UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MATHEUS PINTO PINHEIRO

**Estudos cristalográficos da enzima diidroorotato desidrogenase de
*Trypanosoma cruzi***

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MATHEUS PINTO PINHEIRO

Estudos cristalográficos da enzima diidroorotato desidrogenase de
Trypanosoma cruzi

Ribeirão Preto

2008

MATHEUS PINTO PINHEIRO

**Estudos cristalográficos da enzima diidroorotato desidrogenase de
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Área de Concentração: Física Biológica

Orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pinheiro, Matheus Pinto.

Estudos cristalográficos da enzima diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* / Matheus Pinto Pinheiro; orientadora Maria Cristina Nonato Costa – Ribeirão Preto, 2008.

106 p.; il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Física Biológica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

1. *Trypanosoma cruzi* – cepa Y. 2. Diidroorotato desidrogenase. 3. Clonagem. 4. Expressão. 5. Purificação. 6. Cristalização. 7. Cristalografia de raio-X.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matheus Pinto Pinheiro

Estudos cristalográficos da enzima diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Física Biológica

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos e Ana Catarina, e irmãos, Ana Carla e Thiago, pelo constante incentivo, incansável apoio e por sempre torcerem por mim, apesar de não entenderem absolutamente nada do que eu estou fazendo. E também a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de antecipar meus agradecimentos a toda e qualquer pessoa que tenha me ajudado de alguma forma durante o desenvolvimento deste trabalho. Assim, já me sinto aliviado de não estar sendo injusto com alguns. Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de muitas pessoas às quais gostaria de exprimir os meus agradecimentos.

À minha orientadora, Profa. Cristina Nonato, que me acolheu quando o Laboratório de Cristalografia de Proteínas de Ribeirão Preto (LCP-RP) era, ainda, tão jovem, ensinando-me os primeiros passos de como se faz pesquisa e, principalmente, como pode ser divertido! A sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, creio que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos. Agradeço também à Cris pelos vários incentivos e oportunidades, inclusive a de participar do curso RapiData, realizado no Laboratório de Luz Síncrotron em Brookhaven, onde conheci uma gama de excelentes pesquisadores da área de Cristalografia de proteínas, e também pude acumular experiências únicas, tanto profissionais como pessoais. Além disso, agradeço pela enorme paciência, pela amizade e companheirismo na convivência diária e pela confiança em mim depositada. Acredito que não poderia ter escolhido lugar melhor para iniciar minha vida de pesquisador. Não poderia deixar de agradecer ao Zeca, Pedro e Rafaela, por inúmeras vezes terem compartilhado a atenção da Cris nos momentos em que ela corrigia meus relatórios, projeto e artigo, e também por todos os momentos de descontração que vivenciei com vocês. A vocês meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Jorge Iulek, que me ajudou a processar os dados em um novo programa (*XDS*), o que melhorou consideravelmente a qualidade dos mesmos. Além disso, sua idéia de testar novamente se os cristais eram geminados foi crucial para a conclusão deste trabalho, uma vez que a confirmação de que os cristais eram realmente geminados finalmente se revelou a resposta para o nosso problema de refinamento. Agradeço também ao Jorge pela amizade e por sempre ter se colocado a disposição para me ajudar em qualquer momento.

À Profa. Eliane C. A. Braga, por ceder alguns equipamentos e o pouco espaço físico do seu laboratório, que foram essenciais no desenvolvimento deste projeto, e, principalmente, pelo

seu bom humor que contagia a todos. As confraternizações de final de ano não seriam as mesmas sem a presença dela.

Aos Profs. Sérgio Akira Uyemura, Gustavo Henrique Goldman, Nádia Monesi e Mônica Tallarico Pupo, por disponibilizarem, sem nenhuma restrição, equipamentos e/ou reagentes que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. E também ao Laboratório de Bioquímica da FCFRP, por disponibilizar um espaço na câmara fria, onde alguns ensaios de cristalização foram realizados.

Ao Prof. Richard John Ward e ao Dr. Mario Sanches Matilde Junior, gostaria de agradecer pelas sugestões e colaborações no exame de qualificação, que foram importantes para o aprimoramento da Dissertação.

Ao Prof. João Santana, por ceder amostras de DNA genômico de *Trypanosoma cruzi*, imprescindíveis para a realização deste projeto.

Ao Prof. Otávio Thiemann e Susana Sculaccio, pela realização dos seqüenciamentos do DNA que codifica a enzima de estudo, também fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), por colocar a disposição a área experimental e o laboratório, pois sem esta infra-estrutura este trabalho não seria factível. Um agradecimento especial à Beatriz Guimarães e Mario Sanches, por terem auxiliado durante as coletas de dados e terem dado dicas relevantes para o desenvolvimento deste projeto, além de sempre se mostrarem dispostos a ajudar em qualquer tipo de problema. Não poderia deixar de agradecer ao técnico da linha de luz, Lucas, que sempre nos socorreu quando os problemas ocorriam com a linha, até com aqueles que insistiam em surgir durante a madrugada.

Às técnicas, Karla e Flávia, pelo convívio diário no laboratório. E ao técnico “xexelento” que com seus esforços me ajudou a obter o primeiro cristal que difratasse, após muitas tentativas frustrantes, e pelas conversas produtivas e idéias interessantes.

À secretária do departamento de física e química, Cidinha, pelos favores e prestação de serviços de suporte ao bom funcionamento do departamento.

Ao pessoal do LCP que sempre procura trabalhar em equipe visando o desenvolvimento de trabalho de qualidade no sentido de consolidar este novo centro na área de cristalografia de proteínas no campus da USP de Ribeirão Preto. Aos alunos de iniciação científica, Ricardo, Aline e Cíntia, agradeço pelos questionamentos constantes que me fizeram aprender cada vez mais, além da amizade e da agradável convivência.

Aos colegas da pós-graduação: Ana Lúcia, Naira, Ricardo, João Paulo, Fred, Vicente, Turco, Taisa, Carol, Paty, Camila, Daniela, Ana Paula e Sheila, pela convivência, pelas conversas, pelos momentos de descontração, inclusive nas festas pós-congressos, e, principalmente, pela integração científica e disseminação de conhecimentos.

Aos alunos de iniciação científica da Profa. Eliane, principalmente as alunas Laurinha (que tem orgulho deste meu “livrinho”) e Jamily, pela amizade e convivência. E um agradecimento especial à aluna de pós-graduação Camila, pela sua forma divertida de ser e conduzir as coisas, pela amizade, pelas vastas conversas, pela convivência, pelo companheirismo durante a realização de algumas disciplinas e, principalmente, apesar de ser das toxinas, ter se “agregado” à equipe LCP.

À minha família, amigos e a todos aqueles que passaram pela minha vida, e que são responsáveis pela pessoa que me tornei.

Ainda dentro dos Amigos, dois que o são e serão para sempre, e que por isso merecem um lugar especial nestes agradecimentos: Paty e Val. Nunca me esquecerei de como aprendemos juntos os primeiros passos de como se faz ciência. Nossos inúmeros trabalhos intensivamente em equipe como: mutirões para a realização de experimentos de cristalização até altas horas; revezamento durante as coletas de dados no Síncrotron, fundamental para agüentarmos aquelas intensas vinte e quatro ou quarenta e oito horas de experimentos; ajuda mútua durante os períodos de entrega de relatórios científicos; dentre tantas outras situações, me mostraram o quanto podemos crescer, profissionalmente e pessoalmente, com nossos companheiros. E é

com muito prazer que agradeço vocês por compartilharem comigo várias experiências, boas e ruins, e por me agüentar por todos esses anos reclamando e resmungando. Sei que sem a amizade, a companhia desde a graduação, o incentivo e o apoio de vocês, não seria nada fácil encarar as encruzilhadas que enfrentei durante a realização deste projeto. Sei que vocês duas torcem por mim, assim como eu torço por vocês, portando deixo aqui meus irrestritos agradecimentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela oportunidade de realização do curso de mestrado. E aos funcionários desta instituição, pela ajuda que de alguma maneira me foi prestada.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 05/58008-0) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos meu muito obrigado!

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1- INTRODUÇÃO	01
1.1- Diidroorotato desidrogenase.....	01
1.2- Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	06
2- OBJETIVOS	10
3- MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1- Clonagem de <i>TcDHODH</i>	11
3.2- Expressão de <i>TcDHODH</i>	12
3.3- Purificação de <i>TcDHODH</i>	13
3.3.1- Cromatografia por Afinidade (Ni-NTA).....	13
3.3.2- Cromatografia por Filtração em Gel.....	16
3.4- Dosagem da Proteína.....	18
3.4.1- Método de Bradford.....	18
3.4.2- Método do coeficiente de extinção molar.....	19
3.5- Ensaio de Atividade de <i>TcDHODH</i>	19
3.6- Cristalização de <i>TcDHODH</i>	20
3.6.1- Cristalização de <i>TcDHODH</i> na forma apo.....	22
3.6.1.1- Cristalização de <i>TcDHODH</i> na presença de óleo.....	24
3.6.1.2- Macrosemeadura (“macrosseding”).	25
3.6.1.3- Cristalização de <i>TcDHODH</i> sem a cauda de Histidina.....	25
3.6.1.4- Cristalização de <i>TcDHODH</i> com aditivos.....	26
3.6.2- Cristalização de <i>TcDHODH</i> com orotato.....	28
3.6.2.1- Experimentos de co-cristalização com orotato.....	28
3.6.2.2- Experimentos de “soaking” com orotato.....	30
3.7- Tratamento dos cristais antes da coleta de dados.....	30

3.7.1- Desidratação.....	30
3.7.2- “Soaking” com diferentes pHs.....	32
3.7.3- “Annealing”.....	33
3.7.4- “Cross-linking”.....	34
3.8- Coleta e Processamento de Dados.....	35
3.9- Resolução da Estrutura.....	36
3.10- Refinamento.....	37
3.10.1- Refinamento da estrutura de <i>Tc</i> DHODH.....	37
3.10.2- Refinamento da estrutura de <i>Tc</i> DHODH com dados “twinning”	38
3.11- Avaliação dos dados estereoquímicos.....	41
3.12- Análise e comparações Estruturais.....	41
4- RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.1- Clonagem de <i>Tc</i> DHODH.....	43
4.2- Expressão e Purificação de <i>Tc</i> DHODH.....	43
4.2.1- Cromatografia por Afinidade (Ni-NTA).....	43
4.2.2- Cromatografia por Filtração em Gel.....	44
4.3- Dosagem da Proteína.....	46
4.4- Ensaio de Atividade de <i>Tc</i> DHODH.....	47
4.5- Cristalização de <i>Tc</i> DHODH.....	49
4.5.1- Cristalização de <i>Tc</i> DHODH na forma apo.....	49
4.5.1.1- Cristalização na presença de óleo.....	51
4.5.1.2- Cristalização de <i>Tc</i> DHODH sem a cauda de Histidina.....	51
4.5.1.3- Macrosemeadura (“macrosseding”).....	53
4.5.1.4- Cristalização com aditivos.....	53
4.5.2- Cristalização de <i>Tc</i> DHODH com orotato.....	56
4.5.2.1- Experimentos de co-cristalização com orotato.....	56
4.5.2.2- Experimentos de “soaking” com orotato.....	59
4.6- Tratamento dos cristais antes da coleta de dados.....	60
4.7- Coleta, Processamento de Dados e Resolução da Estrutura	61
4.8- Refinamento.....	67
4.8.1- Refinamento da estrutura de <i>Tc</i> DHODH.....	67
4.8.2- Refinamento da estrutura de <i>Tc</i> DHODH com dados “twinning”	68

4.9- Avaliação dos dados estereoquímicos.....	72
4.10- Análise e comparações Estruturais.....	73
4.10.1- Descrição geral do monômero de <i>Tc</i> DHODH.....	73
4.10.2- Análise estrutural do tetrâmero de <i>Tc</i> DHODH.....	77
4.10.3- Proposta de mecanismo catalítico para a enzima <i>Tc</i> DHODH.....	83
4.10.4- Análise do sítio de ligação do FMN.....	85
4.10.5- Íon sulfato.....	87
4.10.6- Polimorfismo entre os diferentes genes de <i>Tc</i> DHODH.....	89
4.10.7- Comparações entre <i>Tc</i> DHODH e <i>Hs</i> DHODH.....	92
5- CONCLUSÕES	96
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Etapas da biossíntese <i>de novo</i> de nucleotídeos de pirimidinas. Figura adaptada de Nelson e Cox (2002).....	02
Figura 02 – Reação de oxidação-redução catalisada pela enzima DHODH. O hidrogênio H* é transferido para FMN como um hidreto, e o hidrogênio H' é perdido como um próton. No caso da enzima de <i>Trypanosoma cruzi</i> , fumarato é o agente oxidante, responsável pela oxidação do FMNH ₂ a FMN.....	04
Figura 03 – Estrutura tridimensional da enzima DHODH, exemplificando o motivo barril α/β . A molécula de FMN está representada como <i>ball e stick</i> em amarelo. Figura construída no programa <i>Pymol</i> (DELANO, 2002).....	05
Figura 04 – Barbeiro (vetor da doença de Chagas).....	06
Figura 05 – Interação entre a cauda de histidina da enzima (em azul) e o Ni ²⁺ da resina Ni-NTA Agarose (em vermelho).....	14
Figura 06 – Esquema geral da purificação de TcDHODH por cromatografia de afinidade.....	15
Figura 07 – Esquema geral da purificação por cromatografia de exclusão de tamanho. As proteínas maiores (vermelho) migram mais rapidamente pela coluna. As proteínas menores (verde) migram mais lentamente, por penetrarem em poros da matriz e percorrerem um caminho mais tortuoso.....	17
Figura 08 – (A) Difusão de vapor em gota suspensa (“hanging drop”); (B) Difusão de vapor em gota sentada (“sitting drop”).....	22
Figura 09 – Esquema do método de difusão de vapor em gota suspensa utilizando óleo.....	24
Figura 10 – Representação dos métodos utilizados nos experimentos de desidratação. a) Este método consiste em transferir o cristal para uma gota (50 μ L) contendo a solução do poço acrescida de 5 % do agente precipitante. A gota é deixada exposta para o ar durante 5 a 15 minutos. Este processo é repetido até o acréscimo de 30 % do agente precipitante, aumentando 5 % do agente precipitante em cada etapa. Na última etapa além dos 30 % do agente precipitante adicionado, também é adicionado 20 % do agente crioprotetor glicerol. b) Este método consiste em transferir o cristal para uma gota (50 μ L) contendo a solução do poço acrescida de 10 % do agente precipitante mais 20 % de glicerol (crioprotetor), deixando a gota exposta ao ar durante trinta minutos. c) Neste método o cristal é transferido para uma gota (5 μ L), colocada em uma lamínula, contendo a solução de cristalização acrescida de 10 % do agente precipitante. É montado um experimento do tipo gota pendurada com a solução do poço também acrescida de 10 % do agente precipitante. O experimento é selado por doze horas. Figura adaptada de Heras e Martin (2005).....	32
Figura 11 – Representação dos experimentos de “annealing”. a) Representação do primeiro método utilizado no experimento de “annealing”, onde o cristal é retirado da temperatura criogênica, transferido para a solução crioprotetora novamente, deixado nesta condição por cerca de 3 minutos, e levado novamente para a temperatura criogênica rapidamente (“flash-cooling”). b) Representação do segundo método utilizado no experimento de “annealing”, onde ocorre o bloqueio do gás de nitrogênio por dois segundos, em seguida este bloqueio é retirado, levando o cristal para a	

	temperatura criogênica novamente, por 6 segundos, processo este repetido por três vezes. c) Representação do terceiro método utilizado no experimento de “annealing”, onde o gás de nitrogênio é bloqueado uma única vez, por um maior período de tempo (30 segundos), e o bloqueio é retirado rapidamente, e o cristal volta à temperatura criogênica. Figura adaptada de Heras e Martin (2005).....	34
Figura 12 –	Representação esquemática da reação entre os aminoácidos lisina presentes na proteína e o reagente glutaraldeído.....	35
Figura 13 –	Representação esquemática no plano de um cristal geminado. Eixos a (em vermelho) e b (em azul) podem ser encontrados em diferentes orientações dentro do cristal, utilizando os mesmos pontos da rede. As celas encontradas em uma diferente orientação estão ilustradas em verde.....	39
Figura 14 –	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). (a) Padrão de massa molecular e perfil das lavagens na presença de 0, 25, 30 e 50 mM Imidazol. (b) Padrão de massa molecular e as sete primeiras eluições com 100 mM imidazol. <i>TcDHODH</i> migra com massa molecular de aproximadamente 37 kDa.....	44
Figura 15 –	Padronização da coluna Sephacryl TM S-100. A coluna foi padronizada em tampão HEPES 50 mM, 150 mM NaCl, pH 7.2. O volume de injeção de 500µL de cada padrão (~ 1 mg/mL) foi aplicado isoladamente.....	45
Figura 16 –	Perfil do volume de eluição versus o logaritmo da massa molecular dos padrões aplicados na coluna Sephacryl TM S-100. A equação da reta relaciona a massa molecular (M.W) com o volume de eluição (Ve).....	45
Figura 17 –	Perfil cromatográfico da purificação de <i>TcDHODH</i> por cromatografia de filtração em gel, utilizando a coluna Sephacryl TM S-100. Coluna equilibrada com tampão 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.2 e fluxo 1 mL/min.....	46
Figura 18 –	Curva padrão de Bradford. Concentração de BSA <i>versus</i> absorbância.....	47
Figura 19 –	Curva de absorbância a 300 nm versus tempo A concentração de proteína final é 270 nM e a concentração dos substratos fumarato e diidroorotato é, respectivamente, 1 mM e 30 µM. A curva em azul representa a atividade da enzima na ausência dos aditivos. A curva em vermelho representa a atividade da enzima na presença de 2µM de DTT e a curva em verde representa a atividade da enzima na presença de 5µM de β-mercaptoetanol.....	48
Figura 20 –	Curva de absorbância a 300 nm versus o tempo da medida de formação de orotato a 25 °C. A concentração de proteína final é 270 nM e a concentração dos substratos fumarato e diidroorotato é, respectivamente, 1 mM e 30 µM. A curva em vermelho representa a atividade da enzima na ausência do agente precipitante. A curva em preto representa a atividade da enzima na presença de 6 mM de sulfato de amônio.....	48
Figura 21 –	(a) cristal de <i>TcDHODH</i> (8 mg/mL) obtido na condição 5 do Crystal Screen 2 TM (2 M sulfato de amônio, 5 % v/v isopropanol); (b) cristal de <i>TcDHODH</i> (8,8 mg/mL) obtido na condição 1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5 e volume da gota 3 µL: 3 µL (solução de proteína : solução de cristalização); (c) cristal de <i>TcDHODH</i> (11,8 mg/mL) obtido na condição 1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5 e volume da gota 2 µL : 1 µL (solução de proteína : solução de cristalização).....	50
Figura 22 –	SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Demonstração da diminuição da massa molecular da enzima após clivagem.....	52
Figura 23 –	Cristal da enzima <i>TcDHODH</i> (12,4 mg/mL), purificada na presença de β-mercaptoetanol, obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol,	

	0,1 M acetato de sódio pH 5, 5 mM de β -mercaptoetanol) e volume da gota 2 μ L : 2 μ L (solução de proteína : solução de cristalização). Cristal de aproximadamente 0.40 mm, dimensão estimada com o “loop” de coleta.....	54
Figura 24 –	Cristal da enzima <i>TcDHODH</i> (10,8 mg/mL) obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 5 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5, 2 mM DTT) e volume da gota 2 μ L : 2 μ L (solução de proteína : solução de cristalização). Dimensão aproximada de 0.3 mm ao longo do eixo maior, estimada com o “loop” de coleta.....	55
Figura 25 –	Cristais da enzima <i>TcDHODH</i> (13 mg/mL) obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 5 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5.0, 2 mM DTT) e volume da gota 2 μ L : 2 μ L (solução de proteína : solução de cristalização). Dimensão aproximada de 0.4 mm ao longo do eixo maior, estimada com o loop de coleta.....	56
Figura 26 –	Cristal do complexo <i>TcDHODH</i> -orotato (concentração da proteína de 17.75 mg/mL). O cristal foi obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5) e volume da gota 3 μ L: 3 μ L (solução de proteína encubada com orotato : solução de cristalização).....	57
Figura 27 –	O tubo 1, coloração amarela, contém a enzima na forma apo. O tubo 2, coloração laranja, contém a enzima complexada com o orotato.....	58
Figura 28 –	Cristal do complexo <i>TcDHODH</i> -orotato (concentração da proteína de 16 mg/mL) obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5) e volume da gota 3 μ L: 3 μ L (solução de proteína encubada com orotato : solução de cristalização). Dimensão aproximada de 0.2 mm ao longo do eixo maior, estimada com o loop de coleta.....	58
Figura 29 –	Padrão de difração do cristal de Tc_DTT_01 coletado no LNLS. Em rosa estão apresentadas as linhas de resolução.....	65
Figura 30 –	A reta em vermelho representa o comportamento teórico da distribuição cumulativa de intensidades de um cristal não geminado. A curva em vermelho representa o comportamento teórico da distribuição cumulativa de intensidades de um cristal com geminação perfeita. A curva em azul representa a distribuição cumulativa de intensidades dos dados de <i>TcDHODH</i> , que é considerado um cristal com geminação parcial.....	68
Figura 31 –	A figura acima a qualidade do mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, com σ igual 1.0, representado em verde.....	71
Figura 32 –	Gráfico Ramachandram da estrutura final de <i>TcDHODH</i>	72
Figura 33 –	Monômero de <i>TcDHODH</i> com a denominação dos elementos de estrutura secundária, mostrando a localização do FMN (em verde). A região N-terminal está representada pela letra “N”, e a região C-terminal está sendo representada pela letra “C”. Figura em “stereo” construída no programa <i>Pymol</i> (DELANO, 2002).....	74
Figura 34 –	Alinhamento entre as seqüências de DHODH de <i>T. cruzi</i> cepa Y (<i>TcDHODH_Y</i>), cepa Tulahuen (<i>TcDHODH_T1</i> , <i>TcDHODH_T2</i> , <i>TcDHODH_T3</i>), cepa CL Brener (<i>TcDHODH_CLB1</i> , <i>TcDHODH_CLB2</i> , <i>TcDHODH_CLB3</i>) e DHODH de <i>L. lactis</i> (<i>LlDHODH(A)</i>), de <i>L. major</i> (<i>LmDHODH</i>) e de <i>T. brucei</i> (<i>TbDHODH</i>). As posições indicadas em amarelo correspondem aos resíduos localizados nas regiões polimórficas da enzima <i>TcDHODH</i> dos diferentes genes e cepas. As caixas em vermelho representam os resíduos que são conservados em todas as seqüências. Em azul está sendo representado os elementos de estrutura secundária, e sua nomenclatura, encontrados na estrutura da enzima <i>TcDHODH</i> cepa Y. O alinhamento foi realizado no programa <i>MultAlin</i> (CORPET, 1988), e imagem foi criada no programa <i>ESPrIt</i> (GOUET et al., 1999).....	76

- Figura 35** – Sobreposição entre as estruturas dos tetrâmeros, representadas apenas por C α , das enzimas *TcDHODH* e *TbDHODH*. Em verde está sendo representado as quatro moléculas de *TcDHODH*, e em roxo está sendo representada as quatro moléculas de *TbDHODH*. Figura construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002)..... 77
- Figura 36** – Tetrâmero de *TcDHODH*. As moléculas em amarelo (A) e verde (D) representam um dímero funcional, enquanto que as moléculas em rosa (C) e pink (B) representam o segundo dímero funcional. As moléculas de FMN estão sendo representadas azul. Representação estereográfica construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002)..... 80
- Figura 37** – Interações entre as subunidades A (verde) e D (roxo) responsáveis pela manutenção do dímero funcional. Em cinza está sendo representada a molécula de glicerol. Figura no programa *Pymol* (DELANO, 2002)..... 82
- Figura 38** – Representação esquemática do mecanismo da primeira etapa reacional das enzimas DHODHs de ambas as famílias. O esquema demonstra o mecanismo de reação proposto para a reação de oxidação do DHO a orotato. Os resíduos Lys45 e Lys166 são altamente conservados nas DHODHs. A base B⁻ representada em verde corresponde ao resíduo cisteína para as enzimas da família 1 e ao resíduo serina para as enzimas da família 2. No caso de *TcDHODH*, a base B⁻ corresponde a cisteína catalítica Cys132. Figura adaptada de Norager (2002)..... 84
- Figura 39** – Sugestão do mecanismo da oxidação do DHO. A conversão do DHO para orotato ocorre via um simples estado de transição, no qual a cisteína catalítica, Cys132, desprotona o DHO com a transferência de um hidreto ao FMN. Figura adaptada de Fraaije e Mattevi (2000)..... 85
- Figura 40** – Representação da molécula FMN e as interações com a enzima. As ligações de hidrogênio entre a proteína e a molécula FMN são mostradas com linhas pontilhadas em vermelho junto com as distâncias interatômicas em Å. Os átomos de carbono do FMN estão sendo representados em amarelo, os de nitrogênio em azul, os de oxigênio em vermelho e o de fósforo em laranja. A molécula do íon sulfato (SO₄²⁻) está representada em verde. Representação em “*stereo*” construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002)..... 86
- Figura 41** – A figura ilustra o íon sulfato posicionado ao lado da molécula FMN e o mapa de densidade eletrônica 2F_o-F_c, com σ igual 1.5. O íon está sendo representado com o átomo de enxofre em verde e os átomos de oxigênio em vermelho. Figura construída no programa *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004)..... 87
- Figura 42** – As interações entre os resíduos de *TcDHODH* mais duas moléculas de água (representadas por asterisco em preto) e o íon sulfato, no sítio ativo, estão representadas por tracejados em preto. A molécula de orotato, representada em verde, é proveniente da sobreposição da estrutura da enzima *TcDHODH* com a estrutura da enzima do complexo *LtDHODH*-orotato (ROWLAND et al., 1998). As interações entre os resíduos de *TcDHODH* e a molécula orotato estão sendo representadas em vermelho. Representação em “*stereo*” construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002)..... 88
- Figura 43** – Interações do FMN no sítio ativo das DHODHs de *TcDHODH* (A), *TbDHODH* complexada com orotato (B), *LmDHODH* complexada com fumarato (C), *LmDHODH* complexada com orotato (D), *LtDHODH*(A) nativa (E), *LtDHODH*(A) complexada com orotato (F), *HsDHODH* complexada com orotato (G), *EcDHODH* complexada com orotato (H) e *PfDHODH* complexada com orotato (I). Nota-se um semelhança nas interações dos resíduos das enzimas com o orotato, e a proximidade do carbono C5 do orotato com o nitrogênio N5 do FMN. Em *TcDHODH* (A) encontra-se o íons sulfato na mesma posição que as moléculas de orotato nas outras enzimas, e também na mesma posição que a molécula fumarato na enzima de

- LmDHODH* (C). Figura construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002)..... 89
- Figura 44 –** Alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos que codificam a enzima DHODH. TcDHODH_Y corresponde ao gene da DHODH de *T. cruzi* da cepa Y. TcDHODH_T1, TcDHODH_T2, TcDHODH_T3 correspondem aos três diferentes genes que codificam a enzima DHODH de *T. cruzi* da cepa Tulahuen. TcDHODH_CLB1, TcDHODH_CLB2, TcDHODH_CLB3 correspondem aos três diferentes genes que codificam a enzima DHODH de *T. cruzi* da cepa CL Brener. Em amarelo estão sendo indicadas as 28 posições onde ocorre o polimorfismo. O alinhamento foi realizado no programa *MultAlin* (CORPET, 1988)..... 90
- Figura 45 –** Localização estrutural dos resíduos polimórficos (representados em roxo). Representação em “*stereo*” construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002)..... 92
- Figura 46 –** Alinhamento seqüencial baseado em estrutura entre as enzimas DHODH de *T. cruzi* cepa Y (TcDHODH_Y) e humana (HsDHODH). Na parte superior do seqüenciamento estão sendo representados os elementos de estrutura secundária presentes na enzima do parasito, já na parte inferior estão sendo representados os elementos de estrutura secundária da enzima humana. As regiões em amarelo correspondem àquelas em que as enzimas possuem os maiores desvios entre os resíduos. Os resíduos que interagem com o orotato estão assinalados com um quadradinho verde, enquanto que os resíduos que interagem com o FMN estão assinalados com um quadradinho em pink. A figura foi criada no programa *ESPrIt* (GOUET et al., 1999)..... 93
- Figura 47 –** Ilustração das interações responsáveis pela manutenção da conformação fechada do “loop” ativo. Ao fundo, em amarelo, está representada a molécula de FMN. As interações são mostradas com linhas pontilhadas em vermelho. O “loop” representado em cinza corresponde ao “loop” ativo. Representação em “*stereo*” construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002)..... 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 –	Dados cristalográficos e estatísticos para os diferentes conjuntos de dados coletados no LNLS ($\lambda=1.427\text{\AA}$), a 100K. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado.....	66
Tabela 02 –	Dados cristalográficos e estatísticos para o processamento das 90 primeiras imagens do conjunto de dados Tc_DTT_01, coletado no LNLS ($\lambda=1.427\text{\AA}$), a 100K. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado. Algumas informações referentes ao refinamento também estão sendo representadas nesta tabela.....	71
Tabela 03 –	Ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades A e D, que são responsáveis pela manutenção de um dos dímeros funcionais encontrado na estrutura de TcDHODH.....	79
Tabela 04 –	Ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades B e C, que são responsáveis pela manutenção do segundo dímeros funcional encontrado na estrutura de TcDHODH.....	79
Tabela 05 –	Ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades A e B, que são responsáveis pela manutenção do tetrâmero de TcDHODH encontrado na unidade assimétrica.....	81
Tabela 06 –	Ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades A e D, que são responsáveis pela manutenção do tetrâmero de TcDHODH encontrado na unidade assimétrica.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina de soro bovino
DHO	Diidroorotato
DHODH	Diidroorotato desidrogenase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
<i>Ec</i> DHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Escherichia coli</i>
FMN	Flavina mononucleotídeo
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
<i>Hs</i> DHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosídeo
LB	Luria-Bertani
<i>L/D</i> DHODH(A)	Diidroorotato desidrogenase de <i>Lactococcus lactis</i> A
<i>Lm</i> DHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Leishmania major</i>
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
NCS	Simetria não cristalográfica
PEG	Polietilenoglicol
<i>Pf</i> DHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Plasmodium falciparum</i>
PI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribonucléico
Rmsd	Desvio médio quadrático
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
<i>Tb</i> DHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma brucei</i>
<i>Tc</i> DHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano

RESUMO

PINHEIRO, M. P. **Estudos cristalográficos da enzima diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***. 2008. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, esta considerada um problema de saúde pública na América Latina. Cerca de 10 a 14 milhões de pessoas estão infectadas com o *Trypanosoma cruzi* e 40–120 milhões de pessoas correm o risco de contrair a doença. Diidroorotato desidrogenase (DHODH) é uma flavoenzima que catalisa a oxidação de L-diidroorotato em orotato, a quarta e única reação redox na biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas. Atualmente, existe um grande interesse em inibidores da DHODH como agentes terapêuticos para o tratamento de câncer, artrite reumatóide e doenças parasitárias. Em particular, estudos genéticos têm mostrado que DHODH é essencial para a sobrevivência do *T. cruzi*, validando a idéia de que DHODH pode ser considerada um alvo atraente para o desenvolvimento de drogas antichagásicas. Neste trabalho, reportamos a estrutura cristalográfica da enzima DHODH de *Trypanosoma cruzi* cepa Y (*TcDHODH*), uma cepa parcialmente resistente a drogas e altamente virulenta. O gene de *TcDHODH* que codifica um polipeptídeo consistindo de 314 aminoácidos foi clonado em pET-28a entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Not*I. A enzima *TcDHODH* foi expressa como uma proteína solúvel em *E. coli* BL21 (DE3) através da indução com 1 mM IPTG por 5 h a 25 °C e purificada utilizando cromatografia por afinidade em resina Ni-NTA. A cristalização de *TcDHODH* foi realizada utilizando o método de difusão de vapor em gotas suspensa e pendurada contra o reservatório contendo 1,5 M sulfato de amônio, 5% 2-propanol em 0,1 M acetato de sódio pH 5 adicionado de 2 mM ditioneitol (DTT). A coleta de dados foi realizada na linha de luz D03B-MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) com radiação a 1,427 Å. Cristais de *TcDHODH* difratam à resolução de 2,2 Å e crescem no grupo espacial P2₁2₁2₁ com parâmetros de cela a = 82.39, b = 123.92 e c = 128.89 Å. A estrutura foi resolvida por técnicas de substituição molecular e refinada a 2,2 Å de resolução. Uma análise detalhada da enzima *TcDHODH* cepa Y tem nos permitido identificar características estruturais que podem ser melhor exploradas para o desenho de inibidores altamente específicos através da tecnologia de desenho de drogas baseado em estrutura, como uma importante ferramenta no combate a doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; cepa Y; Diidroorotao desidrogenase; Clonagem; Expressão; Purificação; Cristalização; Cristalografia de raio-X.

ABSTRACT

PINHEIRO, M. P. **Crystallographic studies of dihydroorotate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi***. 2008. 106 f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas' disease, considered a public health problem in Latin America. Ten to 14 million people are infected by *Trypanosoma cruzi* and 40–120 million people are at risk of infection. Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) is a flavin mononucleotide containing enzyme, which catalyses the oxidation of L-dihydroorotate to orotate, the fourth step and only redox reaction in the *de novo* biosynthesis of pyrimidine nucleotides. At present, there is a great interest in inhibitors of DHODH as therapeutic agents for the treatment of cancer, rheumatoid arthritis and parasitic disease. In particular, genetic studies have shown that DHODH is essential for *T. cruzi* survival, validating the idea that DHODH can be considered an attractive target for the development of antichagasic drugs. Here, we report the crystal structure of *Trypanosoma cruzi* DHODH from Y strain (*TcDHODH*), a partially drug-resistant and highly virulent strain. The *TcDHODH* gene that encodes a polypeptide consisting of 314 amino acid residues was cloned into *Bam*HI and *Not*I restriction sites of pET-28a. The *TcDHODH* was functionally expressed as a soluble protein in *E. coli* BL21 (DE3), through induction with 1 mM IPTG for 5 h at a temperature of 25 °C and purified to homogeneity using affinity chromatography on Ni-NTA resin. The crystallization of *TcDHODH* was performed using vapor diffusion method in sitting and hanging drops against a reservoir solution containing 1.5 M ammonium sulfate, 5% 2-propanol in 0.1 M sodium acetate pH 5 plus the addition of 2 mM dithiothreitol (DTT). Data collection was performed at the D03B-MX1 beam line of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) using 1.427 Å radiation. *TcDHODH* crystals diffract up to 2.2 Å resolution and belong to space group P2₁2₁2₁ with unit cell dimensions a = 82.39, b = 123.92 and c = 128.89 Å. The structure has been solved by molecular replacement techniques and refined up to 2.2 Å resolution. A detailed analysis of *TcDHODH* strain Y has allowed us to identify structural characteristics that can be further exploited for design of highly specific inhibitors through the technology of structure-based drug design as an important tool to fight against Chagas' disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Y strain; Dihydroorotate dehydrogenase; Cloning; Expression; Purification; Crystalization; X-ray crystallography.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Diidroorotato desidrogenase*

A síntese de nucleotídeos é essencial para o desenvolvimento de todos e quaisquer organismos. Além de participarem como unidades fundamentais dos ácidos nucleicos, DNA e RNA, os nucleotídeos atuam também como ativadores e inibidores de várias vias do metabolismo intermediário das células. Em organismos multicelulares, a produção de nucleosídeos, e dos seus correspondentes nucleotídeos, através da via metabólica de salvação, satisfaz as necessidades celulares. No entanto, células que crescem rapidamente e muitos parasitos não conseguem reciclar a quantidade necessária de nucleosídeos e bases através das vias de salvação, passando a depender da biossíntese *de novo* para a síntese eficiente de precursores de ácidos nucleicos.

A biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina é uma importante via metabólica, altamente conservada em eucariotos e procariotos. A via *de novo* é composta de seis enzimas: carbamil fosfato sintetase (CPSase), aspartato transcarbamilase, diidroorotase, diidroorotato desidrogenase, orotato fosforibosil transferase e orotodilato descarboxilase, que realizam uma série de reações. O produto resultante de cada reação enzimática é utilizado como substrato pela enzima subsequente da via (**Figura 1**) (STRYER, 1995; NELSON; COX, 2002).

No quarto passo desta via metabólica, atua a enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), responsável pela conversão da molécula L-diidroorotato (DHO) em orotato (**Figura 1**).

Figura 1: Etapas da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas. Figura adaptada de Nelson e Cox (2002).

Esta reação corresponde à única etapa de oxidação-redução na síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina (**Figura 2**) (JONES, 1980). Durante a catálise, DHODH utiliza a flavina mononucleotídeo (FMN, $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_9\text{P}_1$) como coenzima, para, na primeira parte da

reação, promover a oxidação do substrato DHO enquanto FMN é reduzido. Na segunda parte da reação, FMN é reoxidado (FMNH₂ convertido em FMN) através do auxílio de um segundo substrato, o agente oxidante, cuja natureza varia entre as enzimas de diferentes origens biológicas. Por exemplo, no caso da enzima DHODH de tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*, fumarato é o agente oxidante (TAKASHIMA et al., 2002; FELICIANO et al, 2006).

As enzimas DHODHs são atualmente divididas nas famílias 1 e 2, e esta divisão está de acordo com a localização celular, características estruturais e propriedades funcionais dessas enzimas. As enzimas da família 1 são encontradas no citosol, enquanto que as da família 2 são encontradas associadas às membranas citosólicas ou mitocondrial. Devido a esta associação com a membrana, todos os membros da família 2 apresentam uma extensão na região N-terminal, denominada domínio de membrana, onde a presença de resíduos hidrofóbicos permitem a interação dessas enzimas com a membrana. A identidade sequencial entre membros das famílias 1 e 2 é de aproximadamente 20%. As enzimas da família 1 são encontradas em bactérias do tipo Gram-positivas e fungos anaeróbicos, enquanto que as da família 2 são encontradas em eucariotos superiores e alguns procariotos como bactérias do tipo Gram-negativa. A divisão das DHODHs em duas famílias correlaciona também a preferência dessas enzimas por diferentes receptores de elétrons. As enzimas da família 1 utilizam como receptores de elétrons moléculas de oxigênio ou moléculas solúveis em água, como fumarato ou NAD⁺, que oxidam FMNH₂ para a regeneração de FMN (JONES, 1980). Já as enzimas da família 2 utilizam, como receptores de elétrons, moléculas de caráter hidrofóbico. No caso da enzima humana, pertencente à família 2, ubiquinona é o agente oxidante (JONES, 1980). A família 1 das DHODHs é dividida em dois subgrupos A e B. DHODHs da família 1A são proteínas homodiméricas que contém um resíduo cisteína como base catalítica e utilizam fumarato como receptor de elétrons (NAGY et al., 1992;

BJORNBERG et al., 1997; ROWLAND et al., 1997). DHODHs da família 1B são enzimas heterotetraméricas, que utilizam NAD^+ como agente oxidante e contém não somente o FMN (como as outras DHODHs) mas também uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e um agregado de Fe-S (NIELSEN et al., 1996; ROWLAND et al., 2000).

Figura 2: Reação de oxidação-redução catalisada pela enzima DHODH. O hidrogênio H* é transferido para FMN como um hidreto, e o hidrogênio H' é perdido como um próton. No caso da enzima de *Trypanosoma cruzi*, fumarato é o agente oxidante, responsável pela oxidação do FMNH₂ a FMN.

A enzima DHODH tem sido considerada o alvo promissor no desenvolvimento de fármacos com atividade anti-inflamatória, imunossupressora, antiproliferativa e antiparasitária (CHRISTOPHERSON et al., 2002; CHEN et al., 1992; JOCKEL et al., 1998; HARDER; HABERKORN, 1989; ITTARAT et al., 1995). O potencial terapêutico da inibição desta via metabólica, através da inibição específica da enzima DHODH, tem sido demonstrado por compostos como Leflunomida (ARAVA®), recentemente aprovado para o tratamento de

artrite reumática, Brequinar sendo testado como antineoplásico e o atavaquone (Malarone®) atualmente prescrito como medicamento anti-malária.

Até o presente momento, a estrutura de DHODH foi resolvida para sete diferentes tipos de organismos: *Homo sapiens* (LIU et al., 2000), *Plasmodium falciparum* (HURT et al., 2005), *Escherichia coli* (NORAGER et al., 2002), *Lactococcus lactis* (ROWLAND et al., 1998), *Trypanosoma brucei* (PDB código 2B4G, manuscrito em preparação), e a estrutura das enzimas DHODH de *Leishmania major* (CORDEIRO et al., 2006, manuscrito em preparação) e de *Trypanosoma cruzi* (PINHEIRO et al., 2008) foram recentemente resolvidas em nosso laboratório. Em termos gerais, as enzimas apresentam uma estrutura terciária similar. Ambas se enovelam em um motivo barril α/β (domínio catalítico) (**Figura 3**). O sítio de ligação do orotato é localizado na parte superior do barril onde várias fitas formam o bolso de ligação do substrato e do FMN (ROWLAND et al., 1998).

Figura 3. Estrutura tridimensional da enzima DHODH, exemplificando o motivo barril α/β . A molécula de FMN está representada como *ball e stick* em amarelo. Figura construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002).

No presente trabalho, o foco de estudo foi a determinação da estrutura cristalográfica da enzima DHODH de *Trypanosoma cruzi* (*TcDHODH*). A estrutura tridimensional permitiu a identificação de diferenças estruturais e funcionais entre as diferentes classes de DHODH que poderão ser exploradas para o planejamento de inibidores específicos contra *TcDHODH*.

como uma importante ferramenta para o planejamento de moléculas com atividade antiparasitária.

1.2. *Diidroorotato desidrogenase de Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas foi descrita em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas. Apesar de estarmos a um ano do centenário da doença de Chagas, esta é ainda considerada um problema de saúde pública na América Latina. O agente etiológico causador da doença é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. A primeira forma de transmissão do protozoário ao homem foi descrita como sendo através das fezes do inseto hematófago *Triatoma infestans*, um percevejo conhecido popularmente como barbeiro (**Figura 4**). Neste caso, a transmissão ocorre durante o ato da alimentação do vetor, barbeiro. Assim que o inseto termina de se alimentar, ele defeca, eliminando protozoários e colocando-os em contato com a ferida e a pele da vítima. Esta primeira forma de transmissão identificada ocorria predominantemente em áreas rurais, cujas condições precárias de moradia favoreciam a nidificação dos barbeiros.

Figura 4: Barbeiro (vetor da doença de Chagas).

Embora inicialmente a doença de Chagas fosse considerada predominantemente rural, a migração da população para áreas urbanas mudou a característica epidemiológica da doença e a transformou em uma infecção do tipo urbana. Neste novo contexto, surgiram novas formas de transmissão da doença, como por transfusão sanguínea, através de transplante de órgãos, via congênita e via oral. Os números de infecção nos bancos de sangue em algumas cidades do continente variam de 1,7% a 53%, mostrando que a infecção de

Chagas por sangue contaminado é maior que a infecção de Aids e Hepatites B e C (www.who.int).

Existem dois estágios da doença: a fase aguda que aparece logo após a infecção e a fase crônica que aparece depois de um período longo sem que a doença se manifeste, período este que pode levar até vários anos. Cerca de 25 a 40% dos indivíduos infectados podem desenvolver a fase crônica da doença. Insuficiência cardíaca, cardiomegalia (dilatação do coração), problemas na formação e condução dos estímulos cardíacos, megaesofagia (dilatação da parede do esôfago) e megacolia (dilatação da parede intestinal) são os sintomas mais freqüentes e que podem levar um paciente chagásico à morte (GELB; HOL, 2002; DIAS et al., 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A distribuição geográfica da doença engloba desde o México até o sul da Argentina, afetando de 10 a 14 milhões de pessoas, e cerca de 40 a 120 milhões de pessoas correm o risco de contrair a doença (GELB; HOL, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Mesmo com os grandes avanços no controle da transmissão do parasito via transfusão sanguínea e através do inseto vetor que vem sendo realizados em partes da América do Sul (DIAS et al., 2002; GURTLE et al., 2007), quimioterapias mais efetivas ainda são necessárias para tratar as milhares de pessoas já infectadas. As duas drogas existentes para o tratamento da doença, o nifurtimox e o benznidazol, atuam apenas na fase aguda e recente da infecção pelo *T. cruzi* e apresentam grandes limitações pelos seus efeitos colaterais, além de exibirem significativa toxicidade (COURA; DE CASTRO, 2002). Além disso, a eficácia dessas drogas varia de acordo com a região geográfica, provavelmente devido a diferenças na susceptibilidade à droga entre as diferentes cepas de *T. cruzi* (MARTINEZ-DIAZ et al, 2001).

Apesar dos grandes esforços e conseqüentes progressos alcançados no estudo da doença de Chagas, até o presente momento não existem vacinas e nenhum medicamento eficaz para combater o *T. cruzi* nos diferentes estágios da doença.

Atualmente, os projetos de seqüenciamento genômico e genoma estrutural constituem ferramentas importantes para a descoberta de novos alvos terapêuticos, proporcionando assim novas estratégias para o planejamento de compostos anti-chagásicos.

Um exemplo desta estratégia é a descoberta da enzima diidroorotato desidrogenase como potencial alvo para fármacos com atividade contra o *T. cruzi*. A utilização da síntese *de novo* dos nucleotídeos de pirimidinas pelo *T. cruzi* foi inicialmente identificada através do seqüenciamento de um fragmento de DNA genômico do parasito de aproximadamente 25kbases (GAO et al., 1999). Neste trabalho, foi reportado a presença dos seis genes que codificam todas as seis proteínas da via *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, incluindo a enzima diidroorotato desidrogenase (*TcDHODH*) (**Figura 1**). Além do papel da DHODH na biosíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, *TcDHODH* foi descrita como uma fumarato redutase solúvel que desempenha um papel importante no controle da quantidade de fumarato/succinato na célula (TAKASHIMA et al., 2002). Estudos posteriores utilizando experimentos de “*Knock out*” do gene que codifica a enzima diidroorotato desidrogenase de *T. cruzi* (*TcDHODH*) sugerem um papel vital desta enzima para a sobrevivência do parasito (ANNOURA et al., 2005).

Uma predição baseada na seqüência dos 314 resíduos da enzima *TcDHODH* cepa Y (<http://au.expasy.org>), indicou sua massa molecular (34.052Da), seu ponto isoelétrico teórico (5.6) e, segundo a sua estrutura primária, sua classificação como membro da família 1A das DHODHs. *TcDHODH* apresenta 56% de identidade seqüencial com DHODH de *Lactococcus lactis* A (*LlDHODH*(A)), 75% com DHODH de *Leishmania major* (*LmDHODH*), 79% com DHODH de *Trypanosoma brucei* (*TbDHODH*), 27% com DHODH humana (*HsDHODH*),

25% com DHODH de *Escherichia coli* (EcDHODH) e 29% com DHODH de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH).

Nossos resultados têm como principal papel correlacionar a estrutura tridimensional com a atividade biológica de DHODH em tripanosomatídeos e identificar diferenças estruturais relevantes a serem utilizadas no planejamento de inibidores específicos contra *Tc*DHODH que poderão, no futuro, ser utilizados como protótipos para a descoberta de novos fármacos para tratamento do mal de Chagas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo a determinação da estrutura cristalográfica da enzima diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* cepa Y (*TcDHODH*). Os resultados permitiram correlacionar a estrutura tridimensional com sua atividade biológica de forma a identificar regiões a serem exploradas no planejamento de ligantes específicos e seletivos para a enzima *TcDHODH*.

Diversas etapas foram necessárias para atingir este objetivo, como:

- Clonagem da enzima *TcDHODH*;
- Expressão da enzima *TcDHODH* na forma recombinante;
- Cristalização da enzima *TcDHODH*;
- Otimização da qualidade dos cristais;
- Coleta e processamento de dados, através de difração de raios-X em monocristais;
- Identificação e caracterização do grau de geminação dos cristais.
- Resolução da estrutura cristalográfica por técnicas de substituição molecular;
- Refinamento da estrutura cristalográfica;
- Validação da estrutura cristalográfica;
- Análises e comparações estruturais criteriosas entre as enzimas DHODHs, com estruturas resolvidas, de diversos organismos (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Lactococcus lactis*, *Escherichia coli*, *Plasmodium falciparum* e humana).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Clonagem de TcDHODH*

A enzima *TcDHODH* foi clonada em nosso laboratório pela Profa. Dra. Maria Cristina Nonato. Amostras de DNA genômico da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) utilizado como DNA template para a clonagem, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. João Santana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os primers utilizados foram TcBamHI: 5'-GACGACGGATCCATGATGTGTCTGAAGCTCAACCTC-3', que contém adaptado o sítio de restrição para BamHI (sublinhado) e TcNotI: 5'-GACGACGCGGCCGCTTCACTCAATTGTCTTGACACGTCC-3' que contém adaptado o sítio de restrição para NotI (sublinhado).

O vetor utilizado, pET28a (Novagen), possui uma região codificadora de uma cauda de 6 histidinas na região 5' anterior ao sítio de restrição múltiplo. Tanto o vetor quanto o gene foram submetidos a uma digestão enzimática com BamHI e NotI. Após, o produto da reação de ligação foi submetido à digestão com EcoRI, para eliminar produtos de ligação que não continham o inserto, e transformado em *E. coli* (DH10B) por eletro transformação. A reação de ligação foi checada através de PCR de colônia. A análise da presença dos insertos em cada colônia foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. DNA purificado foi seqüenciado no laboratório de Cristalografia de Proteínas do IFSC (sob a supervisão do Prof. Dr. Otavio Thiemann). Amostras da construção *TcDHODH*-pET28a foram transformadas em *Escherichia coli* – BL21(DE3), resistente a kanamicina, e foram mantidas em nitrogênio líquido na forma de estoque em glicerol.

3.2 Expressão de TcDHODH

As etapas de expressão da enzima TcDHODH são realizadas em ambiente estéril. Para a preparação do pré-inóculo, amostras de estoque em glicerol, ou uma colônia previamente isolada, são utilizadas para inocular 10 mL de meio de cultura LB (Luria-Bertani) na presença do antibiótico apropriado, kanamicina (30 µg/mL). O material é mantido em uma incubadora sob agitação por aproximadamente 15 horas à 200 rpm e 37 °C. Para a expressão de um litro de cultura de células, o meio de cultura LB na presença de kanamicina é inoculado com a solução do pré-inóculo na proporção 1:100 e mantido sob agitação à 200rpm e 37 °C. O crescimento das células é monitorado medindo-se a DO₆₀₀ (densidade ótica do meio de cultura em um comprimento de onda de 600nm). A indução da expressão de TcDHODH é realizada com a adição de 1mM de IPTG (isopropyl β-D-1-tiogalactopiranosídeo) quando a DO₆₀₀ atinge o valor entre 0,5 e 0,7 e o tempo de indução otimizado é de aproximadamente 5 horas a 25 °C. Neste sistema de expressão, o DNA de interesse é clonado em um plasmídeo contendo o *lacI* (repressor), *lacP* (promotor) e *lacZ* (gene estrutural transcrito para mRNA da beta-galactosidase). A indução da transcrição é obtida pela adição de um análogo de lactose sintético e não degradável (IPTG), o qual se associa ao repressor e inibe-o, deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase e conseqüente transcrição do gene de interesse.

Após cinco horas de indução, a cultura é dividida em quatro partes, 250 mL cada, e centrifugada numa rotação de 6.000 g por 15 minutos a 4 °C. As células são armazenadas a -20 °C e o sobrenadante descartado.

3.3 *Purificação de TcDHODH*

Todos os passos da purificação são realizados à baixa temperatura (4°C) para evitar a desnaturação da proteína. Para evitar desperdício e realizar os experimentos de cristalização com proteína fresca, em cada etapa de purificação são ressuspensas células provenientes de 250 mL de meio de cultura. As células são inicialmente descongeladas e ressuspensas em um tampão apropriado denominado **tampão de lise** (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 1 mM PMSF). Para ressuspender as células são utilizados aproximadamente 3 mL do tampão de lise para cada 1 g de células. O material ressuspensado é sonicado 10 vezes em pequenos intervalos de tempo (30 segundos). Após ter sido sonificada, a amostra é centrifugada por uma hora a 10.000 g e 4 °C.

Para o isolamento da proteína de interesse, TcDHODH, o sobrenadante, denominado extrato bruto, é submetido a duas etapas de purificação constituídas de uma cromatografia por afinidade em coluna de Ni-NTA (Qiagen) e cromatografia por exclusão molecular em coluna SephacrylTM S-100 (Amersham Bioscience).

3.3.1 **Cromatografia por Afinidade (Ni-NTA)**

O primeiro método cromatográfico utilizado para a purificação da enzima TcDHODH é a de **cromatografia de afinidade**. Neste processo, as proteínas são separadas de acordo com a afinidade por um determinado ligante. Em nosso caso, TcDHODH é expressa em fusão com uma cauda contendo seis aminoácidos de histidina que confere à enzima, em pH apropriado, afinidade por íons bivalentes carregados positivamente. A resina utilizada nesta etapa possui como matriz (conjunto ligante-polímero) íons de níquel ligados a agarose, Ni-NTA (Qiagen) (**Figura 5**).

A resina é inicialmente equilibrada com o **tampão de ligação** (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄ e 300 mM NaCl), o extrato bruto é adicionado e o eluente coletado. Este primeiro

eluente normalmente apresenta uma pequena quantidade da enzima *TcDHODH* que não se liga à coluna juntamente com a maioria dos contaminantes.

Figura 5: Interação entre a cauda de histidina da enzima (em azul) e o Ni^{2+} da resina Ni-NTA Agarose (em vermelho).

Para a remoção de contaminantes que eventualmente interajam com a resina, a mesma é lavada com um gradiente crescente de imidazol (0 mM à 50 mM imidazol). A eluição da enzima *TcDHODH* é feita na presença de 100 mM de imidazol (pH 8, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl e 100 mM imidazol) em 12 alíquotas de 2 mL cada, denominadas de E_1 até E_{12} . Uma representação esquemática dos passos da purificação por afinidade da enzima *TcDHODH* é representado na **Figura 6**.

Figura 6: Esquema geral da purificação de TcDHODH por cromatografia de afinidade.

O grau de pureza da enzima é monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Na eletroforese em presença de SDS, as proteínas são separadas quase exclusivamente com base em sua massa molecular. O SDS ligado à proteína contribui com uma grande carga líquida negativa e as proteínas movem-se para o interior do gel quando um campo elétrico é aplicado; proteínas menores movem-se mais rapidamente no gel do que proteínas maiores, portanto, serão encontradas na extremidade inferior, onde se localiza o pólo positivo (NELSON; COX, 2002).

Análise do grau de pureza por SDS-PAGE para a verificação da pureza da enzima TcDHODH é realizada em todas as etapas de purificação. A revelação do gel é efetuada com o corante “Coomassie brilliant blue”.

3.3.2 Cromatografia por Filtração em Gel

Análises por SDS-PAGE indicavam que a purificação da enzima *TcDHODH* utilizando o protocolo de cromatografia por afinidade era suficiente para alcançar um grau de pureza necessário para os ensaios de cristalização. No entanto, os cristais inicialmente obtidos eram pequenos e experimentos iniciais de difração de raios-X realizados na linha de cristalografia de proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (DO3BMX1 - LNLS) resultaram em dados de baixa resolução e não adequados para a resolução da estrutura.

Com o objetivo de melhorar a qualidade dos cristais, uma nova etapa de purificação foi adicionada. Inicialmente, utilizamos uma cromatografia de troca iônica utilizando a resina Q-sepharose (Amersham Bioscience) sem sucesso. No entanto, o aumento no tamanho dos cristais foi obtido quando utilizamos como segunda etapa de purificação a cromatografia de exclusão por tamanho.

A cromatografia de exclusão por tamanho, também denominada filtração em gel, separa as proteínas de acordo com seus tamanhos. A matriz de uma coluna do tipo filtração em gel é composta de um polímero com ligações cruzadas, formando poros de diferentes tamanhos. As proteínas menores penetram nesses poros e são retardadas por percorrerem um caminho mais tortuoso. As proteínas maiores migram mais rapidamente que as de menor peso molecular por serem grandes demais para penetrar nos poros, e percorrem um percurso mais direto através da coluna (**Figura 7**) (NELSON; COX, 2002).

Figura 7: Esquema geral da purificação por cromatografia de exclusão de tamanho. As proteínas maiores (vermelho) migram mais rapidamente pela coluna. As proteínas menores (verde) migram mais lentamente, por penetrarem em poros da matriz e percorrerem um caminho mais tortuoso.

A cromatografia por filtração em gel também pode ser utilizada para isolar proteínas na forma agregada e para certificarmos que os experimentos de cristalização estão sendo realizados com a solução de proteína na forma homogênea e na forma oligomérica esperada.

Desta forma, inicialmente foi realizada uma padronização da coluna utilizando marcadores moleculares de massas moleculares conhecidas: citocromo C, inibidor de tripsina, ovalbumina, BSA e Beta-galactosidade. A corrida foi realizada com um fluxo na coluna de 1,0 mL/min, com um tampão de corrida apropriado (pH 7.2, 50 mM Hepes e 150 mM NaCl) para manter a estabilidade da proteína. A cromatografia de filtração em gel é realizada em um sistema de cromatografia líquida ÄKTA *prime*TM, utilizando uma coluna contendo 120 mL da resina SephacrylTM S-100 (Amersham Bioscience). Para a purificação de *TcDHODH*, as frações eluídas da purificação por cromatografia por afinidade são combinadas, concentradas e dialisadas contra o tampão de corrida utilizando o concentrador Ultrafree-10kDa (Millipore). A concentração da proteína antes de ser injetada na coluna varia de 10 a 15mg/mL. Após a finalização da corrida e obtenção do cromatograma, as frações correspondentes ao centro do pico de absorbância referente a enzima de interesse são

combinadas, e em seguida a enzima é concentrada em um concentrador Ultrafree-10kDa (Millipore).

3.4 *Dosagem de TcDHODH*

3.4.1 Método de Bradford

O método de Bradford utilizado para determinar a concentração de uma solução de proteína (BRADFORD, 1976) é baseado na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 600 nm (ZAIA et al., 1998). Para a realização da estimativa da concentração da proteína através do método de Bradford, utilizamos como referência amostras de Albumina de soro bovino (BSA) de concentração conhecida (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL e 30 µg/mL).

Adiciona-se, em cada poço de uma placa de Elisa, 160 µL de cada amostra juntamente com 40 µL do reagente de Bradford (BIORAD), deixando a mistura bem homogeneizada e livre de bolhas. A placa é lida em um comprimento de onda de 600 nm e após a obtenção dos valores das absorbâncias das amostras padrões é traçada uma curva de calibração. Com os coeficientes da reta obtidos a partir da curva de calibração, é possível determinar a concentração da proteína de interesse utilizando o valor de absorbância obtido. A leitura de absorbância em placa de Elisa é realizada no equipamento gentilmente disponibilizado pelo grupo de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP).

3.4.2 Método do coeficiente de extinção molar

A estimativa da concentração da enzima *TcDHODH* pode ser também determinada através da Lei de Lambert-Beer. Esta lei relaciona a intensidade da luz incidente, I_0 , e a intensidade da luz transmitida, I , por um meio transparente de espessura b e concentração c através da relação dada por:

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

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

No caso específico de macromoléculas, os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, devido à presença de grupos aromáticos em suas cadeias laterais, são responsáveis pelas propriedades de absorção de luz das proteínas, em particular para comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, com base na sequência de aminoácidos que compõem a enzima é possível estimar o coeficiente de extinção molar esperado para *TcDHODH* (NELSON; COX, 2002). O coeficiente de extinção molar teórico a 280 nm, calculado pelo programa *ProtParam* (www.expasy.ch/tools/protparam.html), equivale a 18,38 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.5 Ensaio de atividade de *TcDHODH*

A enzima *TcDHODH* segue a cinética de Michaelis-Menten catalisando reações que envolvem dois substratos, de acordo com o mecanismo de dupla-troca ou pingue-pongue (NELSON; COX, 2002). Neste mecanismo, a reação se inicia com a formação do complexo enzima-substrato (ES_1), onde S_1 corresponde a molécula de L-diidroorotato. A molécula de orotato, correspondendo ao produto da reação P_1 , é liberada deixando a enzima na forma modificada pela redução do cofator FMN (E'). Na segunda parte da reação, um segundo

substrato, S₂ (fumarato) se liga à enzima modificada (E'S₂) para a formação do segundo produto catalisado pela reação, succinato (P₂), regenerando a enzima para novos ciclos de catálise.

A reação enzimática do tipo pingue-pongue pode ser resumida como segue:

Baseado no mecanismo da catálise da enzima *TcDHODH*, a medida da atividade é realizada através de um ensaio espectrofotométrico que monitora a formação do produto da catálise, a molécula de orotato, usando o comprimento de onda de 300 nm (NORAGER et al., 2003) a 25 °C. O experimento é realizado em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC gentilmente cedido pela Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo. Os parâmetros utilizados no ensaio enzimático de *TcDHODH* foram otimizados em nosso laboratório conforme dados a seguir: A reação é iniciada pela adição da enzima em uma concentração final de 270 nM a uma solução contendo 1 mM de fumarato e 30 µM de diidroorotato em tampão 50 mM Tris pH=8,15 e 150 mM KCl. A varredura é feita por 60 segundos (FELICIANO et al., 2006). Os ensaios de atividade são realizados previamente aos ensaios de cristalização. Além disso, com o objetivo de monitorar a influência dos reagentes utilizados nos ensaios de cristalização da enzima, realizamos os testes de atividade na presença de ditioneitol (DTT) a 2 µM, β-mercaptoetanol a 5 µM e sulfato de amônio a 6mM.

3.6 *Cristalização de TcDHODH*

A cristalização da enzima *TcDHODH* visa o estudo estrutural através da utilização de métodos de difração de raios-X em monocristais.

Para a formação de um cristal, a solução de proteína deve ser levada para um estado de supersaturação; estado termodinamicamente instável, onde as moléculas de proteína são

agrupadas de forma organizada. Diversos fatores podem ser combinados de forma a levar a solução de proteína para o estado de supersaturação e conseqüentemente formação do cristal. Os mais comumente utilizados são: temperatura, concentração do agente precipitante, pH, concentração de proteína, adição de ligantes que modificam a solubilidade da proteína, aumento e diminuição da concentração salina (“salting out” e salting in”), dentre inúmeros outros.

Existem várias técnicas utilizadas para a cristalização de proteínas como diálise, difusão líquido-líquido e difusão de vapor. Dois dos métodos mais comuns para cristalização utilizam a técnica por difusão de vapor. Estes são conhecidos como o método da gota suspensa (“hanging drop”) e gota sentada (“sitting drop”) (MCPHERSON, 1982). Em ambos, uma gota contendo a solução de cristalização (tampão, precipitantes e aditivos, também chamada de líquido-mãe) é misturada a solução de proteína e equilibrada contra um reservatório (poço) contendo a mesma solução de cristalização. Desta forma, a solução de cristalização encontrada na gota se encontra inicialmente mais diluída que a encontrada no poço, e a diferença de concentração inicial entre gota e poço depende da razão de diluição inicial da gota. Este sistema é selado e o equilíbrio é alcançado por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório (poço). A concentração dos precipitantes na gota aumenta, diminuindo assim a solubilidade da solução de proteína e permitindo, em condições específicas, a formação de cristais.

Os métodos de gota suspensa e sentada diferem somente na posição em que a gota é colocada no experimento em relação a solução do poço. A **Figura 8** mostra uma representação esquemática de ambos os experimentos.

Figura 8: (A) Difusão de vapor em gota suspensa (“hanging drop”); (B) Difusão de vapor em gota sentada (“sitting drop”).

A técnica de difusão de vapor, em gota suspensa e gota sentada, foi a escolhida para os ensaios de cristalização realizados neste projeto.

3.6.1 Cristalização de TcDHODH na forma apo

A cristalização da enzima na forma apo (livre de ligantes) constitui o primeiro objetivo do nosso trabalho. Além de fornecer dados estruturais relevantes da proteína, esses cristais podem ser utilizados em experimentos de “soaking” para obtenção de complexos com potenciais inibidores, objetivos futuros (MCPHERSON, 1998).

Foram testadas inicialmente 98 condições disponíveis nos kits de cristalização Crystal ScreenTM e Crystal Screen 2TM (Hampton Research) e as 96 condições disponíveis nos kits Wizard Screen I e Wizard Screen II (Biomaterials). Estas soluções utilizam o método de matriz esparsa e são baseadas em soluções de cristalização conhecidas para macromoléculas biológicas. Neste experimento são testados um grande intervalo de pH, sais, precipitantes e aditivos (JANCARIK; KIM, 1991). Duas temperaturas foram testadas, 8 e 22 °C.

Nos primeiros experimentos de cristalização utilizando o método de difusão de vapor utilizou-se 500 µL das soluções de cristalização no reservatório. As gotas consistiam de

3 μL da solução do reservatório e de proteína (8 mg/mL) (volume total da gota igual a 6 μL). Uma análise criteriosa com relação a característica das gotas indicou a formação de pequenos cristais somente na condição 5 do Crystal Screen 2TM (5% v/v isopropanol, 2,0 M sulfato de amônio) apenas para o ensaio realizado a 22 °C.

Baseando-se nesta informação prévia, foi realizado uma varredura em torno das condições iniciais de cristalização, variando-se a concentração de sulfato de amônio (0,5 a 2,0 M), isopropanol (0 a 6 % v/v), diferentes tampões de forma a permitir uma varredura em diferentes pHs (5 a 8) e concentração da proteína (6 a 18 mg/mL). Foram também testados os métodos de difusão de vapor por gota suspensa e gota sentada onde variou-se a proporção de volume entre proteína e poço na gota de cristalização e a quantidade de solução do poço.

Durante a otimização das condições de cristalização, foi também verificado que o tempo entre a purificação da enzima e o ensaio de cristalização influenciava muito na qualidade dos cristais. Vários testes realizados indicaram que os melhores cristais são obtidos quando o ensaio de cristalização é efetuado com a proteína fresca e os experimentos de cristalização realizados durante as primeiras 24 horas após a purificação da proteína. Foi durante a otimização das condições de cristalização que optou-se por adicionar também uma nova etapa na purificação, filtração em gel, para a melhora na qualidade dos cristais.

Embora tivéssemos obtido êxito na cristalização da enzima na forma apo, os cristais apresentavam alta desordem sugerida pela baixa resolução e alta anisotropia observadas no seu padrão de difração. Portanto, diferentes experimentos foram realizados com o objetivo de melhorar a qualidade dos cristais, como: utilização de diferentes métodos de cristalização, adição de aditivos, clivagem da cauda de histidina por digestão proteolítica, controle da taxa de difusão e técnica de macrosemeadura (*macroseeding*).

3.6.1.1 Cristalização de TcDHODH na presença de óleo

Como os cristais da enzima em estudo crescem relativamente rápido (aproximadamente cinco dias), uma abordagem utilizada na tentativa de aumentar a ordem cristalina foi a de tentar aumentar o tempo necessário para o aparecimento dos cristais através da diminuição da taxa de difusão de vapor. Além da realização de ensaios de cristalização realizados a 8 °C, sem sucesso, utilizamos também a técnica de cristalização na presença de óleo.

A metodologia da técnica utilizando óleo consiste em aplicar uma camada deste sobre a solução do poço (**Figura 9**). O óleo age como uma barreira para a difusão de vapor entre o reservatório e a gota. Utilizando, por exemplo, 100% de óleo de parafina, a difusão de vapor é praticamente impedida, enquanto que utilizando 100% de óleo de silicone, os resultados são semelhantes aos resultados de quando nenhum óleo é utilizado. Quando é utilizada uma mistura dos dois óleos, a taxa de difusão de vapor, entre a gota e o reservatório, pode ser controlada (CHAYEN, 1997). A taxa de difusão de vapor também depende da espessura da camada de óleo utilizada.

Figura 9: Esquema do método de difusão de vapor em gota suspensa utilizando óleo.

Para a utilização da técnica de cristalização na presença de óleo foram realizados experimentos de cristalização por difusão de vapor em gota suspensa (“hanging drop”) e gota sentada (“sitting drop”). Foram testadas várias condições variando-se isopropanol (3 a 6 %), sulfato de amônio (1,2 a 1,8 M), concentração da proteína (7,0 a 14,0 mg/mL), proporção

entre óleo de parafina e silicone de 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 e 0:10 (parafina:silicone), mantendo-se constante a concentração de 0,1 M de acetato de sódio pH 5.0. O volume de óleo adicionado foi de 200µL.

3.6.1.2 Macrosemeadura (“macroseeding”)

A técnica de semeadura (“seeding”) consiste na utilização de cristais de proteína (micro cristais ou macro cristais) como sementes para a obtenção de cristais maiores e melhor organizados. Nesta técnica, uma semente é utilizada como modelo para o agrupamento de moléculas na forma cristalina. No caso específico de macrosemeadura, a semente utilizada é um cristal, obtido previamente, que é diretamente adicionado na gota de cristalização normalmente sob condições de mais baixa supersaturação que a necessária para que ocorra nucleação espontânea.

Desta forma, na tentativa de aumentar o tamanho dos cristais de *TcDHODH*, realizamos também experimentos de macrosemeadura, onde os cristais obtidos nas condições originais de cristalização (item 3.6.1 Cristalização de *TcDHODH* na forma apo) foram transferidos para uma nova gota previamente equilibrada contra a solução do poço.

3.6.1.3 Cristalização de *TcDHODH* sem a cauda de Histidina

Uma vez que a presença da cauda de histidina em fusão com a nossa enzima poderia introduzir flexibilidade e prejudicar a formação dos cristais, realizamos ensaios de cristalização da enzima *TcDHODH* sem a presença da cauda. Neste experimento, após a purificação da enzima, a proteína foi submetida a digestão proteolítica na presença de trombina. Foram utilizadas 5 unidades de trombina bovina (Amersham Bioscience, gentilmente cedida pelo grupo de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos - USP) para cada mg de proteína. A solução da proteína foi submetida à digestão a aproximadamente 20

°C por 17 horas. A digestão é interrompida com a utilização de 1 mM de PMSF. O sucesso da clivagem foi monitorado através de eletroforese por SDS-PAGE e por ensaios de atividade. Os testes de atividade mostram que a proteína se mantém ativa depois da digestão proteolítica com trombina. Os ensaios de cristalização da proteína clivada foram realizados utilizando as condições de cristalização já conhecidas para a enzima (item 3.6.1 Cristalização de *TcDHODH* na forma apo). Foram também testadas as 98 condições disponíveis nos kits de cristalização Crystal ScreenTM e Crystal Screen 2TM (Hampton Research) (JANCARIK; KIM, 1991).

3.6.1.4 Cristalização de *TcDHODH* com aditivos

Como sugerido na literatura que descreve a cristalização da enzima DHODH de *Lactococcus lactis* A (NORAGER et al., 2003), os experimentos de cristalização na presença do agente redutor DTT foi fundamental para a melhora na qualidade dos cristais. Melhora possivelmente ocasionada pela estabilização da cisteína altamente conservada nas DHODHs da família 1 (Cys-132), denominada cisteína catalítica e localizada no “loop” que dá acesso ao sítio ativo da proteína. Sendo assim, vários experimentos de cristalização na presença dos agentes redutores DTT e β -mercaptoetanol foram realizados.

- Cristalização de *TcDHODH* na presença de β -mercaptoetanol

A cristalização da enzima em presença do agente redutor β -mercaptoetanol, foi realizada de duas maneiras distintas.

Na primeira, o agente redutor foi adicionado à solução do poço como aditivo no momento da cristalização. Foram realizados ensaios varrendo-se sulfato de amônio (1,2 a 1,8 M), isopropanol (2 a 6 %), concentração da proteína (7,0 a 14,0 mg/mL), β -mercaptoetanol (5 a 14 mM) e a proporção de volume de proteína/solução do poço na gota de cristalização,

solução tampão nos pHs 4,5 e 5,5 com 0,1 M acetato de sódio. Os experimentos foram realizados em três temperaturas, 8, 22 e 25 °C.

Na segunda, a proteína foi purificada na presença do agente redutor que foi adicionado à proteína desde a etapa de lise das células até os ensaios de cristalização. Uma vez que a primeira etapa de purificação consiste na cromatografia por afinidade usando a resina Ni-NTA (Qiagen), a concentração máxima de agente redutor utilizada neste experimento foi limitada pelas especificações da coluna e consiste em 10 mM de β -mercaptoetanol. Na purificação em presença de β -mercaptoetanol, as células são inicialmente descongeladas e ressuspendidas em um tampão denominado **tampão de lise** contendo β -mercaptoetanol (pH 8, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 1 mM PMSF e 10 mM β -mercaptoetanol). As duas etapas de purificação, afinidade e filtração em gel, foram realizadas adicionando-se 10 mM do agente redutor em todos os tampões. Foram realizados ensaios varrendo-se sulfato de amônio (1,2 a 1,8 M), isopropanol (2 a 6 %), concentração da proteína (7,0 a 14,0 mg/mL), β -mercaptoetanol (5 a 14 mM) e a proporção de volume de proteína/solução do poço na gota de cristalização, solução tampão nos pHs 4,5 e 5,5 com 0,1 M acetato de sódio. Os experimentos foram realizados em três temperaturas, 8, 22 e 25 °C.

- Cristalização de TcDHODH na presença de DTT

Além do agente redutor β -mercaptoetanol, também foi testado o agente redutor DTT. Devido as limitações imposta pela resina utilizada para a purificação, o agente redutor DTT foi apenas utilizado como aditivo apenas no momento da cristalização.

Foram realizados ensaios varrendo várias concentrações de sulfato de amônio (1,2 a 1,8 M), isopropanol (2 a 6 %), DTT (1,5 a 6,0 mM), e concentração de proteína (7,0 a 14,0 mg/mL), variando a solução tampão entre os pHs 4,5 e 5,5 com 0,1 M acetato de sódio. Além

disso, com o objetivo de variar a taxa de difusão do experimento variou-se também a proporção de volume de proteína/solução do poço na gota de cristalização e a temperatura de armazenagem dos experimentos de cristalização, 8, 22 e 25 °C.

3.6.2 Cristalização de *Tc*DHODH com orotato

Além da cristalização da enzima *Tc*DHODH na forma apo, outro objetivo do nosso trabalho era o de determinar a estrutura da enzima em complexo com o produto da catálise, e inibidor natural, a molécula de orotato.

3.6.2.1 Experimentos de co-cristalização com orotato

Para a obtenção de cristais do complexo *Tc*DHODH-orotato através da técnica de co-cristalização, a solução de proteína pura é incubada com um excesso molar de orotato. Os primeiros ensaios de co-cristalização consistiram em incubar *Tc*DHODH com orotato utilizando um excesso molar de aproximadamente quatro vezes, por 24 horas.

Os primeiros ensaios de co-cristalização, utilizando as mesmas condições de cristalização da proteína na forma apo renderam cristais muito pequenos. Com o intuito de melhorar a qualidade dos cristais foram então realizados ensaios de co-cristalização variando a proporção volume de proteína/poço na gota de cristalização e a concentração da proteína, mantendo o excesso molar de orotato de aproximadamente quatro vezes.

Outro experimento realizado na tentativa de maximizar a incorporação do inibidor pela enzima consistiu em já adicionar orotato durante o processo de purificação. Neste experimento, a etapa de cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada com um tampão de corrida contendo **orotato** (pH 7.2, 50mM Hepes, 150mM NaCl e 1mM orotato).

Com a proteína purificada na presença de orotato, os ensaios de cristalização foram realizados variando-se sulfato de amônio (1,4 a 1,6 M), isopropanol (3 a 6 %), concentração

da proteína (10,0 a 17,0 mg/mL), proporção de volume de proteína/solução do poço na gota de cristalização e temperatura (8, 22 e 25 °C). Os mesmos ensaios também foram realizados adicionando DTT (2 a 6 mM), como aditivo, nas condições de cristalização.

Na busca de uma condição de cristalização da enzima complexada com orotato, foram testadas as 98 condições disponíveis nos kits de cristalização Crystal ScreenTM e Crystal Screen 2TM (Hampton Research) e as 96 diferentes condições encontradas no kit de cristalização Wizard Screen I e II (Biomeraids). Os ensaios foram realizados em duas temperaturas distintas, 8 e 22 °C. Os experimentos de cristalização foram realizados utilizando 500µL do tampão de cristalização no reservatório e a gota contendo 2µL da solução do poço e de proteína (10 mg/mL) (volume total da gota igual a 4µL).

Ensaio de cristalização da enzima complexada com o orotato também foram realizados com base na condição de cristalização já publicada para este complexo (*TcDHODH*-orotato) (INAOKA et al., 2005). Segundo este estudo, os melhores cristais crescem a 4 °C com concentração de proteína igual a 10 mg/mL em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8.0 contendo 1 mM orotato, e solução do poço composta por 16 % (w/v) PEG 3350, 100 mM cacodilato pH 6,2, 1 mM orotato de sódio, 50 mM de cloreto de hexaamincobalto (III) e 1 mM de tiocianato de sódio. Para tanto, a proteína foi dialisada no mesmo tampão (10 mM Tris-HCl pH 8.0 contendo 1 mM orotato) e deixada na mesma concentração (10 mg/mL). Foram realizados ensaios varrendo várias concentrações de PEG 4000, de 12 a 22 % (w/v), mantendo constante a concentração 100 mM de cacodilato pH 6,2, 1 mM de orotato de sódio, 1 mM de tiocianato de sódio, 50 mM de cloreto de hexaamincobalto (III). Os ensaios foram realizados a 8, 22 e 25 °C.

3.6.2.2 Experimentos de “soaking” com orotato

Como a técnica de co-cristalização na presença da molécula de orotato não foi capaz de produzir cristais com qualidade para os estudos de difração de raios-X, optamos por iniciar experimentos de “soaking”. Nesta técnica, os cristais na forma apo, previamente obtidos, são transferidos para uma solução contendo os ligantes, no caso o orotato, e incubados por um determinado período de tempo antes da realização da coleta de dados. A concentração do inibidor e o tempo de incubação utilizados nestes experimentos são parâmetros que foram variados na tentativa de uma melhora na qualidade dos dados coletados e na incorporação do ligante. Neste ensaio adicionamos o orotato na solução crioprotetora testando diferentes concentrações (0,5 a 2,0 mM). Os cristais que crescem na forma apo e na presença do aditivo DTT foram transferidos para a solução crioprotetora mais orotato. Estes cristais permaneceram incubados na solução por diferentes períodos de tempo que variou de 1 a 10 minutos antes de serem congelados para a realização da coleta.

3.7 *Tratamento dos cristais antes da coleta de dados*

Mesmo obtendo cristais de tamanhos relativamente apreciáveis (cerca de 0.3x0.1x0.1mm a 0.4x0.1x0.1mm) e com morfologia externa com ótima qualidade, o padrão de difração sugeria alta desordem devido a baixa resolução e espalhamento difuso. Vários experimentos (HERAS; MARTIN, 2005), que serão descritos a seguir, foram realizados após a obtenção dos cristais na tentativa de minimizar esta desordem.

3.7.1 Desidratação

Em média cristais de proteína possuem um elevado conteúdo de solvente. A desidratação pode reduzir este volume, e conseqüentemente aumentar o empacotamento das moléculas de proteína, aumentando a ordem cristalina e melhorando a qualidade de difração

do cristal (HERAS; MARTIN, 2005). Existem diversas maneiras de promover a desidratação dos cristais. Foram testados três métodos diferentes de desidratação nos cristais de *TcDHODH*. O primeiro método (**Figura 10a**) consiste em transferir o cristal para uma solução contendo um aumento da concentração do agente precipitante. Inicialmente o cristal é transferido para uma gota (50 μL) contendo a solução do poço onde a concentração do agente precipitante é 5 % maior que a utilizada nos experimentos originais de cristalização. No caso de *TcDHODH* o agente precipitante é o sulfato de amônio. A gota é então deixada exposta ao ar durante 5 a 15 minutos. Em seguida, o cristal é transferido para uma nova gota (50 μL) contendo a solução do poço acrescida de 10 % do agente precipitante, deixando a gota exposta para o ar durante 5 a 15 minutos. Este processo é repetido até o acréscimo de 30 % do agente precipitante. Nesta última etapa além dos 30 % do agente precipitante adicionado, também adicionamos 20 % do agente crioprotetor glicerol. No caso dos cristais de *TcDHODH*, este experimento foi realizado aguardando 5 e 15 minutos cada processo. Após a última etapa os cristais foram congelados em nitrogênio líquido previamente a coleta de dados. O segundo método (**Figura 10b**) consiste em transferir o cristal diretamente para uma gota (50 μL) contendo a solução do poço acrescida de 10 % do agente precipitante, sulfato de amônio, mais 20 % de glicerol (crioprotetor) e deixando a gota exposta ao ar durante trinta minutos. Os cristais são então congelados em nitrogênio líquido previamente a coleta de dados. No terceiro método utilizado (**Figura 10c**), o processo de desidratação ocorre de forma mais lenta. Neste caso, o cristal é transferido para uma gota (5 μL) contendo a solução de cristalização acrescida de 10 % do agente precipitante, sulfato de amônio. Em seguida monta-se um experimento do tipo gota pendurada (“hanging drop”) com a solução do poço também acrescida de 10 % do agente precipitante para que o sistema seja mantido em equilíbrio. O experimento é selado por doze horas. Após este tempo, o cristal é transferido para uma

solução crioprotetora composta pela solução do poço adicionada de 10 % do agente precipitante mais 20 % de glicerol (HERAS; MARTIN, 2005).

Figura 10: Representação dos métodos utilizados nos experimentos de desidratação. **a)** Este método consiste em transferir o cristal para uma gota ($50\mu\text{L}$) contendo a solução do poço acrescida de 5% do agente precipitante. A gota é deixada exposta para o ar durante 5 a 15 minutos. Este processo é repetido até o acréscimo de 30% do agente precipitante, aumentando 5% do agente precipitante em cada etapa. Na última etapa além dos 30% do agente precipitante adicionado, também é adicionado 20% do agente crioprotetor glicerol. **b)** Este método consiste em transferir o cristal para uma gota ($50\mu\text{L}$) contendo a solução do poço acrescida de 10% do agente precipitante mais 20% de glicerol (crioprotetor), deixando a gota exposta ao ar durante trinta minutos. **c)** Neste método o cristal é transferido para uma gota ($5\mu\text{L}$), colocada em uma lamínula, contendo a solução de cristalização acrescida de 10% do agente precipitante. É montado um experimento do tipo gota pendurada com a solução do poço também acrescida de 10% do agente precipitante. O experimento é selado por doze horas. Figura adaptada de Heras e Martin (2005).

3.7.2 “Soaking” com diferentes pHs

Na tentativa de minimizar a desordem cristalina, os cristais de *TcDHODH* que crescem apenas em pH 5.0, foram transferidos para soluções com diferentes pHs, antes da realização da coleta de dados. Nossa expectativa era que a mudança de pH pudesse alterar de alguma forma a carga dos aminoácidos que compõem a proteína, favorecendo o empacotamento cristalino. Para isso, fizemos soluções crioprotetoras trocando o acetato de

sódio pH 5.0, utilizado para a cristalização dos cristais, por outros tampões cujos pHs foram: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Para minimizar o choque de cargas, os cristais foram transferidos do pH 5.0 ao pH de interesse de forma graduada e posteriormente congelados em nitrogênio líquido.

3.7.3 “Annealing”

Cristais de proteína são muito sensíveis à radiação de raios-X, e deterioram rapidamente quando expostos a este tipo de radiação ionizante. Para minimizar os danos causados pela radiação, e conseqüentemente aumentar o tempo de vida dos cristais, os experimentos de difração são realizados a temperatura criogênica. O congelamento rápido ao qual os cristais são submetidos antes da coleta pode produzir desordem, resultando no aumento da mosaicidade e diminuição na qualidade de difração. A técnica de “annealing”, onde os cristais são descongelados e novamente resfriados a temperatura criogênica, pode ser utilizada para minimizar a desordem introduzida no primeiro congelamento. Existem diferentes formas de “annealing” e no caso dos cristais de *TcDHODH*, três maneiras foram realizadas.

A primeira estratégia de “annealing” (**Figura 11a**) consiste no descongelamento do cristal através da transferência para a sua solução crioprotetora, onde este permanece por algum tempo (em nosso experimento cerca de 3 minutos) a temperatura ambiente. Em seguida, o cristal é recongelado em fluxo de nitrogênio gasoso (100K). Na segunda estratégia (**Figura 11b**), o fluxo de gás nitrogênio, responsável por manter o cristal a temperatura de 100 K durante a coleta, é bloqueado por alguns segundos (em nosso caso 2 segundos), para que o cristal seja descongelado. Este procedimento é repetido por três vezes. Na terceira estratégia (**Figura 11c**), o fluxo de gás nitrogênio é interrompido por uma única vez por um tempo maior (em nosso caso 30 segundos) (HERAS; MARTIN, 2005).

Figura 11: Representação dos experimentos de “annealing”. **a)** Representação do primeiro método utilizado no experimento de “annealing”, onde o cristal é retirado da temperatura criogênica, transferido para a solução crioprotetora novamente, deixado nesta condição por cerca de 3 minutos, e levado novamente para a temperatura criogênica rapidamente (“flash-cooling”). **b)** Representação do segundo método utilizado no experimento de “annealing”, onde ocorre o bloqueio do gás de nitrogênio por dois segundos, em seguida este bloqueio é retirado, levando o cristal para a temperatura criogênica novamente, por 6 segundos, processo este repetido por três vezes. **c)** Representação do terceiro método utilizado no experimento de “annealing”, onde o gás de nitrogênio é bloqueado uma única vez, por um maior período de tempo (30 segundos), e o bloqueio é retirado rapidamente, e o cristal volta à temperatura criogênica. Figura adaptada de Heras e Martin (2005).

Todas as estratégias descritas anteriormente foram testadas, e a última que utiliza apenas o bloqueio do fluxo de gás nitrogênio foi a que apresentou os melhores resultados. Diante da melhora significativa no padrão de difração, a técnica “annealing” foi extensamente utilizada durante os experimentos de difração dos cristais de *TcDHODH*.

3.7.4 “Cross-linking”

Uma técnica comumente utilizada para proteger cristais de proteína contra possíveis danos causados pela manipulação ou durante a coleta de dados é a de “cross-linking”. Neste caso, os cristais de proteína são tratados com uma solução de glutaraldeído previamente a qualquer manipulação como “soaking” com ligantes ou solução crioprotetora. Cristais que passam por este tipo de procedimento possuem uma maior resistência ao choque mecânico e maior resistência a qualquer mudança nas condições de cristalização. Neste caso, a técnica

envolve a reação entre aminoácidos de lisina que estão na superfície dos cristais com grupos aldeídos de reagentes do tipo glutaraldeído (**Figura 12**).

Figura 12: Representação esquemática da reação entre os aminoácidos lisina presentes na proteína e o reagente glutaraldeído.

A melhoria nos dados de difração dependem da posição das lisinas no cristal (HERAS; MARTIN, 2005). Existem diferentes formas de promover a reação entre o glutaraldeído e os aminoácidos lisinas presentes no cristal. No caso dos cristais de *TcDHODH*, a reação é processada da seguinte forma: Após a obtenção dos cristais, é adicionado na solução do poço o glutaraldeído, cuja concentração final variou de 0,07 a 0,125%. A reação se processa, devido a alta volatilidade do glutaraldeído, que está primeiramente no poço e vai em direção a gota onde está localizado o cristal, iniciando a reação. Os tempos de reação testados foram: 1 h, 2 h, 6 h, 12 h e 24 h.

3.8 Coleta e Processamento de Dados

Os experimentos de difração de raios-X foram realizados em fonte de radiação Síncrotron da linha de cristalografia de proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (DO3BMX1 - LNLS). As coletas foram realizadas com comprimento de onda, λ , igual a 1.427Å e os dados registrados em um detector marCCD165 (MarResearch).

Os experimentos de difração de raios-X foram realizados em temperatura criogênica (100K). Foram realizados experimentos de difração com cristais congelados em nitrogênio líquido logo após a cessação do crescimento (uma semana aproximadamente) ou com cristais

congelados diretamente em fluxo de gás nitrogênio. Neste último caso, os cristais eram transportados a temperatura ambiente até o local da coleta.

Durante as coletas de dados, diferentes agentes crioprotetores e concentrações foram testadas: glicerol (15 a 30 %), PEG400 (15 a 30 %), MPD (15 a 30 %), etilenoglicol (15 a 30 %) e paratone. Quando possível, foi também testada diferentes concentrações dos componentes que constituem a solução mãe de cristalização.

Cada conjunto de imagens coletado foi processado usando o programa *MOSFLM* (LESLIE, 1992) e escalonado com o programa *SCALA (CCP4)* (EVANS, 1997), separando-se 5 % das reflexões totais para o conjunto teste (R_{free}) a ser utilizado no teste de validação cruzada (BRUNGER et al., 1992). Na tentativa de melhorar o processamento das imagens, o programa *XDS* (KABSCH, 1993) também foi utilizado na etapa de indexação do grupo espacial, integração e escalonamento das reflexões.

3.9 *Resolução da Estrutura*

O conteúdo de solvente, assim como o número de subunidades da proteína na unidade assimétrica foi estimado calculando o coeficiente de Matthews (MATTHEWS, 1968) utilizando o programa *MATTHEWS_COEF* dentro do pacote de programas *CCP4* (CCP4, 1994).

A resolução da estrutura de *TcDHODH* foi efetuada através da técnica de substituição molecular, implementada no programa *MOLREP (CCP4)* (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) utilizando, no primeiro momento, as coordenadas da estrutura de *LmDHODH* (CORDEIRO et al., 2006; CORDEIRO et al., manuscrito em preparação) como modelo e dados experimentais com resolução máxima de 3.0 Å. A solução encontrada pelo programa de substituição molecular, rotação e translação, foi aplicada ao modelo da enzima DHODH de *Leishmania major* (CORDEIRO et al., 2006; CORDEIRO et al., manuscrito em

preparação), que possui aproximadamente 75% de identidade sequencial com a enzima *TcDHODH*. Após a obtenção do primeiro modelo de *TcDHODH*, este foi utilizado na resolução da estrutura feita para outros conjuntos de dados obtidos para *TcDHODH*.

3.10 Refinamento

3.10.1 Refinamento da estrutura de *TcDHODH*

O refinamento da estrutura foi realizado utilizando os programas *REFMAC (CCP4)* (MURSHUDOV et al., 1999) e *CNS* (BRUNGER et al., 1998), onde estão implementados o princípio de máxima entropia (“Maximum Likelihood”) e anelamento simulado (“Simulated Annealing”), respectivamente. A construção visual da estrutura foi feita nos programas *O* (JONES et al., 1991) e *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004) e o ajuste manual das posições atômicas foi feito levando-se em consideração as restrições estereoquímicas, assim como a concordância com os mapas pesados de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ ($2mF_o - DF_c$), com σ igual a 1, e o mapa diferença $F_o - F_c$ ($mF_o - DF_c$), com σ igual a 3. $F_o(hkl)$ corresponde ao fator de estrutura observado para a reflexão hkl e F_c corresponde ao fator de estrutura para a reflexão hkl calculado baseado no modelo. m e D são estimativas de erro para cada reflexão hkl , calculadas a partir do conjunto teste de reflexões.

O primeiro refinamento realizado para a estrutura de *TcDHODH* foi efetuado

$${}^1R_{factor} = \frac{\sum_{(100-T)\%hkl} \|F_{obs} - kF_{cal}\|}{\sum_{(T-100)\%hkl} |F_{obs}|} \times 100\%$$

$${}^2R_{free} = \frac{\sum_{(T)\%hkl} \|F_{obs} - kF_{cal}\|}{\sum_{(T)\%hkl} |F_{obs}|} \times 100\%$$

T é a porcentagem de reflexões escolhidas para o conjunto teste

exclusivamente no programa *REFMAC* (MURSHUDOV et al., 1999). A estratégia de refinamento consiste inicialmente em um refinamento de corpo rígido, cujo objetivo é otimizar os parâmetros rotacionais e translacionais obtidos na etapa de substituição molecular. O sucesso de cada ciclo de refinamento foi monitorado através da diminuição dos valores de R_{factor}^1 e R_{free}^2 . Inicialmente, para o refinamento da estrutura, utilizou-se o vínculo entre as moléculas relacionadas por simetria não cristalográfica (NCS-tight) relacionando as quatro subunidades encontradas na unidade assimétrica (MURSHUDOV et al., 1999). Após o ajuste de todos os aminoácidos na densidade eletrônica ($2F_o - F_c$), moléculas de água foram automaticamente adicionadas pelo programa *ARP/wARP*, incluído no *REFMAC* (MURSHUDOV et al., 1999), através das posições dos picos no mapa diferença $F_o - F_c$, com σ igual a 3, e validadas através da checagem visual levando-se em consideração o ambiente químico de cada molécula de solvente. Algumas águas, que não foram encontradas automaticamente, foram adicionadas manualmente. A busca de ligantes na estrutura (como DTT, sulfato, acetato, isopropanol, glicerol e gluteraldeído) foi realizada utilizando o programa *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004). As coordenadas iniciais para os ligantes foram obtidas do site HIC-Up (<http://xray.bmc.uu.se/hicup/>).

3.10.2 Refinamento da estrutura de *TcDHODH* com dados “twinning”

O comportamento dos valores de R_{free} , valores relativamente altos em comparação com R_{factor} , nos levou a questionar a possibilidade de que os cristais poderiam ser geminados.

A formação de cristais geminados é razoavelmente comum em cristais de proteína, e não pode ser identificada diretamente a partir do padrão de difração. Muitos tipos de desordens no crescimento de cristais são comuns, mas “twinning” refere-se a um caso especial. Cristais geminados ocorrem quando um cristal é formado por celas unitárias que se

agrupam no cristal em duas ou mais diferentes orientações, utilizando os mesmos pontos da rede cristalina (**Figura 13**).

Figura 13: Representação esquemática no plano de um cristal geminado. Eixos a (em vermelho) e b (em azul) podem ser encontrados em diferentes orientações dentro do cristal, utilizando os mesmos pontos da rede. As células encontradas em uma diferente orientação estão ilustradas em verde.

Diferentes tipos de geminação podem ser definidas de acordo com a característica do padrão de difração. Se as contribuições para o padrão de difração das diferentes orientações da rede não coincidem a geminação é denominada “nonmerohedral”. No caso de se coincidirem aproximadamente nas três dimensões, a geminação é denominada “pseudomerohedral”. Estes dois tipos de geminação podem, muitas vezes, serem identificados no momento da coleta devido a dificuldade em indexação dos dados ou devido a presença de várias orientações da rede recíproca. A geminação “merohedral” descreve casos nos quais o padrão de difração proveniente de duas ou mais orientações coincidem exatamente nas três dimensões. Cristal classificado com geminação “merohedral” e com apenas duas orientações distintas são classificados como “hemihedral”. Neste caso, muitas vezes a correta simetria do cristal pode ser difícil de identificar devido ao aparecimento de falsos elementos de simetria no padrão de difração. Cada intensidade observada contém contribuições de reflexões das diferentes orientações, mas são cristalograficamente independentes. Embora o padrão de difração de um cristal com geminação “merohedral” parece ser normal, a geminação pode sempre ser detectada examinando os dados de intensidade cuidadosamente. De um modo

geral, as intensidades observadas no caso de cristais geminados são alteradas de acordo com a fração de geminação (α):

$$I_{obs}(\mathbf{h}_1) = (1 - \alpha) I(\mathbf{h}_1) + \alpha I(\mathbf{h}_2)$$

$$I_{obs}(\mathbf{h}_2) = \alpha I(\mathbf{h}_1) + (1 - \alpha) I(\mathbf{h}_2)$$

No caso onde $\alpha = 0$ corresponde a um cristal não geminado. Quando α não é zero, mas significativamente menor que $\frac{1}{2}$, o cristal possui geminação parcial, e quando α é igual, ou muito próximo de $\frac{1}{2}$, é o caso de um cristal com geminação perfeita. Geminação perfeita gera uma situação mais complicada. Se as reflexões relacionadas pela lei de “twin” contribuem igualmente para cada intensidade observada, a simetria da operação de “twinning” é imposta, gerando uma simetria erroneamente elevada no padrão de difração (YEATES, 1997).

Análises estatísticas das reflexões podem ser utilizadas para estimar a fração de geminação. Existem muitos métodos para estimar a fração de geminação a partir dos valores de intensidades coletadas. Em nosso projeto, utilizamos uma ferramenta chamada *Xtriage* dentro do programa *PHENIX* (ADAMS et al., 2002). Uma dificuldade encontrada é que nem todos os programas possuem um método de análise de geminação compatível com o sistema ortorrômbico, porque usualmente os parâmetros de rede encontrados no sistema ortorrômbico são diferentes e não permitem a formação de cristal geminado. A formação de cristais geminados no sistema ortorrômbico pode acontecer quando dois parâmetros de rede são idênticos ou muito próximos, como é o caso dos cristais de *TcDHODH*.

A estrutura de *TcDHODH* considerando a fração de geminação estimada presente nos dados foi refinada utilizando o programa *CNS* (BRUNGER et al., 1998), que possui algoritmos específicos para refinar dados provenientes de cristais geminados. Realizamos o refinamento da estrutura através da técnica de anelamento simulado (“simulated annealing”), seguido de um processo de refinamento posicional, e por final um refinamento dos fatores de

temperatura individuais. O ajuste manual das posições atômicas foi realizado, no programa *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004), levando-se em consideração as restrições estereoquímicas, assim como a concordância com o mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, com σ igual a 1, e o mapa diferença $F_o - F_c$, com σ igual a 3. Esta primeira etapa de refinamento foi realizada utilizando simetria não cristalográfica estrita (todas as moléculas da unidade assimétrica são consideradas idênticas). Em uma segunda etapa do refinamento, foi diminuindo-se aos poucos o vínculo de simetria não cristalográfica, até excluir totalmente o vínculo de NCS entre as quatro moléculas da unidade assimétrica. Nesta segunda etapa realizamos apenas refinamento posicional e refinamento dos fatores de temperatura individuais no programa *CNS* (BRUNGER et al., 1998), em seguida, o ajuste manual das posições atômicas no programa *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004). O sucesso de cada ciclo de refinamento foi monitorado através da diminuição dos valores de R_{factor} e R_{free} , até a obtenção de valores de R_{factor} e R_{free} aceitáveis para a resolução na qual o modelo estava sendo refinado.

3.11 Avaliação dos dados estereoquímicos

A avaliação da qualidade da estrutura construída é fundamental para a confiança nas conclusões retiradas da mesma. A validação estereoquímica da estrutura foi realizada utilizando o programa *PROCHECK* (LASKOWSKI et al., 1998), onde é verificados parâmetros como comprimentos e ângulos de ligação, quiralidade, planaridade das ligações peptídicas, entre outros.

3.12 Análise e comparações Estruturais

Para obter um maior número de informações referentes aos aminoácidos responsáveis pela catálise promovida pela enzima de interesse, foi realizada uma análise

estrutural comparando-se a estrutura de *TcDHODH* obtida na forma apo com estruturas já conhecidas de membros das famílias 1A e 2 das DHODHs. A estrutura de *TcDHODH* foi comparada com as estruturas de DHODH dos organismos: *Homo sapiens* (LIU et al., 2000), *E. coli* (NORAGER et al., 2002), *Lactococcus lactis* (ROWLAND et al., 1998), *Trypanosoma brucei* (PDB código 2B4G, manuscrito em preparação), *Plasmodium falciparum* (HURT et al., 2005) e *Leishmania major* (CORDEIRO et al., 2006). As coordenadas das estruturas foram obtidas a partir do *Protein Data Bank* (www.rcsb.org/pdb/). O alinhamento entre as seqüências de aminoácidos das diferentes enzimas foi realizado utilizando o programa *MultAlin* (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) (CORPET, 1988). Para uma melhor visualização do alinhamento utilizou-se o programa *ESPrIt* (<http://esprIt.ibcp.fr/ESPrIt/cgi-bin/ESPrIt.cgi>) (GOUET et al., 1999). As sobreposições das estruturas para posterior análise foram realizadas no programa gráfico *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004). A análise das estruturas e a construção das ilustrações foram realizadas pelo programa gráfico *Pymol* (DELANO, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. *Clonagem de TcDHODH*

No presente estudo, o gene que codifica a enzima DHODH de *T. cruzi* (cepa Y) foi amplificado utilizando DNA genômico como molde e o produto foi clonado no vetor de expressão pET28a entre os sítios de restrição BamHI e NotI. Amostras da construção pET28a-*TcDHODH* foram submetidas ao sequenciamento que identificou um gene com 942 pares de bases que codifica uma proteína de 314 aminoácidos.

4.2 *Expressão e Purificação de TcDHODH*

A enzima *TcDHODH* é expressa em *Escherichia coli*, utilizando a cepa BL21(DE3) (Novagen). As condições de expressão foram otimizadas de forma a maximizar a solubilidade e rendimento para os experimentos de cristalização. A expressão de *TcDHODH* é induzida por 1 mM de IPTG, a 25 °C por 5 horas. A purificação da enzima *TcDHODH* é normalmente realizada em uma única etapa que envolve cromatografia por afinidade em resina de Níquel. No entanto, alguns ensaios de cristalização e de caracterização molecular da enzima exigiram a introdução de uma segunda etapa de purificação que envolveu a técnica de cromatografia por filtração em gel.

4.2.1 *Cromatografia por Afinidade (Ni-NTA)*

O processo de purificação utilizando cromatografia por afinidade com a resina Ni-NTA Agarose é analisado por SDS-PAGE (**Figura 14**). As lavagens na presença de 0, 25, 30 e 50 mM imidazol, são eficientes para retirar os contaminantes (**Figura 14(a)**). As eluições (**Figura 14(b)**) mostram o sucesso da purificação.

Figura 14: SDS-PAGE (12% poliacrilamida). **(a)** Padrão de massa molecular e perfil das lavagens na presença de 0, 25, 30 e 50 mM Imidazol. **(b)** Padrão de massa molecular e as sete primeiras eluições com 100 mM imidazol. *TcDHODH* migra com massa molecular de aproximadamente 37 kDa.

4.2.2 Cromatografia por Filtração em Gel

A cromatografia por filtração em gel utilizando a resina SephacrylTM S-100, foi padronizada com cinco marcadores de massa molecular (citocromo C, inibidor de tripsina, ovalbumina, BSA e Beta-galactosidade) (**Figura 15**). Para possibilitar a determinação do grau de oligomerização da enzima *TcDHODH* foi utilizado a curva que correlaciona o volume de eluição com o logaritmo da massa molecular dos padrões aplicados na coluna (**Figura 16**).

Figura 15: Padronização da coluna Sephacryl™ S-100. A coluna foi padronizada em tampão HEPES 50 mM, 150 mM NaCl, pH 7.2. O volume de injeção de 500µL de cada padrão (~ 1 mg/mL) foi aplicado isoladamente.

Figura 16: Perfil do volume de eluição versus o logaritmo da massa molecular dos padrões aplicados na coluna Sephacryl™ S-100. A equação da reta relaciona a massa molecular (M.W) com o volume de eluição (Ve).

O perfil de eluição de TcDHODH é apresentado no cromatograma da **Figura 17**. A proteína elui com pico simétrico com máximo de absorbância em 50,1 mL. Pela equação da reta obtida a partir dos padrões de massa molecular e pela migração em SDS-PAGE, pôde-se calcular a massa molecular e o estado de oligomerização da proteína. Pelos resultados obtidos, a massa molecular calculada de 73,54 kDa é compatível com a forma dimérica composta de subunidades de ~37 kDa.

Figura 17: Perfil cromatográfico da purificação de *TcDHODH* por cromatografia de filtração em gel, utilizando a coluna Sephacryl™ S-100. Coluna equilibrada com tampão 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.2 e fluxo 1 mL/min.

4.3 Dosagem de *TcDHODH*

A determinação da concentração da enzima é sempre realizada previamente aos ensaios de cristalização. Para a estimativa da concentração da proteína na forma apo, utilizamos o método do coeficiente de extinção molar teórico ($18,38 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). No entanto, uma vez que a molécula orotato, produto da catálise e inibidor natural da enzima, interfere na determinação da concentração da proteína por absorver em 280 nm, o método de Bradford foi extensamente utilizado na determinação da concentração do complexo *TcDHODH*-orotato. Um exemplo da curva padrão obtida durante o experimento de Bradford, está representada na **Figura 18**. A curva padrão foi obtida a partir da leitura dos valores de absorbância a 600 nm de amostras de BSA nas seguintes concentrações: 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e 30 $\mu\text{g/mL}$.

Utilizando os valores da equação da reta obtida e o valor da absorbância para as amostras de *TcDHODH*, a concentração da proteína pode ser determinada através da equação abaixo:

$$\text{Concentração} = (\text{Abs} - A) / (B)$$

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) = (\text{Abs} - 0,48606) / (0,01267)$$

Figura 18: Curva padrão de Bradford. Concentração de BSA *versus* absorbância.

4.4 Ensaio de Atividade de *TcDHODH*

Um exemplo de uma curva obtida para o ensaio de atividade qualitativo para *TcDHODH* está representado na (**Figura 19**). A velocidade da reação depende da concentração da proteína e dos substratos, diidroorotato e fumarato, utilizados. O ensaio de atividade foi realizado com a proteína na forma apo, sem aditivos, obtendo assim uma curva controle. Foram também realizados experimentos na presença dos aditivos DTT (2 µM) e β-mercaptoetanol (5 µM) nas mesmas proporções de concentração, aditivo/proteína, utilizadas nos experimentos de cristalização. Como se pode observar na **Figura 19**, a presença dos aditivos nestas concentrações não interfere na atividade catalítica da enzima *TcDHODH* e

podem ser utilizados como aditivos para os experimentos de cristalização. O ensaio de atividade realizado na presença do agente precipitante sulfato de amônio, também indicou que este reagente não interfere na atividade enzimática (**Figura 20**).

Figura 19: Curva de absorbância a 300 nm versus tempo A concentração de proteína final é 270 nM e a concentração dos substratos fumarato e diidroorotato é, respectivamente, 1 mM e 30 µM. A curva em azul representa a atividade da enzima na ausência dos aditivos. A curva em vermelho representa a atividade da enzima na presença de 2µM de DTT e a curva em verde representa a atividade da enzima na presença de 5µM de β-mercaptoetanol.

Figura 20: Curva de absorbância a 300 nm versus o tempo da medida de formação de orotato a 25 °C. A concentração de proteína final é 270 nM e a concentração dos substratos fumarato e diidroorotato é, respectivamente, 1 mM e 30 µM. A curva em vermelho representa a atividade da enzima na ausência do agente precipitante. A curva em preto representa a atividade da enzima na presença de 6 mM de sulfato de amônio.

4.5 *Cristalização de TcDHODH*

4.5.1 *Cristalização de TcDHODH na forma apo*

Os ensaios iniciais de cristalização foram realizados com a proteína purificada através de cromatografia por afinidade (Ni-NTA). Das 98 condições presentes nos kits de cristalização Crystal Screen™ e Crystal Screen 2™ (Hampton Research) testadas a 8 e 22 °C, apenas para a condição 5 do Crystal Screen 2™ (5 % v/v isopropanol e 2,0 M(NH₄)₂SO₄ (sulfato de amônio)) para o ensaio realizado a 22 °C foi possível visualizar a formação de vários cristais de pequena dimensão **Figura 21(a)**. Após a realização de uma varredura completa em diferentes concentrações de sulfato de amônio, isopropanol e pHs, concentração da proteína e os métodos de difusão por gota suspensa e gota sentada, obtivemos uma melhora significativa na qualidade dos cristais. No entanto, mesmo com uma melhora na morfologia externa desses cristais, os experimentos de difração de raios-X não mostraram nenhuma melhora significativa na qualidade do padrão de difração. Decidimos então, iniciar vários processos para aperfeiçoar os cristais de TcDHODH através da incorporação de uma nova etapa de purificação e realização de experimentos de cristalização com a solução de proteína fresca, isto é, recém purificada. Os novos cristais obtidos, que apareciam cerca de 5 dias após a realização dos experimentos, cresciam na presença de 4 % v/v isopropanol, 1,5 M(NH₄)₂SO₄, controle de pH 5 com 0,1 M acetato de sódio para a concentração da proteína em torno de 12 mg/mL (**Figuras 21(b) e 21(c)**). No entanto, embora tenha sido observado uma melhora significativa na morfologia externa destes cristais, os experimentos de difração de raios-X não apresentavam dados superiores a 5 Å.

Figura 21: (a) cristal de *TcDHODH* (8 mg/mL) obtido na condição 5 do Crystal Screen 2TM (2 M sulfato de amônio, 5 % v/v isopropanol); (b) cristal de *TcDHODH* (8,8 mg/mL) obtido na condição 1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5 e volume da gota 3 μ L: 3 μ L (solução de proteína : solução de cristalização); (c) cristal de *TcDHODH* (11,8 mg/mL) obtido na condição 1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5 e volume da gota 2 μ L : 1 μ L (solução de proteína : solução de cristalização).

Uma das tentativas de obter um cristal de melhor qualidade foi a busca de uma nova condição de cristalização da enzima na forma apo. Como tivemos sucesso de cristalização em apenas uma condição de cristalização presente nos kits de cristalização Crystal ScreenTM e Crystal Screen 2TM (Hampton Research), optamos por testar as 96 condições do kit de cristalização Wizard Screen I e Wizard Screen II (Biomaterials). Os ensaios de cristalização, com estes kits, foram realizados em duas temperaturas 8 e 22 °C. No entanto, não obtivemos nenhum indício de nucleação em nenhuma dessas 96 condições testadas e em nenhuma das duas temperaturas, mesmo depois de alguns anos após a realização do experimento.

Devido ao fato da enzima *TcDHODH* possuir apenas uma condição de cristalização e os cristais obtidos nesta condição apresentarem alta desordem sugerida pela baixa resolução e alta anisotropia observadas no seu padrão de difração, diferentes experimentos foram realizados com o objetivo de melhorar a qualidade dos cristais. Os resultados obtidos em cada experimento estão sendo demonstrados a seguir.

4.5.1.1 Cristalização de *TcDHODH* na presença de óleo

O principal objetivo neste experimento era propiciar um crescimento mais lento e conseqüentemente mais organizado dos cristais de *TcDHODH*. A presença do óleo faz com a taxa de difusão de vapor seja reduzida, aumentando assim o tempo de crescimento dos cristais de *TcDHODH*, que crescem relativamente rápidos (em torno de cinco dias). Embora tenhamos conseguido aumentar o tempo de crescimento, agora em torno dos 10 dias, os experimentos de raios-X mostraram que a técnica de cristalização na presença de óleo não foi eficaz para melhorar a ordem cristalina dos cristais de *TcDHODH*.

4.5.1.2 Cristalização de *TcDHODH* sem a cauda de Histidina

Uma vez que a flexibilidade da cauda poderia ser o motivo da possível desordem cristalina observada para os cristais de *TcDHODH*, optamos por realizar experimentos da enzima sem a cauda de histidina. A cauda de histidina, presente em fusão com a nossa enzima de interesse, foi removida através de digestão proteolítica pela enzima trombina. Análises por eletroforese SDS_PAGE indica que a trombina é eficiente para remover a cauda (**Figura 22**).

A atividade proteolítica da trombina foi inibida com o inibidor de protease PMSF através da diálise contra um tampão contendo 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF e pH 7.2.

Figura 22: SDS-PAGE (12% poliacrilamida). Demonstração da diminuição da massa molecular da enzima após clivagem.

A atividade da proteína clivada foi monitorada através de um ensaio espectrofotométrico que monitora a formação do produto da catálise, a molécula de orotato conforme metodologia apresentada na seção 3.5. Os resultados (não apresentados) indicam que a proteína se mantém ativa depois da digestão proteolítica.

Os ensaios de cristalização da enzima sem a cauda de histidina foram realizados varrendo-se as 98 condições disponíveis nos kits de cristalização Crystal ScreenTM e Crystal Screen 2TM (Hampton Research). Além disso, a condição de cristalização já determinada para a enzima na forma apo (com a cauda) também foi testada para a cristalização da enzima clivada na ausência e na presença de orotato (a proteína foi incubada por 24 horas em um excesso molar de orotato de aproximadamente quatro vezes). Interessante, acreditávamos que a desordem cristalina pudesse ser consequência da presença da cauda de histidina, aumentando a flexibilidade da proteína e reduzindo a ordem cristalina. No entanto, embora não possamos concluir ao certo a influência da cauda de histidina, não foi possível obter cristais em nenhuma das condições testadas.

4.5.1.3 Macrosemeadura (“macroseeding”)

Os experimentos de macrosemeadura, realizados na tentativa de obter cristais maiores e de melhor qualidade foram realizados sem sucesso, pois os cristais utilizados como semente não cresceram, e continuaram difratando com baixa qualidade.

4.5.1.4 Cristalização de *TcDHODH* com aditivos

Como sugerido para os experimentos de cristalização da enzima DHODH de *Lactococcus lactis* (NORAGER et al., 2003), a melhora na qualidade dos cristais poderia ser obtida através da estabilização do “loop” flexível que dá acesso ao sítio ativo através da estabilização da cisteína catalítica (Cys132). Com esta informação, para evitar a oxidação total ou parcial de Cys132, decidimos realizar os experimentos de cristalização na presença dos agentes redutores DTT e β -mercaptoetanol.

- Cristalização de *TcDHODH* na presença de β -mercaptoetanol

Os ensaios de cristalização na presença de β -mercaptoetanol foram realizados de duas maneiras distintas, adicionando-se o agente redutor somente na etapa de cristalização e adicionando-o desde a etapa de lise, purificação e cristalização.

Para os experimentos de cristalização realizados na presença do agente redutor, os melhores cristais foram obtidos em 5 % de isopropanol, 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5 e 14 mM β -mercaptoetanol. Os melhores cristais obtidos não apresentavam morfologia externa, nem tamanho superiores aos obtidos na ausência do agente redutor. No experimento onde o agente redutor foi adicionado desde a etapa de purificação, os melhores cristais (**Figura 23**) são obtidos na presença de 5 % de isopropanol, 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5 e 5,0 mM de β -mercaptoetanol. As gotas são compostas de 2 μ L de solução de proteína acrescida de 2 μ L da solução de cristalização do poço. A

concentração da proteína foi 12,4 mg/mL. Baseando-se na morfologia externa dos cristais, conclui-se que a adição do agente redutor desde a etapa de purificação auxiliou na melhora da qualidade dos cristais.

Figura 23: Cristal da enzima *TcDHODH* (12,4 mg/mL), purificada na presença de β -mercaptoetanol, obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5, 5 mM de β -mercaptoetanol) e volume da gota 2 μ L : 2 μ L (solução de proteína : solução de cristalização). Cristal de aproximadamente 0,40 mm, dimensão estimada com o “loop” de coleta.

- Cristalização de *TcDHODH* na presença de DTT

Além do agente redutor β -mercaptoetanol foi também testado o agente redutor ditioneitol (DTT). Para os experimentos realizados na presença do agente redutor DTT, os melhores cristais (**Figura 24**), baseando-se na morfologia externa, crescem a 22 °C na presença de 5 % de isopropanol, 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5 e 2,0 mM de DTT. Esses cristais são obtidos utilizando o método de difusão de vapor em gotas suspensas (“hanging drop”) onde as gotas contém 2 μ L de solução de proteína e 2 μ L da solução de cristalização do poço. A concentração de *TcDHODH* ideal é de aproximadamente 11 mg/mL.

Figura 24: Cristal da enzima *TcDHODH* (10,8 mg/mL) obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 5 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5, 2 mM DTT) e volume da gota 2 μ L : 2 μ L (solução de proteína : solução de cristalização). Dimensão aproximada de 0,3 mm ao longo do eixo maior, estimada com o “loop” de coleta.

Foram também realizados ensaios a 25 °C. Os últimos ensaios de cristalização da enzima na presença de DTT, realizados a 25 °C, mostraram que um pequeno aumento na temperatura de armazenamento era fundamental para aumentar o crescimento dos cristais. Este aumento da temperatura foi responsável pela diminuição dos núcleos, bem como do aumento do tamanho dos cristais. Nestas condições de cristalização, a etapa de purificação por exclusão molecular se tornou dispensável.

Para esses experimentos realizados na presença do agente redutor DTT, os melhores cristais (**Figura 25**), baseando-se na morfologia externa, crescem a 25 °C na presença de 5 % de isopropanol, 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5,0 e 2,0 mM de DTT. Esses cristais são obtidos utilizando o método de difusão de vapor em gotas suspensas (“hanging drop”) onde as gotas contém 2 μ L de solução de proteína e 2 μ L da solução de cristalização do poço. A concentração de *TcDHODH* ideal para cristalização de *TcDHODH* é de aproximadamente 13 mg/mL (em tampão 50 mM Hepes pH 7.2 e 150 mM NaCl).

Figura 25: Cristais da enzima *TcDHODH* (13 mg/mL) obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 5 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5,0, 2 mM DTT) e volume da gota 2 μ L : 2 μ L (solução de proteína : solução de cristalização). Dimensão aproximada de 0,4 mm ao longo do eixo maior, estimada com o *loop* de coleta.

É importante mencionar que a adição de DTT ficou restrita ao experimento de cristalização. Embora poderia ter sido importante introduzir o agente redutor desde o início da purificação, este não foi possível devido a incompatibilidade do agente redutor DTT com a resina de níquel utilizada durante o experimento de cromatografia por afinidade.

Uma melhora significativa nos cristais, na presença de ambos aditivos, foi verificada através da análise do padrão de difração. No entanto, trabalhamos apenas com o agente redutor DTT como aditivo, pois os cristais que cresceram na presença deste forneceram os melhores conjuntos de dados, onde recentemente foi possível caracterizar os dados obtidos por difração de raios-X.

4.5.2 Cristalização de *TcDHODH* com orotato

4.5.2.1 Experimentos de co-cristalização com orotato

Os primeiros ensaios realizados com o intuito de obter cristais do complexo *TcDHODH*-orotato foram através da utilização da técnica de co-cristalização, utilizando as mesmas condições de cristalização encontradas para a enzima na forma apo. Apenas pequenos cristais do possível complexo foram obtidos, porém nenhum desses cristais difratou. Esses pequenos cristais do complexo (**Figura 26**) foram obtidos em gotas compostas de 3 μ L de

solução de proteína somada com 3 μL da solução de cristalização do poço, cuja concentração de TcDHODH ideal é de 17,75 mg/mL e 2,2 mM de orotato.

Figura 26: Cristal do complexo TcDHODH-urotato (concentração da proteína de 17.75 mg/mL). O cristal foi obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5) e volume da gota 3 μL : 3 μL (solução de proteína encubada com orotato : solução de cristalização).

Para maximizar a incorporação do inibidor pela enzima, adicionamos orotato ainda durante o processo de purificação. Neste experimento, a etapa de cromatografia por exclusão molecular foi realizada com um tampão de corrida contendo **urotato** (pH 7.2, 50 mM Hepes, 150 mM NaCl e 1 mM orotato). Após a passagem da enzima pela coluna, equilibrada na presença de orotato, e sua posterior concentração utilizando o concentrador Ultrafree-10kDa (Millipore) a coloração da solução de proteína, que antes era amarela, passa para uma coloração alaranjada, indicando a incorporação do orotato na molécula de proteína. Isto porque, a estrutura em anel fundido do FMN (anel isoaloxazina) durante a catálise sofre redução reversível, incorporando a partir de um substrato reduzido um ou dois elétrons na forma de um ou dois átomos de hidrogênio. A forma totalmente reduzida do FMN é representada como FMNH₂ e é acompanhada por um deslocamento na faixa de absorção de luz. Um exemplo entre a diferença de coloração da enzima complexada e na forma apo pode representada na **Figura 27**.

Figura 27: O tubo 1, coloração amarela, contém a enzima na forma apo. O tubo 2, coloração laranja, contém a enzima complexada com o orotato.

Os melhores cristais obtidos do complexo apresentam uma coloração alaranjada, indicando o sucesso da complexação, porém apresentam superfícies irregulares, indicando baixa qualidade. Estes cristais (**Figura 28**) crescem a 22 °C na presença de 4 % de isopropanol, 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5.0. Eles são obtidos utilizando o método de difusão de vapor em gotas suspensas (“hanging drop”) onde a gota contém 3 µL de solução de proteína e 3 µL da solução de cristalização do poço. A concentração de *TcDHODH* ideal é de aproximadamente 16 mg/mL (em tampão 50 mM Hepes pH 7.2, 150 mM NaCl e **1 mM orotato**). Esses cristais difratam a baixíssima resolução, cerca de 6Å.

Figura 28: Cristal do complexo *TcDHODH*-orotato (concentração da proteína de 16 mg/mL) obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 4 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5) e volume da gota 3 µL: 3 µL (solução de proteína encubada com orotato : solução de cristalização). Dimensão aproximada de 0.2 mm ao longo do eixo maior, estimada com o *loop* de coleta.

Uma das tentativas de obter um cristal do complexo de maior qualidade foi a busca de uma nova condição de cristalização da enzima complexada com orotato. Essa busca foi

feita através da realização dos ensaios de cristalização, com a enzima purificada na presença de orotato (1 mM), com as 98 condições dos kits de cristalização Crystal Screen™ e Crystal Screen 2™ (Hampton Research), e as 96 condições dos kits de cristalização Wizard Screen I e Wizard Screen II (Biomeraids). Os ensaios de cristalização, com estes kits, foram realizados em duas temperaturas 8 e 22 °C, utilizando o método de difusão de vapor em gota sentada. No entanto, não obtivemos nenhum indício de nucleação em nenhuma dessas condições testadas e em nenhuma das duas temperaturas. Apesar de tantos esforços, nenhum cristal da enzima complexada com orotato foi obtido com qualidade suficiente para gerar um conjunto de dados que possibilite a determinação da estrutura do complexo.

Os insucessos na cristalização da enzima na presença de orotato podem ser tanto devido à variação na distribuição de carga das proteínas devido a presença do orotato no tampão da proteína, ou até mesmo devido a um pequeno rearranjo na estrutura da enzima, desfavorecendo assim, algumas interações entre as moléculas de proteína encontradas nos cristais na forma apo.

4.5.2.2 Experimentos de “soaking” com orotato

Como a técnica de co-cristalização na presença da molécula de orotato não foi capaz de produzir cristais com qualidade para os estudos de difração de raios-X, optamos por iniciar experimentos de “soaking”. Para os experimentos de “soaking” com orotato, utilizamos nossos melhores cristais, crescidos na presença do aditivo DTT e a 25°C.

Os cristais que cresceram na presença do aditivo DTT e que passaram pelo processo de “soaking” em uma solução contendo orotato, difrataram a baixa resolução. No experimento de “soaking” adicionamos o orotato na solução crioprotetora, em diferentes concentrações (0,5 a 2,0mM). Estes cristais permaneceram incubados na solução por diferentes períodos de tempo que variou de 1 a 10 minutos antes de serem congelados para a realização da coleta.

Nenhuma dessas tentativas gerou um conjunto de dados de qualidade para a determinação do complexo.

Uma vez que, somente pouquíssimos cristais obtidos na forma apo, e com o aditivo DTT, difratam bem, não se pode afirmar que a qualidade ruim do padrão de difração desses cristais é devido ao experimento de “soaking” ou a qualidade dos cristais que foram submetidos a estes experimentos.

4.6 *Tratamento dos cristais antes da coleta de dados*

Embora tenhamos conseguido melhorar a qualidade dos cristais através da adição de DTT como aditivo e aumento na temperatura nos ensaios de cristalização, o padrão de difração ainda sugeria uma alta desordem cristalina. Decidimos utilizar técnicas para melhoria na qualidade do padrão de difração aplicadas após a obtenção dos cristais.

A técnica de desidratação tem como princípio a redução da quantidade de água dentro do cristal, objetivando o aumento do empacotamento das moléculas de proteína, o que pode aumentar a ordem cristalina e melhorar a qualidade do padrão de difração. A técnica de “soaking” em diferentes pHs tem como objetivo induzir modificações nas interações que ocorrem entre os resíduos dentro do cristal, devido a possíveis mudanças das cargas das cadeias laterais dos resíduos, o que poderia levar eventualmente a um rearranjo cristalino e uma possível melhora no padrão de difração. A técnica de “annealing” tem como princípio o descongelamento e posterior congelamento dos cristais, objetivando minimizar a desordem possivelmente introduzida no primeiro congelamento. A técnica de “cross-linking” tem como princípio promover reações entre as cadeias laterais de aminoácidos de lisina presentes na superfície dos cristais com grupos aldeídos presentes em reagentes do tipo glutaraldeído, objetivando promover várias reações cruzadas entre as cadeias laterais de lisinas presentes na superfície do cristal, fortalecendo os mesmos.

A técnica de desidratação e “soaking” com diferentes pHs foram testadas sem nenhum sucesso. Em valores extremos de pH, os cristais não resistiram ao tratamento, e embora tenham permanecido intactos na presença de pHs entre os valores de 3 e 5, os experimentos de difração indicaram uma redução na qualidade do padrão de difração.

A técnica de “cross-linking” e “annealing” foram extensivamente testadas durante nossos ensaios. Aproximadamente 300 cristais foram submetidos a coleta. Muitos destes difrataram a baixíssima resolução (em torno de 6Å) ou apresentaram espalhamento difuso que não permitiu o correto processamento dos dados.

A estratégia por nós adotada foi a de testar vários cristais submetidos aos diferentes tratamentos. Como de um modo geral foi possível obter conjunto de dados provenientes de cristais tratados de diferentes formas, neste momento fica difícil concluir se os procedimentos de “cross-linking” e “annealing” são fundamentais para a melhora na qualidade do padrão de difração obtido para estes cristais.

4.7 *Coleta, Processamento de Dados e Resolução da Estrutura*

Para a obtenção destes conjuntos de dados foram testados diferentes agentes crioprotetores e concentrações, e a melhor opção encontrada foi a utilização de 20% de glicerol. Para os cristais que crescem em 1,5 M sulfato de amônio, 5 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5,0 e 2 mM DTT, a solução crioprotetora é composta de 1,7 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5,0 e 2 mM DTT. A retirada do isopropanol da solução crioprotetora, componente que constitui a solução mãe de cristalização, foi importante para minimizar o “stress” mecânico que os cristais sofriam durante a etapa de “pesca” do cristal, onde a gota se encontra aberta, e a alta volatilidade do álcool causa uma grande movimentação e conseqüente danificação nos cristais que são muito frágeis.

Os melhores resultados obtidos foram cinco conjuntos de dados obtidos para os cristais crescidos na presença de DTT, conjuntos estes denominados: Tc_DTT_01, Tc_DTT_02, Tc_DTT_03, Tc_DTT_05 e Tc_DTT_06, cuja resolução máxima foi de 1.98, 2.15, 2.65, 2.45 e 2.45 Å, respectivamente. Estes cristais possuem diferenças mínimas nas condições de cristalização, porém, eles foram submetidos a diferentes tratamentos antes da realização da coleta de dados, como por exemplo, “annealing” e “cross-linking”. De um modo geral, os padrões de difração obtidos para estes cristais são fortemente caracterizados por espalhamento difuso (**Figura 29**), o que torna a indexação das imagens um problema bastante complexo. Apesar de grandes esforços e da utilização de diferentes programas de processamento, foi somente possível indexar apenas três conjuntos de dados, Tc_DTT_01, Tc_DTT_03 e Tc_DTT_05.

O primeiro conjunto de dados analisado foi o conjunto **Tc_DTT_03**. O cristal que gerou este conjunto de dados cresceu a 22 °C na presença de 5 % de isopropanol, 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5.0 e 2 mM DTT. Este cristal passou pelo processo de “cross-linking” por 12 horas, foi congelado diretamente em fluxo de nitrogênio, e também foi submetido ao processo de “annealing”. Foram coletadas 142 imagens. A distância detetor-cristal foi de 130 mm e o cristal difratou com resolução máxima na borda de 2.65 Å para uma exposição de 120 segundos e oscilação de 1° por imagem. Os dados da coleta e processamento dos dados estão sumarizados na **Tabela 1**.

A análise das ausências sistemáticas mostrou claramente que existem condições de difração $h00 = 2n$, o que caracteriza a presença de um eixo helicoidal de ordem dois (2_1) ao longo do eixo “a”. Quando analisado as condições de difração $00l = 4n$, não vemos claramente as ausências sistemáticas, portanto, a confirmação de que existe um eixo helicoidal de ordem quatro (4_1), ou seu enantiomórfo (4_3), ao longo do eixo “c” não era tão

precisa. A tentativa de resolução estrutural foi feita por substituição molecular, mas não foi obtida nenhuma solução utilizando os dados processados como $P4_12_12$.

O segundo conjunto de dados analisado foi o conjunto **Tc_DTT_05**. O cristal que gerou este conjunto de dados cresceu a 25 °C na presença de 5 % de isopropanol, 1,6 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5.0 e 2 mM DTT. Este cristal passou pelo processo de “cross-linking” por 6 horas antes do congelamento direto em nitrogênio líquido e também pelo processo de “annealing”. Foram coletadas 181 imagens. A distância detetor-cristal foi de 120 mm e o cristal difratou com resolução máxima na borda de 2.45 Å para uma exposição de 90 segundos e oscilação de 1° por imagem. Este conjunto de dados foi processado tanto no grupo espacial $P4_12_12$ como no grupo espacial $P2_12_12_1$. O problema de ambigüidade no grupo espacial foi resolvido a partir da determinação da estrutura por substituição molecular utilizando os dados processados no grupo espacial $P2_12_12_1$. Os dados da coleta e processamento de dados estão sumarizados na **Tabela 1**. Análise do conteúdo de solvente, para o grupo espacial $P2_12_12_1$, de 44.7% com coeficiente de Mathews de $2.22 \text{ Å}^3 \text{Da}^{-1}$ prevê um tetrâmero na unidade assimétrica. A estrutura foi determinada por substituição molecular utilizando o dímero de *Leishmania major* DHODH como modelo. O valor de R_{factor} obtido da solução de substituição molecular é de 39,0% e correlação de 75,4%.

O terceiro, e melhor, conjunto de dados analisado foi o conjunto **Tc_DTT_01**. O cristal que gerou este conjunto de dados cresceu a 25 °C na presença de 5 % de isopropanol, 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5.0 e 2 mM DTT. Este cristal passou pelo processo de “cross-linking” (0.125% gluteraldeído) por 6 horas antes do congelamento diretamente em nitrogênio líquido. Foram coletadas 150 imagens. A distância detetor-cristal foi de 90 mm e o cristal difratou com resolução máxima na borda de 1.98 Å (**Figura 29**) para uma exposição de 90 segundos e oscilação de 1° por imagem. As imagens foram indexadas e integradas com *MOSFLM* (LESLIE, 1992) e escalonadas com o programa *SCALA* (EVANS,

1997). A estrutura foi determinada por substituição molecular através do programa *MOLREP* (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) utilizando o modelo de *TcDHODH* obtido com o conjunto de dados Tc_DTT_05. O valor de R_{factor} obtido da solução de substituição molecular é de 39,2% e a correlação de 75,5%.

Para tentar melhorar o processamento das imagens do melhor conjunto de dados obtido, Tc_DTT_01, este foi processado novamente utilizando o programa *XDS* (KABSCH, 1993). Os resultados confirmaram que *TcDHODH* se cristaliza numa rede ortorrômbica primitiva, grupo espacial $P2_12_12_1$. Análise do conteúdo de solvente de 44.7% com coeficiente de Mathews de $2.22 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ prevê um tetrâmero na unidade assimétrica. As coordenadas do modelo refinado para os dados inicialmente processados com *MOSFLM* foram utilizadas como modelo inicial para o refinamento.

Uma comparação mais clara entre os resultados obtidos está sendo representada na **Tabela 1**. Pode-se observar, na **Tabela 1**, que os melhores dados são provenientes do cristal Tc_DTT_01. Com este cristal conseguimos dados a mais alta resolução em relação aos outros dois cristais, Tc_DTT_03 e Tc_DTT_05. Os melhores valores de $I/\sigma(I)$ e R_{sym} foram obtidos no processamento do cristal Tc_DTT_01.

Figura 29: Padrão de difração do cristal de Tc_DTT_01 coletado no LNLS. Em rosa estão apresentadas as linhas de resolução.

Uma comparação detalhada, também representada na **Tabela 1**, entre o processamento do conjunto de dados Tc_DTT_01 utilizando o programa *MOSFLM/SCALA* e *XDS/XSCALE*, mostra uma melhora significativa ocorrida com o uso do programa *XDS*. O primeiro ponto observado, é que utilizando o programa *XDS* foi possível obter dados com maior resolução, de 2.4 para 2.2 Å. O número de reflexões obtidas no *XDS* também foi maior. Os dados que mais destacam são os valores de $I/\sigma(I)$ e os valores de R_{sym} .

Tabela 1 – Dados cristalográficos e estatísticos para os diferentes conjuntos de dados coletados no LNLS ($\lambda=1.427\text{\AA}$), a 100K. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado

Dados e Parâmetros	Tc_DTT_03	Tc_DTT_05	Tc_DTT_01	Tc_DTT_01(XDS)
Sistema Cristalino	Tetragonal	Ortorrômbico	Ortorrômbico	Ortorrômbico
Grupo espacial	P4 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=b=126.53, c=82.64	a=82.36, b=126.56, c=126.49	a=82.64, b=124.25, c=129.15	a=82.39, b=123.92, c=128.89
Intervalo de Resolução (Å)	89.43 – 3.5	56.61 – 3.00	41.42 – 2.4	89.44 – 2.2
Moléculas por unidade assimétrica	2	4	4	4
V_m (Coeficiente de Matthews)	2.20 Å ³ Da ⁻¹	2.20 Å ³ Da ⁻¹	2.20 Å ³ Da ⁻¹	2.22 Å ³ Da ⁻¹
Solvente (%)	44.5	44.3	44.7	44.7
Completeza (%)	96.1 (84.9)	98.6 (97.5)	99.0 (96.9)	98.4 (82.1)
I / sigma(I)	4.3 (2.6)	3.5 (1.8)	3.9 (1.80)	10.66 (4.70)
^a R _{sym} (%)	15.8 (28.5)	17.7 (36.3)	15.5 (36.7)	11.0 (31.9)
Nº reflexões únicas	8 557	26 746	52 188	66 576
Multiplicidade	8.0 (6.0)	7.1 (6.7)	5.5 (5.1)	5.6 (4.8)
Substituição Molecular				
R _{factor}	Sem solução	39.0%	39.2%	-
Correlação	Sem solução	75.4%	75.5%	-

^a R_{sym} = $\sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum I_{\text{obs}}$ onde $\langle I \rangle$ é a média das intensidades calculada a partir das observações para as reflexões relacionadas por simetria.

4.8 Refinamento

4.8.1 Refinamento da estrutura de TcDHODH

O primeiro refinamento foi realizado utilizando o conjunto de dados Tc_DTT_01, grupo espacial $P2_12_12_1$, com dados processados nos programas *MOSFLM/SCALA*. Os primeiros ciclos de refinamento de corpo rígido resultaram em R_{factor} e R_{free} de 37.8 e 40.7%, respectivamente. Vários ciclos de refinamento posicional utilizando o programa *REFMAC* foram realizados, vinculando fortemente as moléculas relacionadas por simetria não cristalográfica (NCS-tight). Após adição de águas pelo programa *ARP/wARP* o modelo final apresenta os valores de R_{factor} e R_{free} de 26.7 e 31.7%. A diferença entre os valores de R_{factor} e R_{free} , e o valor relativamente alto encontrado para o R_{factor} sugeriam algum problema na qualidade dos dados utilizados

Contudo, a estrutura também foi refinada utilizando o conjunto de dados Tc_DTT_01, grupo espacial $P2_12_12_1$, com os dados processados no programa *XDS/XSCALE*. As coordenadas do modelo refinado com *MOSFLM* foram utilizadas como modelo para este refinamento mantendo o mesmo conjunto R_{free} de dados. O primeiro passo foi a utilização da técnica de anelamento simulado “simulated annealing” implementada no programa *CNS*. Vários ciclos de refinamento posicional utilizando o programa *REFMAC* foram realizados, vinculando fortemente as moléculas relacionadas por simetria (NCS-tight). Um total de 852 moléculas de água foram adicionadas manualmente e através da utilização do programa *ARP/wARP*. Através do programa *Coot*, quatro moléculas de sulfato foram adicionadas. Após todo este processo de busca de ligantes na estrutura, e inúmeros ciclos de refinamento, o modelo final apresenta os valores de R_{factor} e R_{free} de 22.9 e 29.1%.

Uma vez que a diferença entre os valores de R_{free} e R_{factor} ainda era relativamente alta, característica esta observada para todos os conjuntos de dados testados, questionamos a hipótese de que os cristais obtidos para *TcDHODH* poderiam ser geminados (“twinned”).

4.8.2 Refinamento da estrutura de *TcDHODH* com dados “twinning”

O teste inicial de “Merohedral Twin” foi realizado utilizando um algoritmo desenvolvido por Padilla-Yeates (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/pystats>) (PADILLA; YEATES, 2003). Uma comparação entre comportamentos teóricos da distribuição cumulativa de intensidades com experimentais, revelam se os dados experimentais são geminados ou não. Um exemplo desta comparação está sendo representado na **Figura 30**. A **Figura 30** foi obtida através da análise dos dados obtidos do conjunto de dados Tc_DTT_01, que indica tratar-se de um cristal com geminação parcial.

Figura 30: A reta em vermelho representa o comportamento teórico da distribuição cumulativa de intensidades de um cristal não geminado. A curva em vermelho representa o comportamento teórico da distribuição cumulativa de intensidades de um cristal com geminação perfeita. A curva em azul representa a distribuição cumulativa de intensidades dos dados de *TcDHODH*, que é considerado um cristal com geminação parcial.

A operação e a fração de geminação foram determinadas, utilizando uma ferramenta chamada *Xtriage* dentro do programa *PHENIX* (ADAMS et al., 2002) com o auxílio do Prof. Dr. Jorge Iulek da Universidade Federal de Ponta Grossa. Os resultados obtidos indicam que para o cristal Tc_DTT_01 temos que a fração de geminação é de 11,7 % e para o cristal Tc_DTT_05 temos que a fração de geminação é de quase 50 %, ou seja, geminação perfeita, e neste caso o programa *Xtriage* sugere processar os dados no grupo espacial tetragonal. Estes resultados são compatíveis com o comportamento do processamento fazendo com que os dados Tc_DTT_05 fossem processados também em $P4_12_12$ enquanto isto não é possível para Tc_DTT_01. A operação de geminação obtida no programa *Xtriage* é $-h -l -k$.

Como o conjunto de dados Tc_DTT_01 possui a menor fração de geminação, e o processamento deste conjunto de dados utilizando o programa *XDS/XSCALE* se mostrou bem melhor que os outros, decidimos prosseguir o refinamento somente com este conjunto de dados.

Na tentativa de obter um conjunto de dados com uma menor fração de geminação, optamos por processar novamente o conjunto de dados Tc_DTT_01, com diferentes grupos de imagens. Isto porque acreditamos que os cristais apresentam fração de geminação variável ao longo de sua extensão. Quando o cristal é rotacionado, partes diferentes dele são expostas ao feixe, variando a fração de geminação total. O processamento com diferentes grupos de imagens foi possível porque os dados provenientes do processamento obtido para as 150 imagens coletadas eram bastante redundantes. Processamos o conjunto de dados com as imagens 1 a 90 e com as imagens 50 a 150. Conseguimos obter uma menor fração de geminação (9,1%), quando somente as 90 primeiras imagens foram processadas. A maior fração de geminação foi obtida quando foi realizado o processamento das imagens 50 a 150 (14,0%). Quando processado todas as 150 imagens, a fração de geminação foi intermediária (11,7%). Baseando-se nesta informação, a estrutura foi refinada com o conjunto de dados

Tc_DTT_01, utilizando somente as primeiras 90 imagens. O processamento das imagens foi realizado no programa *XDS/XSCALE*. Os dados da coleta e do processamento destas primeiras 90 imagens estão sumarizados na **Tabela 2**. Deste ponto em diante, todo o refinamento foi realizado utilizando o programa *CNS* (BRUNGER et al., 1998), por possuir algoritmos para refinar dados provenientes de cristais geminados, levando-se em consideração a fração de geminação de 9,1% e a operação de geminação $-h -l -k$, obtida no programa *Xtriage*. O primeiro passo foi a utilização da técnica de anelamento simulado “simulated annealing”, utilizando simetria não cristalográfica estrita (todas as moléculas da unidade assimétrica são consideradas idênticas). No segundo passo realizamos refinamento posicional e refinamento dos fatores de temperatura individuais, também utilizando NCS estrita, e, em seguida, o ajuste manual das posições atômicas no programa *Coot*. No terceiro passo, realizamos o refinamento posicional e refinamento dos fatores de temperatura individuais, diminuindo o vínculo de simetria não cristalográfica imposto no início do refinamento. Mais ajustes manuais de posições atômicas no programa *Coot* foram realizados, além da adição de mais águas e ligantes. Este passo foi sendo repetido por várias vezes até a liberação total do vínculo de simetria não cristalográfica entre as quatro subunidades. Em uma segunda etapa do refinamento, foi diminuindo-se aos poucos o vínculo de simetria não cristalográfica, até excluir totalmente o vínculo de NCS entre as quatro moléculas da unidade assimétrica. Um total de 795 moléculas de água foi adicionado. A adição de quatro moléculas de sulfato e cinco moléculas de glicerol foi realizada utilizando o programa *Coot*. Após todo este processo de buscas de ligantes na estrutura, e inúmeros ciclos de refinamento, o modelo final apresenta os valores de R_{factor} e R_{free} de 20,6 e 25,1%, respectivamente. A qualidade do mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, com σ igual 1.0, está ilustrada na **Figura 31**.

Tabela 2 – Dados cristalográficos e estatísticos para o processamento das 90 primeiras imagens do conjunto de dados Tc_DTT_01, coletado no LNLS ($\lambda=1.427\text{\AA}$), a 100K. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado. Algumas informações referentes ao refinamento também estão sendo representadas nesta tabela

Coleta de Dados	
Comprimento de onda ($\text{\AA}$)	1,427
Temperatura (K)	100
Grupo espacial	$P2_12_12_1$
Parâmetros de rede ($\text{\AA}$)	$a = 82,39, b = 123,92, c = 128,89$
Intervalo de resolução ($\text{\AA}$)	100-2,2
Número de reflexões únicas	65377
Completeza (%)	96,6 (77,2)
Multiplicidade	3,5
R_{sym}^a (%)	11,8 (38,4)
$I/\sigma(I)$	9,72 (4,3)
Moléculas na unidade assimétrica	4
V_M ($\text{\AA}^3 \text{Da}^{-1}$) (Coeficiente de Matthews)	2,4
Solvente (%)	49,3
Refinamento	
Resolução ($\text{\AA}$)	55,8-2,2
Número de reflexões	
trabalho	59496
teste ^b	3053
Fator de temperature médio ($\text{\AA}^2$)	15,30

^a $R_{\text{sym}} = \sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum I_{\text{obs}}$ onde $\langle I \rangle$ é a média das intensidades calculada a partir das observações para as reflexões relacionadas por simetria.

Figura 31: A figura acima a qualidade do mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, com σ igual 1.0, representado em verde.

4.9 Avaliação dos dados estereoquímicos

As ligações N-C α e C α -C podem sofrer rotações em ângulos torsionais denominados ϕ (*phi*) e ψ (*psi*), respectivamente. O gráfico de Ramachandram mostra a distribuição dos ângulos torsionais associados a cada aminoácido (RAMACHANDRAM et al., 1963). O diagrama de Ramachandram (**Figura 32**), da estrutura final de TcDHODH, mostra que 88,8% dos resíduos encontram-se nas regiões mais favoráveis, 11,0% na região adicional permitida, 0,2% na região generosamente permitida e nenhum resíduo encontra-se na região não permitida. Os desvios médio quadrático (rmsd) dos valores ideais obtidos para o modelo final foi de 0,008Å para distância de ligações e 1,5° para ângulos de ligação.

Figura 32: Gráfico Ramachandram da estrutura final de TcDHODH.

4.10 Análise e comparações Estruturais

4.10.1 Descrição geral da estrutura de *Tc*DHODH

A estrutura cristalográfica de *Tc*DHODH consiste em um tetrâmero de quatro subunidades idênticas, denominadas A, B, C e D. O modelo final é composto de 1244 aminoácidos, 4 moléculas de FMN (uma em cada monômero), 4 íons sulfato (um em cada monômero), 5 moléculas de glicerol e 795 moléculas de água. A cauda de histidina, assim como os dois primeiros e o último resíduo (Met1, Met2 e Glu314) não são visíveis na densidade eletrônica. As coordenadas da estrutura da enzima diidroorotato desidrogenase de *T. cruzi* (cepa Y) foram depositadas no banco de dados PDB (Protein Data Bank) com código de acesso **3C3N**. As coordenadas cristalográficas de *Tc*DHODH, assim como os dados de difração, se encontram anexadas no CD localizado na contra-capá da presente dissertação.

Uma das subunidades do tetrâmero está sendo representada na **Figura 33** juntamente com a denominação de cada elemento de estrutura secundária presente na estrutura tridimensional de *Tc*DHODH.

Os elementos de estrutura secundária presentes na estrutura de *Tc*DHODH também estão sendo indicados no alinhamento entre as DHODHs da família 1A, representado na **Figura 34**. A estrutura final de um monômero de *Tc*DHODH consiste de 16 fitas β , 9 α hélices e 2 hélices 3_{10} (**Figura 33**). Apesar da baixa identidade seqüencial entre as DHODHs das famílias 1A e 2 (em torno de 20%), o enovelamento na forma de um barril α/β é muito similar entre essas duas classes. *Tc*DHODH não foge a regra e como outras DHODHs se enovela na forma de um barril α/β , consistindo predominantemente de um centro principal de oito fitas β paralelas ($\beta 1$ – $\beta 8$) rodeadas por oito α hélices ($\alpha 1$ – $\alpha 8$). Os elementos de estrutura secundária adicionais (designados com letras) e “loops” estão presentes interligando as oito

fitas β e as oito α hélices principais que formam o barril. A molécula de FMN está localizada no topo do barril.

Figura 33: Monômero de *TcDHODH* com a denominação dos elementos de estrutura secundária, mostrando a localização do FMN (em verde). A região N-terminal está representada pela letra “N”, e a região C-terminal está sendo representada pela letra “C”. Figura em “stereo” construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002).

Excluindo as duas pequenas fitas β antiparalelas (βA e βB), encontradas na base do barril, todos os elementos de estrutura secundária adicionais estão localizados na parte superior do barril. (LIU et al., 2000; NORAGER et al., 2002; ROWLAND et al., 1998; HURT et al., 2005; CORDEIRO et al., 2006).

A sobreposição estrutural entre a enzima DHODH de *Trypanossoma cruzi*, pertencente a família 1A, com a enzima DHODH de *Homo sapiens*, pertencente a família 2, gerou um desvio médio quadrático de 1,72 Å (cadeia A), 1,74 Å (cadeia B), 1,72 Å (cadeia C) e 1,74 Å (cadeia D), para 272 C α alinhados. Valores bastante próximos são encontrados quando a estrutura de *TcDHODH* é comparada com as estruturas da enzima DHODH de *Plasmodium falciparum* e de *Escherichia coli*, ambos membros da família 2. Apesar do alto desvio encontrado na sobreposição estrutural entre as enzimas DHODH de diferentes

famílias, estas mantêm o mesmo domínio barril α/β . Quando sobreposta a estrutura de *TcDHODH* com outras estruturas de enzimas pertencentes a família 1A, como DHODH de *Lactococcus lactis* A, *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*, o desvio médio quadrático é bem menor, o que é esperado devido a maior identidade sequencial entre essas enzimas: *TcDHODH* apresenta 56% de identidade sequencial com DHODH de *Lactococcus lactis* A (*LlDHODH*(A)), 75% com DHODH de *Leishmania major* (*LmDHODH*), 79% com DHODH de *Trypanosoma brucei* (*TbDHODH*). Este fato é comprovado após a sobreposição entre *TcDHODH* e *LlDHODH*(A), cujo rmsd foi de 1,04 Å, para 302 C α alinhados. Já quando 311 C α foram alinhados, entre *TcDHODH* e *TbDHODH* o rmsd foi de 0,53Å e quando 312 C α foram alinhados, entre *TcDHODH* e *LmDHODH* o rmsd foi de 0,41Å. Estes resultados estruturais comparativos entre a estrutura de *TcDHODH* e outras estruturas de DHODH são consistentes com o fato de que, embora as estruturas sejam, de uma forma geral, conservadas para todas as DHODHs, existem desvios significativamente maiores quando comparamos a família 1A com a família 2 (em torno de 1,75Å), do que quando comparamos membros dentro da mesma família 1A. Outra observação importante é que ao comparar as estruturas de membros da família 1A, existe uma grande similaridade estrutural entre as estruturas dos tripanosomatídeos (*T. brucei*, *L. major* e diferentes cepas de *T. cruzi*). A identificação e análise mais profunda das regiões características das enzimas de tripanosomatídeos poderão auxiliar no planejamento específico de ligantes.

Figura 34: Alinhamento entre as seqüências de DHODH de *T. cruzi* cepa Y (TcDHODH_Y), cepa Tulahuen (TcDHODH_T1, TcDHODH_T2, TcDHODH_T3), cepa CL Brener (TcDHODH_CLB1, TcDHODH_CLB2, TcDHODH_CLB3) e DHODH de *L. lactis* (LlDHODH(A)), de *L. major* (LmDHODH) e de *T. brucei* (TbDHODH). As posições indicadas em amarelo correspondem aos resíduos localizados nas regiões polimórficas da enzima TcDHODH dos diferentes genes e cepas. As caixas em vermelho representam os resíduos que são conservados em todas as seqüências. Em azul está sendo representado os elementos de estrutura secundária, e sua nomenclatura, encontrados na estrutura da enzima TcDHODH cepa Y. O alinhamento foi realizado no programa *MultAlin* (CORPET, 1988), e imagem foi criada no programa *ESPrIt* (GOUET et al., 1999).

4.10.2 Análise estrutural do tetrâmero de *Tc*DHODH

Embora, o fato de encontrarmos a forma tetramérica de *Tc*DHODH poderia ser um indicio da relevância funcional desta forma oligomérica, os experimentos de caracterização da enzima por cromatografia por filtração em gel mostraram que a enzima nativa é encontrada na forma dimérica em solução. A enzima elui em um único pico simétrico da coluna Sephacryl-HP S100 16/60 em um volume de retenção correspondente a uma massa molecular de aproximadamente 74 kDa, o que corresponde a um homodímero com duas subunidades de 37 kDa. Além disso, a comparação estrutural entre *Tc*DHODH e *Tb*DHODH, que também é encontrada na forma tetramérica no cristal, mostrou que o tetrâmero observado nas duas estruturas são diferentes e os monômeros estão orientados entre si de forma diferente (**Figura 35**). Estes resultados sustentam a hipótese de que o tetrâmero encontrado para a estrutura de *Tc*DHODH, assim como para *Tb*DHODH, são conseqüências de forças de empacotamento cristalino.

Figura 35: Sobreposição entre as estruturas dos tetrâmeros, representadas apenas por Ca , das enzimas *Tc*DHODH e *Tb*DHODH. Em verde está sendo representado as quatro moléculas de *Tc*DHODH, e em roxo está sendo representada as quatro moléculas de *Tb*DHODH. Figura construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002).

Os quatro monômeros de *TcDHODH* na unidade assimétrica formam dois dímeros que se assemelham a estrutura dimérica de outros membros da família 1A (ROWLAND et al., 1998; FELICIANO et al., 2006). Os dois dímeros estão relacionados por um eixo de ordem dois (2) não cristalográfico em torno do eixo “a” seguido de uma translação (7,9; 0,1; 64,99). Uma sobreposição virtual, somente de C α , dos dois dímeros encontrados na unidade assimétrica indicou um rmsd de 0,1425 Å, sugerindo que não há diferenças significativas entre esses dímeros. Além disso, não existem diferenças significativas entre os valores do fator de temperatura entre eles. A maior diferença é encontrada nos resíduos localizados na hélice $\alpha 8$ de ambas subunidades, expostas ao solvente, onde as distâncias entre dois átomos de C α , após a superposição dos dois dímeros, são de 0,41 Å. A hélice $\alpha 8$ é uma longa hélice encontrada na estrutura e uma das regiões mais variada encontrada nas seqüências das DHODHs atualmente conhecidas. A forma tetramérica de *TcDHODH* encontrada na unidade assimétrica está sendo mostrado na **Figura 36**. Com base no dímero encontrado na estrutura cristalina de outras enzimas DHODHs da família 1A, concluímos que o primeiro dímero funcional é composto pelas subunidades A e D, e o segundo pelas subunidades B e C. Várias interações são responsáveis por manter o dímero funcional e o tetrâmero no cristal. As ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades A e D formando o primeiro dímero funcional se encontram sumarizadas na **Tabela 3**. As ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades B e C formando o segundo dímero funcional se encontram sumarizadas na **Tabela 4**.

Tabela 3 – Ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades A e D, que são responsáveis pela manutenção de um dos dímeros funcionais encontrado na estrutura de *TcDHODH*

Cadeia A Resíduo(átomo)	Cadeia D Resíduo(átomo)	Distância interatômica (Å)
Gln140(NE2)	Phe171(O)	2.55
Phe171(O)	Gln140(NE2)	2.63
Phe171(O)	Asn200(ND2)	2.87
Asp172(OD2)	Gln140(N)	3.27
Asn200(ND2)	Phe171(O)	2.98
Leu202(N)	Pro229(O)	2.54
Glu207(O)	Lys298(NZ)	2.87
Ala206(O)	Lys298(NZ)	2.73
Glu209(O)	Lys311(N)	2.68
Val211(N)	Lys311(O)	2.71
Pro229(O)	Leu202(N)	2.66
Lys298(NZ)	Ala206(O)	2.76
Lys298(NZ)	Glu209(OE2)	2.64
Lys311(O)	Val211(N)	2.99
Lys311(N)	Glu209(O)	2.91

Tabela 4 – Ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades B e C, que são responsáveis pela manutenção do segundo dímeros funcional encontrado na estrutura de *TcDHODH*

Cadeia B Resíduo(átomo)	Cadeia C Resíduo(átomo)	Distância interatômica (Å)
Gln140(NE2)	Phe171(O)	2.40
Phe171(O)	Gln140(NE2)	3.99
Phe171(O)	Asn200(ND2)	2.93
Asp172(OD2)	Gln140(N)	2.77
Asn200(ND2)	Phe171(O)	3.02
Leu202(N)	Pro229(O)	2.53
Glu207(O)	Lys298(NZ)	2.88
Ala206(O)	Lys298(NZ)	2.84
Glu209(O)	Lys311(N)	2.67
Val211(N)	Lys311(O)	2.68
Pro229(O)	Leu202(N)	2.53
Lys298A(NZ)	Ala206(O)	3.73
Lys298(NZ)	Glu209(OE2)	2.77
Lys311(O)	Val211(N)	2.77
Lys311(N)	Glu209(O)	2.77

Figura 36: Tetrâmero de *TcDHODH*. As moléculas em amarelo (A) e verde (D) representam um dímero funcional, enquanto que as moléculas em rosa (C) e pink (B) representam o segundo dímero funcional. As moléculas de FMN estão sendo representadas azul. Representação estereográfica construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002).

Quando comparadas as interações presentes entre as subunidades A-D e B-C, observa-se que a maior parte das interações são semelhantes. A partir desta análise concluímos que as interações listadas nas **Tabelas 3 e 4** são as responsáveis pela manutenção de cada dímero funcional da enzima *TcDHODH*. Como na estrutura de *LlDHODH* (ROWLAND et al., 1997), os resíduos Phe171 das subunidades A e D, bem como das subunidades B e C, auxiliam a manutenção de cada dímero através de uma interação do tipo π - π . A **Figura 37** ilustra as interações responsáveis pela formação do dímero AD, que se assemelha ao dímero BC. Na estrutura cristalográfica de *TcDHODH*, encontra-se uma molécula de glicerol na interface dos dois dímeros. Esta molécula está fazendo ligações de hidrogênio com o átomo de nitrogênio da cadeia lateral da His175 de ambos os dímeros, e também com o átomo de nitrogênio da cadeia principal da Phe171 de ambos os dímeros. Por sua vez, o átomo de nitrogênio da cadeia principal da His175 interage com o oxigênio da cadeia principal da Asp172, resíduo que antecede a Phe171, responsável pela interação π - π .

A carboxila da cadeia principal do resíduo Phe171 interage com o átomo de nitrogênio N δ da cadeia lateral do resíduo Asn200, e o átomo de oxigênio O δ da cadeia lateral do resíduo Asn200 interage com o nitrogênio da cadeia lateral da Lys216. A cadeia lateral da Lys216 também interage com a carboxila da cadeia principal da Pro133. Interessantemente, ao analisarmos esta rede de interações, notamos que existe uma forte comunicação entre as moléculas que compõem o dímero funcional. Uma vez que estudos já mostraram a importância do dímero para a atividade das enzimas da família 1A (ROWLAND et al., 1997) essa região pode ser considerada como um bom alvo para o desenho de inibidores específicos para enzimas da família 1A. As interações entre as subunidades A-B e C-D são responsáveis pela manutenção do tetrâmero. As ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades A e B estão sendo representadas na **Tabela 5**. As ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades C e D sendo representadas na **Tabela 6**.

Tabela 5 – Ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades A e B, que são responsáveis pela manutenção do tetrâmero de TcDHODH encontrado na unidade assimétrica

Cadeia A Resíduo(átomo)	Cadeia B Resíduo(átomo)	Distância interatômica (Å)
Arg297(NE)	Asp205(OD2)	2.87
Arg297(NH2)	Asp205(OD1)	3.26
Lys298(NZ)	Glu207(OE1)	2.85
Glu290(OE2)	Pro64(N)	3.38
Arg286(N)	Glu278(OE1)	3.13

Tabela 6 – Ligações de hidrogênio presentes entre os resíduos das subunidades A e D, que são responsáveis pela manutenção do tetrâmero de TcDHODH encontrado na unidade assimétrica

Cadeia C Resíduo(átomo)	Cadeia D Resíduo(átomo)	Distância interatômica (Å)
Arg286(N)	Glu278(OE1)	3.02
Glu290(OE2)	Pro64(N)	2.94
Arg297(NE)	Glu207(OE1)	3.04
Arg297(NE)	Asp205(OD2)	2.68
Arg297(NH1)	Asp205(OD2)	3.22
Lys298(NZ)	Glu207(OE1)	3.20

Figura 37: Interações entre as subunidades A (verde) e D (roxo) responsáveis pela manutenção do dímero funcional. Em cinza está sendo representada a molécula de glicerol. Figura no programa *Pymol* (DELANO, 2002).

4.10.3 Proposta de mecanismo catalítico para a enzima *TcDHODH*

O ciclo catalítico da enzima DHODH consiste de duas etapas de reação. Na primeira etapa, o FMN é reduzido pelo DHO. Na segunda etapa, o FMN é oxidado pelo fumarato (no caso de *TcDHODH*). Em todas as famílias das DHODHs, DHO é convertido em orotato pela quebra de duas ligações C-H. Ambas as reações envolvem a desprotonação e a transferência de um hidreto. Durante a oxidação do DHO, um átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono C5 do DHO é removido por uma base, enxofre da cadeia lateral da cisteína na família 1A e o oxigênio da cadeia lateral da serina na família 2. O hidrogênio ligado ao carbono C6 do DHO é transferido ao FMN como um hidreto, formando a primeira ligação N-H, com o átomo de nitrogênio N5 do anel isoaloxazina do FMN. Comparações estruturais entre as classes 1A e 2 da DHODHs sugerem que o mecanismo da primeira parte depende de dois resíduos de lisina (Lys45 e Lys166) que são essenciais para a função catalítica (NORAGER et al., 2002). A informação obtida da sobreposição estrutural é que os resíduos Lys45 e Lys166 são altamente conservados nas famílias 1A e 2 das DHODHs, assim como encontrado na estrutura de *TcDHODH*. A transferência do hidreto ao FMN é favorecida devido a interação da cadeia lateral da Lys45 com o grupo carboxila da molécula de DHO. Já a Lys166 é responsável por balancear a carga negativa criada no anel isoaloxazina do FMN após a transferência do hidreto (**Figura 38**).

A oxidação do DHO a orotato poderia ocorrer via dois mecanismos. No primeiro, ambas as ligações C-H se rompem simultaneamente, e no segundo mecanismo, as ligações se rompem sequencialmente. Estudos realizados com as enzimas *HsDHODH* e *EcDHODH*, pertencentes a família 2, sugerem que essas enzimas utilizam os dois mecanismos. Já a observação da enzima *LlDHODH*(A) sugere que a reação segue o primeiro mecanismo (rompimento simultâneo das ligações – eliminação bimolecular [E2]) (**Figura 39**) (FRAAIJE; MATTEVI, 2000).

Figura 38: Representação esquemática do mecanismo da primeira etapa reacional das enzimas DHODHs de ambas as famílias. O esquema demonstra o mecanismo de reação proposto para a reação de oxidação do DHO a orotato. Os resíduos Lys45 e Lys166 são altamente conservados nas DHODHs. A base B⁻ representada em verde corresponde ao resíduo cisteína para as enzimas da família 1 e ao resíduo serina para as enzimas da família 2. No caso de TcDHODH, a base B⁻ corresponde a cisteína catalítica Cys132. Figura adaptada de Norager (2002).

Apesar de inicialmente o mecanismo da primeira etapa de reação parecer ser o mesmo entre as DHODHs das diferentes famílias, como observado na **Figura 38**, existem essas diferenças no modo em que ocorre a oxidação do DHO a orotato. Além disso, a importância do resíduo cisteína, como base catalítica em membros da família 1A, já foi investigada para a enzima *L/DHODH(A)*, através da mutação deste resíduo por uma alanina e também por uma serina. Em ambos os mutantes a redução do FMN é muito lenta. Logo, apesar da serina atuar como base catalítica nas enzimas da família 2, ela não possui a mesma

eficiência quando está presente nas enzima da família 1A, indicando a existência de diferenças entre os mecanismos catalíticos das DHODHs das diferentes famílias.

Figura 39: Sugestão do mecanismo da oxidação do DHO. A conversão do DHO para orotato ocorre via um simples estado de transição, no qual a cisteína catalítica, Cys132, desprotona o DHO com a transferência de um hidreto ao FMN. Figura adaptada de Fraaije e Mattevi (2000).

4.10.4 Análise do sítio de ligação do FMN

O sítio de ligação do FMN é localizado entre o topo do barril e o subdomínio formado por três fitas β antiparalelas, β C, β D e β H. A molécula de FMN forma múltiplas ligações de hidrogênio com os resíduos de *TcDHODH*, e este padrão de ligações de hidrogênio é encontrado em todas as quatro subunidades de *TcDHODH*. Os átomos de oxigênio do grupo fosfato forma ligações de hidrogênio com os grupamentos NH da cadeia principal dos resíduos Gly224, Gly252, Gly273 e Thr274, e uma molécula de água. A hidroxila do resíduo Thr274 também faz ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio do grupo fosfato. As hidroxilas do FMN, fora do anel isoaloxazina, fazem ligações de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia lateral da Lys166, com o grupo carboxila da Val195 e da Ala21, e com uma molécula de água. Existem ligações de hidrogênio entre o anel isoaloxazina do FMN e as cadeias laterais dos resíduos Lys166, Asn196, Asn129, Lys45 e Ser46. O anel isoaloxazina do FMN também faz ligações de hidrogênio com as carboxilas da cadeia principal da Ala21, e com o grupamento NH da cadeia principal da Ser46. A ligação *cis*-peptídica, entre a Cys194 e Val195 facilita a formação da ligação de hidrogênio entre o oxigênio (FMN) com o grupo carboxila da Val195. A **Figura 40** mostra o ambiente em que o

FMN está localizado na subunidade A, como exemplo de todas as interações com os átomos da proteína. Análise do alinhamento seqüencial (**Figura 34**) indica que todos os resíduos encontrados interagindo com o FMN são conservados nas DHODHs da família 1A, com exceção da Ala21 e Val195, que são conservadamente substituídas, sugerindo que apesar da interação com o FMN se dar com a carboxila e o grupamento NH da cadeia principal desses resíduos, a natureza da cadeia lateral pode ser crucial para o bom enovelamento da proteína. Além dos resíduos, o anel isoaloxazina do FMN também coordena com o íon sulfato presente no sítio ativo. A região hidrofóbica do anel isoaloxazina (dimetilbenzeno) não possui nenhum contato na enzima de *T. cruzi*, porém, na enzima humana este anel se encontra empacotado, contra os resíduos Asn145, Tyr356 e Tyr147 (nomenclatura da enzima humana) (LIU et al., 2000). A extremidade do anel dimetilbenzeno está exposta ao “canal” hidrofóbico e esta é presumidamente a região na qual a segunda reação redox entre FMNH₂ e a ubiquinona ocorre, no caso da enzima humana. Uma vez que a flavina é fundamental na catálise das DHODHs, essa diferença na exposição deste grupamento pode ser utilizada como ponto de partida para a análise das diferenças no mecanismo reacional entre as enzimas.

Figura 40: Representação da molécula FMN e as interações com a enzima. As ligações de hidrogênio entre a proteína e a molécula FMN são mostradas com linhas pontilhadas em vermelho junto com as distâncias interatômicas em Å. Os átomos de carbono do FMN estão sendo representados em amarelo, os de nitrogênio em azul, os de oxigênio em vermelho e o de fósforo em laranja. A molécula do íon sulfato (SO₄²⁻) está representada em verde. Representação em “stereo” construída no programa Pymol (DELANO, 2002).

4.10.5 Íon sulfato

Durante o refinamento, uma inspeção criteriosa no mapa de densidade eletrônica identificou íons sulfato (provenientes do tampão de cristalização) no sítio ativo de cada uma das quatro subunidades (**Figura 41**).

Figura 41: A figura ilustra o íon sulfato posicionado ao lado da molécula FMN e o mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$, com σ igual 1.5. O íon está sendo representado com o átomo de enxofre em verde e os átomos de oxigênio em vermelho. Figura construída no programa *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004).

Apesar de não ser a única enzima das DHODHs a utilizar sulfato de amônio como componente da solução de cristalização (*HsDHODH* e *PfDHODH* também utilizam), *TcDHODH* é a única que apresenta íon sulfato coordenando no sítio ativo. Comparação estrutural entre *TcDHODH* e DHODHs de *L. lactis* e humana complexadas com orotato (ROWLAND et al., 1998; LIU et al., 2000), mostrou que os íons sulfatos estão localizados no sítio de ligação do orotato. O anel pirimidínico da molécula de orotato é quase paralelo ao FMN na estrutura de DHODH humana. A localização e orientação do orotato na estrutura da humana é essencialmente a mesma aquela encontrada na estrutura de *L. lactis* (ROWLAND et al., 1998). Interessantemente, o íon sulfato fazendo ligações de hidrogênio com duas moléculas de água se assemelha a estrutura do orotato (**Figura 42**). A cadeia lateral dos resíduos Lys45, Cys132 e Asn134, e o grupo NH da cadeia principal dos resíduos Met71,

Gly72 e Leu73 coordenam com o íon sulfato, enquanto que as cadeias laterais dos resíduos Asn69, Asn129, Asn196 e Ser197 coordenam com as duas moléculas de água que se situam na posição dos átomos de oxigênio O2 e O4 do orotato (**Figura 42**). Além disso, o íon sulfato coordena com o átomo de nitrogênio N5 do anel isoaloxazina do FMN. Todas as interações com *TcDHODH* são conservadas nos complexos DHODH-orotato, com exceção da Leu73 e Ser197 que são substituídas pelos resíduos Phe e Thr, respectivamente, na família 2 das DHODHs. A comparação entre os resíduos que participam da interação com o FMN, com orotato em alguns casos, e com fumarato em *LmDHODH*, entre as famílias 1A e 2 das DHODHs, está sendo demonstrada na **Figura 43**. Como pode-se notar, pequenas diferenças no ambiente químico onde se localiza a molécula FMN são encontradas nas diferentes famílias. Assim, embora o modo de atuação das enzimas das famílias 1A e 2 das DHODHs pareça ser bastante semelhante, essas diferenças químicas podem ainda ser exploradas para aumentar a seletividade das drogas.

Figura 42: As interações entre os resíduos de *TcDHODH* mais duas moléculas de água (representadas por asterisco em preto) e o íon sulfato, no sítio ativo, estão representadas por tracejados em preto. A molécula de orotato, representada em verde, é proveniente da sobreposição da estrutura da enzima *TcDHODH* com a estrutura da enzima do complexo *LmDHODH*-orotato (ROWLAND et al., 1998). As interações entre os resíduos de *TcDHODH* e a molécula orotato estão sendo representadas em vermelho. Representação em “stereo” construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002).

Figura 43: Interações do FMN no sítio ativo das DHODHs de *TcDHODH* (A), *TbDHODH* complexada com orotato (B), *LmDHODH* complexada com fumarato (C), *LmDHODH* complexada com orotato (D), *LfDHODH*(A) nativa (E), *LfDHODH*(A) complexada com orotato (F), *HsDHODH* complexada com orotato (G), *EcDHODH* complexada com orotato (H) e *PfDHODH* complexada com orotato (I). Nota-se uma semelhança nas interações dos resíduos das enzimas com o orotato, e a proximidade do carbono C5 do orotato com o nitrogênio N5 do FMN. Em *TcDHODH* (A) encontra-se o íon sulfato na mesma posição que as moléculas de orotato nas outras enzimas, e também na mesma posição que a molécula fumarato na enzima de *LmDHODH* (C). Figura construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002).

4.10.6 Polimorfismo entre os diferentes genes de *TcDHODH*

O alinhamento entre a sequência de nucleotídeos obtida para a cepa Y e as sequências das cepas Tulahuen e CL Brener disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), revelou que o gene de *TcDHODH* difere em 28 dos 942 bp (**Figura 44**). Embora encontradas várias diferenças em termos de sequência de nucleotídeos, estas depois de traduzidas levam a um número menor de mutações em termos de sequência de aminoácidos.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
TcDHODH_Y	ATGA	GGTCTGAA	CTCAACCTCCTCGACCATGTGTTGCGCAACCCCTTCATGAAGCGCGCGGG	GTTCCTCTGCAGCACCAGGAAAGACCTGCGCTGCA							
TcDHODH_T1	ATGA	GGTCTGAA	CTCAACCTCCTCGACCATGTGTTGCGCAACCCCTTCATGAAGCGCGCGGG	GTTCCTCTGCAGCACCAGGAAAGACCTGCGCTGCA							
TcDHODH_T2	ATGA	GGTCTGAA	CTCAACCTCCTCGACCATGTGTTGCGCAACCCCTTCATGAAGCGCGCGGG	GTTCCTCTGCAGCACCAGGAAAGACCTGCGCTGCA							
TcDHODH_T3	ATGA	GGTCTGAA	CTCAACCTCCTCGACCATGTGTTGCGCAACCCCTTCATGAAGCGCGCGGG	GTTCCTCTGCAGCACCAGGAAAGACCTGCGCTGCA							
TcDHODH_CLB1	ATGA	GGTCTGAA	CTCAACCTCCTCGACCATGTGTTGCGCAACCCCTTCATGAAGCGCGCGGG	GTTCCTCTGCAGCACCAGGAAAGACCTGCGCTGCA							
TcDHODH_CLB2	ATGA	GGTCTGAA	CTCAACCTCCTCGACCATGTGTTGCGCAACCCCTTCATGAAGCGCGCGGG	GTTCCTCTGCAGCACCAGGAAAGACCTGCGCTGCA							
TcDHODH_CLB3	ATGA	GGTCTGAA	CTCAACCTCCTCGACCATGTGTTGCGCAACCCCTTCATGAAGCGCGCGGG	GTTCCTCTGCAGCACCAGGAAAGACCTGCGCTGCA							
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
TcDHODH_Y	TGACAGCCTCCTCCAGCGGCGCACTTGTGTGCGAAGAGCTGCACGAGTGACCTCGCGATGGTAACCCCGAGCGCGGTTACATGGCC	TTCCACTTGG	AG								
TcDHODH_T1	TGACAGCCTCCTCAGCGGCGCACTTGTGTGCGAAGAGCTGCACGAGTGACCTCGCGATGGTAACCCCGAGCGCGGTTACATGGCC	TTCCACTTGG	AG								
TcDHODH_T2	TGACAGCCTCCTCCAGCGGCGCACTTGTGTGCGAAGAGCTGCACGAGTGACCTCGCGATGGTAACCCCGAGCGCGGTTACATGGCC	TTCCACTTGG	AG								
TcDHODH_T3	TGACAGCCTCCTCCAGCGGCGCACTTGTGTGCGAAGAGCTGCACGAGTGACCTCGCGATGGTAACCCCGAGCGCGGTTACATGGCC	TTCCACTTGG	AG								
TcDHODH_CLB1	TGACAGCCTCCTCCAGCGGCGCACTTGTGTGCGAAGAGCTGCACGAGTGACCTCGCGATGGTAACCCCGAGCGCGGTTACATGGCC	TTCCACTTGG	AG								
TcDHODH_CLB2	TGACAGCCTCCTCCAGCGGCGCACTTGTGTGCGAAGAGCTGCACGAGTGACCTCGCGATGGTAACCCCGAGCGCGGTTACATGGCC	TTCCACTTGG	AG								
TcDHODH_CLB3	TGACAGCCTCCTCCAGCGGCGCACTTGTGTGCGAAGAGCTGCACGAGTGACCTCGCGATGGTAACCCCGAGCGCGGTTACATGGCC	TTCCACTTGG	AG								
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
TcDHODH_Y	CATCAAACTCTATGGGGCTGCCCTAACCTGGGCTTTGATTCTATTGAAATACGCCA	CGATCTGCACGATTACAGCAAGAA	CCGCTTTTT	TCTCCATT							
TcDHODH_T1	CATCAAACTCTATGGGGCTGCCCTAACCTGGGCTTTGATTCTATTGAAATACGCCA	CGATCTGCACGATTACAGCAAGAA	CCGCTTTTT	TCTCCATT							
TcDHODH_T2	CATCAAACTCTATGGGGCTGCCCTAACCTGGGCTTTGATTCTATTGAAATACGCCA	CGATCTGCACGATTACAGCAAGAA	CCGCTTTTT	TCTCCATT							
TcDHODH_T3	CATCAAACTCTATGGGGCTGCCCTAACCTGGGCTTTGATTCTATTGAAATACGCCA	CGATCTGCACGATTACAGCAAGAA	CCGCTTTTT	TCTCCATT							
TcDHODH_CLB1	CATCAAACTCTATGGGGCTGCCCTAACCTGGGCTTTGATTCTATTGAAATACGCCA	CGATCTGCACGATTACAGCAAGAA	CCGCTTTTT	TCTCCATT							
TcDHODH_CLB2	CATCAAACTCTATGGGGCTGCCCTAACCTGGGCTTTGATTCTATTGAAATACGCCA	CGATCTGCACGATTACAGCAAGAA	CCGCTTTTT	TCTCCATT							
TcDHODH_CLB3	CATCAAACTCTATGGGGCTGCCCTAACCTGGGCTTTGATTCTATTGAAATACGCCA	CGATCTGCACGATTACAGCAAGAA	CCGCTTTTT	TCTCCATT							
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
TcDHODH_Y	TCAGGTCCTTCCGTGGAGGA	AATGTGGCGATGGTGGCGCGCCTTGCCCTGTGGCGCAGGAAAAAGGTGTATTGTTGGAAGTTGAACTCTTCTGCCCCGA									
TcDHODH_T1	TCAGGTCCTTCCGTGGAGGA	AATGTGGCGATGGTGGCGCGCCTTGCCCTGTGGCGCAGGAAAAAGGTGTATTGTTGGAAGTTGAACTCTTCTGCCCCGA									
TcDHODH_T2	TCAGGTCCTTCCGTGGAGGA	AATGTGGCGATGGTGGCGCGCCTTGCCCTGTGGCGCAGGAAAAAGGTGTATTGTTGGAAGTTGAACTCTTCTGCCCCGA									
TcDHODH_T3	TCAGGTCCTTCCGTGGAGGA	AATGTGGCGATGGTGGCGCGCCTTGCCCTGTGGCGCAGGAAAAAGGTGTATTGTTGGAAGTTGAACTCTTCTGCCCCGA									
TcDHODH_CLB1	TCAGGTCCTTCCGTGGAGGA	AATGTGGCGATGGTGGCGCGCCTTGCCCTGTGGCGCAGGAAAAAGGTGTATTGTTGGAAGTTGAACTCTTCTGCCCCGA									
TcDHODH_CLB2	TCAGGTCCTTCCGTGGAGGA	AATGTGGCGATGGTGGCGCGCCTTGCCCTGTGGCGCAGGAAAAAGGTGTATTGTTGGAAGTTGAACTCTTCTGCCCCGA									
TcDHODH_CLB3	TCAGGTCCTTCCGTGGAGGA	AATGTGGCGATGGTGGCGCGCCTTGCCCTGTGGCGCAGGAAAAAGGTGTATTGTTGGAAGTTGAACTCTTCTGCCCCGA									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
TcDHODH_Y	ATGTGCCCGGCAAAACCGCAGGTGGCCCTATGACCTTTGAGGCGATGCGCACTTACTTGCAGCAGGTGTGCTGTTGGCATA	GGAT	CCCTTTGG	GTGAAGAT							
TcDHODH_T1	ATGTGTGCCCGCAAAACCGCAGGTGGCCCTATGACCTTTGAGGCGATGCGCACTTACTTGCAGCAGGTGTGCTGTTGGCATA	GGAT	CCCTTTGG	GTGAAGAT							
TcDHODH_T2	ATGTGTGCCCGCAAAACCGCAGGTGGCCCTATGACCTTTGAGGCGATGCGCACTTACTTGCAGCAGGTGTGCTGTTGGCATA	GGAT	CCCTTTGG	GTGAAGAT							
TcDHODH_T3	ATGTGTGCCCGCAAAACCGCAGGTGGCCCTATGACCTTTGAGGCGATGCGCACTTACTTGCAGCAGGTGTGCTGTTGGCATA	GGAT	CCCTTTGG	GTGAAGAT							
TcDHODH_CLB1	ATGTGTGCCCGCAAAACCGCAGGTGGCCCTATGACCTTTGAGGCGATGCGCACTTACTTGCAGCAGGTGTGCTGTTGGCATA	GGAT	CCCTTTGG	GTGAAGAT							
TcDHODH_CLB2	ATGTGTGCCCGCAAAACCGCAGGTGGCCCTATGACCTTTGAGGCGATGCGCACTTACTTGCAGCAGGTGTGCTGTTGGCATA	GGAT	CCCTTTGG	GTGAAGAT							
TcDHODH_CLB3	ATGTGTGCCCGCAAAACCGCAGGTGGCCCTATGACCTTTGAGGCGATGCGCACTTACTTGCAGCAGGTGTGCTGTTGGCATA	GGAT	CCCTTTGG	GTGAAGAT							
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
TcDHODH_Y	GCCGCCGTACTT	GATATTGCACACTTTGATACGGCTGCTGCTGCTT	GAATGAGTTCCCACTTGTCAAAGTTTGTGACGCTGTGTGAA	AGTGTGCGGCAAC							
TcDHODH_T1	GCCGCCGTACTT	GATATTGCACACTTTGATACGGCTGCTGCTGCTT	GAATGAGTTCCCACTTGTCAAAGTTTGTGACGCTGTGTGAA	AGTGTGCGGCAAC							
TcDHODH_T2	GCCGCCGTACTT	GATATTGCACACTTTGATACGGCTGCTGCTGCTT	GAATGAGTTCCCACTTGTCAAAGTTTGTGACGCTGTGTGAA	AGTGTGCGGCAAC							
TcDHODH_T3	GCCGCCGTACTT	GATATTGCACACTTTGATACGGCTGCTGCTGCTT	GAATGAGTTCCCACTTGTCAAAGTTTGTGACGCTGTGTGAA	AGTGTGCGGCAAC							
TcDHODH_CLB1	GCCGCCGTACTT	GATATTGCACACTTTGATACGGCTGCTGCTGCTT	GAATGAGTTCCCACTTGTCAAAGTTTGTGACGCTGTGTGAA	AGTGTGCGGCAAC							
TcDHODH_CLB2	GCCGCCGTACTT	GATATTGCACACTTTGATACGGCTGCTGCTGCTT	GAATGAGTTCCCACTTGTCAAAGTTTGTGACGCTGTGTGAA	AGTGTGCGGCAAC							
TcDHODH_CLB3	GCCGCCGTACTT	GATATTGCACACTTTGATACGGCTGCTGCTGCTT	GAATGAGTTCCCACTTGTCAAAGTTTGTGACGCTGTGTGAA	AGTGTGCGGCAAC							
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
TcDHODH_Y	GGCCTTGTATTGATGCGGAGAGTGAGTCTGTTGTCATCAAACCCAAACAAAGGGTTTGGTGGT	TTGGCGGCAAGTATAT	CTCCCTACAGC	ATT	GGCA						
TcDHODH_T1	GGCCTTGTATTGATGCGGAGAGTGAGTCTGTTGTCATCAAACCCAAACAAAGGGTTTGGTGGT	TTGGCGGCAAGTATAT	CTCCCTACAGC	ATT	GGCA						
TcDHODH_T2	GGCCTTGTATTGATGCGGAGAGTGAGTCTGTTGTCATCAAACCCAAACAAAGGGTTTGGTGGT	TTGGCGGCAAGTATAT	CTCCCTACAGC	ATT	GGCA						
TcDHODH_T3	GGCCTTGTATTGATGCGGAGAGTGAGTCTGTTGTCATCAAACCCAAACAAAGGGTTTGGTGGT	TTGGCGGCAAGTATAT	CTCCCTACAGC	ATT	GGCA						
TcDHODH_CLB1	GGCCTTGTATTGATGCGGAGAGTGAGTCTGTTGTCATCAAACCCAAACAAAGGGTTTGGTGGT	TTGGCGGCAAGTATAT	CTCCCTACAGC	ATT	GGCA						
TcDHODH_CLB2	GGCCTTGTATTGATGCGGAGAGTGAGTCTGTTGTCATCAAACCCAAACAAAGGGTTTGGTGGT	TTGGCGGCAAGTATAT	CTCCCTACAGC	ATT	GGCA						
TcDHODH_CLB3	GGCCTTGTATTGATGCGGAGAGTGAGTCTGTTGTCATCAAACCCAAACAAAGGGTTTGGTGGT	TTGGCGGCAAGTATAT	CTCCCTACAGC	ATT	GGCA						
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	
TcDHODH_Y	ACGTGAATGCATTCTACCGCGG	TG	CCGGATAAGTTGGTCTTTGGCTGCGGCGCGGCTTTACAGCGGCGAGGATGCCCTTCTTGATATACATTGCGCGGTGC								
TcDHODH_T1	ACGTGAATGCATTCTACCGCGG	TG	CCGGATAAGTTGGTCTTTGGCTGCGGCGCGGCTTTACAGCGGCGAGGATGCCCTTCTTGATATACATTGCGCGGTGC								
TcDHODH_T2	ACGTGAATGCATTCTACCGCGG	TG	CCGGATAAGTTGGTCTTTGGCTGCGGCGCGGCTTTACAGCGGCGAGGATGCCCTTCTTGATATACATTGCGCGGTGC								
TcDHODH_T3	ACGTGAATGCATTCTACCGCGG	TG	CCGGATAAGTTGGTCTTTGGCTGCGGCGCGGCTTTACAGCGGCGAGGATGCCCTTCTTGATATACATTGCGCGGTGC								
TcDHODH_CLB1	ACGTGAATGCATTCTACCGCGG	TG	CCGGATAAGTTGGTCTTTGGCTGCGGCGCGGCTTTACAGCGGCGAGGATGCCCTTCTTGATATACATTGCGCGGTGC								
TcDHODH_CLB2	ACGTGAATGCATTCTACCGCGG	TG	CCGGATAAGTTGGTCTTTGGCTGCGGCGCGGCTTTACAGCGGCGAGGATGCCCTTCTTGATATACATTGCGCGGTGC								
TcDHODH_CLB3	ACGTGAATGCATTCTACCGCGG	TG	CCGGATAAGTTGGTCTTTGGCTGCGGCGCGGCTTTACAGCGGCGAGGATGCCCTTCTTGATATACATTGCGCGGTGC								
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	
TcDHODH_Y	GTCGATGGTGCAAGTGGGAACTGCACCTGCAGGAGGAGGG	CCCGGCATTTTTTA	CGGTCTTGAAGATGAGTTGCTGGAGATCATGGC	CGGAAGGGGTAC							
TcDHODH_T1	GTCGATGGTGCAAGTGGGAACTGCACCTGCAGGAGGAGGG	CCCGGCATTTTTTA	CGGTCTTGAAGATGAGTTGCTGGAGATCATGGC	CGGAAGGGGTAC							
TcDHODH_T2	GTCGATGGTGCAAGTGGGAACTGCACCTGCAGGAGGAGGG	CCCGGCATTTTTTA	CGGTCTTGAAGATGAGTTGCTGGAGATCATGGC	CGGAAGGGGTAC							
TcDHODH_T3	GTCGATGGTGCAAGTGGGAACTGCACCTGCAGGAGGAGGG	CCCGGCATTTTTTA	CGGTCTTGAAGATGAGTTGCTGGAGATCATGGC	CGGAAGGGGTAC							
TcDHODH_CLB1	GTCGATGGTGCAAGTGGGAACTGCACCTGCAGGAGGAGGG	CCCGGCATTTTTTA	CGGTCTTGAAGATGAGTTGCTGGAGATCATGGC	CGGAAGGGGTAC							
TcDHODH_CLB2	GTCGATGGTGCAAGTGGGAACTGCACCTGCAGGAGGAGGG	CCCGGCATTTTTTA	CGGTCTTGAAGATGAGTTGCTGGAGATCATGGC	CGGAAGGGGTAC							
TcDHODH_CLB3	GTCGATGGTGCAAGTGGGAACTGCACCTGCAGGAGGAGGG	CCCGGCATTTTTTA	CGGTCTTGAAGATGAGTTGCTGGAGATCATGGC	CGGAAGGGGTAC							
	910	920	930	940							
TcDHODH_Y	AGGACTCTGGAGGAGTTCCGTGGACGTGTCAAAGACAATTGAGTGA										
TcDHODH_T1	AGGACTCTGGAGGAGTTCCGTGGACGTGTCAAAGACAATTGAGTGA										
TcDHODH_T2	AGGACTCTGGAGGAGTTCCGTGGACGTGTCAAAGACAATTGAGTGA										
TcDHODH_T3	AGGACTCTGGAGGAGTTCCGTGGACGTGTCAAAGACAATTGAGTGA										
TcDHODH_CLB1	AGGACTCTGGAGGAGTTCCGTGGACGTGTCAAAGACAATTGAGTGA										
TcDHODH_CLB2	AGGACTCTGGAGGAGTTCCGTGGACGTGTCAAAGACAATTGAGTGA										
TcDHODH_CLB3	AGGACTCTGGAGGAGTTCCGTGGACGTGTCAAAGACAATTGAGTGA										

Figura 44: Alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos que codificam a enzima DHODH. TcDHODH_Y corresponde ao gene da DHODH de *T. cruzi* da cepa Y. TcDHODH_T1, TcDHODH_T2, TcDHODH_T3 correspondem aos três diferentes genes que codificam a enzima DHODH de *T. cruzi* da cepa Tulahuen. TcDHODH_CLB1, TcDHODH_CLB2, TcDHODH_CLB3 correspondem aos três diferentes genes que codificam a enzima DHODH de *T. cruzi* da cepa CL Brener. Em amarelo estão sendo indicadas as 28 posições onde ocorre o polimorfismo. O alinhamento foi realizado no programa *MultAlin* (CORPET, 1988).

Como consequência da diversidade genética encontrado nos genes que codificam a enzima DHODH de *T. cruzi*, oito aminoácidos são alvos de mutação: Thr/Met2, Arg/Cys3, Phe/Val63, Ile/Ser86, Val/Leu98, Ile/Leu222, Arg/Thr285, and Lys/Arg301. A análise da estrutura cristalográfica de *TcDHODH* permitiu a caracterização estrutural desta variabilidade genética. A substituição de cinco aminoácidos: Met2, Cys3, Ser86, Thr285, e Arg301 estão localizadas na superfície da proteína e os resíduos expostos ao solvente (**Figura 45**). Nossos resultados estão de acordo com a variação observada entre as sequências de membros da família 1A das DHODHs (**Figura 34**), pois essas cinco posições podem ser ocupadas por aminoácidos de diferentes propriedades químicas. Todas as outras substituições, Val63, Leu98 e Leu222, são rodeadas por resíduos hidrofóbicos altamente conservados. A Leu98 está em contato de van der Waals com os resíduos Leu126, Ile100, Phe78, Leu115, Ala85 e Leu96, enquanto que a Val63 está localizada perto da Val203, Val212, Ile68 e Tyr226. A Leu222, localizada na interface do dímero, é encontrada perto da Pro229 e Tyr226, ambas essenciais para a formação do dímero. Nossos estudos de modelagem molecular dos resíduos polimórficos mostraram que todas as substituições não interferem com o empacotamento da proteína, necessitando somente de pequenos rearranjos para acomodar os diferentes aminoácidos. No entanto, nas posições polimórficas específicas, Leu98, Val63 e Leu222, somente substituições conservativas são permitidas a fim de cumprir as exigências impostas pelo ambiente hidrofóbico conservado. Além disso, nossas análises indicaram que nenhum resíduo próximo ou constituinte do sítio ativo é polimórfico. Isto é consistente com a caracterização de diferentes genes de *TcDHODH* da cepa Tulahuen, que mostrou que, apesar das variações genéticas, todas as enzimas apresentam propriedades enzimáticas muito semelhantes (SARIEGO et al., 2006). Nossos resultados sugerem que, apesar da variabilidade genética, projetos de desenho de drogas baseado podem explorar regiões de similaridade entre

as isoformas de forma a estudar todas as isoformas de *Tc*DHODH de uma só vez. No entanto, uma melhor compreensão da correlação da variabilidade genética dos genes de *Tc*DHODH com os três estágios de desenvolvimento do parasito, epimastigota, tripomastigota e amastigota, e as formas clínicas da doença podem ser exploradas para potencializar os inibidores de *Tc*DHODH como potentes drogas anti-chagásicas.

Figura 45: Localização estrutural dos resíduos polimórficos (representados em roxo). Representação em “stereo” construída no programa Pymol (DELANO, 2002).

4.10.7 Comparações entre *Tc*DHODH e *Hs*DHODH

Um alinhamento seqüencial baseado em estrutura entre as enzimas DHODH de *T. cruzi* e humana foi utilizado para guiar na seleção de sítios alvos para a descoberta de drogas (**Figura 46**). DHODH humana é membro da família 2 das DHODHs e divide aproximadamente 28 % de identidade seqüencial com *Tc*DHODH. De modo geral, apesar da baixa identidade seqüencial, muitos dos elementos de estrutura secundária e os resíduos envolvidos na ligação do FMN e do substrato, orotato, são conservados em ambas as estruturas. No entanto, além da extensão N-terminal encontrada em membros da família 2 das DHODHs, várias regiões foram encontradas para distinguir a enzima do parasito com a humana (**Figura 46**). Em particular, a hélice $\alpha 5$ encontrada na estrutura da enzima humana é

substituída por um “loop” altamente conservado entre as estruturas dos tripanosomatídeos (Figura 35 e 46). Esta região, compreendendo os resíduos 87 a 94, forma uma série de ligações de hidrogênio intramoleculares, promovendo a estabilidade estrutural dos monômeros em *TcDHODH*.

Figura 46: Alinhamento sequencial baseado em estrutura entre as enzimas DHODH de *T. cruzi* cepa Y (*TcDHODH_Y*) e humana (*HsDHODH*). Na parte superior do sequenciamento estão sendo representados os elementos de estrutura secundária presentes na enzima do parasito, já na parte inferior estão sendo representados os elementos de estrutura secundária da enzima humana. As regiões em amarelo correspondem àquelas em que as enzimas possuem os maiores desvios entre os resíduos. Os resíduos que interagem com o orotato estão assinalados com um quadrado verde, enquanto que os resíduos que interagem com o FMN estão assinalados com um quadrado em pink. A figura foi criada no programa *ESPrIt* (GOUET et al., 1999).

Interessantemente, as fitas βE, βF e βG encontradas em *TcDHODH* não são observadas na enzima humana. De fato, em termos de estratégias racionais no desenvolvimento de drogas, esta região, compreendendo os resíduos 196 a 219, merece especial atenção. Além da baixa similaridade sequencial dividida pelas enzimas humana e de *T. cruzi*, esta região já foi descrita como sendo responsável pela formação do dímero funcional (ROWLAND et al., 1997), um artefato observado somente nas família 1A das DHODHs. Ainda mais relevante que isto, estudos de mutagênese sítio dirigida sugeriu que a

dimerização nas enzimas da família 1A é essencial para a atividade catalítica (OTTOSEN et al., 2002). Assim, ligantes concebidos especificamente para interagir nas proximidades ou na interface dimérica, poderiam separar as subunidades do dímero ou simplesmente alterar a dinâmica da molécula, interferindo com as funções catalíticas de *TcDHODH*.

Outra diferença a ser explorada para esta região se baseia na posição cisteína catalítica na família 1A das DHODHs (BJORNBERG et al., 1997) que é substituída por uma serina na família 2 (BJORNBERG et al., 1999). Em *TcDHODH* esta cisteína catalítica corresponde a posição 132. A Cys132 fica situada na base de um “loop” flexível, cujos resíduos são altamente conservados. Este “loop” que se inicia com o resíduo Leu130 e termina com o resíduo Gln140 cobre a entrada do sítio ativo, por isso o denominamos de “loop” ativo. A Cys132 é conservada somente na família 1, mas o “loop” ativo contém três resíduos que são totalmente conservados nas duas famílias (Ser131, Pro133, Asn134) (**Figura 46**). Na estrutura cristalográfica de *TcDHODH* o “loop” ativo se encontra fechado (**Figura 47**) em todas as subunidades, e acredita-se que esta conformação é resultado da ligação de hidrogênio entre a Pro133 e a Lys216.

Figura 47: Ilustração das interações responsáveis pela manutenção da conformação fechada do “loop” ativo. Ao fundo, em amarelo, está representada a molécula de FMN. As interações são mostradas com linhas pontilhadas em vermelho. O “loop” representado em cinza corresponde ao “loop” ativo. Representação em “stereo” construída no programa *Pymol* (DELANO, 2002).

A região, entre os resíduos 196 e 219, onde está localizada a Lys216, é orientada em frente ao “loop” ativo na enzima do parasito. Na enzima humana esta região é formada apenas por um único “loop”, enquanto que na enzima do parasito esta região é formada por duas fitas antiparalelas (βE , βF e βG). Além desta diferença entre as estruturas do tipo secundária adotada nas duas enzimas, esta região na enzima humana está voltada para um lado, enquanto que na enzima do parasito está voltada para o “loop” ativo. Estes resultados sugerem que o mecanismo de controle da abertura e fechamento do “loop” ativo, é diferente entre as enzimas das famílias 1A e 2, reforçando a importância desta região para desenho de inibidores específicos contra o parasito.

5. CONCLUSÕES

- A enzima *TcDHODH* foi clonada, expressa e purificada com sucesso durante a realização deste projeto;
- As dificuldades encontradas na obtenção de cristais de qualidade, e conseqüentemente bons conjuntos de dados, estavam relacionadas ao fato dos cristais de *TcDHODH* serem geminados. O uso das diversas metodologias disponíveis na literatura auxiliou no aumento da qualidade dos cristais da enzima de interesse, possibilitando a determinação de sua estrutura cristalográfica;
- A estrutura foi determinada por métodos de substituição molecular utilizando as coordenadas de DHODH de *Leishmania major* como modelo. O refinamento final da estrutura de *TcDHODH* foi realizado a 2.2 Å de resolução após a correção dos dados geminados;
- A estrutura da enzima diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* cepa Y foi obtida e as coordenadas depositadas no Protein Data Bank com código de acesso **3C3N**. As coordenadas finais para o modelo, assim como os dados cristalográficos, se encontram no CD localizado na contra-capa desta dissertação.
- Análises e comparações estruturais criteriosas entre a enzima *TcDHODH* e as DHODHs com estruturas já resolvidas, possibilitaram a identificação de resíduos e regiões que são importantes para a atividade catalítica de *TcDHODH*;
- As comparações realizadas entre a estrutura da enzima de *T. cruzi* e humana, através de alinhamento de resíduos baseado na sobreposição estrutural indicaram potenciais regiões a serem exploradas no planejamento de ligantes específicos para a enzima *TcDHODH*;

- A partir das análises, sugerimos que a região que se mostrou mais interessante para ser explorada no planejamento de inibidores específicos para as enzimas DHODHs da família 1A, corresponde à região da interface dimérica. Isto porque, além da relevância da forma dimérica para a atividade catalítica para os membros da família 1A, já demonstrada por estudos de mutagênese sítio-dirigida, diferenças estruturais mais significativas foram encontradas nesta região;
- A região do sítio ativo, apesar de muito semelhante entre as DHODHs de ambas as famílias, não pode ser descartada como alvo de planejamento de inibidores específicos. Como foi detalhado nas discussões, apesar desta região ser altamente conservada, existem diferenças no mecanismo catalítico que podem ser melhor exploradas para o desenvolvimento de inibidores seletivos para as enzimas da família 1A;
- Os resultados obtidos neste trabalho serão de grande valia para o planejamento de inibidores específicos contra *Tc*DHODH como uma importante ferramenta para o planejamento de fármacos com atividade antiparasitária. Estes constituem os objetivos do projeto de doutoramento a ser desenvolvido pelo aluno.
- O trabalho aqui apresentado foi compilado na forma de um manuscrito e submetido para a revista BBRC (*Biochemical and Biophysics Research Communication*). A cópia do artigo submetido a publicação se encontra no CD localizado na contra-capa desta dissertação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (ADAMS et al., 2002) ADAMS, P.D.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; HUNG, L.W.; IOERGER, T.R.; MCCOY, A.J.; MORIARTY, N.W.; READ, R.J.; SACCHETTINI, J.C.; SAUTER, N.K.; TERWILLIGER, T.C. *PHENIX*: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallographica Section D**, v.58, p.1948-1954, 2002.
- (ANNOURA et al., 2005) ANNOURA, T.; NARA, T.; MAKIUCHI, T.; HASHIMOTO, T.; AOKI, T. The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. **Journal of Molecular Evolution**, v.60(1), p.113-127, 2005.
- (BJORNBERG et al., 1997) BJORNBERG, O.; ROWLAND, P.; LARSEN, S.; JENSEN, K.F. Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* investigated by chemical modification and mutagenesis. **Biochemistry**, v.36(51), p.16197-16205, 1997.
- (BJORNBERG et al., 1999) BJORNBERG, O.; GRUNER, A.C.; ROEPSTORFF, P.; JENSEN, K.F. The activity of *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase is dependent on a conserved loop identified by sequence homology, mutagenesis, and limited proteolysis. **Biochemistry**, v.38(10), p.2899-2908, 1999.
- (BRADFORD, 1976) BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

- (BRUNGER et al., 1998) BRUNGER, A.T.; ADAMS, P.D.; CLORE, G.M.; DELANO, W.L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; JIANG, J.S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N.S.; READ, R.J.; RICE, L.M.; SIMONSON, T.; WARREN, G.L. Crystallography and NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination. **Acta Crystallographica Section D**, v.54, p.905-921, 1998.
- (CCP4, 1994) Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: Programs for Protein Crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v.50, p.760-763, 1994.
- (CHAYEN, 1997) CHAYEN, N.E. A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger protein crystals. **Journal of Applied Crystallography**, v.30, p.198–202, 1997.
- (CHEN et al., 1992) CHEN, S.F.; PERRELLA, F.W.; BEHRENS, D.L.; PAPP, L.M. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase activity by Brequinar Sodium. **Cancer Research**, v.52(13), p.3521–3527, 1992.
- (CHRISTOPHERSON et al., 2002) CHRISTOPHERSON, R.I.; LYONS, S.D.; WILSON, P.K. Inhibitors of *de novo* nucleotide biosynthesis as drug. **Accounts of Chemical Research**, v.35(11), p.961-971, 2002.
- (CORDEIRO et al., 2006) CORDEIRO, A.T.; FELICIANO, P.R.; NONATO, M.C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section F**, v.62(10), p.1049-1051, 2006.
- (CORPET, 1988) CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v.16(22), p.10881-10890, 1988.

- (COURA; DE CASTRO, 2002) COURA, J.R.; DE CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy, **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.3-24, 2002.
- (DELANO, 2002) DELANO, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. **DeLano Scientific LLC**, San Carlos, CA, USA (<http://www.pymol.org>).
- (DIAS et al., 2002) Dias, J.C.P.; Silveira, A.C.; Schofield, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America - A review, **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.603-612, 2002.
- (EMSLEY; COWTAN, 2004) EMSLEY, P; COWTAN, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. **Acta Crystallographica Section D**, v.60, p.2126-2132, 2004.
- (EVANS, 1997) EVANS, P.R. **Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography**, v.33, p.22-24, 1997.
- (FRAAIJE; MATTEVI, 2000) FRAAIJE, M.W.; MATTEVI, A. Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25(3), p.126-132, 2000.
- (FELICIANO et al., 2006) FELICIANO, P.R.; CORDEIRO, A.T.; COSTA-FILHO, A.J.; NONATO, M.C. Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Protein Expression and Purification**, v.48(1), p.98-103, 2006.
- (GAO et al., 1999) GAO, G.N.T.; NAKAJIMA-SHIMADA J.; AOKI T. Novel organization and sequences of five genes encoding all six enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Biology**, v.285(1), p.149-161, 1999.

- (GELB; HOL, 2002) Gelb, M.H.; Hol, W.G.J. Parasitology - Drugs to combat tropical protozoan parasites, **Science**, v.297, p.343-344, 2002.
- (GOUET et al., 1999) GOUET, P.; COURCELLE, E.; STUART, D.I.; METOZ, F. ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics.**, v.15, p.305-308, 1999.
- (GURTLER et al., 2007) GURTLER, R.E.; KITRON, U.; CECERE, M.C.; SEGURA, E.L.; COHEN, J.E. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.16194-16199, 2007.
- (HARDER; HABERKORN, 1989) HARDER, A.; HABERKORN, A. Possible mode of action of toltrazuril: studies on two Eimeria species and mammalian and Ascaris suum enzymes. **Parasitology Research**, v.76(1), p.8-12, 1989.
- (HERAS; MARTIN, 2005) HERAS, B.; MARTIN, J.L. Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. **Acta Crystallographica Section D**, v.61, p.1173–1180, 2005.
- (HURT et al., 2005) HURT, D.E.; WIDOM, J.; CLARDY, J. Structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor. **Acta Crystallographica Section D**, v.62, p.312-323, 2005.
- (INAOKA et al., 2005) INAOKA, D.K.; TAKASHIMA, E.; OSANAI, A.; SHIMIZU, H.; NARA, T.; AOKI, T.; HARADA, S.; KITA, K. Expression, purification and crystallization of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with orotate. **Acta Crystallographica Section F**, v.61, p.875-878, 2005.
- (ITTARAT et al., 1995) ITTARAT I.; ASAWAMAHASAKDA, W.; BARTLETT, M.S.; SMITH J.W.; MESHNICK, S.R. Effects of atovaquone and other inhibitors on

- Pneumocystis carinii* dihydroorotate dehydrogenase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39(2), p.325–328, 1995.
- (JANCARIK; KIM, 1991) JANCARIK, J.; KIM, S.H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v.24, p.409-411, 1991.
- (JOCKEL et al., 1998) JOCKEL, J.; WENDT, B.; LOEFFLER, M. Structural and functional comparison of agents interfering with dihydroorotate, succinate and NADH oxidation of rat liver mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v.56(8), p.1053-1060, 1998.
- (JONES, 1980) JONES, M.E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: Gene, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v.49, p.253-279, 1980.
- (JONES et al., 1991) JONES, T.A.; ZOU, J.Y.; COWAN, S.W.; KJELD GAARD, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. **Acta Crystallographica Section A**, v.47, p.110-119, 1991.
- (KABSCH, 1993) KABSCH, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. **Journal of Applied Crystallography**, v.26, p.795-800, 1993.
- (LASKOWSKI et al., 1998) LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; THORNTON, J.M. Validation of protein models derived from experiment. **Current Opinion in Structural Biology**, v.8(5), p.631-639, 1998.
- (LESLIE, 1992) LESLIE, A.G.W. Recent changes to MOSFLM package for processing film and image plate data. **Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography**, v.26, Daresbury Laboratory, Warrington, UK, 1992.

- (LIU et al., 2000) LIU S.; NEIDHARDT, E.A.; GROSSMAN, T.H.; OCAIN, T.; CLARDY, J. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. **Structure**, v.8(1), p.25-33, 2000.
- (MARTINEZ-DIAZ et al, 2001) MARTINEZ-DIAZ, R.A.; ESCARIO, J.A.; NOGAL-RUIZ, J.J.; GOMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains, **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.53-59, 2001.
- (MATTHEWS, 1968) MATTHEWS, B.W. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v.33(2), p.491-497, 1968.
- (MCPHERSON, 1982) MCPHERSON, A. **Preparation and Analysis of Protein Crystals**. New York: John Wiley & Sons, 1982, 371p.
- (MCPHERSON, 1998) MCPHERSON, A. **Crystallization of Biological Macromolecules**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- (MURSHUDOV et al., 1999) MURSHUDOV, G.N.; VAGIN, A.A.; LEBEDEV, A.; WILSON, K.S.; DODSON, E.J. Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. **Acta Crystallographica Section D**, v.55, p.247-255, 1999.
- (NAGY et al., 1992) NAGY, M.; LACROUTE, F.; THOMAS, D. Divergent evolution of pyrimidine biosynthesis between anaerobic and aerobic yeasts, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.8966-8970, 1992.
- (NELSON; COX, 2002) NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Tradução Simões, A.A.; Kettelhut, I.C; Valim, Y.M.L.; Curti, C.; Vugman, I.; Rotschild, Z.; Rechia, C.G.V; Rodrigues, V.; Lodi, W.R.N; Leone, F.A; Galban, V.D. 3ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2002, 975p.

- (NIELSEN et al., 1996) NIELSEN, F.S.; ANDERSEN, P.S.; JENSEN, K.F. The B form of dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis* consists of two different subunits, encoded by the pyrDb and pyrK genes, and contains FMN, FAD, and [FeS] redox centers, **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.29359-29365, 1996.
- (NORAGER et al., 2002) NORAGER, S.; JENSEN, K.F.; BJORNBERG, O.; LARSEN, S. E-coli dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenases. **Structure**, v.10(9), p.1211-1223, 2002.
- (NORAGER et al., 2003) NORAGER, S.; ARENT, S.; BJORNBERG, O.; OTTOSEN, M.; LEGGIO, L.L.; LARSEN, K.F.J.S. *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A mutants reveal important facets of the enzymatic function. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278(31), p.28812-28822, 2003.
- (OTTOSEN, et al., 2002) OTTOSEN, M.B.; BJÖRNBERG, O.; NØRAGER S, LARSEN S, PALFEY BA, JENSEN KF. The dimeric dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* dissociates reversibly into inactive monomers. *Protein Science*, v.11(11), p.2575-2583, 2002.
- (PADILLA; YEATES, 2003) PADILLA, J.; YEATES, T.O. A statistic for local intensity differences: robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning. **Acta Crystallographica Section D**, v.59, p.1124-1130, 2003.
- (RAMACHANDRAM et al., 1963) RAMACHANDRAM, G.N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v.7, p.95-99, 1963.

- (ROWLAND et al., 1997) ROWLAND, P.; NIELSEN, F.S.; JENSEN K.F.; LARSEN, S. The crystal structure of the flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis*. **Structure**, v.5(2), p.239-252, 1997.
- (ROWLAND et al., 1998) ROWLAND, P.; BJORNBERG, O.; NIELSEN, F.S.; JENSEN K.F.; LARSEN, S. The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. **Protein Science**, v.7(6), p.1269-1279, 1998.
- (ROWLAND et al., 2000) ROWLAND, P.; NORAGER, S.; JENSEN K.F.; LARSEN, S. Structure of dihydroorotate dehydrogenase B: electron transfer between two flavin groups bridged by an iron-sulphur cluster. **Structure**, v.8(12), p.1227-1238, 2000.
- (SARIEGO et al., 2006) SARIEGO, I.; ANNOURA, T.; NARA, T.; HASHIMOTO, M.; TSUBOUCHI, A.; IIZUMI, K.; MAKIUCHI, T.; MURATA, E.; KITA, K.; AOKI, T. Genetic diversity and kinetic properties of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase isoforms. **Parasitology International**, v.55(1), p. 11-16, 2006.
- (STRYER, 1995) STRYER, L. **Biochemistry**. 4ª Edição. New York: W.H. Freeman and Company, 1995, 1064p.
- (TAKASHIMA et al., 2002) TAKASHIMA, E.; INAOKA, D.K.; OSANAI, A.; NARA, T.; ODAKA, M.; AOKI, T.; INAKA, K.; HARADA, S.; KITA, K. Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.122(2), p.189-200, 2002.
- (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) VAGIN, A.A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v.30, p.1022-1025, 1997.

(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002) World Health Organization. **Control of Chagas Disease**. WHO, Geneva, 2002, 109p.

(YEATES, 1997) YEATES, T.O. Detecting and Overcoming Crystal Twinning. **Methods in Enzymology**, v.276, p.344-358, 1997.

(ZAIA et al., 1998) ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes. **Química Nova**, v.21(6), p.789-790, 1998.