UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JULIANA ROBERTA TORINI DE SOUZA

Determinação estrutural e funcional da enzima 5'-deoxi-5'metiltioadenosina Fosforilase de S*chistosoma mansoni*.

> São Carlos 2012

JULIANA ROBERTA TORINI DE SOUZA

Determinação estrutural e funcional da enzima 5'-deoxi-5'metiltioadenosina Fosforilase de *Schistosoma mansoni*.

> Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada Opção: Física Biomolecular Orientador: Dr. Humberto D'Muniz Pereira

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos 2012 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

> Torini de Souza, Juliana Roberta Determinação estrutural e funcional da enzima 5'deoxi-5'- metiltioadenosina Fosforilase de Schistosoma mansoni. / Juliana Roberta Torini de Souza; orientador Humberto D\'Muniz Pereira - versão corrigida -- São Carlos, 2012. 92 p. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012. 1. Schistosoma mansoni. 2. Metiltioadenosnia Fosforilase. 3. Estrutura Cristalográfica. 4. Constantes Catalíticas. 5. Metabolismo de Purinas. I. Pereira, Humberto D\'Muniz, orient. II. Título.

À minha vó Zefa (*in memoriam*), Ao meu noivo Jeferson e aos meus pais Roberto e Neusa. Dedico este trabalho com amor e gratidão pela compreensão, carinho e incansável apoio ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Humberto D'Muniz Pereira pela orientação, confiança, paciência, dicas e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Richard Charles Garratt por se responsabilizar na parte burocrática do processo desde o começo.

Ao Dr. Alexandre Cassago pela amizade, dicas, conselhos e pela sempre disposição em ajudar.

À doutoranda Amanda Bernardes pela imensa paciência em me explicar como utilizar os programas de coleta, processamento e refinamento de dados.

Ao doutorando Ricardo N. Santos pela amizade e imensa ajuda em especial com o programa PyMol.

Ao José Fernando Ruggiero Bachega, pela incrível amizade, ajuda e grandes "insights".

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para minha formação, em especial: Adriano Andricopulo, Rafael Guido, Otávio Thiemann, Ricardo deMarco, Nelma Bossolan, Ilana Camargo, Eduardo Horjales, Javier Hellena e Eduardo Castellano.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Maria Auxiliadora Amorim, Lívia Regina Manzine, Simone Michelan Duarte e em especial à Susana Andrea Sculaccio que sempre estava pronta a ajudar, obrigada pela paciência.

Às amigas de grupo Larissa Romanello e Angela Maria Fala pela harmonia, colaboração e companheirismo.

A todos os pós-graduandos e alunos, que estão ou que já passaram pelo laboratório de Bioquímica. Obrigada pela companhia, risadas e altos papos, em especial: Kelvin, Jaque, Gu, Wally, B2, Marcos Michel, Fernanda Costa, Teresa, Ana, Ivan, Mamé, Maycou, Heline, Maluf, Van, Fernanda Batista, Atílio, Fran, Marisa, Cesar, Tavin, André, Daiana, Lívia Fain, Malu, Renata, Vivi, Liz, Nicole e outros.

A todos os funcionários do IFSC. Aos do grupo de cristalografia, em especial: Lu, Rejane, Augusto e Fernando. Aos da pós-graduação, em especial: Silvio, Patrícia e Ricardo. E aos da Biblioteca em especial à Neusa. Obrigada a todos pela incrível competência e respeito. Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pela infra-estrutura e formação acadêmica.

Ao CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu noivo Jeferson de Oliveira, que sempre esteve ao meu lado desde o começo, me incentivando, me apoiando, ouvindo mesmo sem entender nada tudo o que eu tinha para contar, falar e desabafar. Obrigada pelo carinho, amor e dedicação.

Aos meus pais por acreditar em mim, pela exemplar educação dada e simplesmente por tudo que sou.

À todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

"Quase todos os aspectos da vida são projetados à nível molecular, sem entender as moléculas, teremos apenas uma compreensão superficial da nossa própria vida."

Francis Crick (1988)

RESUMO

SOUZA, J. R. T., **Determinação estrutural e funcional da enzima 5'-deoxi-5'metiltioadenosina Fosforilase de** *Schistosoma mansoni*. 2012. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

As doenças parasitárias são uma das maiores causas de morte em países em desenvolvimento, e recebem pouca ou nenhuma atenção das indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de terapias. A esquistossomose mansoni também conhecida como barriga d'água ou doença do caramujo é uma doença parasitária crônica que afeta aproximadamente 207 milhões de pessoas no mundo sendo aproximadamente 6 milhões somente no Brasil. Os medicamentos disponíveis no mercado causam graves efeitos colaterais. Além disso, há relatos de cepas de S. mansoni resistentes à esses medicamentos, justificando assim a busca por novos fármacos. O Schistosoma mansoni não possui a via "de novo" para a biosíntese de bases púricas e depende integralmente da via de salvação para o suprimento dessa. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar as constantes catalíticas e a estrutura tridimensional da MTAP (EC 2.4.2.28), enzima esta que participam da via de salvação de purinas, e é desta forma essencial para a reprodução do parasita. Esta enzima foi expressa de forma heteróloga, purificada e cristalizada. A proteína foi submetida à ensaios cinéticos em sistema acoplado, onde foram determinadas as constantes catalíticas. A proteína foi também cristalizada em condições que continham 100 mM de Bis-tris ou MES com pH variando entre 6,1 a 6,5 e PEG3350, cuja concentração variou ente 14-18%. Os cristais foram submetidos à difração de raios-X no LNLS e no DLS. Foram obtidos, quatro conjuntos de dados, que foram processados, refinados e analisados. Obteve-se estrutura apoenzima em complexo com fosfato, em complexo com adenina e sulfato, em complexo com tubercidina e sulfato e em complexo com adenina e glicerol em um grupo espacial diferente dos demais. Através da estrutura secundária, foi possível analisar o sítio ativo, além de obter informações preliminares do mecanismo catalítico da enzima alvo. Este trabalho colabora para a futura elucidação completa da via de salvação de purinas em S. mansoni, e fornece informações básicas para que a busca por novos fármacos tenha novos ramos a serem explorados.

Palavras-chave: Schistosoma mansoni. Metiltioadenosina Fosforilase. Estrutura cristalográfica.

ABSTRACT

SOUZA, J. R. T., Structural and Functional Determination of 5'-deoxy-5'methylthioadenosine Phosphorylase enzyme from *Schistosoma mansoni*. 2012. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The parasitic illness are the leading cause of deaths in developing countries, and receives little or no attention from drug companies to develop therapies. Schistosomiasis mansoni also known as "water belly" or "snail's disease" is a chronic parasitic illness that affects approximately 207 million people worldwide with approximately 6 million in Brazil. Schistosomiasis is treated by the use of drugs that are not-in fact effective for the eradication of the disease, and although their efficiency cause serious side effects. In addition, there are reports of S. mansoni's resistant strains to these drugs, thus justifying the search for new drugs. The Schistosoma mansoni parasite does not possess the "de novo" pathway for purine bases biosynthesis and depends entirely on salvage pathways for its purine requirement. Thus this study aimed to determine the catalytic constants and three-dimensional structure of MTAP (EC 2.4.2.28), an enzyme that is involved in purine salvation pathway, and is thus essential to the reproduction of the parasite. The MTAP was heterologously expressed, purified and crystallized. The protein was submitted to kinetic assays in coupled system, to determine the catalytic constants. The protein was crystallized in 100mM Bis-tris or MES pH 6.1-6.5 and 14-18% PEG 3350. The crystals were submitted to diffraction of rays-X in the LNLS and DLS. Data sets were obtained, processed, refined and analyzed. Structures were obtained in apoenzyme form complexed with fosfate, complexed with adenine and sulfate, complexed with tubercidin and sulfate, and with adenine and glycerol in a space group different of the others. Through the secondary structure, it was possible to analyze the active site and obtained preliminary information of the catalytic mechanism of the target enzyme. This study contributes to the complete elucidation of the purine salvation pathway in S. mansoni, and provides basic information for the research of the new drugs.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Methylthioadenosine Phosphorylase. Crystallographic structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>S.mansoni</i>	.28
Figura 2 - Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em S. mansoni	.31
Figura 3 - Trímero da MTAP humana (1CB0) em complexo com adenina	.33
Figura 4 - Alinhamento entre as MTAPs de <i>Schistosoma</i> e Humana	.33
Figura 5 - Visualização da amplificação por PCR do gene codificante da SmMTAP	43
Figura 6 - Visualização da PCR das colônias obtidas após transformação	44
Figura 7 - Análise eletroforética da expressão protéica	.44
Figura 8 - Análise eletroforética da purificação da proteina SmMTAP	.45
Figura 9 - Esquema do acoplamento das reações cinéticas	46
Figura 10 - Gráfico de Michaelis-Meten para fosforólise de MTA pela SmMTAP	.47
Figura 11 - Gráfico de Michaelis-Meten para fosforólise de Adenosina pela SmMTAP	47
Figura 12 - Gráfico da velocidade versus concentração de PO4	49
Figura 13 - Espectograma da absorção à 275 nm, mostrando a formação de 2,8- dihidroxiadenina na ausência de fosfato	50
Figura 14 - Espectograma da absorção à 275 nm, mostrando a não formação de 2,8- dihidroxiadenina na ausência da SmMTAP	.51

Figura 15 - Gráfico de Michaelis-Menten para a reação de conversão de MTA pela SmMTA	٩P
na ausência de fosfato5	53
Figura 16 - Gráfico de Michaelis-Menten para a reação de conversão de Adenosina pela SmMTAP na ausência de fosfato	54
Figura 17 - Cristais da SmMTAP (~0.4 mm)	55
Figura 18 - Vista da estrutura da SmMTAP	58
Figura 19 - Mapa da densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3.6σ, para o sítio ativo da SmMTAP-ade-gol	58
Figura 20 - Mapa da densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3.6σ, para o sítio ativo da SmMTAP-tub	59
Figura 21 - Diagramas de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para as quatro estruturas da SmMTAP	62
Figura 22 - Sobreposição das estruturas tridimensionais das MTAPs depositadas no PDB com a SmMTAP	66
Figura 23 - Imagem estéreo do mapa de densidade 2Fo-Fc da inserção de 16 aminoácidos n MTAP de <i>S. mansoni</i>	a 57
Figura 24 - Sobreposição das estruturas da MTAP de S. mansoni e humana	67
Figura 25 - Estrutura secundaria da SmMTAP em função da sequência de aminoácidos gerada pelo programa ProMotif	59
Figura 26 - Estrutura do monômero da SmMTAP	70
Figura 27 - Alinhamento das MTAPs triméricas com a SmMTAP	72

Figura 28 - Sítio de ligação da Ribose tipo I na estrutura SmMTAP-tub74
Figura 29 - Sítio de ligação da Ribose tipo II na estrutura SmMTAP-tub75
Figura 30 - Sítio de ligação da base na estrutura SmMTAP-ade76
Figura 31 - Sítio de ligação da base na estrutura SmMTAP-ade-gol.77
Figura 32 - Sobreposição do sítio ativo das estruturas SmMTAP-ade, -tub e -apo78
Figura 33 - Sobreposição das estruturas SmMTAP-apo e SmMTAP-ade79
Figura 34 - Sítio de ligação do fosfato na estrutura SmMTAP-tub80
Figura 35 - Sobreposição da MTAP de S.mansoni e H. sapiens (1CG6)81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequencia dos <i>primers</i> e enzimas de restrição utilizadas
Tabela 2 - Resultado das constantes catalíticas da SmMTAP46
Tabela 3 - Comparação dos valores de KM para MTAP em Humanos e em S. mansoni48
Tabela 4 - Comparação dos valores de KM para o substrato PO4 de MTAP em outros organismos
Tabela 5 - Resultado das constantes catalíticas da SmMTAP na ausência de Fosfato53
Tabela 6 - Estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados para os cristais da SmMTAP
Tabela 7 - Valores de R _{free} e R _{work} das quatro estruturas obtidas
Tabela 8 - Análise das estruturas da SmMTAP gerada pelo programa MolProbity61
Tabela 9 - Dados estatísticos gerados pelo programa ProCheck
Tabela 10 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos trímeros da SmMTAP64
Tabela 11 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos monômeros da SmMTAP emonômeros das MTAPs depositadas no PDB

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2xTY	2x(Triptone, Yeast extract)
Ade	Adenina
Ado	Adenosina
AMP	adenosina monofosfato
ApMTAP	MTAP de Aeropyrum pernix
ATP	adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
DLS	Diamond Light Source
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO	densidade óptica
GOL	Glicerol
GTP	guanosina trifosfato
Нрх	Hipoxantina
HsMTAP	MTAP de <i>H. sapiens</i>
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
Ino	Inosina
k _{cat}	Constante catalítica
K _M	Constante de Michaelis-Menten
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mRNA	RNA mensageiro
MTA	5'-deoxi-5'-metiltioadenosina
MTAP	5'-deoxi-5'-metiltioadenosina Fosforilase
MTR1P	5-metiltiorribose-1-fosfato
NTD	neglected tropical diseases
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank
PNP	Purina Nucleosídeo Fosforilase
PO ₄	Fosfato
RMSD	root mean square deviation
SmMTAP	MTAP de S. mansoni
SO_4	Sulfato
SsMTAP	MTAP de Sulfulobus solfataricus
StMTAP	MTAP de Sulfolobus tokadaii
UP	Uridina Fosforilase
V _{max}	Velocidade máxima
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO25
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA27
2.1 - Histórico da esquistossomose27
2.2 - Ciclo evolutivo do parasita27
2.3 - Tratamento da esquistossomose29
2.4 - Patogenia da doença29
2.5 - Metabolismo de Purinas em S. mansoni30
2.6 - A 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP)32
3 - OBJETIVOS
3.1 - Objetivo Geral
3.2 - Objetivos Específicos35
4 - MATERIAIS E MÉTODOS
4.1 - Amplificação do gene Smp_02819037
4.1 - Amplificação do gene Smp_028190374.2 - Ligação do gene de interesse em vetor de propagação, transformação de
 4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
 4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
 4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
 4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
 4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
 4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
 4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
 4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
4.1 - Amplificação do gene Smp_028190
4.1 - Amplificação do gene Smp_028190

5.4 - Determinação das constantes catalíticas para os substratos MTA e Adenosina na
ausência de PO452
5.5 - Cristalização e Co-cristalização da SmMTAP55
5.6 - Coleta de dados, processamento, resolução e refinamentodos dados de difração
de raios-X da SmMTAP56
5.7 - Validação dos modelos59
5.8 - Análise das estruturas tridimensionais da SmMTAP63
5.8.1 - Comparação estrutural entre as quatro estruturas obtidas da SmMTAP64
5.8.2 - Comparação estrutural entre MTAPs de diferentes organismos65
5.8.3 - Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas
5.8.4 - O Sítio Ativo da SmMTAP77
5.8.4.1 - Sítio de ligação da Ribose73
5.8.4.2 - Sítio de ligação da Base75
5.8.4.3 - Sítio de ligação do fosfato80
6 - CONCLUSÃO
7 - PERSPECTIVA
REFERENCIAS

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 1 bilhão de pessoas são afetadas por uma ou mais doenças tropicais negligenciadas (NTDs - *neglected tropical diseases*). Essas doenças são assim chamadas porque acometem principalmente as populações mais pobres e mais marginalizadas. Por terem sido completamente eliminadas em lugares mais desenvolvidos, ficam completamente esquecidas e não recebem atenção devida (1). Atualmente existem 17 doenças descritas como negligenciadas, dessas, sete são causadas por helmintos (ascaridíase, ancilostomose, tricuríase, dracunculíase, elefantíase, oncocercose e esquistossomose) (2). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*), 1 de cada 6 pessoas está afetada por uma NTD, mas no entanto menos de 1% dos aproximadamente 1400 medicamentos registrados entre 1975 e 1999 foram para essas doenças (1). Diante deste cenário torna-se imprescindível o investimento em mais pesquisa, desenvolvimento de mecanismos inovadores de financiamento e/ou negociações para redução de preços dos medicamentos e novas estratégias para sanar as falhas de saúde pública (3).

Este trabalho teve como objetivo geral, contribuir para o aumento do conhecimento científico de um dos parasitas causador de uma das 17 NTDs, o *Schistosoma mansoni* causador da esquistossomose, doença que afeta 207 milhões de pessoas no mundo (4) sendo 6 milhões somente no Brasil (5). Atualmente apenas um medicamento é utilizado no combate, o praziquantel. Geralmente uma pessoa precisa de 3 a 5 comprimidos desse composto por dia. Apesar de relativamente barato (~U\$ 0,08 cada comprimido) (6), se considerarmos as 207 milhões de pessoas atingidas, o valor gasto torna-se muitas vezes inviável para muitos governos.

Assim, este trabalho teve como objetivo específico determinar a estrutura tridimensional e as constantes catalíticas da enzima 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina Fosforilase (MTAP), uma enzima chave da via de salvação de purinas. O parasita *S. mansoni*, depende integralmente dessa via para suprir sua necessidade de bases púricas (7, 8) em especial adenina e guanina, essas bases além de serem componentes de várias moléculas bioenergéticas, elas fazem parte do DNA e RNA. O bloqueio desta enzima pode dificultar, não só a manutenção vital, como também a postura de ovos pelo parasita, principal aspecto etiológico da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da esquistossomose

A esquistossomose mansônica também conhecida como barriga d'água ou doença do caramujo, é um grande problema de saúde pública, estando associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico, que gera a necessidade da utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer.

Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) (4) revelam que 207 milhões de pessoas no mundo estão infectadas, sendo que 700 milhões estão vivendo em áreas de risco nos 74 países endêmicos, destes, 54 estão localizados nas Ásia, África e America. Na America latina os países acometidos são Brasil, Venezuela e Ilhas do Caribe, sendo que o Brasil é o país com a maior área endêmica das Américas (5). Assim essa é considerada a segunda mais importante doença parasitária tropical em termos de impacto social e econômico (9).

No final da década de 1940 a esquistossomose era problema de saúde pública também nos estados de São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro (10), época essa, em que se intensificou a industrialização nesses estados e surgiu uma corrente migratória de indivíduos originários das zonas endêmicas do Nordeste, em direção ao Sul e Sudeste (11). Atualmente, esta doença é endêmica em nove estados, sendo eles: MA, AL, BA, PE, PB, RN, SE, MG e ES. Sendo que mais dez estados apresentam transmissão focal (PA, PI, CE, RJ, SP, PR, SC, RS, GO e DF), acometendo 6 milhões de pessoas. No período de 2000 a 2010 foram registrados 820 caso de forma grave e 505 óbitos no Brasil (5).

2.2 Ciclo evolutivo do parasita

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica cujos sintomas são hepatopatias, enteropatias, hipertensão portal e/ou pulmonar (12). Nas Américas, é causada pelo parasita

Schistosoma mansoni e transmitida através da água por moluscos do gênero Biomphalaria. O ciclo da doença inicia-se com S. mansoni pondo seus ovos nas veias do intestino do hospedeiro definitivo (homem). Esses ovos atravessam as paredes das veias e do intestino e são eliminados juntamente com as fezes. Os ovos que caem na água transformam-se em larvas, os miracídios. Estes penetram no corpo de um caramujo e ali se transformam em um novo tipo de larvário, o esporocisto, que, por poliembrionia, gera esporocistos-filhos e, depois, larvas infectantes para os hospedeiros vertebrados: as cercárias. Depois de formadas, as cercárias saem do caramujo e passam novamente para a água. E então, podem penetrar ativamente na pele humana ou outro vertebrado susceptível. As cercarias que não foram destruídas na pele, transformam-se rapidamente em esquistossômulo, ultima forma larval, e ganham a corrente sangüínea, chegando ao coração, pulmão, intestino e fígado. Os esquistossômulos que atingem o sistema porta-hepático podem completar seu desenvolvimento e alcançam a fase adulta, onde se acasalam e migram para as vênulas da parede intestinal, fechando o ciclo (13) (Figura 1).



Figura 1 - Ciclo de vida do S. mansoni. Ovos são eliminados nas fezes ou urina 🔍 em condições ideais há eclosão dos ovos e liberação de miracídios 2, que nadam e penetram em hospedeiro intermediário específico (moluscos) 3. Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos 4 e a produção de cercárias 5. Após liberadas do caramujo, as cercárias infectantes nadam e penetram na pele do hospedeiro humano 6, perdem sua cauda, passando a ser esquistossômulo 70. Os esquistossômulos disseminam-se pelo sangue 80 e atingem o fígado onde se maturam na forma adulta 🕗. Adultos emparelham-se e migram para o plexo venoso do intestino (S. mansoni e S. Japonicum) ou plexo venoso da bexiga (S. haematobium) O. eliminados com as Os ovos são fezes ou urina, respectivamente. (http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm).

2.3 Tratamento da esquistossomose

A esquistossomose é tratada através do uso de drogas que não são efetivas para a erradicação da doença, pois estudos mostraram que aproximadamente 53% dos pacientes voltam a apresentar a doença uma vez que essas pessoas residem nas áreas de risco e são continuamente infectadas (14). Atualmente existem duas drogas disponíveis para o tratamento da esquistossomose mansônica: oxamniquine e praziquantel. Os dois medicamentos se equivalem quanto à eficácia e segurança. Atualmente, o praziquantel é a droga de escolha, em função do menor custo/tratamento. Esses compostos apresentam alta eficiência, mas, no entanto causam efeitos colaterais como tonturas, náuseas, vômitos, cefaléia e sonolência. A oxamniquine pode causar efeitos ainda mais graves, como alucinações e mudança de comportamento (15), em pacientes com antecedentes neurológicos pode-se observar casos de alucinações ou convulsões, além disso, há relatos de cepas de *S. mansoni* resistentes à essas substâncias (16) justificando assim a constante busca por novos fármacos.

2.4 Patogenia da doença

A produção de ovos pelas fêmeas pode chegar a 300 por dia, sendo esse o aspecto mais significante do parasitismo e a maior causa da patologia da esquistossomose (13), pois esses ovos tanto provocam hemorragias e ulcerações durante a passagem pela luz intestinal como provocam a formação de granulomas no intestino, fígado ou em outros locais onde se alojam. Acredita-se que esta fecundidade persista por anos e represente assim um exemplo notável de capacidade biossintética altamente especializada. Desta forma esta impressionante capacidade requer um metabolismo ativo de nucleotídeos, tanto para o suprimento de bases nas sínteses de DNA e RNA como para fonte energética (ATP) (7).

2.5 Metabolismo de Purinas em S. mansoni

Nucleotídeos de purina são requeridos em todos os organismos para síntese de DNA, RNA e outros metabólitos. Estes nucleotídeos podem ser obtidos pela via "*de novo*" que utiliza precursores simples para a síntese ou pela via "de salvação" que é a reutilização de vias pelas quais o organismo pode satisfazer seu requerimento pré-formado de purinas endógenas e exógenas (17).

Senft et al., (7) em seu trabalho sobre metabolismo de purinas em S. mansoni, mostraram que o verme quando incubado em meio contendo ¹⁴C-glicina, após quatro horas e meia, tinha incorporado apenas 5% desta glicina ao seu metabolismo, e o que foi incorporado permaneceu na forma de livre aminoácido não sendo incorporado ao anel púrico. Mas quando incubado em meio contendo ¹⁴C-adenina pelo mesmo período, cerca de 28% havia sido incorporado e foram encontrados em frações que continham AMP, ADP e ATP. Esta evidência tanto mostra uma grande dependência de um suprimento externo de bases préformadas para a síntese de nucleotídeos, como demonstra a perda da via "de novo" de síntese de purinas. Esta evidência foi confirmada por Dovey et al. (8), fato que mostra a dependência do parasita pela via de salvação de purinas. Deste modo o S. mansoni ao contrário do seu hospedeiro não possui a via biossintética de purinas "de novo" e depende da via de salvação para seu requerimento de purinas (18). Por este motivo a via de salvação é tida como exclusivo meio de obtenção de purinas pelo parasita. Coerente com esta hipótese são as observações de Senft e Crabtree (19) e Ross e Jaffe (20) de que vários análogos de purinas inibem enzimas da via de salvação e que um deles, tubercidina (7-deaza-adenosina) em concentrações menores que 10⁻⁷M causa separação dos adultos quando emparelhados, altera o padrão de atividade muscular, diminui a capacidade de sucção da ventosa ventral e inibe a postura de ovos. Além disso, Jaffe et al. (21) mostraram que a tubercidina pode ser usada como agente anti-esquitossomose em macacos.

O problema é que compostos como a tubercidina, quando utilizados como agentes anti-esquitossomose, irão também inibir as enzimas envolvidas na via de salvação do homem. Mesmo possuindo a via de síntese, as enzimas da via de salvação no ser humano são de extrema importância para o metabolismo de purinas, e deste modo esses agentes são extremamente tóxicos ao ser humano e podem causar sérios efeitos colaterais podendo levá-lo à morte. Para contornar este problema, tem-se procurado agentes que atuem especificamente nas enzimas do parasita ou melhor, em uma enzima alvo presente apenas no metabolismo do *S. mansoni* e não no metabolismo do Homem.

Senft e Crabtree (19), esquematizaram as várias vias pelas quais a adenosina é convertida em nucleotídeo em *S. mansoni*, a figura 2 mostra este esquema de forma adaptada.



Figura 2 - Esquema das vias de conversão de adenosina em nucleotídeos em S. mansoni. ADA- Adenosina Desaminase, PNP- Purina Nucleosídeo Fosforilase, HGPRT- Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase, APRT- Adenina Fosforibosiltraferase, AK - Adenosoina Kinase, ADK -Adenilato Kinase, NDPK Nucleosídeo Difosfato Kinase, ADSL - Adenilosuccinato Liase, ADSS -Adenilosuccinato Sintase, IMPDH - Inosina-5'-fosfato Desidrogenase, GMPS - Guanilato Sintase, GK -Guanilato Kinase.

Em 1971 (22), descobriu-se que no metabolismo de purinas em humanos a adenosina (Ado) não é diretamente convertida em adenina (Ade), esta reação no Homem acontecem em duas etapas: 1- a ado é convertida primeiramente em AMP (adenosina monofosfato) pela ação da adenosina kinase e 2- o AMP é convertido em adenina pela ação da adenina fosforribosiltrasferase. Deste modo a enzima capaz de catalisar a reação Ado \rightarrow Ade diretamente, não está presente na via de salvação em humanos. Já em *S. mansoni* não só é descrita esta enzima (23-26), como ainda é demonstrado baixos níveis de kinases no metabolismo, o que indica pouco uso da via indireta e uma dependência maior da enzima que converte ado em ade de forma direta e que está ausente em humanos.

Esta enzima foi descrita como sendo uma possível adenosina fosforilase mas que necessariamente não pertença à família das PNPs, já que os análogos de adenosina, formicina

A e formicina B inibem respectivamente as reações Ado \rightarrow Ade e Inosina (Ino) \rightarrow Hipoxantina (Hpx), mas não inibem respectivamente as reações Ino \rightarrow Hpx e Ado \rightarrow Ade. Outra hipótese é de que a enzima responsável pela quebra de Ado em Ade seja uma adenosina hidrolase já que no mesmo trabalho, observou-se que 25% da radioatividade presente na adenosina foi encontrada em adenina após duas horas na ausência de fosfato (24). Em seguida Miech *et. al.* (25) mostram que provavelmente esta enzima seja de fato uma adenosina fosforilase, já que acompanharam o consumo de fosfato na reação que formava adenina a partir de adenosina. Mas em 1985, Dovey *et. al.*(26), em seu trabalho sobre a ação da tubercidina e outros análagos de adenosina, volta a afirmar que a adenosina fosforilase, se presente em *S. mansoni*, pode sim hidrolisar adenosina. Assim resta saber em *S. mansoni* qual é a enzima que converte adenosina em adenina e por quais mecanismos ela atua.

2.6 A 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (MTAP)

Dentre os membros da família PNP, a MTAP (EC 2.4.2.28) tem sido identificada em mamíferos (27), *Leishmania donovani* (28), *Schistosoma mansoni* (29), *Trypanosoma cruzi* (30) e *Trypanosoma brucei* (31). Sua atividade foi primeiramente descrita em 1969 por Pegg e Williams-Ashman (32) quando estudavam tecido da próstata de ratos. Esta enzima tem como substrato a adenosina e a 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina (MTA), um nucleosídeo gerado durante a síntese de poliaminas. Essa reação tem como produto 5-metiltiorribose-1-fosfato (MTR1P) e adenina, essa última acredita-se que pode ser salva pelo *S. mansoni* através da via de salvação de purinas para a formação de ATP e GTP.

A MTAP de parasitas possui algumas características em comum com as que são encontradas em mamíferos, como baixo valores de K_M para o seu principal substrato (MTA) e ampla tolerância à substituições na posição 5' dos nucleosídeos. Mas, no entanto apresenta uma importante diferença, a MTAP de parasitas apresenta um K_M baixo para o substrato adenosina e análogos (31).

Em humanos, a MTAP é um trímero composto por três subunidades idênticas. Cada subunidade consiste de um único domínio α/β contendo 8 folhas β centrais mistas, e 6 α hélices (Figura 3). Na estrutura nativa revelou-se a presença de uma molécula de adenina e sulfato (usado no lugar do fosfato) no sítio de ligação de purinas (33). Se confirmada a ação

da MTAP no metabolismo de purinas em *S. mansoni*, o fato reforçará as suspeitas de Miech *et al.* e Crabtree *et. al.* (24, 25), de que a conversão da adenosina em adenina no parasita, é realizada por uma adenosina fosforilase que difere das PNPs.



Figura 3 - Trímero da MTAP humana (1CB0) em complexo com adenina.

O *S. mansoni* possui um gene codificante para a MTAP o Smp_028190 que codifica uma proteína com 314 resíduos, sendo que 16 correspondem à uma inserção inexistentes na MTAP humana (HsMTAP). Quando essas duas enzimas são comparadas, apresentam 46% de identidade entre si. O alinhamento é mostrado na figura 4 abaixo.

SmMTAP HuMTAP	MSKVKVGIIGGSGFDDPNLFKKVGVRQVTTPFGKPSDTLVEGFVGDVACVVLPR MASGTTTTAVKIGIIGGTGLDDPEILEGRTEKYVDTPFGKPSDALILGKIKNVDCVLLAR : **:*****:::: : * *****:*: * : : * *:*.*
SmMTAP	HGKGHLIPPSEVNYRANVWALKDLGCTHILATNACGSLQEDLVPGDFVVLNQFMDKTWGR
HuMTAP	HGRQHTIMPSKVNYQANIWALKEEGCTHVIVTTACGSLREEIQPGDIVIIDQFIDRTTMR **: * * **:***:**:***: ****:**********
SmMTAP	ENTFYGSKPDSLKGVLHMPMAEPFCERTRQILIQAARNKSIN <mark>VYDKKTMDKSACIHPC</mark> VH
HuMTAP	PQSFYDGSHSCARGVCHIPMAEPFCPKTREVLIETAKKLGLRCH ::** :** *:****** :**::**:: .:. *
SmMTAP	AEGSAVTINGPRFSTRCESFIHKAMGLDIVNMTLVPEVSLAREAGLSYASIAIVTDFDCW
HuMTAP	SKGTMVTIEGPRFSSRAESFMFRTWGADVINMTTVPEVVLAKEAGICYASIAMATDYDCW ::*: ***:****:*:*:********************
SmMTAP	KSEEEHVCVDMVLEQFRKSVVHVREILLEAVALIGAEDWTKTIEANKALVMSSRQDLLHQ
HuMTAP	KEHEEAVSVDRVLKTLKENANKAKSLLLTTIPQIGSTEWSETLHNLKNMAQFSVLLPR*** *.** **: ::::::::::::::::::::::::
SmMTAP	GSNDK
HuMTAP	H

Figura 4 - Alinhamento entre as MTAPs de Schistosoma (Smp_028190) e Humana (NP_002442.2). As seqüências possuem 46% de identidade sequencial. Em destaque, inserção de 16 resíduos na MTAP de Schistosoma em relação à MTAP Humana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização bioquímica, determinar as constantes catalíticas e a estrutura tridimensional da enzima 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina Fosforilase, contribuindo assim para o aumento do conhecimento científico do metabolismo de purinas em *Schistosoma mansoni*.

3.2 Objetivos específicos

Amplificar por PCR o gene SmMTAP a partir do RNA total do verme adulto; Expressar de forma heteróloga e purificar a enzima recombinante; Cristalizar a SmMTAP com diferentes substratos e/ou inibidores; Realizar experimentos de difração de raios X com os cristais obtidos; Determinar as constantes catalíticas da enzima; Resolver e refinar as estruturas obtidas.
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amplificação do gene Smp_028190

Para a amplificação do gene Smp_028190 referente à MTAP de *S. mansoni* (SmMTAP) foi utilizada uma biblioteca de cDNA a partir do mRNA total do verme adulto utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System da Invitrogen segundo instruções do fabricante. O mRNA foi fornecido pelo Prof. Ricardo De Marco. Iniciadores (*primers*) foram desenhados inserindo sítios para enzimas de restrição (Tabela 1), visando assim, sua ligação nos vetores de expressão, para a produção da proteína recombinante.

I abela I - Sequencia dos <i>Di línei</i> s e enzimas de resulcao dunizada	Tabela 1 - Sequ	iencia dos	primers e	enzimas d	e restricão	utilizadas.
---	-----------------	------------	-----------	-----------	-------------	-------------

GENE	Sequ	ência dos <i>Primers</i> (5'-3') ^a	Enzima de Restrição	TM ^b
МТАР	F	CTGGCTAGCATGTCTAAAGTTAAGGTTGGAATTATTG	Nhe I	57,3
	R	CTGCTCGAGCCAATTTACTTCATGTTTATTTGTCATTAC	Xho I	57,2

^a Sequencias em vermelho, correspondem ao sítio de restrição da respectiva enzima utilizada; ^bTemperatura de *melting*.

O gene foi amplificado por PCR, cuja reação continha: Tampão de reação, 1,5mM de $MgCl_2$, 0,2mM de dNTP, 10pmol/µL de cada *primer* (R e F), ~100ng de DNA molde, 1,25 Unidades de TaqDNA polimerase, e água para completar o volume. A reação foi feita no termociclador, sendo 30 segundos à 96°C para a desnaturação, 45 segundos à 60°C para anelamento dos *primers* e 45 segundos à 55°C para extensão. Após a reação completa, verificou-se a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.2 Ligação do gene de interesse em vetor de propagação, transformação de bactérias competentes, plaqueamento, seleção de colônias, extração de DNA plasmidial e seqüenciamento.

Depois de confirmada a amplificação, foi realizada uma PCR em maior escala para a produção de maior quantidade de DNA. O DNA de interesse foi purificado e adenilado para ser inserido no vetor de propagação pTZ57R/T. 10 μ L do produto resultante da ligação foram utilizados para a transformação de 50 μ L de bactérias competentes *E. coli* DH5 α . Utilizou-se a técnica de choque térmico para a transformação: banho à 42° C por 90 segundos e gelo por 5 minutos. Em seguida adicionou-se 250 μ L de meio de cultura LB e incubou a 37° C por 1 hora com rotação à 125 rpm. Passada 1 hora as bactérias foram plaqueadas, 100 μ L e 200 μ L por placa de petri contendo meio LB suplementado com ampicilina (100 μ g/mL). As placas permaneceram à 37°C por 14 horas. Após este período, observou-se o crescimento de colônias isoladas nas placas.

Para confirmar a transformação das colônias presentes na placa, fez-se uma PCR das colônias utilizando *primers* correspondentes à sequência do vetor e observou-se, por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, a diferença do peso molecular dos amplificados. Os Plasmídeos recombinantes foi digerido com as enzimas de restrição descritas na tabela 1, e após a purificação com kit Promega Wizard SV Gel and PCR Clean Up do inserto o mesmo foi ligado ao vetor de expressão pET28a. Com o vetor pET28a pré-digerido com as mesmas enzimas, utilizou-se a seguinte reação: Tampão Ligase 2x, Inserto adenilado, 50 ng/µL do Vetor e T4 DNA ligase. A reação foi incubada "overnight" a 4º C em câmara fria.

O produto resultante da ligação foi utilizado para a transformação de bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3) códon plus seguindo o mesmo protocolo de transformação citado acima, utilizando meio LB suplementado com Kanamicina (50µg/mL) e clorafenicol

(10μg/mL). Após a transformação, seguiu-se com uma nova PCR de colônias como descrito anteriormente para confirmar a presença do inserto no vetor.

Também visando confirmação da presença do inserto, realizou-se um sequenciamento dos vetores no equipamento MegaBace 1000, seguindo-se o protocolo do Kit "*DYEnamic ET dye terminator kit* (MegaBACE)" e a matriz de corrida MegaBACE Long Read Matrix, ambos da empresa GE Healthcare.

4.3 Expressão.

Para a expressão da enzima foi utilizado 500 mL de meio 2xTY suplementado com 50 μ g/mL de kanamicina e 10 μ g/mL de clorafenicol, inoculado com uma cultura crescida por 16 horas contendo o plasmídio pET28a que possuia o gene da SmMTAP. Os tubos foram mantidos sob agitação (250 rpm) até que a DO (densidade óptica) fosse igual ou superior a 0,6. Então se adicionou 100 μ M/mL de IPTG e as culturas foram mantidas nas mesmas condições por 4 horas. O produto da expressão foi centrifugado por 20 minutos a 9000 g. Descartou-se o sobrenadante, o pellet foi suspendido com 50 mL de tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol e 5mM β -Mercaptoetanol). As bactérias foram então lisadas por sonicação e novamente centrifugadas por 20 min. a 9000 g.

4.4 Purificação.

Para a purificação das enzimas foi utilizada cromatografia de afinidade, utilizando a resina cromatográfica de cobalto Co-NTA agarose da Quiagen. Aplicou-se o extrato bruto contendo a proteína na coluna de afinidade e então a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de lavagem (50 mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol e 5 mM β-Mercaptoetanol). Para a eluição da proteína ligada na coluna, foi utilizado 1,5 volumes de tampão de eluição (50 mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300 mM NaCl, 200 mM imidazol e 5 mM β-

Mercaptoetanol). A SmMTAP foi dialisada contra 20 mM tris pH 7.4, 200 mM NaCl e 10 mM de β -mercaptoetanol e concentrada até 10 mg/mL. Quando armazenada, o fez à -80°C com 50% de glicerol, concentração final.

4.5 Cinética enzimática da SmMTAP

Foram realizados cinco ensaios para a enzima SmMTAP, sendo o primeiro e segundo com uso de MTA como substrato na presença e ausência de fosfato, o terceiro e quarto com uso de Ado na presença e ausência de fosfato, e o quinto com fosfato (PO₄) como substrato. Todos os ensaios foram baseados no método utilizado por Singh, V. *et al* (34) que mede indiretamente a formação de adenina, através da formação de 2,8-dihidroxiadenina, produzido pela oxidação da adenina pela xantina oxidase (XO) a 275 nm. Nesta condição o $\Delta\epsilon$ para a conversão de MTA ou adenosina em 2,8-dihidroxiadenina é 15,2 mM⁻¹. Para os substratos MTA e Ado na presença de fosfato, a reação continha 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,4, 0,3 unidades de XO e 50 nM de SmMTAP para um volume final de 200 µl. Para os substratos MTA e Ado na ausência de fosfato e para o substrato PO₄ foi utilizada a mesma reação, mas em 100 mM de tampão Tris. A reação era iniciada pela adição do substrato que foi utilizado em quantidades variáveis (50 - 0,57 µM para MTA; 25 - 0,28 µM para Ado e 1000 - 0,00 µM para PO₄). A OD 275 foi imediatamente monitorada em UV-VIS espectofotômetro por 10 minutos.

As medidas foram feitas em sextuplicatas, e o valor do K_M e V_{max} foram determinados a partir dos dados coletados utilizando-se o programa de bioestatística para cinética enzimática GraphPad Prism 5, que contém um sistema interativo para desempenhar a análise gráfica não linear de melhor ajuste.

4.6 Cristalização.

Nos ensaios de cristalização da SmMTAP, foi utilizada a técnica de difusão de vapor em "gotas sentadas" utilizando as placas de cristalização CrystalQuick de 96 poços e as soluções de cristalização das empresas Hampton Research (3 kits de 96 condições) e da Quiagen (6 kits de 96 condições) perfazendo ao total 864 condições diferentes. Para a realização destes experimentos o volume da gota foi de 1 µL de solução de proteína a 10mg/mL, mais 1µL de solução de cristalização e foi montado através do robô de cristalização Honeybee da Genomic Solutions.

As condições em que obteve-se os melhores cristais, foram aquelas cujo tampão era Bis-tris ou Mes e PEG 3350, então essas condições foram otimizadas manualmente variandose o pH e concentração de PEG, para isso, a técnica utilizada foi difusão de vapor em "gota suspensa", cujo volume foi de 3µL de solução de proteína a 10mg/mL, mais 3µL de solução de cristalização, as gotas foram montadas em placas tipo limbro de 24 poços, sendo que em cada poço foi adicionado 500mL de solução de cristlização..

4.7 Co-cristalização.

Para co-cristalizar a SmMTAP com seus ligantes e inibidores, foi acrescentado ao tampão de diálise 2mM de sulfato de amônio e após concentrada a 10mg/mL, a proteína foi incubada "*over night*" com 5mM de Ribose-1-fosfato, Guanosina e Tubercidina. E incubada em concentrações que variaram de 5 a 25mM de MTA e Adenosina. A co-cristalização, foi feita em tampão Bis-Tris ou MES variando o pH (de 6,1 a 6,7) e a concentração de PEG 3350 (de 14 a 20%).

4.8 Coleta, Processamento, refinamento e validação dos dados.

Os cristais resultantes foram submetidos à coleta de dados de difração nas estações MX2 do laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP e na IO2 do Diamond Light Source em Oxfordshire Inglaterra. Para o processamento dos dados foi utilizados os programas MOSFLM/ SCALA para os dados coletados no IFSC e no LNLS, e os programas xia2 e XDS para os dados coletados no Diamond. A primeira estrutura da SmMTAP foi determinada no programa Phaser (35) por substituição molecular, usando a estrutura humana da MTAP (1CB0) que possui 46% de identidade com a MTAP de *S. mansoni*. As demais estruturas foram resolvidas também por substituição molecular, mas agora utilizando como modelo a primeira estrutura obtida.

Para o refinamento foram empregados os programas Phenix (36) e Coot (37) para a visualização dos mapas de densidade eletrônica e construção do modelo.

Após refinados, os modelos foram validados utilizando-se os métodos: avaliação do valor de R e R_{free} (38); validação pelo programa MolProbity (39) e validação pelo programa ProCheck (40). Apos validadas, as estruturas foram submetidas a analise comparativa da estrutura tridimensional com MTAPs depositadas no PDB (*Protein Data Bank*) utilizando o programa PyMOL (41).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação, clonagem, expressão e purificação.

O gene da SmMTAP (Smp_028190) foi amplificado utilizando-se os *primers* descritos na tabela 1. A banda apareceu na altura correspondente, ~1000pb (Figura 5).



Figura 5 - Visualização da amplificação por PCR do gene codificante da enzima SmMTAP. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 1- Marcador de peso molecular; 2- SmMTAP (946 pb).

O gene foi clonado no vetor de propagação pTZ57R/T e inseridos em bactérias competentes *E. coli* DH5α. Após confirmada a presença do inserto por PCR, o plasmídeo foi recuperado e digerido com as enzimas de restrição, já citadas anteriormente. Em seguida o inserto digerido foi clonado no vetor de expressão pET28a e inseridos em bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3) códon plus. Para confirmação da presença do inserto, fez-se uma PCR com as colônias obtidas na transformação das bactérias, utilizando iniciadores do vetor. Pôde-se constatar através de bandas que correspondiam ao tamanho do vetor + inserto (~1200pb), que as colônias eram positivas à presença do inserto (figura 6).



Figura 6 - Visualização da PCR das colônias obtidas após transformação. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1- Marcador de peso molecular; 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11 e 12- Colônias positivas; 6 e 8- Colônias negativas.

Foram escolhidas 4 colônias para expressar a proteína.

As bactérias expressaram a 37 °C por 4 horas sob agitação. Durante a expressão foram coletadas 5 amostras, sendo a primeira sem indução e as demais uma para cada hora de expressão. As amostras foram visualizadas em gel de poliacrilamida 15% corado por comassie blue (Figura 7). A expressão foi considerada satisfatória.



Figura 7 - Análise eletroforética da expressão protéica. Gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue. SmMTAP (34,5 KDa). 1- Marcador de peso molecular; 2- Extrato bruto sem indução; 3- Colônia 1 induzida por 1 hora; 4- 2 horas; 5- 3 horas; 6- 4 horas.

Após expressão, o meio foi centrifugado, o pellet ressuspendido em tampão de lise e sonicado. Em seguida foi novamente centrifugado e o sobrenadante aplicado em coluna de cobalto para a purificação. O vetor de expressão pET28a insere no N-terminal da proteína uma seqüência de 6 histidinas, esta cauda de polihistidina tem afinidade por íons zinco ou cobalto permitindo desta maneira a purificação das proteínas.

Durante a purificação foram coletadas amostras do eluato, lavagem e eluição da proteína, essas amostras foram visualizadas em gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue (Figura 8), foi purificado aproximadamente 120 mg da proteína por litro de cultura.



Figura 8 - Análise eletroforética da purificação da proteina SmMTAP. Gel de poliacrilamida 15% corado por coomassie blue. Purificação em coluna de cobalto. 1- Marcador de peso molecular; 2- Eluato; 3-Lavagem da coluna; 4 e 5. Frações da eluição da SmMTAP.

5.2 Determinação das constantes catalíticas para os substratos MTA e adenosina.

Os ensaios cinéticos para a SmMTAP foram baseados no método descrito por Singh, V. *et al* (34), através do acoplamento de duas reações. O esquema deste acoplamento é mostrado na figura 9 abaixo.



Figura 9 - Esquema do acoplamento das reações para a determinação das constantes catalíticas da SmMTAP. O substrato MTA pode ser substituído por Ado na primeira reação.

Foi realizada a determinação das constantes catalíticas para a fosforólise de adenosina e MTA pela SmMTAP na presença de fosfato. Os valores obtidos seguem na tabela 2 abaixo:

	$K_M(\mu M)$	V _{max} (nmol/min)	$k_{cat}(s^{-1})$	k_{cat}/K_{M} (s ⁻¹ / μ M ⁻¹)	$R^{2^{\prime}}$
MTA	3,12 ± 0,16	37,60	752 ± 12,85	241,02	0,99
ADENOSINA	$1,94 \pm 0,08$	25,87	$\textbf{517,4} \pm 7,72$	266,7	0,98

Tabela 2 - Resultado das constantes catalíticas da SmMTAP.

[^] Coeficiente de determinação, parâmetro entre 0 e 1 que atesta a qualidade do modelo. Este parâmetro multiplicado por 100, indica a porcentagem de variância de *Y* que é explicada pela variância de *X*.

Os gráficos da cinética da SmMTAP podem ser visualizados nas Figura 10 e 11 que evidenciam a crescente velocidade em concentrações mais baixas e a aparente saturação da velocidade em altas concentrações de substrato. Isso se deve ao fato de que em baixas concentrações a formação do complexo enzima-substrato (ES) é diretamente proporcional à concentração de substrato [S]. Em altas concentrações de substrato, toda enzima do meio está em complexo ES, fazendo com que a velocidade de catálise passe a ser proporcional a dissociação de ES e não mais da concentração de substrato (42).



Michaelis-Menten (*S. mansoni* Metiltioadenosina Fosforilase)

Figura 10 - Gráfico de Michaelis-Meten para fosforólise de MTA pela SmMTAP.



Michaelis-Menten (S. mansoni Metiltioadenosina Fosforilase)

Figura 11 - Gráfico de Michaelis-Meten para fosforólise de Adenosina pela SmMTAP.

A constante de Michaelis (K_M), que é equivalente à concentração de substrato na qual a velocidade da reação é exatamente a metade da velocidade máxima (V_{max}) obtida (42), indica a "afinidade" de uma enzima pelo seu substrato. Assim, os dados de K_M aqui obtidos, quando comparados com os dados de K_M obtidos para MTAP humana, indicam uma maior "afinidade" da SmMTAP por seus substratos (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação dos valores de K_M para MTAP em Humanos e em S. mansoni.

	<u>K</u> M	<u>(µM)</u>
	MTA	Adenosina
Homo Sapiens	14 [*] e 26 [*]	184*
Schistosoma mansoni	3,12	1,94

* Ref. BRENDA, the enzyme information system in 2011 (43).

Esses dados revelam uma preferência quase 100 vezes maior da SmMTAP por seus substratos, indicando assim uma maior atividade desta enzima em *S. mansoni* do que em humanos. Aparentemente esses dados podem estar relacionados com o fato de que em humanos está presente tanto a via de salvação de purinas como a via de síntese "*de novo*", enquanto que em *S. mansoni* a obtenção de purinas é feita exclusivamente pela via de salvação (7, 8), ou seja, a obtenção de purinas é feita exclusivamente por enzimas desta via, o que revela um forte indício da SmMTAP fazer parte da via de salvação de purinas em *S. mansoni*.

Um dado bastante interessante, foi que os valores de K_M para SmMTAP indicam uma leve preferência desta enzima por adenosina em vez de MTA (Tabela 3), seu substrato natural. Apesar deste fato já ter sido relatado em *Trypanossoma brucei* (31), este dado juntamente com a comparação das constantes catalíticas da MTAP humana, nos chama muito a atenção já que em 1975, Miech *et al.* (25), mostraram que o *S. mansoni* pode também utilizar a adenosina como um substrato alternativo para obtenção de adenina, mas que no entanto essa reação é catalizada por uma enzima, até então desconhecida, diferente daquela responsável pela reação com inosina (PNP). Assim os resultados aqui obtidos aumentam o indício de que a MTAP possa ser essa enzima descrita em 1975, que provavelmente está envolvida na fosforólise da adenosina na via de purinas em *S. mansoni*.

Mutações encontradas no sítio ativo podem justificar o baixo K_M da SmMTAP para os seus substratos, e ainda explicar a preferência da enzima por adenosina. Mas os dados que justificam esta hipótese serão discutidos mais adiante.

5.3 Determinação das constantes catalíticas para o substrato PO_{4.}

Ensaios cinéticos em tampão Tris na presença de 50 μ M (concentração fixa) de MTA ou Ado, também foram realizados para obtenção das constantes catalíticas do substrato PO₄. Nestes ensaios foram utilizadas concentrações de PO₄ que variaram de 0,7 μ M até 1000 μ M, no entanto em todas as faixas de concentração, a velocidade foi relativamente constante, mesmo em concentrações mais baixas de substrato (Figura 12).



Figura 12 - Gráfico da velocidade versus concentração de PO₄. Velocidade relativamente constante mesmo à baixas concentrações de PO₄ (V₀ 31,9 nmol/min).

Como pode ser visto na tabela 4, baixos valores de K_M para o substrato $PO_{4,}$ não são comuns.

$K_{M (\mu M)^*}$	Organismo
125	Sulfolubus solfataricus
200	Rattus novergicus
750	Homo Sapiens
6100	Drosophila melanogaster

Tabela 4 - Comparação dos valores de K_M para o substrato PO₄ de MTAP em outros organismos.

* **Ref.** BRENDA, the enzyme information system in 2011 (43).

Com as reações tendo velocidade constante mesmo em concentrações de substrato estando perto de zero, foi feito um ensaio a fim de verificar a atividade da SmMTAP na completa ausência de fosfato. Como pode ser visto na figura 13, surpreendentemente foi possível detectar à 275 nm a formação de 2,8-dihidroxiadenina, apesar de o aumento na absorbância ser discreto, o fato indica a formação de adenina que só acontece uma vez que a SmMTAP catalisa a primeira reação.



Figura 13 - Espectograma da absorção à 275 nm de 24 reações, mostrando a formação ao longo do tempo de 2,8dihidroxiadenina a partir de Ado. Esta reação só ocorre quando a SmMTAP catalisa a primeira reação formando adenina, aqui essa reação ocorre na ausência de fosfato. Eixo x, tempo; eixo y, absorbância.

A fim de eliminar suspeitas de possíveis ruídos, foi feito um acompanhamento da reação na ausência da SmMTAP. O espectograma obtido pode ser visualizado abaixo na figura 14, e como já era esperado não houve formação de 2,8-dihidroxiadenina, pois não houve formação de adenina na ausência da SmMTAP.



Figura 14 - Espectograma da absorção à 275 nm de 24 reações, mostrando a não formação de 2,8-dihidroxiadenina a partir de Ado, uma vez que a SmMTAP estava ausente e por isso não ocorreu a primeira reação. Eixo x, tempo; eixo y, absorbância.

Os dados aqui relatados sugerem a possibilidade de a SmMTAP ter ganho a função de hidrolisar seus substratos. Esta hipótese explica os dados obtidos em 1974 por Crabtree e Senft (24) que caracterizaram o metabolismo da adenosina *in vitro*. Esses autores observaram a ação de uma enzima amplamente capaz de converter adenosina em adenina na presença de fosfato, mas quando na ausência apesar de discreta, a reação também acontecia. Apesar de esses mesmos autores concordarem que esta enzima era mesmo uma fosforilase, em 1985 Dovey *et.al.*(26) voltam a afirmar que a enzima responsável por converter Ado em Ade em *S. mansoni* podia hidrolisar adenosina.

Com os resultados obtidos até este momento, fica claro que a MTAP é a enzima que fosforolisa a adenosina em *S. mansoni*, e explica a dúvida quanto à hidrolise. Apesar de que, novos experimentos ainda serão realizados para confirmar definitivamente a também capacidade hidrolítica desta enzima, já que não há (até o momento) relatos na literatura deste ganho de função nas MTAPs.

Diante do que foi observado, teve-se a necessidade de determinar novamente as constantes catalíticas para os substratos MTA e adenosina, mas agora na ausência de fosfato.

5.4 Determinação das constantes catalíticas para os substratos MTA e Adenosina na ausência de PO_{4.}

A reação foi feita como descrita anteriormente, mas agora em 100 mM de tampão Tris e sem adição de fosfato, vale ressaltar que antes dos ensaios cinéticos a proteína é dialisada contra 2 0mM tris pH 7.4, 200 mM NaCl e 10 mM de β -mercaptoetanol, eliminando assim possíveis moléculas de PO₄ remanescentes do processo de purificação.

Obteve-se as constantes catalíticas para ambos os substratos MTA e Ado, essas são mostradas na tabela 5, e os gráficos de Michaelis-Menten gerado nestes ensaios podem ser visto na figura 15 e 16.

Tabela 5 - Resultado das constantes catalíticas da SmMTAP na ausência de Fosfato.

	$K_M(\mu M)$	V _{max} (nmol/min)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_{M} (s ⁻¹ / μ M ⁻¹)	\mathbb{R}^{2}
MTA	1,94 ± 0,15	11,54	230,8 ± 6,0	118,9	0,96
ADENOSINA	2,9 ± 0,15	13,29	265,8 ± 4,45	91,65	0,98

[^] Coeficiente de determinação, parâmetro entre 0 e 1 que atesta a qualidade do modelo. Este parâmetro multiplicado por 100, indica a porcentagem de variância de *Y* que é explicada pela variância de *X*.

Comparando os dados da tabela 2 e 5, observa-se que na ausência de fosfato os valores de k_{cat} e V_{max} diminuem, indicando uma diminuição na eficiência enzimática. Apesar de menos eficiência a SmMTAP consegue perfeitamente catalisar seus substratos na ausência de fosfato.



Michaelis-Menten (S. mansoni Metiltioadenosina Fosforilase)

Figura 15 - Gráfico de Michaelis-Menten para a reação de conversão de MTA pela SmMTAP na ausência de fosfato.



Michaelis-Menten (*S. mansoni* Metiltioadenosina Fosforilase)

Figura 16 - Gráfico de Michaelis-Menten para a reação de conversão de Adenosina pela SmMTAP na ausência de fosfato.

Paul, D. *et al.* (44) estudando a estrutura da enzima Uridina Fosforilase (UP) (EC 2.4.2.3) de bovino e *Escherichia coli*, observaram no sítio ativo uma densidade eletrônica correspondente à um glical (enol éter cíclico derivado de açúcares com dupla ligação entre os átomos de carbono 1 e 2 do anel). A hipótese levantada por esses autores no mesmo trabalho, é de que esta enzima hidrolisa seus nucleosídeos na ausência de fosfato, e um dos produtos desta reação pode ser o glical, explicando desta forma a presença desta molécula no sítio. Apesar de não ter sido encontrado nenhuma densidade eletrônica que correspondesse à um glical no sítio ativo das nossas estruturas, os dados cinéticos aqui apresentados sugerem que a SmMTAP possa possuir o mesmo mecanismo descrito para UP de bovino e *Escherichia coli*. Sendo assim, foi firmada uma colaboração com a professora Claudia Elisabeth Munte do IFSC para investigar a clivagem da adenosina e MTA via NMR da SmMTAP. Pretende-se também realizar junto com o professor Ricardo DeMarco também do IFSC, ensaios para a

determinação da massa aparente dos produtos da reação na ausência de fosfato, afim de identificá-los.

5.5 Cristalização e Co-cristalização da SmMTAP.

A SmMTAP foi expressa e purificada com um rendimento de 120 mg por litro de cultura. Após purificada, foi submetida aos ensaios robóticos de cristalização a uma concentração de 10 mg/mL.

Foi realizado uma otimização manual variando-se o pH de 6,1 a 6,7, o tampão (100mM de Bis-tris ou MES) e o PEG (3350) 14-20%, os cristais surgem em aproximadamente 3 dias após a montagem das gotas e em uma semana atingem sua maior dimensão (~ 0,4 mm). Na Figura 17 são observados os cristais de SmMTAP crescidos na melhor condição obtida: 100 mM de Bis-tris pH 6,3 e 18% de PEG3350.





Figura 17 - Cristais da SmMTAP (~0.4 mm).

Os cristais obtidos foram congelados e submetidos à difração de raios X na linha MX2 do LNLS em Campinas-SP e na linha I02 do Diamond Light Source em Oxford, Inglaterra. Obteve-se no total 4 conjuntos de dados, sendo eles:

1-Com 2,0Å de resolução, grupo espacial monoclínico, com a enzima na forma apoenzima (sem ligantes) em complexo com fosfato (**SmMTAP-apo**).

2-Com 2,1Å de resolução, grupo espacial monoclínico, em complexo com adenina e sulfato em algumas cadeias (**SmMTAP-ade**).

3-Com 2,1 Å de resolução, grupo espacial monoclínico, em complexo com tubercidina e sulfato (**SmMTAP-tub**).

4-Com 1,9 Å de resolução, grupo espacial ortorrômbico, em complexo com adenina e glicerol (GOL) em todas as cadeias (**SmMTAP-ade-gol**).

Das estruturas obtidas a partir de cristais de SmMTAP cujos ligantes foram incubados, apenas os ligantes adenina e tubercidina foram encontrados no sítio ativo, vale ressaltar que a estrutura SmMTAP-ade-gol, em que todas as cadeias estavam ligadas à uma molécula de adenina, foi obtida a partir de um cristal cuja proteína foi incubada com 25mM de adenosina. A possibilidade da SmMTAP estar catalisando os substratos durante a cristalização foi inicialmente descartada já que, como citado no tópico 3.7, a proteína foi dialisada com tampão contendo 2mM de sulfato de amônio. O sulfato ocupa o sítio do fosfato e impede a reação de fosforilação. No entanto diante dos resultados obtidos nos ensaios cinéticos citados anteriormente, acredita-se que esses ligantes possam estar sendo hidrolisados pela enzima durante a cristalização.

5.6 Coleta de dados, processamento, resolução e refinamentodos dados de difração de raios-X da SmMTAP.

A SmMTAP cristalizou tanto no sistema cristalino monoclínico com o grupo espacial $P2_1$ (estruturas 1, 2 e 3) como no sistema cristalino ortorrômbico com grupo espacial $P2_12_12_1$

(estrutura 4). Os dados da coleta dos dados, processamento e refinamento são mostrados na tabela 6.

	SmMTAP-apo	SmMTAP-ade	SmMTAP-tub	SmMTAP-ade-gol
Detetor	marmosaic 225	marmosaic 225	Quantum 315r	Quantum 315r
Parametros da cela (Å) a, b,c	80,62; 82,4; 150,28	81,27; 82,55; 150,30	81,06; 82,68; 150,56	102,41; 135,53; 145,05
α, β, γ	90,0; 101,6; 90,0	90,0; 100,6; 90,0	90,0; 101,3; 90,0	90,0; 90,0; 90.0
Grupo Espacial	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	$P 2_1 2_1 2_1$
Resolução (Å)	19,9-6,4	30,0-6,5	42,2-6,5	20,0-6,0
	$(2,1-2,0)^{d}$	$(2,1-2,1)^{d}$	$(2,1-2,1)^{d}$	$(1,9-1,9)^{d}$
Mosaicidade	0,2	0,7	0,2	0,2
Fonte de raios-X	W01B-MX2	W01B-MX2	I02	I02
λ (Å)	1,46	1,43	0,97	0,97
Número de images	200	268	260	360
Multiplicidade	$4,1(3,9)^{d}$	$5,4(5,2)^{d}$	3,7 (3,9) ^d	7,2 (7,3) ^d
\mathbf{R}_{meas} (%) ^a	11,7 (72,4) ^d	13,7 (75,1) ^d	8,3 (63,1) ^d	12,8 (61,8) ^d
(Completeza (%)	98,4 (95,9) ^d	90,1(82,7) ^d	91,2 (98,5) ^d	99,4 (97,1) ^d
Número de reflexões	459122 (67754) ^d	649620 (82782) ^d	374257 (30947) ^d	1025810 (147694) ^d
Número de reflexões únicas	111592 (17346) ^d	119216 (15897) ^d	100709 (8034) ^d	146070 (22679) ^d
Ι/σ	$10,16(2,35)^{d}$	$8,0(2,4)^{d}$	$14(2,7)^{d}$	10,59 (2,81) ^d
Nº moléculas UA	6	6	6	6
Nº átomos refinados:	13475	13769	13573	14646
R/R _{free} ^c	0,1849/0,2400	0,2052/0,2518	0,2040/0,2592	0,1881/0,2304

Tabela 6 - Estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados para os cristais da SmMTAP.

^a $R_{meas} = \Sigma_h (n_h/n_h - 1)^{1/2} \Sigma_i |Ii(h) - \langle I(h) \rangle| / \Sigma_h \Sigma_i Ii(h)$, onde Ii(h) e $\langle I(h) \rangle$ sao os ith e intensidade media e n_h é a multiplicidade de todas as reflexões h com simetrias equivalentes (45).

^b $R_{sym} = \Sigma_h \Sigma_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle | / \Sigma_h \Sigma_i I_i(h)$, onde Ii(h) e $\langle I(h) \rangle$ são os ith é intensidade média de todas as reflexões h com simetrias equivalentes (45).

^c R = Σ ||Fo| - |Fc|| / Σ |Fo| onde |Fc| é a amplitude do fator de estrutura calculado do modelo e |Fo| é a amplitude do fator de estrutura observado do modelo. R_{free} é calculado com base em 5% do conjunto de reflexões que não é utilizado durante o refinamento (46).

^d Valores entre parênteses referem-se aos valores das faixas de mais alta resolução.

O conteúdo da unidade assimétrica foi estimado pelo Coeficiente de Matthews, indicando a presença de 2 trímeros (figura 18). O complexo SmMTAP-ade foi resolvido por substituição molecular (MR) usando o programa Phaser, sendo a estrutura da MTAP humana (1CB0), que possui 46% de identidade com a MTAP de *S. mansoni*, utilizada como molde. As estruturas SmMTAP-apo, SmMTAP-tub e SmMTAP-ade-gol foram resolvida também no programa Phaser (35) por substituição molecular, mas agora utilizando como modelo de busca a primeira estrutura obtida. Para o refinadas foi utilizado o programa Phenix (36).



Figura 18 - Vista da estrutura da SmMTAP. A- Conteúdo da unidade assimétrica com os dois trímeros da SmMTAP;
 B- Um dos trímeros em evidência. Em amarelo, ligantes na interface entre as subunidades. Estrutura secundária em diferentes cores: Helices em rosa; Loops em cinza; Folhas em azul. Figuras geradas no programa PyMOL

Foi possível identificar uma densidade eletrônica no sítio ativo da SmMTAP-ade nas subunidades A, B, D e E, em todas as cadeias da SmMTAP-ade-gol e em todas as cadeias da SmMTAP-tub essas densidades foram modeladas como adenina e tubercidina respectivamente, o mapa de densidade eletrônica Fo-Fc para o sitio ativo destes ligantes podem ser visualizados em amarelo na Figura 19 e 20.



Figura 19 - Mapa da densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3.6σ, para o sítio ativo da SmMTAP-ade-gol, onde pode ser visualizado a molécula de adenina.



Figura 20 - Mapa da densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3.6σ, para o sítio ativo da SmMTAP-tub, onde pode ser visualizado a molécula de tubercidina e sulfato.

5.7 Validação dos modelos

Após completo o refinamento dos dados, os modelos foram avaliados e validados utilizando-se 3 métodos: avaliação do valor do R_{free} (38); validação pelo programa MolProbity (39) e validação pelo programa ProCheck (40).

Durante o processo de refinamento procura-se encontrar uma concordância entre as amplitudes medidas e o modelo. Antes do primeiro passo deste processo, aproximadamente 5% das reflexões são separadas do refinamento e utilizadas como um conjunto de teste no cálculo do fator R_{free}, as demais reflexões seguem para o refinamento e geram o fator R_{work}. Ambos os valores melhoram (diminuem) à medida que o modelo torna-se mais completo e mais parâmetros como, ângulos de ligação, distancias, torsões, quiralidade, e interações são ajustados. Num certo estágio do refinamento, o modelo será ideal, e a introdução de mais parâmetros não melhorará o modelo. Neste ponto, o R_{free} para de diminuir, e o R_{work} é reduzido artificialmente, assim a validação do modelo por este método é feita através da observação dos valores de R_{free} (o melhor modelo será o de menor valor de R_{free}) e pelo intervalo entre os valores de R_{free} e R_{work} . Para estruturas protéicas resolvidas à resolução melhor que 2,0 Å, espera-se que o R atinja valores menores que 0,2 e a diferença entre eles, seja em torno de 0,05 (47). Abaixo na tabela 7, são mostrados os valores de R obtidos para as quatro estruturas. Os valores são coerentes e considerados bons em relação ao valor da resolução obtida.

	Rwork	R _{free}	Resolução (Å)
SmMTAP-apo	0,18	0,24	2,096
SmMTAP-ade	0,20	0,25	2,100
SmMTAP-tub	0.20	0.25	2,121
SmMTAP-ade-gol	0,18	0,23	1,951

Tabela 7 - Valores de R_{free} e R_{work} das quatro estruturas obtidas.

Um dos métodos de validação utilizado foi a análise dos contatos atômicos, utilizando o programa MolProbity (39), que fornece uma análise detalhada de todos os contatos entre os átomos e detecta problemas estéricos no interior das moléculas através do cálculo das ligações de hidrogênio e contatos de van der Waals nas interfaces entre os componentes. Outra ferramenta do programa é a análise do desvio do carbono-β em relação à cadeia central (um

sinal de que a torção da cadeia lateral subseqüente talvez esteja errada) (47, 48). Dados gerados destas análises podem ser visualizados na tabela 8.

Parâmetros Analisados	SmMTAP Apo	SmMTAP ade	SmMTAP tub	SmMTAP ade-gol	Referência
Clashscore ¹	6.14	2,15	12,61	6,64	-
Rotâmeros Ruins	1,95%	3,63%	2,02%	1,38%	< 1%
Desvio $C\beta > 0.25A$	0	0	0	1	0
Resíduos com ligações ruins	0,00%	0,00%	0,24%	0,00%	< 0%
Resíduos com ângulos ruins	0,00%	0,00%	0,30%	0,00%	< 0,1%

Tabela 8 - Análise das estruturas da SmMTAP gerada pelo programa MolProbity

Número de sobreposições ruins para cada 1000 átomos.

A maioria dos dados apresentados está dentro do referencial proposto pelo programa, sendo que os demais diferem minimamente do referencial. Assim os padrões analisados por este método de validação foram considerados ideais.

Outro método de validação utilizado foi através do uso do programa ProCheck, que fornece uma verificação detalhada da estereoquímica de uma estrutura protéica através da análise gráfica dos anglos e torções da cadeia principal e laterais (47). Um dos gráficos gerado pelo programa ProCheck é o gráfico de Ramachandran (49), que cruza os valores dos ângulos $\varphi \in \psi$. Esses ângulos apresentam combinações preferenciais de seus valores, com base na conformação e na menor energia de ligação dos resíduos. Desvios na conformação preferencial dos resíduos são usados para indicar possíveis erros na estrutura. O gráfico de Ramachandran é dividido em quatro áreas: área amplamente favorável; área adicional permitidas; área amplamente permitida e área não permitida. Em um modelo considerado ideal, o número de resíduos encontrados na área não permitida deve ser inferior a 0,5%, sendo que valores próximos ou acima de 0,5 são incomum, os resíduos na área amplamente

favorável deve ser igual ou superior a 90% (40, 50). As quatro estruturas da SmMTAP apresentaram valores dentro dos parâmetros aceitáveis, indicando alta qualidade estrutural. Os gráficos de Ramachandran gerados pelo programa ProCheck para as quatro estruturas, podem ser visualizados na figura 21, e os dados estatísticos na tabela 9.



Figura 21 - Diagramas de Ramachandran com a distribuição dos ângulos diedros para as quatro estruturas da SmMTAP. A – SmMTAP-apo; B – SmMTAP-ade; C – SmMTAP-tub; D – SmMTAP-ade-gol. A região representada em vermelho corresponde à área amplamente favorável, a região bege à adicional permitida, a região em amarelo escuro à amplamente permitida e a região em amarelo claro à área não permitida para os valores dos ângulos. As glicinas são representadas por triângulos e os demais resíduos por quadrados ambos em azul.

Áreas	Favorável nº de resíduos	Adicional Permitida nº de resíduos	Permitida nº de resíduos	Não Permitida nº de resíduos
SmMTAP-apo	1354 (92,9%)	103 (7,1%)	1 (0,1%)	0 (0,0%)
SmMTAP-ade	1390 (92,9%)	102 (6,8%)	4 (0,3%)	1 (0,1%)
SmMTAP-tub	1339 (91,5%)	121 (8,3%)	3 (0,2%)	1 (0,1%)
SmMTAP-ade-gol	1405 (92,6%)	106 (7,0%)	6 (0,4%)	0 (0,0%)

 Tabela 9 - Dados estatísticos gerados pelo programa ProCheck, mostrando o número e porcentagem de resíduos encontrados em cada uma das quatro áreas do diagrama de Ramachandran.

5.8 Análise das estruturas tridimensionais da SmMTAP

A estrutura cristalina revela que a SmMTAP é um trímero de 3 subunidades idênticas relacionadas por um eixo de simetria de ordem 3. Na unidade assimétrica são encontrados 2 trímeros medindo ~40Å ao longo do eixo e ~72Å transversalmente. Há poucos contatos entre os trímeros, envolvendo apenas de 4 à 6 resíduos e consequentemente a maior parte da superfície de ambos está exposta ao solvente. O contato entre as subunidades de um mesmo trímero é mais extenso, envolvendo de 23 à 26 resíduos.

No centro do trímero por onde passa o eixo de ordem 3 há o encontro de três resíduos idênticos (um de cada subunidade) em ambas as faces, de um lado há o encontro de três Trp112 e no outro o encontro de três Met199. Na estrutura da MTAP humana também é descrito esse encontro de resíduos idênticos, interagindo hidrofóbicamente (33).

5.8.1 Comparação estrutural entre as quatro estruturas obtidas da SmMTAP.

As quatro estruturas obtidas para a SmMTAP, quando alinhadas apresentam diferenças entre si, já que a presença ou não do ligante induz mudanças conformacionais na estrutura. Essas mudanças são medidas pelo RMSD (*root mean square deviation*), esse parâmetro indica o quanto uma estrutura diverge em relação à outra, quando estão sobrepostas. Assim valores baixos de RMSD indicam menores divergências entre as estruturas (47).

Foram comparados os RMSDs entre os trímeros A e B de uma mesma estrutura, sendo que o trímero A corresponde às cadeias A, B e C e o trímero B às cadeias D, E e F. E o RMSD entre os trímeros das quatro diferentes estruturas, os resultados obtidos são mostrados abaixo na tabela 10.

Tabela 10 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos trímeros da SmMTAP. Os valores foram
calculados pela ferramenta "SSM Superpose" do programa Coot.

SmMTAP	Apo A		_				
Apo B	0,417	Apo B					
Ade A	0,433	0,541	Ade A		_		
Ade B	0,596	0,476	0,423	Ade B		_	
Tub A	0,498	0,490	0,483	0,532	Tub A		
Tub B	0,596	0,691	0,524	0,676	0,577	Tub B	
Ade-ort A	0,560	0,654	0,428	0,624	0,713	0,648	Ade-ort A
Ade-ort B	0,857	0,654	0,465	0,870	0,791	0,728	0,202

Nota-se que os maiores valores de RMSD, acontece entre os trímeros da estrutura SmMTAP-Ade-ort e os trímeros das demais estruturas. Essa diferença acontece provavelmente devido ao fato de que a SmMTAP-Ade-ort, cristalizou no grupo espacial ortorrômbico, enquanto as demais cristalizou no grupo espacial monoclínico.

5.8.2 Comparação estrutural entre MTAPs de diferentes organismos.

No banco de dados PDB são encontradas estruturas da MTAP oriunda de quatro diferentes organismos, são eles: *Aeropyrum pernix* (1WTA), *Sulfulobus solfataricus* (1JDV) (51), *Sulfulobus tokadaii* (1V4N) e *Homo Sapiens* (1CB0) (33).

Todas são muito similares com a MTAP de *S. mansoni* com exceção da SsMTAP que diferente das demais, faz parte da família das PNPs hexaméricas e ainda contém 3 pontes de dissulfeto entre cada monômero (51). Abaixo na tabela 11, são mostrados os valores de RMSD da sobreposição entre os monômeros (cadeia A) das diferentes MTAPs em relação à SmMTAP, e na figura 22 a sobreposição dos mesmos.

Tabela 11 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos monômeros da SmMTAP e monômeros das
MTAPs depositadas no PDB. Valores calculados pelo alinhamento no programa PyMOL

Estruturas Sobrepostas	RMSD
MTAP de Schistosoma mansoni e MTAP de Aeropyrum pernix (1WTA)	0,716
MTAP de Schistosoma mansoni e MTAP de Homo sapiens (1CB0)	0,566
MTAP de Schistosoma mansoni e MTAP de Sulfolobus tokadaii (1V4N)	0,621
MTAP de Schistosoma mansoni e MTAP de Sulfolobus solfataricus (1JDV)	8,975



Figura 22 - Sobreposição das estruturas tridimensionais das MTAPs depositadas no PDB com a SmMTAP. A-SmMTAP (Rosa) e ApMTAP, 1WTA (Lilás); B- SmMTAP (Rosa) e HsMTAP, 1CB0 (Branco); C-SmMTAP (Rosa) e StMTAP, 1V4N (Verde); D- SmMTAP (Rosa) e SsMTAP, 1JDV (Amarelo).

D

Analisando o alinhamento entre as MTAPs do PDB e a de *S. mansoni* é observado uma inserção de 16 resíduos, e em relação à SsMTAP a inserção é de 21 resíduos (Figura 4 e 27). Inicialmente não foi observada a densidade eletrônica para esta região, durante o refinamento a densidade eletrônica foi melhorando sendo possível a construção do modelo, os resíduos modelados participam dos contatos cristalinos. Na Figura 23 é mostrado o mapa de densidade eletrônica para a inserção e na Figura 24 a sobreposição das estruturas da MTAP humana e de *S. mansoni* evidenciando o local da inserção.

С



Figura 23 - Imagem estéreo do mapa de densidade 2Fo-Fc da inserção de 16 aminoácidos na MTAP de S. mansoni.



Figura 24 - Sobreposição das estruturas da MTAP de *S. mansoni* (azul) e humana (vermelho). A seta indica a inserção de 16 resíduos na SmMTAP.

5.8.3 Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas

Análises da estrutura secundária e topologia da SmMTAP foram obtidas através do programa ProMotif (52) disponível no servidor pdbsum (53). O monômero da SmMTAP consiste de um único domínio α/β , composto por 2 folhas β , 14 fitas β , 1 unidade beta-alphabeta, 2 β -hairpins, 1 psi loop, 3 β -bulges, 8 α -hélices, 5 interações hélice-hélice, 20 β -turns e 2 γ -turns.

A parte central da molécula é composta pela folha β A com 12 fitas mistas (fita β 1 a β 7 e β 10 a β 14), e lateralmente pela folha β B com 2 fitas paralelas (β 8 e β 9). A folha β central é flanqueada pelas 8 α -hélices que ficam expostas ao solvente, sendo que duas delas (α 1 e α 4) são hélices do tipo 3.10 (Figura 25). Resíduos pertencentes ao sítio ativo aparecem tanto em fitas como em hélices e loops.



Figura 25 - Estrutura secundaria da SmMTAP em função da sequência de aminoácidos gerada pelo programa ProMotif disponível no pdbsum. Símbolos: estrutura secundária, espirais α -helices e setas fitas β ; H1, H2,..., numeração das hélices; A, B, classificação das folhas; β beta turn; γ gamma turn; beta hairpin; resíduos que fazem contato com o ligante (adenina).

Appleby *et. al.* (33), optaram em descrever a topologia da MTAP de forma levemente diferente da descrita acima. Baseada na descrição desses autores, a SmMTAP apresenta, assim como a MTAP humana, uma grande folha β central composta de 8 fitas β , cuja topologia é: β 7, β 12, β 13, β 5, β 14, β 6, β 11 e β 10. Adicionalmente às fitas β 5 e β 14 estende-se uma pequena folha de 5 fitas cuja topologia é: β 3, β 4, β 1, β 5, β 14. As fitas β 8 e β 9 não são consideradas por esta descrição. Abaixo, na figura 26, observa-se a estrutura secundária e o diagrama da topologia do monômero da SmMTAP.



Figura 26 - Estrutura do monômero da SmMTAP. A - Representação dos elementos da estrutura secundária do monômero da SmMTAP. Helices em rosa; Loops em cinza; Fitas em azul. Figura gerada no programa PyMOL. B – Diagrama da topologia do monômero da SmMTAP. Fitas são representadas por setas rosa, Hélices por cilindros vermelho e Loops em azul. Figura gerada pelo pdbsum (53).

Além do enovelamento bem conservado entre as MTAPs triméricas, como visto na tabela 12 e figura 21, outras características são marcantes entres as MTAPs, como a presença de um número significante de cisteínas. Na SmMTAP, são 24 em cada trímero, 8 em cada subunidade, sendo 2 na inserção de 16 resíduos. Das 8 apenas uma, a Cys139 tem sua posição conservada apesar de não participar no sítio ativo. A presença dessas cisteínas é inesperada, já que este fato contribui para a desestabilização térmica da proteína, o que não foi observado durante os processos de expressão, purificação e cristalização. Esse alto número de cisteínas é

observado também nas MTAPs de organismos termofílicos, o que também não é comum, já que em altas temperaturas as cistéinas são particularmente sensíveis à oxidação (54, 55).

Nas MTAPs triméricas, a maioria dos resíduos envolvidos no sítio ativo são altamente conservados, apenas quatro aparecem substituídos, sendo que três deles são substituído por outro de mesmas propriedades. Apenas o resíduo Gln289 não é conservado entre as MTAPs analisadas, o fato nos chama atenção já que esse resíduo parece ser importante na interação com O5' da tubercidina ou adenosina e em humanos, na posição deste resíduo é encontrada uma Leucina que não interage com o ligante. É possível que esse seja o fator chave para explicar um dos resultados inesperados, a preferência pelo substrato adenosina.

Resíduos que não fazem parte diretamente do sítio ativo também aparecem conservados, esses resíduos aparecem próximos uns dos outros formando grandes sequências conservadas (figura 27). Essas sequências devem ser fundamentais para a manutenção estrutural das MTAPs, explicando assim a alta similaridade encontrada.





VHE

GSKPDSLKGVL

PTVAR

WG

YDGSHSCARGVCH

YDG....PV1

 $\alpha 3$

RAESFMFR

RA

00000000.0

RCESFIHK . AMG

SRVWKDVFK

5.8.4 O Sítio Ativo da SmMTAP

O sítio ativo de cada monômero está localizado próximo da interface entre as subunidades (Figura 18B). Na SmMTAP o sítio ativo é composto por resíduos da mesma subunidade com exceção do resíduo Gln289 que pertence à subunidade vizinha.

Figura 27 - Alinhamento das MTAPs triméricas com a SmMTAP. Os resíduos em brancos grifados de vermelho são conservados, os em vermelho grifados de branco são os resíduos não conservados, mas de propriedades similares A quarta linha corresponde à exposição dos resíduos ao solvente: em azul escuro os mais expostos; azul claro podem estar expostos e branco hidrofóbicos. Análise gerada em (http://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi).
O sítio ativo das MTAPs é comumente dividido em três subsítios: Sítio de ligação da ribose (para adenosina e análogos) ou metiltioribose (para MTA ou análogos); Sítio de ligação da Base e Sítio de Ligação do fosfato. Dentre as quatro estruturas obtidas, apenas a estrutura SmMTAP-apo possui uma molécula de fosfato no sítio ativo, já que a proteína proveniente desta cristalização, não foi dialisada com sulfato, as demais foram incubadas com sulfato, pois essa molécula funciona como um inibidor da reação catalítica, possibilitando a manutenção dos substratos no sítio durante a cristalização. Como essas duas moléculas possuem características químicas similares, a ligação do sulfato nos fornece importantes informações estruturais sobre esta região do sítio, que a partir de agora será referenciado como sítio de ligação sulfato/fosfato.

5.8.4.1 Sítio de ligação da Ribose

Este sítio será aqui descrito baseado nas informações obtidas da estrutura SmMTAP-Tub. A tubercidina é um análogo da adenosina, sendo que a única diferença da tubercidina em relação à adenosina é a substituição de um átomo de nitrogênio por um de carbono na posição 7 da base, podemos assim expandir as análises aqui feita para a molécula de adenosina ao que se refere à porção da ribose.

Na subunidade B, C, D e F as interações no sítio da ribose, acontece através dos contatos polares entre os átomos: Asn205/ND2-Tub/O2' e Met206/N-Tub/O2'. Adicionalmente há contatos polares entre o resíduo Gln289 da subunidade vizinha: Gln289/OE1-Tub/O5' e Gln289/NE2-Tub/O5'. Há ainda neste sítio, contatos polares entre os átomos: SO4/O1-Tub/O2', SO4/O1-Tub/O3', SO4/O4-Tub/O3' e SO4/O4-Tub/O4'. A

molécula de tubercidina/adenosina é por fim, estabilizada, nesta parte, pela interação com uma molécula de água presente no sítio: HOH105/O-TubO3'.

As subunidades A e E apresentam mudanças conformacionais neste sítio, a cadeia lateral do resíduo Asn205 é desviada 1,3Å para longe da molécula de tubercidina, com isso a interação com este resíduo é desfeita, e o átomo O2' da tubercidina passa a interagir com o átomo O do resíduo Ala88. A molécula de água HOH105 deixa o sítio, e o contato com o O3' da tubercidina/adenosina passa a ser feito entres este e o átomo O3 da molécula de sulfato/fosfato, que antes não interagia. Com essa nova configuração, não há interações entre o átomo O4' da molécula de tubercidina/adenosina, e o contato entre os átomos Gln289/OE1-Tub/O5' é desfeita. Os dois tipos de interação observados no sítio de ligação da Ribose na SmMTAP são mostradas na figura 28 e 29.



Figura 28 - Sítio de ligação da Ribose tipo I na estrutura SmMTAP-tub. Em branco, resíduos da cadeia B; em azul, resíduo da cadeia A; em verde, porção ribose da tubercidina/adenosina; em amarelo, molécula de sulfato/fosfato. Tabela: comprimento das ligações de hidrogênio da molécula de tubercidina/adenosina no sítio de ligação da ribose na SmMTAP.



Figura 29 - Sítio de ligação da Ribose tipo II na estrutura SmMTAP-tub. Em branco, resíduos da cadeia A; em azul, resíduo da cadeia C; em verde, porção ribose da tubercidina/adenosina; em amarelo, molécula de sulfato/fosfato. Tabela: comprimento das ligações de hidrogênio da molécula de tubercidina/adenosina no sítio de ligação da ribose na SmMTAP.

5.8.4.2 Sítio de ligação da Base

O sítio de ligação da base na SmMTAP, é muito parecido com o descrito para a HsMTAP. Os resíduos Ser188, Phe187, Asp230 e Asp232 juntamente com uma molécula de água formam um bolso facilitando a ligação da base púrica. O Asp230 parece ser o resíduo responsável pela especificidade por aminopurinas, já que ele interage simultaneamente com o N6 e N7 da adenina.

O resíduo Asp232 também forma pontes de hidrogênio com o N6 da adenina e juntamente com a Ser188 ajuda no posicionamento correto de uma molécula de água que interagem também no N6 e atua como um doador na ligação de hidrogênio para o N1, que em purinas não é protonado (33).

Na MTAP de *S. mansoni*, assim como na MTAP humana, no sítio ativo, está presente o resíduo Phe187, que com o seu grupo fenil no plano perpendicular ao do anel púrico da base possibilita a formação de um dipolo, essa interação é conhecida como empilhamento ou em inglês "*Stacking interaction*", esse arranjo facilita a estabilidade do ligante no sítio. Esse empilhamento é visto também nas PNPs uma família de fosforilases cuja especificidade é por oxopurinas (33).

Quando analisamos as estruturas SmMTAP-ade e SmMTAP-ade-gol, observamos outras interações, já que nessas estruturas não está presente a porção ribose do ligante. Na SmMTAP-ade o N9 interage com uma molécula de água, HOH544 que é mantida no sítio pelas interações com outras duas moléculas de água, HOH151 mantida no sítio pelas interações com Met206/N, Ala88/O e SO4/O4 e a molécula de água HOH502 mantida no sítio pelas interações com Ser12/OG e Gln289/OE1 da cadeia vizinha (Figura 30).



Figura 30 - Sítio de ligação da base (adenina) com sulfato/fosfato na estrutura SmMTAP-ade. Em branco, resíduos da cadeia B; em azul, resíduo da cadeia A; em verde, base adenina, atrás nota-se o resíduo Phe187 com anel no plano perpendicular ao anel púrico (*Stacking interaction*); em amarelo, molécula de sulfato/fosfato; Asteriscos em vermelho representam as moléculas de água com suas respectivas numeração. Tabela: comprimento das ligações de hidrogênio dos átomos envolvidos na manutenção da base no sítio ativo da SmMTAP.

Na estrutura SmMTAP-ade-gol, devido à presença de uma molécula de glicerol (GOL) no sítio, a estabilização da molécula de adenina é feita de forma um pouco diferente. O N3 e N9 da adenina interagem com uma molécula de água, HOH93/O. O N9 interage ainda com GOL/O2. A molécula de glicerol é mantida no sítio pelas seguintes interações: GOL/O1-Gln289/OE1; GOL/O2-Ser12/OG; GOL/O3-HOH550/O e GOL/O3-HOH93/O. Já a molécula de água HOH93 é mantida no sítio pelas interações: HOH93/O-Met206/N; HOH93/O-Ala88/O e HOH93/O-GOL/O3 (Figura 31). Observa-se que independentemente da presença de uma ribose, são os mesmo resíduos que estão envolvidos na interação com o ligante.



Figura 31 - Sítio de ligação da base (adenina) com Glicerol) na estrutura SmMTAP-ade-gol. Em branco, resíduos da cadeia F; em azul, resíduo da cadeia E; em verde, base adenina e glicerol; Asteriscos em vermelho representam as moléculas de água com suas respectivas numeração. Tabela: comprimento das ligações de hidrogênio dos átomos envolvidos na manutenção da base no sítio ativo da SmMTAP.

Na estrutura SmMTAP-tub, as mesmas interações são vistas para a base, com exceção da interação entre a base e o resíduo Asp230. Como dito anteriormente a tubercidina é um análogo da adenosina sendo que a única diferença entre elas é a troca de um átomo de nitrogênio por um átomo de carbono na posição 7 da tubercidina. Essa troca desfaz a

interação com o Asp230 e impede a catálise bloqueando o sítio. Em 1977, Senft *at al*, já descreviam a tubercidina como sendo um importante inibidor de adenosinas fosforilases (19).

Ainda na estrutura SmMTAP-tub nota-se nas cadeias A, B, C e F uma mudança conformacional do resíduo Asp230, a cadeia lateral se afasta aproximadamente 3,54Å do ligante quando comparada à cadeia lateral do mesmo resíduo da estrutura SmMTAP-ade. Essa mudança é vista também na estrutura SmMTAP-apo nas cadeias B, D e F. Na estrutura SmMTAP-apo é vista também uma segunda mudança conformacional, a do resíduo Phe231, que se movimenta de forma que sua cadeia lateral ocupe o sítio ativo que nesta estrutura está vazio (Figura 32).



Figura 32 - Sobreposição do sítio ativo das estruturas SmMTAP-ade, -tub e -apo, evidenciando as mudanças conformacionais induzidas pelo ligante. A- Mudança conformacional do resíduo Asp230. Nas estruturas -tub e -apo o resíduo Asp230 permanece em sua posição inicial, enquanto que na estrutura - ade, ele se volta para interagir com o ligante. B- Mudança conformacional do resíduo Phe231. Na estrutura -apo, este resíduo ocupa o sítio ativo. Em rosa, estrutura -ade; Em amarelo, estrutura -tub e em azul, estrutura -apo.

Apesar de os dois resíduos que sofrem mudanças conformacionais estarem em um loop, a mudança conformacional do resíduo Phe231 na estrutura SmMTAP-apo, provoca um deslocamento na α -helice 7, que se afasta do sítio aproximadamente 13,6Å (figura 33).

Diante do que foi exposto acreditamos que, quando o ligante interage no sítio, ele provoca uma mudança conformacional na estrutura, o resíduo Phe231 é deslocado do sítio, sofrendo uma repulsão pela ligante, enquanto o resíduo Asp230 se aproxima para interagir, exceto na estrutura SmMTAP-tub em que o resíduo Asp230 permanece na sua posição inicial não sendo deslocado em direção ao ligante.



Figura 33 - Sobreposição das estruturas SmMTAP-apo (em azul) e SmMTAP-ade (em rosa), evidenciando a mudança conformacional na estrutura secundária, induzida pelo ligante.

5.8.4.3 Sítio de ligação do fosfato

Quando analisamos a estrutura SmMTAP-tub, o sítio de ligação do sulfato/fosfato é composto pelos resíduos Ser12, Arg54, His55, Ala88 e Thr207. A cadeia lateral desses resíduos facilita a ligação dos íons carregados negativamente. O grupo guanidina do resíduo Arg54, carregado positivamente, fornece uma interação favorável com o íon sulfato. Adicionalmente, Ser12/OG, Thr207/OG1 e Hist55/NE2 formam ligações de hidrogênio com os átomos de oxigênio da molécula de sulfato/fosfato. O nitrogênio da cadeia principal dos resíduos Ser12 e Ala88 também são doadores na ligação de hidrogênio com o oxigênio do sulfato/fosfato (figura34).



Figura 34 - Sítio de ligação do sulfato/fosfato na estrutura SmMTAP-tub. Em branco, resíduos do sítio ativo; em verde, tubercidina; em amarelo, sulfato. Tabela: comprimento das ligações de hidrogênio dos átomos envolvidos no sítio de ligação sulfato/fosfato da SmMTAP.

Nas estruturas SmMTAP-ade e -apo, devido a ausência da ribose no sítio, a interação da molécula de sulfato/fosfato é levemente diferente. Na estrutura SmMTAP-ade, as interações descritas anteriormente são mantidas, as cargas do sulfato/fosfato são redistribuídas e surgem três novas interações, são elas: SO4/O2-Thr86/O; SO4/O3-HOH264/O e SO4/O4-HOH151/O. Na estrutura SmMTAP-apo, o mesmo acontece com exceção da interação com o resíduo Thr86, que não acontece e é substituída pela interação com uma terceira molécula de água.

A maioria dos resíduos envolvidos na ligação no sulfato/fosfato são conservados (figura 27), mas quando comparado os sítio de *S. mansoni* e *H. sapiens*, algumas diferenças importantes são observadas (Figura 35). O resíduo Ser12, em humanos é substituído por uma treonina (Thr18) em *S. mansoni*. As características químicas entre esses dois aminoácidos são semelhantes, e como é a porção OH que interage com o sulfato/fosfato, essa mutação parece não interferir nas interações. Na figura 27 é possível notar que das estruturas de MTAP depositadas no PDB, apenas a MTAP humana apresenta essa substituição.



Figura 35 - Sobreposição da MTAP de S.mansoni e H. sapiens (1CG6), evidenciando as mutações encontradas no sítio do sulfato/fosfato. SmMTAP em branco. HsMTAP, em amarelo. Tracejado em preto, representa a interação SO4/O1-Ser12/OG. Tracejado em lilás representa as interações: SO4/O4-Thr18/OG1 e SO4/O1-Thr93/OG1. Observe que o resíduo Asn87 não interage com a molécula de sulfato/fosfato.

A diferença mais marcante entre a SmMTAP e a HsMTAP no sítio de ligação do sulfato/fosfato, acontece na substituição de um resíduo treonina (Thr93) em humanos por uma asparagina (Asn87) em *S. mansoni*. O átomo Thr93/OG1, em humanos, interage com o átomo SO4/O1 da molécula de sulfato. Em *S.mansoni*, apesar de o oxigênio estar voltado para a molécula de sulfato/fosfato, o tamanho da cadeia lateral da asparagina faz com que este átomo se distancie do sulfato não possibilitando a interação. Assim o oxigênio desta posição na molécula de sulfato/fosfato interage com o átomo Ala88/N. Na figura 27 observamos, que apenas a SmMTAP apresenta essa substituição, o que nos leva a crer que esta é uma mutação que deve ser explorada na tentativa de explicar a atividade da SmMTAP na ausência de fosfato.

6. CONCLUSÃO

Os resultados acima descritos contribuem para o alcance dos objetivos inicialmente propostos. O conhecimento da estrutura tridimensional da enzima 5'-deoxi-5'- metiltioadenosina e dos seus mecanismos catalíticos, mesmo que de forma preliminar, abre novas perspectivas na busca por fármacos realmente eficazes, além de contribuir de forma significativa para o aumento do conhecimento científico global da esquistossomose mansônica, uma das 17 NTDs.

A preferência (menor valor de K_M) da MTAP por adenosina em vez de seu substrato natural (MTA) coloca definitivamente esta enzima na via de salvação de purinas em *S. mansoni*, confirmando os trabalhos (23-26) que previam a presença de uma adenosina fosforilase na via. A surpreendente capacidade de esta enzima catalisar na ausência de fosfato, explica os resultados obtidos pelos mesmos autores.

Através da determinação da estrutura tridimensional da MTAP, pôde-se conhecer os resíduos envolvidos no sítio catalítico e observar as interações entre esses e os ligantes adenina, tubercidina/adenosina, glicerol e sulfato/fosfato além do solvente. A sobreposição da estrutura na forma -apo com as demais estruturas obtidas revelou mudanças conformacionais na posição da cadeia lateral dos resíduos envolvidos na reação e na estrutura secundária da proteína, podendo-se assim atribuir movimento de uma α -helice, que ocorre quando o ligante adentra ao bolso catalítico. Essas informações são importantes para propor futuramente a dinâmica do mecanismo catalítico desta enzima.

Na comparação das estruturas de *S. mansoni* e de *H. sapiens*, foi possível identificar três mutações no sítio ativo, sendo que duas delas (Q289L e N87T) parecem estar diretamente ligadas com a preferência por adenosina e com a catálise na ausência de fosfato respectivamente. O encontro dessas mutações no sítio ativo abre campo para novas investigações a fim de esclarecer, não só como esses mecanismos catalíticos realmente acontecem, mas também de como essa proteína evoluiu e proporcionou desta forma uma melhor adaptação ao parasita. Essas informações são imprescindíveis para um efetivo bloqueio desta enzima já que ela parece ser de extrema importância na via.

7. PERSPECTIVA

Este trabalho abriu campo para novas investigações, assim sendo pretende-se:

- Obter estruturas tridimensionais com diferentes ligantes;

- Mutar a enzima SmMTAP, para conhecer a importância e a influência da reação enzimática das mutações encontradas no sítio ativo;

- Realizar experimentos de ressonância magnética para investigar a clivagem da adenosina e MTA.

- Identificar por espectroscopia de massa, a massa aparente dos produtos gerados na reação catalítica da SmMTAP na ausência de fosfato;

- Determinar as barreiras energéticas das ligações envolvidas na reação catalítica, a fim de elucidar de forma precisa o mecanismo de quebra dos substratos.

REFERENCIAS

1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO - 10 facts on neglected tropical diseases2010.Disponívelem:<</td>http://www.who.int/features/factfiles/neglected_tropical_diseases/en/index.html >. Acesso em12 Jan 2012

2 WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO - Strategic and technical advisory group for neglected tropical diseases 2010. Disponivel em: < http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_STAG_Report_2010.pdf >. Acesso em: 02 Jan 2012.

3 MOREL, C. M. Innovation in health and neglected diseases. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 22, n. 8, p. 1522-1523, 2006.

4 WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO - schistosomiasis: fact sheet n° 115. 2011. Disponivel em: < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>. Acesso em: 03 Nov 2011.

5 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da esquistossomose mansonica no Brasil. 2011. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresent_esquistossomose_mansoni_30_05_201 1.pdf >. Acesso em 30 jun 2011.

6 WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO - action against worms. 2006. Disponivel em: < http://www.who.int/wormcontrol/newsletter/PPC7_Eng_min.pdf >. Acesso em: 02 Jan 2012

7 SENFT, A. W.; MIECH, R. P.; BROWN, P. R.; SENFT, D. G. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni. International Journal for Parasitology*, v. 2, n. 2, p. 249-260, 1972.

8 DOVEY, H. F.; MCKERROW, J. H.; WANG, C. C. Purine salvage in *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Molecular Biochemistry Parasitology*, v. 11, p. 157-167, 1984.

9 SHUHUA, X.; TANNER, M.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J.; CHOLLET J.; BERGQUIST, R.; MINGGANG, C.; JIANG, Z. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and hematobia. *Acta Tropical*, v. 82, n. 2, p. 175-181, 2002.

10 LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G.; SIQUEIRA JUNIOR..; W. Introdução à geografia médica no Brasil. São Paulo: Edgar Blücher, 1972.

11 CUNHA, A. S. Esquistossomose mansônica. São Paulo: Sarvier, 1970.

12 RODRIGUES G. C.; LACERDA D. C.; GUSMÃO E. S.; COLARES, F. A.; MOTA, V. T. Forma pseudoneoplásica de esquistossomose pulmonar crônica sem hipertensão pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 35, n. 5, p. 484-488, 2009.

13 REY, L. Bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

14 KLOETZEL, K. On the advantage of chemotherapy of schistosomiasis in a population in continuous contact with the foci. (Preliminary note). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 5, p. 106-110, 1963.

15 NEVES, D. P. Parasitologia humana. 8a ed. São Paulo: Atheneu, 1991.

16 REY, L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

17 EL KOUNI, M. H.; CHA, S. Metabolism of adenosine analogues by *Schistosoma mansoni* and the effect of nucleoside transport inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, v. 36, n. 7, p. 1099-1106, 1987.

18 SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 20, n. 3, p. 341-356, 1983.

19 SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*--VII. inhibition of adenine and guanine nucleotide synthesis by purine analogs in intact worms. *Biochemical Pharmacology*, v. 26, n. 20, p. 1847-1856, 1977.

20 ROSS, A. F.; JAFFE, J. J. Effects of tubercidin and its ribonucleotides on various metabolic pathways in *Schistosoma mansoni*. *Biochemical Pharmacology*, v. 21, n. 22, p. 3059-3069, 1972.

21 JAFFE, J. J.; DOREMUS, H. M.; DUNSFORD, H. A.; KAMMERER, W. S.; MEYMARIAN, E. Antischistosomal activity of tubercidin in monkeys. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 22, n. 1, p. 62-72, 1973.

22 MEYSKENS, F. L.; WILLIAMS, H. E. Adenosine metabolism in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 240, n. 2, p. 170-179, 1971.

23 SENFT, A. W.; SENFT, D. G.; MIECH, R. P. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. II. disposition of adenosine by whole worms. *Biochemical Pharmacology*, v. 22, n. 4, p. 437-447, 1973.

24 CRABTREE, G.W.; SENFT, A. W. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. V. adenosine cleavage enzyme and effects of purine analogues on adenosine metabolism in vitro. *Biochemical Pharmacology*, v. 23, n. 3, p. 649-660, 1974.

25 MIECH, F. P.; SENFT, A. W.; SENFT, D. G. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*--VI adenosine phosphorylase. *Biochemical Pharmacology*, v. 24, n. 3, p. 407-411, 1975.

26 DOVEY, H. F.; MCKERROW, J. H.; WANG, C. C. Action of tubercidin and other adenosine analogs on *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 16, n. 2, p. 185-198, 1985.

27 WILLIAMS-ASHMAN, H. G.; SEIDENFELD, J.; GALLETTI, P. Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochemical Pharmacology*, v. 31, n. 3, p. 277-288, 1982.

28 KOSZALKA, G. W.; KRENITSKY, T. A. 5'-Methylthioadenosine (MTA) phosphorylase from promastigotes of *Leishmania donovani*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 195 pt B, p. 559-563, 1986.

29 SAVARESE, T. M.; HARRINGTON, S.; EL KOUNI, M. H. Adenine nucleoside phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase in *Schistosoma mansoni*. *Journal of Cell Biology*, v. 107, p. 396a, 1989.

30 MILLER R. L.; SABOURIN, C. L.; KRENITSKY, T. A. *Trypanosoma cruzi* adenine nucleoside phosphorylase. Purification and substrate specificity. *Biochemical Pharmacology*, v. 36, n. 4, p. 553-560, 1987.

31 GHODA, L. Y.; SAVARESE, T. M.; NORTHUP, C. H.; PARKS, R. E. JR.; GAROFALO, J.; KATZ, L.; ELLENBOGEN, B. B.; BACCHI, C. J. Substrate specificities of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from *Trypanosoma brucei brucei* and mammalian cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 27, n. 2-3, p. 109-118, 1988.

32 PEGG, A. E.; WILLIAMS-ASHMAN, H. G. Phosphate-stimulated breakdown of 5'methylthioadenosine by rat ventral prostate. *Biochemical Journal*, v. 115, n. 2, p. 241-247, 1969.

33 APPLEBY, T. C.; ERION, M. D.; EALICK, S. E. The structure of human 5'-deoxy-5'methylthioadenosine phosphorylase at 1.7 Å resolution provides insights into substrate binding and catalysis. *Structure*, v. **7**, n. 6, p. 629-641, 1999.

34 SINGH, V.; EVANS, G. B.; LENZ, D. H.; MASON, J. M.; CLINCH, K.; MEE, S.; PAINTER, G. F.; TYLER, P. C.; FURNEAUX, R. H.; LEE, J. E.; HOWELL, P. L.; SCHRAMM, V. L. Femtomolar transition state analogue inhibitors of 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 18, p. 18265-18273, 2005.

35 MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, v. 40, n. Pt4, p. 658-674, 2007.

36 ADAMS, P. D.; AFONINE, P. V.; BUNKOCZI, G.; CHEN, V. B.; DAVIS, I. W.; ECHOLS, N.; HEADD, J. J.; HUNG, L. W.; KAPRAL, G. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; OEFFNER, R.; READ, R. J.; RICHARDSON, D. C.; RICHARDSON, J. S.; TERWILLIGER, T. C.; ZWART, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica D: biological crystallography*, v. 66, n. Pt2, p. 213-221, 2010.

37 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: biological crystallography*, v. 60, pt 12 pt 1, p. 2126-2132, 2004.

38 BRUNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, v. 355, n. 6359, p. 472-475, 1992.

39 CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B., 3RD; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: biological crystallography*, v. 66, n. Pt1, p. 12-21, 2010.

40 LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; Et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structure. *Journal of Applied Crystallography*, v. 26(2), p. 283-291, 1993.

41 LUA, R. C.; LICHTARGE, O. PyETV: a PyMOL evolutionary trace viewer to analyze functional site predictions in protein complexes. *Bioinformatics*, v. 26, n. 23, p. 2981-2982, 2010.

42 COPELAND, R. A. *Enzymes:* a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. New York: Wiley-VCH, 2000.

43 SCHOMBURG, D.; SCHEER, M.; GROTE, A.; CHANG, A.; SCHOMBURG, I.; MUNARETTO, C.; ROTHER, M.; SOHNGEN, C.; STELZER, M.; THIELE, J. BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Research*, v. 39, p. D670-D676, 2011.

44 PAUL, D.; O'LEARY, S. E.; RAJASHANKAR, K.; BU, W.; TOMS, A.; SETTEMBRE, E. C.; SANDERS, J. M.; BEGLEY, T. P.; EALICK, S. E. Glycal formation in crystals of uridine phosphorylase. *Biochemistry*, v. 49, n. 16, p. 3499-3509, 2010.

45 DIEDERICHS, K.; KARPLUS, P. A. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nature Structural Biology*, v. 4, n. 4, p. 269-275, 1997.

46 KUETTEL, S.; GREENWALD, J.; KOSTREWA, D.; AHMED, S.; SCAPOZZA, L.; PEROZZO, R. Crystal structures of *T. b. rhodesiense* adenosine kinase complexed with inhibitor and activator: implications for catalysis and hyperactivation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. **5**, n. **5**, p. e1164, 2011.

47 RUPP, B. Biomolecular crystallography, Summers Scholl edn. Garland Sciense, 2010.

48 DAVIS, I. W.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. Web Server issue, p. W615-619, 2004.

49 RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, v. **7**, p. 95-99, 1963.

50 KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, v. 4, n. 12, p. 1395-1400, 1996.

51 APPLEBY, T. C.; MATHEWS, II; PORCELLI, M.; CACCIAPUOTI, G.; EALICK, S. E. Three-dimensional structure of a hyperthermophilic 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Biological Chemistry* v. 276, n. 42, p. 39232-39242, 2001.

52 HUTCHINSON, E. G.; THORNTON, J. M. PROMOTIF - a program to indentify and analyse structural motifs in protein. *Protein Science*, v. 5, n. 2, p. 212-220, 1996.

53 EMBL-EBI. Pdbsum: a database of the known 3d structures of proteins and nucleic acids. 2004. Disponivel em: http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/. Acesso em: 20 Nov 2011.

54 CACCIAPUOTI, G.; BERTOLDO, C.; BRIO, A.; ZAPPIA, V.; PORCELLI, M. Purification and characterization of 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus: substrate specificity and primary structure analysis. *Extremophiles*, v. 7, n. 2, p. 159-168, 2003.

55 MOZHAEV, V. V.; BEREZIN, I.V.; MARTINEK, K. Structure-stability relationship in proteins: fundamental tasks and strategy for the development of stabilized enzyme catalysts for biotechnology. *CRC Critical Reviews in Biochem*istry, v. 23, n. 3, p. 235-281, 1988.