de 96 poços, incubados à temperatura ambiente por dez minutos para, somente então, adicionar-se o substrato. A placa foi lida como descrito acima e as velocidades das reações foram calculadas e comparadas entre si para obtenção do pH ótimo de funcionamento da enzima.

### **Temperatura ótima**

A temperatura ótima foi avaliada por meio de ensaios do tipo *endpoint*, no qual apenas a fluorescência total no fim da reação foi considerada. Adicionou-se L-AMC numa concentração final de 20  $\mu\text{M}$  em 50  $\mu\text{L}$  de tampão de reação (Tris-CAPS 100 mM, pH 8,5) contendo cerca de 1  $\mu\text{g}$  de enzima. As reações ocorreram em um termociclador programado com diferentes temperaturas (20 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C), por dez minutos cada, ao final dos quais foram interrompidas pela adição de 150  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. As amostras foram aplicadas em placa de 96 poços, lidas em leitora de placa e as taxas de fluorescência comparadas entre si.

### **Influência da força iônica**

Para a avaliação da influência da força iônica na velocidade média da reação, fez-se uma diluição seriada de NaCl em tampão Tris-CAPS 100 mM, pH 8,5, de modo que o primeiro poço tivesse uma concentração de 1 M, e o último 0,016 M. Adicionou-se aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de enzima obtida da primeira etapa de purificação em tampão de reação, e em seguida incubou-se à temperatura ambiente por dez minutos antes da adição de substrato L-AMC numa concentração final de 20  $\mu\text{M}$ . A placa foi inserida na leitora de placas e a velocidade média calculada e comparada ao grupo controle (sem adição de NaCl).

### **Influência de agente redutor**

Foi testada a influência do agente redutor DTT no tampão de reação. DTT foi adicionado ao tampão de reação Tris-CAPS 100 mM, pH 8,5 nas concentrações finais de 2 mM, 1 mM e 0,5 mM. Após incubação de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de enzima por dez minutos nos tampões, adicionou-se o substrato numa concentração final de 20  $\mu\text{M}$ . A placa foi lida e as velocidades calculadas e comparadas ao grupo controle (sem adição de DTT).

### **Inibição por EDTA**

A enzima recombinante foi incubada em tampão de reação (Tris-HCl 25 mM, pH 8,5) com 1 e 10  $\mu\text{M}$  do inibidor EDTA, por 10 e 30 minutos. Passado o tempo de incubação, adicionou-se o substrato fluorogênico L-Leu-AMC. A reação foi monitorada por 10 minutos em leitora de placas como descrito.

### **Suplementação e/ ou dependência de cátions**

Para avaliação da dependência de cátions nas reações, uma alíquota da enzima obtida na purificação por coluna de níquel foi incubada com EDTA (10 mM) por 30 minutos e em seguida submetida a processo de diálise em tampão Tris-HCl pH 8,5 a 4 °C, por 16 h. A enzima inibida foi incubada em tampão de reação com 0,4 mM de CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> ou ZnCl<sub>2</sub> por meia hora antes da adição do substrato L-AMC na concentração final de 20 μM. A velocidade da reação foi calculada e comparada com a do grupo controle (enzima submetida a processo de diálise sem adição prévia de EDTA). Enzima não inibida foi utilizada para averiguar a suplementação da atividade enzimática pela incubação com cátions nas mesmas condições.

### **Velocidade máxima e Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ )**

A concentração de substrato necessária para saturar os sítios ativos da enzima HaLAP foi extrapolada por um ensaio com diluição seriada de L-Leu-AMC em tampão Tris-CAPS 100 mM, pH 8,5. A concentração final de L-Leu-AMC variou de 50 μM a 1,56 μM para reações de 100 μL, com 0,2 μg de enzima purificada em coluna de filtração em gel. A reação ocorreu à temperatura ambiente (25 °C), e o ensaio foi realizado em duplicatas.

### **Produção de soro α-HaLAP em camundongos**

A proteína purificada em coluna de níquel foi extensamente dialisada contra solução salina 0,9% antes de submeter os camundongos isogênicos fêmeas do tipo Swiss às aplicações intra-dérmicas. A primeira dose constituiu de 5 μg da proteína recombinante por animal, homogeneizada com adjuvante completo de Freund quatro vezes diluído (1:3 de proteína devidamente diluída em solução salina estéril). No segundo desafio foi utilizada a mesma concentração de proteína, porém homogeneizada com adjuvante incompleto de Freund, nas mesmas proporções, 15 dias após a primeira imunização. A terceira imunização foi efetuada apenas com solução salina 0,9% estéril, com a mesma quantidade de proteína por animal (5 μg). Os animais foram sacrificados 10 dias depois, o soro recolhido e armazenado em glicerol 50% em -20 °C. O soro pré-imune foi retirado antes do primeiro desafio, por via do sinus orbital.

## Imunoblot

Extrato total de *E. coli* BL21-DE3 foi separado em SDS-PAGE 8%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*Hybond-C Extra*, Amersham) e bloqueadas por incubação em PBS-leite 5%, por duas horas. As membranas bloqueadas foram lavadas por duas horas com o anti-soro primário derivado de camundongo diluído 1:100 em PBS-leite 1%. Depois de três lavagens cada de 5 minutos com PBS 1x, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo  $\alpha$ -IgG de camundongo conjugado com a fosfatase alcalina diluído 1:2000. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas como descrito, incubadas por 10 minutos em tampão da fosfatase alcalina e submetidas à revelação com o substrato *NBT/BCIP* (Sigma).

## Resultados

---

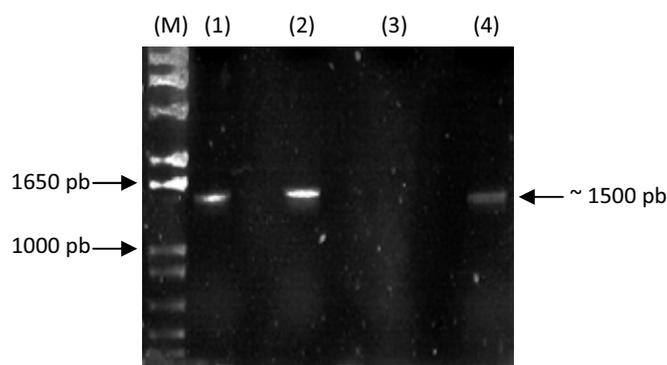
# Resultados

---

Tendo em vista a importância das proteases no metabolismo, produção de energia, e sobrevivência de vários microorganismos, e baseados em resultados preliminares não publicados da identificação de atividade proteolítica do extrato de diversos sorovares de *Leptospira spp.*, propusemos caracterizar bioquimicamente a enzima responsável pela atividade leucil-aminopeptidásica, tida como a principal diferença entre os extratos de bactérias patogênicas e não-patogênicas. Para tanto, a estratégia escolhida foi a de clonagem e expressão recombinante do gene *pepA* baseado nos genomas publicados de *Leptospira interrogans* sorovares Copenhageni e Lai (números de acesso no GenBank: NC\_005823.1 e NC\_004342.1, respectivamente). As anotações sugerem que esse gene é responsável pela codificação de uma provável aminopeptidase citosólica (também conhecida por leucil-aminopeptidase). Contando com essa informação, e utilizando como molde os genomas dos sorovares Hardjo, Icteriohaemorrhageae, Patoc e Pomona, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcos Heinemann, da Universidade Federal de Minas Gerais, pudemos dar início ao processo de clonagem do gene em questão.

## **O produto amplificado tem uma massa molecular semelhante à predita.**

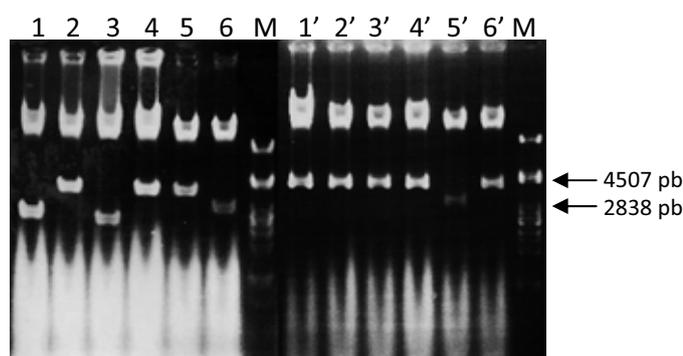
A reação de polimerase em cadeia com os oligonucleotídeos aneladores específicos descritos em material e métodos resultou em produtos com massa molecular estimada de 1500 pb, tamanho coerente com aquele atribuído às seqüências depositadas em banco de dados (GENBANK GeneID: 2771497, 1152783, 4406685 e 4409717), de aproximadamente 1488 pb. Dentre as quatro amostras enviadas pelo prof. Dr. Marcos Heinemann, somente as provenientes dos sorovares Hardjo e Pomona foram inicialmente amplificadas. Quanto às duas restantes, uma amostra não gerou produto de amplificação (sorovar Patoc), e a outra (sorovar Icteriohaemorrhageae) apenas foi amplificada quando se preparou a reação de PCR no próprio tubo em que a amostra foi encaminhada, sugerindo se tratar de pequena quantidade de DNA genômico extraído e/ou precipitado (figura 1).



**Figura 1. Estimativa da massa molecular dos produtos amplificados pela reação de polimerase em cadeia tendo como molde o material genômico de *L. interrogans*.** (1) sorovar Hardjo, (2) sorovar Pomona, (3) sorovar Patoc e (4) sorovar Icterohaemorrhagiae. (M) corresponde ao marcador de massa molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen). A PCR foi realizada com os oligonucleotídeos e sob as condições descritas na seção Material e Métodos.

### O fragmento de 1500 pb foi clonado corretamente nos vetores.

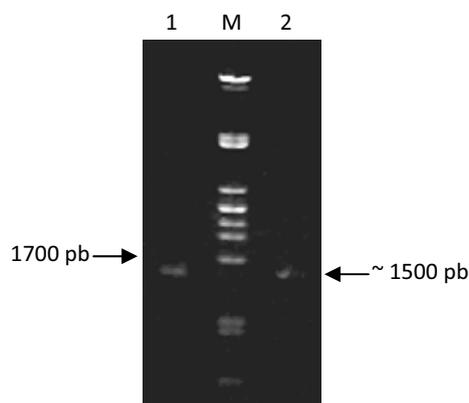
Dos produtos de PCR obtidos, somente foram clonados e seqüenciados aqueles dos sorovares Hardjo e Pomona. Esses produtos foram clonados no vetor T/A *pGEM®-T Easy* (Promega) e transformados em bactérias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . Colônias brancas, com o cassete da beta-galactosidase interrompido, foram submetidas à triagem por extração com fenol-clorofórmio (figura 2), e os clones com plasmídeos de massas moleculares superiores aos demais foram posteriormente confirmados por PCR para a existência do gene *pepA* (dados não mostrados).



**Figura 2. Padrão de migração dos plasmídeos obtidos da extração por fenol-clorofórmio de colônias brancas selecionadas de placas de transformação.** (1) a (6), colônias transformadas com o vetor pGEM-HapepA; (1') a (6'), colônias transformadas com o vetor pGEM-PopepA. (M), marcador de peso molecular  $\lambda$ -Pst I. Para confirmação, clones com massa molecular próximas a 4500 pb (pGEM-T easy + inserto) foram submetidos à análise por PCR.

Após a digestão dos vetores de clonagem com as enzimas XhoI e NdeI, foram obtidos fragmentos com tamanhos equivalentes ao esperado (aproximadamente 1500 pb), tanto no clone derivado do sorovar Hardjo quanto do sorovar Pomona,

demonstrando que os sítios de restrição foram corretamente inseridos por PCR em ambos os clones (figura 3). Ainda que o gene que codifica a leucil-aminopeptidase de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae não tenha sido clonado e seqüenciado, sua presença também foi confirmada pelo produto de amplificação na reação da polimerase em cadeia (figura 1).



**Figura 3. Resultado da eluição dos insertos liberados da digestão dupla (XhoI e NdeI) dos vetores de clonagem. (1), pGEM-HapepA e (2), pGEM-PopepA. Marcador de peso molecular  $\lambda$  Pst I.**

O fragmento da digestão eluído de gel de agarose foi corretamente ligado ao vetor de expressão pET19b (Novagen) como indicado pela triagem de plasmídeos extraídos por fenol-clorofórmio de colônias selecionadas ao acaso e pela confirmação por PCR (dados não mostrados). Quando digeridos com a enzima Eco RI, verificou-se que os vetores de expressão apresentavam massa molecular próxima de 7200 pb, o que era previsto como resultado da ligação do vetor pET19b de 5717 pb com o inserto de 1488 pb (dados não mostrados).

### **Seqüenciamento: O gene foi inserido em fase de leitura apropriada.**

O sentido e a fase de inserção foram confirmados pelo seqüenciamento parcial dos vetores pET19b-HapepA e pET19b-PopepA com o oligonucleotídeo anelador para o promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). A figura a seguir (figura 4) apresenta dados da ligação *in silico* dos fragmentos seqüenciados no vetor pET19b (ambos digeridos com a enzima NdeI), bem como a tradução esperada de suas fases de aberturas de leitura identificadas.

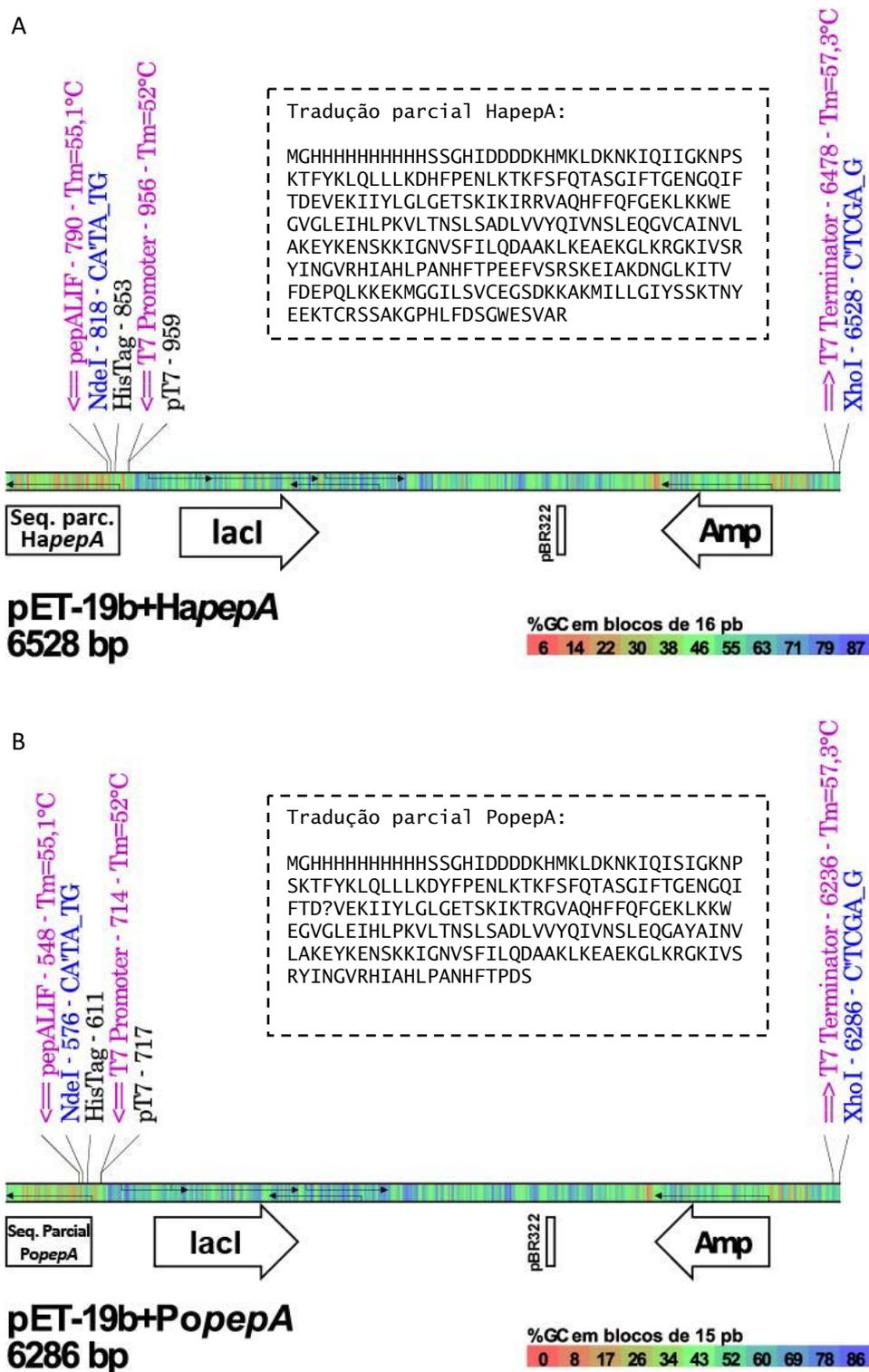
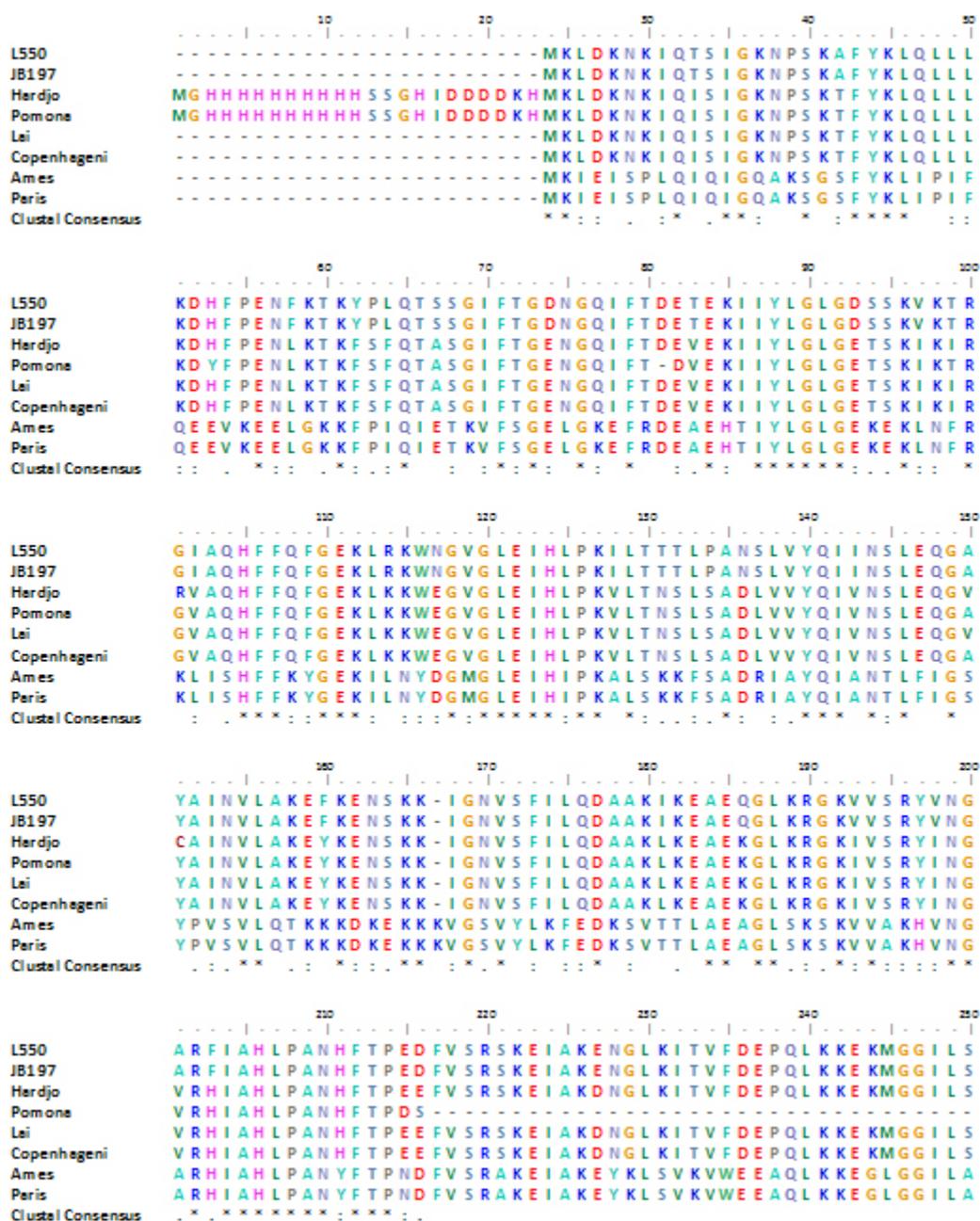


Figura 4. Ligação *in silico* do resultado da digestão do vetor pET19b e seqüências parciais dos vetores de expressão com a enzima Nde I. (A) seqüência parcial do vetor pET19b-HapepA e (B) pET19b-PopepA. As traduções esperadas para as fases abertas de leitura obtidas da ligação dos fragmentos respectivos nos sítios de clonagem do vetor pET19b encontram-se na caixa tracejada. Indicações em magenta apontam para sítios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, e suas respectivas temperaturas de fusão; em azul os sítios de restrição utilizados para clonagem. Análises concebidas no programa pDRAW32 (versão 1.1.97).

A análise dos resultados do seqüenciamento indica que a fase aberta de leitura do gene clonado codifica uma proteína de fusão com a cauda de poli-histidina com seqüência similar àquelas depositadas no banco de dados GENBANK como potenciais aminopeptidases citosólicas (leucil-aminopeptidases) de *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. biflexa* (números de acesso no GENBANK: AAS69352, AAN50639, ABJ79660, ABJ75481, ABZ92974 e ABZ96589, para os sorovares Copenhageni, Lai, Hardjo-bovis L550, Hardjo-bovis JB197, Patoc 1 'Ames' e Patoc 1 'Paris', respectivamente), como se pode perceber no alinhamento das seqüências peptídicas (figura 5).



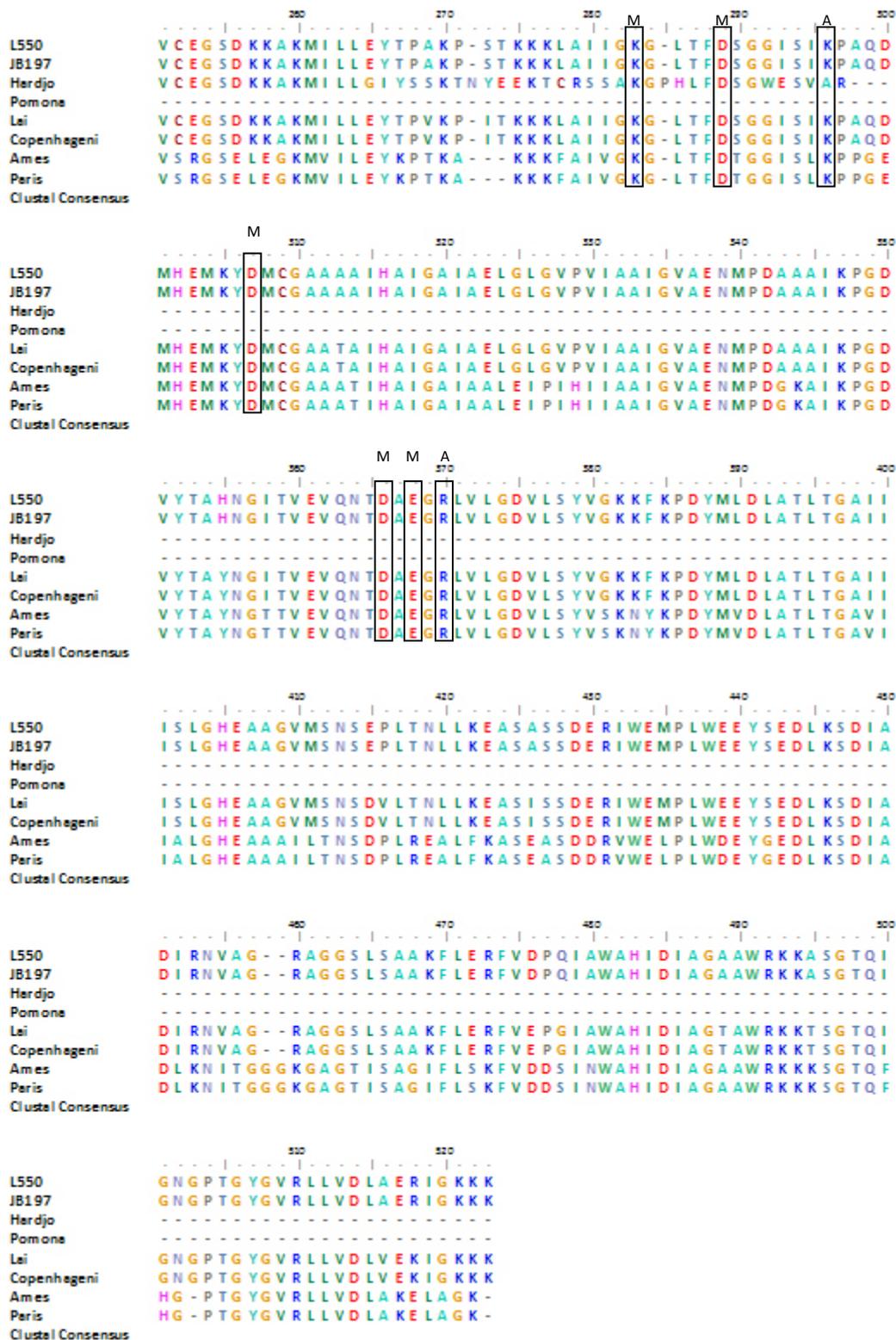


Figura 5. Alinhamento das seqüências peptídicas previstas da tradução do gene *pepA* das espécies *L. interrogans* (sorovares Hardjo, Pomona, Lai e Copenhageni), *L. borgpetersenii* (sorovar Hardjo-bovis linhagens L550 e JB197) e *L. biflexa* (sorovar Patoc 1, linhagens Ames e Paris). Os resíduos essenciais para a ligação do íon metálico (M) e para a atividade catalítica (A) estão evidenciados nas caixas. A seqüência consenso é gerada automaticamente pelo programa Clustal: (\*) significa que os resíduos na coluna são idênticos em todas as seqüências; (:.) significa que ocorreu substituição conservativa, de acordo com a matriz de Dayhoff (DAYHOFF, SCHWARTZ, e ORCUTT, 1978); (.) significa que foram observadas substituições semiconservativas.

## O seqüenciamento parcial indica que a seqüência dos genes obtidos tem identidade com seqüências depositada em bancos de dados.

Quando comparado com seqüências depositadas no GENBANK pelo algoritmo *blastn*<sup>6</sup>, os fragmentos parciais do gene da leucil-aminopeptidase (*pepA*) de *L. interrogans* sorovar Hardjo e Pomona apresentaram 99% de identidade entre os sorovares Lai e Copenhageni e 79% entre as linhagens de *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis. A matriz de identidades obtida pelo aplicativo ClustalW se encontra na tabela 2.

**Tabela 2. Matriz de distância filogenética baseada em mudanças de bases nucleotídicas, calculada pelo algoritmo PROTDIST, da suíte de aplicações PHYLIP, a partir de um alinhamento executado pelo programa ClustalW.** Os valores representam o número esperado de substituições nucleotídicas por sítio, ou, mais indiretamente, o tamanho dos ramos da árvore filogenética entre cada um dos espécimes.

Sorovar ou Linhagem	JB197	L550	Hardjo	Pomona	Lai	Copenhageni	Ames	Paris
<b>JB197</b>	0.000000							
<b>L550</b>	0.000667	0.000000						
<b>Hardjo</b>	0.242976	0.242976	0.000000					
<b>Pomona</b>	0.240272	0.240272	0.010675	0.000000				
<b>Lai</b>	0.218558	0.218558	0.003291	0.007102	0.000000			
<b>Copenhageni</b>	0.216928	0.216928	0.004941	0.005321	0.002028	0.000000		
<b>Ames</b>	0.620968	0.620968	0.775181	0.806945	0.612233	0.611721	0.000000	
<b>Paris</b>	0.620923	0.620923	0.775181	0.806945	0.612202	0.611690	0.000000	0.000000

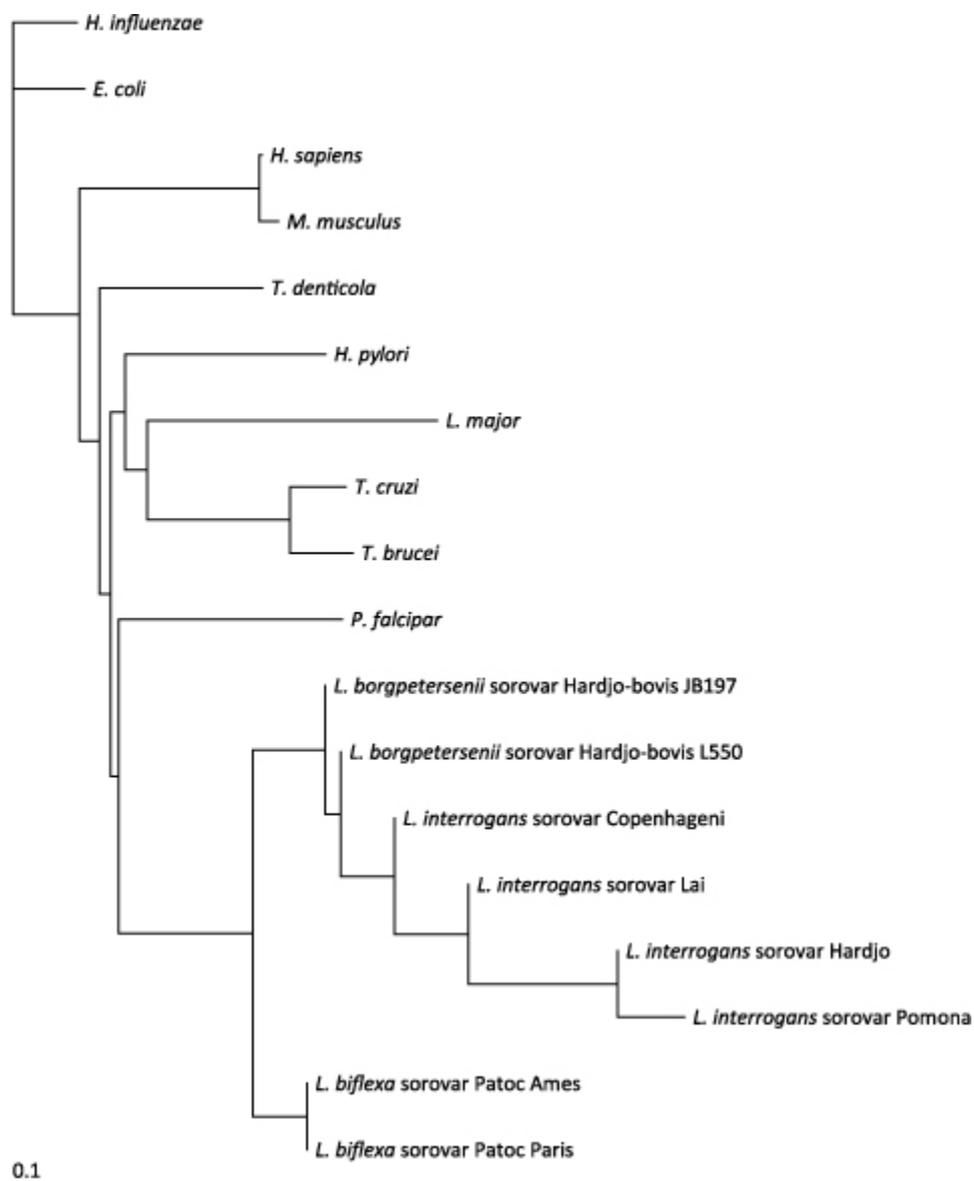
## Análise filogenética baseada na LAP reafirma a classificação atual.

Após o seqüenciamento parcial dos genes de leucil-aminopeptidase clonados dos sorovares Hardjo e Pomonas foi feita a comparação dos dados obtidos com seqüências dessa enzima disponíveis em bancos de dados (GENBANK). Como esperado, as seqüências provenientes dos genes clonados dos sorovares Hardjo e Pomona ficaram agrupados com outros sorovares de *L. interrogans* (Lai e Copenhageni), enquanto as duas linhagens de *L. borgpetersenii* (sorovar Hardjo-bovis,

<sup>6</sup> Acessível em:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&LAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&LAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on).

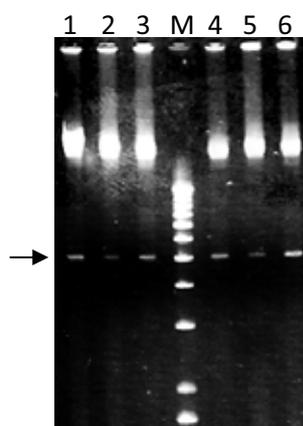
linhagens JB197 e L550) se agruparam em um ramo filogenético mais distante (figura 6), assim como as duas linhagens de *L. biflexa* (sorovar Patoc, linhagens Ames e Paris).



**Figura 6.** Filograma construído pelo método Neighbor-Joining, baseado nas distâncias entre as seqüências parciais do gene *pepA* de *L. interrogans* sorovares Hardjo e Pomona comparadas com as de outros organismos. *L. interrogans* sorovar Copenhageni e Lai (n<sup>o</sup>s de acesso YP\_000715.1 e NP\_713621.1), *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis (n<sup>o</sup>s de acesso YP\_798593.1 e ABJ75481.1), *L. biflexa* sorovar Patoc (n<sup>o</sup>s de acesso ABZ92974.1 e ABZ96589.1), *H. influenzae* (n<sup>o</sup> de acesso AAC23351.1), *E. coli* (YP\_001726686.1), *H. pylori* (n<sup>o</sup> de acesso NP\_207365.1), *T. denticola* (n<sup>o</sup> de acesso NP\_970914.1), *P. falciparum* (n<sup>o</sup> de acesso XP\_001348613.1), *T. cruzi* (n<sup>o</sup> de acesso EAN91071.1), *T. brucei* (n<sup>o</sup> de acesso AAX70152.1), *L. major* (n<sup>o</sup> de acesso CAJ02694.1), *M. musculus* (n<sup>o</sup> de acesso AAK13495.1), *H. sapiens* (n<sup>o</sup> de acesso NP\_056991.2), conforme descrito em material e métodos. A barra de escala corresponde ao número de substituições de resíduos de aminoácidos esperadas por sítio.

## Bactérias BL21-DE3 foram transformadas eficientemente.

Bactérias transformadas por choque térmico selecionadas com ampicilina foram submetidas à extração plasmideal simples por fenol-clorofórmio. A presença de plasmídeo foi observada em gel de agarose 0,8% para todos os clones escolhidos, sugerindo o sucesso da transformação (figura 7). Para excluir a possibilidade de contaminações com o vetor pET19b vazio, os plasmídeos foram testados por PCR, da qual foram obtidos produtos amplificados do tamanho aproximado do gene *pepA* (dados não mostrados).

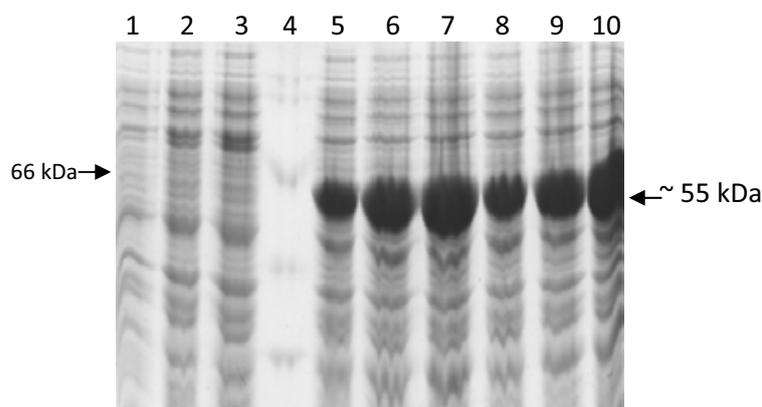


**Figura 7.** Extração plasmideal de bactérias transformadas com os vetores de expressão pET19b+HapepA (poços 1 a 3) e pET19b+PopepA (poços 4 a 6) visualizada em gel de agarose 0,8%. A presença dos plasmídeos (indicados pela seta) confirma a transformação. (M) Marcador de peso molecular 1kb+ DNA Ladder.

## A proteína de 55 kDa já é expressa generosamente após 2 horas de indução.

Uma vez induzidas com IPTG, culturas de bactérias BL21-DE3 que carregavam o vetor de expressão produziram significativa quantidade da proteína de aproximadamente 55 kDa ( $\sim 250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), como constatado por SDS-PAGE realizado para análise do extrato bacteriano total (figura 8). Culturas-controle transformadas com o vetor de expressão vazio não apresentam quantidades detectáveis dessa mesma proteína (figura 8).

Ainda na figura 8, podemos observar que a proteína recombinante foi detectada em quantidades crescentes no extrato total de bactérias cultivadas induzidas com IPTG por diferentes intervalos de tempo (2, 4 e 6 horas).

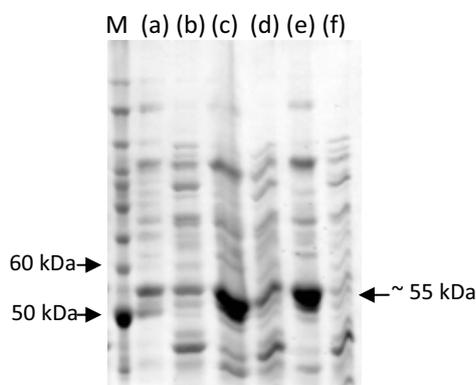


**Figura 8. Padrão de migração do extrato total de colônias transformadas induzidas com IPTG.** Colônias carregando o vetor pET19b vazio (1 a 3), o vetor pET19b-HapepA (5 a 7) e pET19b-PopepA (8 a 10) em SDS-PAGE 10%. Culturas foram induzidas com a mesma concentração de IPTG (0,5 mM) por tempos diferentes a 30 °C: poços 1, 5 e 8 – duas horas de indução; poços 2, 6 e 9 – quatro horas de indução, 3, 7 e 10 – seis horas de indução. Poço 4, marcador de peso molecular SDS 6H (Sigma).

Para melhor adaptarmos o protocolo de produção de proteína recombinante à rotina do laboratório, foi necessário ajustar a temperatura e as concentrações de IPTG utilizadas para induzir as colônias transformadas com os vetores de expressão.

### A proteína é expressa significativamente aos 30 °C.

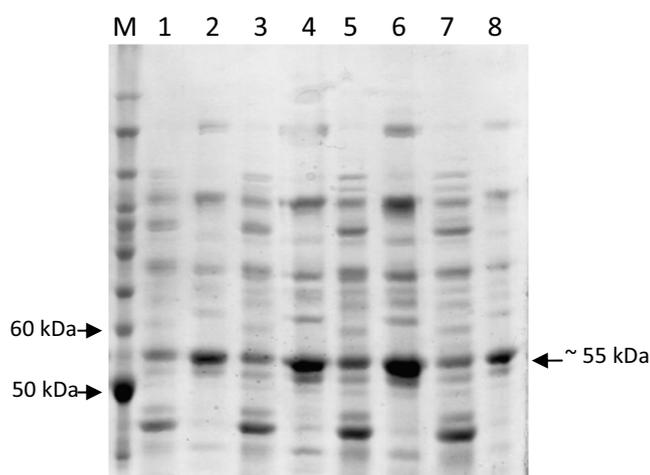
A expressão de proteína recombinante de 55 kDa está diretamente associada à temperatura de incubação das culturas, como indicado pelo acúmulo diferenciado no extrato total de células mantidas sob 20, 30 e 37°C, na figura 9. Apesar de não notificarmos a presença de quantidades apreciáveis de proteína ao induzirmos a colônia a 20 °C por 4 horas, em uma indução por toda a noite essa é a temperatura ideal, pois impede a super-expressão da proteína (fato que poderia acarretar em precipitação indesejada).



**Figura 9. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 8% de colônias induzidas com 0,3 mM de IPTG a diferentes temperaturas por 4 horas.** Poços (a) e (b), 20 °C; (c) e (d), 30 °C; (e) e (f), 37 °C. (b), (d) e (f): frações insolúveis da extração. (M) – marcador de peso molecular *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen). Nota-se um aumento de proteína recombinante expressa durante induções em temperaturas maiores.

## Concentração de IPTG maior que 0,5 mM pode induzir super-expressão da proteína de 55 kDa.

Culturas de bactérias transformadas induzidas com concentrações de 0,1 mM de IPTG produzem quantidades significativas de proteína recombinante, mas um nível mais aceitável de expressão foi obtido quando a concentração de IPTG no meio de cultura foi de 0,3 mM. Concentrações superiores não influenciaram proporcionalmente a expressão da proteína recombinante visualizada em SDS-PAGE (figura 10). Pelo contrário, intrigantemente, observamos grande redução na quantidade de proteína expressa quando a concentração de IPTG no meio chega a 1 mM.



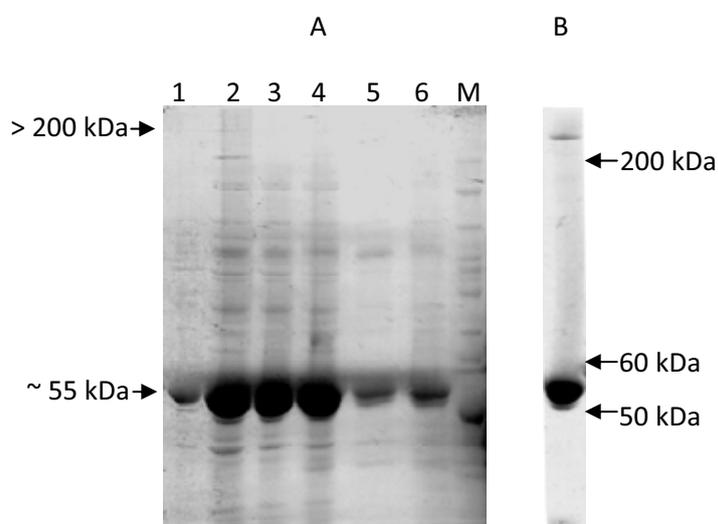
**Figura 10. Padrão de migração das bandas de culturas induzidas com diferentes concentrações de IPTG, a 20 °C por 4 horas, visualizado em SDS-PAGE 8%. (1) e (2), 0,1 mM de IPTG; (3) e (4), 0,3 mM de IPTG; (5) e (6), 0,5 mM de IPTG; (7) e (8), 1 mM de IPTG. Poços (1), (3),(5) e (7) correspondem às frações insolúveis das extrações. (M) *BenchMark™ protein ladder* (Invitrogen).**

A variação nas condições de indução da expressão nos possibilitou refinar o processo de obtenção da proteína recombinante, e, sendo assim, foram adotadas aquelas que resultaram em rendimento maior: temperatura de 20 °C, 0,3 mM de IPTG por 16 horas.

## A recuperação da fração de proteína solúvel é maior após sonicação;

Ciclos de congelamento e descongelamento em tampão de lise não foram suficientes para recuperar quantidades significativas de proteína solúvel quando comparados com os outros métodos (figura 11, poços 1 e 4). Apesar do método de

extração com BugBuster® (Novagen) ter se mostrado eficiente, a sonicação apresentou vantagens no que diz respeito à relação custo/benefício. Além disso, a extração por sonicação demonstrou uma maior recuperação de proteínas de alto peso molecular (que podem corresponder a estruturas quaternárias da enzima recombinante) do que a extração por BugBuster® (figura 11, poço 2 e 5 versus 3 e 6).



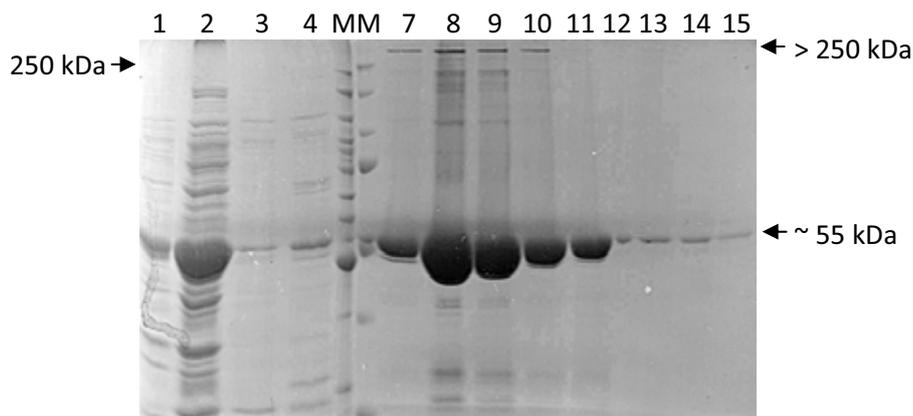
**Figura 11. Comparação entre diferentes técnicas de extração celular.** Em A, os poços contêm a fase solúvel (1, 2 e 3) e insolúvel (4, 5 e 6) das extrações por: (1) e (4), ciclos de congelamento e descongelamento; (2) e (5), sonicação; (3) e (6), BugBuster® (Novagen). Em B, perfil de migração da proteína purificada para comparação da massa esperada de estruturas quaternárias.

### **O extrato solúvel de bactérias induzidas possui atividade sobre o substrato L-Leu-AMC.**

A fração solúvel obtida da lise celular das bactérias de culturas induzidas apresentou atividade leucil-aminopeptidásica, fato não observado com o sobrenadante do extrato celular de culturas transformadas com o vetor pET19b vazio induzidas com as mesmas condições (dados não mostrados).

### ***A proteína recombinante tem boa ligação com a coluna de afinidade à histidina.***

Ao passar pela coluna de níquel, parte significativa da atividade do extrato não ligado à coluna era perdida. Ao ser visualizado em SDS-PAGE, a fração protéica não ligado à coluna de afinidade apresentou uma diminuição expressiva de proteína com massa de 55 kDa, quando comparado com o extrato total (figura 12).



**Figura 12. Visualização em SDS-PAGE 8% das frações obtidas durante o processo de purificação em cromatografia de afinidade em coluna de níquel.** (2) extrato total (previamente aplicação na coluna); (1) fração não ligada; (3) fração coletada após passagem de tampão de ligação (5 mM de imidazol); (4) fração coletada após passagem de tampão de lavagem (100 mM de imidazol); (7) a (15), frações eluídas com tampão de eluição (300 mM de imidazol). (M) marcadores de peso molecular *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen) e *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad), da esquerda para a direita.

### **A força de ligação entre proteína e a resina carregada com níquel suporta concentrações de até 100 mM de imidazol.**

Apesar de parte da proteína com massa de 55 kDa se desligar da coluna com afinidade por histidina durante a passagem do tampão de lavagem com 100 mM de imidazol, a relação entre contaminantes e quantidade de proteína purificada mostrou-se mais do que satisfatória para a continuidade dos experimentos (figura 12). Concentrações de imidazol superiores a essa no tampão de lavagem aumentaram significativamente a quantidade de proteína recombinante desligada da coluna nessa etapa (dados não mostrados).

### **Frações eluídas da coluna de níquel continham uma proteína de massa molecular superior a 250 kDa.**

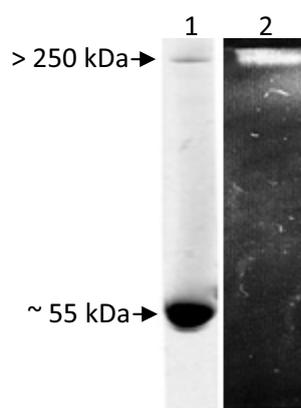
A análise em SDS-PAGE 9% das proteínas eluídas da coluna de níquel mostrou um padrão de migração com duas bandas principais relacionadas com a enzima recombinante, uma de aproximadamente 55 kDa e outra com mais de 250 kDa (figura 12).

## O imidazol presente no tampão de reação não influencia na atividade sobre o substrato fluorogênico.

A atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico L-Leu-AMC foi mantida nas frações eluídas com 300 mM de imidazol, que por sua vez não exerceu influência na quantidade de fluorescência do AMC livre liberado pela atividade da enzima recombinante em várias concentrações testadas (dados não mostrados). O imidazol, quando co-incubado com o substrato L-Leu-AMC e sob excitação de luz UV a 380 nm não apresentou fluorescência significativa e, portanto, sua presença ou ausência na reação não parece alterar os dados obtidos pela leitora de placas (dados não mostrados).

## A atividade leucil-aminopeptidásica da enzima recombinante depende de sua estrutura quaternária.

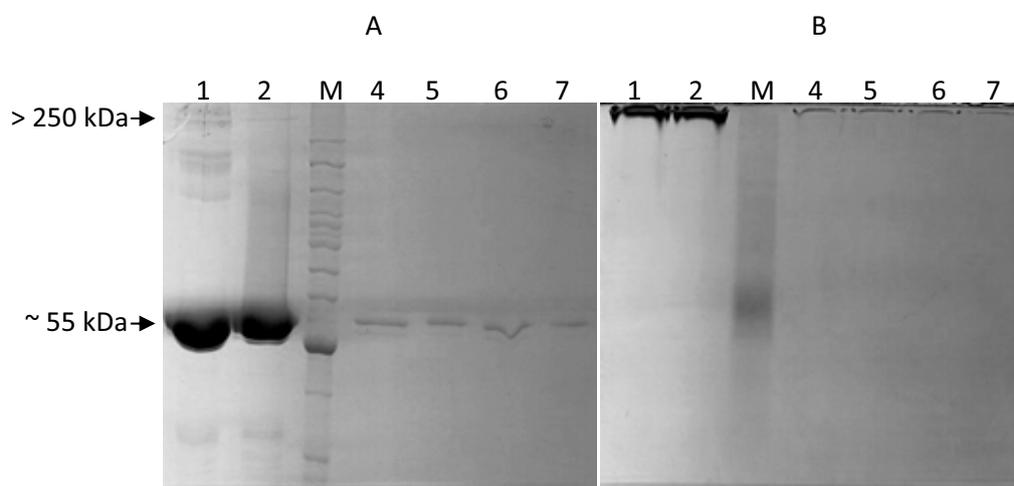
Quando visualizada em gel de poliacrilamida, a atividade enzimática da leucil-aminopeptidase foi atribuída somente à banda de peso molecular superior a 250 kDa (figura 13). Adicionalmente, isolamos a forma oligomérica da enzima por cromatografia líquida e rápida de proteínas (FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography), utilizando uma coluna de filtração em gel. Como resultado, frações com massa molecular estimada em 320 kDa possuíram atividade sobre o substrato L-Leu-AMC (dados não mostrados), sugerindo se tratar de uma estrutura hexamérica.



**Figura 13. Atividade leucil-aminopeptidásica em gel SDS-PAGE.** No poço (1), o gel foi corado com azul de Coomassie. Poço (2), visualização sob incidência de luz ultra-violeta do gel, lavado e incubado em tampão de reação previamente à adição do substrato fluorogênico L-Leu-AMC. A atividade foi atribuída à forma oligomérica da enzima recombinante HaLAP.

## A estrutura oligomérica da leucil-aminopeptidase recombinante se desfaz parcialmente quando submetida à migração em sistema de SDS-PAGE.

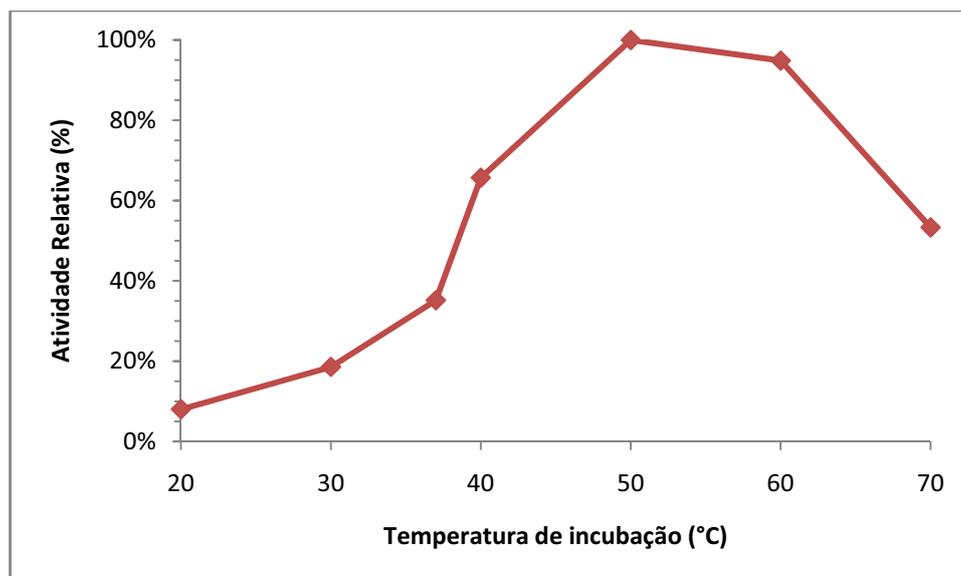
Mesmo as primeiras frações que apresentam atividade ao sair da coluna de filtração em gel se apresentam como monômeros de 55 kDa quando visualizadas em SDS-PAGE (figura 14 A, poço 4). Entretanto, em sistema de eletroforese não-desnaturante, as amostras parecem possuir uma massa molecular superior, quando comparadas com o marcador *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen), sugerindo a interferência do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) na estrutura quaternária da proteína (figura 14).



**Figura 14.** Comparação entre o padrão de migração da enzima recombinante HaLAP em sistema de eletroforese desnaturante (A) e não desnaturante (B) com 9% de acrilamida. Poços (1) e (2), enzima purificada em coluna de níquel; poços (4) a (6), enzima purificada em coluna de filtração em gel. Amostras (2), (5) e (7) foram previamente fervidas antes da aplicação nos géis. Em (M), marcador de peso molecular *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen).

## A enzima recombinante possui propriedades termofílicas.

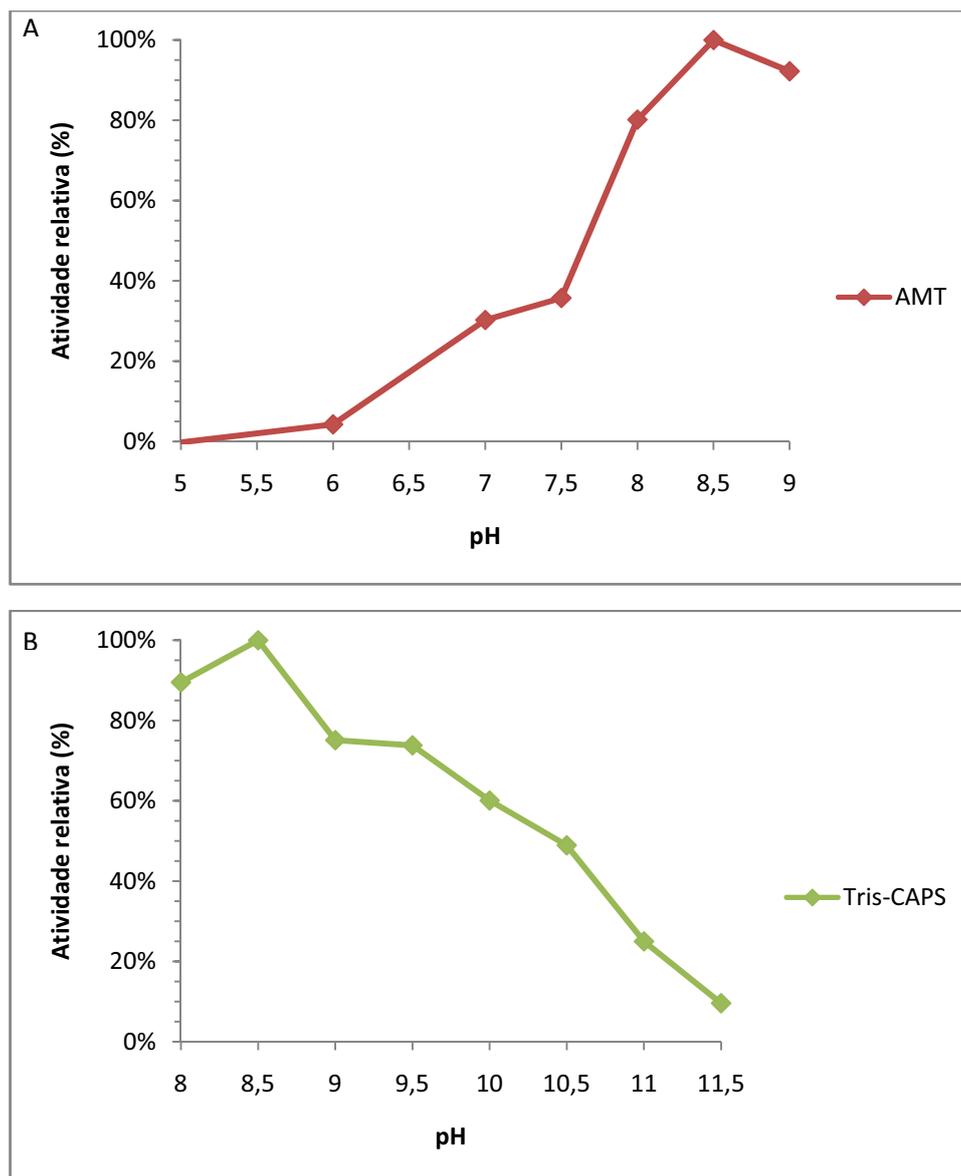
Na caracterização da atividade enzimática da proteína recombinante, foram investigados vários fatores, entre eles a temperatura ótima de atividade. Os resultados obtidos apontam para maior atividade da enzima entre 50 e 60°C, como verificado pela incubação da reação de hidrólise do substrato L-Leu-AMC em diferentes temperaturas (figura 15).



**Figura 15.** Efeito da temperatura na atividade média relativa da enzima recombinante HaLAP (Leucil-aminopeptidase de *L. interrogans* sorovar Hardjo). O substrato fluorogênico L-Leu-AMC foi adicionado após as amostras atingirem a temperatura indicada, e a reação interrompida após 10 minutos com a adição de etanol absoluto, como descrito em material e métodos.

### **A leucil-aminopeptidase recombinante possui atividade ótima em pH alcalino.**

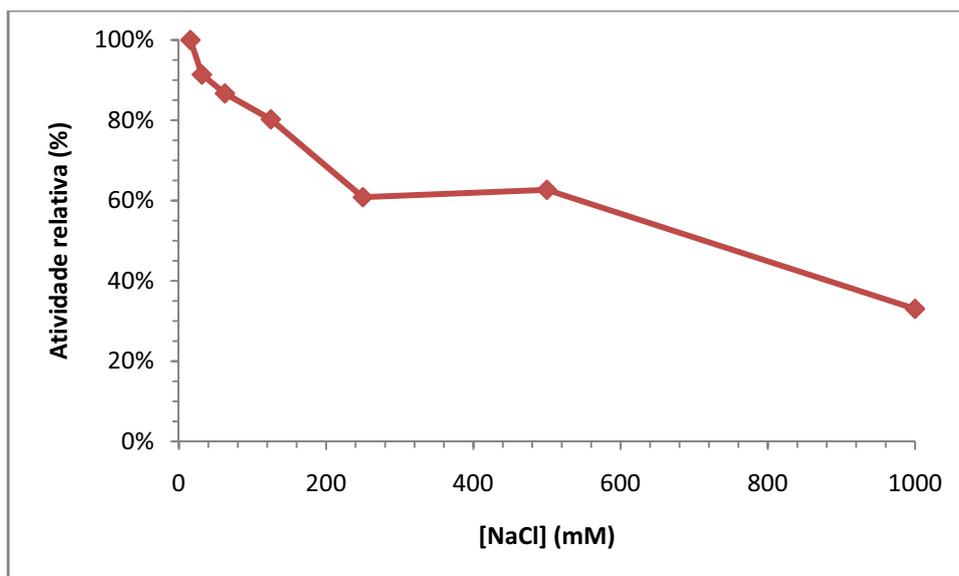
Um ensaio de atividade enzimática em diferentes faixas de pH pôde esclarecer quanto ao pH de atividade ótima da enzima. Quando incubada tanto em tampão AMT (Acetato 50 mM, MES 50 mM e TRIS 100 mM) quanto Tris-CAPS 100 mM (figura 16) a atividade da enzima aumentou na medida em que o pH se aproximava de 8,5. Ao estender as faixas analisadas para pHs mais básicos em tampão Tris-CAPS, a atividade voltou a decrescer.



**Figura 16. Atividade média relativa da atividade da enzima recombinante HaLAP sobre o substrato fluorogênico L-Leu-AMC em sistemas-tampão com pH diferentes.** Em 'A', atividade enzimática mediante incubação em tampão AMT (Ácido acético 50 mM, MES 50 mM e Tris 100 mM). Em B, atividade da enzima incubada em tampão Tris-CAPS (Tris 100 mM, CAPS 100 mM).

### **O aumento da força iônica no tampão de reação resulta em decréscimo da atividade enzimática.**

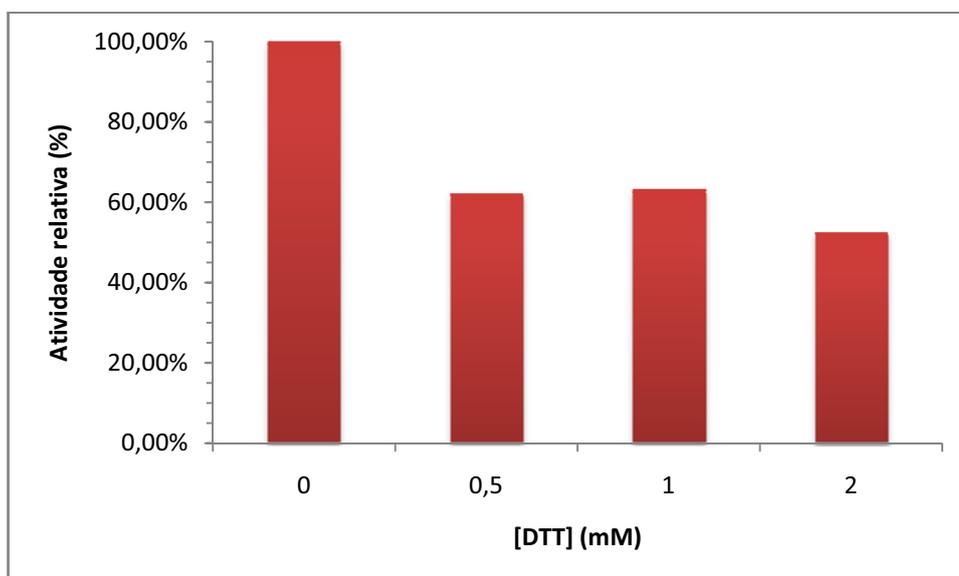
Uma diluição seriada de NaCl em tampão de reação Tris-CAPS com molaridade constante permitiu a análise do papel da interação de íons livres com a proteína recombinante na velocidade da reação enzimática. Quantidades crescentes de NaCl perturbaram o conjunto catalítico de tal forma que a taxa de hidrólise do substrato fluorogênico diminuiu (figura 17).



**Figura 17. Influência da força iônica na atividade média relativa da enzima recombinante HaLAP.** A enzima foi incubada por 10 minutos em tampão Tris-CAPS com diferentes concentrações de NaCl, e sua atividade foi aferida logo após a adição do substrato fluorogênico L-Leu-AMC na reação.

### Influência de agente redutor.

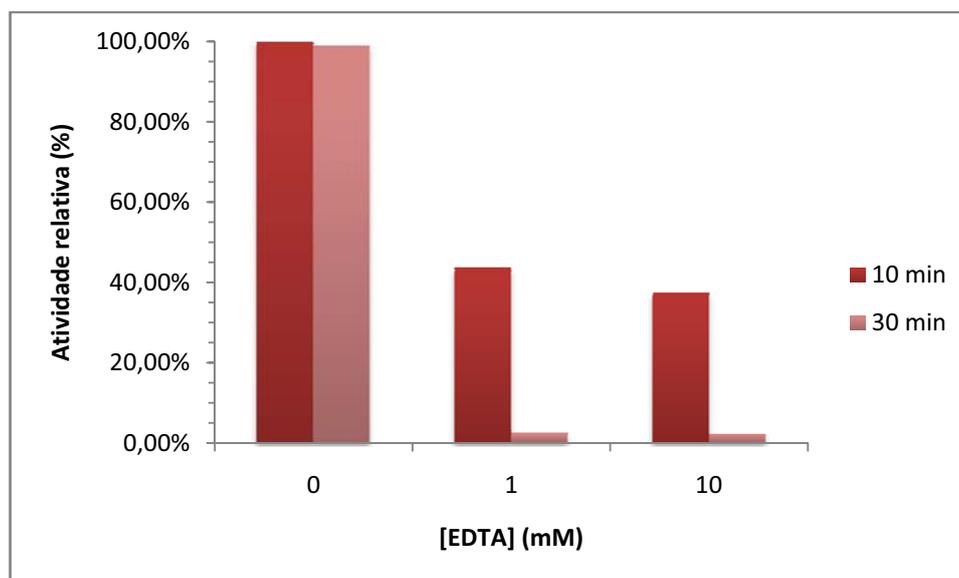
A enzima teve sua atividade diminuída com a adição de DTT no tampão de reação, em qualquer uma das concentrações avaliadas (2, 1 e 0,5 mM), como podemos ver na figura 18.



**Figura 18. Influência do agente redutor ditioneitol (DTT) na atividade média relativa da enzima recombinante HaLAP.** A enzima foi incubada em tampão Tris-CAPS com concentrações diferentes de DTT, como indicado, por 10 minutos antes da adição do substrato fluorogênico L-Leu-AMC.

## Inibição por EDTA.

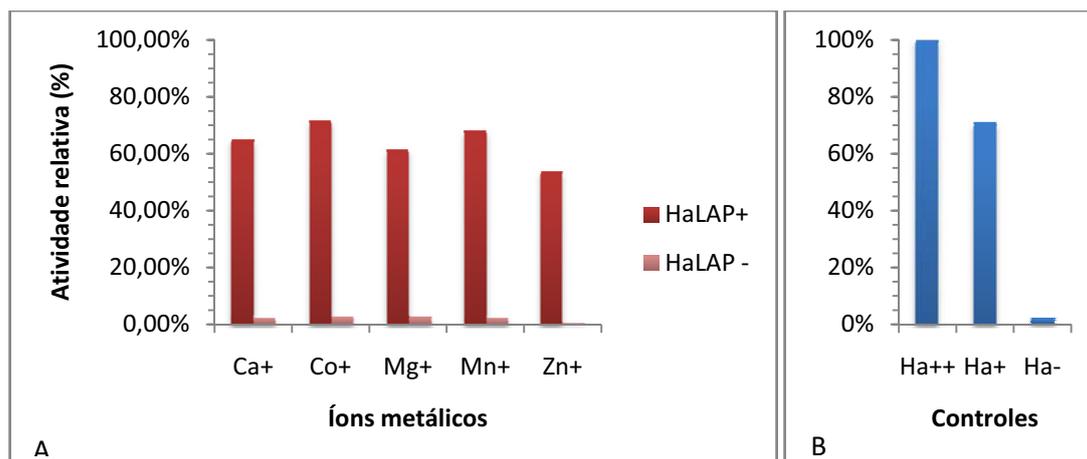
O EDTA é um conhecido agente quelante de íons, e, portanto, é amplamente utilizado como inibidor de metaloproteases. Em um ensaio com diferentes concentrações de EDTA, e diferentes tempos de incubação, a enzima recombinante teve sua atividade reduzida em mais de 50%, em ambas as concentrações testadas por 10 minutos, e atividade abolida quando o tempo de incubação foi de 30 minutos (figura 19).



**Figura 19. Inibição da enzima recombinante HaLAP por EDTA.** A enzima foi incubada em tampão Tris-CAPS com diferentes concentrações de EDTA, como indicado, por 10 minutos previamente à adição do substrato fluorogênico L-Leu-AMC.

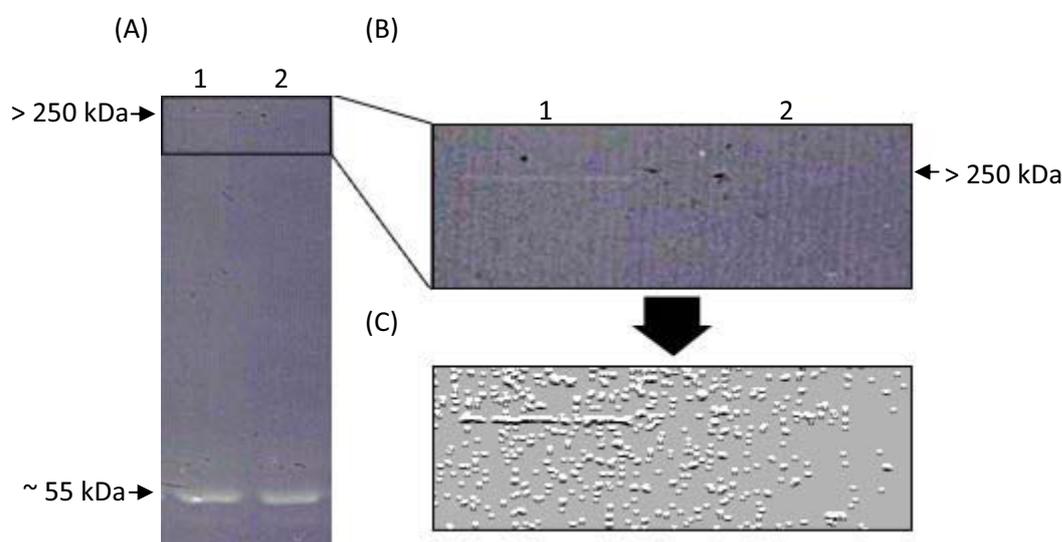
## Influência de íons na atividade enzimática

As aminopeptidases da família M17 possuem dois sítios de ligação ao zinco, um dos quais pode ser substituído por outros íons. Para avaliar a participação de íons metálicos na taxa de atividade da HaLAP recombinante, foi promovido um ensaio utilizando a enzima inibida com EDTA (apoenzima), seguida por diálise extensiva, com a adição de cálcio, cobalto, magnésio, manganês e zinco. Também foi averiguado se os íons poderiam alterar a atividade da enzima não-inibida (holoenzima), sem prévia adição de EDTA. Como resultado, nenhum íon foi capaz de restabelecer ou modular ou restaurar a atividade da enzima recombinante, com exceção do zinco, que pareceu exercer uma leve ação inibitória (figura 20).



**Figura 20. Influência de íons metálicos na atividade da enzima recombinante HaLAP, previamente induzida ou não por EDTA.** Em (A), enzima previamente inibida (HaLAP-) ou não (HaLAP+) e submetida a processo de diálise intensiva por toda a noite em tampão de reação (Tris 25 mM, pH 8,5) foi pré-incubada por 10 minutos com 0,4 mM dos íons indicados antes da adição do substrato fluorogênico L-Leu-AMC. Em (B), os controles utilizados: Ha++, enzima não inibida e não dializada; Ha+, enzima não inibida e dializada; Ha- enzima inibida e dializada. A leitura dos resultados se procedeu como descrita em material e métodos.

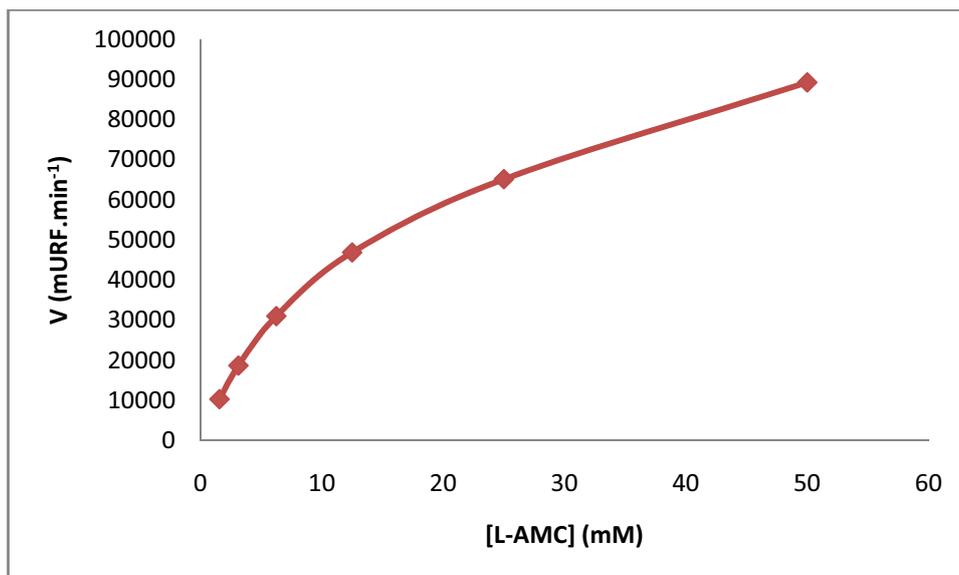
Quando visualizadas em SDS-PAGE, amostras previamente inibidas apresentam apenas uma banda correspondente ao monômero de 55 kDa, enquanto que as não inibidas apresentam tanto a banda correspondente ao monômero quanto a atribuída ao oligômero (figura 21).



**Figura 21. Comparação do perfil eletroforético da enzima recombinante HaLAP inibida ou não por EDTA.** As amostras utilizadas para as reações do experimento da influência dos íons metálicos foram aplicadas em gel SDS-PAGE 8%, sem prévia fervura, para visualização da forma oligomérica (A). Nestas condições, apenas a amostra não inibida (poço 1) apresentou a banda de peso molecular superior a 250 kDa, enquanto que a amostra inibida (poço 2) apresentou-se apenas como monômero. Em (B), uma aproximação da seção indicada em (A). (C) corresponde à imagem (B) com aplicação de um filtro para melhor visualização da banda correspondente ao oligômero.

### Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ).

A incubação da enzima com um gradiente de concentrações do substrato possibilitou a extrapolação da quantidade necessária de L-Leu-AMC para a enzima atingir metade de sua velocidade máxima (figura 22). Valores mais precisos da constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima foram obtidos por meio de regressão linear pelos métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Woolf.



**Figura 22. Curva de saturação da enzima recombinante HaLAP.** A enzima foi incubada em tampão de reação contendo Tris-HCl 25 mM, pH 8,5, por 10 minutos anteriormente a adição do substrato L-Leu-AMC em diferentes concentrações, como descrito em material e métodos. A extrapolação da velocidade máxima da reação possibilita a aproximação do valor da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).

As fórmulas utilizadas na regressão encontram-se a seguir:

$$\text{Lineweaver-Burk: } 1/V_0 = (K_M/V_{max}) \cdot (1/S) + 1/V_{max}$$

$$\text{Eadie-Hofstee: } V_0 = -K_M \cdot (V_0/S) + V_{max}$$

$$\text{Woolf: } S/V_0 = (S/V_{max}) + (K_M/V_{max})$$

Os valores obtidos em cada regressão estão na tabela 3.

**Tabela 3. Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ) da enzima recombinante HaLAP durante a hidrólise de L-Leu-AMC, de acordo com os três métodos de regressão mais utilizados. O valor de  $R^2$  representa a confiabilidade da regressão.**

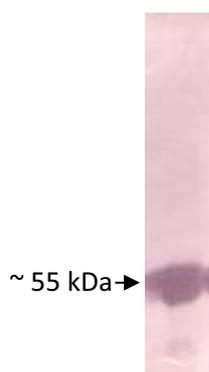
Tipo de Regressão	$K_M^*$	$V_{max}^{**}$	$R^2$
Lineweaver-Burk	13,9	102378,8	0,999
Eadie-Hofstee	15,4	109727,1	0,976
Woof	17,6	117828,1	0,992

\* A unidade de  $K_M$  é dada em  $\mu\text{M}$ ;

\*\* Provisoriamente,  $V_{max}$  encontra-se em miliunidades relativas de fluorescência por minuto, até obtermos uma curva de calibração de AMC livre adequada.

### A leucil-aminopeptidase recombinante de *Leptospira interrogans* é imunogênica em camundongo

Quando submetidos a desafios intra-dérmicos, camundongos fêmeas isogênicas do tipo Swiss produziram soro  $\alpha$ -HaLAP que reconheceram uma única banda de 55 kDa em Western-Blot, como verificado na figura 23.



**Figura 23. Imunoblot realizado com o soro anti-HaLAP produzido em camundongo.** Extrato total de bactérias BL21 induzidas foi separado em SDS-PAGE 8% e posteriormente transferido para membrana de nitro-celulose e revelado como descrito em material e métodos.

Discussão

---

# Discussão

---

## **Comparação da atividade proteolítica entre sorovares patogênicos e não-patogênicos de bactérias do gênero *Leptospira*.**

Dados não publicados obtidos em 2005 pelos professores Silene Lozzi, Marcos Heinemann e Jaime Santana, demonstraram que extratos de sorovares de *Leptospira interrogans* patogênica apresentavam, diferentemente de alguns não-patogênicos, atividade proteolítica na hidrólise do substrato fluorogênico L-Leu-AMC. Tal substrato é normalmente clivado por aminopeptidases capazes de reconhecer e remover resíduos do aminoácido leucina de pequenos peptídeos. Baseados nessas informações, e com o objetivo de identificar os genes responsáveis pela produção de proteases com essa característica, realizamos uma busca nos genomas publicados de *Leptospira interrogans*. A busca resultou em seis aminopeptidases preditas, em ambos os sorovares (Lai e Copenhageni), das quais duas eram relacionadas com atividade leucil-aminopeptidásicas – uma aminopeptidase N e uma leucil-aminopeptidase (LAP).

De modo a obter quantidade razoável de proteína recombinante para sua caracterização bioquímica e molecular, optamos pela expressão heteróloga da proteína classicamente atribuída à atividade leucil-aminopeptidásica em outros organismos, codificada pelo gene *pepA*.

## **Implicações na detecção do gene *pepA*.**

Os resultados preliminares obtidos da reação de polimerase em cadeia utilizando como molde o material genético cedido pelo professor Dr. Marcos Heinemann sugeriram a ausência do gene responsável pela produção da LAP nas espécies não-patogênicas (saprofíticas) de *Leptospira* (*L. biflexa* sorovar Patoc), quando comparada com outros sorovares (*L. interrogans* sorovar Hardjo, Pomona e Icterohaemorrhagiae), como observado na Fig. 1. Contudo, o recente seqüenciamento do genoma de *L. biflexa* (Picardeau *et alii*, 2008) identificou um gene que codifica uma LAP com 58% de identidade e entre 75% e 76% de similaridade com as LAPs de outros sorovares previamente seqüenciados (*L. interrogans*, sorovares Copenhageni e Lai e *L.*

*borgpetersenii*, sorovar Hardjo-bovis). Tal identidade é menor em alinhamentos baseados na seqüência de nucleotídeos, o que nos leva a refletir que as mutações que resultaram na divergência evolutiva entre estas espécies talvez possam ter ocorrido de modo a selecionar substituições redundantes para os aminoácidos mais importantes na estrutura da enzima. Em um instante no qual a proteína não exercesse o mesmo papel de sua ancestral, mutações subseqüentes poderiam ter levado à perda da atividade leucil-aminopeptidásica verificada no sorovar Patoc. Por outro lado, nos sorovares patogênicos, as mutações podem ter sido selecionadas de modo a refinar essa atividade em um ambiente em que fosse fundamental, gerando as diferenças observadas na seqüência nucleotídica entre as espécies. Tal modelo é suportado por Picardeau e colaboradores (2008), quando afirmam que, enquanto a espécie saprofítica *L. biflexa* possui um genoma “mais denso”, a espécie *L. borgpetersenii* apresenta regiões erodidas por elementos de inserção, levando a uma perda da funcionalidade e conseqüentemente à restrição dessa espécie em hospedeiros mamíferos. Já o maior tamanho do genoma na espécie *L. interrogans*, provavelmente reflete a incorporação de novas informações genéticas responsáveis pela sobrevivência dessa espécie tanto em hospedeiros mamíferos quanto em ambientes aquáticos.

Outro fato importante a se considerar, é o de que leptospiros perdem seu fenótipo de virulência quando submetidas a passagens seqüenciais em meios de cultura (Haake *et alii*, 1991). Portanto, a falta de atividade leucil-aminopeptidásica pode estar relacionada ao tempo de manutenção dos diferentes isolados submetidos ao teste proteolítico, e não à ausência de uma LAP funcional. Estudos com linhagens isoladas de tecidos, ao invés de culturas *in vitro*, podem ajudar a elucidar essa questão.

### **Inferências sobre a possível expressão diferencial da leucil-aminopeptidase de *Leptospira spp.***

Dentre dois estudos com microarranjos (Lo *et alii*, 2006; Matsunaga *et alii*, 2007), os quais avaliaram os genes de *L. interrogans* que sofreram regulação sob mudanças na temperatura e na osmolaridade, respectivamente, não há referência ao gene *pepA*, o que indica que provavelmente esse gene não seja regulado por nenhum desses fatores nas condições testadas. Resta averiguar se as demais interações entre o

parasito e o hospedeiro são capazes de modular significativamente a expressão desse gene, ou se o mesmo é expresso indiscriminadamente tanto em bactérias de culturas *in vitro* quanto nas de tecidos animais.

Nally e colaboradores (Nally *et alii*, 2005) detectaram mudanças na composição do antígeno O-lipopolissacarídico (Oag) entre infecções crônicas e agudas com o uso de anticorpos monoclonais específicos. A quantidade de Oag diminuiu em bactérias estabelecidas na fase crônica da doença em porcos da Índia em relação à de bactérias atenuadas por múltiplas passagens *in vitro*. Utilizando ratos como modelos, não foi observada tal diferença, sugerindo que a regulação da síntese de Oag por *Leptospira* deve ser hospedeiro-específica. De fato, muitos outros genes devem ser modulados pela relação íntima e específica entre a bactéria e o hospedeiro infectado, já que os animais podem ser tanto hospedeiros de manutenção para alguns sorovares quanto hospedeiros incidentais para outros (Levett, 2001). Assim, o anti-soro desenvolvido contra a proteína recombinante HaLAP poderá ser utilizado para detectar em que condições a enzima nativa é expressa em bactérias do gênero *Leptospira*, ou se essa expressão decai quando as bactérias são submetidas à passagens de culturas seqüenciais. Esse anti-soro poderá ainda ser utilizado para ensaios de imunohistoquímica, possibilitando a avaliação da expressão da proteína de um sorovar específico em diferentes modelos de infecção (camundongo, rato, hamster).

### **A LAP de *Leptospira interrogans* faz parte da família M17 de metaloproteases.**

A seqüência do gene responsável pela codificação da provável aminopeptidase citosólica de *L. interrogans* depositado no banco de dados GenBank possui uma região com grande homologia ao domínio conservado da família M17 das metaloproteases, como identificada no banco de dados CDD (do inglês Conserved Domain Database, Marchler-Bauer *et alii*, 2007). De acordo com o banco de dados MEROPS, essa família é conhecida por conter exopeptidases dependentes de zinco ou de manganês, incluindo as leucil-aminopeptidases. Ainda, catalisam a remoção de aminoácidos da região N-terminal de polipeptídeos, e se diferem das aminopeptidases da família M1 por não possuírem o motivo HEXXH no sítio de ligação ao metal. Além disso, são em

sua maioria hexaméricas e se ligam a dois cátions, enquanto que as da família M1 são monoméricas e se ligam apenas a um cátion. Uma vez expressa, a existência da proteína passa de predita para comprovada por evidências funcionais.

### **Os resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade catalítica são conservados entre espécies representantes de *Leptospira* e outras.**

Um alinhamento pelo algoritmo *ClustalW* com seqüências do banco de dados *UniProt KB* revelou grande conservação dos resíduos essenciais para a ligação dos íons metálicos e para a atividade catalítica, tanto entre os sorovares distintos de *Leptospira* quanto entre outras espécies também analisadas (todas as que compõe a análise filogenética da figura 6, dados não mostrados). Este fato sugere que a LAP dos sorovares Patoc pode ser ativa, embora não se possa desconsiderar que alguma alteração na seqüência peptídica possa alterar o dobramento necessário para que os resíduos essenciais formem o sítio ativo ou de ligação aos íons metálicos, influenciando a atividade. Se isso for comprovado, a posterior modelagem dessas enzimas poderá elucidar sobre quais os resíduos de aminoácidos são importantes para a conservação da estrutura catalítica. Alternativamente, outros estudos devem ser realizados para desvendar o motivo da ausência de atividade leucil-aminopeptidásica nos sorovares não patogênicos de *Leptospira*.

### **Parâmetros de indução e expressão da enzima recombinante HaLAP.**

A formação de corpos de inclusão na expressão heteróloga de proteínas recombinantes é comum, e entre os fatores que desencadeiam isso estão o mau dobramento da proteína, causado pela exposição de resíduos hidrofóbicos ou pela ausência de processamento pós-traducional em sistemas de expressão procariontes; a super-expressão, que acarreta em precipitação por saturação; e outras condições, como, por exemplo, o microambiente em que a proteína é dobrada e a velocidade da produção da proteína, muitas vezes regulada pela taxa metabólica da bactéria (Ventura e Villaverde, 2006). O controle das condições de expressão, portanto, pode inibir a formação de corpos de inclusão (Strandberg e Enfors, 1991; Wang *et alii*, 2007).

Para evitar que a expressão da enzima resultasse na formação de corpos de inclusão, a temperatura, a concentração de IPTG e o tempo de indução foram controlados. Em todas as condições a proteína foi recuperada na forma solúvel, provavelmente por se tratar de uma enzima de origem procarionte. No entanto, notou-se a precipitação da proteína quando o tempo de indução foi superior a 16 horas, ou quando pouco tampão de lise era empregado durante a sonicação (numa proporção de 1:5 mL de cultura), sugerindo que o meio pudesse estar saturado devido à grande quantidade de proteína expressa. A enzima também se precipitou durante o armazenamento a -20 °C, fato contornado pela adição de glicerol numa concentração final de 15%.

Outro fato a se observar é a redução da quantidade de proteína recombinante presente em culturas com 1 mM de IPTG. Talvez a super-expressão induzida por tal concentração de IPTG tenha causado citotoxicidade nas bactérias BL21-DE3, o que poderia levar a uma seleção de indivíduos que por algum motivo (plasmídeo hiper-enovelado, por exemplo) não expressaram quantidades prejudiciais da proteína.

### **A atividade peptidolítica da leucil-aminopeptidase recombinante de *Leptospira interrogans* depende de sua estrutura oligomérica.**

O ensaio de atividade enzimática em gel indica que a forma ativa da enzima recombinante HaLAP se encontra como uma estrutura oligomérica assim como outras LAPs descritas na literatura. De fato, as anotações (*UniProt KB*, *NCBI*, *MEROPS*)<sup>7</sup> sobre a família M17 das metaloproteases a classificam como um homo-hexâmero composto de um dímero de trímeros.

A leucil-aminopeptidase bovina, uma das primeiras caracterizadas, é fisiologicamente ativa como um hexâmero (Burley *et alii*, 1990), cuja estrutura é mantida por meio de pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals. É provável que a LAP recombinante de *L. interrogans* também seja mantida como um hexâmero por tais interações, já que sua visualização em géis de eletroforese depende da temperatura e da presença ou não de SDS (dados não mostrados e figura 14,

---

<sup>7</sup> Acesso em: <http://beta.uniprot.org/uniprot/P68767>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=48344>  
<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=M17>.

respectivamente), mas não da presença de agentes redutores como  $\beta$ -mercaptoetanol ou ditioneitol (dados não mostrados).

Igualmente, a LAP de três espécies patogênicas de *Leishmania* (Morty e Morehead, 2002), a de *Plasmodium falciparum* (Stack et alii, 2007) e a de *Helicobacter pylori* (Dong et alii, 2005) também têm suas atividades relacionadas à suas estruturas hexaméricas.

### **Parâmetros cinéticos da leucil-aminopeptidase recombinante de *L. interrogans*.**

#### **O pH ótimo de atividade da enzima recombinante HaLAP é 8,5.**

O uso de sistemas-tampão com mais de um componente em ensaios de atividade para averiguação do pH ótimo de atividade de enzimas é comum, tanto para garantir que tamponem em todas as faixas desejáveis quanto para garantir a manutenção de uma força iônica constante. Dentre os mais utilizados, está o AMT (ácido acético 50 mM, MES 50 mM, e Tris 100 mM), com ampla faixa de tamponamento (pHs 3 a 9, podendo se estender com alguma confiabilidade). Foi este o sistema utilizado nos estudos com leucil-aminopeptidases de *Helicobacter pylori* (Dong et alii, 2005) e *Leishmania* (Morty e Morehead, 2002), por exemplo.

Por ter essas qualidades, o tampão AMT foi o escolhido para os ensaios de pH da LAP de *Leptospira interrogans*. No entanto, na faixa de pH testada, houve uma aberração na qual a fluorescência emitida era muitas vezes maior em pH 10, fato que fez com que a curva se descaracterizasse. Esse empecilho fez com que fosse adotado um novo sistema-tampão, o Tris-CAPS (100 mM), que poderia atuar bem nas faixas de pH mais básicas (7 a 11). O novo tampão nos permitiu avaliar que a emissão de fluorescência fora de escala observada quando a enzima foi incubada em tampão AMT pH 10 tratava-se, realmente, de uma anomalia. As curvas correspondiam entre si, em termos de atividade relativa, e o pH ótimo em ambos os tampões foi 8,5.

No entanto, em termos de atividade absoluta, o rendimento observado pela enzima em tampão AMT era muito aquém ao do Tris-CAPS, e os valores das duas

curvas não se sobrepujam. Pensamos tratar-se de uma diferença ocasionada pela diferente força-iônica entre os tampões. Em busca de um novo sistema-tampão, que abrangesse as faixas de pH 5 a 10, nos deparamos com o fato de que o MES presente no tampão AMT é um agente quelante de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ , e que, portanto, não é aconselhável para estudos com enzimas ativadas por metal (Ellis e Morrison, 1982). No mesmo artigo, os autores fornecem duas fórmulas adaptadas para a linguagem de programação BASIC, já ultrapassada e sem compiladores atuais, para o cálculo da força iônica em sistemas-tampão de dois e três reagentes. Foi realizada a adaptação dos programas para a linguagem Perl, muito mais difundida atualmente, e amplamente utilizada em programas de bioinformática. Os códigos para os programas encontram-se nas tabelas em anexo (tabelas 4 e 5).

O uso do aplicativo possibilitou calcular a força iônica do tampão Tris-CAPS que vinha sendo utilizado, e, surpreendentemente, a mesma variava em até 90%. Afortunadamente, em nenhum momento a força iônica ultrapassou 0,1 M, o que significa que no máximo as taxas de fluorescência obtidas do ensaio enzimático foram superestimadas em direção ao pH 9 (faixa na qual ocorre a menor força iônica), não alterando o fato de que o pH ótimo da enzima é realmente 8,5. Os dados obtidos do teste da influência da força iônica corroboram essa afirmação, uma vez que para se ter uma queda de 30% da atividade (para que a mesma se equiparasse à de pH 9) seria necessária a adição de cerca de 200 mM de NaCl à solução de reação, algo em torno de três vezes mais do que o suficiente para normalizar a força iônica em 0,1 M. O pH ótimo da HaLAP recombinante encontra-se na mesma faixa de pH de outras enzimas dessa família estudadas recentemente (Stack *et alii*, 2007; Dong *et alii*, 2005; Morty e Morehead, 2002).

### **A LAP de *L. interrogans* é termofílica.**

Quando incubada em diferentes temperaturas, a LAP recombinante de *L. interrogans* sorovar Hardjo teve atividade máxima entre 50 °C e 60 °C, mantendo mais de 50% de sua atividade quando incubada a 70 °C (figura 15). Curiosamente, bactérias do gênero *Leptospira* não são termófilas. Entretanto, outras bactérias não-termófilas também apresentam aminopeptidases termofílicas, como aminopeptidase T de

*Borrelia burgdorferi* (Bertin, 2005) e a aminopeptidase S de *Bacillus subtilis* (Motoshima *et alii*, 1997). Em *Vibrio proteolyticus* (*Aeromonas proteolytica*), a leucil-aminopeptidase é regulada pós-transcricionalmente pela temperatura. A 70 °C, seu precursor de 43 kDa é processado em ambas as extremidades, conferindo uma termoestabilidade notável à forma ativa de 32 kDa (Guenet, Lepage e Harris, 1992).

De fato, a existência de enzimas termoestáveis em bactérias não-termófilas está de acordo com postulações sobre a origem de bactérias e de outros procariotos a partir de organismos hipertermófilos (Achenbach-Richter *et alii*, 1987; Forterre, 1995; Brown *et alii*, 2001). Além disso, as espiroquetas têm sido posicionadas como o grupo bacteriano mais primitivo na árvore evolutiva universal (Brown *et alii*, 2001; Wolf, 2001), e, portanto, a presença de aminopeptidases termofílicas em bactérias do gênero *Leptospira* e *Borrelia* é coerente com suas origens evolutivas. Maiores investigações poderiam esclarecer se a existência dessas aminopeptidases termofílicas representa alguma vantagem evolutiva.

A visualização em gel de eletroforese (desnaturante e não-desnaturante) da forma oligomérica em algumas preparações fervidas da enzima recombinante (figura 14) sugere que a enzima possa se redobrar corretamente durante o resfriamento da amostra. Tal redobrimento não é observado quando a amostra é imediatamente colocada em gelo após fervura, situação na qual apenas o monômero de 55 kDa é visualizado em SDS-PAGE (dados não mostrados). Estudos de caracterização biofísica da LAP de *Leptospira interrogans* poderão ajudar a elucidar os questionamentos sobre as características termofílicas da mesma.

### **A leucil-aminopeptidase de *L. interrogans* é inibida por EDTA.**

O EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético, é um composto orgânico capaz de formar complexos muito estáveis com diversos íons metálicos, em especial com Mn(II), Cu(II), Fe(III), e Co(III) (Holleman e Wiberg, 2001). Atua como ligante hexadentado, ou seja, possui seis posições de coordenação para ligação do íon metálico. Tais características conferem ao EDTA uma poderosa atividade quelante.

Por se tratarem de metaloproteases com sítios de ligação ao zinco (Zn1 e Zn2), as LAPs da família M17 são susceptíveis à inibição por EDTA. Supõe-se que o sítio Zn2 seja mais arraigado na estrutura da LAP, enquanto que o sítio Zn1 apresenta-se mais acessível e esteja sujeito a trocas com outros íons, tais como Mg(II) ou Mn(II). De fato, esses íons parecem estar presentes nas formas ativas das LAPs de diversos organismos, tendo em vista suas potentes capacidades de ativá-las (Matsui, Fowler e Walling, 2006). A demora de até 30 minutos para a inibição total da atividade enzimática (figura 19) pode ser atribuída, portanto, à posição destes sítios de ligação ao íon metálico, e da viabilidade do seqüestro de pelo menos um deles pelo EDTA, momento em que a reação começaria a entrar em equilíbrio.

### **A influência de co-fatores iônicos na atividade da enzima recombinante.**

Ao contrário do que ocorre com outras leucil-aminopeptidases (Stack *et alii*, 2007; Bertin, 2005) uma vez inibida por EDTA, a enzima recombinante de *L. interrogans* não readquire atividade mediante adição de co-fatores iônicos na concentração testada. É importante notar que a perda da atividade observada pela inibição com EDTA é acompanhada da perda da estrutura oligomérica, pelo menos em níveis observáveis por SDS-PAGE (figura 21). Quando comparadas com as enzimas nativas, proteínas recombinantes expressas heterologicamente podem ter suas estruturas mais susceptíveis a variações, provavelmente devido ao dobramento da proteína não ser exatamente igual ao que ocorre originalmente na bactéria nativa. Além disso, para facilitação da purificação, o vetor de expressão utilizado adiciona à proteína uma cauda poli-histidínica e um sítio de enteropeptidase. Tais adições, associadas ao ambiente heterólogo de expressão, podem resultar numa maior fragilidade da estrutura quaternária da enzima. Juntos, esses fatores podem ser responsáveis pela monomerização observada em géis de eletroforese desnaturante, tanto pelo uso do SDS (figura 14) quanto pela retirada do co-fator iônico com o uso do EDTA (figura 21).

O zinco, no entanto, teve um efeito levemente inibidor sobre a atividade enzimática. De fato, outras leucil-aminopeptidases, como a de *H. pilory* (Dong *et alii*,

2005), também sofrem o mesmo efeito, e isso pode estar relacionado ao fato do zinco competir pelo sítio de outros íons mais eficientes, como o  $Mg^{++}$  e o  $Mn^{++}$ . Pelo fato de ser uma metalopeptidase, a enzima recombinante HaLAP está sujeita ao níquel utilizado na coluna de afinidade, o que pode, em parte, responder a falta de resposta aos co-fatores iônicos (a enzima pode já estar ativada pelo níquel).

Vale lembrar que o tampão AMT, utilizado em alguns dos estudos com as LAPs que tiveram sua atividade restaurada ou modulada positivamente por co-fatores iônicos (*H. pylori* e *Leishmania*), é um quelante de  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  e  $Mn^{++}$ , e portanto pode mascarar a suposta ativação por esses íons. Ao adicionar-se qualquer desses co-fatores à reação, a capacidade quelante do MES tenderá a entrar em equilíbrio, permitindo a ligação dos íons aos sítios de ligação ao metal da enzima. Na LAP de *Leptospira interrogans*, a diferença de atividade absoluta entre o tampão AMT e Tris-CAPS no mesmo pH (8,5), foi da ordem de 270% (dados não mostrados).

## **Aspectos biológicos e funcionais de leucil-aminopeptidases**

Atualmente, o papel das aminopeptidases vem mudado de participantes no final da jornada de degradação proteolítica intracelular para reguladores de uma vasta gama de funções biologicamente distintas.

Em animais, a importância da LAP tem sido relacionada à inativação de oligopeptídeos biologicamente ativos, à apresentação de antígenos pelo MHC de classe I, e mais recentemente ao combate oxidativo por meio da regulação de dipeptídeos Cys-Gly, e a conseqüente modulação do ciclo da glutathiona (Matsui, Fowler e Walling, 2007).

Entre os protistas, sua participação foi inferida principalmente ao suprimento nutricional em parasitos do gênero *Leishmania* (Morty e Morehead, 2002), à atividade hemolítica auxiliar em *Plasmodium* (Stack *et alii*, 2007), e à catálise de peptídeos degradados pelo proteasoma de *T. cruzi* durante sua diferenciação nos diferentes estágios de infecção (Cadavid-Restrepo, 2005).

As leucil-aminopeptidases de bactérias são altamente diversificadas funcionalmente. Além de provavelmente atuar nas manutenções basais desses organismos, garantindo uma reciclagem dos aminoácidos derivados de atividade endopeptidásica, estão relacionadas com vários eventos que requerem interação com o DNA, como recombinação, repressão de transcrição (Colloms, 2004), e expressão de toxinas (Behari *et alii*, 2001). Dentre as espiroquetas, uma atenção específica foi dada à detecção proteolítica em bactérias do gênero *Treponema*, já que essas bactérias são capazes de causar infecções periodontais (Mäkinen e Mäkinen, 1996). Contudo, a associação entre a atividade leucil-aminopeptidásica e a ocorrência de tais infecções deve ser comprovada. Estudo realizado por Bertin e colaboradores (2005) sugere que essa atividade enzimática pode ter papel fundamental na sobrevivência de *Borrelia burgdorferi*, tendo em vista que bactérias desse gênero não são capazes de sintetizar aminoácidos, os quais devem ser adquiridos de sua dieta (Bertin *et alii*, 2005).

Em 1983, Neill e colegas (Neill, Reid e Ellis, 1983), examinaram 15 culturas de *Leptospira spp.* para atividade aminopeptidásica, e em 1987, baseados nos perfis de especificidade aos substratos, tentaram identificar diferentes espécies de *Leptospira*, e conseguiram com sucesso diferenciar o padrão entre *L. interrogans* e *L. biflexa* (Neill *et alii*, 1987). Infelizmente, pela impossibilidade da obtenção, até então, dos referidos artigos, não temos conhecimento sobre quais substratos foram utilizados, e quais foram as diferenças observadas.

Ao contrário das bactérias do gênero *Borrelia*, as *Leptospiras* têm uma via de síntese de aminoácidos, inclusive para a leucina, por meio da  $\alpha$ -isopropilmalato sintase (Xu *et alii*, 2004; Zou *et alii*, 2007). Mesmo assim, a existência de uma via de produção de aminoácidos não exclui a possibilidade da obtenção dos mesmos pela alimentação, e, portanto, a leucil-aminopeptidase de *Leptospira* pode estar relacionada com a aquisição de leucina pela bactéria.

Em uma recente comparação, Picardeau e colaboradores identificaram uma expansão no número de genes que codificam proteínas ricas em repetições de leucina (LRR) de um para 18, em *L. biflexa* e *L. interrogans*, respectivamente (Picardeau *et alii*, 2008). Apesar de não se saber ao certo a função dessas proteínas LRR, em *T. denticola*

a LrrA parece exercer algum papel na adesão e na invasão dos tecidos do hospedeiro (Ikegami *et alii*, 2004). Picardeau sugeriu ainda que a diversidade nas LRR de *L. interrogans* possa estar relacionada com a infecção bem sucedida numa grande variedade de espécies de mamíferos. A confirmação da existência dessa correlação justificaria nossos achados iniciais sobre a existência de atividade leucil-aminopeptidásica em sorovares patogênicos em contraposição a não-patogênico. Mesmo que a LAP de *Leptospira* não esteja envolvida na regulação direta da expressão desses genes, ela pode fazer parte crucial no processamento e na degradação destas proteínas.

Adicionalmente, Matsunaga e colaboradores (2007) demonstraram a importância da diferença osmótica entre o hospedeiro e o meio ambiente na regulação gênica em *L. interrogans*. Uma vez dentro do hospedeiro, os genes necessários para a sobrevivência da bactéria em ambientes úmidos abióticos (solo ou água contaminados, por exemplo), devem ser reprimidos, enquanto que outros genes relacionados a fatores de virulência devem ser induzidos. A detecção da expressão diferencial de três proteínas nessas condições confirma a importância da força osmótica na regulação de fatores de virulência nesse organismo (Matsunaga *et alii*, 2007). Assim como é importante a passagem de um ambiente hipo- para hiper-osmótico, o oposto também deve ser importante. Imagine a situação de uma infecção crônica nos rins, condição de manutenção e dispersão das Leptospiras no meio (Athanzio *et alii*, 2007), na qual as bactérias devem passar de um meio extremamente hiper-osmótico para um hipo-osmótico. É de se esperar que a bactéria tenha meios de reduzir a força osmótica para impedir a perda de eletrólitos e o possível rompimento de sua parede. Nesse cenário, a leucil-aminopeptidase contribuiria para o controle da diferença osmótica de uma maneira semelhante à predita para *Plasmodium* (Stack *et alii*, 2007): na clivagem final de proteínas ricas em leucina (no caso do *Plasmodium*, a hemoglobina), e na liberação desses aminoácidos, que uma vez livres, podem difundir pela membrana, aliviando a pressão osmótica da entrada da água na célula.

Outro papel atribuído às leucil-aminopeptidases bacterianas é o da regulação indireta de genes, como no caso do gene *algD*, de *Pseudomonas aeruginosa*

(Woolwine *et alii*, 2001). Apesar da inibição da enzima PhPA (uma homóloga de *Pseudomonas* à PepA de *E. coli*) não gerar diferença no pool de aminoácidos intracelulares, ela causa um resposta ao estresse do acúmulo de peptídeos derivados de proteínas mal-dobradas ou agregadas, que resulta na inibição da repressão transcricional de *algD*. Similarmente, a taxa da atividade da LAP de *Leptospira* pode regular a expressão de outros genes.

Apesar de ainda ser um assunto controverso, as leucil-aminopeptidases bacterianas também podem estar relacionadas ao controle do estresse oxidativo, por meio da regulação indireta da glutathiona. Peptídeos do tipo Cys-Gly, já comprovados como substratos para a leucil-aminopeptidase de *E. coli*, são reativos por si só, e também estão relacionados ao combate de espécies oxidativas, que podem ser prejudiciais à integridade celular (Matsui, Fowler e Walling, 2006). Se comprovado que a LAP de *Leptospira* cliva esse substrato, podemos inferir uma relação da mesma na proteção contra o estresse oxidativo.

## Conclusões

---

# Conclusões

---

A caracterização bioquímica e funcional de proteases tem grande importância científica, já que muitas vezes são alvos quimioterápicos promissores no combate a doenças com tratamento insatisfatório. No presente trabalho, uma atividade leucil-aminopeptidase presente no extrato de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* foi atribuída à leucil-aminopeptidase da família M17, codificada pelo gene *pepA*. A partir de nossos estudos, foi possível concluir que:

1. A seqüência nucleotídica do gene *pepA* de *Leptospira interrogans* codifica uma leucil-aminopeptidase funcional;
2. A estratégia aplicada neste trabalho se demonstrou eficaz para seus fins, demonstrando que a clonagem e expressão heteróloga de proteases pode ser de grande ajuda no processo de caracterização de possíveis alvos quimioterápicos;
3. A enzima recombinante HaLAP possui parâmetros cinéticos característicos da família de metalopeptidases M17;
4. Apresenta seqüência parcial altamente conservada entre as espécies patogênicas do gênero *Leptospira* com genomas elucidados;
5. É uma enzima termofílica, com atividade ótima entre 50° e 60 °C;
6. Sua atividade leucil-aminopeptidásica é muitas vezes aumentada ou depende da estrutura oligomérica;
7. Apesar de se apresentar principalmente em sua forma monomérica sua estabilidade catalítica sugere que em solução a formação dos oligômeros possa ser dinâmica;
8. A enzima recombinante é fortemente inibida por EDTA, de maneira irreversível nas condições testadas;
9. Existem indícios teóricos de que possam participar de papéis biológicos relevantes para a patogenia da doença;
10. É imunogênica em camundongos, o que abre espaço para novas perspectivas de estudos de localização e expressão diferencial dessa enzima.

Anexos

---

# Anexos

**Tabela 4. Programa em Perl para o cálculo da força iônica em uma solução de dois tampões.**

```

#! C:\Perl\bin\perl.exe
print "Calculation and Adjustment of Ionic Strength of a Mixture of Two Buffers\n\n"
z = Charge on Conjugate Base
IS = Ionic Strength with no salt add
II = Required concentration of salt
Absolute (CI) = Concentration of acid or base required
If CI is > 0, Add acid; if CI < 0, Add base\n\n";
print "Pk of buffer 1 = "; my $Pk1 = <STDIN>;
print "Pk of buffer 2 = "; my $Pk2 = <STDIN>;
print "Charge on conjugate base 1 = "; my $Ch1 = <STDIN>;
print "Charge on conjugate base 2 = "; my $Ch2 = <STDIN>;
print "Concentration of buffer 1 = "; my $Co1 = <STDIN>;
print "Concentration of buffer 2 = "; my $Co2 = <STDIN>;
print "Required Ionic Strength ="; my $I = <STDIN>;
print "First pH = "; my $pH1 = <STDIN>;
print "Final pH = "; my $pH2 = <STDIN>;
print "pH Increment = "; my $pH3 = <STDIN>;
print "pH\HA1\A1\HA2\A2\CI\IS\II\n";
my $H = 0; my $X1 = 0; my $X2 = 0; my $A1 = 0; my $A2 = 0;
my $B1 = 0; my $B2 = 0; my $U = 0; my $I1 = 0; my $I2 = 0;
for($H = $pH1; $H <= $pH2; $H+= $pH3){
$X1=exp(($H-$Pk1)*2.303); $A1=$Co1/(1+$X1); $B1=$A1*$X1;
$X2=exp(($H-$Pk2)*2.303); $A2=$Co2/(1+$X2); $B2=$A2*$X2;
$U=($Ch1+1)*$A1+$Ch1*$B1+($Ch2+1)*$A2+$Ch2*$B2;
$I1=.5* (($Ch1+1)**2*$A1+$Ch1**2*$B1+($Ch2+1)**2*$A2+$Ch2**2*$B2+(abs($U)));
$I2=$I-$I1;
printf("%.1f\t%.4f\t%.4f\t%.4f\t%.4f\t%.4f\t%.4f\n",
    $H,$A1,$B1,$A2,$B2,$U,$I1,$I2);
}
print "\nEND OF CALCULATIONS"

```

**Tabela 5. Programa em Perl para o cálculo da força iônica em uma solução de três tampões.**

```

#! C:\Perl\bin\perl.exe
print "Calculation and Adjustment of Ionic Strength of a Mixture of Three Buffers\n\n"
z = Charge on Conjugate Base
IS = Ionic Strength with no salt add
II = Required concentration of salt
Absolute (CI) = Concentration of acid or base required
If CI is > 0, Add acid; if CI < 0, Add base\n\n";
print "Pk of buffer 1 = "; my $Pk1 = <STDIN>;
print "Pk of buffer 2 = "; my $Pk2 = <STDIN>;
print "Pk of buffer 3 = "; my $Pk3 = <STDIN>;
print "Charge on conjugate base 1 = "; my $Ch1 = <STDIN>;
print "Charge on conjugate base 2 = "; my $Ch2 = <STDIN>;

```

---

```

print "Charge on conjugate base 3 = "; my $Ch3 = <STDIN>;
print "Concentration of buffer 1 = "; my $Co1 = <STDIN>;
print "Concentration of buffer 2 = "; my $Co2 = <STDIN>;
print "Concentration of buffer 3 = "; my $Co3 = <STDIN>;
print "Required Ionic Strength ="; my $I = <STDIN>;
print "First pH = "; my $pH1 = <STDIN>;
print "Final pH = "; my $pH2 = <STDIN>;
print "pH Increment = "; my $pH3 = <STDIN>;
print "pH\thA1\ta1\thA2\ta2\thA3\ta3\tCl\tI\tI\n";
my $H = 0; my $X1 = 0; my $X2 = 0; my $X3 = 0; my $A1 = 0; my $A2 = 0; my $A3 = 0; my $B1 =
0;
my $B2 = 0; my $B3 = 0; my $U = 0; my $I1 = 0; my $I2 = 0; my $I3 = 0; my $I4 = 0;
for($H = $pH1; $H <= $pH2; $H+= $pH3){
$X1=exp(($H-$Pk1)*2.303); $A1=$Co1/(1+$X1); $B1=$A1*$X1;
$X2=exp(($H-$Pk2)*2.303); $A2=$Co2/(1+$X2); $B2=$A2*$X2;
$X3=exp(($H-$Pk3)*2.303); $A3=$Co3/(1+$X3); $B3=$A3*$X3;
$U=($Ch1+1)*$A1+$Ch1*$B1+($Ch2+1)*$A2+$Ch2*$B2+($Ch3+1)*$A3+$Ch3*$B3;
$I1=.5* (($Ch1+1)**2*$A1+$Ch1**2*$B1+($Ch2+1)**2*$A2+$Ch2**2*$B2+(abs($U)));
$I2=.5* (($Ch3+1)**2*$A3+$Ch3**2*$B3);
$I3=$I1+$I2; $I4=$I-$I3;
printf("%.1f %.3f %.3f %.4f %.4f %.4f %.4f %.4f %.4f\n",
    $H,$A1,$B1,$A2,$B2,$A3,$B3,$U,$I3,$I4);
}
print "\nEND OF CALCULATIONS"

```

---

## Referências Bibliográficas

---

# Referências Bibliográficas

---

- ABADJIEVA, A.; HILVEN, P.; PAUWELS, K.; CRABEEL, M. The yeast ARG7 gene product is autoproteolyzed to two subunit peptides, yielding active ornithine acetyltransferase. **J Biol Chem.** v. 275, nº 15, p. 11361-11367. 2000.
- ACHENBACH-RICHTER, L.; GUPTA, R.; STETTER, K. O.; WOESE, C. R. Were the original eubacteria thermophiles? **Syst Appl Microbiol.** v. 9, p.34-39. 1987.
- ANANTHA, R. P.; STONE, K .D.; DONNENBERG, M. S. Effects of bfp mutations on biogenesis of functional enteropathogenic Escherichia coli type IV pili. **J Bacteriol.** v. 182, nº9, p. 2498-2506. 2000.
- ATHANAZIO, D. A.; SILVA, E. F.; SANTOS, C. S.; M. ROCHA, G. M.; VANNIER-SANTOS, M. A.; McBride, A. J. A.; KO, A. I. e REIS, M. G. Rattus norvegicus as a model for persistent renal colonization by pathogenic Leptospira interrogans. **Acta Tropica.** v. 105, p. 176–180. 2008.
- BARRETT, A. J. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. **Biochem J.** v. 187, nº 3, p. 909-912. 1980.
- BARRETT, A. J.; MCDONALD, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **Biochem J.** v. 237, nº 3, p. 935. 1986.
- BEHARI, J.; STAGON, L. e CALDERWOOD, S. B. pepA, a gene mediating pH regulation of virulence genes in Vibrio cholerae. **J. Bacteriol.** 183, 178–188. 2001.
- BERTIN, P. B.; LOZZI, S. P.; HOWELL, J. K.; RESTREPO-CADAVID, G.; NEVES, D.; TEIXEIRA, A. R.; DE SOUSA, M. V.; NORRIS, S. J.; SANTANA, J. M. The thermophilic, homohexameric aminopeptidase of Borrelia burgdorferi is a member of the M29 family of metallopeptidases. **Infect Immun.** v. 73, nº4, p. 2253-2261. 2005.
- BOND, J. S.; BUTLER, P.E. Intracellular proteases. **Annu Rev Biochem.** v. 56, p. 333-364. 1987.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 816 p.
- BROWN, J. R.; DOUADY, C. J.; ITALIA, M. J.; MARSHALL, W. E.; STANHOPE, M. J. Universal trees based on large combined protein sequence data sets. **Nat Genet.** v. 28, nº 3, p. 281-285. 2001.
- BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; AND ADLER, B. Genome reduction in Leptospira

- borgpetersenii reflects limited transmission potential. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 26, nº103, e. 39, p. 14560-14565. 2006.
- BURLEY, S. K.; DAVID, P. R.; TAYLOR, A; LIPSCOMB, W. N. Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 87, nº 17, p. 6878-6882. 1990.
- CADAVID-RESTREPO, G. Caracterização bioquímica da catepsina b de *Trypanosoma cruzi*. 2001. Tese de doutorado (Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília.
- COLLOMS, S.D. Leucyl aminopeptidase PepA. In: Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd Edition, BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. e WOESSNER, J. F. (Ed). San Diego, USA: Elsevier/ Academic Press), p. 905–908. 2004
- CORBELLINIA, L. G.; PESCADORA, C. A.; FRANTZA, F.; WUNDERA, E.; STEFFENB, D.; SMITHC, D. R. e DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **Vet J.** v. 172, nº 1, p. 114-120. 2006.
- DALL'ANTONIA, M.; SLUGA, G.; WHITFIELD, S.; TEALL, A.; WILSON, P. e KRAHÉ, D. Leptospirosis pulmonary haemorrhage: a diagnostic challenge. **Emerg. Med. J.** v. 25, p. 51-52. 2008.
- DAYHOFF, M. O.; SCHWARTZ, R. M. e ORCUTT, B. C. A model of evolutionary change in proteins. **Atlas Protein Struct.** v. 5, p. 345–352. 1978.
- DELPYERRE, G. R.; FRUTON, J. S. Inactivation of pepsin by diphenyldiazomethane. **Proc Natl Acad Sci.** v. 54, nº 4, p. 1161-1167. 1965.
- DOLHNIKOFF, M.; MAUAD, T.; BETHLEM, E. P.; CARVALHO, C. R. Leptospiral pneumonias. **Curr Opin Pulm Med.** v. 13, nº 3, p. 230-235. 2007.
- DONG, L.; CHENG, N.; WANG, M. W.; ZHANG, J.; SHU, C. e ZHU, D. X. The leucyl aminopeptidase from *Helicobacter pylori* is an allosteric enzyme. **Microbiology.** v. 151, p. 2017–2023. 2005.
- DUNN, B. M. Determination of protease mechanism. In: R. J. Beynon and J. S. Bond (Ed), Proteolytic Enzymes. A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford (2001). Cap. 4, p. 77-104.
- ELLIS, K. J.; MORRISON, J. F. Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. **Methods Enzymol.** v. 87, p. 405-426. 1982.

- ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** v. 10, nº 3, p. 463-478. 1994.
- ENNA, Z. M.; ROLANDO, P. P. Leptospirosis: Puesta al día. **Rev. chil. infectol.** v. 24, nº 3, p.220-226. 2007.
- FAINE, S. *Leptospira* and leptospirosis. 1994. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- FORTERRE, P. Looking for the most "primitive" organism(s) on Earth today: the state of the art. **Planet Space Sci.** v. 43, nº1-2, p.167-177. 1995.
- FUJINAGA, M.; CHERNEY, M. M.; OYAMA, H.; ODA, K.; JAMES, M.N. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 101, p. 3364-3369. 2004.
- GONZALES, T.; ROBERT-BAUDOUIY, J. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. **FEMS Microbiol Rev.** v. 18, nº 4, p. 319-344. 1996.
- GUENET, C.; LEPAGE, P. e HARRIS. B. A. Isolation of the Leucine aminopeptidase gene from *Aeromonas proteolytica*. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 8390-8395. 1992.
- HAAKE, D. A.; DUNDOO, M.; CADER, R.; KUBAK, B. M.; HARTSKEERL, R. A.; SEJVAR, J. J. e ASHFORD, D. A. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. **Clin Infect Dis.** v. 34, p. e40-43. 2002.
- HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infect Immun.** v. 70, p. 4936-4945. 2002.
- HAAKE, D. A.; WALKER, E. M.; BLANCO, D. R.; BOLIN, C. A.; MILLER, M. N. e LOVETT, M. A. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. **Infect Immun.** v. 59, p. 1131-1140. 1991.
- HARTLEY, B.S. Proteolytic enzymes. **Annu Rev Biochem.** v. 29, p. 45-72. 1960.
- HARTSUCK, J. A.; TANG, J. The carboxylate ion in the active center of pepsin. **J Biol Chem.** v. 247, n 8, p. 2575-2580. 1972.
- HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Vet Microbiol.** v. 73, nº 4, p. 261-267. 2000.

- HILL, H. R.; BOHNSACK, J. F.; MORRIS, E. Z.; AUGUSTINE, N. H.; PARKER, C. J.; CLEARY, P. P.; WU, J.T. Group B streptococci inhibit the chemotactic activity of the fifth component of complement. **J Immunol.** v. 141, nº 10, p. 3551-3556. 1988.
- HOLLEMAN, A. F., WIBERG, E. (2001). *Inorganic Chemistry*. San Diego: Academic Press.
- IKEGAMI, A.; HONMA, K.; SHARMA, A.; KURAMITSU, H. Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. **Infect Immun.** v. 72, p. 4619–4627. 2004.
- KALSOW, C. M.; DWYER, A. E. Retinal Immunopathology in horses with Uveitis. **Ocul Immunol Inflammat.** v. 6, p. 239-251. 1998.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, nº 5259, p. 680-685. 1970.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics.** v. 23, p. 2947-2948. 2007.
- LEON-VIZCAINO, L.; HERMOSO de MENDOZA, M.; GARRIDO, F. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** v. 10, nº 2, p. 149-153. 1987.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev.** v. 14, nº 2, p.296-326. 2001.
- LEVETT, P. N., **Leptospirosis**. In: MANDELL, G. N.; BENNETT, J. E. e DOLIN, R.. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6ª ed., Nova Iorque. Churchill Livingstone, 2005. v. 2, cap. 237, p. 2789-2795.
- LILES, M. R.; EDELSTEIN, P.H.; CIANCIOOTTO, N.P. The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. **Mol Microbiol.** v. 31, nº 3, p. 959-970. 1999.
- LIN, Y.; CHANG, Y. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 362, nº 2, p. 443-448. 2007.
- LO, M; BULACH, D. M.; POWELL, D. R.; HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J.; PAUSTIAN, M. L.; ZUERNER, R. L. e ADLER, B. Effects of Temperature on Gene Expression Patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as Assessed by Whole-Genome Microarrays. **Infect Immun.** 74(10): 5848–5859. 2006.
- MÄKINEN, K. K.; e MÄKINEN, P.-L. The peptidolytic capacity of the spirochete system. **Med Microbiol Immunol.** v. 185, nº 1, p. 1-10. 1996.

- MÄKINEN, K. K.; SYED, S. A.; LOESCHE, W. J.; MÄKINEN, P.L. Proteolytic profile of *Treponema vincentii* ATCC 35580 with special reference to collagenolytic and arginine aminopeptidase activity. **Oral Microbiol Immunol.** v. 3, nº3, p. 121-128. 1988.
- MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J. B.; DERBYSHIRE, M. K.; DeWEESE-SCOTT, C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HAO, L.; HE, S.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; KE, Z.; KRYLOV, D; LANCZYCKI, C. J.; LIEBERT, C. A.; LIU, C.; LU, F.; LU, S.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; YIN, J. J.; ZHANG, D; BRYANT, S. H. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. **Nucleic Acids Res.** v. 35, p. D237-240. 2007.
- MATSUI, M.; FOWLER, J. H. e WALLING, L. L. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. **Biol. Chem.** v. 387, p. 1535–1544. 2006.
- MATSUI, M.; FOWLER, J. H.; WALLING, L. L. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. **Biol Chem.** v. 387, nº 12, p. 1535-1544. 2006.
- MATSUNAGA, J.; LO, M.; BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B. e HAAKE, D. A. Response of *Leptospira interrogans* to Physiologic Osmolarity: Relevance in Signaling the Environment-to-Host Transition. **Infect. Immun.** 75(6): 2864-2874. 2007.
- MATTHIAS, M. A.; RICARDI, J. N.; CESPEDAS, M.; DIAZ, M. M.; GALLOWAY, R. L.; SAITO, M.; STEIGERWALT, A. G.; PATRA, K. P.; ORE, C. V.; GOTUZZO, E.; GILMAN, R. H.; LEVETT, P. N.; VINETZ, J. M. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique leptospira associated with a rattus species reservoir in the peruvian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 2, nº 4, p. e213. 2008.
- MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis.** v. 18, nº 5, p. 376-386. 2006.
- MERIEN, F.; TRUCCOLO, J.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol Lett.** v. 185, p. 17–22. 2000.
- MORGAN, J.; BORNSTEIN, S. L.; KARPATI, A. M.; BRUCE, M.; BOLIN, C. A.; AUSTIN, C. C.; WOODS, C. W.; LINGAPPA, J.; LANGKOP, C.; DAVIS, B.; GRAHAM, D. R.; PROCTOR, M.; ASHFORD, D. A.; BAJANI, M.; BRAGG, S. L.; SHUTT, K.; PERKINS, B. A.; TAPPERO, J. W.; Leptospirosis Working Group. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin Infect Dis.** v. 34, p. 1593–1599. 2002.

- MOTOSHIMA, H; MINAGAWA, E; TSUKASAKI, F; KAMINOGAWA, S. Cloning of genes of the aminopeptidase T family from *Thermus thermophilus* HB8 and *Bacillus stearothermophilus* NCIB8924: apparent similarity to the leucyl aminopeptidase family. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 61, nº 10, p.1710-1717. 1997.
- NALLY, J. E.; CHOW, E.; FISHBEIN, M. C.; BLANCO, D. R. e LOVETT, M. A. Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infections. **Infect Immun.** v. 73, nº 6, p. 3251–3260. 2005.
- NASCIMENTO, A. L. T. O.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E. A.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A. e MARTINS, E. A. L. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Braz J Med Biol Res.** v. 37, p. 459-478. 2004.
- NEILL, S. D.; REID, L. R.; ELLIS, W. A. Aminopeptidase activity of *Leptospira* strains. **J Gen Microbiol.** v. 129, nº 2, p. 395-400. 1983.
- NEILL, S. D.; REID, R. L.; WEATHERUP, S. T. e ELLIS, W. A. The use of aminopeptidase substrate specificity profiles to identify leptospires. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A].** v. 264, nº 1-2, p. 137-144. 1987.
- OHTA, K.; MAKINEN, K. K.; LOESCHE, W. J. Purification and characterization of an enzyme produced by *Treponema denticola* capable of hydrolyzing synthetic trypsin substrates. **Infect Immun.** v. 53, nº 1, p. 213-220. 1986.
- PARMA, A. E.; CERONE, S. I.; SANSINANE, S. A. Biochemical analysis by SDS-PAGE and western blotting of the antigenic relationship between *Leptospira* and equine ocular tissues. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 33, p. 179-185. 1992.
- PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C. e ADLER, B. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. **PLoS ONE.** v. 3, nº 2, e. 1607. 2008.
- POTEMPA, J.; PIKE, R. N. BACTERIAL PEPTIDASES. IN: RUSSELL W, HERWALD H (Ed): Concepts in Bacterial Virulence. Contrib Microbiol. Basel, Karger, 2005, vol 12, p 132-180.
- RAGHAVAN, U. M.; PALANIAPPAN, S. R.; YUNG-FU, C. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Curr Opin Infect Dis.** v. 20, p. 284–292. 2007.

- RATHINAM, S. R. Ocular manifestations of leptospirosis. **J Postgrad Med.** v. 51, p. 189-194. 2005.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem J**, v. 290, p. 205-218. 1993.
- RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; KOK, C. Y.; KONG, J. e BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.** v.36, p. D320-D325. 2008.
- REN, S. X.; FU, G.; JIANG, X. G.; ZENG, R.; MIAO, Y. G.; XU, H.; ZHANG, Y. X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L. F.; JIANG, H. Q.; JIA, J.; TU, Y. F.; JIANG, J. X.; GU, W. Y.; ZHANG, Y. Q.; CAI, Z.; SHENG, H. H.; YIN, H. F.; ZHANG, Y.; ZHU, G. F.; WAN, M.; HUANG, H. L.; QIAN, Z.; WANG, S. Y.; MA, W.; YAO, Z. J.; SHEN, Y.; QIANG, B. Q.; XIA, Q. C.; GUO, X. K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y. M.; SHI, M. H.; CHEN, Z.; XU, J. G.; ZHAO, G. P. Unique and physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing. **Nature.** v. 422, p.888–893. 2003.
- RISTOW, P.; BOURHY, P.; DA CRUZ MCBRIDE, F. W.; FIGUEIRA. C. P.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRONS, I. S.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog.** v. 3, nº7, p. e97. 2007.
- MORTY, R. E. e MOREHEAD, J. Cloning and Characterization of a Leucyl Aminopeptidase from Three Pathogenic *Leishmania* Species. **J. Biol. Chem.** v. 277, nº 9, p. 26057–26065. 2002.
- SAINT-GIRONS, I.; BOURHY, P.; OTTONE, C.; PICARDEAU, M.; YELTON, D.; HENDRIX, R. W.; GLASER, P.; CHARON, N. The LE1 Bacteriophage Replicates as a Plasmid within *Leptospira biflexa*: Construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* Shuttle Vector. **J Bacteriol.** v. 182, nº. 20, p. 5700–5705. 2000.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** v. 4, nº 4, p. 406-425. 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York, Cold Spring Harbor Press, 1989, 956 p. 1989.
- SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; RODIER, M. H.; SCHREVEL, J.; TEIXEIRA, A. Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 187, nº 3, p. 1466-1473. 1992.
- ST. JOHN M. A.; KING, S.; BULLEN, S. E.; CHERIAN, J. e LEVETT, P. N. Leptospirosis occurring in two children after fresh water immersion. **West Indian Med J.** v. 49, p. 3403–43. 2000.

- STACK, C. M.; LOWTHER, J.; CUNNINGHAM, E.; DONNELLY, S.; L. GARDINER, D. L.; TRENHOLME, K. R.; SKINNER-ADAMS, T. S.; TEUSCHER, F.; GREMBECKA, J.; MUCHA, A.; KAFARSKI, P.; LUA, L.; BELL, A.; e DALTON, J. P. Characterization of the *Plasmodium falciparum* M17 leucyl aminopeptidase: a protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development. **J. Biol. Chem.** v. 282, nº 3, p. 2069-2080. 2007.
- STORCK, C. H.; POSTIC, D.; LAMAURY, I.; PEREZ, J. M. Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003–2004, a two El Niño Southern Oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. **Epidemiol Infect.** In press. 2007.
- STRANDBERG, L. e ENFORS, S. O. Factors Influencing Inclusion Body Formation in the Production of a Fused Protein in Escherichia coli. **Appl Environ Microbiol.** v. 57, nº 6, p. 1669–1674. 1991.
- STRÄTER, N.; SHERRATT, D. J.; COLLOMS, S. D. X-ray structure of aminopeptidase A from Escherichia coli and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. **EMBO J.** v. 18, nº 16, p. 4513-4522. 1999.
- TURNER, L. H.; MOHUN, A.F. Leptospirosis. **Br Med J.** v. 1, nº 5693, p. 433-434. 1970.
- VENTURA, S e VILLAYERDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. **Trends Biotechnol.** v. 24, nº 4, p. 179-185. 2006.
- VIRIYAKOSOL, S.; MATTHIAS, M. A.; SWANCUTT, M. A.; KIRKLAND, T. N.; VINETZ, J. M. Toll-like receptor 4 protects against lethal Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. **Infect Immun.** v. 74, nº 2, p. 887-895. 2006.
- VOET, D. E VOET, J. G. Biochemistry. 1. Ed. New York, Willey, 1990.
- WANG, X.; FU, M.; REN, J. e QU, X. Evaluation of different culture conditions for high-level soluble expression of human cyclin A2 with pET vector in BL21(DE3) and spectroscopic characterization of its inclusion body structure. **Protein Expr Purif.** v. 56, nº 1, p. 27-34. 2007.
- WOLF, Y. I.; ROGOZIN, I. B.; GRISHIN, N. V.; TATUSOV, R. L. e KOONIN, E. V. Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades. **BMC. Evol. Biol.** v. 1, p.8. 2001
- WOOLWINE, S. C.; SPRINKLE, A. B.; e WOZNIAK, D. J. Loss of Pseudomonas aeruginosa PhpA aminopeptidase activity results in increased algD transcription. **J. Bacteriol.** v. 183, p. 4674–4679. 2001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the control of leptospirosis. Faine, S (Ed). 1982. Geneva. nº 67.

- XU, H.; ZHANG, Y.; GUO, X.; REN, S.; STAEMPFLI, A. A.; CHIAO, J.; JIANG, W. e ZHAO, G. Isoleucine Biosynthesis in *Leptospira interrogans* Serotype lai Strain 56601 Proceeds via a Threonine-Independent Pathway. **J Bacteriol.** v. 186, nº 16, p. 5400-5409.
- YANG, C. W.; HUNG, C. C.; WU, M.S.; TIAN, Y. C.; CHANG, C. T.; PAN, M. J.; VANDEWALLE, A. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney Int.** v. 69, p. 815–822. 2006.
- ZOU, Y.; GUO, X.; PICARDEAU, M.; XU, H.; ZHAO, G. A comprehensive survey on isoleucine biosynthesis pathways in seven epidemic *Leptospira interrogans* reference strains of China. **FEMS Microbiol Lett.** v. 269, nº 1, p. 90-96. 2007.