

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE UNA PROTEÍNA DE CLUSTER HÍBRIDO DE *Entamoeba histolytica*.

**Bentivegna, Sofía**

Laboratorio de Enzimología Molecular, IAL, UNL-CONICET

Área temática del proyecto: Ciencias biológicas; sub-área: Biotecnología

### INTRODUCCIÓN

La infección con *Entamoeba histolytica*, el agente causante de la amebiasis, es un problema de salud mundial que afecta a 50 millones de personas cada año alrededor del mundo y es el causante de 100.000 muertes anuales en países donde la calidad del agua y el tratamiento de aguas residuales son inadecuados. Mayormente, este parásito intestinal provoca disentería hemorrágica y abscesos hepáticos. Durante el proceso infeccioso, *E. histolytica* se adapta a distintas tensiones de oxígeno, desde condiciones anaeróbicas en el lumen intestinal, hasta ambientes ricos en oxígeno en los tejidos, donde están presentes especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno, altamente citotóxicas. La caracterización bioquímica y funcional de las proteínas que intervienen en el metabolismo redox de este protozoo, permite conocer los mecanismos por los cuales este parásito coloniza, infecta y sobrevive dentro del organismo humano, como también es potencialmente útil para descubrir nuevas dianas terapéuticas para controlar la enfermedad.

Las proteínas de cluster híbrido (HCP, por sus siglas en inglés) contienen dos tipos de cluster de Fe/S,  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$  o  $[2\text{Fe-2S}]^{2+/1+}$ , y un tipo inusual de cluster híbrido,  $[4\text{Fe-2S-2O}]$ . Aunque se ha propuesto que la HCP posee un rol en el metabolismo del nitrógeno en bacterias, la verdadera función fisiológica de estas proteínas aún no se conoce. En este trabajo, se presentan propiedades funcionales y estructurales de una HCP de *E. histolytica* (*EhHCP*). Los resultados obtenidos sugieren que la HCP podría estar involucrada en la protección del parásito frente a condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo. Es importante destacar que es la primera vez que se realiza la caracterización de una forma eucariota de esta proteína.

### OBJETIVOS

El objetivo del trabajo es proporcionar información sobre la funcionalidad de la proteína de cluster híbrido de *Entamoeba histolytica* (*EhHCP*).

### METODOLOGÍA

**Expresión y purificación de HCP:** el ORF codificante de HCP fue amplificado por PCR mediante el uso de oligonucleótidos específicos. El producto fue clonado en el vector pGEM-T-Easy (Promega) y la construcción pGEM-T-Easy/*EhHCP* se utilizó para transformar bacterias *Escherichia coli* Top10 F'. Se realizó una minipreparación de ADN plasmídico (kit comercial de Promega) y la construcción pGEM-T-Easy/*EhHCP* se digirió

con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. El producto de la digestión se ligó con el plásmido pCold-1 (Takara) digerido previamente con *NdeI* y *SalI*. Todas las ligaciones se realizaron usando T4 DNA ligasa durante 16h a 4°C. *EhHCP* se expresó de manera recombinante (con un His-Tag N-terminal) en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) y se purificó mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado.

**Modelado molecular:** se realizó un modelado por homología de *EhHCP*. La búsqueda de homólogos se realizó con la plataforma de Swiss-Model, el alineamiento estructural se realizó con el programa SPDBV 4.10, el modelado se logró mediante el programa MODELLER y las visualizaciones fueron obtenidas con el programa UCSF Chimera.

**Medidas de actividad:** todos los ensayos enzimáticos se realizaron de manera espectrofotométrica a 30 °C (en un volumen final de 50 µl) usando un fotómetro Multiskan Ascent (Thermo Electron Co.). Las mediciones de actividad peroxidasa e hidroxilamina reductasa se realizaron monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm. La mezcla de reacción estaba compuesta por NADH 300 µM, rubredoxina reductasa 1 µM, rubredoxina 10 µM y concentraciones de *EhHCP* de 1, 10 y 100 µM. Para la medición de actividad peroxidasa se usó *buffer* fosfato 100 mM pH 7,0 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. Para la medición de actividad hidroxilamina reductasa se usó *buffer* fosfato 100 mM pH 8,0 y NH<sub>2</sub>OH 5 mM.

**Ensayos de estrés en soft agar:** se utilizaron las bacterias DH5α-pCold (como modelo *wild type*), LMSØ873-pCold (cepa de *E. coli* K12 defectiva en el gen *hcp*) y LMSØ873-pCold/*EhHCP* (como modelo para evaluar la complementación con la HCP recombinante) para evaluar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>OH, ditioneitol (DTT) o diamida en el crecimiento microbiano. Se utilizó medio LB-Agar al 2% para armar las bases de las placas de Petri y LB-Agar 0,65% para el *soft agar*. Se utilizaron 5 µl de cada uno de los agentes, depositados en círculos de papel de filtro apoyados sobre el *soft agar* inoculado. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>OH o DTT fueron evaluados en concentraciones de 125, 250, 500 y 1000 mM, mientras que la diamida se utilizó a concentraciones de 50, 100, 200 y 400 mM.

## RESULTADOS

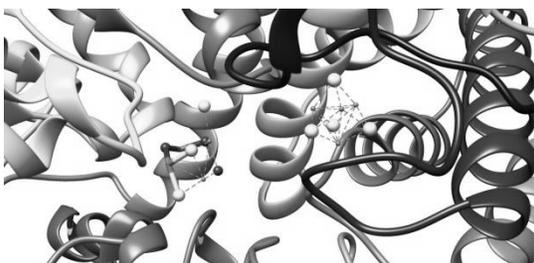
### Análisis estructural de la HCP:



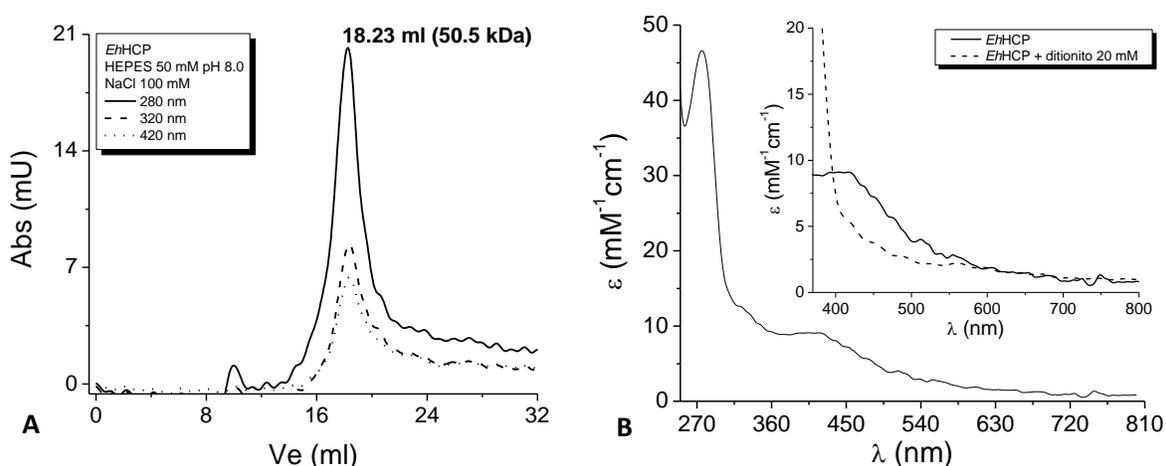
El modelado por homología (Fig. 1 A y B) muestra una estructura con predominancia de hélices alfa, con los cluster en el centro de la proteína. Se determinó el contenido proteico en la fracción purificada por el método de Bradford. Además, se realizó la cuantificación de Fe mediante fotometría de llama, y con estos resultados se determinó una relación Fe/proteína de 5,9, por lo que se estima que la HCP recombinante podría contener un cluster

Fig 1 A: modelo estructural de *EhHCP*

híbrido [4Fe-2S-2O] y un cluster dinuclear [2Fe-2S]<sup>2+/1+</sup>, lo que es coherente con el espectro de absorción UV-Vis de la proteína (Fig. 2A). Mediante cromatografía de filtración por geles se determinó que *EhHCP* es una proteína monomérica de 50,5 kDa (Fig. 2B).



**Fig. 1B:** vista aumentada de los clusters. El cluster izquierdo corresponde al cluster híbrido mientras que el derecho es el cluster dinuclear.



**Fig. 2A:** Perfil de elución de *EhHCP* en cromatografía de filtración por geles. **Fig. 2B:** Espectro de absorción UV-Vis de *EhHCP* recombinante.

**Ensayos *in vitro*:** no se pudo detectar actividad peroxidasa o hidroxilamina reductasa utilizando un ensayo enzimático acoplado *in vitro*. Sin embargo se pudo observar una reducción del cluster/s de la *EhHCP* a expensas de la rubredoxina reducida (datos no mostrados).

**Ensayos *in vivo*:** los ensayos de estrés en soft agar mostraron una diferencia significativa en la viabilidad celular entre las bacterias mutantes para HCP y las mutantes complementadas con la HCP de *E. histolytica*, para concentraciones bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en aerobiosis y para concentraciones medianas y altas de NH<sub>2</sub>OH, siendo más resistentes a estos agentes las bacterias que estaban complementadas (Fig. 3 y 4).

También se probaron agentes estresantes como DTT, CysNO o diamida, habiendo una diferencia significativa únicamente para éste último compuesto (datos no mostrados).

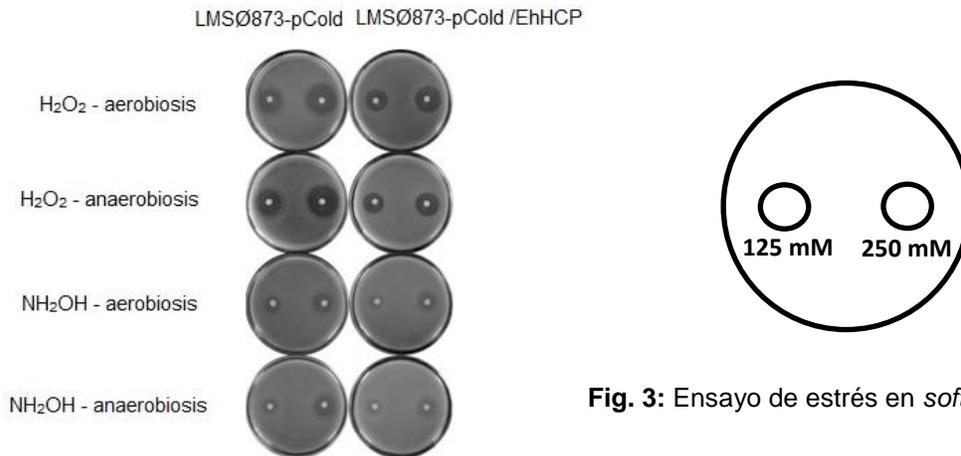


Fig. 3: Ensayo de estrés en soft agar.

Estos resultados indican que, aunque no se hayan podido determinar la actividad peroxidasa e hidroxilamina reductasa *in vitro*, en los ensayos de complementación *in vivo* puede observarse que la HCP conferiría una actividad protectora frente a condiciones de estrés provocadas por peróxido de hidrógeno, hidroxilamina y diamida.

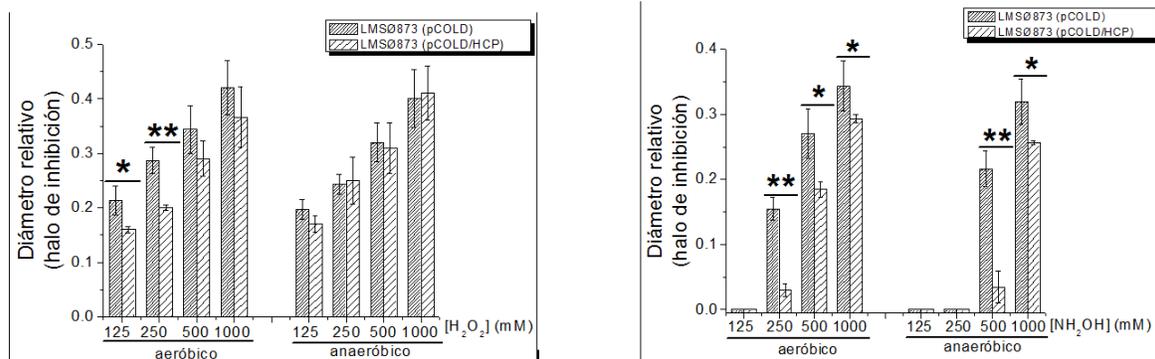


Fig. 4: Análisis estadístico de las medidas de los halos de inhibición. (\*):  $p < 0.05$  en la prueba de hipótesis (ANOVA de una vía); (\*\*):  $p < 0.05$  en la prueba de hipótesis (ANOVA de una vía). La ausencia de asteriscos indica que no hay diferencias significativas en relación al control.  $N = 3$

## BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, C. C., Romão, C. V., Lindley, P. F., Teixeira, M., & Saraiva, L. M. (2006). The role of the hybrid cluster protein in oxidative stress defense. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32445-32450.
- van den Berg, W. A., Hagen, W. R., & van Dongen, W. M. (2000). The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 267(3), 666-676.
- Vicente, J. B., Ehrenkauf, G. M., Saraiva, L. M., Teixeira, M., & Singh, U. (2009). *Entamoeba histolytica* modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: implications for amebic pathogenesis. *Cellular microbiology*, 11(1), 51-69.
- Wolfe, M. T., Heo, J., Garavelli, J. S., & Ludden, P. W. (2002). Hydroxylamine reductase activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 184(21), 5898-5902.